

Nanoparticules recouvertes de carbohydrates comme biocapteurs de lectines

Nicoleta Bogdan

Thèse
présentée
au
Département de chimie-biochimie

comme exigence partielle au grade de
philosophae doctor (Ph.D.)
Université Concordia
Montréal, Québec, Canada

Février, 2009

© Nicoleta Bogdan, 2009



Library and Archives
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-63458-5
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-63458-5

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

■♦■
Canada

Résumé

Nanoparticules recouvertes de carbohydrates comme biocapteurs de lectines

Nicoleta Bogdan, Ph.D.

Université Concordia, 2009

Les interactions protéines-carbohydrates sont impliquées dans l'adhésion des bactéries à la surface cellulaire. L'utilisation des carbohydrates a permis le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et de biodétection. Comme leurs interactions avec les protéines sont faibles, une amplification de celles-ci est nécessaire.

Cette thèse va aborder une telle approche pour développer un biocapteur. Pour amplifier et optimiser les interactions protéines-carbohydrates cette étude combine l'efficacité des glycodendrimères (GD) pour la reconnaissance de lectines et les propriétés optiques de l'or afin de développer des glyconanoparticules d'or (GNP) comme biocapteurs.

Pour synthétiser les GNP, des dendrimères de type poly(amidoamine) PAMAM sont adsorbés sur des nanoparticules d'or (NP). Puis, les amines terminales de NP sont modifiées avec des carbohydrates (et des fluorophores) par un couplage thio-urée. Les méthodes physico-chimiques de caractérisation ont démontré que des GNP solubles dans l'eau, ayant une taille d'environ 2 nm, avec peu de défauts sur les branches de PAMAM et un bon rapport stœchiométrique N : S sont obtenues. Un titrage des amines terminales avec le TNBS permet de constater les bons rendements du greffage des carbohydrates.

Les GNP ont été utilisées comme biocapteurs pour la détection de lectines végétales et d'une bactérie, *E. coli* par fluorescence et microscopie. Les mesures de fluorescence ont démontré que la surface d'or des GNP est impliquée dans le processus d'atténuation de la fluorescence des lectines par un mécanisme de transfert d'énergie de type SET.

Cette méthode a permis de déterminer les paramètres thermodynamiques et cinétiques de l'interaction lectines-carbohydrates. Les constantes d'affinités de la lectine Con A pour les GNP sont 10 à 100 fois supérieures aux GD. Les paramètres thermodynamiques obtenus montrent une contribution entropique favorable pour les GNP comparée à une contribution entropique défavorable pour les GD lors de la formation du complexe lectine-carbohydrate. Les résultats cinétiques montrent que la formation du complexe lectine-GNP est une réaction biomoléculaire du deuxième ordre ayant une vitesse d'association inférieure aux vitesses contrôlées par diffusion.

Le potentiel de nanoparticules de silice recouvertes de carbohydrates pour la détection des lectines a aussi été montré dans cette thèse. Cependant ces dernières sont moins sélectives envers les lectines.

À mon fils,

Radu Théodor

Remerciements

En tout premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, Pr. Mario Morin à l'UQAM pour m'avoir offert l'opportunité de travailler dans son groupe, pour son encadrement, pour sa confiance, sa disponibilité pendant les expériences et la rédaction de thèse, sa patience et de m'avoir permis de réaliser cette thèse pluridisciplinaire.

Je remercie également Dr. John Capobianco d'avoir accepté d'être mon co-directeur à l'Université Concordia. Je remercie Dr. Marcus Lawrence pour la période quand il a été mon co-directeur à l'Université Concordia.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse Dr. Louis Cuccia et Dr. Yves Gelinat pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Mes remerciements s'adressent aussi à Dr. William Skene qui a assumé le rôle d'examineur externe de cette thèse. Je remercie également Dr. Robert Kilgour d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

*Je remercie le Pr. René Roy pour sa collaboration pour les glycodendrimères. Je tiens à remercier Dr. Charles Dozois pour le don de la bactérie *E. coli*.*

Mes remerciements s'adressent aussi à Danny Bolduc, Marie-Josée Crevier, Francine Paquin pour le support technique au département de chimie de l'UQAM. Je souhaite aussi remercier Denis Flipo et Raymond Mineau pour les images de fluorescence et MEB.

Un remerciement spécial à mon collègue de laboratoire Fabrice Courtel pour les mesures XPS, la bonne ambiance au laboratoire et son amitié.

Une pensée toute particulière pour ma collègue Christelle Médard. Merci pour ton amitié, les bons moments à l'UQAM et pour ton aide en particulier sur les mesures XPS et d'avoir amélioré mon français!

Merci à tous les autres membres, passés et présents, du laboratoire et tout particulièrement à Milena Bozoukova pour la bonne collaboration sur le projet et son amitié.

Je souhaite aussi remercier mes amis pour leur soutien. Un merci spécial à Christophe Chabanier pour le covoiturage à l'INRS.

Un grand merci pour ma famille: mon mari, mes parents, ma sœur, mon frère et leurs familles qui m'ont toujours aidé et soutenue.

Finalement, je souhaite remercier la Fondation UQAM et le FQRNT pour leur support financier.

Table des matieres

Liste des figures.....	xii
Liste des tableaux	xxii
Liste des abreviations.. ..	xxiv
Chapitre 1. Introduction générale.....	1
1.1. Introduction	1
1.2. Carbohydrates dans la reconnaissance des protéines	2
1.2.1. Interactions ligand-récepteur.....	10
1.3. Multivalence et interactions avec des protéines	13
1.3.1. Glycodendrimères	15
1.3.2. Glyconanoparticules d'or	17
1.4. Biocapteurs à base de nanoparticules d'or.....	20
1.5. Détection de protéines par fluorescence	24
1.6. Affinité des carbohydrates multivalents pour les protéines	30
1.7. Interaction carbohydrate-protéine	33
1.8. Objectifs de la thèse.....	34
Chapitre 2. Synthèse de nanoparticules et surfaces recouvertes de carbohydrates.	37
.....	37
2.1. Introduction	37
2.2. Méthodes de synthèse	42
2.2.1. Synthèse des dendrimères PAMAM	42
2.2.1.1. Synthèse de la génération PAMAM G-0.5.....	43
2.2.1.2. Synthèse de la génération PAMAM G0.....	44
2.2.1.3. Synthèse de la génération PAMAM G0.5	45
2.2.1.4. Synthèse de la génération PAMAM G1	46
2.2.1.5. Synthèse de la génération PAMAM G1.5	47
2.2.1.6. Synthèse de la génération PAMAM G2.....	48
2.2.2. Synthèse de glyconanoparticules d'or (GNP).	49

2.2.2.1. Adsorption de PAMAM à la surface de NP	52
2.2.2.2. Greffage de carbohydrates (et de fluorophores) sur les NP.....	53
2.2.2.2.1. Synthèse de carbohydrates (p-ITC- α -D-man)	56
2.2.3. Synthèse de nanoparticules stabilisées par le 1-dodécane-thiol	57
2.2.4. Fonctionnalisation de NPSi avec des carbohydrates	58
2.2.4.1. Introduction	58
2.2.4.2. Greffage de silanes sur les NPSi.....	60
2.2.4.3. Greffage de carbohydrates sur les NPSi	61
2.2.5. Fonctionnalisation de plaques de verre avec des carbohydrates	62
2.2.5.1. Introduction	62
2.2.5.2. Greffage de silanes à la surface de plaques de verre	64
2.2.5.3. Greffage de carbohydrates à la surface de plaques de verre	65
2.3. Techniques de caractérisation de nanoparticules d'or. Conditions expérimentales ...	66
2.3.1. Analyse UV- VIS	66
2.3.1.1. Évaluation du taux de greffage de carbohydrates par titrage avec le TNBS.....	67
2.3.1.2. Évaluation du nombre de moles de fluorophores greffées sur les NP	68
2.3.2. Analyse par TGA et DTA	70
2.3.3. Analyse par FTIR	71
2.3.4. Analyse par XPS	72
2.3.5. Analyse par MEB	74
2.3.6. Analyse par TEM	75
2.3.7. Analyse par DLS	76
2.4. Applications de nanoparticules pour la reconnaissance moléculaire	77
2.4.1. Spectroscopie de fluorescence.....	77
2.4.2. Séparation des protéines par l'électrophorèse SDS-PAGE.....	78
2.4.3. Détection de la bactérie <i>E. coli</i>	82
2.4.3.1. Immobilisation de la poly(lysine).....	82
2.4.3.2. Immobilisation et marquage de <i>E. Coli</i> par les GNP fluorescentes	83

Chapitre 3. Caractérisation des nanoparticules	85
3.1. Introduction	85
3.2. Caractérisation de nanoparticules d'or	85
3.2.1. Détermination de la taille de nanoparticules d'or	87
3.2.2. Plasmon de surface de nanoparticules dans le spectre UV-VIS.....	90
3.2.3. Étude du greffage de PAMAM et de carbohydrates sur les NP par FTIR.....	93
3.2.4. Détermination de la fraction organique par TGA et DTA	101
3.2.5. Calcul du taux de greffage de carbohydrates par titrage avec le TNBS.....	114
3.2.6. Évaluation du nombre de moles de fluorophores greffés sur les NP	115
3.2.7. Détermination du rapport N : S par XPS.....	116
3.3. Caractérisation de nanoparticules de silice.....	121
3.3.1. Étude du greffage du silane et de carbohydrates par FTIR	122
3.3.2. Calcul du taux de greffage des carbohydrates sur la silice par titrage avec le TNBS.....	126
3.3.3. Détermination de la fraction organique à la surface de silice par TGA.....	126
3.3.4. Évaluation de la taille de particules de silice par MEB.....	129
3.4. Conclusion	130
Chapitre 4. GNP pour la reconnaissance des lectines	131
4.1. Introduction	131
4.2. Étude de la formation du complexe lectine-GNP	131
4.2.1. Sélectivité de Con A pour les GNP de type mannose.....	132
4.2.2. Immunoprécipitation des lectines suivie par UV-VIS	134
4.2.3. Étude de la taille du complexe lectine-GNP par DLS et TEM	140
4.3. Détection de lectines par fluorescence	143
4.3.1. Étude du transfert d'énergie par FRET	145
4.3.1.1. Résultats et discussion.....	146
4.3.2. Étude du transfert d'énergie par SET	153
4.3.2.1. Résultats et discussion.....	154
4.3.2.2. Inhibition du transfert d'énergie par SET.....	157
4.4. Conclusion	159

Chapitre 5. Détermination de paramètres thermodynamiques et cinétiques de la formation du complexe lectine-GNP par fluorescence	163
5.1. Introduction	163
5.2. Variation de la fluorescence des lectines avec la concentration de GNP	164
5.3. Détermination de constantes d'affinité pour le complexe lectine-GNP	171
5.3.1. Introduction	171
5.3.2. Résultats et discussion.....	171
5.4. Stœchiométrie du complexe Con A-GNP.....	182
5.5. Paramètres thermodynamiques pour le complexe Con A-GNP	185
5.5.1. Introduction	185
5.5.2. Résultats et discussion.....	186
5.6. Cinétique de la formation du complexe Con A-GNP.....	197
5.6.1. Introduction	197
5.6.2. Résultats et discussion.....	198
5.7. Conclusion	209
Chapitre 6. Applications des GNP en électrophorèse pour la détection d'<i>E. coli</i> et surfaces de silice recouvertes des carbohydrates pour la reconnaissance de lectines.....	210
6.1. Introduction	210
6.2. GNP pour la séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE.....	211
6.3. Marquage de la bactérie <i>E. coli</i> par des GNP fluorescentes	215
6.4. Nanoparticules de silice pour la reconnaissance de lectines	219
6.4.1. Immunoprécipitation de Con A par les particules de silice.....	219
6.4.2. Atténuation de la fluorescence des lectines par les particules de silice	221
6.5. Immobilisation sélective de la lectine Con A-FITC	224
6.6. Conclusion	226
Conclusions générales.....	227
Références.....	230

Liste des Figures

Figure 1.1: Exemples des interactions ligands-récepteurs à la surface cellulaire.....	3
Figure 1.2: Structures de monosaccharides (mannose, fructose et fucose)	5
Figure 1.3: Sites de reconnaissance de la bactérie <i>E. coli</i>	8
Figure 1.4: Interactions entre le α -D-man et huit acides aminés de la bactérie <i>E. coli</i> par des liaisons hydrogène, interactions hydrophobes et liaisons avec les molécules d'eau....	9
Figure 1.5: L'interaction entre le Con A et le Me- α -D-man par des liaisons hydrogène.....	11
Figure 1.6: Régions hydrophobes et polaires des carbohydrates.....	12
Figure 1.7: Interaction hydrophobes entre <i>Con A</i> et le p-NO ₂ - α -D-man (PNM).....	13
Figure 1.8: Interaction entre les récepteurs des protéines et des ligands monovalents et multivalent.....	15
Figure 1.9: Structure de glycodendrimère de type poly(amidoamine) PAMAM de génération 1 (G 1) avec 8 groupements mannoses en surface.....	16
Figure 1.10: Réaction de Brust pour obtenir des nanoparticules d'or recouvertes d'alkylthiols	18
Figure 1.11: Déplacement du plasmon de surface dans le spectre UV-VIS en fonction de la taille de nanoparticules d'or	20
Figure 1.12: Interactions des glyconanoparticules d'or avec des protéines	21
Figure 1.13: Étude de compétitivité par SPR entre les interactions carbohydrates de type mannose de glyconanoparticules d'or et d'une surface SAM et la lectine Con A	23

Figure 1.14: Marquage de la bactérie <i>E. coli</i> par les glyconanoparticules d'or	24
Figure 1.15: Diagramme de Jablonski	25
Figure 1.16: Transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET).....	26
Figure 1.17: Transfert d'énergie entre un fluorophore (FITC) et une surface de nanoparticule métallique d'or (SET)	29
Figure 1.18: Interactions intramolécule entre les récepteurs des toxines bactériennes de Shiga et de Shigalike (SLT) un ligand pentavalent.....	31
Figure 1.19: Formation du complexe tridimensionnel de Con A (gauche) par des interactions intermoléculaires (droite)	32
Figure 2.1: Caractérisation physico-chimique de: (a) nanoparticules d'or recouvertes de PAMAM, carbohydrates et le fluorophore (FITC); (b) silice recouverte de silane et carbohydrate.....	40
Figure 2.2: Applications des nanoparticules recouvertes des carbohydrates et méthodes expérimentales pour: (a) précipitation des lectines; (b) détection d'une bactérie <i>E. coli</i> par les GNP fluorescentes; (c) application de silice recouverte de carbohydrates pour la détection d'une lectine	41
Figure 2.3: Structure du dendrimère de génération G-0.5	43
Figure 2.4: Structure du dendrimère de génération G0	44
Figure 2.5: Structure du dendrimère de génération G0.5.....	45
Figure 2.6: Structure du dendrimère de génération G1	46
Figure 2.7: Structure du dendrimère de génération G1.5	47
Figure 2.8: Structure du dendrimère de génération G2	48

Figure 2.9 Synthèse de nanoparticules d'or stabilisées avec PAMAM de génération G0 (Au-G0) (1) et greffage des carbohydrate (p-ITC- α -D-man) sur les amines terminales de nanoparticules d'or (2).....	51
Figure 2.10: Solubilité de nanoparticules d'or stabilises avec PAMAM dans l'eau suivant l'addition du carbohydrate de type mannose	55
Figure 2.11: Schéma réactionnel pour la synthèse de p-NH ₂ - α -D-man	56
Figure 2.12: Schéma réactionnel pour la synthèse de p-NO ₂ - α -D-man.....	56
Figure 2.13 : Schéma réactionnel pour le greffage de silane sur les NPSi.....	60
Figure 2.14: Greffage de p-ITC- α -D-man sur les groupements amines de silice.....	61
Figure 2.15: Schéma réactionnel pour le greffage de silane à la surface des plaques de verre.....	64
Figure 2.16: Schéma réactionnel pour la réaction entre les amines de NP (Au-G0) et le TNBS	68
Figure 2.17: Processus du balayage de la surface d'un échantillon par MEB.....	75
Figure 2.18: Schéma de fonctionnement d'un microscope confocal.....	84
Figure 3.1: Solubilité de nanoparticules: (a) Au-G0; (b) Au-thiol dans l'eau.....	86
Figure 3.2: Image TEM pour les NP stabilisées avec PAMAM.....	87
Figure 3.3: Image TEM pour les GNP de type mannose	88
Figure 3.4: Distribution de taille de GNP de type mannose	89
Figure 3.5: Spectres UV-VIS des NP: (a) Au-G-0.5; (b) Au-G0.5; (c) Au-G1.5 (0.1 mg/mL dans le méthanol)	91

Figure 3.6: Spectres UV-VIS des NP: (a) Au-G0; (b) Au-G1; (c) Au-G2 (0.1 mg/mL dans le méthanol)	91
Figure 3.7: Spectres UV-VIS des GNP de type mannose: (a) Au-G0-man; (b) Au-G1-man; (c) Au-G2-man (0.1 mg/mL dans le méthanol)	92
Figure 3.8: Spectre UV-VIS pour Au-thiol (0.1 mg/mL dans le toluène)	93
Figure 3.9: Spectres FTIR de: (a) dendrimères PAMAM: (A) G-0.5; (B) G 0.5; (C) G 1.5 et (b) NP: (A) Au-G-0.5; (B) Au-G0.5; (C) Au-G1.5.....	95
Figure 3.10: Spectres FTIR de: (a) dendrimères PAMAM: (A) G0; (B) G1; (C) G2 et (b) NP: Au-G0 (A) ; (B) Au-G1; (C) Au-G2 de génération amine	97
Figure 3.11: Spectres IR pour Au-thiol	98
Figure 3.12: Spectre IR pour le p-ITC- α -D-man.....	100
Figure 3.13: Spectre FTIR pour Au-G0-man: (a) dans le domaine 600-3600 cm^{-1} ; (b) dans le domaine 900-2000 cm^{-1}	101
Figure 3.14: Analyse TGA pour Au-thiol.....	103
Figure 3.15: Analyse (1) TGA et (2) DTA pour les GNP de type mannose: (a) Au-G0-man; (b) Au-G1-man; (c) Au-G2-man.....	105
Figure 3.16: Perte de masse organique évaluée par TGA de NP de génération PAMAM Gn ou n=-0.5, 0, 0.5, 1, 1.5 et 2 (a) avant et (b) après le greffage du carbohydrate de type mannose	106
Figure 3.17: Variation de % TGA organique en fonction du diamètre de nanoparticules d'or, d (nm).....	107
Figure 3.18: Variation du nombre des atomes d'or de nanoparticules d'or en fonction du diamètre, d (nm).....	108

Figure 3.19: Structures d'agrégats d'or: (a) cubooctaèdre avec 459 atomes d'or et (b) icosaèdre avec 561 atomes d'or.....	110
Figure 3.20: Structure d'un cubooctaèdre avec (a) 28 et (b) 55 atomes d'or	110
Figure 3.21: (a) L'aire de surface occupée par une branche G0-mannose et (b) par le dodécane-thiol obtenue expérimentalement par électrochimie à la surface d'or (111)	111
Figure 3.22: Courbe de calibration pour la cystamine pour déterminer le nombre de moles des amines primaires ($\mu\text{mol NH}_2 / \text{mg}$).....	114
Figure 3.23: Spectre XPS pour (a) Au; (b) S; (c) N de Au-G0-man	118
Figure 3.24: Spectres XPS pour (a) Au; (b) S; (c) N de Au-G1-man	119
Figure 3.25: Spectres XPS pour (a) Au ; (b) S ; (c) N de Au-G2-man	120
Figure 3.26: Spectre FTIR de NPSi-OH.....	123
Figure 3.27: Spectre FTIR de silane	124
Figure 3.28: Spectre FTIR de NPSi après le greffage de silane	124
Figure 3.29: Spectre FTIR de NPSi après le greffage de p-ITC- α -D-man.....	125
Figure 3.30: Types de silanol formées après le traitement thermique de silice: un libre (A), un vicinal (B) et un qui forme des ponts siloxane (C).....	127
Figure 3.31: Thermogrammes des (a) NPSi-NH ₂ et (b) NPSi-man.....	128
Figure 3.32: Analyse MEB de NPSi-man.....	129
Figure 4.1: Précipitation de la lectine Con A par les GNP d'or de type mannose: (a) Au-G0-man; (b) Au-G1-man; (c) Au-G2-man après 15 min.....	133
Figure 4.2: Sélectivité des lectines pour les GNP: (a) Au-G0-man, (1 mg/mL); (b) Con A (1 mg/mL); (c) solution (a) mélangée avec (b); (d) solution (c) mélangée avec 1 mL α -D-	

man (200 mg/mL); (e) solution (c) mélangée avec 1 mL α -D-gal (200 mg/mL) (f) WGA (1mg/mL); (g) solution (a) mélangée avec (f).....134

Figure 4.3: Variation de l'absorbance à 490 nm en fonction du temps après le mélange de: A) Con A et les GNP de type mannose (a) Au-G0-man, (b) Au-G1-man, (c) Au-G2-man; B) Con A et les GD de type mannose (a) G0-man, (b) G1-man, (c) G2-man. Des solutions de 1 mg/mL de GNP ou GD ont été mélangées dans des proportions de 1 : 2 avec Con A (1 mg/mL)..... 136

Figure 4.4: Variation de l'absorbance à 490 nm en fonction du temps après le mélange de WGA avec Au-G0-NAcGlc. Une solution de 1 mg/mL en GNP a été mélangée dans une proportion de 1 : 2 avec WGA (1 mg/mL).....137

Figure 4.5: Variation de l'absorbance à 280 nm en fonction du temps après le mélange de (a) PA-IL et Au-G0-gal ; (b) PA-IL et G0-gal Des solutions de 1 mg/mL en GNP ou GD ont été mélangées dans des proportions de 1 : 2 avec PA IL (1 mg/mL)139

Figure 4.6: Compléxation entre les GNP et la lectine Con A.....139

Figure 4.7 Évaluation par DLS du diamètre pour le complexe formé entre Con A (0.1 mg/mL dans PBS) et Au-G0-man (1 mg/mL dans PBS) mélangés en différents rapports (v/v).....142

Figure 4.8: Visualisation de la formation du complexe Con A-Au-G0-man par TEM..143

Figure 4.9: Schéma des mécanismes proposés pour la détection des lectines par fluorescence: (a) FRET ou (b) SET145

Figure 4.10: (a) Spectre d'excitation et (b) d'émission de GNP marqués de FITC (Au-man-FITC) (2.2 μ M); λ_{ex} =490nm, λ_{em} =520nm.....146

Figure 4.11: Variation de la fluorescence (%) de Au-man-FITC (2.2 μ M) en présence de (\diamond) Con A; (\square) Con A-FITC ; (\circ) Con A-RITC (c); λ_{ex} =490 nm, λ_{em} =520 nm148

Figure 4.12: Variation de la fluorescence (%) de Au-man-FITC (2.2 μ M) en présence de (\diamond) WGA ; (\circ) WGA-RITC; λ_{ex} =490nm, λ_{em} =520 nm	149
Figure 4.13: Variation de la fluorescence (%) de Au-NAcGlc-FITC (2.2 μ M) en présence de (\diamond) Con A; (\square) Con A-FITC; (\circ) Con A-RITC (c); λ_{ex} =490 nm, λ_{em} =520 nm.....	150
Figure 4.14: Variation de la fluorescence (%) de Au-NAcGlc-FITC (2,2 μ M) en présence de (\boxtimes) WGA; (\circ) WGA-RITC; λ_{ex} =490nm, λ_{em} =520nm	152
Figure 4.15: Variation de la fluorescence (%) des lectines (\diamond) Con A-FITC (640 nM); (\boxtimes) Con A-RITC (640 nM) en présence de GNP (Au-G0-man) (λ_{ex} =490 nm, λ_{em} =520 nm); (\circ) WGA-RITC (1.84 μ M) en présence de GNP (Au-G0-NAcGlc); λ_{ex} =550 nm, λ_{em} =580 nm.....	154
Figure 4.16: Variation de la fluorescence (%) des lectines (\diamond) Con A-FITC (0.32 μ M), (\boxtimes) Con A-RITC (0.32 μ M) en présence de GNP (Au-G0-man) (λ_{ex} =490 nm, λ_{em} =520 nm); (\circ) WGA-RITC (0.92 μ M) en présence de GNP (Au-G0-NAcGlc); λ_{ex} =550 nm, λ_{em} =580 nm	156
Figure 4.17: Atténuation de la fluorescence (%) de Con A-FITC (0.32 μ M) par Au-G0-man (2.2 μ M) en absence et en présence de mannan (0.0033-3.33 mg/mL).....	158
Figure 4.18: Modèle suggéré pour le transfert d'énergie entre (a) la lectine fluorescente (Con A-FITC) et les GNP de type mannose en absence et (b) en présence de mannan.....	161
Figure 5.1: Atténuation de la fluorescence de Con A-FITC (320 nM) par GNP : (\diamond) Au-G0-man; (\square) Au-G1-man; (\circ) Au-G2-man; λ_{ex} =490 nm, λ_{em} =520 nm.....	166
Figure 5.2: Atténuation de la fluorescence de WGA-RITC (925 nM) par (\diamond) Au-G0-NAcGlc; (\square) Au-G1-NAcGlc; (\circ) Au-G2-NAcGlc; λ_{ex} =550 nm, λ_{em} =580 nm.....	166

Figure 5.3: Réversibilité de l'atténuation de la fluorescence (pourcentage de la valeur initiale) du complexe formé entre Con A-FITC (320 nM) et Au-G0-man de concentrations (◊) 0.22 μM ; (○) 2.2 μM après l'ajout de α-D-man.....	168
Figure 5.4: Atténuation de la fluorescence de Con A-FITC de concentrations: (◻) 320 nM; (◻) 32 nM; (◻) 3.2 nM par les GNP (Au-G0-man); λ _{ex} =490nm, λ _{em} =520nm.....	170
Figure 5.5: Atténuation de la fluorescence (%) de WGA-RITC de concentrations: (◻) 925 nM; (◻) 92.5 nM; (◻) 9.25 nM par les GNP (Au-G0-NAcGlc); λ _{ex} =550 nm, λ _{em} =580 nm.....	170
Figure 5.6: Courbes pour la détermination de K _a pour les complexes entre Con A-FITC (320 nM) et les GNP (L): (◊) Au-G0-man; (◻) Au-G1-man; (○) Au-G2-man	172
Figure 5.7: Courbes pour la détermination de K _a pour les complexes entre WGA-RITC (925 nM) et les GNP (L): (◊) Au-G0-NAcGlc; (◻) Au-G1-NAcGlc; (○) Au-G2-NAcGlc.....	173
Figure 5.8: Courbes pour la détermination de K _a pour les complexes formés entre les GNP (L) Au-G0-man et Con A-FITC de concentration: (◊) 320 nM; (◻) 32 nM; (○) 3.2 nM.....	176
Figure 5.9: Courbes pour la détermination de K _a pour les complexes formés entre les GNP (L) Au-G0-NAcGlc et WGA-RITC de concentration: (◊) 925 nM; (◻) 92.5 nM; (○) 9.25nM.....	176
Figure 5.10: Structure cristallographique pour le complexe trimannoside-Con A. Le groupement central mannose est marqué avec C, le résidu mannose α (1,3) avec 3 et le résidu mannose α (1,6) avec 6	180
Figure 5.11: Structure cristallographique pour le complexe pentamannoside-Con A....	181
Figure 5.12: Courbe de Scatchard pour déterminer le nombre (n) de GNP (L): (◊) Au-G0-man; (◻) Au-G1-man; (○) Au-G2-man par Con A (320 nM).....	184

Figure 5.13: Variation de $\ln(K_a)$ en fonction de $1/T$ pour le complexe entre Con A et: (a) Au-G0-man; (b) Au-G1-man; (c) Au-G2-man	187
Figure 5.14: Désolvatation de carbohydrates et lectines, formation des liaisons hydrogènes et interactions hydrophobes après la fixation des carbohydrates dans le site de lectine.....	191
Figure 5.15: Paramètres thermodynamiques et différents types d'interactions dans les protéines.....	193
Figure 5.16: Paramètres thermodynamiques pour l'interaction entre Con A et (a) Me- α -man; (b) Me- α -Glc; (c) G2-man; (d) Au-G0-man; (e) Au-G1-man; (f) Au-G2-man	194
Figure 5.17: Variation de la fluorescence ($F_0 - F$) en fonction du temps (t) à 24 °C pour le complexe formé entre Con A-FITC et GNP: (a) Au-G0-man; (b) Au-G1-man; (c) Au-G2-man.....	200
Figure 5.18: Variation de A en fonction du temps (t) à 24 °C pour le complexe formé entre Con A-FITC et GNP: (\diamond) Au-G0-man; (\square) Au-G1-man; (\circ) Au-G2-man	201
Figure 5.19: Variation de $\ln(kv/T)$ en fonction de $1/T$ pour le complexe formé entre Con A-FITC et GNP: (a) Au-G0-man; (b) Au-G1-man; (c) Au-G2-man.....	203
Figure 5.20: Profil cinétique de réaction pour le complexe Con A (R)-GNP (L)	206
Figure 5.21: Interaction entre les ions (Ca^{2+} et Mn^{2+}) de Con A et Me- α -D-man.....	208
Figure 6.1: Électrophorèse SDS-PAGE sur le gel de séparation de 12 % pour: (1) Standard (Broad Range) [®] ; (2) Con A; (3) WGA; (4) surnagent et (5) précipité du mélange Con A et WGA avec GNP (Au-G0-man); coloration avec bleu de Coomassie.....	213
Figure 6.2: Électrophorèse SDS-PAGE sur le gel de séparation de 12 % pour : (1) standard (Broad Range) [®] ; (2) Con A-FITC ; (3) mélange Con A-FITC et Au-man-FITC;	

(4) précipité du complexe Con A-Au-man-FITC; (5) Au-man-FITC; Visualisation en fluorescence	214
Figure 6.3: Détection de la bactérie <i>E. coli</i> marquée par les Au-man-FITC en utilisant la microscopie confocale en mode: (a) réflectance; (b) fluorescence.....	217
Figure 6.4: Détection de la bactérie <i>E. coli</i> marquée par Au-gal-RITC en utilisant la microscopie confocale en mode: (a) réflectance; (b) fluorescence.....	217
Figure 6.5: Image MEB pour les bactéries <i>E. coli</i> (a) en absence et (b) en présence de Au-man-FITC	218
Figure 6.6: Variation de l'absorbance à 490 nm en temps pour le complexe formé entre Con A et NPSi-man	220
Figure 6.7: Variation de la fluorescence (%) pour la lectine Con A-FITC (0.05 mg/mL) (a) en absence des particules de silice; (b) en présence de NPSi-OH (0.05 mg/mL); (c) en présence de NPSi-man (0.05 mg/mL) ; $\lambda_{ex}=490nm$, $\lambda_{em}=520nm$	222
Figure 6.8: Variation de la fluorescence (%) pour la lectine WGA-RITC (0.05 mg/mL) (a) en absence des particules de silice; (b) en présence de NPSi-OH (0.05 mg/mL); (c) en présence de NPSi-man (0.05 mg/mL) ; $\lambda_{ex}=550nm$, $\lambda_{em}=580nm$	223
Figure 6.9: Détection de la lectine Con A-FITC (1mg/mL PBS) sur une plaque de silice modifiée avec p-ITC- α -D-man	225

Liste des Tableaux

Tableau 1.1: Exemples des lectines végétales et leurs affinités pour les carbohydrates.....	7
Tableau 2.1: Le nombre des groupes (ester ou amine) en surface et les masses molaires (MW) des dendrimères PAMAM des générations ester (G-0, G0.5 et G1.5) et amine (G0, G1 et G2).....	49
Tableau 2.2: Préparation des solutions d'acrylamide/méthylènebisacrylamide pour l'électrophorèse SDS-PAGE.....	80
Tableau 2.3: Préparation des gels pour l'électrophorèse SDS-PAGE.....	80
Tableau 3.1: Détermination du rapport massique entre la fraction organique et la fraction de l'or pour les nanoparticules d'or de générations PAMAM et Au-thiol par TGA.....	102
Tableau 3.2: Détermination du nombre des moles de NH ₂ /mg pour les NP et GNP de générations G0, G1 et G2 par le titrage TNBS et des rendements (η) de greffage de carbohydrates de type mannose	115
Tableau 3.3: Évaluation du nombre de moles de fluorophores des GNP (Au-man-FITC et Au-gal-RITC) par UV-VIS.....	116
Tableau 3.4: Résultats XPS pour les GNP de type mannose.....	117
Tableau 5.1: Constantes d'affinité (K_a), pour les complexes formés entre Con A-FITC et les GNP (Au-G0-man, Au-G1-man, Au-G2-man) et GD (G0-man, G1-man, G2-man).....	174
Tableau 5.2: Constantes d'affinité (K_a) pour les complexes formés entre WGA-RITC et les GNP (Au-G0-NAcGlc, Au-G1-NAcGlc, Au-G2-NAcGlc).....	175

Tableau 5.3: Constantes d'affinité (K_a) pour les complexes formés entre Con A-FITC (320, 32 et 3.2 nM) et Au-G0-man et entre WGA-RITC (925, 92.5 et 9.25 nM) et Au-G0-NAcGlc177

Tableau 5.4: Paramètres thermodynamiques pour le complexe formé entre Con A-FITC et GNP (Au-G0-Man, Au-G1-man et Au-G2-man) à 23°C188

Tableau 5.5: Paramètres cinétiques pour le complexe formé entre Con A et les GNP (Au-G0-man, Au-G1-man, Au-G2-man) à 24°C205

Liste des Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucleique
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
Asp	Acide aspartique
Au (111)	Plan (111) de l'or
Au-Gn	Nanoparticules d'or recouvertes de PAMAM, n=0, 1, ou 2
Au-Gn-gal	Glyconanoparticules d'or de type galactose, n=0
Au-Gn-man	Glyconanoparticules d'or de type mannose, n=0, 1, 2
Au-Gn-NAcGlc	Glyconanoparticules d'or de type N-acétyle glucosamine, n=0, 1 et 2
Au-thiol	Nanoparticules d'or recouvertes de 1-dodécane-thiol
Con A	<i>Concanavaline A</i>
CPS	Intensité
DLS	Analyse par diffusion de la lumière
DTA	Analyse thermique différentielle
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDX	Analyse de Rayons-X par dispersion d'énergie
ELLA	Tests d'inhibition (<i>Enzyme-linked-lectin assay</i>)
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
FRET	Transfert d'énergie par résonance de type Förster
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
fuc	Fucose
gal	Galactose
GD-man	Glycodendrimère de type mannose
Gln	Glutamine
Glu	Acide glutamique
Gn	Génération dendrimère, n=-0.5, 0, 0.5, 1, 1.5 ou 2
GNP	Glyconanoparticules d'or
ITC	Microcalorimétrie (<i>Isothermal Titration Microcalorimetry</i>)

K _a	Constante d'association
K _d	Constante de dissociation
kDa	Kilodalton
k _v	Constante de vitesse
Leu	Leucine
man	Mannose
MCBL	Microscopie confocale de fluorescence
MEB	Microscopie électronique à balayage
Me-Umb-man	4-Méthyleumbelliferyle- α -D-mannopyranoside
Me- α -D-man	Méthyle- α -D-mannopyranoside
NAcGal	N-acétyle galactosamine
NAcGlc	N-acétyle glucosamine
NP	Nanoparticules d'or
NPSi	Nanoparticules de silice
NPSi-man	Nanoparticules de silice recouvertes de mannose
NPSi-NH ₂	Nanoparticules de silice recouvertes de 3-aminopropyle-triéthoxysilane
NPSi-OH	Nanoparticules de silice activées avec des groupements hydroxyle
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA-IL et PA-IIL	Lectines de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMAM	Dendrimère de type poly(amidoamine)
PBS	Tampon salin
p-ITC- α -D-man	p-Isothiocyanatophényle α -D-mannopyranoside
p-ITC- β -D-gal	p-Isothiocyanatophényle β -galactopyranoside
p-ITC- β -D-NAcGlc	p-Isothiocyanatophényle N-acétyle- β -D-glucosamine
p-NH ₂ - α -D-man	p-Aminophényle α -D-mannopyranoside
p-NO ₂ - α -D-man	p-Nitrophényle α -D-mannopyranoside
QD	Points quantiques (quantum dots)
RITC	Tétrarhodamine isothiocyanate
SAM	Monocouches auto-assemblées d'or

SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de poly(acrylamide)
Ser	Sérine
SET	Transfert d'énergie de surface
Silane	3-aminopropyle-triéthoxysilane
SP	Plasmon de surface
SPR	Spectroscopie de résonance de plasmons de surface
TEM	Microscopie à transmission électronique
TGA	Analyse par thermogravimétrie
TNBS	Acide trinitrobenzène sulfonique
Tyr	Tyrosine
UV-VIS	Spectroscopie ultraviolet-visible
WGA	Agglutinine de germe de blé (<i>Wheat germ agglutinin</i>)
XPS	Spectroscopie de Photoélectrons X
α -D-man	α -D-mannopyranoside
β -D-gal	β -D-galactopyranoside
β -D-NAcGlc	β -D-N-acétyle glucosamine
ε	Coefficient d'extinction molaire
λ	Longueur d'onde

Chapitre 1. Introduction générale

1.1. Introduction

Les glycoprotéines présentes à la surface des cellules sont impliquées dans un ensemble de processus biochimiques dont les infections bactériennes et virales ainsi que dans la propagation de cellules cancéreuses. Ceux-ci impliquent des protéines ayant une affinité plus ou moins sélective envers des carbohydrates qui sont appelés lectines. Le grand nombre de processus dans lesquels les carbohydrates de glycoprotéines sont impliqués a mené au développement de stratégies thérapeutiques (médicaments, vaccins) et de biodétection impliquant des molécules synthétiques ayant des carbohydrates. Dans cette thèse, une telle approche est développée et validée par la détection de lectines et d'une bactérie.

Dans ce chapitre, une revue de la littérature sera présentée en portant une attention particulière sur les aspects physico-chimiques des interactions entre carbohydrates et lectines. Le rôle de la multivalence est examiné et plus spécifiquement, l'utilisation d'une catégorie de molécules, les glycodendrimères, est détaillée ainsi que l'utilisation de nanoparticules. Ensuite, des méthodologies de détection de lectines impliquant des carbohydrates sont décrites. L'emphase est aussi mise sur l'utilisation de la fluorescence comme mode de détection. Les objectifs de la thèse, la méthodologie choisie sont finalement décrits.

1.2. Carbohydrates dans la reconnaissance des protéines

Les carbohydrates sont un des produits de la photosynthèse et ils sont des composés essentiels pour les organismes vivants car ils représentent une réserve d'énergie pour les plantes et pour les animaux. Les carbohydrates sont des molécules biologiques qui se trouvent en nature sous forme de monosaccharides (glucose, fructose, etc.), ou bien sous forme de polysaccharides (cellulose, amidon).

De plus, les carbohydrates sont impliqués dans la reconnaissance moléculaire en interagissant avec des protéines. Cette interaction se produit par l'intermédiaire de récepteurs ayant une affinité particulière pour un type de carbohydrates. Comme il est montré dans la Figure 1.1, cette spécificité découle d'une interaction entre récepteurs et ligands sur la surface cellulaire. Celle-ci se distingue donc de l'adhésion non spécifique de protéines, due notamment à des interactions de van der Waals ou bien d'interactions électrostatiques.

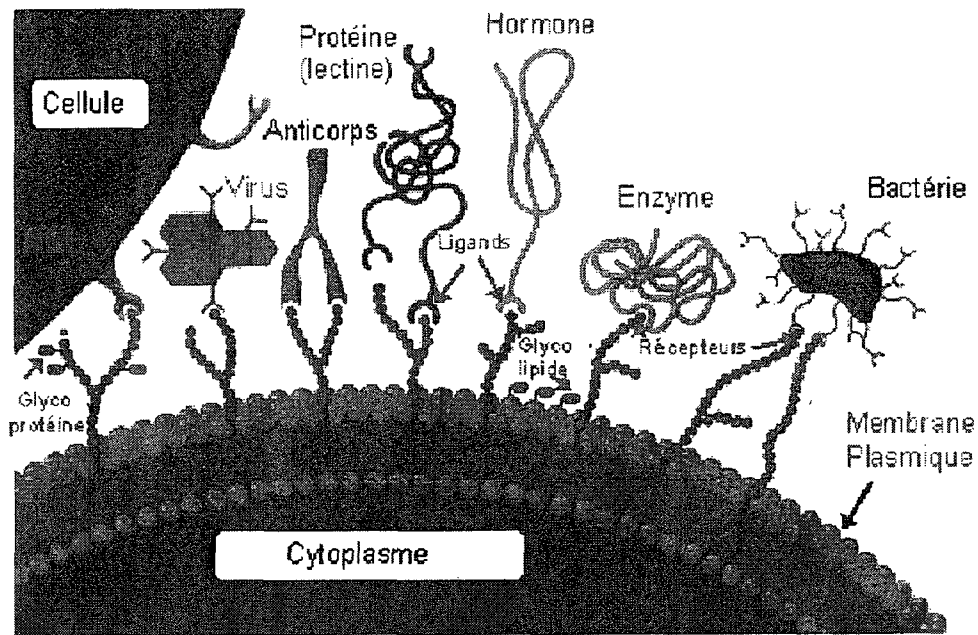


Figure 1.1: Exemples des interactions ligands-récepteurs à la surface cellulaire [1].

La Figure 1.1 montre des exemples d'interactions ligand-récepteur. Un de ces exemples est l'interaction entre carbohydrates (récepteurs) et les protéines (ligands). Comme l'illustre la Figure 1.1, la surface extracellulaire des membranes est recouverte de carbohydrates liés de façon covalente à des protéines formant les glycoprotéines. Ces dernières fonctionnent comme une barrière de diffusion appelée glycocalyx. Elles servent de récepteurs à la surface des cellules de mammifères et des agents pathogènes (virus, bactéries) et elles se lient de façon spécifique avec certaines molécules (lectines, hormones) ou, elles sont glycoconjuguées d'une autre cellule, ce qui, dans ce cas, permet la communication entre cellules.

Les lectines sont des protéines qui interagissent spécifiquement avec des carbohydrates [2-4]. Les carbohydrates peuvent être sous forme de monosaccharides, d'oligosaccharides, de glycoprotéines ou de glycolipides. Les lectines sont impliquées dans la communication entre les cellules ainsi que dans les interactions entre les carbohydrates et les protéines à la surface des cellules favorisant ainsi l'adhésion d'agents pathogènes (virus, bactéries) aux cellules saines [5, 6]. Les surfaces de lectines présentent généralement plusieurs sites de liaison pouvant reconnaître des carbohydrates. Le site principal se lie spécifiquement aux monosaccharides, alors que les sites secondaires ou les sites hydrophobes montrent une spécificité pour les oligosaccharides [7]. Par conséquent, l'interaction des lectines avec les carbohydrates multivalents à la surface des cellules cause l'agrégation des cellules. Ce phénomène est appelé hémagglutination dans le cas de globules rouges. L'agglutination est, en général, utilisée pour la détection et la caractérisation des cellules. En présence des carbohydrates spécifiques et multivalents, les lectines précipitent. L'agglutination et la précipitation des lectines peuvent être inhibées en utilisant des carbohydrates spécifiques pour ces lectines.

Les lectines sont classées en fonction de leur spécificité par rapport aux carbohydrates [2] ou de leur origine soit végétale, bactérienne et animale (comme les galectines qui sont spécifiques pour le galactose). Ces lectines sont formées de plusieurs monomères, pas nécessairement identiques, ayant une masse moléculaire qui ne dépasse pas 40 kDa. L'affinité des lectines pour les monosaccharides (de l'ordre de 1 mM) est généralement plus faible en comparaison avec leur affinité pour les oligosaccharides (de l'ordre du μM) [8].

À la surface des cellules, les oligosaccharides sont formés de plusieurs unités de monosaccharides. Certains monosaccharides présentent une topologie semblable. Par exemple, les lectines qui reconnaissent le galactose se lient aussi au N-acétyl galactosamine. Certaines lectines, comme la PA IIL de *Pseudomonas aeruginosa*, présentent aussi une affinité pour plusieurs monosaccharides (mannose, fructose et fucose) ayant des structures différentes mais avec des fonctions hydroxyles avec une topologie très similaire, tel que présenté dans la Figure 1.2.

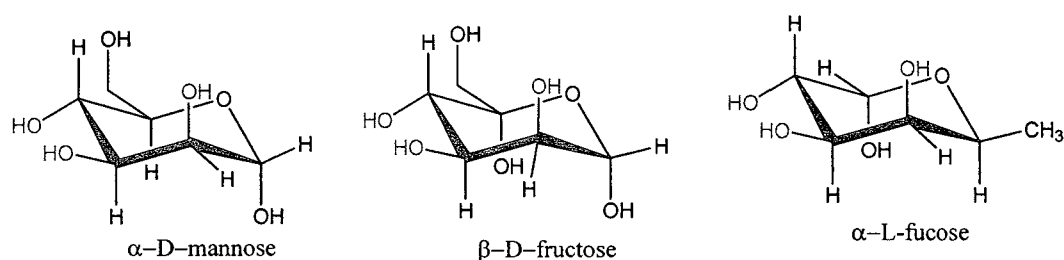


Figure 1.2: Structures de monosaccharides (mannose, fructose et fucose).

Les lectines végétales sont produites par les plantes légumineuses (pois, fèves, haricots, arachides, etc.). Le Tableau 1.1 présente quelques exemples de lectines végétales et leurs spécificités pour les carbohydrates [9].

La lectine Concanavoline A (Con A) utilisée dans cette étude, est produite par le haricot sabre (*Concanavalia ensiformis*). Elle a été isolée en 1919 par Sumner, qui a également démontré sa spécificité pour les carbohydrates [10]. La découverte de cette lectine a joué un rôle important pour élucider la spécificité du groupe sanguin. Con A a une structure de

homotétramère composée de quatre sous-unités identiques de 26 kDa pour une masse totale d'approximativement 104 kDa. Chaque sous-unité est liée à deux ions métalliques, soit Ca^{2+} et Mn^{2+} . À pH 7, les tétramères sont formés préférentiellement alors qu'aux pH plus acides (pH 4.5 à 5.6) il y a la formation de dimères seulement. Con A présente une sélectivité pour des groupes de α -D-mannose (α -D-man) et α -D-glucose (α -D-Glc) de forme pyranose. Un tétramère de Con A pourra donc se lier en même temps à quatre carbohydrates.

Une autre lectine utilisée dans cette étude, le *Wheat germ agglutinin* (WGA), est isolée du *Triticum vulgare*. Cette lectine d'une masse moléculaire de 36 kDa est un dimère formé de deux sous-unités identiques. La lectine WGA présente une sélectivité pour le N-acétyl glucosamine (NAcGlc) et l'acide sialique.

Tableau 1.1: Exemples des lectines végétales et leurs affinités pour les carbohydrates.

Source de lectine	Abréviation	Affinité
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	β -D-gal-(1 \rightarrow 3)-D-NAcGal
<i>Canavalia ensiformis</i>	Con A	α -D-man > α -D-Glc
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	α -D-NAcGal
<i>Griffonia simplicifolia</i>	GSA-II	α et β -NAcGlc
<i>Griffonia simplicifolia</i>	GSA IB4	α -D-galactose
<i>Glycine max</i>	SBA	α -D-NAcGal > β -D-NAcGal
<i>Lens culinaris</i>	LCA	α -D-man > α -D-Glc
<i>Lotus tetragonolobus</i>	LTA	α -L-fucose
<i>Ricinus communis</i>	RCA-I	β -D-gal-(1 \rightarrow 4)-D-NAcGlc
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	NAcGlc > acide sialique
<i>Ulex europaeus</i>	UEA-I	α -L-fucose

Les lectines, présentes à la surface des bactéries, sont impliquées dans l'adhésion bactérienne aux glycoprotéines à la surface cellulaire. Cette adhésion représente la première étape dans le processus d'infection d'une cellule [11]. Les lectines sont des facteurs de virulence. Certaines bactéries pathogènes mutantes qui n'ont pas de lectines sont incapables d'initier l'infection [12]. Après l'adhésion, les bactéries s'agglutinent et forment un biofilm qui est une matrice de polymère hydratée. Ce biofilm donne une certaine résistance des bactéries aux antibiotiques. Les lectines bactériennes sont sur des

fimbriae (pilis), qui sont des organelles qui assurent la mobilité des lectines dans le milieu, afin de reconnaître la surface d'une cellule.

L'adhésion de la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*), qui est un pathogène humain, se produit par l'intermédiaire des fimbriae de type I avec des domaines de lectines favorisant l'adhésion à l'épithélium de l'appareil urinaire [13, 14]. Les lectines d'*E. coli* ont des sites de reconnaissance différents (FimH, FimC). Par exemple, le FimH représenté dans la Figure 1.3 est spécifique pour le mannose. La structure du complexe avec le mannose est illustrée sur la Figure 1.4 [15]. Cette spécificité sera utilisée pour vérifier l'efficacité des biocapteurs développés lors de cette étude.

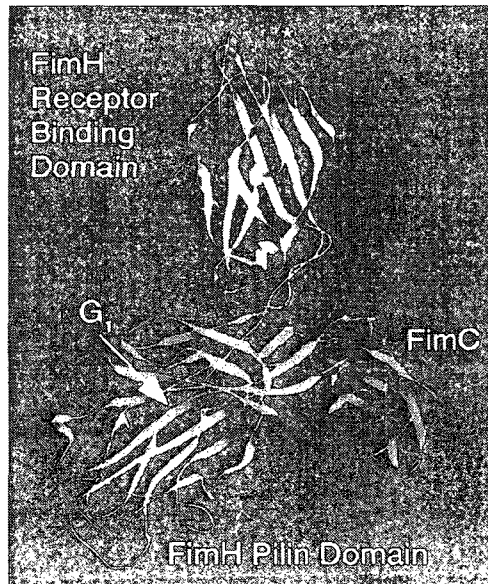


Figure 1.3: Sites de reconnaissance de la bactérie *E. coli* [15].

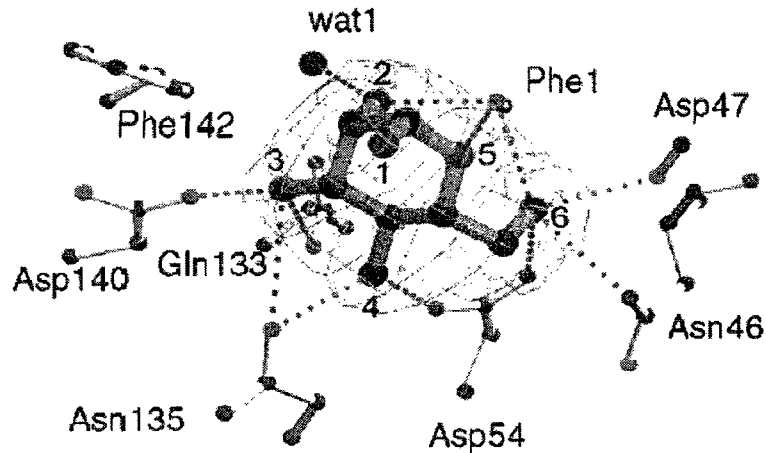


Figure 1.4: Interactions entre le α -D-man et huit acides aminés de la bactérie *E. coli* par des liaisons hydrogène, interactions hydrophobes et liaisons avec les molécules d'eau [15].

Une autre bactérie, qui produit deux lectines dont une sera étudiée, est la *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Elle cause des infections du système respiratoire, de l'appareil urinaire et gastro-intestinal. Elle peut causer la mortalité chez les nouveaux-nés car la bactérie a une résistance aux antibiotiques [16]. Dans le cas de patients atteints de fibrose kystique la mortalité est d'environ 50%. La bactérie PA, possède des fimbriae de type IV qui lui permettent de se lier à la surface des cellules. Elle produit deux lectines solubles qui sont associées aux facteurs de virulence de la bactérie. La lectine PA IL (12.7 kDa) a une spécificité pour le galactose et possède une constante d'association de $3.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ [17]. La lectine PA IIL (11.7 kDa) possède une sélectivité forte pour le fucose tel que le montre une constante d'affinité de $1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ [18]. Les deux lectines sont des tétramères et elles sont présentes dans le cytoplasme et sur la paroi extracellulaire de la bactérie et se lient aux carbohydrates de glycoconjugués [19]. PA IL et PA IIL sont

impliquées dans la formation du biofilm et dans l'adhérence de PA aux cellules épithéliales des patients atteints de fibrose kystique. Les interactions entre la bactérie et le biofilm sont responsables de l'infection des poumons par la bactérie PA [20]. La formation du biofilm consiste en une étape d'adhésion des bactéries à la surface des poumons, suivis de la prolifération et l'agglomération des bactéries [20]. Ce biofilm donne une résistance aux anticorps et une protection contre la pénétration des antibiotiques. La lectine PA IL sera aussi utilisée pour valider le biocapteur synthétisé.

1.2.1. Interactions ligand-récepteur

Plusieurs études ont permis de mieux comprendre les processus de reconnaissance impliquant les carbohydrates. Ces processus sont complexes et impliquent un équilibre entre la formation de liaisons d'hydrogène, d'interactions de van der Waals, d'interactions hydrophobes, et d'interactions électrostatiques. Les molécules d'eau forment des liens hydrogènes avec le ligand. Les acides aminés ont des groupes NH et CO qui sont impliqués dans les liaisons avec le ligand par des liaisons hydrogène et des interactions électrostatiques. Les interactions électrostatiques et la coordination avec des ions métalliques sont moins souvent impliquées dans l'interaction.

Les liaisons hydrogène sont fortement impliquées dans la spécificité et l'affinité des carbohydrates pour les protéines. Elles dépendent, en général, des interactions entre les hydroxyles de carbohydrates et les chaînes latérales d'acides aminés de la protéine tels que l'acide aspartique (Asp), de l'asparagine (Asn), de l'acide glutamique (Glu), de la

glutamine (Gln), de l'arginine (Arg), des résidus de sérine (Ser), de tyrosine (Tyr) et de leucine (Leu). Le groupement hydroxyle des carbohydrates possède l'avantage d'avoir un degré de rotation autour de l'angle de torsion de C-OH, ce qui permet une meilleure orientation et mène à une meilleure spécificité [5].

Par exemple, sur la Figure 1.5, l'oxygène en position 3 (O3) du groupement hydroxyle du mannose forme une liaison hydrogène avec Arg 228 de la lectine Con A [2]. Les oxygène en position 4 et 6 (O4) et (O6) forment des liaisons hydrogène avec Asp206, O4 et O6 une liaison hydrogène avec Asn 14 et Tyr 100.

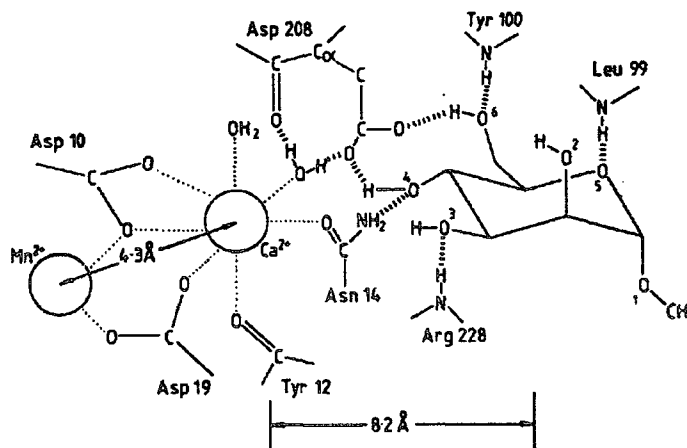


Figure 1.5: L'interaction entre le Con A et le Me- α -D-man par des liaisons hydrogène. [2].

Les interactions de van der Waals sont aussi impliquées dans les interactions hydrophobes. Même si les carbohydrates sont des molécules polaires, la disposition des

groupements hydroxyles, tel qu'illustré dans la Figure 1.6, cause la formation de régions hydrophobes à leurs surfaces. Ceci favorise les contacts avec les chaînes latérales hydrophobes des protéines [21, 22].

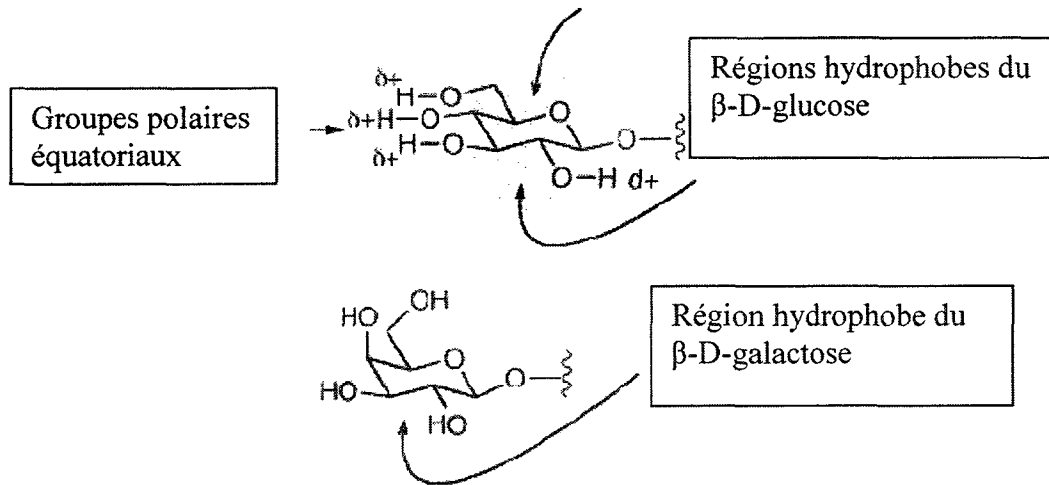


Figure 1.6: Régions hydrophobes et polaires des carbohydrates [21].

La Figure 1.7 présente l'interaction entre la lectine Con A et le p-NO₂-α-D-man. Il y a des interactions par des liaisons hydrogène entre les acides aminés de la protéine (Asn14 et Asp208, Arg228, Leu99 et Tyr100) avec le sucre et aussi des interactions de van der Waals entre la Tyr12, Leu99 et Tyr100 et le groupement hydrophobe phényle du p-NO₂-α-D-man [7]. La présence du groupe phényle hydrophobe sur p-NO₂-α-D-man augmente l'affinité pour la lectine Con A de 10 fois comparé à celle de α-D-man [23, 24].

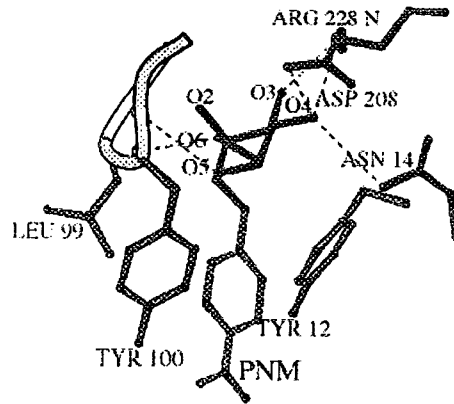


Figure 1.7: Interaction hydrophobes entre *Con A* et le p-NO₂-α-D-man (PNM) [7].

Les molécules d'eau jouent aussi un rôle important. Les interactions non polaires impliquent la libération de molécules d'eau. En relâchant plusieurs molécules d'eau, le système est stabilisé d'un point de vue entropique et énergétique car les interactions entre molécules d'eau et résidus non polaires ne sont pas favorables. Pour les interactions polaires, les molécules d'eau peuvent se lier par des liaisons hydrogène avec les ligands et récepteurs.

1.3. Multivalence et interactions avec des protéines

Les carbohydrates jouent un rôle important dans le système immunitaire. Des approches synthétiques ont été développées pour utiliser les carbohydrates comme inhibiteurs d'adhésion de bactéries sur les cellules saines et aussi pour diminuer la propagation de cellules tumorales. Ces approches utilisent des ligands multivalents pour augmenter l'affinité faible (de l'ordre du mM) entre monosaccharides et protéines [24]. Le concept

de multivalence est inspiré de la nature car les ligands et récepteurs qui sont à la surface des cellules sont multivalents [25].

Des oligosaccharides ont donc été synthétisés et utilisés comme une alternative aux traitements utilisant des monosaccharides. Les tests d'inhibition ont montré une plus grande affinité des oligosaccharides comparée aux monosaccharides [20, 26]. Des oligosaccharides synthétiques ont été utilisés dans le traitement de diverses maladies telles que les infections bactériennes et virales [20], les déficits immunitaires, l'arthrite, l'inflammation et le cancer [27].

D'autres approches multivalentes posant moins de défis synthétiques que la synthèse d'oligosaccharides ont été développées pour augmenter l'affinité entre les carbohydrates et les protéines. La discussion qui suit porte sur l'effet de la multivalence sur la spécificité des interactions carbohydrates-protéines ainsi que l'utilisation de carbohydrates multivalents pour la reconnaissance des protéines, l'inhibition et la détection.

De nombreuses études montrent que les molécules multivalentes, géométriquement bien organisées ayant une structure ouverte terminée par des carbohydrates en surface, augmentent la reconnaissance moléculaire des protéines qui ont plusieurs récepteurs tel que montré dans la Figure 1.8. Cependant, plus ce type de molécule est flexible, plus la perte d'entropie sera grande et l'interaction des carbohydrates aux récepteurs de protéines sera moins favorable [25].

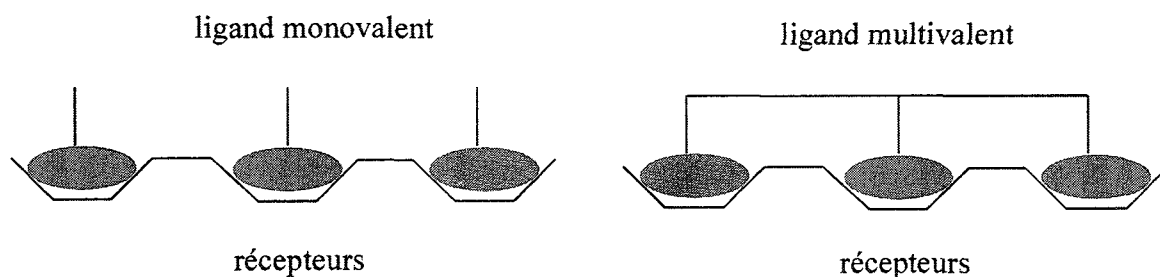


Figure 1.8: Interaction entre les récepteurs des protéines et des ligands monovalents et multivalents.

1.3.1. Glycodendrimères

Les dendrimères [28-35] sont une classe de molécules qui possèdent un ensemble de propriétés structurales, ce qui en fait un bon choix pour la synthèse de glycomolécules multivalentes. Les dendrimères sont des molécules ayant un noyau sur lequel sont attachées successivement des branches ayant des groupes fonctionnalisés. À la fin de chaque réaction, une nouvelle génération ayant un nombre croissant de branches identiques est obtenue. Deux types de méthodes de synthèse sont utilisées pour obtenir des dendrimères: la synthèse divergente [28, 31] et la synthèse convergente [29]. La synthèse divergente s'effectue à partir du cœur vers la périphérie, en greffant de petites molécules sur la surface du dendrimère. La synthèse convergente consiste à construire le dendrimère de la périphérie vers le cœur à l'aide d'unités dendritiques qui sont rattachées ensemble, par un cœur, dans l'étape finale de synthèse. Des carbohydrates peuvent être

greffés à la surface des dendrimères, ce qui forme une classe de molécules nommées glycodendrimères dont la structure est illustrée dans la Figure 1.9.

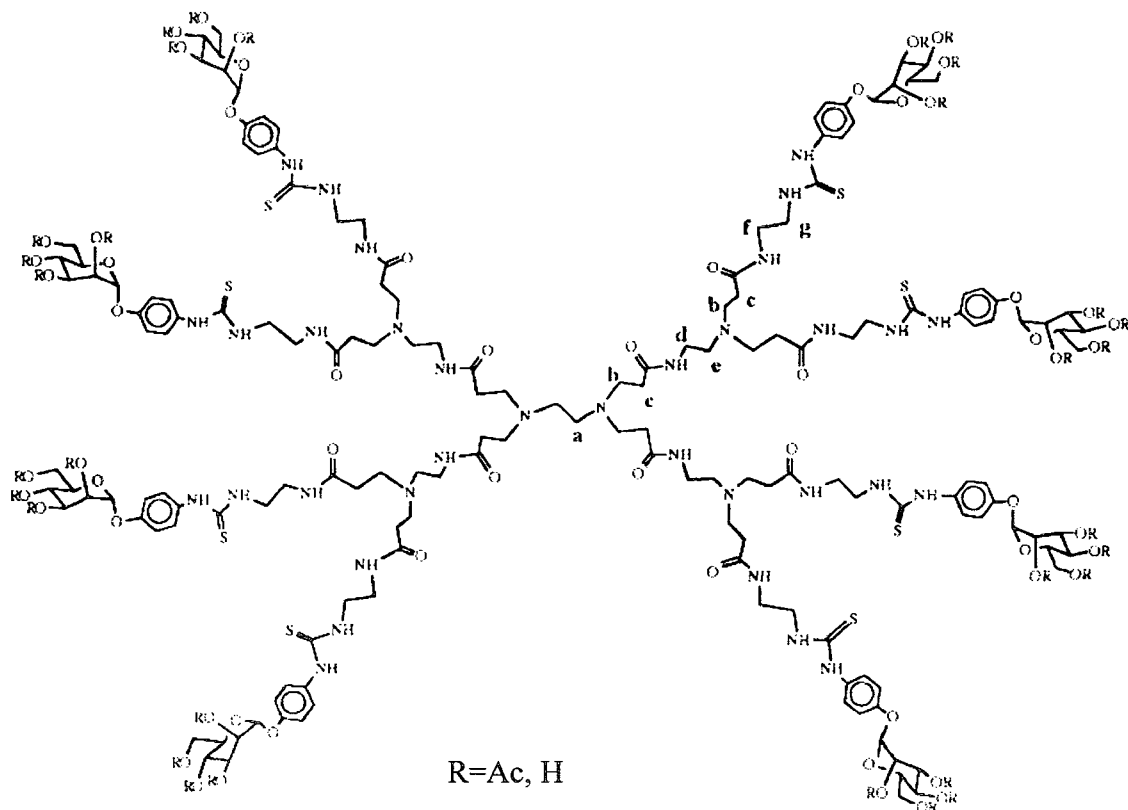


Figure 1.9: Structure du glycodendrimère de type poly(amidoamine) PAMAM de génération 1 (G 1) avec 18 groupements mannoses en surface [24].

Présentement, les glycodendrimères sont surtout formés à partir de dendrimères de type poly(amidoamine) (PAMAM) obtenus par la méthode divergente [24]. Les amines terminales des dendrimères servent à greffer des carbohydrates par l'intermédiaire de groupements isothiocyanates [23, 24, 36-38]. Les dendrimères PAMAM présentent l'avantage d'être faciles à synthétiser et ils sont même disponibles commercialement.

D'autres glycodendrimères de type poly(propylène imine) similaires aux PAMAM ont été synthétisés [39]. Les glycodendrimères PAMAM ont été utilisés pour l'agglutination de lectines [24, 40] et l'inhibition de la bactérie *E. Coli* [37, 41]. Les glycodendrimères ont été aussi testés comme vaccins [42, 43] dans le traitement d'infections pathogènes [6, 44] et du cancer [42, 45, 46].

L'efficacité des glycodendrimères à reconnaître des protéines augmente avec la génération de glycodendrimères, où G_n ($n=0, 1, 2, 3, \text{etc.}$) correspond à la génération de dendrimères. Les générations inférieures de glycodendrimères (G_0, G_1 et G_2) ont des structures ouvertes avec peu de défauts mais elles présentent moins de carbohydrates en surface que les générations supérieures ($G_3, G_4, \text{etc.}$). Toutefois, l'augmentation du nombre des carbohydrates en surface pour les générations supérieures diminue la reconnaissance moléculaire à cause de l'encombrement stérique [24]. Pour ces raisons, l'amplification de la reconnaissance par les glycodendrimères est limitée.

1.3.2 Glyconanoparticules d'or

Des alkylthiols terminés par des carbohydrates adsorbées sur des nanoparticules d'or [47] ou sur des plaques recouvertes d'or sous forme des monocouches auto-assemblées (SAM) [48, 49] ont été utilisées comme approches multivalentes. Les propriétés optiques et catalytiques de l'or, des nanoparticules d'or et des structures SAM ont été utilisées dans le développement de sondes biomédicales ou chimiques.

La première méthode développée pour obtenir des nanoparticules d'or est la méthode de réduction de l'acide tétrachloroaurique (HAuCl_4) en présence du citrate de sodium [50, 51]. En utilisant cette méthode, des particules avec un diamètre variant entre 10 et 100 nm peuvent être obtenues. Plusieurs méthodes de synthèse de nanoparticule d'or relativement simples ont été développées et elles permettent de mieux contrôler la taille des particules. La méthode la plus utilisée est celle de Brust [52] qui est schématisée dans la Figure 1.10. Cette méthode utilise comme ligand le thiol car le soufre se lie de façon covalente à l'or. Pour cette réaction, une solution aqueuse de l'acide tétrachloroaurique, (HAuCl_4) est transférée à une solution de bromure de tétraoctylammonium dans le toluène qui agit comme surfactant. Par la suite, l'or est réduit par le réducteur NaBH_4 en présence de dodécane-thiol [52].

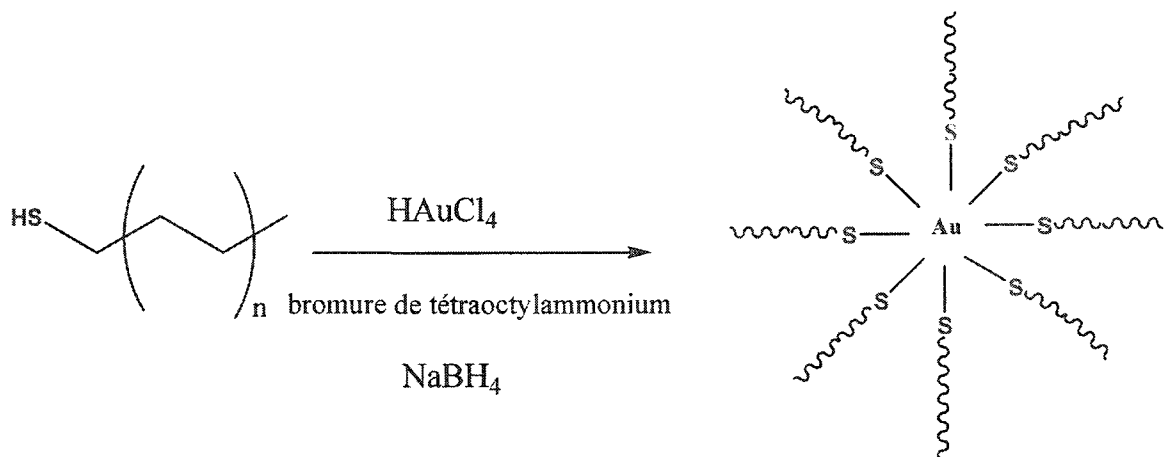


Figure 1.10: Réaction de Brust pour obtenir des nanoparticules d'or recouvertes d'alkylthiols.

La méthode de Brust permet la synthèse de nanoparticules d'or stables et avec une distribution réduite de leur taille. Cependant, ces nanoparticules sont insolubles dans

l'eau. La synthèse de nanoparticules d'or peut également être effectuée dans une solution de méthanol-eau en utilisant des thiolates solubles dans l'eau [53]. Plus tard, Murray a rapporté la synthèse de nanoparticules d'or solubles en utilisant comme stabilisateur le tiopronin qui est un acide aminé [54]. Pour obtenir des nanoparticules d'or solubles dans l'eau, des dendrimères de type poly(amidoamine) PAMAM ont été adsorbés à la surface d'or [55]. La synthèse se déroule dans le méthanol et des particules de 2-3 nm sont obtenues. Ces nanoparticules sont solubles dans l'eau.

Les propriétés optiques de nanoparticules d'or dépendent de leur taille et structure [56-59] et de l'environnement chimique (ligand organique, solvants) [60, 61]. De plus, quand les nanoparticules sont suffisamment proches l'une de l'autre, les interactions inter-particules peuvent changer leurs propriétés optiques.

Une caractéristique optique importante des nanoparticules d'or est la présence d'un plasmon de surface (SP) dans le spectre UV-VIS. Le plasmon de surface est dû au nuage électronique à la surface de nanoparticules qui entre en résonance avec le champ électromagnétique à cause des oscillations des électrons de la bande de conduction. La couleur des nanoparticules dépend de l'intensité et de l'énergie du SP. Le plasmon de surface à 520 nm est caractéristique de nanoparticules d'or de taille plus grande que 2 nm et il se déplace vers des longueurs d'ondes plus élevées quand leur taille augmente [62], telle que le démontre la Figure 1.11.

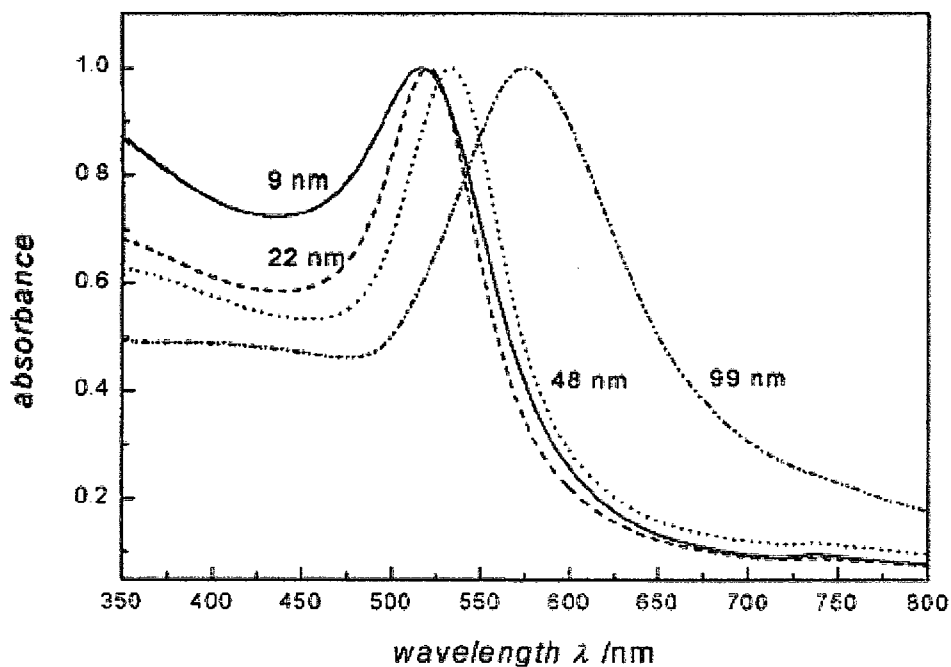


Figure 1.11: Déplacement du plasmon de surface dans le spectre UV-VIS en fonction de la taille de nanoparticules d'or [62].

Les nanoparticules de taille de moins de 2 nm n'ont pas de plasmon de surface à 520 nm. Ceci est dû au fait que les électrons de conduction sont dans des niveaux discrets d'énergie, alors que dans l'or métallique, les électrons sont délocalisés et forment un continuum ayant dans le spectre UV-VIS l'aspect d'un conducteur [63].

1.4. Biocapteurs à base de nanoparticules d'or

Les propriétés optiques ainsi que physico-chimiques des nanoparticules d'or (plasmon de surface, effet de taille de quantum, conductivité) ont été utilisées pour la détection des protéines par des méthodes optiques telles que la résonance des plasmons de surface

(SPR), microscopies électroniques (MEB, TEM) ainsi que la calorimétrie (ITC). Ces méthodes ont l'avantage de détecter des protéines non marquées au préalable.

Dans cette section, quelques exemples d'applications des nanoparticules d'or pour la détection de biomolécules par colorimétrie, SPR et TEM sont présentés. Par exemple, des nanoparticules fonctionnalisées avec des protéines, des peptides et l'ADN ont été utilisées comme biocapteurs [64-70]. Plus récemment [66] des NP modifiées avec des peptides ont été utilisées pour visualiser in vitro des cellules des fibroblastes. Ces NP sont stables, compatibles avec le milieu biologique et elles ne sont pas toxiques pour les cellules.

Tel que présenté dans la Figure 1.12, [66] des nanoparticules sur lesquelles ont été greffés des alkylthiols modifiés avec de carbohydrates (glyconanoparticules, (GNP) [71] ont été utilisées pour la détection des protéines [67, 72-74].

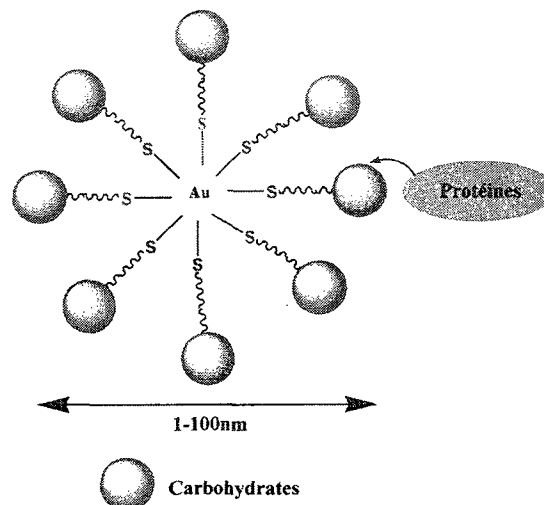


Figure 1.12: Interactions des glyconanoparticules d'or avec des protéines [66].

Cependant, la présence d'alkylthiols sur ces GNP diminue la stabilité et la dispersion de taille de GNP. De plus, les branches thiols contribuent à des interactions non spécifiques entre les NP et les protéines [75].

Des GNP modifiées avec des oligosaccharides, obtenus par la méthode de Penadés [47], ont été utilisés pour étudier les interactions entre les carbohydrates et les biomolécules (protéines, des peptides ou ADN) et différents processus biologiques [47, 65, 66, 76]. Le groupe de Panadés [77] a utilisé des GNP modifiées avec du lactose dans une thérapie anti-adhésive afin de ralentir ou empêcher la progression de cellules cancéreuses. Une des étapes dans la formation de métastases est l'adhérence des cellules cancéreuses aux sélectines présentes à la surface de l'endothélium des cellules. Après l'adhésion, ces cellules peuvent migrer et ainsi créer de nouvelles cellules cancéreuses. Par conséquent, l'utilisation de glyconanoparticules a comme but d'inhiber l'adhésion des cellules cancéreuses à la surface des cellules en bloquant les selectines.

Pour comprendre le mécanisme des interactions entre les carbohydrates multivalents et les protéines [25, 78], plusieurs recherches ont utilisé la lectine Con A en présence de GNP comme système multivalent [72, 79, 80-82]. Les études par colorimétrie ont démontré une agglomération des particules après l'addition de Con A aux GNP recouvertes de mannose qui est suivie d'une précipitation due à la formation d'un complexe tridimensionnel [79].

Les GNP ont été aussi utilisées dans la reconnaissance de la lectine Con A par la méthode SPR [72]. Comme le montre la Figure 1.13, cette étude utilise une surface d'or (SAM) modifiée avec l'alkylthiol et le mannose. Les groupements mannose de SAM reconnaissent la lectine Con A. Cependant, en présence de GNP, la lectine Con A présente une affinité plus grande pour les récepteurs mannose de GNP. Cette affinité est due à la multivalence et à la distribution spatiale des ligands à la surface de GNP.

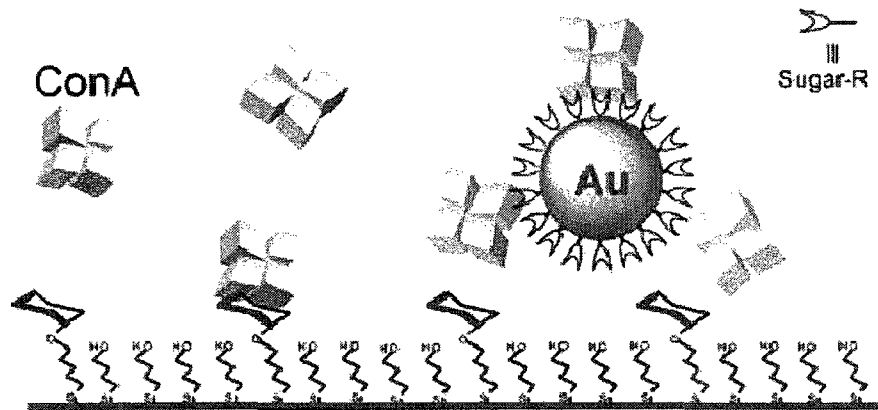


Figure 1.13: Étude de compétitivité par SPR entre les interactions carbohydrates de type mannose de glyconanoparticules d'or et d'une surface SAM et la lectine Con A [72].

Depuis 1971 les nanoparticules d'or [83] ont été utilisées dans l'immuno marquage des biomolécules. Le développement de la méthode TEM permet la visualisation du marquage des cellules par les nanoparticules d'or modifiées avec des protéines, peptides ou avec l'ADN [84-86]. Il n'est pas nécessaire de modifier les cellules avec des biomolécules ou avec des fluorophores. Le groupe de Lin [87] a utilisé les GNP pour le

marquage de protéines membranaires. L'image TEM présentée dans la Figure 14, montre que les GNP de type mannose (points noir qui correspondent à l'or) présentent une adhésion spécifique pour les récepteurs Fim H de pili (sous forme de bâton blanc) de la bactérie *E. coli* (en noir).

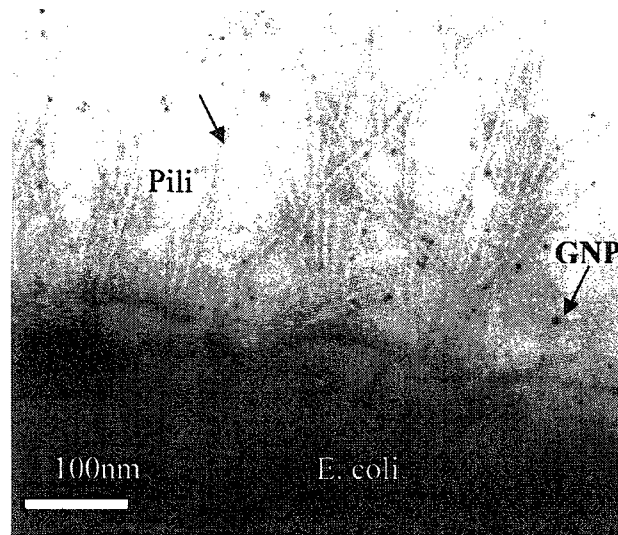


Figure 1.14: Marquage de la bactérie *E. Coli* par les glyconanoparticules d'or [87].

1.5. Détection de protéines par fluorescence

La fluorescence (par spectroscopie ou microscopie confocale) est la méthode de choix pour la détection de biomolécules car elle a la sensibilité requise pour étudier des phénomènes biochimiques impliquant un petit nombre de molécules. Néanmoins, il faut dans la majorité des cas greffer des fluorophores sur la protéine ou sur le ligand.

De manière générale, la fluorescence se produit suite à l'absorption de photons par une molécule de type fluorophore, fluorochrome ou par sonde fluorescente. C'est un phénomène physique dans l'ensemble des phénomènes de luminescence comprenant la photoluminescence. Le diagramme de Jablonski présenté dans la Figure 1.15, illustre deux différents phénomènes liés à la photoluminescence: la fluorescence et la phosphorescence. La fluorescence a lieu suite à une absorption de lumière et elle est caractérisée par l'émission de photons qui se produit lors des transitions électroniques d'une molécule entre un état excité singulet S1 vers l'état fondamental singulet S0 (relaxation). La phosphorescence est un type de photoluminescence qui persiste après l'arrêt de l'excitation lumineuse. En effet, elle se distingue de la fluorescence par le mode de désexcitation de la molécule. La phosphorescence est caractérisée par des transitions électroniques entre un état triplet excité et l'état fondamental singulet. Dans ce cas, la durée de vie moyenne de l'état excité est plus longue que pour la fluorescence.

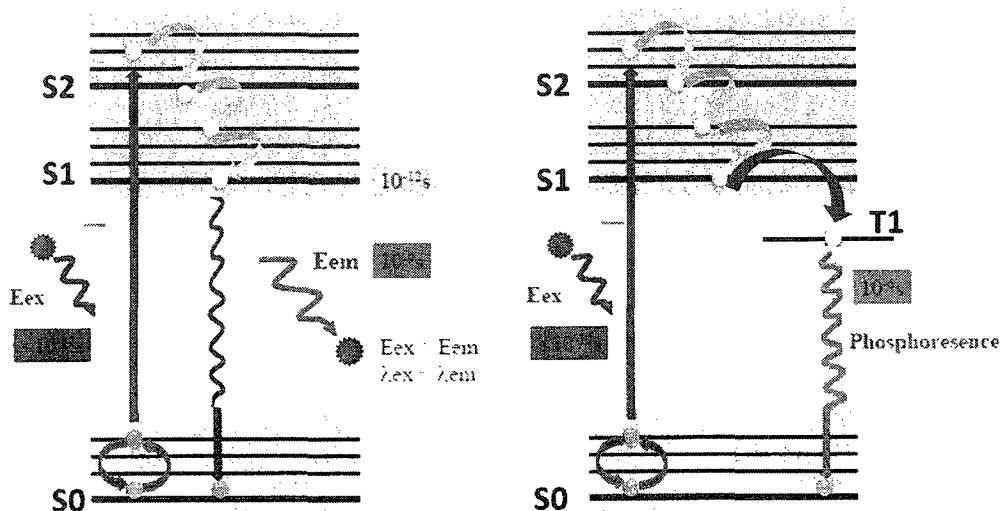


Figure 1.15: Diagramme de Jablonski. Adapté de [88].

De plus en plus en biologie, la détection sélective de biomolécules peut être réalisée par le transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) (Förster Resonance Energy Transfer) [88-91]. Tel que représenté dans la Figure 1.16 la méthode FRET est basée sur la mesure du transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes (un donneur et un accepteur) lorsque leurs niveaux d'énergie coïncident et que leur séparation est entre 10 et 100 Å. Ceci conduit à une diminution de l'intensité de fluorescence du donneur et à une augmentation de l'intensité d'émission de l'accepteur. Pour un transfert d'énergie de fluorescence optimal, le spectre d'émission du donneur doit se superposer au spectre d'absorption de l'accepteur. L'efficacité du transfert est proportionnelle à l'inverse de la distance entre le donneur et l'accepteur à la puissance 6. Dans cette section, des exemples de détection par FRET seront présentés.

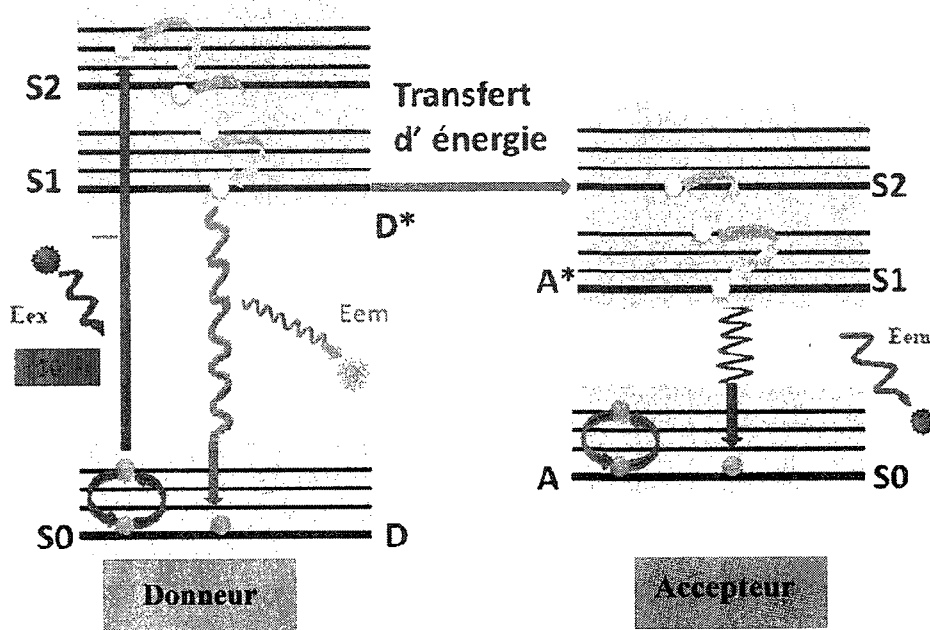


Figure 1.16: Transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET). Adapté de [88].

Certains biocapteurs qui possèdent une bonne sensibilité pour la détection de glucose dans le sang utilisent la méthode par FRET. Ce type d'analyse a été réalisé pour l'interaction compétitive entre la lectine Con A, des polymères fluorescents de type dextran sur lesquels ont été greffés des fluorophores de couleurs différentes et le glucose [92].

Une autre étude [93] montre une affinité sélective entre des carbohydrates et une lectine en mesurant le transfert d'énergie par FRET entre la fluorescéine (donneur) d'une sonde à base de polymère modifiée avec la lectine et un polymère de dextran marqué avec le Rouge du Texas[®] (accepteur).

L'affinité entre la lectine PA IL de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* pour l'homosérine N-acyl lactones (AHSL) est démontrée par le transfert d'énergie FRET entre deux marqueurs fluorescents qui sont des dérivés d'acide naphthalène sulfonique greffés à la lectine [94]. D'autres études [95] ont utilisé des glycodendrimères fluorescents de type PAMAM modifiés avec de glucose et marqués avec le chromophore Alexa Fluor[®], utilisés pour la détection de la lectine fluorescente, Con A. Dans cette étude, le transfert d'énergie se réalise entre les fluorophores du glycodendrimère et de la lectine.

Récemment, des nanoparticules d'or ont été utilisées pour la détection et le marquage des biomolécules par fluorescence. Elles ont été utilisées en raison de leur coefficient

d'extinction élevé et d'un large spectre d'absorption dans visible qui recouvre les spectres d'émissions de plusieurs fluorophores. Par exemple, des nanoparticules d'or modifiées avec des dendrimères de type PAMAM et conjuguées avec des biomolécules (biotine) ont été utilisées pour détecter spécifiquement, par FRET, les interactions de type biotine-avidine, en présence de QD conjugués avec l'avidine [75]. Les QD sont des semi-conducteurs avec des propriétés optiques photostables et une taille de moins de 100 nm. Leur efficacité est supérieure à celles des colorants fluorescents organiques mais ils sont excités par la lumière UV ce qui peut causer une dégradation du matériel biologique. De plus, dans le cas de QD de CdS et CdSe, les ions Cd^{2+} sont très toxiques.

De plus, des études récentes [96] ont démontré l'utilisation de nanoparticules d'or pour la détection de protéines par un transfert autre que le FRET, le transfert d'énergie entre un fluorophore et une surface de nanoparticule métallique séparées d'une distance (d) de 220 Å comme il est représenté dans la Figure 1.17. Ce transfert d'énergie entre le donneur et les électrons de la bande de conduction d'un métal est appelé le transfert d'énergie de surface (SET). Dans le cas de transfert dipôle-surface de métal, le rendement de transfert d'énergie varie selon $1/d^4$. Les interactions des fluorophores avec des surfaces de métaux sont différentes selon la distance d'interaction. Pour des distances < 10 Å le transfert d'énergie est important. Pour des distances de 20 à 300 Å le transfert d'énergie est dominant. Pour des distances > 500 Å, les oscillations de fluorescence dues aux effets dipôle-miroir sont prépondérantes.

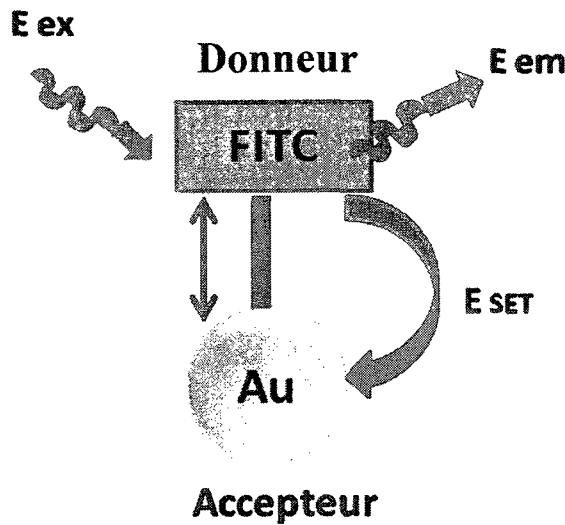


Figure 1.17: Transfert d'énergie entre un fluorophore (FITC) et une surface de nanoparticule métallique d'or (SET). Figure modifiée d'après [96].

Les processus FRET et SET [96] ont des comportements différents selon la séparation entre la fluorescéine (donneur) greffée sur les brins complémentaires d'ADN et l'or des nanoparticules (accepteur) d'un diamètre de 1.4 nm, greffé sur le brin d'ADN à l'opposé du fluorophore. La distance entre le fluorophore et l'or a été systématiquement variée en augmentant les longueurs des brins d'ADN. Le processus SET n'est pas un processus résonnant contrairement au processus FRET. Dans le cas de SET, le champ électromagnétique du dipôle (donneur) du fluorophore interagit avec les électrons libres dans la bande de conduction du métal (accepteur). Ces électrons de conduction se comportent comme un gaz de Fermi et agiront l'un sur l'autre plus fortement avec le dipôle oscillant quand ils sont proches et dans une direction perpendiculaire à la surface du métal. Le dipôle n'interagit pas avec les transitions électroniques résonantes discrètes, mais plutôt avec la bande électronique du métal.

Le groupe de Kim [75] utilise des nanoparticules d'or conjuguées avec la lectine Con A en présence des QD conjuguées avec dextrane. Les résultats montrent que la photoluminescence de QD diminue de 70 % après l'addition de nanoparticules d'or dû à un transfert d'énergie SET entre QD et la surface d'or. La constante d'affinité évaluée par la méthode de transfert SET entre les QD et les nanoparticules d'or a une valeur de $6.7 \times 10^7 \text{M}^{-1}$.

Des glyconanoparticules fluorescentes, non toxiques pour les cellules, ont été utilisées pour le marquage des cellules [47] et leur détection par la microscopie confocale. Cependant, il n'y a pas d'études par FRET ou SET portant sur le mécanisme d'interaction des glyconanoparticules d'or pour la détection des protéines.

1.6. Affinité des carbohydrates multivalentes pour les protéines

La littérature [8, 25, 97] contient peu de détails sur les mécanismes par lesquels les ligands multivalents augmentent leur affinité pour les récepteurs des protéines. Toutefois, il en ressort que l'augmentation de l'affinité est reliée à la formation de complexes sous forme d'agrégats. Ceux-ci se forment grâce aux interactions intramoléculaires et intermoléculaires des ligands multivalents avec les protéines.

Dans le cas de ligands multivalents, la constante d'association des interactions intramoléculaires est plus grande que pour un ligand monovalent. Ceci est dû au fait que l'énergie libre d'interaction est plus grande que celle pour une interaction monovalente.

Par exemple, la Figure 1.18 montre les récepteurs des toxines bactériennes de Shiga et de Shigalike (SLT) qui forment un complexe avec un carbohydre pentavalent par un mécanisme intramoléculaire où les cinq accepteurs de la toxine interagissent avec les cinq carbohydrates du ligand [98].

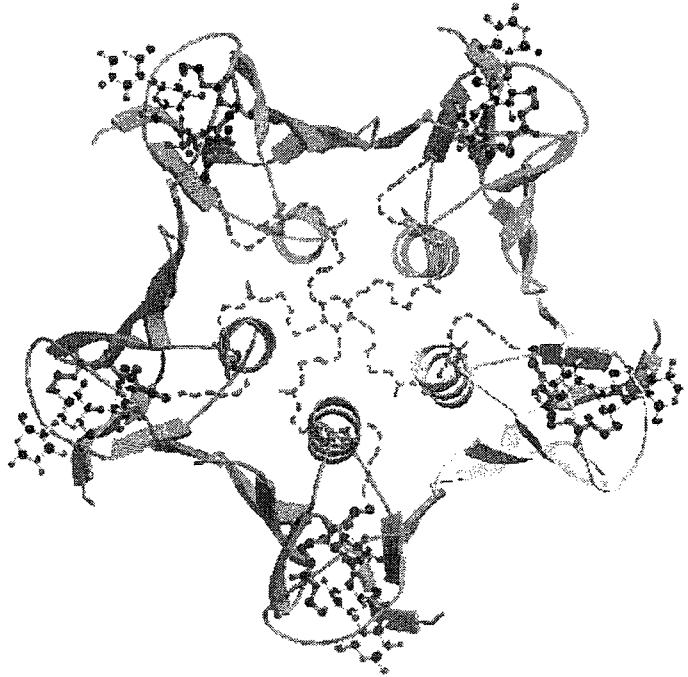


Figure 1.18: Interactions intramoléculaires entre les récepteurs des toxines bactériennes de Shiga et de Shigalike (SLT) et un ligand pentavalent [98].

Les ligands multivalents peuvent également se lier aux récepteurs par des interactions intermoléculaires. Ce type d'interaction implique la formation d'agrégats de grande taille qui précipitent. Dans le cas où les ligands multivalents ont une longueur suffisante, la formation d'agrégats est plus favorable que pour une association intramoléculaire. La formation d'agrégats peut être stabilisée par des interactions entre protéines. La formation

de complexes tridimensionnels entre les carbohydrates et les récepteurs multivalents de lectines cause une précipitation. Les études de Brewer [99-102] ont montré la formation sélective d'agrégats lectine-carbohydate. Des complexes homogènes tridimensionnels sont formés en présence des carbohydrates multivalents. La précipitation des agrégats dépend d'un ensemble de facteurs, tels que la concentration du ligand et de la protéine, la constante d'affinité caractérisant l'interaction, la valence du ligand et de la protéine, la structure du ligand et de la protéine, la concentration ionique, le pH ainsi que la température. Des précipités sont souvent formés quand le ligand et la protéine sont présents dans des rapports équimolaires.

Le groupe de Toone [103] a effectué des études structurales et énergétiques sur le complexe formé par Con A et des glycodendrimères de valences différentes. Les glycodendrimères avec plus de trois carbohydrates ont une plus grande affinité due à la formation des complexes tridimensionnels comme le montre la Figure 1.19.

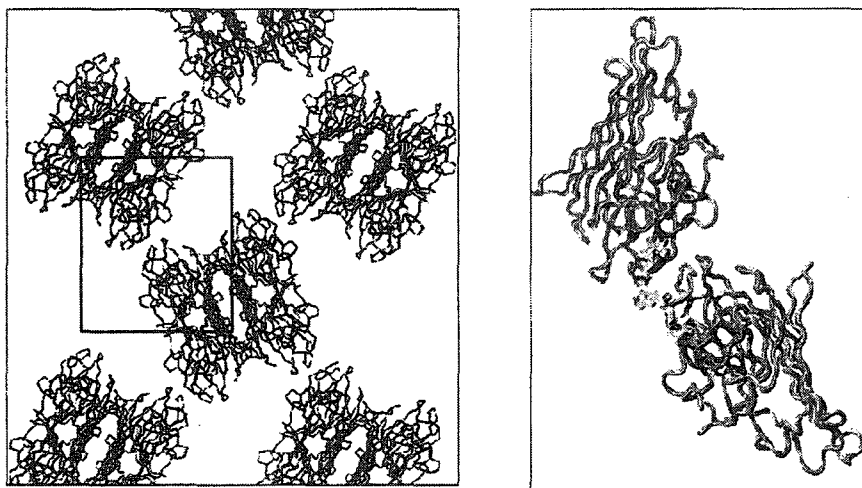


Figure 1.19: Formation du complexe tridimensionnel de Con A (gauche) par des interactions intermoléculaires (droite) [103].

Les études de Kiessling [104] utilisant un ligand trivalent pour la Con A observent la formation de petits agrégats. Par la suite, ces agrégats interagissent avec les carbohydrates immobilisés sur le ligand et non pas avec la protéine qui est un tétramère pour former des gros agrégats. Ce résultat est relié à l'augmentation de la constante d'affinité. Cependant, les conséquences énergiques pour la formation des agrégats sont peu claires.

1.7. Interaction carbohydrate-protéine

Le potentiel d'un biocapteur pour la détection des protéines dépend de la force d'interaction carbohydrate-protéine qui est caractérisée par une constante d'affinité K_a . Les paramètres thermodynamiques, soit les contributions enthalpique et entropique ainsi que l'énergie libre, permettent d'identifier les facteurs déterminants.

Une de méthodes qui permet d'étudier la thermodynamique de la reconnaissance carbohydrate-protéine est la microcalorimétrie (*Isothermal Titration Microcalorimetry*, ITC). Les études effectuées avec des glycodendrimères par ITC montrent que la constante d'affinité (de l'ordre de 10^5 M^{-1}), l'enthalpie ($-\Delta H$) et l'entropie ($-\Delta S$) augmentent avec la multivalence du ligand [105, 106]. L'entropie devient plus négative avec l'augmentation du nombre des carbohydrates et ceci est relié à la flexibilité du ligand [105]. Cependant, pour optimiser les interactions carbohydrates-protéines il faut minimiser la diminution de l'entropie en rigidifiant le ligand sans ajouter des contraintes stériques sur la molécule.

Les études cinétiques apportent des précisions sur les mécanismes d'interaction carbohydrate-protéine. Cependant, seulement quelques constantes cinétiques entre des monosaccharides et la lectine Con A ont été déterminées par calorimétrie et fluorescence. Ces études ont montré que les vitesses d'association entre les monosaccharides-protéines (de l'ordre de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [107, 108] sont inférieures aux vitesses contrôlées par diffusion (de l'ordre de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [109]. De plus, la valeur négative pour le changement d'entropie lors de la formation du complexe entre les monosaccharides et Con A [109] montre qu'il y a des contraintes stériques pour la formation du complexe.

1.8. Objectifs de la thèse

La revue de la littérature présentée ci-dessus a permis de mettre en évidence les progrès récents dans l'utilisation des carbohydrates multivalents pour la détection de biomolécules et pour certaines approches thérapeutiques. Certaines limites ont aussi été mises en évidence. Par exemple, l'efficacité des glycodendrimères est limitée par les effets stériques lorsque leur taille augmente. Les nanoparticules d'or recouvertes de carbohydrates greffés sur des alkylthiols causent des interactions non spécifiques avec les protéines et la présence de chaînes d'alkyls hydrophobes peut diminuer la stabilité et la dispersion de nanoparticules. De plus, il n'y a pas d'études portant sur le mécanisme de l'interaction carbohydrate-protéine en utilisant les GNP qui ont été réalisées. Le but de cette thèse est donc de proposer différentes approches pour améliorer la reconnaissance

des lectines par des GNP et aussi de comprendre l'interaction entre celles-ci et les lectines.

L'objectif principal de cette thèse est de développer un biocapteur qui combine l'efficacité des glycodendrimères pour la reconnaissance de lectines et les propriétés optiques des nanoparticules d'or. Ce biocapteur sera utilisé dans les méthodes de fluorescence (FRET ou SET et en microscopie confocale) pour la détection sélective de lectines et d'une bactérie *E. coli*. Les GNP serviront comme un outil expérimental pour déterminer les constantes thermodynamiques et cinétiques. Cet outil permettra d'étudier le comportement des protéines directement dans l'environnement où elles sont actives, comme, par exemple, le rôle des protéines dans l'adhésion cellulaire. Également, l'utilisation du biocapteur en électrophorèse et en immunoprécipitation sera examinée. Un autre objectif pour cette thèse consiste à greffer des carbohydrates sur la silice et de les utiliser pour la détection et l'immobilisation sélective des lectines.

La thèse est structurée comme suit: en premier lieu, la revue de littérature a été présentée dans le premier chapitre. Le deuxième chapitre décrit les méthodes de synthèse des nanoparticules d'or et surfaces de silice recouvertes des carbohydrates. Ce chapitre présente aussi les techniques de caractérisation et les conditions expérimentales utilisées dans ce projet. La caractérisation des nanoparticules sera présentée dans le troisième chapitre. Dans le quatrième chapitre, les glyconanoparticules d'or seront utilisées pour la reconnaissance de lectines. Des tests d'immunoprécipitation des lectines ainsi que des tests d'atténuation de la fluorescence seront présentés. L'étude thermodynamique et

cinétique de l'interaction carbohydate-protéine en utilisant comme modèle le couple GNP-lectines fluorescentes est l'objet du cinquième chapitre. Le chapitre suivant présente des applications possibles de GNP pour la séparation de lectines par électrophorèse et la détection d'une bactérie par microscopie. Les applications de silice recouverte de carbohydrates dans l'immunoprécipitation, l'atténuation de la fluorescence ainsi que l'immobilisation d'une lectine pour la détection par microscopie confocale, seront aussi présentés dans ce dernier chapitre.

Chapitre 2. Synthèse de nanoparticules et surfaces recouvertes de carbohydrates

2.1. Introduction

Au cours des dernières années, plusieurs groupes ont produit des nanoparticules fonctionnalisées avec des biomolécules [64, 69, 70, 110-113] ou de carbohydrates [65, 66, 71, 77, 82, 86, 114, 115] pouvant servir de biocapteurs. Toutes ces études utilisent comme méthode de synthèse le greffage sur l'or d'alkyl thiols fonctionnalisés avec des biomolécules ou carbohydrates, qui est effectué dans une seule étape.

La présente étude vise à utiliser des nanoparticules d'or recouvertes de carbohydrates qui présentent une affinité spécifique pour des lectines. L'approche proposée, différente de ce qui a été publié, consiste à greffer des carbohydrates à la surface de nanoparticules d'or stabilisées préalablement avec des dendrimères de type poly(amidoamine) PAMAM. Plus précisément, la synthèse consiste à adsorber, tout d'abord, des PAMAM à la surface de particules d'or afin de les solubiliser et stabiliser ainsi que d'obtenir des particules ayant une bonne compatibilité avec le milieu biologique. Dans une deuxième étape, des carbohydrates sont greffés sur les amines terminales de nanoparticules d'or stabilisés avec PAMAM (NP) pour obtenir des glyconanoparticules d'or (GNP). Pour obtenir des GNP fluorescentes, un fluorophore est adsorbé en même temps que les carbohydrates. Les GNP seront utilisées comme biocapteur multivalent pour la détection des protéines.

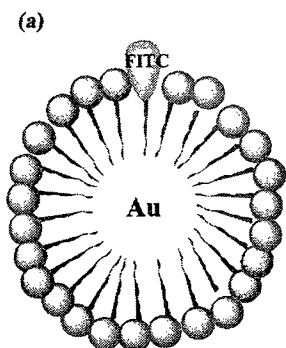
Le greffage de carbohydrates est aussi effectué sur des nanoparticules de silice et des plaques de verre. La silice est un matériau de choix pour cette étude car elle est beaucoup utilisée pour l'immobilisation et séparation des molécules. L'approche utilisée comprend trois étapes: l'activation de la silice pour obtenir les silanols, le greffage de silanes pour obtenir les siloxanes et le greffage des carbohydrates à la surface de siloxanes. Ces surfaces de silice fonctionnalisées avec des carbohydrates seront utilisées pour l'immunoprécipitation et la détection de lectines par fluorescence.

Les propriétés chimiques et physiques des nanoparticules d'or avant et après le greffage des carbohydrates sont déterminées par une série de méthodes physico-chimiques résumées dans la Figure 2.1a. La fraction organique (PAMAM et carbohydrate) sera analysée par FTIR ainsi que par XPS pour évaluer le rapport N : S. Le rendement du greffage des carbohydrates sera évalué par le titrage des amines terminales qui réagissent avec un chromophore, ce qui permet une quantification par la spectroscopie UV-VIS. La masse organique obtenue par TGA servira à évaluer le diamètre et la masse moléculaire des nanoparticules d'or. Pour les GNP fluorescentes, la fluorescence sera mesurée par spectroscopie de fluorescence. Pour la fraction d'or, les méthodes TEM et DLS seront utilisées pour analyser la taille de particules, la spectroscopie XPS pour étudier l'état d'oxydation de l'or et la spectroscopie UV-VIS pour déterminer le plasmon de surface caractéristique de l'or.

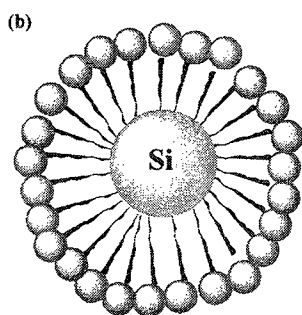
Les propriétés chimiques et physiques des nanoparticules de silice avant et après le greffage des carbohydrates sont déterminées par les méthodes physico-chimiques

résumées dans la Figure 2.1b. La fraction organique (silanol et carbohydrate) sera analysée par FTIR et TGA. Le rendement du greffage des carbohydrates sera évalué par la méthode mentionnée ci-dessus. La taille des particules de silice sera analysée par microscopie MEB.

Les équipements utilisés pour les différentes applications des nanoparticules modifiées soit: l'immunoprécipitation, l'atténuation de la fluorescence suite à la reconnaissance de lectines par les nanoparticules, la séparation des lectines par électrophorèse SDS-PAGE, la détection de la bactérie *E. coli* par MCBL et MEB et, l'immobilisation d'une lectine fluorescente à la surface des plaques de verre recouvertes de carbohydrates par MCBL sont présentés dans la Figure 2.2.



Méthode	Propriétés
TEM, DLS	d (nm)
UV-VIS	plasmon surface % taux greffage de carbohydrates (titrage TNBS)
XPS	degré d'oxydation de l'or, rapport N : S
FTIR	groupes fonctionnels
TGA	% fraction organique
Fluorescence	émission (FITC/RITC)



Méthode	Propriétés
UV-VIS	% taux greffage de carbohydrates (titrage TNBS)
FTIR	groupes fonctionnels
TGA	% fraction organique
MEB	d (nm)

Figure 2.1: Caractérisation physico-chimique de: (a) nanoparticules d'or recouvertes de PAMAM, carbohydrates et le fluorophore (FITC); (b) silice recouverte de silane et carbohydrate.

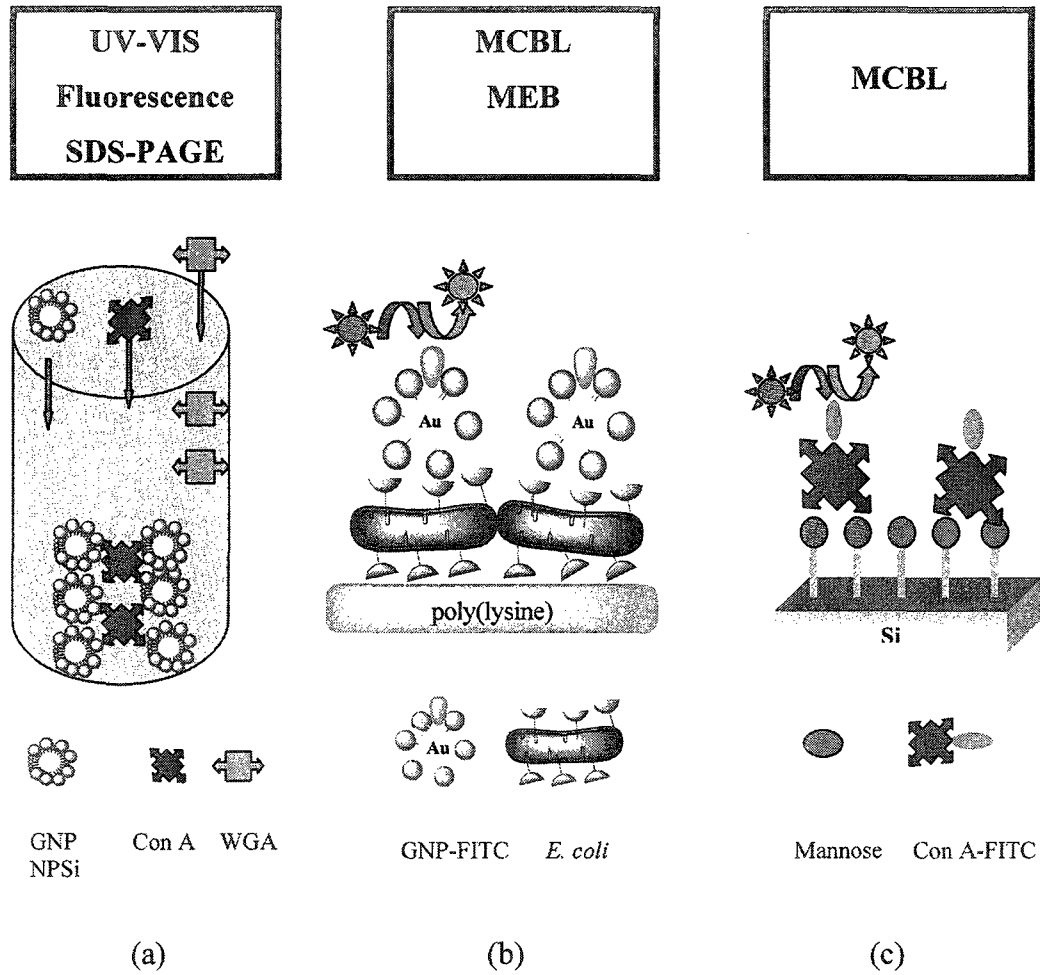


Figure 2.2: Applications de nanoparticules recouvertes de carbohydrates et méthodes expérimentales pour la: (a) précipitation des lectines; (b) détection d'une bactérie *E. Coli* par les GNP fluorescentes; (c) application de silice recouverte de carbohydrates pour la détection d'une lectine.

2.2. Méthodes de synthèse

2.2.1. Synthèse des dendrimères PAMAM

Les dendrimères de type poly(amidoamine) PAMAM ont été utilisés comme support pour greffer des molécules organiques ou biomolécules. Leur solubilité, stabilité et compatibilité avec les biomolécules et le milieu biologique, leur petite taille et multivalence expliquent ce choix. Dans cette section, la synthèse des dendrimères PAMAM est présentée. Ces derniers seront, par la suite, adsorbés sur des surfaces d'or et serviront à greffer des carbohydrates.

À partir de la cystamine, sept générations des dendrimères PAMAM de type ester et amine sont synthétisées par la méthode de synthèse divergente de Tomalia [33]. Cette méthode se déroule en deux étapes soit, une addition de Michael, pour former les générations ester et une amidation des esters, pour former les générations amine. Suite à une addition d'acrylate de méthyle à la cystamine en présence d'une base, la triéthylamine, la première génération ester G-0.5 avec quatre groupements ester terminaux est synthétisée. La réaction suivante est une amidation des esters terminaux de la génération précédente obtenue en ajoutant un excès d'éthylènediamine pour former la première génération amine G0 avec quatre groupements amines terminaux. Une succession des réactions d'addition de Micheal et d'amidation mène aux générations suivantes jusqu'à la génération amine G2 qui a 16 groupements amines terminaux. Le détail de chaque synthèse est présenté ci-dessous. Les spectres RMN du ^1H RMN et ^{13}C

RMN ont été obtenus en utilisant un instrument de Varian de 300 MHz. Les générations esters ont été analysées dans CDCl_3 et les générations amines dans le CD_3OD .

2.2.1.1. Synthèse de la génération PAMAM G-0.5

Le dichlorure de cystamine (10 g, 0.044 mol) dissout dans 5 mL d'eau nanopure et l'acrylate de méthyle (0.956 g/cm^3 ; 0.80 mol, 72.17 ml) sont mélangés dans 100 mL méthanol. Une solution de triéthylamine (0.726 g/cm^3 ; 0.10 mol, 13.77 mL) est ensuite additionnée lentement. Après l'addition d'environ la moitié de la solution de triéthylamine, la solution blanche devient plus claire. La réaction continue à la température de la pièce sous atmosphère d'azote pendant 48 h. Après 48 h, la solution est chauffée à 40°C pendant 30 min. Le solvant est éliminé sous vide. Le produit obtenu est visqueux avec des solides blancs. Il est mélangé au diéthyléther et extrait deux fois avec de l'eau. La partie aqueuse est extraite de nouveau avec le diéthyléther. La phase organique est séchée avec du sulfate de magnésium pendant 30 min et est ensuite filtrée. Le solvant est évaporé et 19 g de PAMAM G-0.5 de couleur jaune sont obtenus. Le rendement de la réaction est de 90 %. Les déplacements chimiques du proton et du carbone pour G-0.5 (Figure 2.3) sont pour ^1H RMN (δ , ppm) : 2.44 (t), 2.72 (t), 2.78 (t), 3.62 (s) et pour ^{13}C RMN (δ , ppm) : 32.5, 36.3, 49.1, 51.3, 53.1, 172.6.

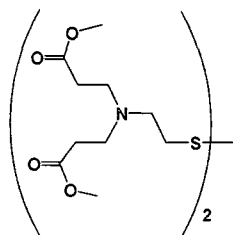


Figure 2.3: Structure du dendrimère de génération G-0.5.

2.2.1.2. Synthèse de la génération PAMAM G0

L'éthylène diamine (0.899 g/cm^3 ; 240.26 mL) est mélangé avec 54 mL de méthanol et ensuite la solution est refroidie à 5°C . À ce mélange, est ajoutée une solution de 50% (m/m) dans le méthanol du PAMAM G-0.5 (18 g). La réaction se produit sous atmosphère d'azote à 5°C pendant 5 jours et après le mélange est chauffé à 40°C pour 30 min. L'éthylène diamine en excès et le méthanol sont évaporés sous vide. L'excès d'éthylène diamine est ensuite éliminé par l'azéotrope toluène : méthanol : 3/1. Après la purification, 20.1 g de PAMAM G0 d'un produit visqueux de couleur jaune sont obtenus. Le rendement de la réaction est de 92 %. Les déplacements chimiques du proton et du carbone pour G0 (Figure 2.4) sont pour ^1H RMN (δ , ppm): 2.12 (s), 2.30 (t), 2.57 (t), 2.67 (t), 3.07 (t), 3.17(t), 3.20 (m) et pour ^{13}C RMN (δ , ppm): 34.6, 37.0, 42.5, 43.0, 50.8, 53.7, 175.

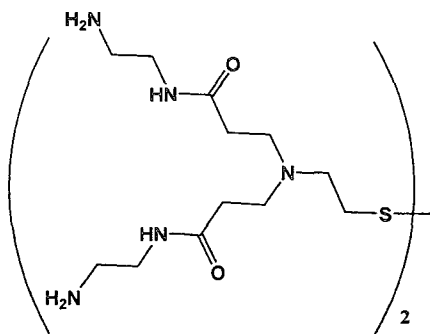


Figure 2.4: Structure du dendrimère de génération G0.

2.2.1.3. Synthèse de la génération PAMAM G0.5

À une solution de l'acrylate de méthyle (0.956 g/cm^3 ; 12.30 mL) dans le méthanol (50% m/m) sont additionnés lentement, pendant 30 min, 9.30 g PAMAM G0. La réaction est faite sous atmosphère d'azote à la température de la pièce pendant 48 h. Le mélange est chauffé à $40 \text{ }^\circ\text{C}$ pour 30 min et le solvant ainsi que le méthyle acrylate en excès sont éliminés par évaporation sous vide. À la fin, 15 g de PAMAM G0.5 un produit visqueux de couleur jaune est obtenu. Le rendement de la réaction est de 98 %. Les déplacements chimiques du proton et du carbone pour G0.5 (Figure 2.5) sont pour ^1H RMN (δ , ppm) : 2.28 (t), 2.44 (t), 2.63 (t), 2.65 (s), 2.68(t), 2.74 (t), 3.19 (m), 3.57 (s) et pour ^{13}C RMN (δ , ppm) : 32.4, 33.4, 35.9, 36.9, 49.0, 49.4, 51.3, 52.3, 52.7, 171.8, 172.8.

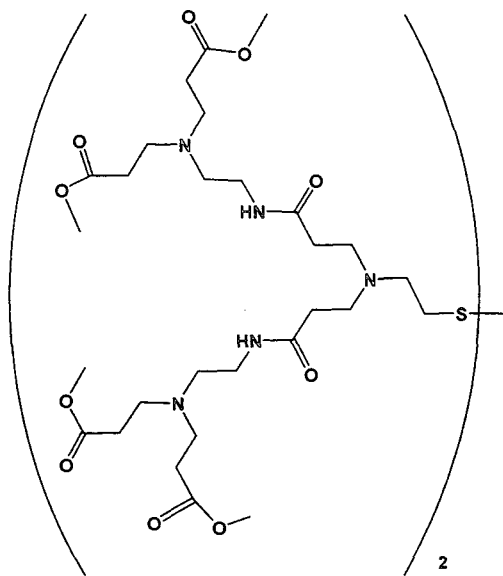


Figure 2.5: Structure du dendrimère de génération G0.5.

2.2.1.4. Synthèse de la génération PAMAM G1

L'éthylène diamine (0.899 g/cm^3 ; 198.37 mL) est mélangé avec 44 mL de méthanol et la solution est refroidie à 5°C . À ce mélange, 50% (m/m) dans le méthanol du PAMAM G0.5 (10.27 g) est ajouté. La réaction se poursuit sous atmosphère d'azote à 5°C pour 5 jours et, ensuite le mélange est chauffé à 40°C pour 30 min. L'éthylène diamine en excès et le méthanol sont évaporés sous vide. L'excès d'éthylène diamine est éliminé par l'azéotrope toluène : méthanol : 3/1. Après purification, 10.2 g d'un produit visqueux de PAMAM G1 de couleur jaune sont obtenus. Le rendement de la réaction est de 95 %. Les déplacements chimiques du proton et du carbone pour G1 (Figure 2.6) sont pour ^1H RMN (δ , ppm): 2.28 (s), 2.33 (t), 2.53 (t), 2.67 (t), 2.77 (t), 3.28 (t), 3.30 (m) et pour ^{13}C RMN (δ , ppm) : 33.5, 33.7, 35.5, 37.5, 40.9, 41.9, 48.6, 49.6, 50.1, 52.4, 173.9, 173.5.

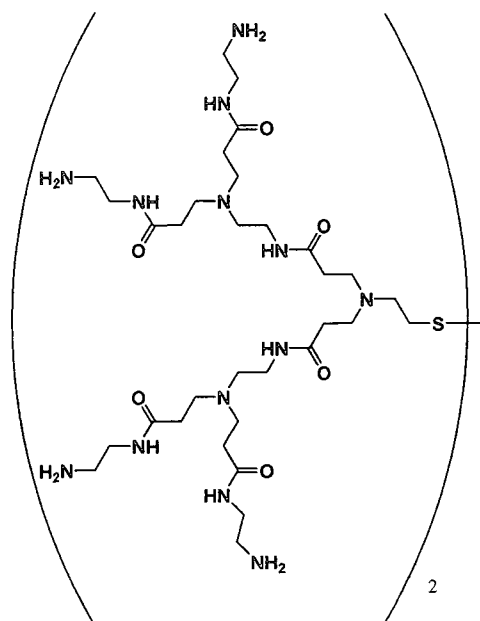


Figure 2.6: Structure du dendrimère de génération G1.

2.2.1.5. Synthèse de la génération PAMAM G1.5

Dans une solution d'acrylate de méthyle (0.956 g/cm^3 ; 6.68mL) dans le méthanol (50% m/m) sous agitation, 6.67 g PAMAM G1 sont ajoutés lentement durant 30 min. La réaction se fait sous atmosphère d'azote à la température de la pièce pendant 48 h. Le mélange est ensuite chauffé à $40 \text{ }^\circ\text{C}$ pour 30 min. Le solvant et l'acrylate de méthyle en excès sont éliminés par évaporation sous vide. À la fin, 13.9 g d'un produit visqueux PAMAM G1.5 de couleur jaune sont obtenus. Le rendement de la réaction est de 98 %. Les déplacements chimiques du proton et du carbone pour G1.5 (Figure 2.7) sont pour ^1H RMN (δ , ppm): 2.29 (t), 2.37 (t), 2.46 (t), 2.48 (t), 2.69 (t), 2.70 (t), 2.82 (t), 3.21 (t), 3.25 (m), 3.61 (s), 7.90 (t) et pour ^{13}C RMN (δ , ppm): 32.4, 33.6, 33.8, 34.1, 37.0, 38.8, 48.4, 49.5, 49.9, 51.3, 51.5, 52.7, 172.2, 172.7, 172.9

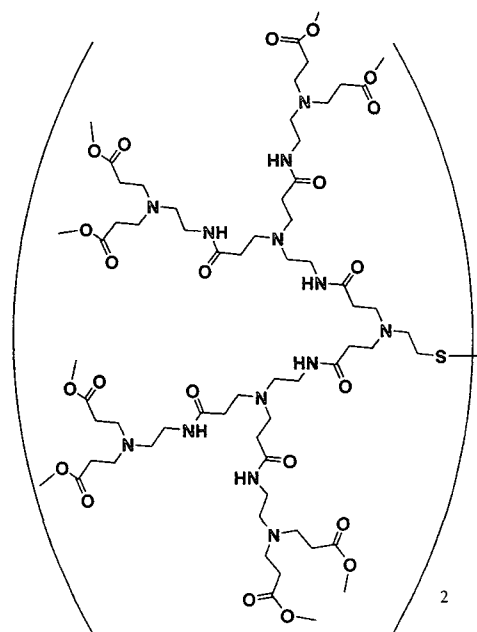


Figure 2.7: Structure du dendrimère de génération G1.5

2.2.1.6. Synthèse de la génération PAMAM G2

L'éthylène diamine (0.899 g/cm^3 ; 328.32 mL) est mélangé avec 91.35 mL de méthanol et la solution est refroidie à $5 \text{ }^\circ\text{C}$. À ce mélange, une solution 50 % (m/m) dans le méthanol du PAMAM G1.5 (10.15 g) est ajoutée et la réaction continue sous atmosphère d'azote à 5°C pendant 5 jours et après, le mélange est chauffé à $40 \text{ }^\circ\text{C}$ pour 30 min. L'éthylène diamine en excès et le méthanol sont évaporés sous vide. L'excès d'éthylène diamine est éliminé par l'azéotrope toluène : méthanol : 3/1. Après purification, 12 g d'un produit visqueux de PAMAM G2 de couleur jaune sont obtenus. Le rendement de la réaction est de 95 %. Les déplacements chimiques du proton et du carbone pour G2 (Figure 2.8) sont pour ^1H RMN (δ , ppm) : 2.27 (t), 2.31 (t), 2.53 (t), 2.67 (t), 2.74 (t), 2.80 (t), 3.20 (t), 3.28 (m) et pour ^{13}C RMN (δ , ppm) : 33.7, 33.9, 35.7, 37.7, 39.0, 41.2, 42.2, 47.2, 48.9, 49.8, 50.2, 52.6, 173.8, 174.2.

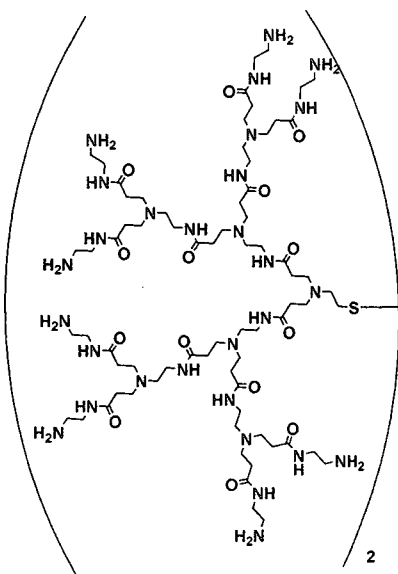


Figure 2.8: Structure du dendrimère de génération G2

Dans le Tableau 2.1 les caractéristiques des PAMAM soit le nombre de groupes (ester ou amine) en surface et les masses moléculaires des dendrimères PAMAM sont présentés.

Tableau 2.1: Le nombre de groupes (ester ou amine) en surface et les masses molaires (MW) des dendrimères PAMAM des générations ester (G-0, G0.5 et G1.5) et amine (G0, G1 et G2) [33].

PAMAM	Nr. groupes (ester ou amine)	MW (Da)
G-0.5	4	496
G0	4	609
G0.5	8	1298
G1	8	1522
G1.5	16	3348
G2	16	3348

2.2.2. Synthèse de glyconanoparticules d'or (GNP)

Ce travail a pour objectif d'augmenter l'efficacité de glycodendrimères en limitant les effets stériques sur les branches de dendrimères PAMAM de générations supérieures à G2 et d'obtenir des nanoparticules d'or solubles et compatibles avec un milieu biologique. Les dendrimères PAMAM sont également utilisés pour stabiliser les

particules d'or car ils agissent comme surfactant en réduisant l'agglomération des particules d'or.

Dans la première étape de la synthèse des nanoparticules d'or, les dendrimères PAMAM de générations ester et amine (G-0.5 à G2) avec un pont disulfure synthétisés par la méthode de Tomalia [33] sont adsorbés sur une surface d'or en utilisant la méthode de Brust [52]. Lors de l'adsorption de disulfures, la liaison S-S est coupée et les molécules formées sont liées à la surface d'or par un lien Au-S. Selon la littérature l'adsorption de dithiols sur l'or est plus facile que dans le cas de thiols [116].

Seulement les générations amine sont utilisées dans une deuxième étape pour le greffage des carbohydrates qui est effectué par couplage thio-urée entre les amines de NP et des groupes isothiocyanate des carbohydrates. Les générations ester de NP sont aussi étudiées car elles peuvent être aussi utilisées comme support pour le greffage des molécules ou biomolécules par un couplage ester-amine.

La Figure 2.9 montre la méthode de synthèse. La réduction de Au^{+3} du complexe Au^{+3} -dendrimère à Au^0 s'effectue par un réducteur, le borohydrure de sodium ($NaBH_4$). Ceci est suivi par le greffage du carbohydrate de type mannose sur les amines de nanoparticules par un couplage thio-urée.

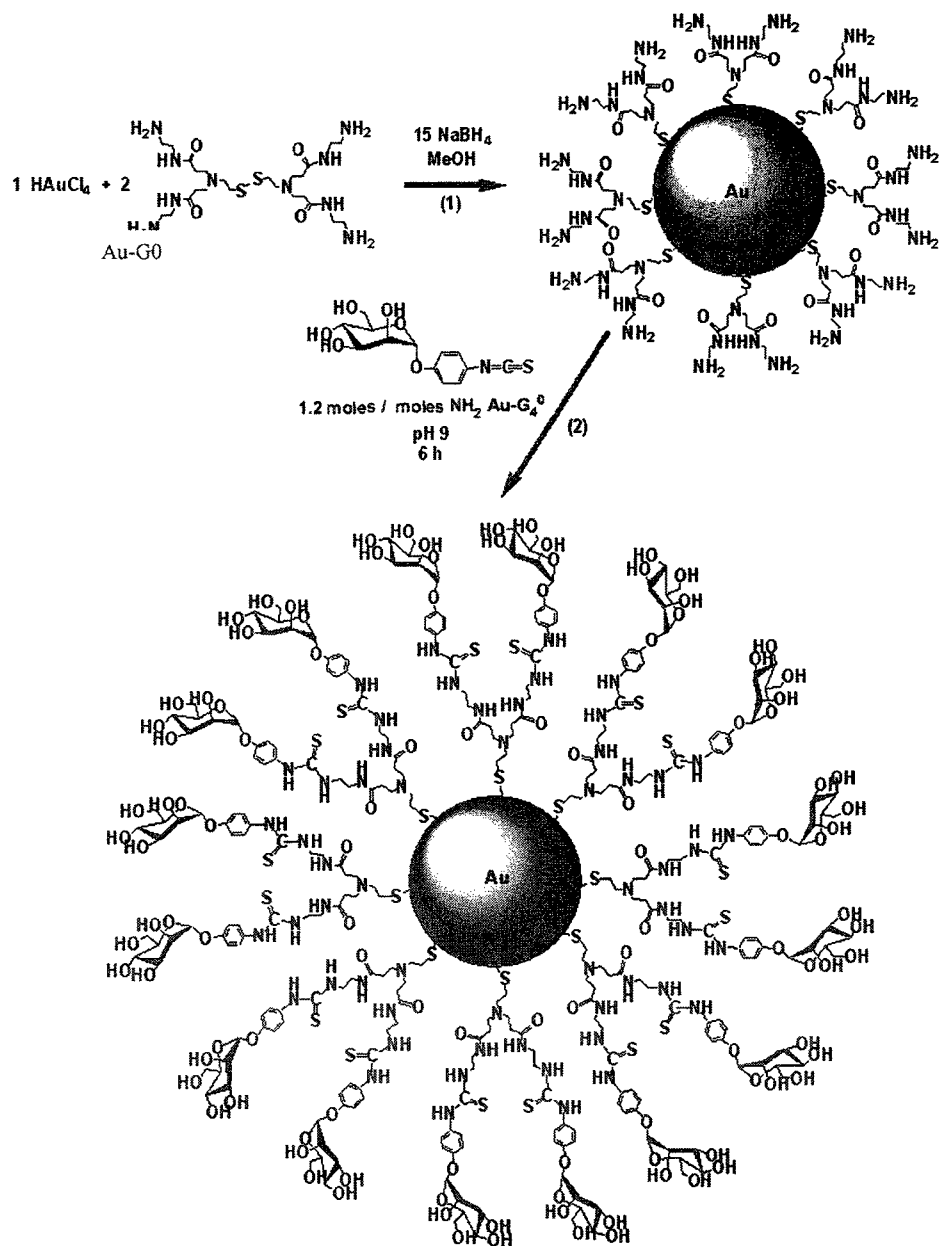


Figure 2.9: Synthèse de nanoparticules d'or stabilisées avec PAMAM de génération G0 (Au-G0) (1) et greffage de carbohydrates (p-ITC- α -D-man) sur les amines terminales de nanoparticules d'or (2).

2.2.2.1. Adsorption de PAMAM à la surface de NP

Lors de cette étude, le rapport AuCl_4^- : dendrimères, AuCl_4^- : NaBH_4 et la vitesse d'addition du réducteur sont optimisés afin d'obtenir des particules plus petites que 2 nm [117]. La synthèse des nanoparticules d'or est effectuée dans le méthanol [55], pour éviter l'hydrolyse des esters.

À une solution vigoureusement agitée, de 0.5 mmole de tétrachloroaurate d'hydrogène (III) trihydraté ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) dans 50 mL de méthanol, une solution de dendrimères PAMAM dans du méthanol est ajoutée. Pour les générations PAMAM G-0.5 et G0 le rapport molaire AuCl_4^- : PAMAM est 1 : 2. Pour les générations G0.5 et G1 le rapport molaire AuCl_4^- : PAMAM est 1 : 1 et pour les générations G1.5 et G2, le rapport molaire AuCl_4^- : PAMAM est 2 : 1. Suivant l'addition du PAMAM, la solution jaune de AuCl_4^- devient orange. Le mélange est agité pendant 30 minutes pour que l'or soit complexé avec les dendrimères. Au mélange de couleur orange, une solution de 7.5 mmoles de NaBH_4 dans 50 mL de méthanol est ajoutée à une vitesse de 10 mL par minute. Le tout est brassé pendant 1 h. La solution devient brun-rouge suivant l'addition du réducteur. Le méthanol est ensuite éliminé par évaporation sous vide. Les nanoparticules précipitent avec l'ajout de 100 mL d'acétone. Une heure est requise pour sédimenter les nanoparticules. Après, elles sont recueillies par filtration sur un filtre de nylon de 0.45 μm . Le précipité est lavé avec un mélange acétone : méthanol 5 : 1. Le solide recueilli est séché dans une étuve à vide à 20°C pendant 6h. La quantité récupérée est d'environ 100 mg de nanoparticules.

Les nanoparticules Au-G-05 sont noires; Au-G0 sont brunes; Au-G0.5 sont brunes-rouges; Au-G1, Au-G1.5 et Au-G2 sont brunes. Toutes les nanoparticules d'or stabilisées avec PAMAM sont solubles dans l'eau et dans une solution tampon de PBS. La taille des particules est déterminée par TEM. Les particules ont été caractérisées par FTIR, XPS et TGA afin de vérifier l'adsorption des dendrimères PAMAM. La présence du plasmon de surface, qui est reliée à la taille des nanoparticules, a été vérifiée par la spectroscopie UV-VIS. Le taux de greffage des PAMAM a été déterminé par le titrage des amines avec le TNBS.

2.2.2.2. Greffage de carbohydrates (et de fluorophores) sur les NP

La deuxième étape de synthèse du biocapteur est le greffage des carbohydrates p-isothiocyanatophényle soit : α -D-mannopyranoside (p-ITC- α -D-man), β -galactopyranoside (p-ITC- β -D-gal) et N-acétyle- β -D-glucosamine (p-ITC- β -D-NAcGlc) et du fluorophore isothiocyanate: fluorescéine (FITC) ou tétrarhodamine (RITC) pour obtenir des particules fluorescentes. Ce greffage est effectué directement sur les amines des nanoparticules d'or et résulte en la formation d'un groupement thio-urée [24, 37, 118]. Une purification consistant en la précipitation causée par l'ajout d'acétone suivie d'une filtration est effectuée.

Les carbohydrates p-ITC- α -D-man et p-ITC- β -D-gal ont été greffés sur les amines de dendrimères PAMAM (sans nanoparticules d'or) en utilisant la méthode proposée par

Roy [24] pour la formation du groupement thio-urée afin de comparer l'efficacité des glycodendrimères avec celle des glyconanoparticules d'or.

Les carbohydrates p-isothiocyanatophényle greffés sur les nanoparticules et dendrimères sont synthétisés à partir de carbohydrates p-nitrophényle [118]. Les carbohydrates phényles sont utilisés à cause de l'attraction hydrophobe du groupe phényle pour les récepteurs de bactéries et lectines plus grande que celle des carbohydrates méthyliques [5, 24].

À une solution aqueuse de NP stabilisées avec les PAMAM de génération amine (Au-G0, Au-G1 et Au-G2) d'un pH de 9, une solution aqueuse de carbohydrates p-isothiocyanatophényle, (1.2 mole par groupe d'amine terminale) est ajoutée, goutte à goutte. Le nombre de moles d'amines terminales de glyconanoparticules d'or de différentes générations a été déterminé par un titrage avec le TNBS. Pour obtenir des GNP fluorescentes, les carbohydrates sont mélangés avec un fluorophore, (FITC ou RITC) solubilisée dans méthanol dans un rapport de 99 : 1 (%), (1.2 mole par amine terminale). Les fluorophores FITC et RITC sont utilisés pour le greffage sur les nanoparticules d'or car ils ont une grande absorptivité molaire et un bon rendement quantique.

Après le mélange avec les carbohydrates, aucune agglomération n'a été observée pour Au-G0. Dans le cas de Au-G1 et Au-G2, après le mélange avec le carbohydrate, il y a une

agglomération des particules. (Figure 2.10). Les solutions deviennent claires vers la fin de la réaction.

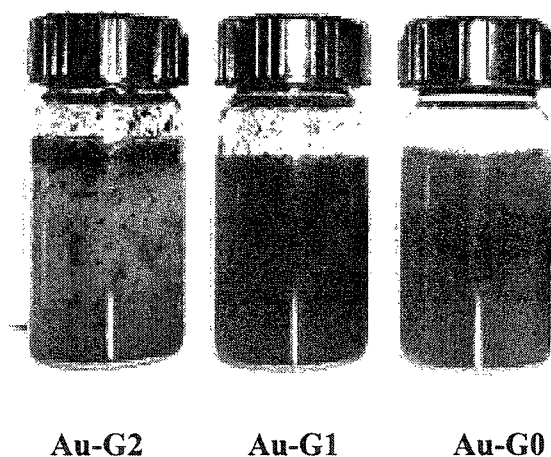


Figure 2.10: Solubilité de nanoparticules d'or recouvertes de PAMAM dans l'eau dans les premières minutes suivant l'addition du carbohydrate de type mannose.

Après l'addition du carbohydrate (et du fluorophore), les solutions de nanoparticules sont mélangées pendant 6 h à la température de la pièce (sans lumière quand le fluorophore est présent) avec un agitateur magnétique. Avec l'ajout de NaOH 0.1 M le pH est maintenu à 9-9.3 pendant toute la réaction. Après 6 h, les solutions sont refroidies à 4°C pendant 12 h. Par la suite, le pH est ajusté à 7 avant d'ajouter 100 mL d'acétone pour précipiter les nanoparticules. La nouvelle solution qui contient de l'acétone et de l'eau est refroidie dans un bain de glace durant 6 h pour accélérer la précipitation. Après 30 minutes, il y a des agrégats bruns dans la solution. Le précipité est filtré sur un filtre de nylon de 0.45 μm et lavé plusieurs fois avec de l'acétone. Après le greffage des carbohydrates, les nanoparticules d'or sont de couleur brune. Les nanoparticules sont séchées à 20 °C sous vide pendant 6 h.

2.2.2.2.1. Synthèse de carbohydrates (p-ITC- α -D-man)

Les carbohydrates p-ITC- α -D-man, p-ITC- β -D-gal, p-ITC- β -D-NAcGlc ont été synthétisés à partir de carbohydrates p-nitrophényle [118] comme schématisé dans la Figure 2.11. Par la suite, par une réaction entre l'amine du p-nitrophényle de carbohydrates et le thiophosgène, comme le montre la Figure 2.12, le carbohydrate isothiocyanate est obtenu.

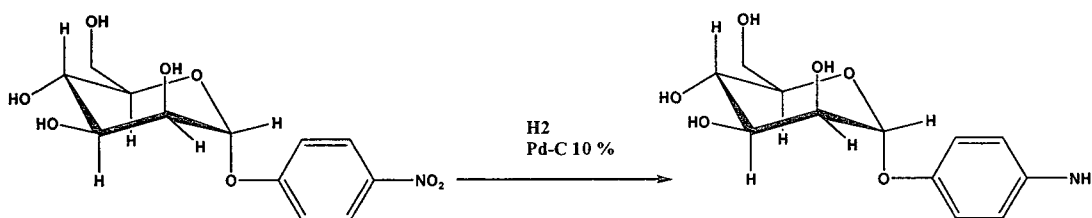


Figure 2.11: Schéma réactionnel pour la synthèse de p-NH₂- α -D-man.

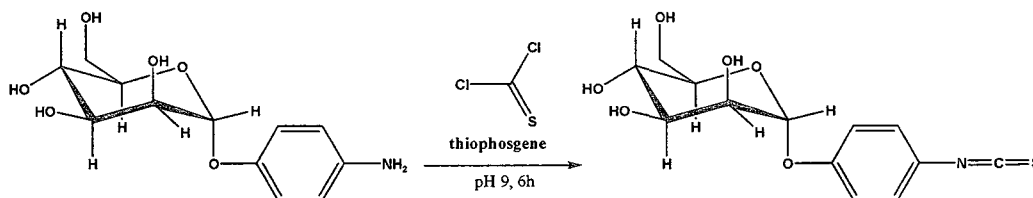


Figure 2.12: Schéma réactionnel pour la synthèse de p-ITC- α -D-man.

Pour obtenir le p-NH₂- α -D-man, le catalyseur Pd-C 10% (50 mg) est ajouté à une solution de p-NO₂- α -D-man (0.473 g, 1.57 mmol) dans le méthanol (50 mL). Le ballon est purgé avec H₂ trois fois puis l'hydrogénation se poursuit pendant 1 h sous agitation.

La solution de couleur rose pâle est filtrée afin d'éliminer le catalyseur. Après l'évaporation du solvant sous vide, 0,4 g de cristaux est récupéré. La transformation du groupement nitro en amine est vérifiée par la chromatographie à couche mince (méthanol : chloroforme : 1 : 1) ainsi que par FTIR. Le rendement de la réaction est de 88%.

Pour obtenir le p-ITC- α -D-man, une solution de p-NH₂- α -D-man (0.202 g, 0.67 mmoles) et 25 mL d'une solution de thiophosgène dans l'éthanol 80% sont mélangées (0.13 mL, 1.69 mmoles) sous agitation. La réaction se produit à la température de la pièce pendant 2h. Après 45 minutes le pH diminue à 2. Après la synthèse, la chromatographie sous couche mince (méthanol : chloroforme 1 : 1) montre que le produit de départ est absent. Le solvant est éliminé par évaporation sous vide et le carbohydrate est précipité dans l'eau. Le précipité est filtré et lavé avec l'eau. Le rendement de la réaction est de 60%. Les déplacements chimiques du proton pour le p-ITC- α -D-man sont ¹H RMN (δ , ppm) : 5.4 (d), 5.1 (d), 4.8 (d), 4.7 (d), 4.4 (d), 3.8 (s), 7.1 (d), 7.4 (d).

2.2.3. Synthèse de nanoparticules stabilisées par le 1-dodécane-thiol

Les propriétés des nanoparticules stabilisées avec les PAMAM (Au-G0, Au-G1 et Au-G2) ont été comparées aux nanoparticules d'or stabilisées avec le 1-dodécane-thiol (Au-thiol) synthétisées avec la méthode de Brust [52]. Les études de Murray [117] effectuées sur les nanoparticules Au-thiol ont permis l'évaluation du diamètre, de la masse moléculaire et du nombre d'atomes d'or. La synthèse de celles-ci est décrite ci-dessous.

À une solution de 1.5 g de bromure de tétraoctyle d'ammonium (3 moles $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7)_4\text{NBr}$) dans 80 mL de toluène, est additionnée sous agitation une solution de 0.31 g de HAuCl_4 dans 25 mL d'eau déionisée. Le tout est agité pendant plusieurs minutes. La solution jaune de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ devient orange-brune lorsque AuCl_4^- est transféré dans la phase organique. Les phases organique et aqueuse sont séparées et 0.436 mL de 1-dodécane-thiol (rapport molaire AuCl_4^- : dodécane-thiol 1:2) est ajouté à la phase organique. La solution est mélangée pendant 10 minutes et la couleur brune devient jaune très pâle. À ce mélange, une solution de 0.38 g de NaBH_4 dans 25 mL d'eau déionisée est ajoutée. Le tout est agité pendant 3 h. La phase organique devient noire suivant l'addition du réducteur (NaBH_4). Après 3 h, les phases organique et aqueuse sont séparées. La phase organique est recueillie et le toluène est évaporé. La température d'évaporation du toluène doit être environ 45°C pour prévenir une décomposition des agrégats. Des particules noires sont obtenues et elles sont caractérisées par UV-VIS, FTIR et TGA.

2.2.4. Fonctionnalisation de NPSi avec des carbohydrates

2.2.4.1. Introduction

La surface de silice a été utilisée pour l'immobilisation de biomolécules telles que des enzymes, des protéines ou d'ADN [119-125]. Grâce à la facilité de la modification de la silice et à la biocompatibilité des nanoparticules de silice (NPSi) avec le milieu biologique [126, 127] ainsi que leur taille nanométrique, [128] des NPSi fonctionnalisées avec des protéines, des peptides, d'ADN ou anticorps [129] ont été utilisées comme

biocapteurs. La littérature présente quelques exemples de NPSi modifiées avec des enzymes [130] ou des fluorophores [130-133] utilisées comme biocapteurs et biomarqueurs. Récemment, des nanoparticules (Ag, Fe₃O₄, et ZnS-CdSe) recouvertes de silice et fonctionnalisées avec le dextrane ont été synthétisées pour être utilisées comme biocapteurs [134]. Il a été montré que la présence de silice à l'extérieur de ces particules peut améliorer leur photostabilité [126, 133].

Cependant il n'y a pas beaucoup de recherches sur le développement de NPSi modifiées avec des carbohydrates (et de fluorophores) afin de les utiliser comme biocapteurs ou dans des colonnes d'affinité pour la chromatographie.

Dans ce projet, les particules de silice modifiées par des carbohydrates ont été utilisées pour l'immunoprécipitation et la détection par fluorescence de lectines. La préparation de nanoparticules de silice est effectuée en deux étapes. La première consiste en la fonctionnalisation de la silice avec des groupements amines. La seconde repose sur le greffage des carbohydrates sur des amines adsorbées sur la silice tel qu'illustré sur la Figure 2.7. Pour chaque étape de synthèse, les particules seront caractérisées par FTIR et TGA afin de vérifier leur fonctionnalisation, tout d'abord avec silane et par la suite avec des carbohydrates. Le taux du greffage de carbohydrates sera déterminé par le titrage des amines avec le TNBS et la taille des nanoparticules par MEB.

2.2.4.2. Greffage de silane sur les NPSi

Pour augmenter la concentration des groupements silanol à la surface de la silice, dans une première étape, les particules sphériques de silice de taille de 20 nm, obtenues de la compagnie Sigma, ont été chauffées dans un tube de quartz à 600°C, pendant 48h sous vide [135-138]. De cette manière, la surface de la silice a été activée avec des groupements hydroxyles, ce qui permet un greffage des silanes avec un bon rendement. Des conditions anhydres sont nécessaires afin d'éliminer l'adsorption des molécules d'eau à la surface de silice qui pourraient bloquer la surface active de silice.

Dans la deuxième étape, sur les particules de silice activée, un greffage de silane a été effectué comme il est illustré dans la Figure 2.13 [139, 140]. Environ 40 g de silice précédemment activée sous vide, ont été immergés dans 250 mL de toluène contenant 4 mL de silane, (3-aminopropyle-triéthoxysilane). Le mélange obtenu a été sous reflux pendant 3 h à 110°C. Après la réaction, la silice modifiée avec le silane a été lavée avec du toluène (100 mL) ensuite avec de l'acétone (100 mL) et séchée sous vide pendant 12 h.

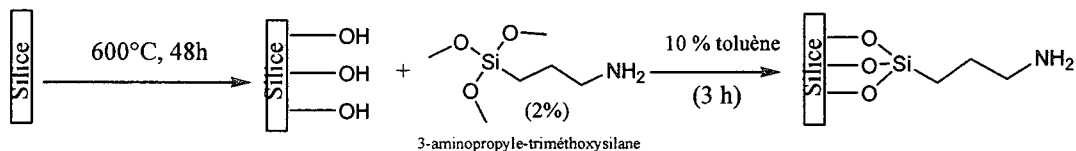


Figure 2.13 : Schéma réactionnel pour le greffage de silane sur les NPSi.

2.2.4.3. Greffage de carbohydrates sur les NPSi

Dans la dernière étape, les carbohydrates seront greffés sur les amines obtenues dans l'étape précédente. À une solution méthanolique de NPSi modifiées précédemment avec le silane, est ajoutée goutte à goutte une solution méthanolique du carbohydrate (*p*-ITC- α -D-man) dans une proportion de 1.2 mole par amine terminale [24] comme schématisé dans la Figure 2.14. Les conditions de synthèse et de purification pour les NPSi sont les mêmes que celles présentées pour les GNP.

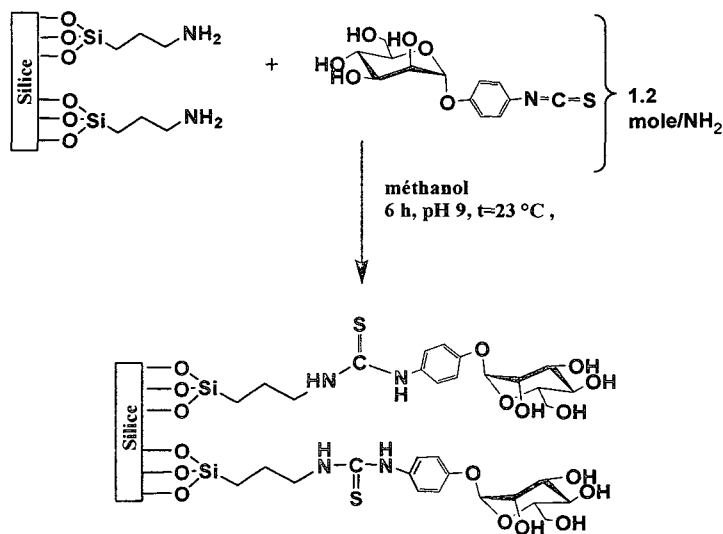


Figure 2.14: Greffage de *p*-ITC- α -D-man sur les groupements amines de silice.

2.2.5. Fonctionnalisation de plaques de verre avec des carbohydrates

2.2.5.1. Introduction

De manière générale, pour détecter les interactions spécifiques entre les protéines et carbohydrates, un des réactifs impliqués dans l'interaction est fixé sur la surface. La fixation peut se faire par une simple physisorption ou bien par la formation d'une liaison chimique qui va permettre une fixation stable des carbohydrates sur la surface. Les carbohydrates doivent être assez loin de la surface afin de limiter les interactions non sélectives entre les protéines et le substrat [141]. Donc, il est important de fonctionnaliser la surface d'un support avec des carbohydrates de manière à ce qu'elle réagisse spécifiquement avec la protéine en limitant les interactions non spécifiques. Il est aussi important de limiter l'encombrement stérique à la surface et de favoriser l'accessibilité des sites de la protéine ainsi que de limiter les interactions non spécifiques avec les cibles.

Des surfaces modifiées avec de l'ADN [142, 143], des protéines [144-146] ou des carbohydrates (puces de carbohydrates) [147-149], ont été développées. Lors des premières études, des carbohydrates greffés à la biotine qui a des interactions fortes (K_a de l'ordre de 10^{15} M^{-1}) avec l'avidine ou la streptavidine ont été utilisés. Les carbohydrates ont été physisorbés à la surface d'une plaque de verre modifiée avec l'avidine ou la streptavidine [150-152]. Lors d'autres études, des carbohydrates ont été immobilisés de manière covalente sur une surface (verre, polymère) [153-155]. L'étude

de Kiessling [141] utilise une surface modifiée avec des amines pour le greffage des carbohydrates afin d'éliminer l'immobilisation non sélective des carbohydrates à la surface du support. Des carbohydrates contenant une fonction azide ont aussi été immobilisés de manière covalente par une réaction de Staudinger à la surface d'une plaque de verre fonctionnalisée avec des dendrimères PAMAM de génération 4 et comportant en surface des groupes phosphanes [156, 157]. Les PAMAM sont utilisés afin de maximiser les sites réactifs à la surface du support. Les monocouches auto-assemblées des carbohydrates sur l'or [116, 158, 159] ont été développées par Russell et al. [160], Kahne et al. [161] et Mrksich et al. [162] afin d'immobiliser des biomolécules spécifiquement orientées à la surface. La détection des protéines immobilisées à la surface de puces à carbohydrates a été réalisée par microscopie confocale de fluorescence [162, 163], par marquage enzymatique [164, 165] et par SPR [166, 167].

Dans cette section, le greffage des carbohydrates isothiocyanates à la surface d'une plaque de verre recouverte d'amines est décrit. La préparation du substrat consiste en hydroxylation d'une plaque de verre, le greffage du silane suivi de la fixation des carbohydrates par un couplage thio-urée tel que présenté pour les NPSi. Les plaques modifiées avec des carbohydrates ont été utilisées pour immobiliser spécifiquement et détecter des lectines fluorescentes par microscopie confocale de fluorescence.

2.2.5.2. Greffage de silanes à la surface de des plaques de verre

Les étapes pour la préparation du support consistent à nettoyer, à augmenter la concentration en hydroxyle à la surface d'une plaque de verre suivi d'un greffage de silane [168-171]. Pour ce faire, des plaques de microscope ont été nettoyées dans un mélange de $H_2SO_4 : H_2O_2$ de 3 : 1. Les plaques sont ensuite rincées plusieurs fois avec de l'eau déionisée et distillée et séchées. Elles ont été mises dans une solution KOH (10% m/v) dans l'alcool isopropylique, pendant 1 h. Par la suite, les plaques ont été lavées avec du méthanol et séchées sous jet d'azote.

Les plaques de verre activées avec des groupements hydroxyle en surface ont été immergées dans une solution de 2% de silane (3-aminopropyle-triméthoxysilane) dans le toluène anhydre pour une période de 2 h, menant ainsi à la réaction décrite par la Figure 2.15. Ensuite, les plaques ont été lavées avec du méthanol et séchées sous jet d'azote.

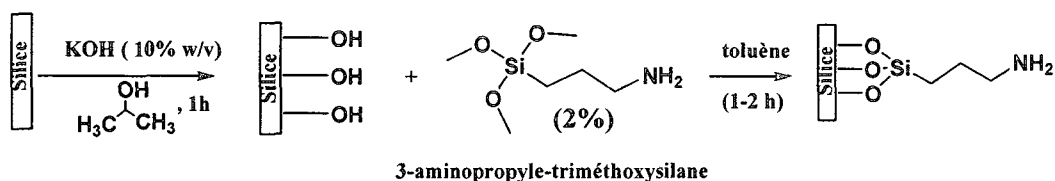


Figure 2.15: Schéma réactionnel pour le greffage de silane à la surface des plaques de verre.

2.2.5.3. Greffage de carbohydrates à la surface de plaque de verre.

Dans la dernière étape, les carbohydrates de type mannose sont greffés par un couplage thio-urée de manière covalente à la surface d'une plaque de verre. Pour ce faire, les plaques de verre modifiées précédemment avec des groupements amines en surface sont mises dans une solution de *p*-ITC- α -D-man (1M), dans le méthanol. La réaction se déroule à un pH de 9 pendant 6 h à 23°C et puis pendant 12 h à 4 °C. Afin de terminer la réaction, le pH a été ajusté à 7 avec une solution HCl 0.1 M. Après la réaction, les plaques ont été lavées avec de l'acétone et séchées sous jet d'azote. Les plaques fonctionnalisées avec le mannose ont été utilisées comme substrat pour la détection d'une lectine fluorescente par microscopie confocale. Ces applications sont présentées dans le Chapitre 6.

2.3. Techniques de caractérisation de nanoparticules d'or. Conditions expérimentales.

L'adsorption des PAMAM sur les nanoparticules d'or ainsi que le greffage des carbohydrates sur les nanoparticules d'or ont été analysés en se servant de la spectroscopie UV-VIS, FTIR, XPS et TGA. Un titrage des amines terminales a été effectué par UV-VIS afin de déterminer le rendement du greffage des carbohydrates. La taille des particules a été déterminée par TEM et DLS. La fluorescence des nanoparticules d'or fluorescentes a été mesurée. Les applications des glyconanoparticules fluorescentes pour la détection de lectines et d'une bactérie sont présentées dans les chapitres 4 et 6.

Des nanoparticules d'or stabilisées avec le dodécane-thiol (Au-thiol) servant pour une l'étude comparative avec les nanoparticules d'or stabilisées avec PAMAM, ont aussi été caractérisées par UV-VIS, FTIR et TGA.

2.3.1. Analyse UV-VIS

La formation des nanoparticules d'or a été analysée par spectroscopie UV-VIS afin de vérifier la réduction de Au^{+3} à Au^0 . Ce processus est suivi en déterminant la présence de plasmon de surface (SP) des nanoparticules d'or à environ 520 nm. Les échantillons de NP et GNP ont été dissous dans du méthanol (0.1 mg/mL) en utilisant le méthanol comme blanc. Un spectre UV-VIS a aussi été enregistré pour une solution de

nanoparticules stabilisées avec le thiol (Au-thiol) dans le toluène (0.1 mg/mL) en utilisant, comme blanc, le toluène.

Les spectres UV-VIS des solutions ont été mesurés entre 300 et 700 nm dans des cellules de quartz (1x1x4 cm), avec une résolution de 2 nm en utilisant le spectromètre UV-VIS, modèle Cary 100, Varian.

2.3.1.1. Évaluation du taux de greffage des carbohydrates par titrage avec le TNBS.

Dans cette section, le nombre de moles d'amines terminales sur les nanoparticules d'or (NP) de générations de PAMAM (Au-G0, Au-G1 et Au-G2) et sur les GNP de type mannose (Au-G0-man, Au-G1-man et Au-G2-man) est calculé afin de déterminer le rendement de cette réaction. Pour ce faire, les amines terminales de NP et de GNP ont été titrées avec l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) [129, 172]. Dans cette réaction, les amines terminales sont modifiées en N-trinitrophénylamine comme présenté dans la Figure 2.16. Le spectre UV-VIS du produit résultant donne deux pics aux longueurs d'onde de 340 ou 420 nm. Le nombre de moles d'amines terminales a été calculé en effectuant une courbe de calibration pour un étalon soit la cystamine, en se servant de la transition à 340 nm.

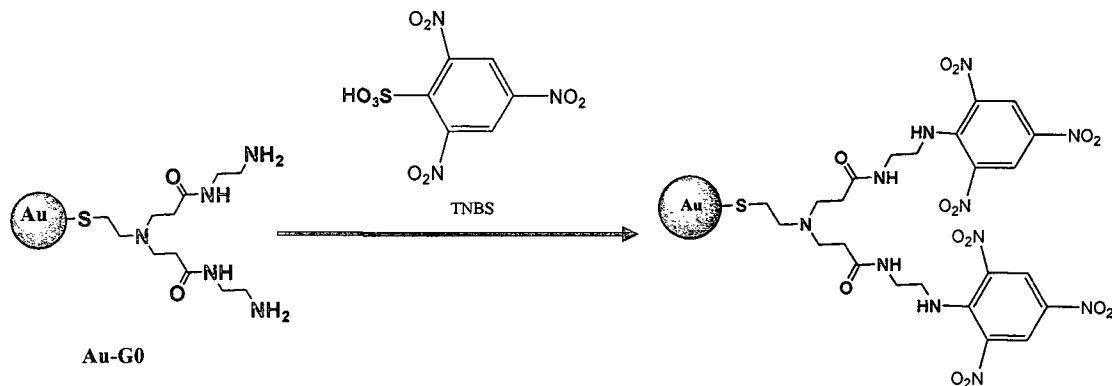


Figure 2.16: Schéma réactionnel pour la réaction entre les amines de NP (Au-G0) et le TNBS.

Pour le titrage des amines, 1 mL de l'échantillon (NP/GNP) de concentration 1 mg/mL est mélangé avec 1 mL de solution tampon de pH 9 (acide borique 0.1 M et KOH 0.5 M) et 1 mL de TNBS 0.1% (m/m). Cette solution est thermostatée pendant 2 h à 70°C. Pour arrêter la réaction, après 2 h à 70°C, la solution est refroidie et 0.5 mL de HCl 1 M est ajouté. Le spectre UV-VIS entre 300 et 500 nm est ensuite mesuré. Le blanc est effectué de la même manière qu'il a été présenté ci-dessus, en remplaçant 1 mL de l'échantillon par 1 mL d'eau nanopure.

2.3.1.2. Évaluation du nombre de moles de fluorophores greffés sur les NP.

Afin d'évaluer le nombre de fluorophores (FITC ou RITC) greffés sur les GNP de génération G0 de type mannose (Au-man-FITC) et de type galactose (Au-gal-RITC), des spectres d'absorbance entre 300 et 600 nm ont été enregistrés pour les nanoparticules

d'or avant et après le greffage des carbohydrates et fluorophores (0.1 mg/mL dans l'eau). A_{NP} correspond à l'absorbance à une longueur d'onde de 420 nm où les nanoparticules d'or (NP) avant le greffage des carbohydrates et fluorophores absorbent. L'absorbance A_{FL} correspond à l'absorbance maximale du fluorophore (à 495 nm pour FITC et 558 nm pour RITC). À partir des mesures d'absorbance, le coefficient d'extinction molaire des NP (ϵ_{NP} , $M^{-1}cm^{-1}$) a été calculé en utilisant l'équation (2.1):

$$\epsilon_{NP} = A_{420} \times MW_{NP} / (l \times c) \quad (2.1)$$

La masse moléculaire (MW_{NP}) de NP de 12.8 KDa est évaluée à partir de résultats TGA. Le parcours optique l est de 1 cm et la concentration de NP (c) est de 0.1 mg/mL.

La concentration des GNP fluorescentes [GNP-FI] est calculée à partir d'équation (2.2) et le nombre des moles de fluorophores par moles d'or (moles $_{FI}$ / moles Au) est calculé à partir de l'équation (2.3) :

$$[GNP-FI] = A_{NP} - (A_{FI} \times CF_{FI}) / \epsilon_{NP} \quad (2.2)$$

$$\text{moles } _{FI} / \text{ moles Au} = A_{FI} / (\epsilon_{FI} \times [GNP-FI]) \quad (2.3)$$

Le coefficient d'extinction molaire pour le fluorophore ϵ_{FI} est de 68 000 ($M^{-1}cm^{-1}$) pour FITC et de 65000 ($M^{-1}cm^{-1}$) pour RITC, le facteur de correction pour le fluorophore (CF_{FI}) est de 0.3 pour FITC et de 0.17 pour RITC selon le manufacturier Pierce [173].

2.3.2. Analyse par TGA et DTA.

Les pourcentages de la masse organique et d'or des NP des générations ester (Au-G-0.5, Au-G0.5 et Au-G1.5) et des générations amine (Au-G0, Au-G1 et Au-G2) ainsi que pour les (GNP) de type mannose (Au-G0-man, Au-G1-man et Au-G2-man), ont été déterminés par TGA et DTA. Le pourcentage massique d'or obtenu par TGA pour les GNP est utilisé pour estimer le diamètre, la masse moléculaire, le nombre de branches PAMAM et le nombre d'atomes d'or. Une analyse TGA a été aussi effectuée pour les nanoparticules d'or stabilisées avec le 1-dodécane-thiol (Au-thiol) afin de les comparer avec les nanoparticules d'or stabilisées avec PAMAM.

Les mesures TGA ont été effectuées en utilisant l'appareil Extar 6000 Thermal Instrument de Seiko. Il est constitué d'une balance électromagnétique ayant une précision inférieure au μg , installée dans une chambre thermorégulée (25°C à 1000°C) et étanche permettant des atmosphères gazeuses spécifiques (N_2 , Ar ou air). L'échantillon, dont la masse initiale est connue, est placé dans un creuset en platine. Un deuxième creuset qui contient de l'alumine sert de référence pour l'analyse thermique différentielle. Par cette technique, nous avons suivi la calcination des NP/GNP (environ 2 mg) sous atmosphère d'azote. Initialement la température a été maintenue à 120°C pendant 30 minutes pour éliminer l'eau. Par la suite, la température a été augmentée de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à 800°C .

2.3.3. Analyse par FTIR

Pour caractériser certains groupes fonctionnels des dendrimères PAMAM (générations ester et amine), des mesures FTIR ont été effectuées en utilisant un spectromètre Thermo Nicolet NEXUS 670 et le logiciel Omnic version 6.0a. Quelques gouttes d'une solution contenant des PAMAM dans le méthanol (0.1 mg/mL) ont été déposées sur une pastille du NaCl et le méthanol a été évaporé. Le spectre du NaCl seul a été pris comme référence.

Pour caractériser les nanoparticules d'or stabilisées avec les PAMAM (NP) de générations ester (G-0.5, G0.5 et G1.5) et amine (G0, G1 et G2) ainsi que les GNP de générations amine (G0, G1 et G2) des spectres ont été enregistrés. Environ 1 mg d'échantillon NP/GNP a été mélangé avec environ 25 mg de bromure de potassium (KBr). Le KBr est utilisé comme référence. Les spectres ont été mesurés entre 600 et 3500 cm^{-1} avec une résolution de 2 cm^{-1} par réflexion diffuse. Le spectre de KBr est soustrait de l'échantillon.

Des spectres FTIR entre 600 et 3500 cm^{-1} avec une résolution de 2 cm^{-1} ont été mesurés pour des solutions Au-thiol (0.1 mg/mL) dans le toluène. Le spectre du toluène seul a été pris comme référence est il a été soustrait de l'échantillon.

2.3.4. Analyse par XPS

Les mesures XPS permettent de déterminer la stœchiométrie N : S des NP de générations ester (Au-G-0.5, Au-G0.5 et Au-G1.5) et amine (Au-G0, Au-G1 et Au-G2) ainsi que de GNP de type mannose (Au-G0-man, Au-G1-man et Au-G2-man).

La spectroscopie XPS a été choisie pour nos études car elle permet d'obtenir la composition chimique et la concentration relative des différents éléments jusqu'à une profondeur de 5 à 50 Å. De plus, cette méthode permet de distinguer les degrés d'oxydation des différents éléments [174].

Lors d'une analyse XPS, l'échantillon est bombardé par un rayonnement X d'énergie $h\nu$ de 1 à 2 keV. Les photons causent l'excitation et l'éjection d'électrons, appelés photoélectrons. Ceux-ci proviennent des niveaux de basses énergies qui sont caractéristiques des éléments. Les photoélectrons sont analysés selon leur énergie. Dans l'équation (2.4) [174], on constate que l'énergie cinétique (EC) mesurée est directement reliée à l'énergie de liaison (EL) des électrons dans les différentes orbitales par la relation fondamentale de conservation de l'énergie, ce qui permet de déterminer la nature des éléments.

$$h\nu = EC + EL + \phi_e \quad (2.4)$$

où ϕ_e est le potentiel d'extraction nécessaire pour éjecter les électrons dans le vide. La gamme d'énergie cinétique variant de 400 à 1400 eV permet d'étudier les électrons des niveaux de cœur des éléments.

L'échantillon à analyser est mis sous forme de pastille et déposé dans une porte-échantillon, puis il est dégazé à température ambiante dans la chambre de transfert avant d'être analysé. Le spectre XPS a été pris à un angle d'émission de photoélectrons de 0° en utilisant comme source de rayons X, la raie monochromatique Al K α (1486.7 eV). Pour l'acquisition des spectres à haute résolution, l'énergie de passage a été fixée à 20 eV en mode CAE «constant analyzer energy » avec une incrémentation de l'énergie de 100 meV. Les survols sont enregistrés entre 0 et 1100 eV avec une énergie de passage de 160 eV et une incrémentation de 0.3 eV. Les spectres de haute résolution sont enregistrés pour C1s, Au4f, N1s et S2p. Dans le cas où l'échantillon est faiblement conducteur, l'énergie cinétique des photoélectrons est faussée car il y a accumulation de charges positives à la surface de l'échantillon. Dans ce cas, les pics sont déplacés vers des énergies de liaison plus élevées. Afin de recalibrer les spectres, le pic à 284.9 eV qui correspond à l'orbital C1s est utilisé comme référence interne. En utilisant le logiciel d'analyse CasaXPS[®], le fond linéaire est soustrait du spectre de l'échantillon. Pour calculer la composition de l'échantillon, des corrections pour la fonction de transmission, qui exprime l'efficacité du transport des électrons vers le détecteur en fonction de l'énergie de l'analyseur, la section efficace, et le libre parcours moyen des photoélectrons ont été effectués avec logiciel CasaXPS[®]. Après ces différentes corrections, la surface du pic est proportionnelle à la concentration atomique (%) de l'élément. Les mesures XPS

ont été effectuées en utilisant le spectromètre Vacuum Generators 220iXL avec un analyseur hémisphérique.

2.3.5. Analyse par MEB

Les GNP en présence des bactéries *E. coli* ont été visualisées par MEB. Une analyse élémentaire a été aussi effectuée par EDX. La préparation du support et des échantillons est la même que celle utilisée pour la microscopie confocale, présentée plus loin dans cette section.

Les mesures MEB ont été effectuées en utilisant le microscope à pression variable (MEB-VP), S-4300SE/N, Hitachi. La résolution du faisceau d'électrons varie entre 1.5 nm (30kV) et 5.0 nm (1kV) sous vide poussé et de 3.5 nm (30kV) à 10 Pa de pression. La plage d'amplification est de 20 à 500 000X.

Le principe d'un appareil MEB consiste à balayer, à l'aide d'un faisceau très fin, point par point la surface d'un échantillon par lignes successives et à transmettre le signal du détecteur à un écran cathodique. Par l'intermédiaire d'un canon à électrons, un faisceau d'électrons ayant une énergie entre 10 à 40 eV est envoyé sur l'échantillon et sous l'impact du faisceau d'électrons, des électrons rétrodiffusent (er) et des électrons secondaires (es) sont aussi émis par l'échantillon. Ces derniers sont obtenus par l'interaction entre les électrons du faisceau et les électrons des couches électroniques de l'atome comme il est montré dans la Figure 2.17.

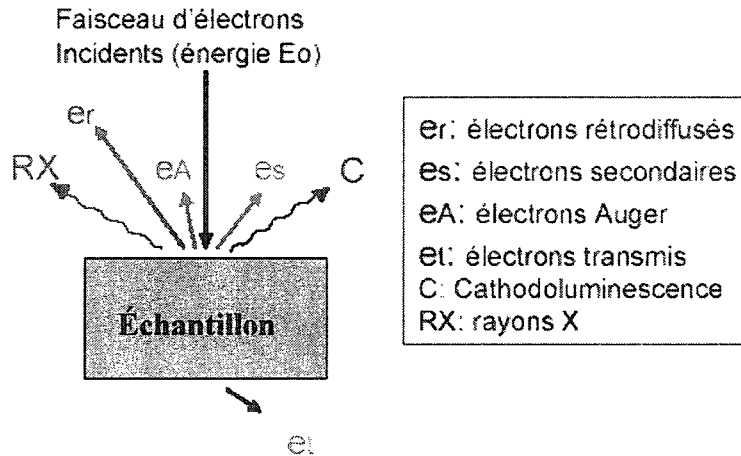


Figure 2.17: Processus du balayage de la surface d'un échantillon par MEB.

L'image obtenue donne des informations sur la topographie de l'échantillon. Pour l'analyse MEB, l'échantillon doit être un conducteur électrique (ou rendu conducteur par dépôt d'une couche mince d'or ou de graphite) afin d'éviter l'accumulation de charges. Pour obtenir des images des bactéries, une couche de graphite a été utilisée.

2.3.6. Analyse par TEM.

La taille des particules d'or (NP et GNP) a été mesurée par TEM. Quelques gouttes d'une solution fraîche de NP et GNP (1 mg/mL dans l'eau) ont été placés pendant 30 secondes sur des supports de cuivre (300 mesh). L'excès est éliminé avec du papier buvard. Ensuite la grille est séchée à l'air pendant 1 h. Les images ont été prises avec un microscope à transmission électronique JEM-2000FX à un voltage de 200 V.

Le microscope électronique à transmission permet d'obtenir des images des matériaux à l'échelle de quelques nanomètres. Il permet aussi de mettre en évidence la micromorphologie des solides étudiés et la présence de domaines cristallins, déformations, etc. Le microscope électronique à transmission est constitué de trois composantes principales : une colonne optique électronique, un système de vide et les éléments électroniques nécessaires à son fonctionnement (lentilles, etc.). La colonne comporte une succession de lentilles électromagnétiques dont le champ magnétique influence la trajectoire des électrons.

2.3.7. Analyse par DLS

La taille des GNP (1 mg/mL dans l'eau) a aussi été déterminée par la diffusion de la lumière. Avant d'effectuer les analyses, les solutions fraîches ont été filtrées deux fois sur des filtres Millex-GV de 0.22 μ m.

Les mesures ont été effectuées dans des cellules en plastique d'un volume de 3 mL. Une distribution de taille des particules a été enregistrée avec l'analyseur Brookhaven Instrument Corporation, modèle 90 Plus/BI-MAS.

2.4. Applications de nanoparticules pour la reconnaissance moléculaire.

2.4.1. Spectroscopie de fluorescence

La fluorescence est une méthode de choix pour cette étude car elle est plus sensible que la spectroscopie d'absorption. Elle permet la détection simultanée de composés fluorescents à des concentrations très faibles et de manière sélective.

Les études de fluorescence qui sont présentées dans les Chapitres 4 et 5 ont pour but de quantifier l'efficacité des glyconanoparticules (fluorescentes ou non) comme biocapteurs de lectines. Elles permettent aussi de quantifier l'affinité des GNP pour les lectines ainsi que de déterminer la thermodynamique et la cinétique de la reconnaissance.

Les spectres de glyconanoparticules d'or fluorescentes recouvertes de mannose et de fluorescéine de concentration 2.2 μM , présentés dans le Chapitre 4, ont été mesurés dans une cellule de quartz d'un volume de 3 mL (1 x 1 x 4 cm). Les mesures d'atténuation de la fluorescence pour déterminer les constantes d'affinités ainsi que les paramètres thermodynamiques et cinétiques ont été effectuées sur une plaque à 98 puits en triplicata. Les solutions ont été préparées dans une solution tampon de PBS (0.15 M NaCl/20 mM-tampon phosphate, pH 7.4) qui a aussi été utilisé comme blanc.

Pour les GNP ou lectines marqués de FITC, la fluorescence a été mesurée à la longueur d'onde d'émission de 520 nm pour une excitation à 490 nm avec une fente de 5 nm. Pour

les lectines marquées de FITC, la fluorescence a été mesurée à la longueur d'onde d'émission de 580 nm pour une excitation à 550 nm avec une fente de 5 nm. L'émission est enregistrée avec un spectromètre Perkin Elmer Luminescence Spectroscopy LS 50B.

2.4.2. Séparation des protéines par l'électrophorèse SDS-PAGE

La méthode SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) a été choisie car elle permet la séparation et l'identification des protéines en fonction de leur masse moléculaire en utilisant une matrice de gel de polyacrylamide. Elle est une méthode fiable qui permet d'analyser simultanément plusieurs échantillons sur un même gel, dans des conditions expérimentales identiques. La coloration avec le bleu de Coomassie et la fluorescence est utilisée pour visualiser les protéines.

Dans un premier temps, cette étude propose de séparer des protéines de tailles différentes, Con A et WGA, et de les détecter en fonction de leur masse moléculaire en combinant l'immunoprécipitation sélective des protéines par les GNP de type mannose et l'identification des protéines après une séparation par l'électrophorèse SDS-PAGE. Cette méthode permet de mettre en évidence l'affinité sélective des GNP de type mannose pour la lectine Con A.

Dans un deuxième temps, le complexe Con A-GNP est mis en évidence aussi par SDS-PAGE mais détecté par fluorescence. Pour cette expérience la lectine Con A marquée ou non avec FITC (Con A, Con A-FITC) et des GNP de génération G0 de type mannose

marqués avec FITC (Au-man-FITC) ont été utilisées. La masse moléculaire de Au-man-FITC a été ainsi obtenue.

La migration des protéines a été effectuée sur un gel de séparation de 12% [24] dans le tampon (1.5M Tris-HCl, pH 8.8), coulé en position verticale entre deux plaques de verre (0.75 mm épaisseur), en utilisant le système d'électrophorèse Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell, Bio Rad®. Le sommet du gel constitue le gel d'entassement 4% [24] dans le tampon (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8) qui a plusieurs puits qui contiennent les échantillons à séparer.

Les Tableaux 2.2 et 2.3 montrent la préparation des gels de séparation (12%) et d'entassement (4%) à partir des solutions d'acrylamide / méthylènebisacrylamide (30%T, 2.67%C). Le %T représente la concentration totale (g/100 mL) d'acrylamide et de l'agent réticulant, le méthylènebisacrylamide et le % C représente le rapport (%) entre les poids du méthylènebisacrylamide sur celui de l'acrylamide.

Tableau 2.2: Préparation des solutions d'acrylamide/méthylènebisacrylamide pour l'électrophorèse SDS-PAGE.

Acrylamide/ méthylènebisacrylamide (Ac/bisAc) (30%T, 2.67%C)/100 mL
29.2 g acylamide et 0.8 g N'N'-bis-méthylène-acrylamide
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8/ 50 mL (Tris base 9.08 g)
0.5 M tris-HCl, pH 6.8 (Tris base 3 g)
10 % SDS/10 mL: dodécylsulfate de sodium (SDS) 1 g
10 % TEMED/ 3mL: N,N,N',N'-tétraméthylènediamine 0.3 mL
10 % APS /3 mL: ammonium persulfate 0.3 g

Tableau 2.3: Préparation des gels pour l'électrophorèse SDS-PAGE.

<u>Gel de séparation 12 %</u>		<u>Gel d'entassement 4%</u>	
Ac/bisAc (30%, 2.67%)	4.00 mL	Ac/bisAc (30%, 2.67%)	0.65 mL
H ₂ O	3.30 mL	H ₂ O	3.00 mL
1.5M Tris/HCl, pH 8.8	2.50 mL	0.5M Tris/HCl, pH 6.8	1.25 mL
10 % SDS	0.10 mL	10 % SDS	0.05 mL
10 % APS	0.05 mL	10 % APS	0.25 mL
10 % TEMED	0.05 mL	10 % TEMED	0.05 mL

La base et le sommet du gel sont mis dans une solution électrolyte (Glycine, Tris base, sodium dodecyl sulphate (SDS)). L'anode est située en bas du gel et la cathode en haut. Les échantillons sont mélangés avec un tampon d'échantillon (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, glycérol 1.0 mL 5%, bleu de bromophénol 0.04%). Le bleu de bromophénol migre plus rapidement et il est ajouté pour visualiser la migration. Les échantillons sont mélangés aussi avec du β -mercaptoéthanol. Ce dernier est un agent réducteur qui brise les ponts

disulfures des protéines et les dénature. C'est pour cette raison que les bandes qui correspondent aux tétramères ou dimères ne sont pas visibles sur les gels. Les protéines ont été séparées avec une tension constante de 160 V et un courant de 350 mA sur des gels de séparation (12 %). Le temps de migration est de 45 min soit jusqu'au moment où le colorant atteint le fond du gel. Après la migration, les gels ont été révélés par une solution de coloration (0.025% Bleu de Comassie, 40% méthanol, 10% acide acétique) pendant 20 min et décolorés pendant 6 h. Pour chaque protéine présente, une bande est observée. Les bandes des protéines ont été visualisées en épi-illumination transmise à une longueur d'onde de 360 nm ou en fluorescence avec l'Alpha Innotech Corporation, CHEMILMAGER 5500.

Des solutions de lectines (Con A, Con A-FITC) et Au-man-FITC (1mg/mL dans PBS), ont été mélangées dans un rapport (v/v) de 2 : 1. Après 1 h, le complexe protéine-GNP (surnageant et précipité) a été analysé par électrophorèse. Pour ce faire, 0.075 mL de lectine, GNP-FITC et du complexe (surnageant et précipité) ont été prélevés et ensuite mélangés avec 0.075 mL du tampon de chargement, le β -mercaptoéthanol. Ensuite, 20 μ L de chaque mélange ont été prélevés et appliqués sur le gel. Pour le standard (Broad Range[®], 6.5-200 kDa, BioRad), 10 μ L de solution d'une dilution de 1 : 20 ont été appliqués sur le gel. Pour obtenir la dilution, 0.05 mL de standard ont été mélangés avec 0.45 mL H₂O et 0.5 mL de la solution de tampon de l'échantillon (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, glycérol 1.0 mL 5%, bleu de bromophénol 0.04%).

2.4.3. Détection de la bactérie *E. coli*

Les glyconanoparticules d'or fonctionnalisées avec des fluorophores présentées dans cette thèse, ont pour but de développer un biocapteur efficace pour la détection de bactéries sans les modifier chimiquement. Des glyconanoparticules de génération G0 de type mannose modifiées avec la fluorescéine (Au-man-FITC) sont utilisées pour la détection de la bactérie *E. coli*.

Cette étude comporte plusieurs étapes. La première correspond à la préparation du support par l'immobilisation de poly(lysine) à la surface d'une plaque de verre de microscope. Une autre étape est l'immobilisation des bactéries à la surface d'une plaque recouverte de poly(lysine). Les bactéries ont été préalablement cultivées afin d'augmenter le nombre des récepteurs sur les pili des bactéries. La dernière étape consiste en le marquage des bactéries par les GNP fluorescentes et la détection par la microscopie confocale de fluorescence (MCBL). Une étude complémentaire a été effectuée par MEB pour marquer les bactéries par l'or des GNP.

2.4.3.1. Immobilisation de la poly(lysine)

Des plaques de microscope ont été immergées pendant 12 h dans une solution de poly(lysine) 0.01 % (m/m). Par la suite, les plaques ont été lavées pendant 10 min avec de l'eau nanopure pour éliminer l'excès de poly(lysine). Ce type de support est beaucoup utilisé pour immobiliser les bactéries mais il n'est pas sélectif.

2.4.3.2. Immobilisation et marquage de *E. Coli* par les GNP fluorescentes

Les bactéries *E. coli* CFT073, fournies par l'INRS-Institut Armand-Frappier, ont été cultivées pendant 24 h à 37°C dans un milieu de culture (10 g NaCl; 10 g trypton; 10 g levure, 500 mL l'eau nanopure, autoclavé à 120°C pour 1 h). Les plaques de pétrie ont été recouvertes avec 50 µL du milieu bactérien et incubés à 37°C pour 12 h [175]. Dans les mêmes conditions que celles présentées ci-dessus, trois cultures de bactéries ont été obtenues pour augmenter le nombre des récepteurs sur les pili des bactéries.

Approximativement une colonie, obtenue dans la troisième culture de bactéries, a été suspendue dans 50 µL du milieu de culture et mélangées pendant 10 min avec des GNP (1 mg/mL dans PBS). Les GNP utilisées sont celles de génération G0 de type mannose ou marquées avec la fluorescéine (Au-G0-man ou Au-man-FITC) ou de type galactose ou marquées avec la tétrarhodamine (Au-G0-gal ou Au-gal-RITC). Ce mélange a été déposé sur des plaques de microscope recouvertes de poly(lysine) et incubées pendant 1 h à 37 °C. Par la suite, les plaques ont été lavées trois fois avec une solution de PBS pour éliminer les bactéries non-liées et les GNP en excès. Les plaques ont été immergées dans une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 15 min. Les plaques ont été lavées pendant 15 min avec la solution de PBS et de l'eau pendant 10 min. Ces plaques ont été utilisées pour prendre des images de fluorescence ou réflectance par MCBL et des images MEB. La détection de la bactérie *E. coli* par des images de fluorescence et de réflectance a été effectuée en utilisant le microscope confocal MRC 1024ES, BioRad. Le FITC a été

excité à 494 nm et l'émission a été détectée à 518 nm. Le RITC a été excité à 555 nm et l'émission enregistrée à 580 nm.

La microscopie confocale est beaucoup utilisée pour la localisation *in situ* d'une sonde fluorescente dans des cellules d'un spécimen. Le principe général de cette méthode est schématisé sur la Figure 2.18. Un laser cause l'excitation des fluorophores. Il y a alors émission provenant de différents plans de la préparation. Grâce à un diaphragme variable, il est possible de sélectionner les rayons émis par un seul plan et d'éliminer le signal provenant d'autres plans. Les rayons réfléchis sont filtrés en fonction de leur longueur d'onde puis détectés par des photomultiplicateurs.

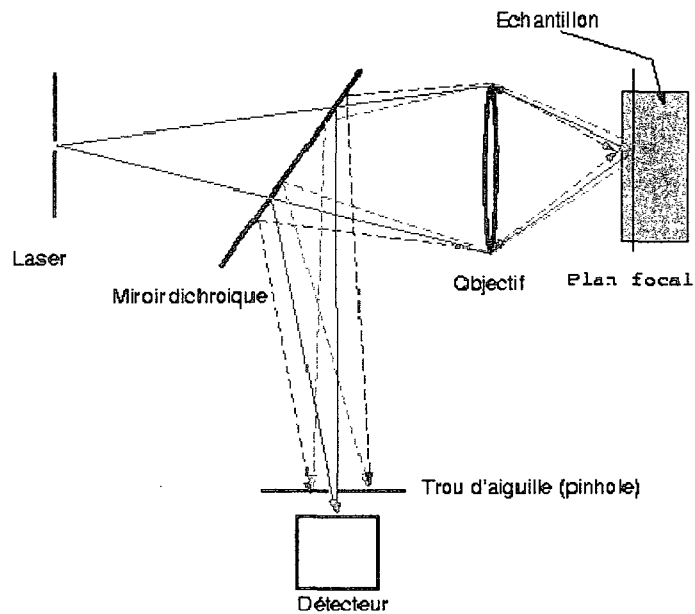


Figure 2.18: Schéma de fonctionnement d'un microscope confocal [176].

Chapitre 3. Caractérisation des nanoparticules

3.1. Introduction

Dans ce chapitre la caractérisation de nanoparticules d'or avant et après le greffage des carbohydrates sera présentée en premier lieu. L'objectif de cette partie est de vérifier si les glyconanoparticules d'or (GNP) sont solubles, stables en milieu biologique et utilisables dans des tests de reconnaissance moléculaire qui seront présentés dans les chapitres suivants. Pour démontrer que le greffage des carbohydrates peut se faire sur d'autres supports, dans la deuxième partie du chapitre, le greffage des carbohydrates à la surface de nanoparticules de silice sera détaillé. Les nanoparticules de silice recouvertes des carbohydrates seront utilisées pour la détection de lectines.

Des méthodes physico-chimiques telles que l'UV-VIS, le FTIR, la TGA et le XPS, ont été utilisées pour caractériser les nanoparticules. La distribution de taille des nanoparticules a été déterminée par TEM et par DLS.

3.2. Caractérisation de nanoparticules d'or

Le choix d'utiliser des dendrimères de type PAMAM adsorbés à la surface d'or vise entre autres à assurer la solubilité et stabilité des nanoparticules d'or dans l'eau et dans un milieu biologique. Cette section est consacrée à l'étude de ces propriétés ainsi que de caractériser l'adsorption des PAMAM de générations ester (G-0.5, G0.5 et G1.5) et amine (G0, G1 et G2) et le greffage des carbohydrates à la surface d'or. Cependant,

seulement les générations amine des nanoparticules d'or ont été utilisées dans la deuxième partie pour le greffage des carbohydrates. Une étude comparative avec des particules d'or modifiées avec 1-dodécane-thiol est aussi présentée.

Tout d'abord, la solubilité des nanoparticules a été étudiée. Après la synthèse, comme le montre la Figure 3.1, les nanoparticules d'or stabilisées par les PAMAM sont solubles dans l'eau tandis que celles recouvertes de 1-dodécane-thiol (Au-thiol) sont insolubles.

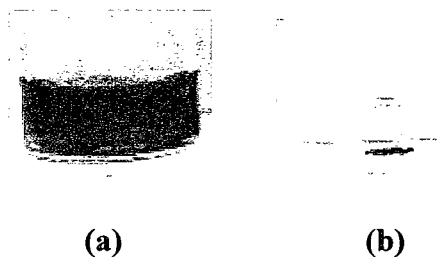


Figure 3.1: Solubilité de nanoparticules: (a) Au-G0 et (b) Au-thiol dans l'eau.

Après le greffage des carbohydrates sur les nanoparticules stabilisées avec les PAMAM, des GNP solubles dans l'eau et dans le tampon PBS sont obtenues. Les solutions de nanoparticules d'or de génération G0 avant et après le greffage des carbohydrates sont les plus stables en temps car aucun précipité n'est observé même après 30 jours. Les autres générations ont une tendance à précipiter après une semaine.

3.2.1. Détermination de la taille de nanoparticules d'or

Dans cette section, la distribution des tailles ainsi que la taille moyenne des particules d'or sont déterminées. Les analyses par TEM et DLS présentés dans cette section ont été effectuées pour la génération G0 de NP et GNP de type mannose.

La Figure 3.2 montre une image TEM des NP (Au-G0) sur laquelle des points noirs correspondant à de l'or dont le diamètre varie entre 2 et 10 nm. On constate que les particules d'or ont tendance à s'agglomérer, possiblement dû à la présence d'amines protonées en surface qui peuvent former des liens hydrogène avec les amides de PAMAM.

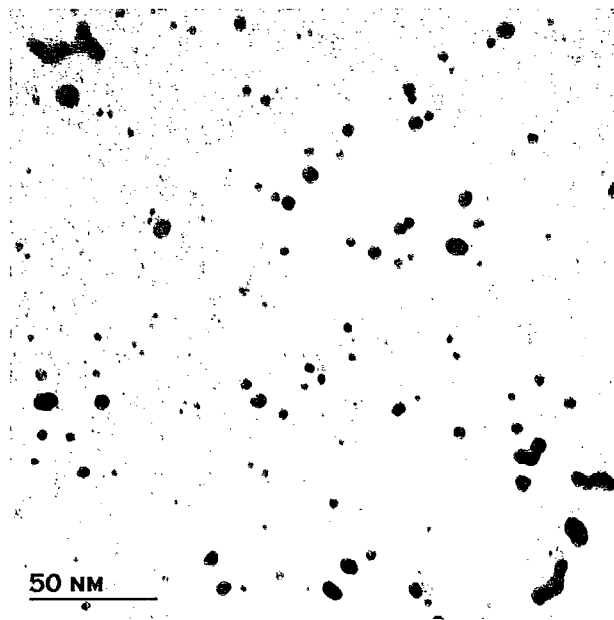


Figure 3.2: Image TEM pour les NP stabilisées avec PAMAM.

La Figure 3.3 montre la distribution de taille de Au-G0-man. On note qu'après le greffage des carbohydrates (mannose) les nanoparticules sont plus dispersées. Dans cette image TEM, une distribution de taille plus étroite des nanoparticules et aussi une taille moyenne d'environ 2 nm est obtenue. Donc, le greffage de carbohydrates stabilise les nanoparticules.

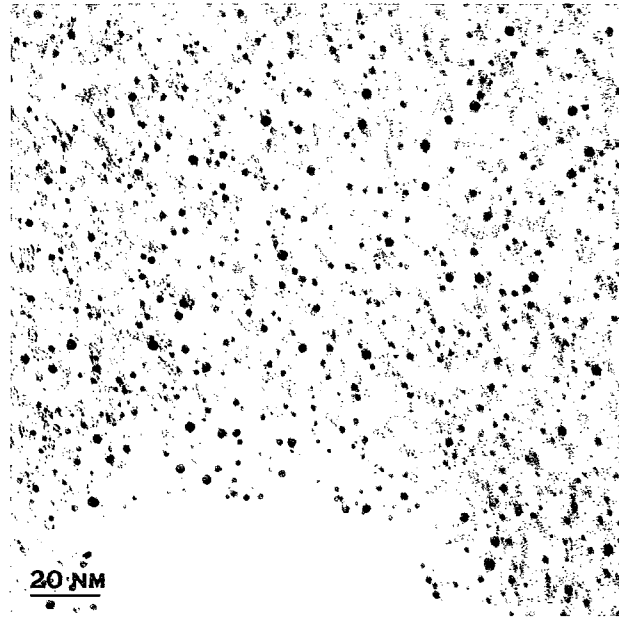


Figure 3.3: Image TEM pour les GNP de type mannose.

La diffusion de la lumière (DLS) confirme le résultat TEM pour la taille des GNP de type mannose de génération G0 dans l'eau ainsi que dans le PBS. La Figure 3.4 montre une distribution de taille centrée autour de 2 nm pour les GNP. Il n'est pas possible de voir une distribution Gaussienne sur la Figure 3.4 car la limite de détection de la taille des particules est d'environ 1.5 nm.

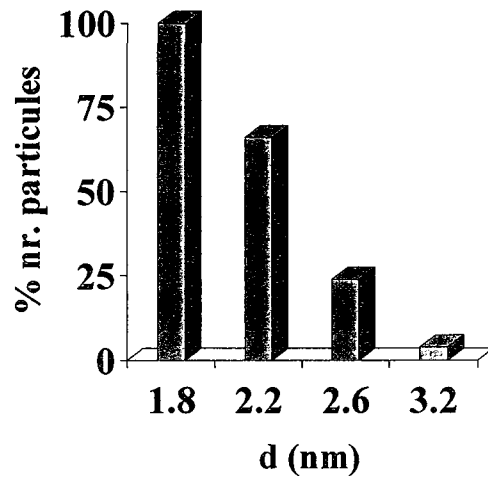


Figure 3.4: Distribution de taille de GNP de type mannose.

Une étude précédente [177] portant sur des nanoparticules d'or recouvertes de PAMAM de type amine de génération G2 a rapportée une distribution de taille d'environ 15 nm. Cependant, lorsque la génération PAMAM augmentait (G6), la taille diminuait à 7 nm. L'analyse TEM montre que ces particules sont agglomérées et qu'elles ont une structure polycristalline. L'agglomération des particules est reliée à la surface chargée positivement par les amines protonées qui peuvent interagir avec des anions. Une autre étude [55] montre que les nanoparticules d'or de type amine de génération PAMAM (G4) sont plus dispersées que celles de la génération G2 qui ont une taille moyenne de 2.5 nm.

3.2.2. Plasmon de surface des nanoparticules d'or

La spectroscopie UV-VIS est utilisée afin d'analyser le plasmon de surface de nanoparticules et les transitions électroniques caractéristiques de l'or. Dans les Figures 3.6 et 3.7, l'absence d'un pic à 313 nm dans le spectre UV-VIS montre que Au^{+3} est bien réduit en Au^0 .

La couleur brune des solutions de NP est la première indication que des nanoparticules de très petite taille sont obtenues. D'autres études sur les nanoparticules d'or ont montré que plus les tailles des particules augmentent, la couleur devient rouge et dans le spectre UV-VIS des particules une bande caractéristique à 520 nm apparaît [117]. Cependant les mesures effectuées par UV-VIS pour les NP obtenues dans cette étude montrent l'absence de cette bande. Tel que présenté dans les Figures 3.5 et 3.6, les spectres UV-VIS de nanoparticules d'or (NP) sont approximativement identiques pour les générations ester et amine de dendrimères. Dans ces figures, l'absence du plasmon de surface (SP) entre 500 et 550 nm, caractéristique des nanoparticules d'or, suggère que la taille de nanoparticules est inférieure à 2 nm [117]. Après le greffage des carbohydrates sur les amines terminales de nanoparticules Au-G0, Au-G1 et Au-G2, la Figure 3.7 montre encore l'absence du pic à 520 nm dans les spectres UV-VIS. Cependant, dans cette figure, le pic caractéristique à environ 260 nm correspondant au phényle des carbohydrates est visible.

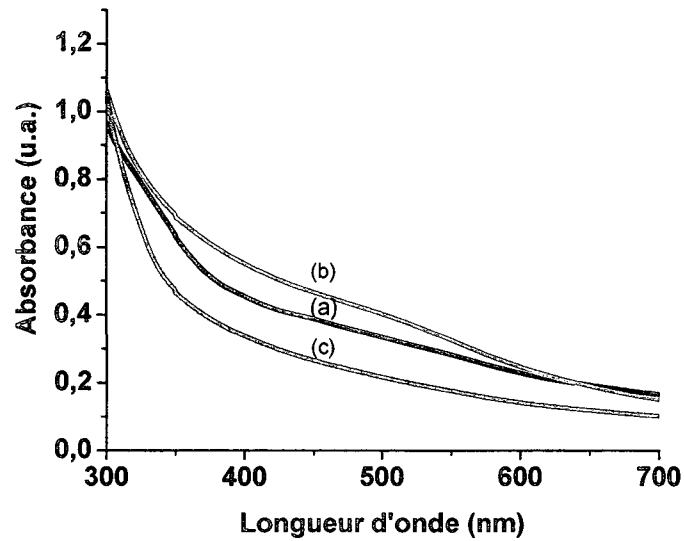


Figure 3.5: Spectres UV-VIS des NP: (a) Au-G-0.5; (b) Au-G0.5; (c) Au-G1.5 (0.1 mg/mL dans le méthanol).

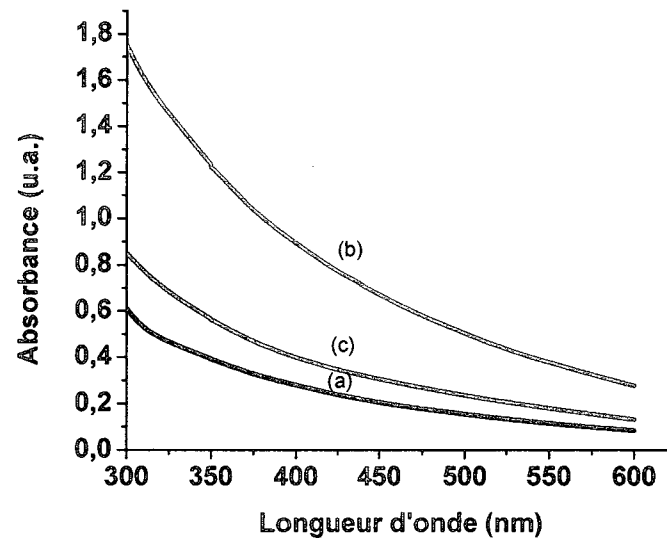


Figure 3.6: Spectres UV-VIS des NP: (a) Au-G0; (b) Au-G1; (c) Au-G2 (0.1 mg/mL dans le méthanol).

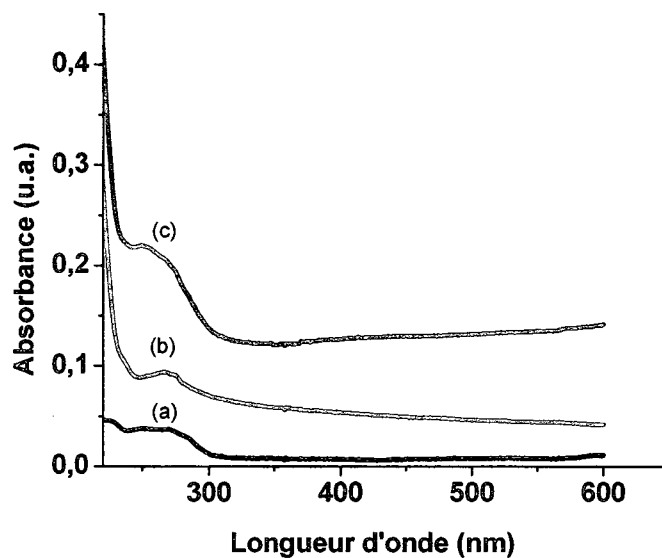


Figure 3.7: Spectres UV-VIS des GNP de type mannose: (a) Au-G0-man; (b) Au-G1-man; (c) Au-G2-man (0.1 mg/mL dans le méthanol).

Dans la littérature [55], les nanoparticules d'or recouvertes de PAMAM de taille 2.5 nm présentent un plasmon de surface à environ 520 nm. Plus la génération PAMAM augmente, la taille diminue et le plasmon se déplace vers 500 nm.

Une étude comparative a été effectuée avec des nanoparticules stabilisées avec le 1-dodécane-thiol (Au-thiol) qui ont été synthétisées d'après la méthode Brust [52]. La Figure 3.8 montre que les nanoparticules (Au-thiol) ont une faible bande SP à 520 nm. Celle-ci démontre que la taille de particules recouvertes de thiols est sous 2 nm.

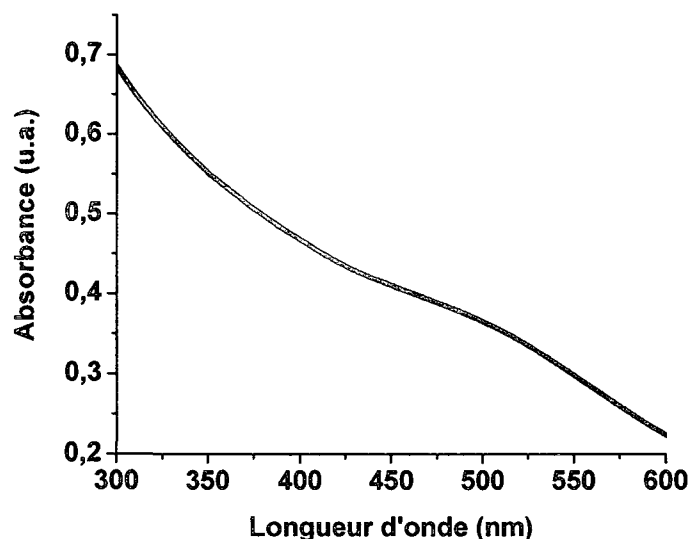


Figure 3.8: Spectre UV-VIS pour Au-thiol (0.1 mg/mL dans le toluène).

Les études de Murray [117] ont démontré que la méthode de synthèse de nanoparticules (les rapports thiol : or : réducteur) ainsi que la température et la période d'ajout des réactifs peuvent produire une variation de taille des particules entre 1.5 et 5.2 nm.

3.2.3. Étude du greffage de PAMAM et de carbohydrates sur les NP par FTIR

La spectroscopie FTIR est utilisée pour identifier les bandes fonctionnelles d'amines, d'amides et des esters avant ainsi qu'après l'adsorption de dendrimères PAMAM des générations ester (G-0.5, G0.5, G1.5) et amine (G0, G1 et G2) à la surface de nanoparticules d'or. En utilisant cette méthode, une étude comparative avec les nanoparticules modifiées avec thiol (Au-thiol), a aussi été effectuée. Par la suite, le greffage des carbohydrates sur les amines primaires par la formation du groupement thio-

urée ainsi que la synthèse des carbohydrates sont suivies par FTIR en examinant la transformation du groupement nitro en amine.

La Figure 3.9 présente les spectres FTIR de NP de génération ester (Au-G-0.5, Au-G0.5, Au-G1.5). Ces spectres montrent la présence des bandes esters et amides caractéristiques des dendrimères (G-0.5, G0.5, G1.5) (Figure 3.9). L'élongation du C=O d'esters est à environ 1730 cm^{-1} . La bande I des amides (déformation du N-H des amides) est à 1640 cm^{-1} , la bande II des amides (déformation du C=O des amides) est à 1550 cm^{-1} , l'élongation asymétrique du N-H est à environ 3540 cm^{-1} et l'élongation symétrique du N-H à environ 3340 cm^{-1} .

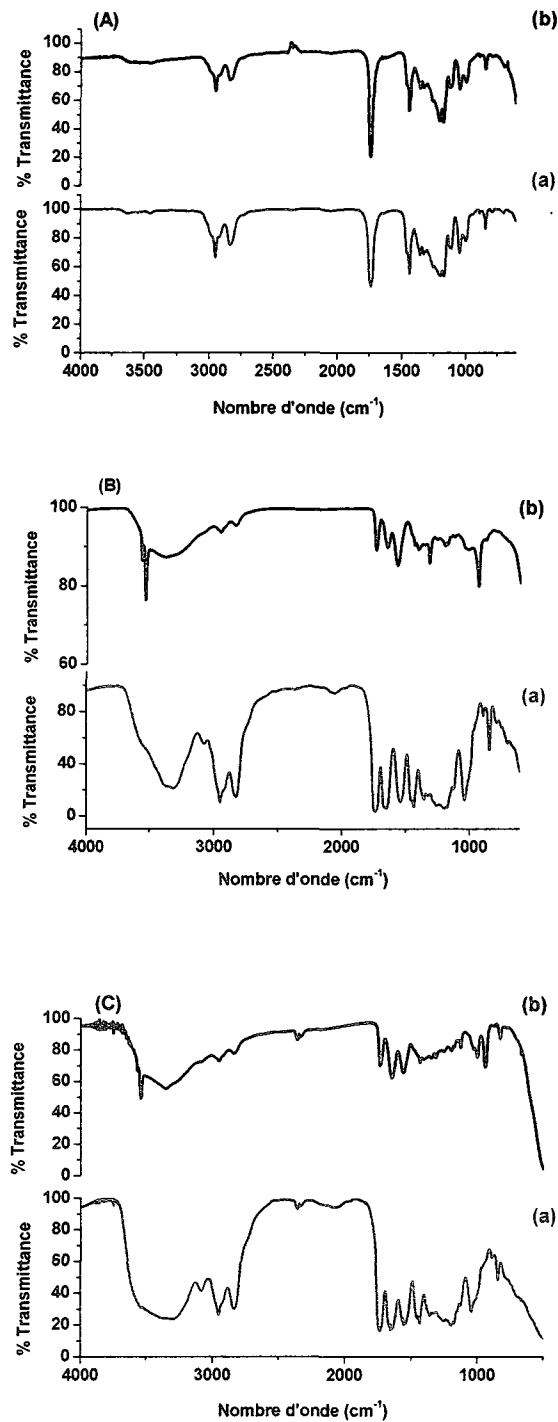


Figure 3.9: Spectres FTIR de: (a) dendrimères PAMAM: (A) G-0.5; (B) G 0.5; (C) G 1.5 et (b) NP: (A) Au-G-0.5; (B) Au-G0.5; (C) Au-G1.5.

La Figure 3.10 montre les spectres FTIR de NP de génération amine (Au-G0, Au-G1 et Au-G2) qui contiennent les bandes d'amines primaires et d'amides caractéristiques des dendrimères (G0, G1 et G2) [33]. La bande de déformation angulaire des liens N-H des amines primaires (cisaillement) est à environ 900 cm^{-1} , la bande I des amides est à environ 1640 cm^{-1} et la bande II des amides est à environ 1550 cm^{-1} . Les élongations asymétrique et symétrique du N-H dues à des amides sont entre 3520 et 3300 cm^{-1} .

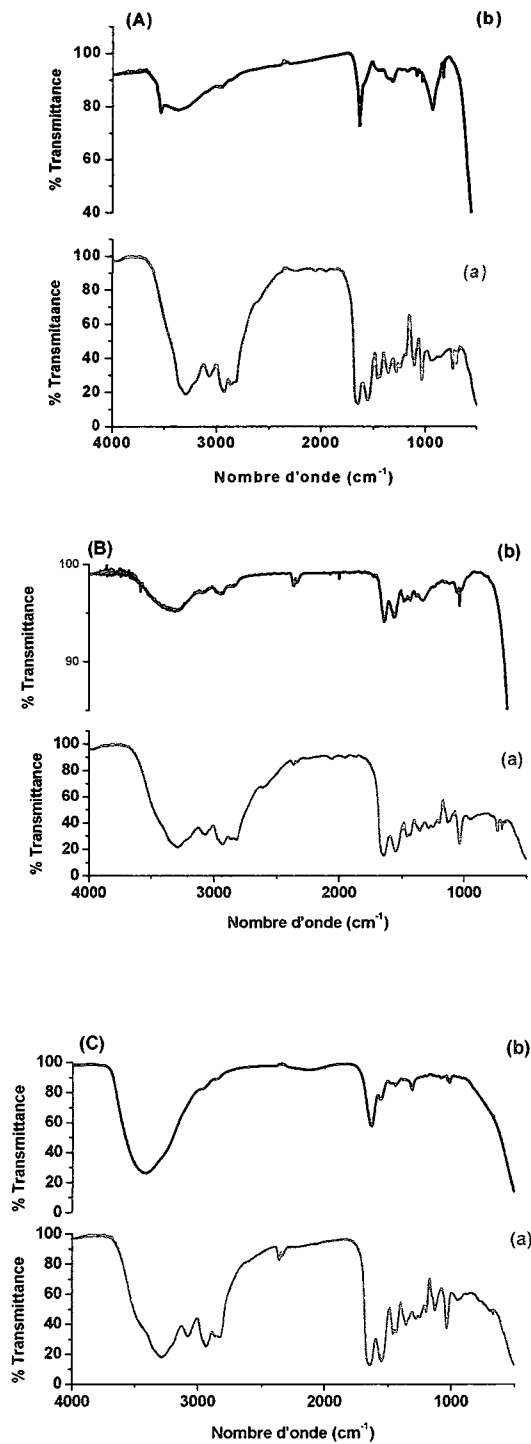


Figure 3.10: Spectres FTIR de: (a) dendrimères PAMAM : (A) G0; (B) G1; (C) G2 et (b) NP: Au-G0 (A) ; (B) Au-G1; (C) Au-G2 de génération amine.

Cette étude montre que les spectres de NP contiennent les bandes spécifiques des groupements des PAMAM (générations ester ou amine) ce qui nous permet de conclure que les PAMAM sont adsorbés à la surface d'or.

La littérature [117, 178] montre qu'en étudiant par FTIR les configurations des groupes méthylènes et les vibrations C-S, certaines informations sur la configuration adoptée par une chaîne aliphatique peuvent être obtenues dans le cas de nanoparticules d'or stabilisées avec 1-dodécane-thiol (Au-thiol). Une comparaison a aussi été effectuée pour les NP avec des PAMAM.

Comme le montre la Figure 3.11, la vibration asymétrique CH_2 est à $\sim 2920 \text{ cm}^{-1}$. Ceci suggère que les groupes méthylènes sont majoritairement dans une configuration trans à la surface d'or. Ceci a aussi été observé pour des alkylthiols adsorbés sur des nanoparticules d'une taille d'environ 2 nm [179].

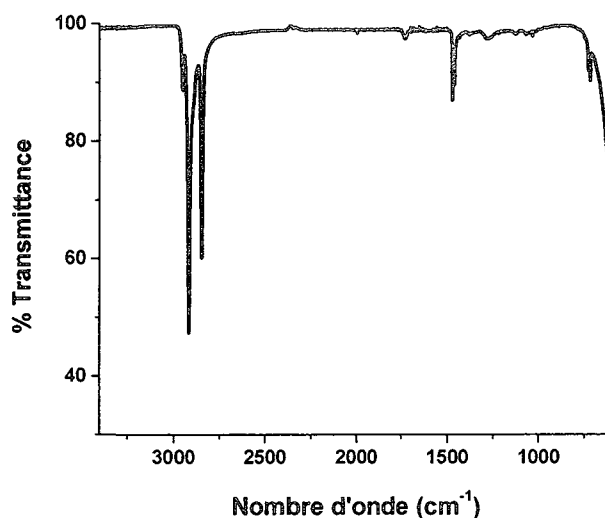


Figure 3.11: Spectre FTIR pour Au-thiol.

Le pic d'élongation symétrique C-H du méthylène est à $\sim 2874\text{cm}^{-1}$. L'élongation asymétrique du CH_3 est à 2946 cm^{-1} . Les déformations symétriques du méthyle sont à $\sim 1378\text{ cm}^{-1}$. Les configurations à la surface d'or sont caractérisées par des vibrations C-S qui lorsque observées à $\sim 720\text{ cm}^{-1}$ indiquent une liaison adjacente C-C trans tandis qu'un pic à $\sim 640\text{ cm}^{-1}$ indique une liaison C-C gauche. Cette dernière est caractéristique de surfaces irrégulières qui ont des défauts. Le spectre FTIR des nanoparticules (Au-thiol) montre la présence d'un pic à $\sim 725\text{ cm}^{-1}$ attribué à une liaison C-C trans adjacente au lien C-S et l'absence de la bande à $\sim 640\text{ cm}^{-1}$. Ce résultat met en évidence une configuration trans majoritairement et un diamètre petit de nanoparticules ce qui est en accord avec les analyses UV-VIS présentée ci-dessous.

Cependant, la méthode FTIR ne peut pas nous fournir des informations sur la configuration adoptée par une chaîne aliphatique de PAMAM car dans le spectre de NP (stabilisées avec les dendrimères PAMAM), l'élongation asymétrique du CH_2 et les bandes caractéristiques pour les vibrations C-S à $\sim 720\text{ cm}^{-1}$ et à $\sim 640\text{ cm}^{-1}$ ne sont pas visibles. La seule bande visible est l'élongation symétrique du CH_2 est entre $2830\text{-}2860\text{ cm}^{-1}$.

Le greffage des carbohydrates sur les amines terminales des NP a été aussi suivi par FTIR. En premier lieu la réduction du groupement nitro du p- $\text{NH}_2\text{-}\alpha\text{-D-man}$ en isothiocyanate pour le p-ITC- $\alpha\text{-D-man}$ est observée. Dans la Figure 3.12, la présence dans le spectre FTIR de la bande d'élongation isothiocyanate $\text{N}=\text{C}=\text{S}$ d'intensité moyenne à 2123 cm^{-1} , $\text{S}=\text{C}$ à 1502 cm^{-1} , des bandes larges C-O des éthers entre 1000-

1120 cm^{-1} et la bande large du OH des alcools à 3320 cm^{-1} , démontrent que le carbohydrate, p-ITC- α -D-man, est obtenu.

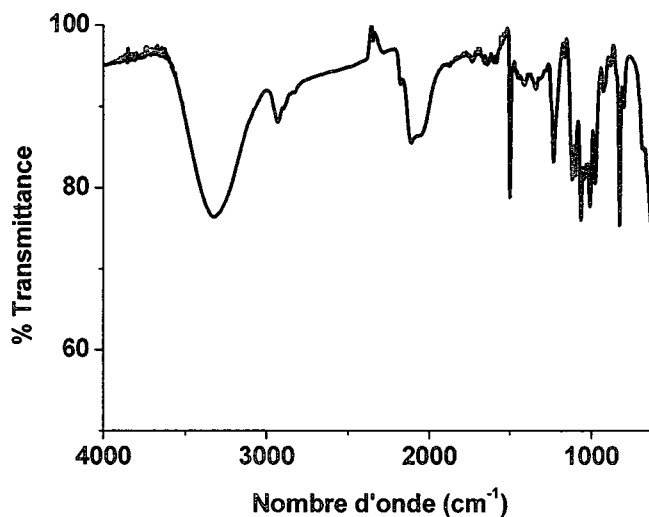


Figure 3.12: Spectre FTIR pour le p-ITC- α -D-man.

Le greffage des carbohydrates sur les NP implique une modification des amines terminales en thio-urée. Dans la Figure 3.13, la disparition de la bande du groupe isothiocyanate à 2123 cm^{-1} , l'apparition de la bande thio-urée S=C-N à 1509 cm^{-1} , la présence des bandes C-O des esters à 1000-1120 cm^{-1} et OH des alcools à 3320 cm^{-1} , démontrent que des nanoparticules d'or modifiées avec des carbohydrates ont été obtenues. Le spectre vibrationnel des GNP type mannose présenté dans la Figure 3.13 montre la présence des bandes amides I (N-H) à 1627 cm^{-1} et II (C=O) à 1535 cm^{-1} reliées au PAMAM adsorbés sur les nanoparticules d'or.

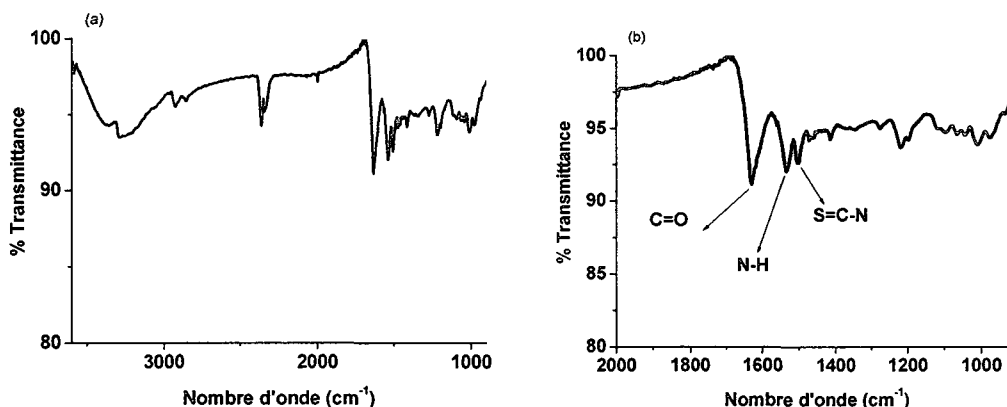


Figure 3.13: Spectre FTIR pour Au-G0-man: (a) dans le domaine 600-3600cm⁻¹; (b) dans le domaine 900-2000 cm⁻¹.

3.2.4. Détermination de la fraction organique par TGA et DTA.

Pour obtenir des informations simultanément sur la perte de masse organique ainsi que sur les transformations telles que la déshydratation ou la dégradation de la masse organique adsorbée à la surface d'or, des analyses TGA et DTA ont été effectuées. La méthode TGA a permis d'estimer le % (m/m) d'or et de fraction organique des nanoparticules d'or avant (NP) et après le greffage de mannose (GNP). Une comparaison a été faite avec des nanoparticules d'or stabilisées avec le 1-dodécane-thiol et les résultats ont été comparés à la littérature.

La fraction organique (% Fract. org.) obtenue par TGA permet de calculer le rapport massique PAMAM : Au pour les NP (générations amine et ester) ou thiol : Au pour Au-thiol. Également, à partir des résultats TGA, le nombre des branches PAMAM modifiées

avec le mannose ou thiol, adsorbées à la surface d'or, le nombre des atomes d'or et la masse moléculaire des glyconanoparticules (GNP) et Au-thiol ont été estimés.

Dans le Tableau 3.1, les résultats TGA pour les NP montrent que le pourcentage de masse organique augmente après le greffage des PAMAM et le rapport massique PAMAM : Au de 1 : 1.3 demeure approximativement constant à partir de la génération Au-G0.5.

Tableau 3.1: Détermination du rapport massique entre la fraction organique et la fraction de l'or pour les nanoparticules d'or de générations PAMAM et Au-thiol par TGA.

NP	Fract. org. : Au
Au-G-0.5	1:5.2
Au-G0	1:2.4
Au-G0.5	1:1.3
Au-G1	1:1.3
Au-G1.5	1:1.3
Au-G2	1:1.2
Au-thiol	1 :2.4

Dans le cas de nanoparticules d'or stabilisées avec le 1-dodécane-thiol, l'analyse TGA indique que celles-ci subissent une perte de masse organique de 32 % entre 110-350°C tel qu'indiqué sur la Figure 3.15. Cette diminution correspond à la perte de molécules de

dodécane-thiol [180]. Le pourcentage de masse organique de 32 % permet de calculer le rapport massique thiol : Au qui est 1 : 2.4. Comparant la fraction organique à ce qui a déjà été publié pour Au-thiol, [178] le diamètre de nanoparticules d'or est évalué à environ 1 à 1.5 nm.

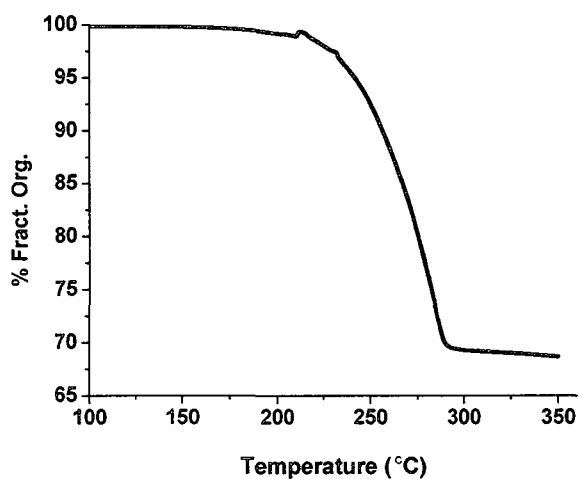


Figure 3.14: Analyse TGA pour Au-thiol.

La perte de masse organique ainsi que les transformations de la fraction organique des glyconanoparticules ont été évaluées par TGA et DTA. La Figure 3.15 présente la perte de masse organique obtenue par TGA pour les GNP modifiées avec le carbohydrate de type mannose (Au-G0-man, Au-G1-man et Au-G2-man). Dans cette figure, les mêmes changements ont été obtenus que pour les NP stabilisées avec PAMAM. La perte d'eau a lieu dans le domaine de température 30-110 °C. La perte de masse organique commence vers ~200 °C et cette température est associée au bris de la liaison Au-S et à la désorption de PAMAM de la surface d'or. Vers 500 °C la présence d'une pic exothermique indique qu'une autre transformation est visible, dû à la dégradation de PAMAM. Dans le cas du

thiolate de glutathionne adsorbé sur l'or, la littérature [181] montre un pic exothermique à 500°C obtenu par DTA qui correspond à l'oxydation de la fraction organique.

Dans le cas des GNP, les courbes obtenues par DTA indiquent qu'après 600 °C il y a des transformations majeures dues à la dégradation de la masse organique (carbohydrates et PAMAM adsorbés à la surface d'or). Donc, la désorption des dendrimères et carbohydrates de la surface d'or se poursuit jusqu'à une température d'environ 600 °C. Lorsque la température est supérieure à 600 °C il y a décomposition de la fraction organique. À partir de 700 °C, la masse demeure approximativement constante. C'est donc le domaine de température entre 110 à 600 °C que la masse organique a été tenu en compte pour évaluer la taille et la masse moléculaire ainsi que le nombre de branches PAMAM adsorbés sur les nanoparticules.

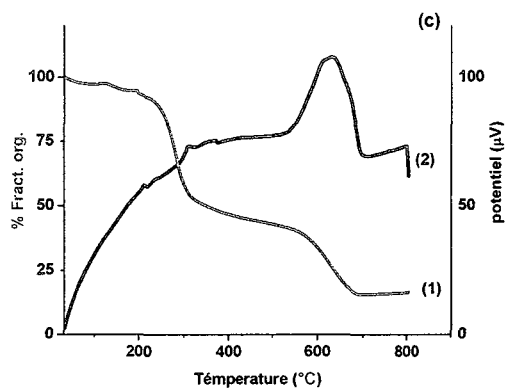
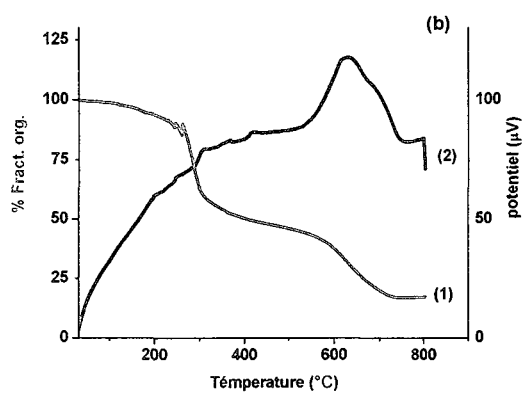
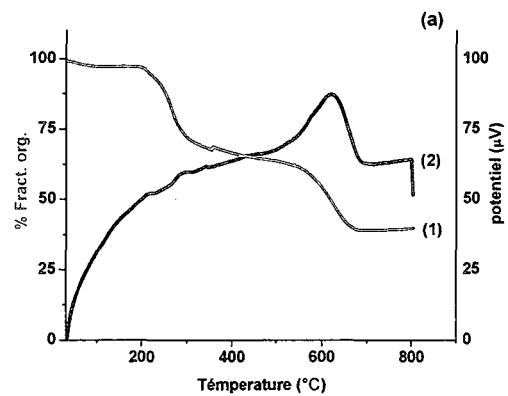


Figure 3.15: Analyse (1) TGA et (2) DTA pour les GNP de type mannose: (a) Au-G0-man; (b) Au-G1-man; (c) Au-G2-man.

Si l'on compare les résultats TGA pour les nanoparticules d'or avant et après le greffage de mannose, il est possible d'observer dans la Figure 3.16 que le pourcentage de masse organique augmente et demeure approximativement constant à partir de la génération G0.5 de NP et G1 de GNP.

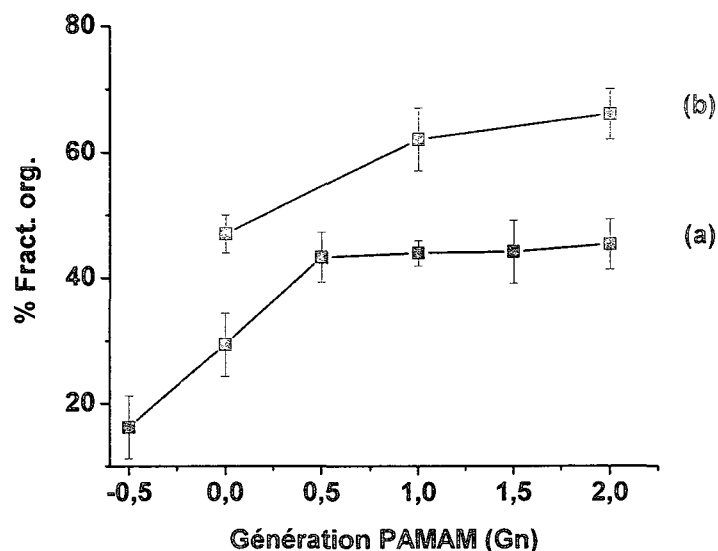


Figure 3.16: Perte de masse organique évaluée par TGA de NP de génération PAMAM Gn ou n=-0.5, 0, 0.5, 1, 1.5 et 2 (a) avant et (b) après le greffage du carbohydrate de type mannose.

À partir des résultats par TGA effectués sur Au-thiol par le groupe de Murray [117] soit la variation de la fraction de thiol en fonction du diamètre et du nombre d'atomes d'or et en utilisant les résultats par TGA pour la fraction organique de GNP de type mannose (Au-G0-man, Au-G1-man et Au-G2-man) de 47 %, 62 % et 68 %, le diamètre des GNP (d), le nombre de branches PAMAM modifiées avec mannose (# Gn-man, Gn=G0, G1, G2) adsorbées à la surface d'or, le nombre d'atomes d'or (# Au) ainsi que la masse

moléculaire de GNP (MW) ont été évalués. Un exemple de calcul est présenté dans cette section pour Au-G0-man. Les mêmes calculs ont été effectués pour Au-G1-man et Au-G2-man et les résultats sont présentés ci-dessous.

Après le lissage de la courbe de la Figure 3.17 soit le pourcentage organique TGA en fonction du diamètre (d) en nm de nanoparticules d'or en se servant de l'approche décrite dans la référence [117], l'équation 3.1 est obtenue:

$$\%TGA \text{ org.} = 43.873 d^{-0.9148} \quad (3.1)$$

À partir de l'équation 3.1 et des fractions organiques des GNP (Au-G0-man, Au-G1-man et Au-G2-man) obtenues dans cette étude par TGA, les diamètres calculés sont de 0.92 nm, 0.68 nm et 0.63 nm.

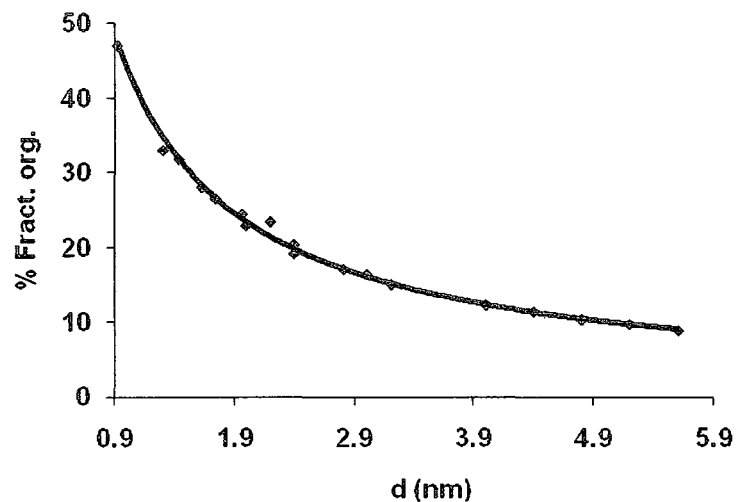


Figure 3.17: Variation de % TGA organique en fonction du diamètre de nanoparticules d'or, d (nm) [117].

À partir de la variation des atomes d'or en fonction du diamètre d (nm), [117] représenté dans la Figure 3.18, et en utilisant l'équation 3.2 obtenue après le lissage de cette courbe, le nombre des atomes d'or calculé correspond à 28, 11 et 9 pour un diamètre de 0.92, 0.68 et 0.63 nm de GNP (Au-G0-man, Au-G1-man et Au-G2-man).

$$\# \text{ atomes Au} = 35.918 d^{2.9976} \quad (3.2)$$

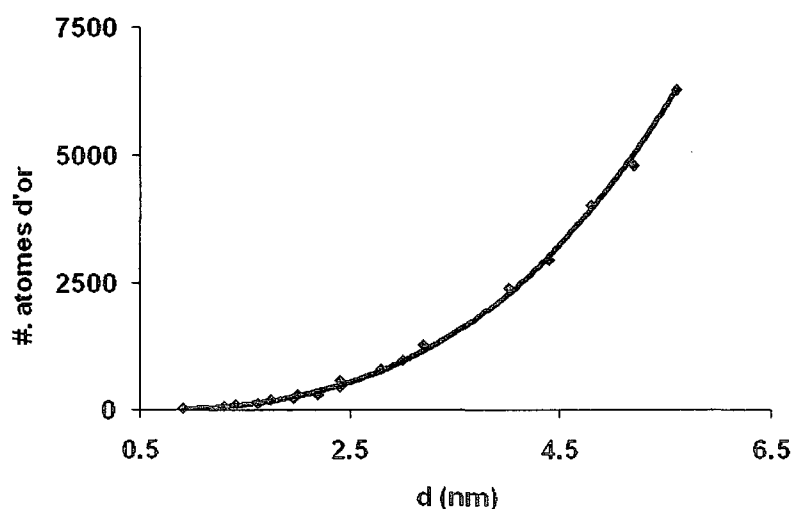


Figure 3.18: Variation du nombre des atomes d'or de nanoparticules d'or en fonction du diamètre, d (nm) [117].

En utilisant la taille de particules et le nombre des atomes d'or, les masses moléculaires calculées sont de 15, 9.5 et 8.6 kDa et le nombre des branches PAMAM modifiées avec mannose adsorbées à la surface d'or est de 5, 2 et 1 pour Au-G0-man, Au-G1-man et Au-G2-man.

En réalité, les GNP présentent une distribution de taille de particules et donc, une distribution de masse moléculaire. Pour une taille moyenne des nanoparticules (Au-G0-man, Au-G1-man et Au-G2-man) d'environ 1nm la masse moléculaire moyenne calculée est de 15 kDa.

Les mêmes calculs ont été effectués pour les nanoparticules d'or recouvertes de dodécane-thiol (Au-thiol). Pour une fraction organique de 32 % obtenues par TGA, un diamètre de 1.4 nm, 98 atomes d'or, 45 branches thiol adsorbées à la surface d'or et une masse moléculaire moyenne de 38 kDa sont obtenus.

Dans la littérature [182], pour l'hexane-thiol adsorbé sur une particule d'or ayant un diamètre de 1.1 nm, la masse molaire est de 14 kDa avec 75 atomes d'or. Pour les nanoparticules d'or sur lesquelles est adsorbé un composé disulfure (R-S-S-R) un diamètre de 1.4 nm avec 55 atomes d'or [183] est calculé. Pour un diamètre de 2 nm il est estimé qu'il y a 251 atomes d'or en surface avec 54 branches (-S-R) adsorbées à la surface l'or. Chaque branche (-S-R) occupant une aire de 0.233 nm^2 [184].

L'aire occupée par une branche de PAMAM sur une nanoparticule d'or a été estimée. Une comparaison a été effectuée avec les nanoparticules Au-thiol afin d'obtenir des informations sur la densité des branches adsorbées à la surface d'or. Il faut préciser que l'aire de surface des atomes d'or n'est pas calculée pour le cas d'une sphère car les atomes d'or présentent une structure différente telle qu'un cubooctaèdre ou icosaèdre comme le montre la Figure 3.19 [185].

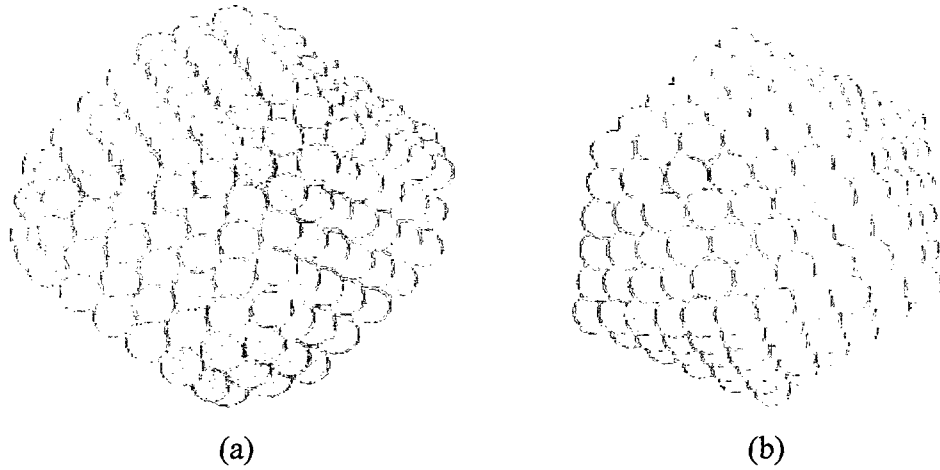


Figure 3.19: Structures d'agrégats d'or: (a) cubooctaèdre avec 459 atomes d'or et (b) icosaèdre avec 561 atomes d'or [185].

Dans le cas des nanoparticules de diamètre d'environ 1 nm avec 28 atomes d'or, la surface des atomes d'or présente une structure de cubooctaèdre comme le montre la Figure 3.20 a. Dans la littérature [186], pour un diamètre de 1.4 nm, une structure de cubooctaèdre avec 55 atomes d'or est présentée dans la Figure 3.20 b.

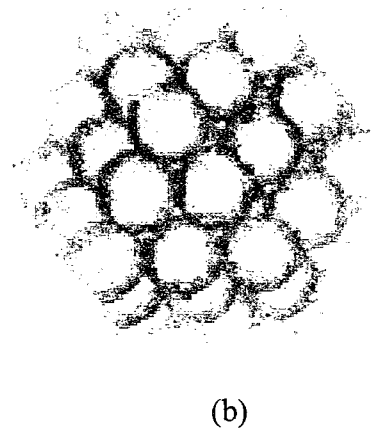


Figure 3.20: Structure d'un cubooctaèdre avec (a) 28 et (b) 55 atomes d'or [186].

Afin d'évaluer l'aire occupée par une branche PAMAM modifiée avec mannose adsorbé à la surface d'or et de la comparer à l'aire du thiol adsorbé, des mesures électrochimiques ont été effectuées [187]. Selon ces mesures le taux de recouvrement de G0-man à la surface d'électrode d'or (111) est de 3×10^{-10} moles/cm² et du 1-dodécane-thiol de 7.4×10^{-10} moles/cm². À partir de ces résultats, les aires occupées par le G0-man et par le 1-dodécane-thiol sont de 0.555 nm², respectivement 0.224 nm² soit l'aire du cône représenté dans la Figure 3.21. Selon des études précédentes [183], chaque thiol adsorbé à la surface de nanoparticules d'or occupe une surface de 0.214 nm². Le rapport de l'aire de molécule G0-man par molécule de dodécane-thiol est de 2.5 (0.555/0.224) tandis que le rapport observé entre le nombre de dodécane-thiol par le nombre de branches G0-man est de 9 (45/5).

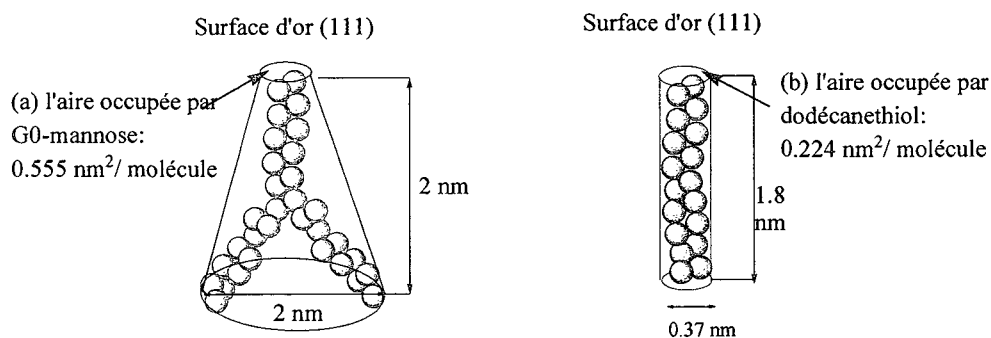


Figure 3.21: (a) L'aire de surface occupée par une branche G0-mannose et (b) par le dodécane-thiol obtenue expérimentalement par électrochimie à la surface d'or (111) [187].

Si l'on compare l'aire totale de la surface occupée par les atomes d'or recouverte de thiol de 10.08 nm² (45 branches thiol x 0.224 nm²), cette valeur est supérieure à 2.8 nm² (5

branches x 0.555 nm²) pour les NP recouvertes de G0-mannose. Ce résultat montre que les alkylthiols sont plus denses à la surface d'or.

Les calculs du nombre de branches des dendrimères PAMAM modifiés avec le mannose de génération G0 adsorbées par atome d'or (# G0-man) (équation 3.3), l'aire occupée par une branche de G0-man (A_{G0-man}) (équation 3.4), l'aire de surface de l'or pour une structure de cubooctahèdre (A_{Au}) (équation 3.5) ainsi que la masse moléculaire de GNP de génération G0 de type mannose ($MW_{Au-G0-man}$) (équation 3.6) sont détaillés ci-dessous.

$$\# \text{ G0-man} = \# \text{ atomes Au} \times MW_{Au} \times (\% \text{ Fr. org}) / (\% \text{ Fr. Au}) \times MW_{org} \quad (3.3)$$

où:

% Fr._{Au} et % Fr._{org} sont les fractions d'or et organique obtenues par TGA pour Au-G0-man; MW_{Au} est la masse moléculaire de l'or; MW_{org} est la masse moléculaire pour la fraction organique (G0-man).

Un taux de recouvrement de G0-mannose, Γ_{G0-man} , à la surface de Au (111) de 3×10^{-10} moles/cm² a été déterminé par des mesures électrochimiques.

L'aire occupée par une molécule de PAMAM de génération G0 modifiée avec mannose (A_{G0-man}) est calculée à partir de l'équation (3.4).

$$A_{G0-man} = 1 \text{ molécule (G0-man)} \times 1 \text{ nm}^2 / \Gamma_{G0-man} \times 10^{-14} \text{ moles} \times N_A \quad (3.4)$$

où $N_A = 6.023 \times 10^{23}$ molécules/moles est le nombre d'Avogadro.

L'aire de surface de l'or pour une structure de cubooctahèdre (A_{Au}) est calculée à partir de l'équation (3.5):

$$A_{Au} = \# \text{G0-man} \times A_{\text{G0-man}} \quad (3.5)$$

La masse moléculaire de Au-G0-man ($MW_{Au-G0-man}$) est calculée à partir de l'équation (3.6):

$$MW_{Au-G0-man} = MW_{Fr.Au} + MW_{Fr.org} \quad (3.6)$$

où la fraction de la masse moléculaire associée à l'or ($MW_{Fr.Au}$) est calculée à partir de l'équation (3.7):

$$MW_{Fr.Au} = \#Au \times MW_{Au} \times 100 / (\% Fr.Au) \quad (3.7)$$

La fraction de la masse moléculaire associée à G0-man ($MW_{Fr.org}$) est calculée à partir de l'équation (3.8):

$$MW_{Fr.org} = \# \text{G0-man} \times MW_{org} \quad (3.8)$$

3.2.5. Calcul du taux de greffage de carbohydrates par titrage avec le TNBS

La méthode de titrage spectroscopique des amines primaires avec l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) décrite dans le Chapitre 2 permet de calculer le rendement de la réaction de greffage des carbohydrates. Ceci est réalisé en déterminant le nombre de moles des amines primaires ($\mu\text{mol NH}_2 / \text{mg}$) pour les nanoparticules d'or de générations PAMAM avant et après le greffage de mannose à partir d'une courbe de calibration à 340 nm utilisant la cystamine, tel que présenté dans la Figure 3.22.

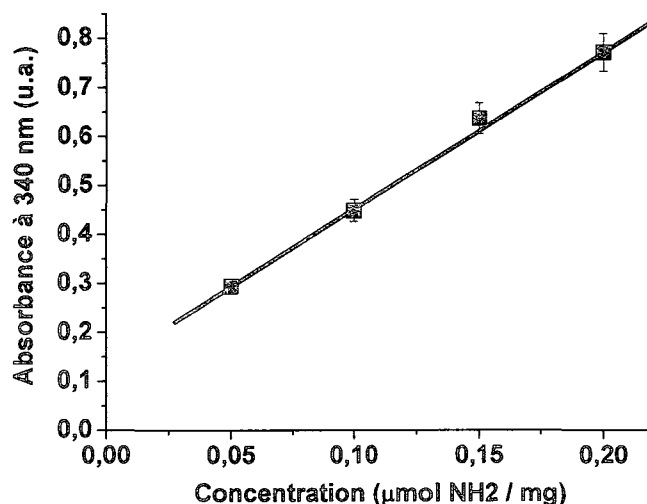


Figure 3.22: Courbe de calibration pour la cystamine pour déterminer le nombre de moles des amines primaires ($\mu\text{mol NH}_2 / \text{mg}$).

Les résultats présentés dans le Tableau 3.2 montrent les rendements élevés du greffage de mannose sur les nanoparticules d'or stabilisées avec le PAMAM, évalués par le titrage avec le TNBS.

Tableau 3.2: Détermination du nombre de moles de NH_2/mg pour les NP et GNP de générations G0, G1 et G2 par le titrage TNBS et des rendements (η) de greffage de carbohydrates de type mannose.

	$\mu\text{mol NH}_2/\text{mg}$ TNBS	η (%)
Au-G0	2.30 ± 0.6	
Au-G0-man	0.3 ± 0.1	87 ± 1
Au-G1	3.0 ± 0.6	
Au-G1-man	0.1 ± 0.1	98 ± 2
Au-G2	2.0 ± 0.1	
Au-G2-man	0.1 ± 0.1	97 ± 2

3.2.6. Évaluation du nombre de moles de fluorophores greffés sur les NP

Les résultats présentés dans le Tableau 3.3 obtenus à partir des mesures UV-VIS montrent que la surface des GNP de type mannose est recouverte de 8.2 ± 0.1 moles FITC/mole Au ce qui représente 36% FITC à la surface d'or comparé à 64 % carbohydrates évalués par titrage TNBS. Ce résultat démontre que la surface active de mannose est diminuée après le greffage de FITC. Dans le cas de RITC la surface des GNP de type galactose est recouverte de 0.9 ± 0.2 moles RITC/mole Au ce qui représente 4% RITC à la surface d'or compare à 96 % carbohydrates évalués par titrage TNBS. Ce résultat montre que le greffage de RITC diminue faiblement la surface active des

carbohydrates. Le RITC est difficilement greffé à la surface d'or, et ceci est peut être reliée à sa solubilité réduite dans l'eau. Le greffage des fluorophores n'est donc pas facile à contrôler.

Tableau 3.3: Évaluation du nombre de moles de fluorophores des GNP (Au-man-FITC et Au-gal-RITC) par UV-VIS.

	moles fluorophore/ moles Au	% fluorophore	% carbohydrate
Au-man-FITC	8.2 ± 0.1	36 ± 1	64 ± 1
Au-gal-RITC	0.9 ± 0.2	4 ± 2	96 ± 2

3.2.7. Détermination du rapport N : S par XPS

La spectroscopie XPS est utilisée pour déterminer la stœchiométrie N:S des nanoparticules. L'analyse XPS de la surface des nanoparticules après le greffage du carbohydrate de type mannose (p-ITC- α -D-man) sur les générations (G0, G1 et G2) de nanoparticules d'or, donne deux pics pour: Au 4f_{7/2} et 4f_{5/2} à environ 83.2 et 86.87 eV comme le montrent les Figures 3.24 a, 3.25 a et 3.26 a. La différence entre les deux pics de 3.67 eV et l'absence du pic à 84.9 eV pour Au (III) démontre que l'or des nanoparticules stabilisées est dans l'état de valence zéro [180, 188]. Les Figures 3.23 b, 3.24 b et 3.25 b montrent que le soufre présente un doublet qui correspond aux niveaux

2p_{3/2} et 2p_{1/2} à environ 161.7 et 162.9 eV et les Figures 3.23 c, 3.24 c et 3.25 c montrent que l'atome d'azote a un seul pic correspondant au niveau 1s à environ 398.9 eV. Pour calculer le rapport S : N, le pourcentage atomique pour S 2p_{3/2} et N 1s est utilisé. Le rapport atomique N : S correspond à celui prédit comme le montre le Tableau 3.4. Ces résultats démontrent que les dendrimères et les carbohydrates sont bien adsorbés sur les nanoparticules et les branches des PAMAM ont peu de défauts.

Tableau 3.4: Résultats XPS pour les GNP de type mannose.

	Position Au 4f_{5/2} (eV)	Position S 2p_{3/2} (eV)	Position N 1s (eV)	Rapport N:S mesuré XPS	Rapport N:S prédit
Au-G0-man	87.1	161.6	399.2	(2.0 ± 0.1) : 1	2.3 : 1
Au-G1-man	86.5	160.9	398.8	(3.2 ± 0.2) : 1	3.4 : 1
Au-G2-man	86.4	160.7	398.8	(3.8 ± 0.2) : 1	4.1 : 1

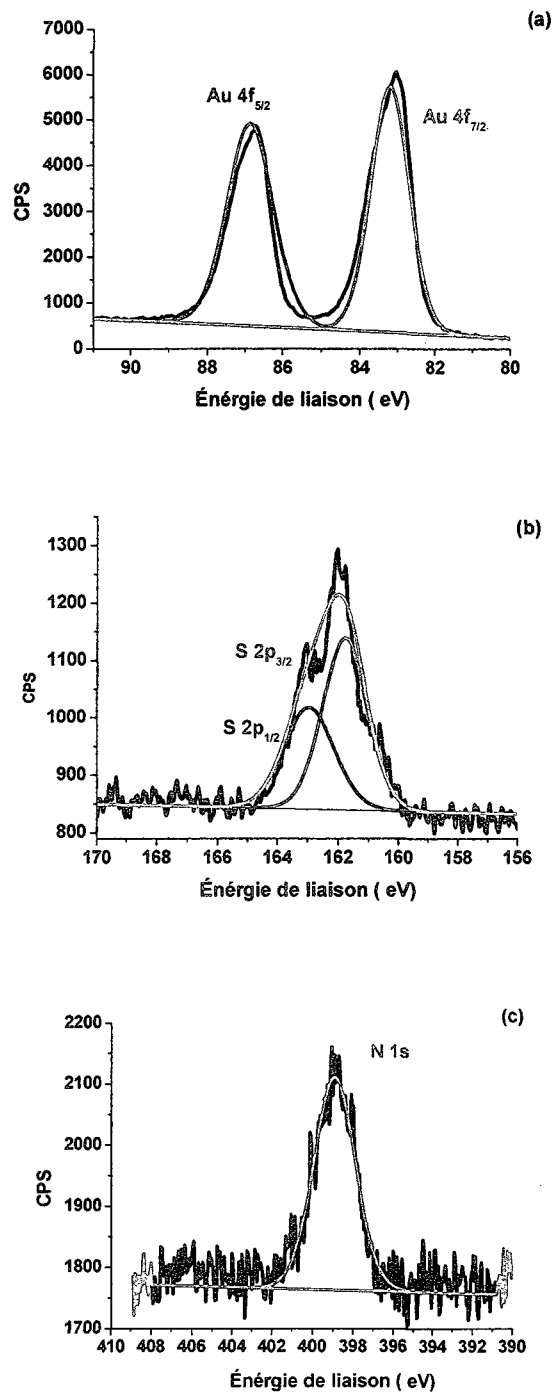


Figure 3.23: Spectres XPS pour (a) Au; (b) S; (c) N de Au-G0-man.

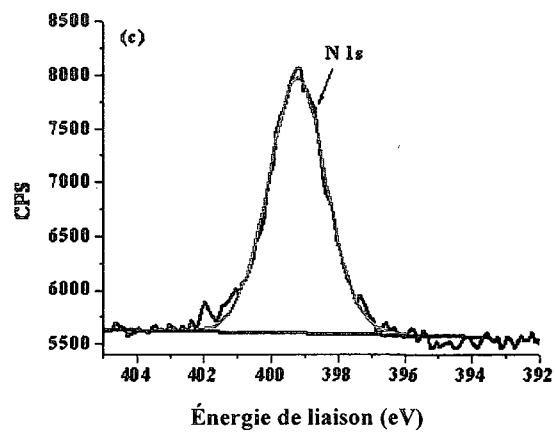
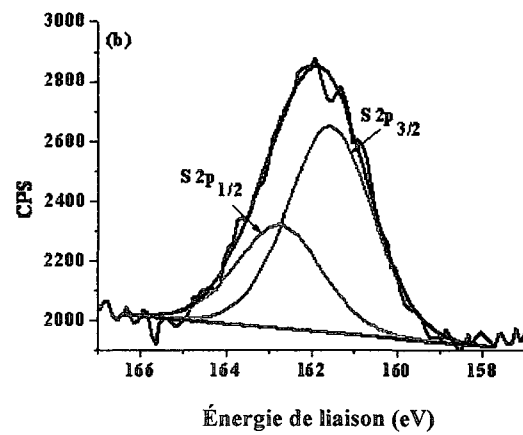
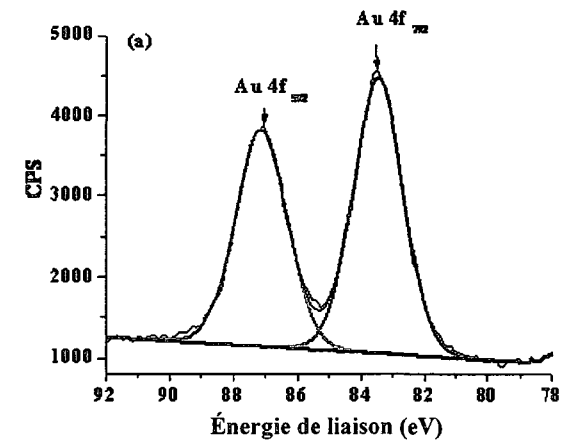


Figure 3.24: Spectres XPS pour (a) Au; (b) S; (c) N de Au-G1-man.

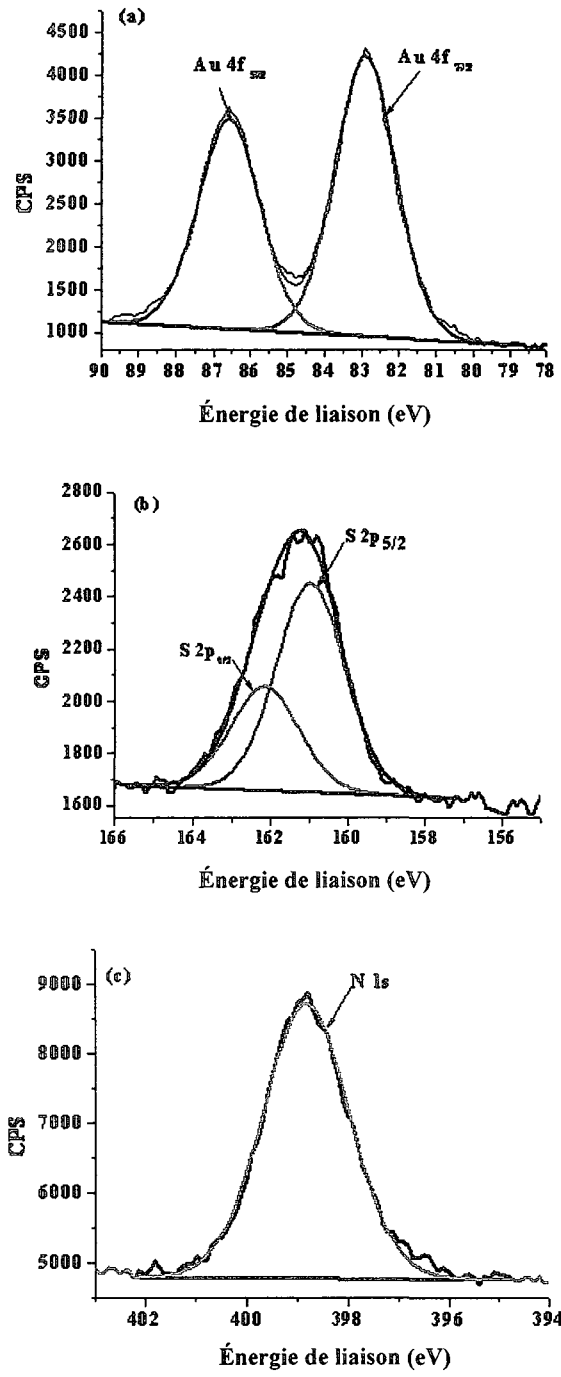


Figure 3.25: Spectres XPS pour (a) Au; (b) S; (c) N de Au-G2-man.

3.3. Caractérisation de nanoparticules de silice

La silice est utilisée comme substrat pour l'immobilisation de protéines, d'enzymes, d'ADN ou comme matériel chromatographique [119-121, 123, 189-191]. Des substrats de silice recouverts par des nanoparticules d'or stabilisées avec thiol ont été utilisés pour la détection de protéines [192]. Les particules de silice occupent un rôle important en chromatographie et en catalyse mais de plus en plus dans le domaine biomédical. Plusieurs techniques ont été mises au point pour préparer des nanoparticules de silice de taille de 1 à 20 nm [193]. La fonctionnalisation chimique des nanoparticules de silice avec plusieurs types de groupements démontre leur potentiel comme biocapteurs [123, 130, 191].

Le greffage chimique de différents silanes à la surface de silice a été utilisé pour obtenir des matériaux pour la détection et la purification de composés biologiques [189, 190, 194]. Après l'activation de la surface de silice avec des groupements hydroxyles suivie d'un greffage des groupements silanol [135, 136, 138, 195, 196], plusieurs groupes peuvent être greffés à la surface [130]. Pour augmenter les propriétés hydrophiles de la silice, des groupements amines ont été adsorbés à la surface. Toutefois, ces dernières peuvent interagir de manière électrostatique avec les groupements carboxyles des protéines et dans ce cas la détection n'est pas sélective.

Comme la silice est compatible avec plusieurs matériaux biologiques, n'est pas toxique et est moins dispendieuse que l'or, elle est utilisée, dans cette étude, pour obtenir un

biocapteur des lectines. Des carbohydrates de type mannose seront chimisorbés sur des particules de silice stabilisées avec le silane (NPSi-NH₂). Le design du biocapteur obtenu (NPSi-man) présente une architecture multivalente avec un cœur de silice.

Cette approche permet d'étudier l'interaction entre les NPSi-man et les lectines sans compromettre leurs sites actifs. Le marquage des lectines pourrait aussi se faire à l'aide d'une sonde fluorescente (fluorescéine) greffée sur les NPSi-NH₂ en même temps que les carbohydrates. Le greffage de fluorophore (FITC) à la surface de silice a pu être réalisé mais il ne sera pas présenté dans cette étude.

Dans cette section le greffage de silanes et de carbohydrates de type mannose sur les nanoparticules de silice est décrit. La spectroscopie FTIR a été utilisée pour analyser les groupements fonctionnels sur la silice et le titrage des amines avec le TNBS pour évaluer le rendement de greffage des carbohydrates. La fraction organique a été évaluée par TGA. La taille et la morphologie des particules après le greffage des carbohydrates, ont été déterminées par la microscopie MEB. Les conditions expérimentales de caractérisation de NPSi sont les mêmes que celles utilisées pour les GNP. Le potentiel de NPSi-man pour la détection des lectines est discuté dans le dernier chapitre.

3.3.1. Étude du greffage du silane et de carbohydrates par FTIR

Les spectres FTIR de la silice avant et après le greffage du silane et après le greffage de carbohydrate de type mannose ont été mesurés.

La Figure 3.26 montre le spectre FTIR des nanoparticules de silice avec des groupements silanol en surface (NPSi-OH) avec des bandes spécifiques de SiO-H à 3739 cm^{-1} et des bandes SiO et Si-O-Si entre 1110 et 830 cm^{-1} [197-199].

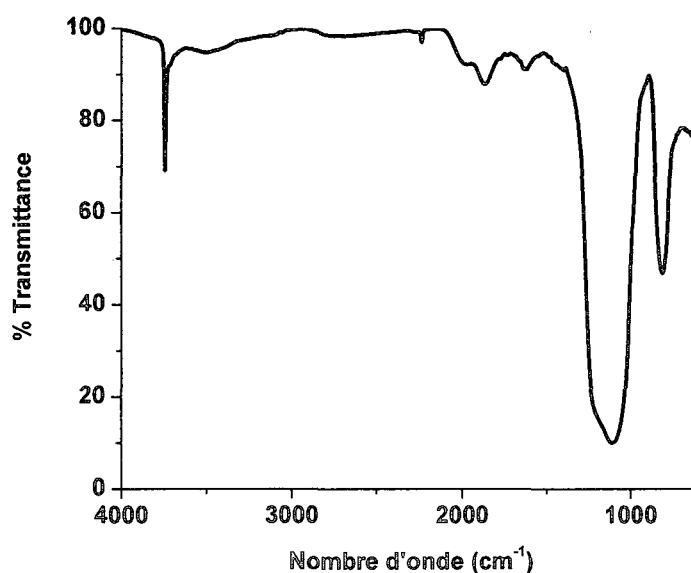


Figure 3.26: Spectre FTIR de NPSi-OH.

Après le greffage du silane, le 3-aminopropyle-triméthoxysilane, les Figures 3.27 et 3.28 montrent la disparition de la bande SiO-H à 3739 cm^{-1} et l'apparition des bandes reliées au silane soit les élongations asymétrique et symétrique du N-H à 3376 et 3280 cm^{-1} , les élongations asymétrique et symétrique du CH_2 à 2933 et 2840 cm^{-1} , la déformation angulaire du N-H des amines à 1580 cm^{-1} et la déformation angulaire du C-H (cisaillement du CH_2) à 1482 cm^{-1} [197, 198]. Les bandes Si-O et Si-O-Si sont à 1098 cm^{-1} et 813 cm^{-1} .

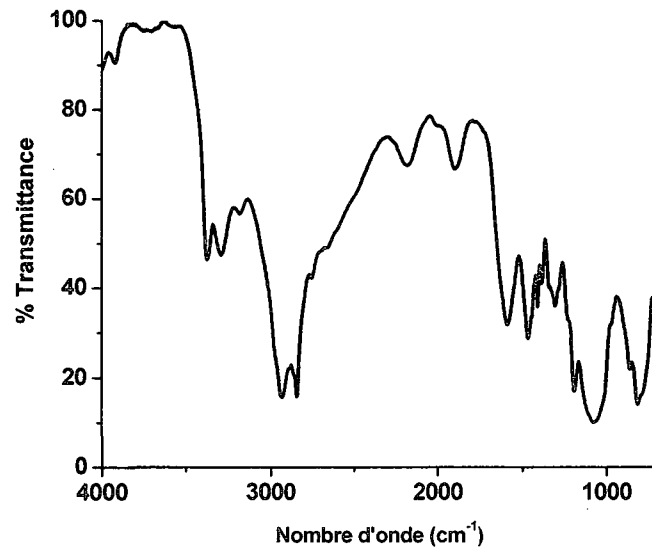


Figure 3.27: Spectre FTIR du silane.

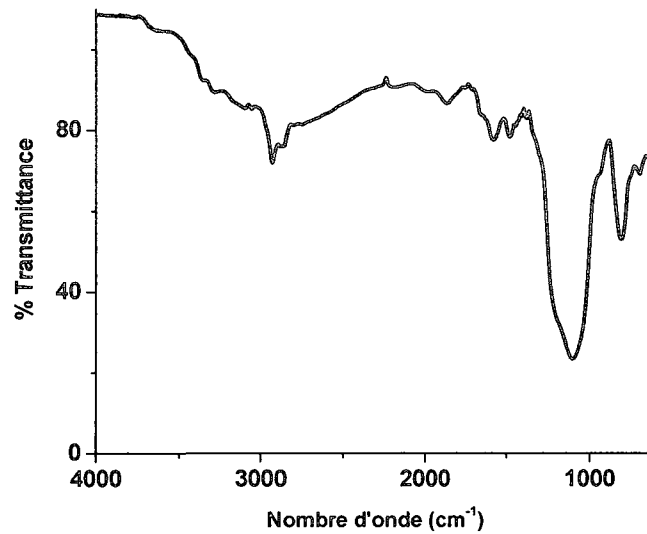


Figure 3.28: Spectre FTIR de NPSi après le greffage de silane.

Après le greffage du carbohydrate de type mannose (p-ITC- α -D-man) sur les amines de nanoparticules de silice, la Figure 3.29 montre la disparition de la bande N=C=S à 2123 cm^{-1} et la présence de la bande S=C-N à 1502 cm^{-1} qui démontre que le carbohydrate est greffé par un couplage thio-urée. La bande à 3300 cm^{-1} est reliée aux groupements OH du mannose.

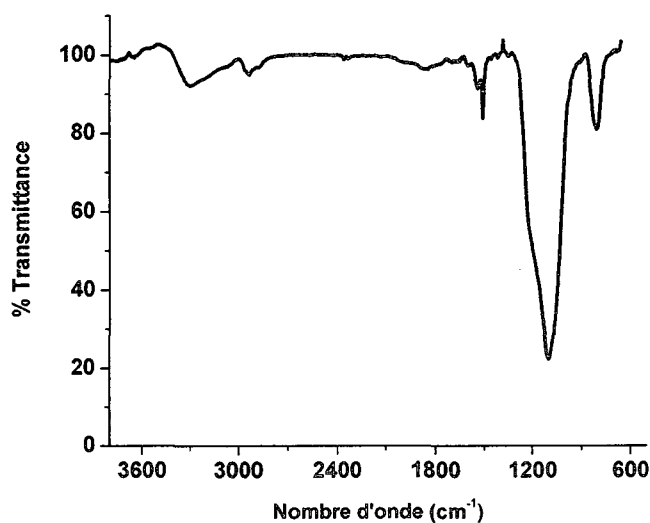


Figure 3.29: Spectre FTIR de NPSi après le greffage de p-ITC- α -D-man.

L'analyse FTIR démontre que les NPSi sont bien recouvertes de mannose. Le titrage spectrophotométrique des amines par TNBS a été utilisé afin de quantifier le rendement de greffage de mannose. Les résultats sont présentés ci-dessous.

3.3.2. Calcul du taux de greffage des carbohydrates sur la silice par titrage avec le TNBS.

Une courbe de calibration de la cystamine à 340 nm a été effectuée. Les détails de ces mesures sont décrits dans le Chapitre 2. Le rendement du greffage des carbohydrates a été calculé en évaluant le nombre d'amines par mg d'échantillon pour les nanoparticules de silice avant et après le greffage de carbohydrate de type mannose par la méthode de titrage des amines par le TNBS. Les résultats obtenus sont de (3.4 ± 0.1) $\mu\text{mol NH}_2/\text{mg}$ de NPSi-NH₂ et (0.24 ± 0.1) $\mu\text{mol NH}_2/\text{mg}$ de NPSi-man. Le rendement du greffage de mannose sur silice est donc de $93 \pm 1\%$.

3.3.3. Détermination de la fraction organique à la surface de silice par TGA.

L'effet du traitement thermique de silice pour l'activation avec des groupements silanol sur les propriétés de surface de la silice a été étudié par TGA [136]. Ces études ont montré que dans le cas des surfaces irrégulières et hétérogènes de silice, des molécules d'eau sont fortement adsorbées à la surface de la silice. L'analyse thermogravimétrique de la silice a indiqué une perte continue de l'eau adsorbée à la surface et une condensation possible des silanols extérieurs aux températures de 450 °C. Comme le montre la Figure 3.30, après le traitement thermique, trois types de silanols sont accessibles à la surface de la silice pour la modification avec silane. Un premier type de silanol est libre, un vicinal et un dernier forme des ponts siloxane.

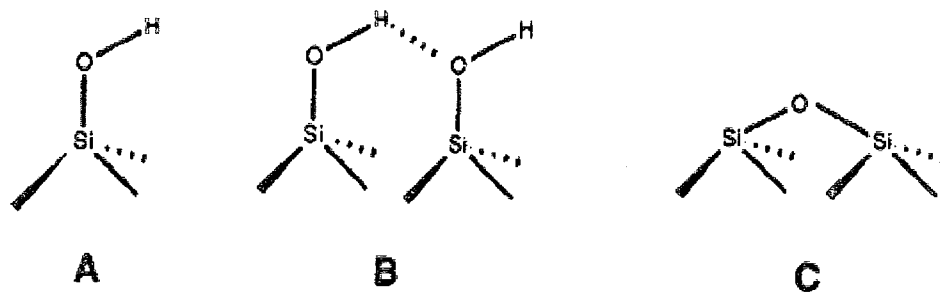


Figure 3.30: Types de silanol formés après le traitement thermique de silice: (A) libre (B) vicinal et (C) qui forment des ponts siloxane [136].

L'analyse TGA a été effectuée pour les particules de silice après le greffage de silane et le greffage de mannose. La Figure 3.31a montre une faible perte d'eau d'environ 1.2 % dans la région de 30 à 140°C. Donc le traitement thermique effectué (voir le Chapitre 2) pour activer la surface de silice avec silanol a éliminé l'eau des particules de silice. Ceci est relié à la diminution des volumes des pores de silice [136]. La masse organique désorbée de la surface de silice est d'environ 5% après le greffage du silane. Ce résultat démontre un faible pourcentage de silanol à surface de silice. Cependant, la Figure 3.31b montre une augmentation de la masse organique de 25 % après le greffage de mannose. Les deux thermogrammes montrent une perte de masse organique dans une seule étape. Le résultat TGA nous indique un plus faible pourcentage de masse organique adsorbée à la surface de silice comparée aux glyconanoparticules d'or.

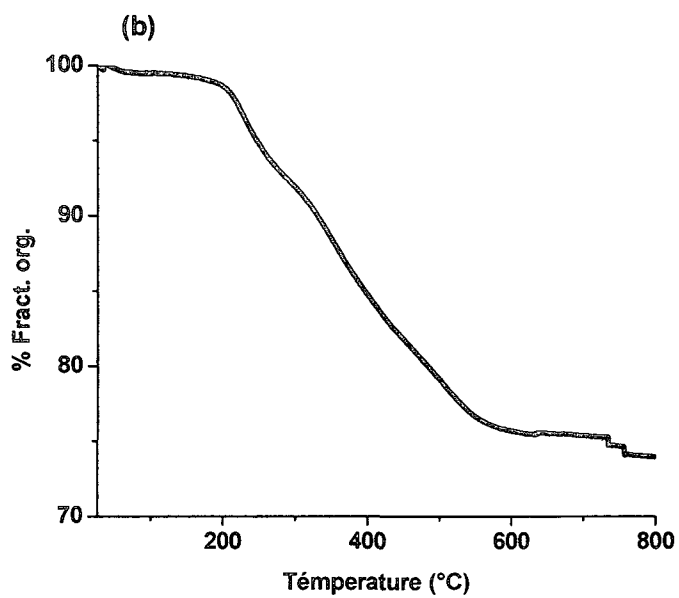
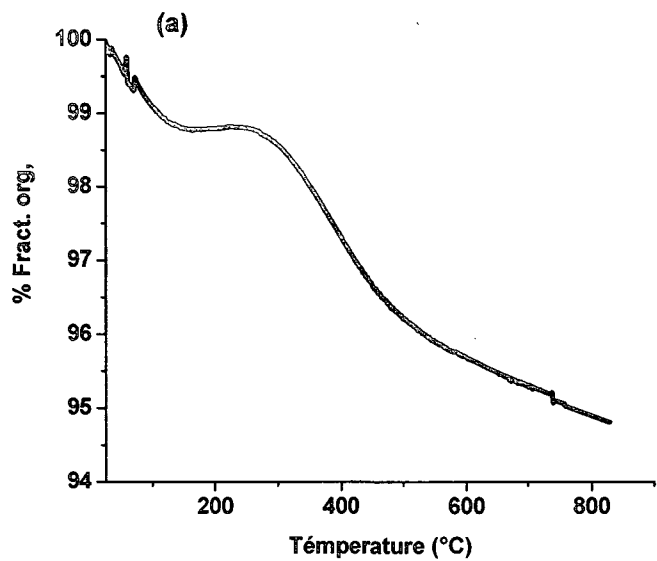


Figure 3.31: Thermogrammes de (a) NPSi-NH₂ et (b) NPSi-man.

3.3.4. Évaluation de la taille de particules de silice par MEB

La taille des particules de NPSi-man a été déterminée par des mesures MEB. Approximativement 1 mL de solution (1 mg/mL NPSi-man dans méthanol), est déposé sur une plaque recouverte d'un film d'or. Le méthanol est évaporé sous vide pendant 2 h.

La Figure 3.32, montre des particules de silice agglomérées, d'une taille d'environ 20-50 nm, tel que déterminé par la compagnie Sigma. Les particules sont agglomérées à cause d'interactions électrostatiques avec la surface de silice. Des particules agglomérées ont été aussi obtenues pour les nanoparticules de silice avant et après le greffage du silane.

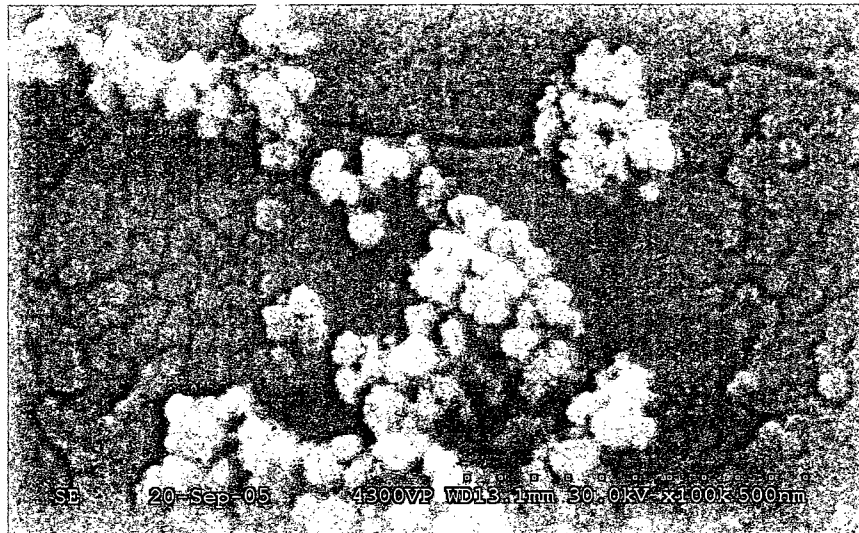


Figure 3.32: Analyse MEB de nanoparticules de NPSi-man.

3.4. Conclusion

Des GNP d'or solubles dans l'eau ont été obtenues. La génération G0 de GNP (Au-G0-man) est la plus stable dans une solution aqueuse. L'absence de plasmon de surface dans le spectre UV-VIS à 520 nm de NP et GNP est reliée à la petite taille des particules. Les méthodes TEM et DLS confirment que la taille moyenne des GNP est de moins 2 nm.

La présence des bandes caractéristiques des groupes fonctionnels de PAMAM et des carbohydrates dans le spectre FTIR des GNP démontre que les dendrimères et les carbohydrates ont été greffés à la surface d'or. La stœchiométrie N : S obtenue par XPS démontre qu'il y a peu de défauts sur les branches de PAMAM. Les rendements de greffage qui varient entre 87 et 98% démontrent que les carbohydrates sont bien greffés à la surface d'or. Dans le cas des GNP fluorescentes, le greffage des fluorophores est difficile à contrôler. Le FITC occupe 36% de la surface d'or comparé au RITC qui en occupe seulement 4 %.

La fraction organique évaluée par TGA montre une saturation de la surface d'or à partir de Au-G 0.5. Le pourcentage de fraction organique obtenu par TGA permet de calculer un diamètre moyen d'environ 1 nm pour les GNP avec 28 atomes d'or, une structure de cubooctaèdre et une masse moléculaire moyenne pour les GNP de 15 kDa.

Les analyses FTIR, TGA et le titrage TNBS montrent que le greffage des carbohydrates peut aussi se faire avec de bons rendements sur les particules de silice (92%).

Chapitre 4. GNP pour la reconnaissance des lectines

4.1. Introduction

Ce chapitre est consacré à la démonstration de l'efficacité des GNP pour la détection des lectines par fluorescence. Tout d'abord, la reconnaissance des lectines pour les GNP par la formation des complexes GNP-lectines a été mise en évidence par UV-VIS, DLS et TEM. Par la suite, une méthode de détection de lectines par fluorescence est développée. Différentes stratégies consistant en des GNP combinées à des lectines fluorescentes ou non fluorescentes sont examinées. Parmi ces stratégies, celle qui est la plus efficace et reproductible a été identifiée et a été utilisée pour étudier le mécanisme de reconnaissance de lectines par les GNP.

4.2. Étude de la formation du complexe lectine-GNP

L'affinité sélective des lectines pour les carbohydrates sous certaines conditions mène à la formation d'agrégats et à la précipitation surtout s'il y a des interactions des carbohydrates avec plus d'une lectine [92-102, 200, 201]. Dans le cas où le ligand se lie à plusieurs sites de la même lectine il n'y a pas la précipitation.

Comme il a été présenté dans l'introduction, la précipitation des lectines dépend de plusieurs facteurs [97]. Dans ce chapitre un ensemble de facteurs seront donc examinés.

Ceux-ci comprennent l'effet de la multivalence, de la structure du ligand, de la lectine ainsi que de la concentration du ligand et de la lectine, de même que le rapport molaire entre eux pour la précipitation des lectines.

Une série d'expériences simples a été effectuée pour démontrer la sélectivité et la réversibilité de l'interaction entre les GNP et une lectine. Pour cette étude, des GNP de type mannose (Au-Gn-man), N-acétylglucosamine (Au-Gn-NAcGlc) et galactose (Au-Gn-gal) ainsi que des GD de type mannose (Gn-man) et galactose (Gn-gal) de différentes générations (Gn=G0, G1, ou G2) ont été testées en présence des lectines. Les lectines végétales Con A et WGA ont été choisies pour cette recherche car il existe de nombreuses études qui nous permettent de comparer les GNP avec d'autres biocapteurs. La lectine PA IL qui provient de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* [144] a aussi été utilisée. Bien que plusieurs recherches aient démontré la spécificité de la lectine PA IL modifiée avec biotine pour les carbohydrates [202, 203], il reste encore à développer un biocapteur efficace pour la détection de cette lectine.

4.2.1. Sélectivité de Con A pour les GNP de type mannose

La sélectivité de GNP type mannose pour la lectine Con A est facilement mise en évidence par le test de précipitation de la lectine. Dans ce test, les GNP modifiées avec le mannose: Au-G0-man, Au-G1-man et Au-G2-man ont été dissoutes dans le PBS (1 mg/1mL). Ces solutions ont été mises en présence de la lectine Con A dissoute dans le PBS (1 mg/mL) dans un rapport de 1 : 1 et ont été mélangées pendant 1 min. La turbidité de la

solution change rapidement après l'ajout des lectines aux GNP et après 15 min, la lectine commence à précipiter (Figure 4.1).

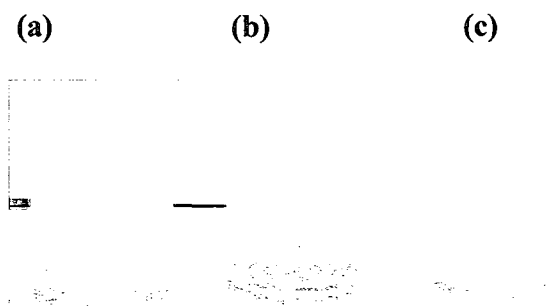


Figure 4.1: Précipitation de la lectine Con A par les GNP d'or de type mannose: (a) Au-G0-man; (b) Au-G1-man; (c) Au-G2-man après 15 min.

Le simple test visuel de la précipitation de la lectine Con A en présence de nanoparticules d'or modifiées avec le mannose démontre une reconnaissance rapide des sites actifs de la lectine par les mannoses des GNP. Ce test montre aussi que la précipitation se produit plus rapidement avec l'augmentation de la génération de GNP.

La réversibilité du complexe entre Con A et Au-G0-man a été démontrée par l'expérience suivante: le précipité a été mélangé avec un excès de α -D-man / α -D-gal (200 mg/mL dans PBS) pendant 1 min (Figure 4.2 d, e). Dans le cas de Au-G0-man, le précipité brun obtenu après 30 min a été dissout seulement après l'ajout de α -D-man et non pas de α -D-gal. Les mêmes résultats ont été obtenus pour les autres générations. La réversibilité observée montre qu'il n'y a pas d'agglomérats de GNP.

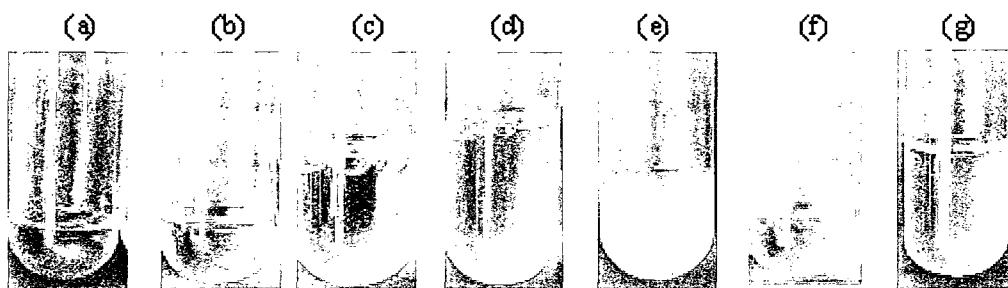


Figure 4.2: Sélectivité des lectines pour les GNP: (a) Au-G0-man, (1 mg/mL); (b) Con A (1 mg/mL); (c) solution (a) mélangée avec (b); (d) solution (c) mélangée avec 1 mL α -D-man (200 mg/mL); (e) solution (c) mélangée avec 1 mL α -D-gal (200 mg/mL) (f) WGA (1mg/mL); (g) solution (a) mélangée avec (f).

La sélectivité de Au-G0-man pour Con A est démontrée en mélangeant les GNP (1 mg/mL) avec une autre lectine (WGA) (1 mg/mL), sensible au NAcGlc (Figure 4.2 g). Aucune précipitation ne se produit, ce qui démontre la sélectivité des GNP de type mannose envers les récepteurs de Con A mais pas avec le WGA. La sélectivité de Au-G0-man pour Con A et non pas pour WGA a été confirmée par l'électrophore SDS-PAGE et est présentée dans le Chapitre 6.

4.2.2. Immunoprécipitation des lectines suivie par UV-VIS

Pour les GNP en présence de lectines, aucun plasmon de surface à 520 nm n'a été observé dans le spectre UV-VIS. Le seul changement correspond à l'augmentation de l'absorbance de GNP après l'ajout des lectines. Donc, n'importe quelle longueur d'onde

entre 250 et 600 nm peut être utilisée pour mesurer la variation de l'absorbance en fonction du temps pour la formation du complexe GNP-lectine.

Dans cette section, des mesures plus détaillées de la précipitation des lectines (Con A, PA IL et WGA) causée par les GNP ou les GD ont été effectuées en mesurant la variation de l'absorbance à 490 nm pour Con A [24] et WGA [23, 204] et à 280 nm pour PA IL [94]. Un rapport (v/v) de 2 : 1 entre les lectines (1 mg/mL dans PBS) et les GNP ou GD (1 mg/mL dans PBS) a été utilisé. Il faut préciser que les concentrations en GD (générations G0, G1 et G2) sont 12, 6 et 4 fois supérieures aux celles des GNP (générations G0, G1 et G2).

Dans le cas de Con A (sous forme de tétramère), la Figure 4.3A montre que l'absorbance augmente rapidement suite à l'addition de GNP de type mannose: Au-G0-man, Au-G1-man et Au-G2-man. Ce résultat montre la formation rapide d'agrégats. L'augmentation de l'absorbance se poursuit lentement et l'absorbance atteint un maximum en 6 min pour Au-G2-man, 17 min pour Au-G1-man et 25 min pour Au-G0-man. L'absorbance commence à diminuer due à la précipitation des agrégats qui présentent une taille trop grande pour demeurer en suspension. Une précipitation totale de la lectine Con A par les GNP de type mannose est obtenue après 30 min pour Au-G2-man, 40 min pour Au-G1-man et 55 min pour Au-G0-man.

Des GNP de type mannose d'une taille de 16 nm ont été utilisées pour la précipitation de Con A [79]. Ces GNP présentent un plasmon de surface (PS) à 520 nm. La cinétique de précipitation de Con A, suivie à 620 nm, montre que plus la concentration en Con A

augmente plus l'intensité de PS diminue, le PS se déplace vers des longueurs d'onde plus grandes et la bande devient plus large due à l'agrégation des nanoparticules d'or.

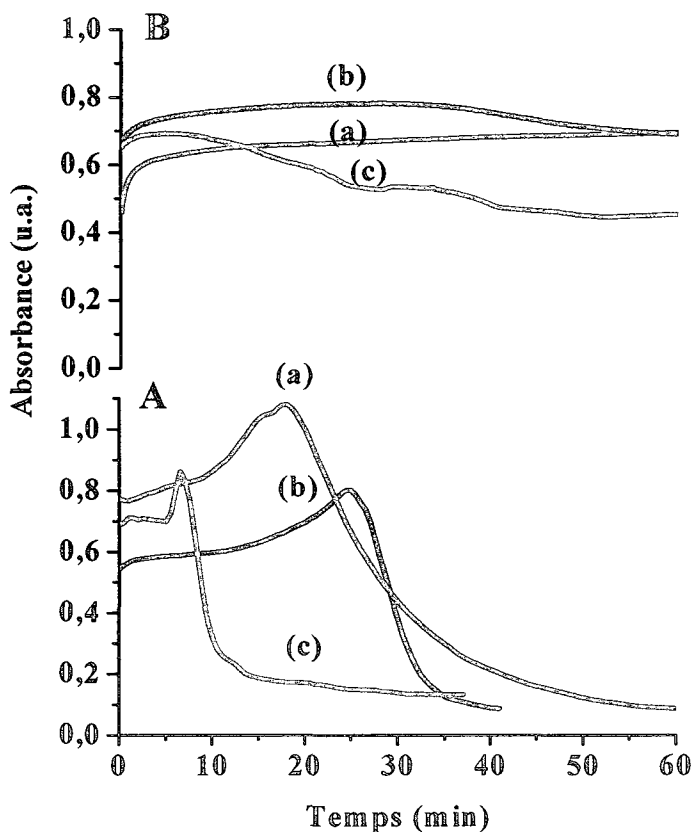


Figure 4.3: Variation de l'absorbance à 490 nm en fonction du temps après le mélange de : A) Con A et les GNP de type mannose : (a) Au-G0-man, (b) Au-G1-man, (c) Au-G2-man; B) Con A et les GD de type mannose : (a) G0-man, (b) G1-man, (c) G2-man. Des solutions de 1 mg/mL de GNP ou GD ont été mélangées dans des proportions de 1 : 2 avec Con A (1 mg/mL).

La même expérience a été effectuée avec les glycodendrimères (GD) de type mannose (G0-man, G1-man et G2-man) afin de comparer l'efficacité de glycodendrimères greffées

sur de nanoparticules d'or pour la complexation de la lectine Con A. Pour cette expérience, l'absorbance à 490 nm a été mesurée après que la lectine Con A (1 mg/mL PBS) et GD (1 mg/mL dans PBS) aient été mélangées dans un rapport de 2 : 1. La Figure 4.3B montre une lente augmentation de l'absorbance pour le complexe Con A-GD et aucune précipitation n'est obtenue même après 3 h. Des résultats semblables ont été obtenus précédemment [24].

La lectine WGA, qui est un dimère, a aussi été précipitée par les GNP de type NAcGlc de génération G0 (Au-G0-NAcGlc). Les solutions de lectine WGA (1 mg/mL dans PBS) et de Au-G0-NAcGlc (1 mg/mL dans PBS) ont été mélangées dans un rapport de 2 : 1. Comme la montre la Figure 4.4, l'absorbance augmente puis à partir de 85 min, l'absorbance diminue rapidement.

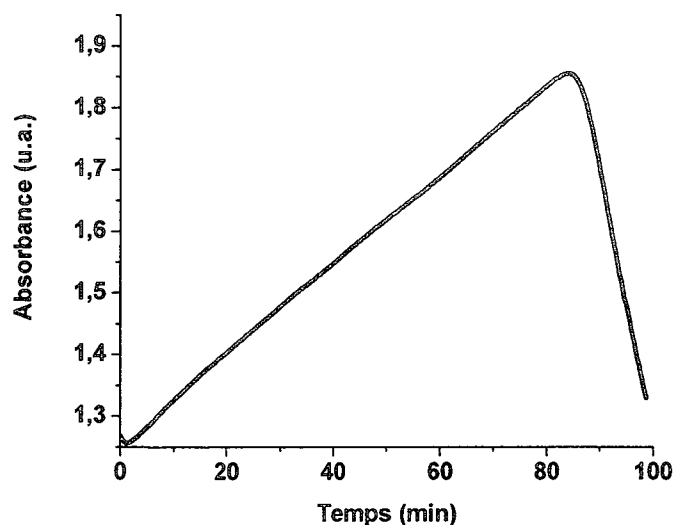


Figure 4.4: Variation de l'absorbance à 490 nm en fonction du temps après le mélange de WGA avec Au-G0-NAcGlc. Une solution de 1 mg/mL en GNP a été mélangée dans une proportion de 1 : 2 avec WGA (1 mg/mL).

Pour démontrer la généralité de notre approche, une lectine d'origine bactérienne, la lectine PA IL qui a une affinité pour le β -D-gal [20, 202, 203, 205], a été aussi étudiée. La complexation entre PA IL, qui est sous forme de tétramère, (1mg/mL PBS) et les GNP type galactose (Au-G0-gal) (1 mg/mL PBS) a été suivie en mesurant la variation de l'absorbance à 280 nm en fonction du temps après qu'elles aient été mélangées dans un rapport de 2 : 1. La variation de l'absorbance est présentée dans la Figure 4.5 a. La même expérience a été effectuée en utilisant les glycodendrimères de type galactose (G0-gal) (1 mg/mL PBS) et le résultat est présenté dans la Figure 4.5 b. Dans les deux cas, l'absorbance augmente dans les premières secondes mais elle augmente beaucoup plus rapidement dans le cas de GNP comparé au GD. Pendant les premières 30 min l'absorbance augmente et diminue après 50 min. Dans le cas de GD, l'absorbance augmente lentement et aucune précipitation n'est observée avec le temps. Seulement les GNP ont causé la précipitation de PA IL.

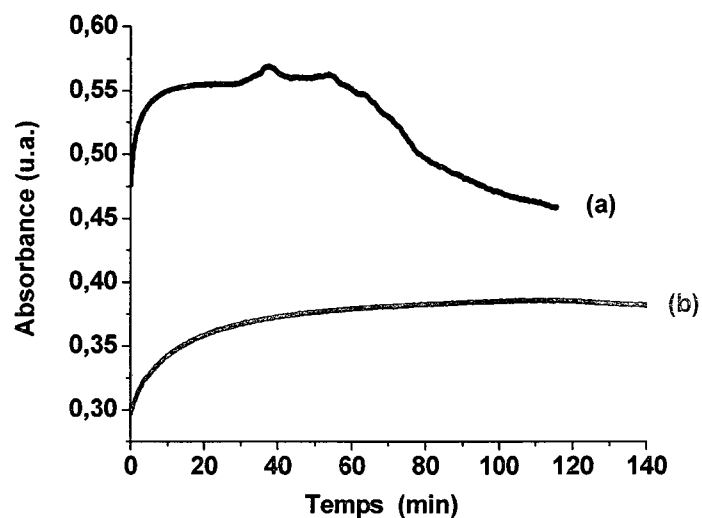


Figure 4.5: Variation de l'absorbance à 280 nm en fonction du temps après le mélange de (a) PA IL et Au-G0-gal; (b) PA IL et G0-gal. Des solutions de 1 mg/mL en GNP ou GD ont été mélangées dans des proportions de 1 : 2 avec PA IL (1 mg/mL).

La précipitation observée dans ces tests est due à la formation d'un réseau tridimensionnel [200, 201]. Dans le cas de Con A, chaque lectine du tétramère est liée à un mannose de GNP. Cependant, une GNP doit être liée à au moins deux lectines de tétramères différents afin pour former un complexe tridimensionnel tel que présenté dans la Figure 4.6.

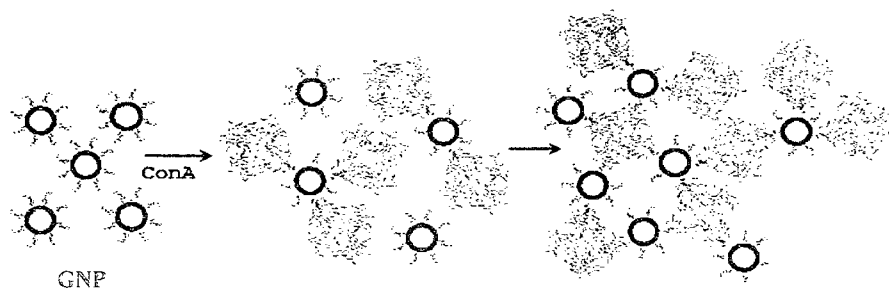


Figure 4.6: Complexation entre les GNP et la lectine Con A [206].

La précipitation de WGA ou PA IL par les GNP de type NAcGlc ou galactose est elle aussi reliée à la formation d'un complexe tridimensionnel. Cependant, il n'y a pas d'autres études de précipitation des lectines WGA et PA IL par les carbohydrates des GD ou GNP pour comprendre le mécanisme d'interaction.

La précipitation rapide des GNP comparée aux GD est reliée à l'affinité plus grande des GNP pour les récepteurs des lectines. Cette affinité pourrait être reliée non seulement à la multivalence mais aussi à la structure rigide de GNP. L'accessibilité des carbohydrates des GNP aux récepteurs des lectines ainsi que la solvation/désolvation peuvent aussi jouer un rôle dans l'augmentation d'affinité des GNP pour les lectines. Tous ces facteurs sont discutés en détail dans le Chapitre 5.

La précipitation rapide, sélective et réversible des lectines par les GNP valide notre approche pour la reconnaissance des lectines. La formation des complexes est mise en évidence aussi par des expériences de diffusion de la lumière et des mesures TEM présentées ci-dessous.

4.2.3. Étude de la taille du complexe lectine-GNP par DLS et TEM.

Les GNP en présence de lectines forment des agrégats. Ce phénomène d'agrégation a été suivi par la diffusion de la lumière qui permet de déterminer la taille des agrégats. Pour ces expériences la lectine Con A (0.1 mg/mL dans le PBS) en présence de GNP de type

mannose, de génération G0 (Au-G0-man) (1 mg/mL dans le PBS) mélangées dans des rapports (v/v) de 10 : 1 à 1 : 10 est utilisée.

La Figure 4.7 montre une taille d'environ 3 nm pour Con A et de 2 nm pour les GNP (Au-G0-man). Dans le cas où Con A et les GNP sont présentes dans la solution dans un rapport (v/v) de 2 : 1 des agrégats d'environ 60 nm sont obtenus. En diminuant la quantité de Con A (Con A : GNP de 1 : 1) des agrégats d'environ 250 nm ont été obtenus. Pour un rapport Con A : GNP de 1 : 2, la taille des agrégats augmente à 400 nm. Lorsque la concentration en GNP augmente, (Con A : GNP de 1 : 5), de gros agrégats se forment et précipitent rapidement. Des agrégats d'une taille de 300 nm sont observés. Dans le cas où la concentration de la lectine diminue par rapport aux GNP, des agrégats d'environ 60 nm sont obtenus pour le rapport Con A : GNP de 1 : 10.

En résumé, de gros agglomérats sont obtenus pour un rapport (v/v) de 1 : 1 et 1 : 2 entre GNP et lectine. On constate qu'en augmentant la concentration de GNP la quantité en Con A détectée diminue.

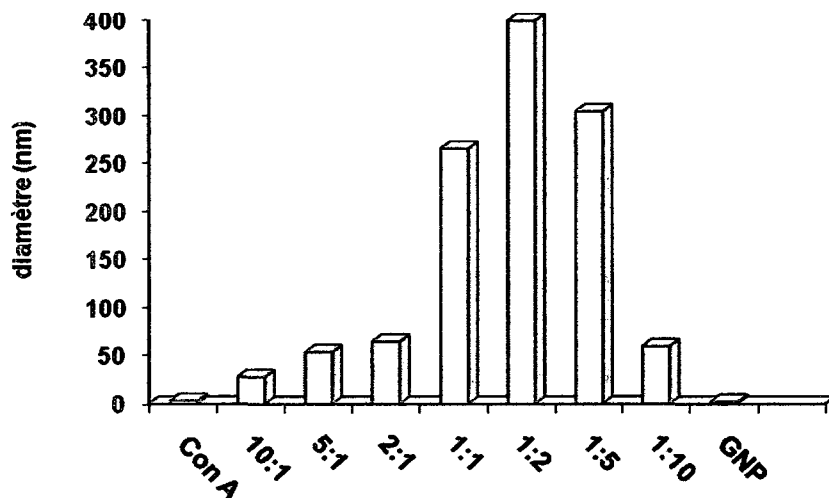


Figure 4.7: Évaluation par DLS du diamètre pour le complexe formé entre Con A (0.1mg/mL dans PBS) et Au-G0-man (1 mg/mL dans PBS) mélangés en différentes proportions (v/v).

L'agglomération de Au-G0-man (1 mg/mL, PBS) en présence de la lectine Con A (0.1 mg/mL, PBS) dans un rapport (v/v) de 1 : 1 a aussi été visualisée par TEM. Dans la Figure 4.8 des taches de couleur noire dont la taille varie de 50 à 200 nm sont visibles. Les points noirs correspondent aux particules d'or qui s'agglomèrent en présence de la lectine Con A pour former des complexes tridimensionnels.

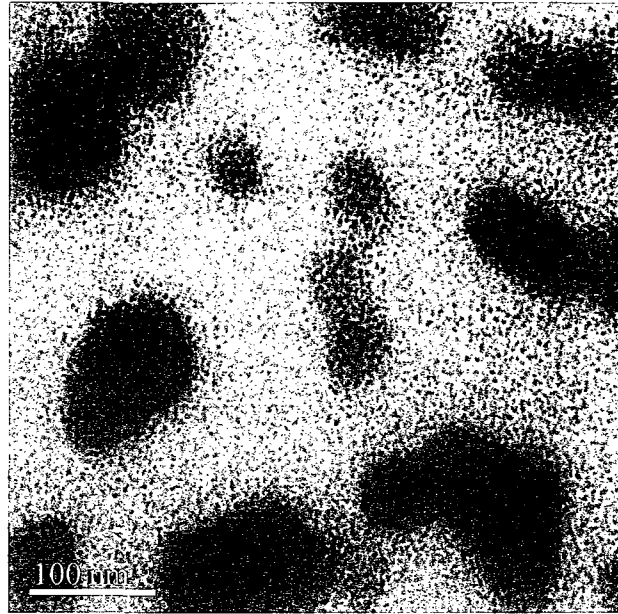


Figure 4.8: Visualisation de la formation du complexe Con A-Au-GO-man par TEM.

4.3. Détection de lectines par fluorescence

La détection des protéines est souvent réalisée à l'aide de marqueurs fluorescents attachés sur des biomolécules (protéines, anticorps) [207]. Ces types de détection présentent des contraintes car les modifications chimiques sur des biomolécules peuvent causer des changements structuraux et donc de spécificité.

Des stratégies utilisant des carbohydrates multivalents fluorescents pour la détection des protéines non fluorescentes ont été rapportées. Des glycodendrimères fluorescents de type PAMAM modifiés avec le glucose et marqués avec un fluorophore subissent une atténuation de 70 % en présence de la lectine Con A fluorescente [95]. L'atténuation de la fluorescence est causée par transfert d'énergie via un mécanisme de type FRET entre les

fluorophores. Les nanoparticules d'or modifiées avec le PAMAM et conjuguées avec des biomolécules ont été aussi utilisées pour détecter, par FRET, les interactions de type biotine-avidine, en présence de points quantiques (QD) fluorescents [75]. Dans un autre cas, [96] le transfert d'énergie entre un fluorophore d'une protéine et une surface de nanoparticule d'or métallique a été utilisé pour la détection de protéine. Ce transfert d'énergie appelé le transfert d'énergie de surface (SET) est différent du FRET quand à sa variation en fonction de la distance entre la surface et la protéine fluorescente. Comme il a été présenté dans l'introduction, le transfert d'énergie par FRET peut se produire pour une distance entre carbohydrates et lectines sous 100 Å [90] tandis que le transfert d'énergie par SET peut se faire pour une distance plus grande que 200 Å [96].

Ces deux stratégies sont illustrées dans la Figure 4.9 pour les systèmes GNP-lectines étudiés soit: (1) le transfert d'énergie par FRET (Figure 4.9a) entre les fluorophores d'une GNP et une lectine et (2) par transfert d'énergie par SET (Figure 4.9b) entre le fluorophore d'une lectine et la surface d'or d'une GNP.

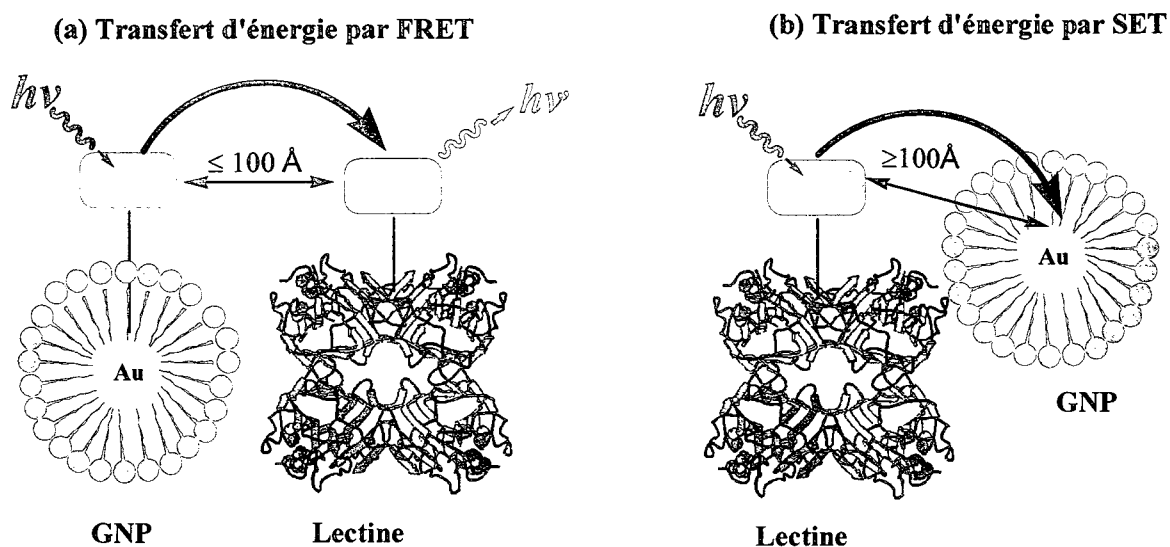


Figure 4.9: Schéma des mécanismes proposés pour la détection des lectines par fluorescence: (a) FRET ou (b) SET.

4.3.1. Étude du transfert d'énergie par FRET

Dans la perspective de contribuer à amplifier la reconnaissance moléculaire pour une détection rapide et spécifique des protéines, sans les modifier chimiquement, cette étude propose, d'abord, l'utilisation de glyconanoparticules d'or greffées de fluorophores. La détection se fait par l'atténuation de la fluorescence de ces particules en présence des lectines modifiées ou non par des fluorophores.

L'intensité de la fluorescence de GNP de génération G0 marquées de FITC de type mannose (Au-man-FITC) et de type N-acétyl-glucosamine (Au-NAcGlc-FITC) a été

mesurée en présence des lectines Con A et WGA, modifiées ou non avec FITC ou RITC. L'effet de la concentration des lectines sur l'atténuation de la fluorescence des GNP fluorescentes a été évalué. La concentration de GNP (Au-man-FITC et Au-NAcGlc-FITC); (2.2 μM dans le PBS) et le domaine de concentration des lectines fluorescentes ou non: Con A et Con A-FITC de 0.03-0.64 μM et WGA et WGA-RITC de 0.09-1.84 μM , ont été choisis de façon à avoir de bonnes intensités en fluorescence et de ne pas avoir de précipitation.

4.3.1.1. Résultats et discussion

Les spectres de GNP marquées de FITC montrent une excitation à 490 nm et émission à 520 nm (Figure 10). Pour les études suivantes, la variation de la fluorescence des GNP-FITC en présence des lectines a été suivie à la longueur d'émission de 520 nm.

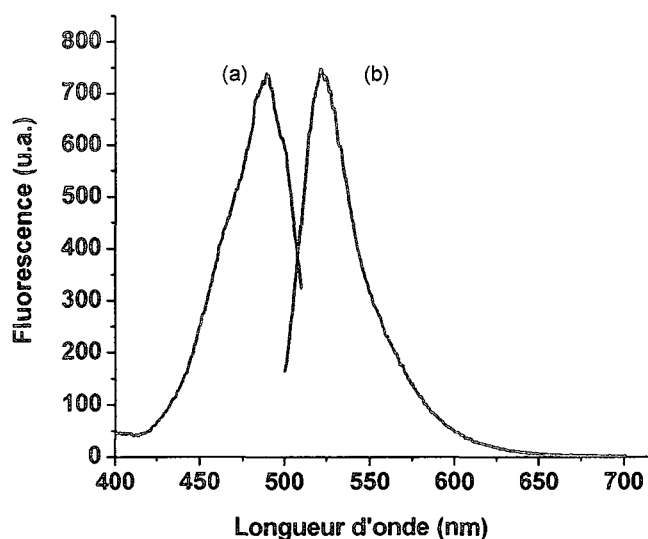


Figure 4.10: (a) Spectre d'excitation et (b) d'émission de GNP marqués de FITC (Au-man-FITC); (2.2 μM); $\lambda_{\text{ex}}=490$ nm, $\lambda_{\text{em}}=520$ nm.

La Figure 4.11 montre que la fluorescence de Au-man-FITC (2.2 μM) diminue avec l'augmentation de la concentration de Con A. En présence de Con A (0.64 μM), la fluorescence à 520 nm est atténuée de 7 %. Cette atténuation peut être reliée au transfert d'énergie entre les fluorophores FITC de GNP qui se trouvent confinés dans le complexe avec Con A. Cependant, pour une concentration en lectines de 0.64 μM , une atténuation de la fluorescence de 40 % a été obtenue en présence de Con A-FITC et de 46 % en présence de Con A-RITC. Ces résultats montrent que l'atténuation la plus importante est obtenue lorsque les GNP fluorescentes sont en présence de lectines marquées avec des fluorophores. Ces atténuations de 40 % et 54 % pourraient être attribuées au transfert d'énergie par FRET entre FITC de GNP et le fluorophore (FITC) ou (RITC) de Con A (donneur). Les mesures de fluorescence ont démontré que le transfert par FRET n'a pas été observé car après l'excitation à 490 nm, aucune augmentation de la fluorescence à la longueur d'émission de RITC de Con A-RITC à 580 nm n'a été observée en présence de Au-man-FITC. Donc, le transfert correspondrait plutôt à un transfert par SET entre le fluorophore de lectine (donneur) et la surface d'or des nanoparticules (l'accepteur). L'atténuation plus grande quand les fluorophores sont présents sur la lectine pourrait aussi être reliée à des interactions électrostatiques non-sélectives de type hydrophobes entre FITC de GNP et FITC ou RITC de lectine. Des mesures supplémentaires ont été faites dans cette étude pour clarifier si l'atténuation importante obtenue pourrait être reliée aux interactions non-sélectives entre les fluorophores.

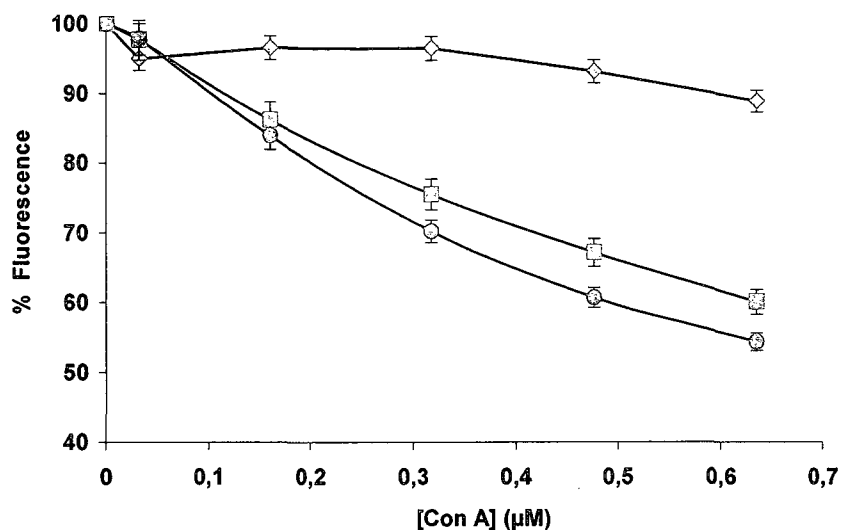


Figure 4.11: Variation de la fluorescence (%) de Au-man-FITC (2.2 μM) en présence de (◇) Con A; (▣) Con A-FITC; (○) Con A-RITC (c); $\lambda_{\text{ex}}=490$ nm, $\lambda_{\text{em}}=520$ nm.

La sélectivité des GNP pour les lectines est vérifiée en mettant des GNP (Au-man-FITC) (2.2 μM) en présence des lectines WGA et WGA-RITC sélectives pour NAcGlc. La Figure 4.12 montre une faible atténuation de la fluorescence de 6 % de Au-man-FITC après l'ajout de WGA (1.84 μM). Celle-ci peut être probablement due aux interactions non-sélectives entre les carbohydrates ou fluorophore de GNP et les groupements amines et carboxyles des acides aminés sur la lectine WGA. Quand les GNP (Au-man-FITC) sont en présence de WGA-RITC, la fluorescence diminue avec la concentration en lectine. Pour une concentration en WGA-RITC (1.84 μM), la fluorescence diminue de 50 %. Cette atténuation importante de la fluorescence est due probablement à des interactions électrostatiques non-sélectives de type dipôle-dipôle entre FITC et RITC. S'il y avait un transfert par FRET entre les deux fluorophores (FITC) de GNP et (RITC) de

WGA, après l'excitation à 490 nm, l'émission à 580 nm de RITC devrait augmenter. Cependant, aucun changement de la fluorescence n'a pas été observé à 580 nm. Donc dans ce cas, l'atténuation est due seulement à des interactions non spécifiques.

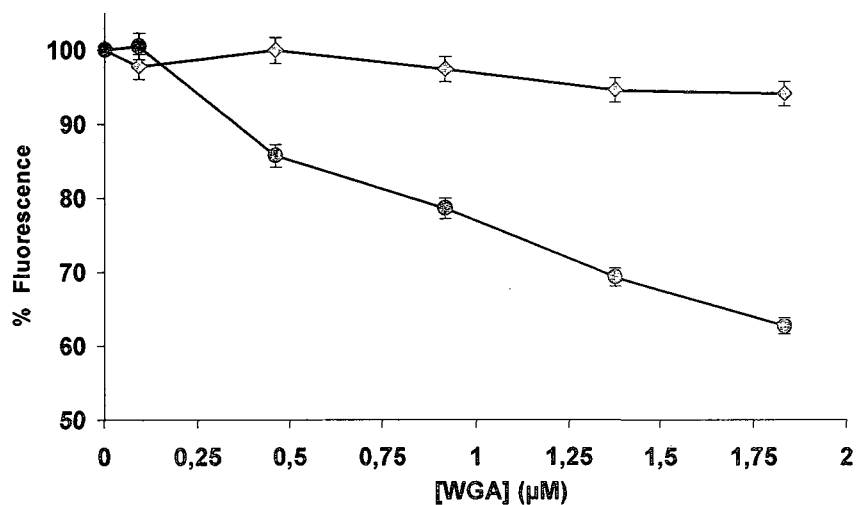


Figure 4.12: Variation de la fluorescence (%) de Au-man-FITC (2.2 μM) en présence de (\diamond) WGA; (\odot) WGA-RITC; $\lambda_{\text{ex}}=490$ nm, $\lambda_{\text{em}}=520$ nm.

La sélectivité de Au-NAcGlc-FITC pour Con A est aussi vérifiée par la fluorescence. La Figure 4.13 montre la variation de la fluorescence de Au-NAcGlc-FITC (2.2 μM) en présence de Con A, Con A-FITC et Con A-RITC à $\lambda_{\text{em}}=520\text{nm}$. Cette figure montre que la fluorescence pour Au-NAcGlc-FITC demeure constante avec l'augmentation de la concentration en Con A. Ce résultat montre que les récepteurs de lectine Con A ne reconnaissent pas les carbohydrates de type NAcGlc des GNP. La lectine n'est donc pas à proximité de GNP pour atténuer la fluorescence des GNP. Dans le cas de Au-NAcGlc-

FITC en présence de Con A-FITC, la fluorescence augmente proportionnellement à la concentration de la lectine fluorescente ajoutée à la solution. Aucune atténuation de la fluorescence n'est observée car les GNP ne sont pas à la proximité de lectines pour que le transfert par SET entre le fluorophore de lectine et la surface d'or puisse se réaliser. Les interactions entre les fluorophores FITC de Au-NAcGlc-FITC et de Con A-FITC sont trop faibles pour produire une atténuation de la fluorescence. Cependant, quand les Au-NAcGlc-FITC sont en présence de Con A-RITC, la fluorescence diminue de 47 % et cette atténuation est due à des interactions non spécifiques entre FITC de GNP et RITC de Con A. Après une excitation à 490 nm, aucun changement de la fluorescence n'a été observé à 580 nm. Donc l'atténuation entre les deux fluorophores n'est pas liée au transfert par FRET.

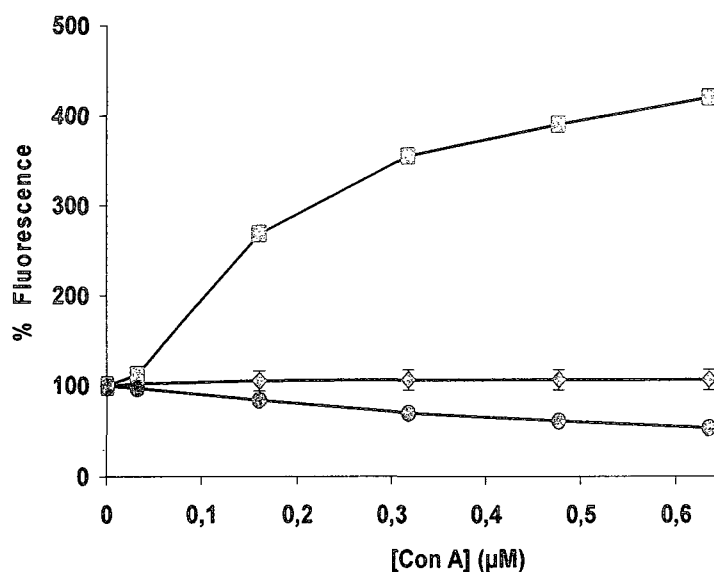


Figure 4.13: Variation de la fluorescence (%) de Au-NAcGlc-FITC (2.2 µM) en présence de (◇) Con A; (▣) Con A-FITC; (⊙) Con A-RITC (c); $\lambda_{ex} = 490$ nm, $\lambda_{em} = 520$ nm.

D'autres tests de sélectivité ont été effectués en utilisant les GNP (Au-NAcGlc-FITC) ($2.2 \mu\text{M}$) en présence de la lectine WGA et WGA-RITC. La Figure 4.14 montre que la fluorescence à $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ diminue avec la concentration des lectines et est atténuée de 30 % en présence de WGA ($1.84 \mu\text{M}$) et de 50 % en présence de WGA-RITC ($1.84 \mu\text{M}$). Ces résultats démontrent une bonne sélectivité de Au-NAcGlc pour WGA. L'augmentation de l'atténuation à 50 % peut être attribuée au transfert entre le donneur (RITC) de WGA-RITC et l'or de GNP qui est l'accepteur mais aussi à des interactions hydrophobes des fluorophores différentes que celles observées dans les tests précédents. Cependant, le transfert par FRET entre FITC des nanoparticules et RITC de la lectine n'a pas été observé car après une excitation de FITC à 490 nm, la fluorescence de RITC à $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$ diminue proportionnellement avec l'augmentation de la concentration en lectines. Dans le cas où le transfert se ferait par FRET, la fluorescence à $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$ devrait augmenter.

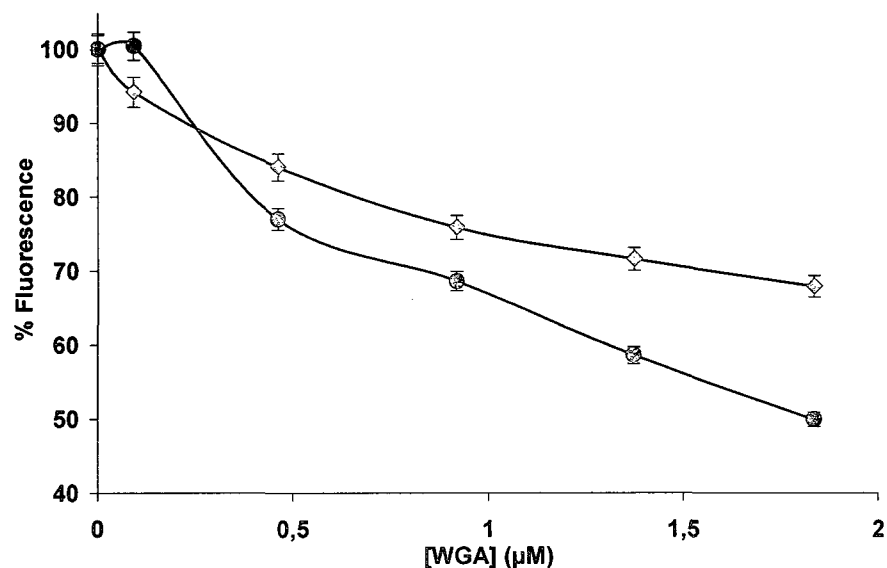


Figure 4.14: Variation de la fluorescence de Au-NAcGlc-FITC (2.2 µM) en présence de (◇) WGA; (●) WGA-RITC; $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$.

En conclusion, notre approche d'utiliser des GNP marquées avec des fluorophores pour la détection des lectines non fluorescentes est limitée par une faible atténuation de la fluorescence (6 % pour Au-man-FITC et 30 % Au-NAcGlc-FITC). Cependant, cette étude montre que dans le cas où la lectine est marquée avec un fluorophore, l'atténuation est plus importante que dans le cas où la lectine ne possède pas un fluorophore. Cette atténuation est liée au transfert par SET entre le fluorophore de la lectine et la surface d'or de GNP. Les résultats ont montré que les interactions non spécifiques entre FITC des GNP et FITC des lectines sont très faibles. Cependant, des interactions non spécifiques de type hydrophobes entre FITC de GNP et RITC des lectines ont été observées.

4.3.2. Étude du transfert d'énergie par SET

L'approche décrite dans la section précédente n'est pas efficace. C'est pour cette raison qu'une autre stratégie qui aborde l'utilisation des GNP non fluorescentes en présence de lectines fluorescentes est maintenant décrite. Dans ce cas les GNP sont exclusivement des accepteurs et les lectines des donneurs. Le transfert par SET est mis en évidence entre le fluorophore d'une lectine et la surface d'or d'une GNP.

Plus spécifiquement, des GNP de génération G0 de type mannose (Au-G0-man) et de type N-acétyl-glucosamine (Au-G0-NAcGlc) dans une gamme de concentrations de 0.22 à 2.2 μM ont été mises en présence des lectines fluorescentes Con A-FITC et Con A-RITC (0.32 et 0.64 μM) ainsi que WGA-RITC (0.92 et 1.84 μM). L'atténuation de la fluorescence a été suivie à la longueur d'onde d'émission spécifique à chaque fluorophore.

L'atténuation de la fluorescence de la lectine Con A-FITC par les Au-G0-man a été inhibée en présence de la levure de mannan, un polysaccharide à base de mannose qui reconnaît la lectine Con A. Plusieurs concentrations en mannan ont été testées soit de 0.0033 à 3.33 mg/mL dans le PBS. Cette étude permet de démontrer qu'en bloquant les récepteurs de Con A avec le mannan, les GNP seront trop loin de Con A pour que le transfert entre FITC de Con A et la surface d'or puisse se faire.

4.3.2.1. Résultats et discussion

La Figure 4.15 montre la variation de la fluorescence des lectines Con A-FITC, Con A-RITC (0.64 μM) en présence de Au-G0-man et aussi de lectine WGA-RITC (1.84 μM) en présence de Au-G0-NAcGlc. Une diminution importante de la fluorescence avec la concentration de GNP soit jusqu'à 80 % pour Con A-FITC et 72 % pour Con A-RITC en présence de Au-G0-man (2.2 μM) est observée. Une atténuation de 72 % a été obtenue pour WGA-RITC en présence de Au-G0-NAcGlc (2.2 μM). On observe qu'à partir de 1.1 μM en GNP, que la fluorescence pour les deux lectines demeure approximativement constante. Donc, à partir de cette concentration tous les récepteurs de lectine sont occupés par les carbohydrates.

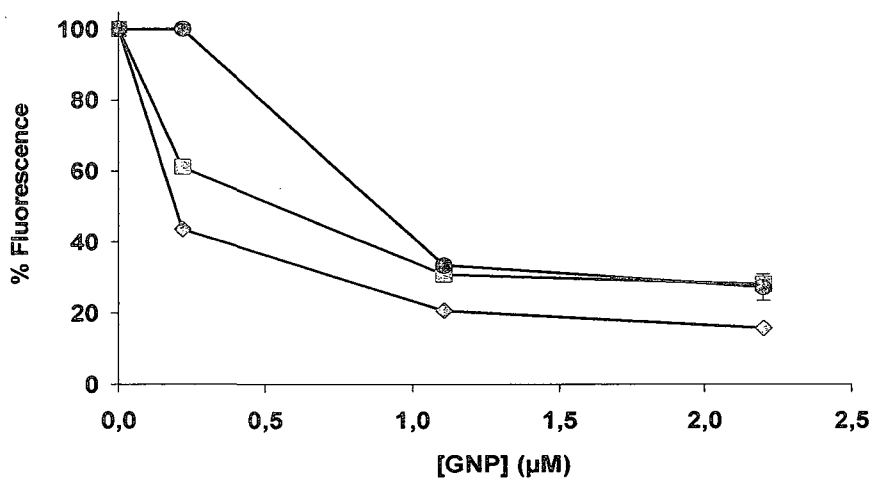


Figure 4.15: Variation de la fluorescence (%) des lectines (◇) Con A-FITC (0.64 μM); (◻) Con A-RITC (0.64 μM) en présence de GNP (Au-G0-man) ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$); (⊙) WGA-RITC (1.84 μM) en présence de GNP (Au-G0-NAcGlc); $\lambda_{\text{ex}} = 550 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$.

Il faut préciser que les GNP Au-G0-NAcGlc ont produit une atténuation de la fluorescence de Con A-FITC de 1 % et Au-G0-man une atténuation de la fluorescence de WGA-RITC de 3 %. Ces résultats démontrent une meilleure sélectivité des GNP non fluorescentes pour les lectines que les GNP fluorescentes.

Dans le but d'estimer la limite de détection de cette méthode, la concentration en lectines fluorescentes a été diminuée par deux soit 0.32 μM pour Con A et à 0.92 μM pour WGA afin d'avoir de bonnes intensités en fluorescence. La variation de la fluorescence a été mesurée en fonction de la concentration de GNP.

La Figure 4.16 montre une diminution de la fluorescence avec la concentration de GNP soit de 60 % pour Con A-FITC et de 72 % pour Con A-RITC en présence de Au-man (2.2 μM). Une atténuation de 75 % a été obtenue pour WGA-RITC en présence de Au-G0-NAcGlc (2.2 μM). La même figure montre une atténuation aussi importante de la fluorescence de 35 à 55 %, dépendamment de la lectine étudiée, en diminuant la concentration en GNP à 0.22 μM . Cependant, à partir de 1.1 μM de GNP, la fluorescence diminue faiblement et un plateau est observé vers une concentration de 2.2 μM car tous les récepteurs des lectines sont occupés. C'est le raison pour laquelle la concentration maximale en GNP utilisée est de 2.2 μM .

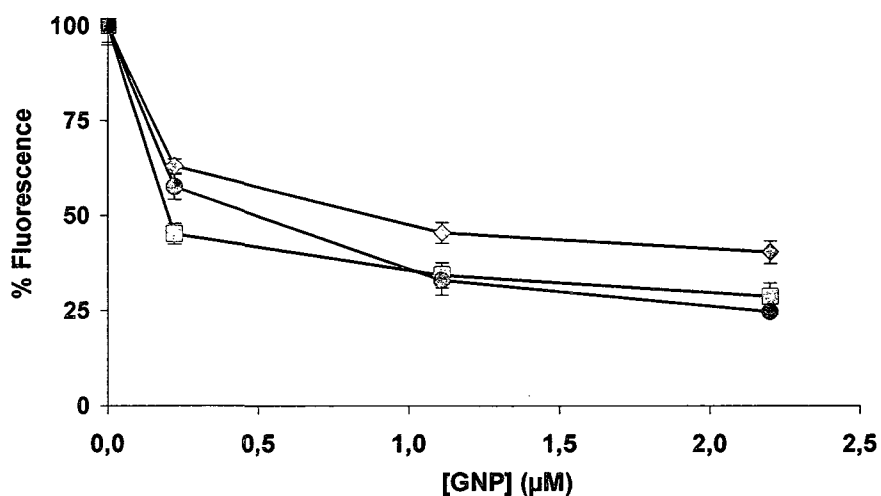


Figure 4.16: Variation de la fluorescence (%) des lectines (◆) Con A-FITC (0.32 µM), (◻) Con A-RITC (0.32 µM) en présence de GNP (Au-G0-man) ($\lambda_{ex} = 490$ nm, $\lambda_{em} = 520$ nm); (●) WGA-RITC (0.92 µM) en présence de GNP (Au-G0-NAcGlc); $\lambda_{ex} = 550$ nm, $\lambda_{em} = 580$ nm.

Ces résultats montrent une atténuation de la fluorescence des lectines plus importante en présence des GNP non fluorescentes que dans le cas de GNP fluorescentes. Celle-ci peut être attribuée au fait qu'en modifiant la surface des GNP avec des fluorophores l'affinité des carbohydrates pour les récepteurs des lectines diminue. Ceci peut être relié au fait que le greffage des fluorophores implique une diminution de la concentration en carbohydrates à la surface de GNP. Dans le cas de Au-man-FITC, FITC occupe 36% de la surface d'or comparé à 64 % pour mannose. De plus, les fluorophores sont des molécules hydrophobes pouvant bloquer le site de la reconnaissance de lectine empêchant l'accès des carbohydrates. Donc, en éliminant le fluorophore sur la nanoparticule on obtient une atténuation de la fluorescence importante car l'affinité des

GNP pour les lectines devrait augmenter. Cette atténuation pourrait être reliée au transfert d'énergie entre le fluorophore des lectines et la surface d'or de GNP quand les deux se trouvent à une distance optimale pour que le transfert par SET se réalise. Cependant, ce transfert ne devrait pas se réaliser si les récepteurs des lectine sont bloqués par un autre carbohydrate.

4.3.2.2. Inhibition du transfert d'énergie par SET

Pour démontrer que le transfert d'énergie par SET se réalise seulement si la lectine est à proximité des GNP, le mannan ayant une affinité pour Con A est utilisé pour bloquer l'interaction entre les carbohydrates de GNP pour les récepteurs des lectines. De cette manière, la fluorescence de Con A-FITC ne devrait pas beaucoup diminuer. Le mannan est aussi utilisé dans les tests d'inhibition par la méthode ELLA [24]. Cette étude a utilisé des glycodendrimères afin de bloquer l'interaction de Con A pour le mannan. Une glycoprotéine est utilisée pour inhiber le transfert par FRET entre le donneur (Con A fluorescente) et l'accepteur (bille de polymère fluorescente) [93] ou bien le transfert par SET entre le donneur des points quantiques fonctionnalisés avec le dextrane (QD-dextrane) et l'accepteur (Con A fonctionnalisée avec des nanoparticules d'or) [75].

Pour cette étude, il est proposé d'étudier l'inhibition du transfert d'énergie entre le donneur (Con A-FITC) et l'accepteur (la surface d'or) de GNP de type mannose de génération G0 (Au-G0-man). Tout d'abord, la fluorescence de Con A-FITC (0.32 μ M) a été analysée seulement en présence de mannan pour voir s'il y a une atténuation. Les résultats ont montré que dans le cas d'une concentration en mannan de 3.33 mg/mL,

l'atténuation diminue de 9 %, pour 1.66 mg/mL l'atténuation diminue de 3 %. Pour les concentrations inférieures à 1.66 mg/mL en mannan l'atténuation est sous 1 %.

Par la suite, les GNP ont été ajoutées à la solution de Con A-FITC (0.32 μ M) et de mannan. La Figure 4.17 montre qu'en présence de mannan (0.33 à 3.33 mg/mL), l'atténuation de la fluorescence de Con A-FITC par Au-G0-man (2.2 μ M) est d'environ 15 %. Une partie de cette atténuation est aussi reliée au mannan. Plus la concentration en mannan diminue plus l'atténuation de la fluorescence est importante. Cette étude montre que le mannan bloque une partie des récepteurs de Con A et empêche les GNP de se fixer sur les récepteurs de Con A. De cette manière, le fluorophore est loin de la surface d'or et le transfert d'énergie se réalise difficilement. Donc le mécanisme d'interaction carbohydate-protéine suggéré par le transfert d'énergie entre le fluorophore et la surface métallique d'or semble valide.

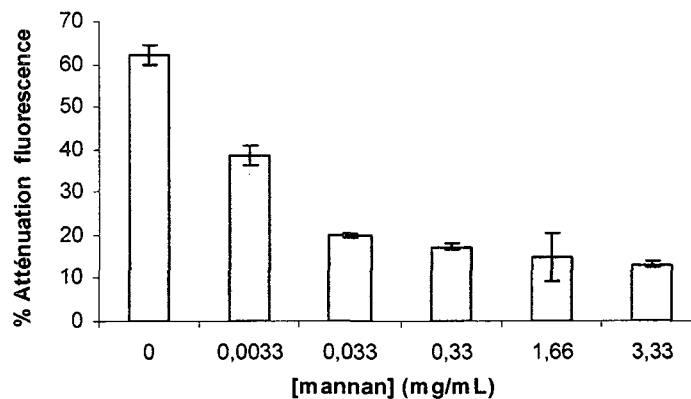


Figure 4.17: Atténuation de la fluorescence (%) de Con A-FITC (0.32 μ M) par Au-G0-man (2.2 μ M) en absence et en présence de mannan (0.0033-3.33 mg/mL); λ_{ex} =490 nm, λ_{em} =520 nm.

4.4. Conclusion

Cette étude a montré que les GNP reconnaissent des lectines spécifiques et la formation de ces complexes est réversible. Les mesures décrites ci-dessus ont permis de valider que la méthode de synthèse des GNP consistant à greffer des carbohydrates à la surface de nanoparticules d'or résulte en un biocapteur efficace.

Les mesures de fluorescence ont démontré le potentiel de GNP pour la détection des lectines. Les résultats obtenus dans ce chapitre permettent d'éliminer une première approche soit d'utiliser des nanoparticules d'or marquées de fluorophores pour la détection des protéines non fluorescentes car la réponse obtenue par fluorescence est faible. La deuxième approche, qui consiste à d'utiliser des nanoparticules d'or non fluorescentes, est la plus sensible et spécifique pour la détection des protéines fluorescentes. Grâce aux mesures de fluorescence, le mécanisme d'interaction par un transfert d'énergie de type SET entre l'or des GNP et les fluorophore des lectines a pu être démontré.

Le schéma de la Figure 4.18 a, résume les résultats obtenus dans ce chapitre. Le spectre sur la Figure 4.18a montre que la lectine Con A-FITC a une fluorescence importante à 520 nm en absence des GNP. Après l'ajout des GNP à la solution de lectine, la fluorescence à 520 nm diminue considérablement. Dans la Figure 4.18b, il est montré qu'après le mélange de la lectine avec le mannan, le transfert par SET entre le fluorophore de Con A-FITC et l'or de GNP se réalise difficilement car les récepteurs sur

la lectine sont majoritairement bloqués par le mannan, de manière à ce que l'or soit trop loin de la lectine pour que le transfert d'énergie se produise. Cependant, il est obtenu qu'après l'ajout de GNP à la solution lectine et mannan (3.33 mg/mL) la fluorescence de Con A-FITC est atténuée de 13 % comparativement à 60 % en absence de mannan. Donc, le mannan qui a une structure différente de la structure globulaire des GNP, ne peut pas bloquer efficacement tous les sites de lectine et inhiber totalement l'atténuation de la fluorescence de lectine reliée par les GNP. Des tests supplémentaires devraient être effectués en variant les concentrations en mannan et GNP ou en utilisant un autre inhibiteur, une glycoprotéine.

Les mesures de fluorescence ont donc démontré que l'atténuation de la fluorescence se produit par un transfert SET entre le fluorophore FITC de lectine (Con A-FITC) et la surface métallique d'or de GNP (Au-G0-man).

Cette méthode a été appliquée pour la mesure quantitative des paramètres thermodynamiques et cinétiques des interactions lectine-GNP. Cette étude est présentée dans le chapitre suivant.

Chapitre 5. Détermination de paramètres thermodynamiques et cinétiques de la formation du complexe lectine-GNP par fluorescence

5.1. Introduction

Les interactions protéines-carbohydrates ont fait l'objet de plusieurs études visant le développement des médicaments, inhibiteurs et biocapteurs [3-5, 15, 45, 208-210]. Les interactions faibles à des concentrations de l'ordre du mM entre les monosaccharides et lectines [8, 24, 211], posent un problème pour le développement d'applications thérapeutiques. Une forte affinité est requise pour compétitionner avec les récepteurs multivalents des protéines présents à la surface des cellules. Dans la présente étude, l'affinité des GNP multivalentes pour les lectines a été comparée à celle des GD de type PAMAM pour déterminer l'effet de la structure et de la multivalence sur l'interaction carbohydrates-protéines.

Plusieurs techniques expérimentales telles que la colorimétrie (immunoprécipitation, tests ELLA) et l'électrophorèse SDS-PAGE [24] ont été utilisées pour quantifier l'affinité des carbohydrates pour les récepteurs des protéines. La cristallographie par rayons-X [212, 213] a fourni une image tridimensionnelle de cette interaction. Pourtant, il n'y a pas beaucoup d'études détaillées sur les aspects énergétiques du mécanisme d'interaction. La microcalorimétrie [8, 97, 101-103, 105, 214, 215] a été utilisée pour obtenir les paramètres thermodynamiques de ces interactions et ceci a apporté des informations complémentaires aux techniques mentionnées ci-dessus. Dans cette étude, la

spectroscopie de fluorescence est utilisée dans l'étude du mécanisme d'interaction lectines-carbohydrates et pour la détermination des paramètres cinétiques pour la reconnaissance entre lectine et GNP.

5.2. Variation de la fluorescence des lectines avec la concentration de GNP.

Dans cette section, l'atténuation de la fluorescence d'une lectine modifiée par un fluorophore est utilisée pour étudier la reconnaissance entre le récepteur de la protéine et les carbohydrates de la GNP. Cette méthode permet aussi d'obtenir les paramètres thermodynamiques à équilibre tels que la constante d'affinité (K_a), l'énergie libre de réaction (ΔG^0), la stœchiométrie du complexe lectine-GNP de même que, les contributions enthalpiques (ΔH^0) et entropiques ($T\Delta S^0$). Les paramètres cinétiques tels que la constante de vitesse (k_v), l'énergie d'activation (E_A), l'entropie (ΔS^*), enthalpie (ΔH^*) et énergie libre (ΔG^*) d'activation pour le complexe lectine-GNP ont aussi été déterminés.

Dans la première partie, les constantes d'affinité des GNP de type mannose (Au-Gn-man) et N-acétyle glucosamine (Au-Gn-NAcGlc) des générations (Gn=G0, G1 et G2) pour les lectines conjuguées avec des fluorophores (Con A-FITC et WGA-RITC) ont été obtenues. Une comparaison a été effectuée avec les glycodendrimères de type mannose (Gn-man) de génération (Gn=G0, G1, G2).

L'équilibre des formes dimère-tétramère de Con A est sensible au pH. Le tétramère existe à pH 7.0 tandis que le dimère est dominant à pH 5.0. Pour cette étude, Con A est utilisée sous forme de tétramère à pH 7.4 dans le PBS.

Pour calculer la constante d'affinité (K_a) entre Con A-FITC/WGA-RITC et les GNP (Au-G-man/Au-G-NAcGlc) des solutions de 320, 32 et 3.2 nM en Con A-FITC et de 925, 92.5 et 9.25 nM en WGA-RITC (après le mélange) dans le PBS ont été titrées avec Au-G-man/Au-G-NAcGlc de différentes concentrations allant de 0.011 à 2.2 μ M (après le mélange) dans le PBS à une température de 23 °C.

Pour calculer la constante d'affinité (K_a) entre Con A-FITC et les GD (G0-man, G1-man, G2-man), une concentration fixe de 320 nM de Con A-FITC (après le mélange) dans le PBS a été titrée avec les GD de différentes concentrations allant de 0.01-1 mM (après le mélange) dans PBS.

L'atténuation de la fluorescence de Con A-FITC par les GNP de type mannose à 520 nm et à 580 nm pour les GNP de type NAcGlc, est illustrée par les Figures 5.1 et 5.2. Celles-ci correspondent à la variation de fluorescence de Con A-FITC/WGA-RITC en fonction de la concentration de Au-G-man/Au-G-NAcGlc ajoutée à la solution de lectine.

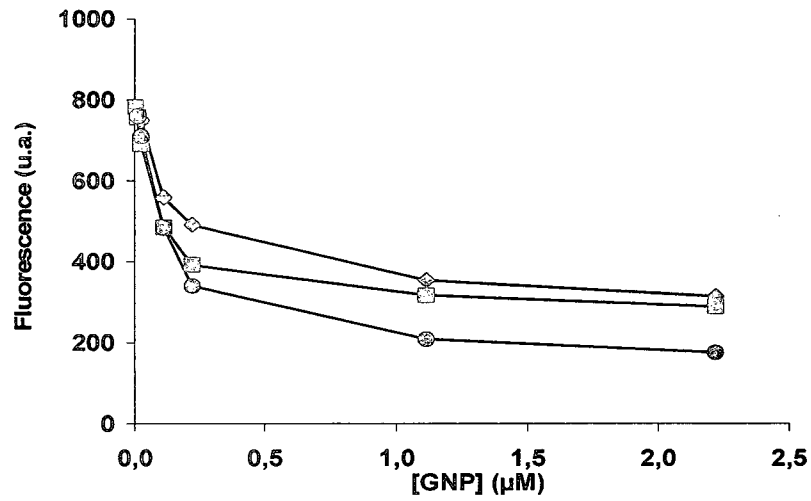


Figure 5.1: Atténuation de la fluorescence de Con A-FITC (320 nM) par GNP: (◇) Au-G0-man; (◻) Au-G1-man; (⊙) Au-G2-man; $\lambda_{ex}=490$ nm, $\lambda_{em}=520$ nm.

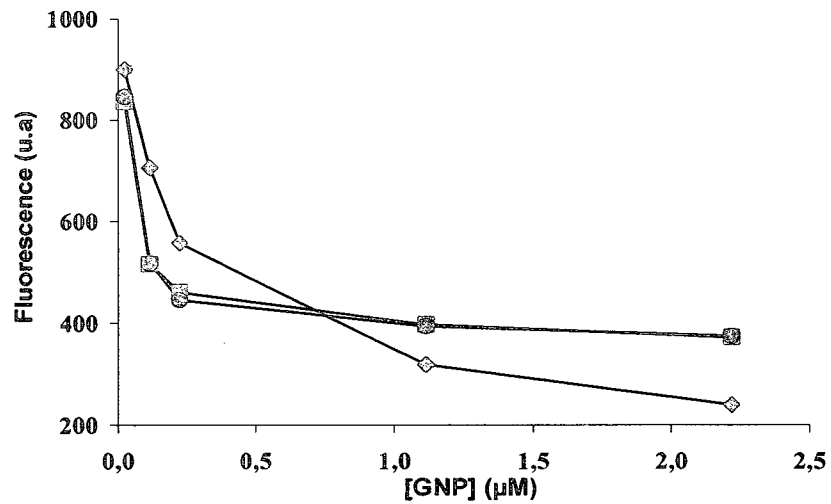


Figure 5.2: Atténuation de la fluorescence de WGA-RITC (925 nM) par (◇) Au-G0-NAcGlc; (◻) Au-G1-NAcGlc; (⊙) Au-G2-NAcGlc; $\lambda_{ex}=550$ nm, $\lambda_{em}=580$ nm.

Dans la Figure 5.1, il est possible de voir que l'intensité de la fluorescence de Con A-FITC diminue de 60 %, 63 % et 80 % en présence d'une concentration de 2.2 μM de GNP (Au-G0-man, Au-G1-man et Au-G2-man). À cette concentration, tous les sites de liaison sont occupés et la fluorescence demeure donc constante.

Dans la Figure 5.2, l'intensité de la fluorescence de WGA-RITC diminue de 75 % en présence d'une concentration de 2.2 μM Au-G0-NAcGlc et de 62 % en présence de Au-G1-NAcGlc et Au-G2-NAcGlc. Il faut noter que pour une concentration de 0.22 μM de GNP de type NAcGlc une atténuation de 55 % pour Au-G1-NAcGlc et Au-G2-NAcGlc est obtenue comparativement à 42 % pour Au-G0-NAcGlc.

L'atténuation de la fluorescence est réversible car après l'ajout d'un excès de $\alpha\text{-D-man}$ au complexe entre Con A-FITC (320 nM) et Au-G0-man (0.22 ou 2.2 nM) (Figure 5.3), l'intensité de la fluorescence de Con A-FITC augmente jusqu'à 80% de sa valeur initiale. Ceci démontre une interaction spécifique entre Con A-FITC et Au-G0-man. Dans la

Figure 5.3, $(\%) \textit{Fluorescence} = \frac{F_{D-man} - F_{GNP}}{F_{max} - F_{GNP}} \times 100$, où F_{max} , F_{GNP} , F_{D-man} sont la

fluorescence de Con A-FITC en absence, en présence de GNP et après l'ajout de $\alpha\text{-D-man}$ au complexe Con A-FITC-Au-G0-man.

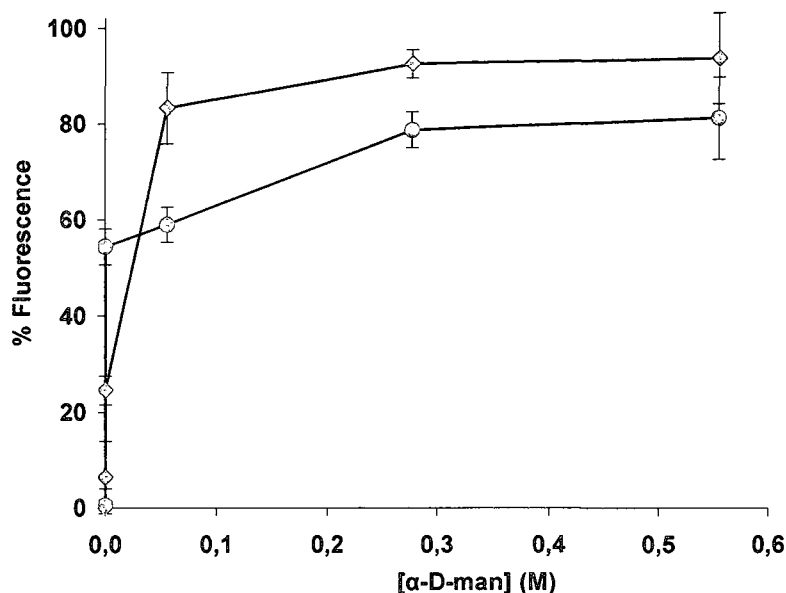


Figure 5.3: Réversibilité de l'atténuation de la fluorescence (pourcentage de la valeur initiale) du complexe formé entre Con A-FITC (320 nM) et Au-G0-man de concentrations (\diamond) 0.22 μ M; (\circ) 2.2 μ M après l'ajout de α -D-man.

Les Figures 5.4 et 5.5 montrent qu'en présence de Au-G0-man et Au-G0-NAcGlc (2.2 μ M), l'atténuation de la fluorescence est de 60 % pour Con A-FITC (320 et 32 nM) et de 68 % et 60 % pour WGA-RITC (925 et 92.5nM). Ces résultats démontrent que l'affinité des lectines pour les GNP est similaire dans des domaines de concentration des lectines plus petits ou égaux à la concentration des GNP. Ces résultats sont confirmés par les constantes d'affinité présentées ci-dessous. Dans le cas où les lectines (Con A-FITC et WGA-RITC) sont en faible concentration (3.20 et 9.25 nM), l'atténuation est de 27 et 33 % en présence de Au-G0-man et Au-G0-NAcGlc (2.2 μ M). Ces résultats confirment que des concentrations de l'ordre du nM des lectines peuvent être détectées en présence de

GNP. Les Figures 5.4 et 5.5 montrent que le domaine de concentration de GNP où l'atténuation de la fluorescence des lectines est importante se situe entre 0.2 et 2.2 μM soit où la concentration des GNP est égale ou supérieure à celle des lectines et que l'intensité de la fluorescence est importante.

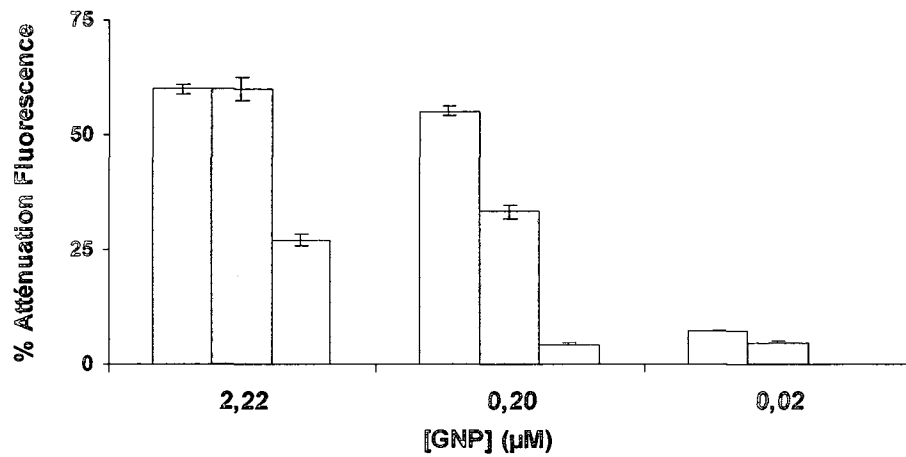


Figure 5.4: Atténuation de la fluorescence (%) de Con A-FITC de concentrations: (□) 320 nM; (□) 32 nM; (□) 3.2 nM par les GNP (Au-G0-man); $\lambda_{ex}=490$ nm, $\lambda_{em}=520$ nm.

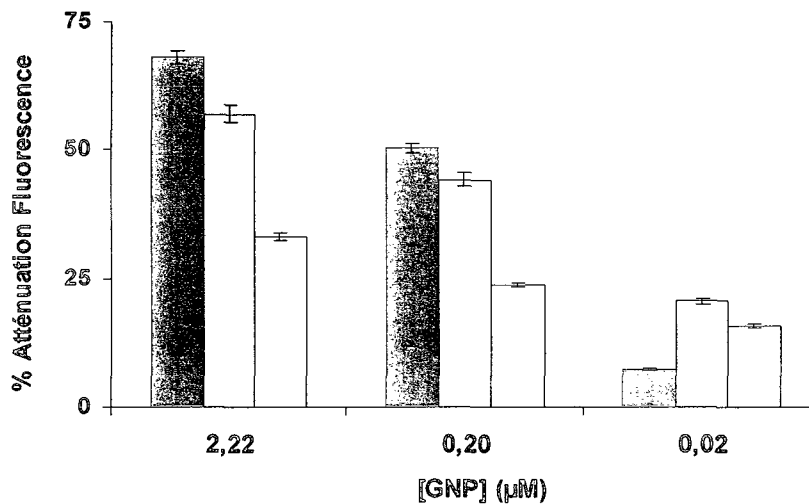


Figure 5.5: Atténuation de la fluorescence (%) de WGA-RITC de concentrations: (□) 925 nM; () 92.5 nM; () 9.25 nM par les GNP (Au-G0-NAcGlc); $\lambda_{ex}=550$ nm, $\lambda_{em}=580$ nm.

5.3. Détermination de constantes d'affinité pour le complexe GNP-lectine

5.3.1. Introduction

Les interactions entre un récepteur d'une protéine R et un ligand L pour former le complexe RL sont représentées dans l'équation 5.1 par la réaction suivante:



Cette réaction est caractérisée par une constante d'affinité K_a (équation 5.2) qui correspond au rapport des concentrations du complexe formé et le produit entre les concentrations du récepteur et du ligand.

$$K_a = \frac{[RL]}{[R][L]} \quad (5.2)$$

5.3.2. Résultats et discussion

Pour obtenir la constante d'affinité (K_a) entre Con A-FITC/WGA-RITC et Au-G-man/Au-G-NAcGlc à partir de mesures de fluorescence, l'Équation (5.3) [216, 217] est utilisée:

$$\frac{[L]}{\Delta F} F_0 = \frac{[L]}{\Delta F_{\max}} F_0 + \frac{F_0}{\Delta F_{\max} K_a} \quad (5.3)$$

Dans l'équation (5.3), $[L]$ est la concentration de GNP (Au-G-man/Au-G-NAcGlc). F_0 , F , and F_{\max} , sont l'intensité de fluorescence de Con A-FITC/WGA-RITC en absence, en présence, et à une concentration maximale en GNP où la fluorescence demeure constante. $\Delta F = (F_0 - F)$ et $\Delta F_{\max} = (F_0 - F_{\max})$ sont les variations de l'intensité de fluorescence. À partir de cette équation (5.3), $\frac{[L]}{\Delta F} F_0$ a été représentée en fonction de $[L]$. Les valeurs de l'ordonnée à l'origine et de la pente pour les droites obtenues dans les Figure 5.6 et 5.7, fournissent les valeurs de K_a pour les complexes des GNP (de générations G0, G1 et G2) et Con A-FITC (320 nM) ou WGA-RITC (925 nM).

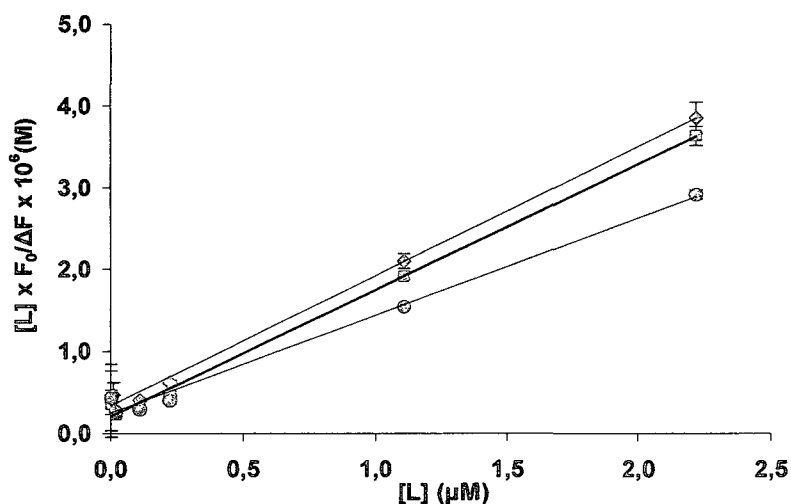


Figure 5.6: Courbes pour la détermination de K_a pour les complexes formés entre Con A-FITC (320 nM) et les GNP (L): (◇) Au-G0-man; (◻) Au-G1-man; (○) Au-G2-man.

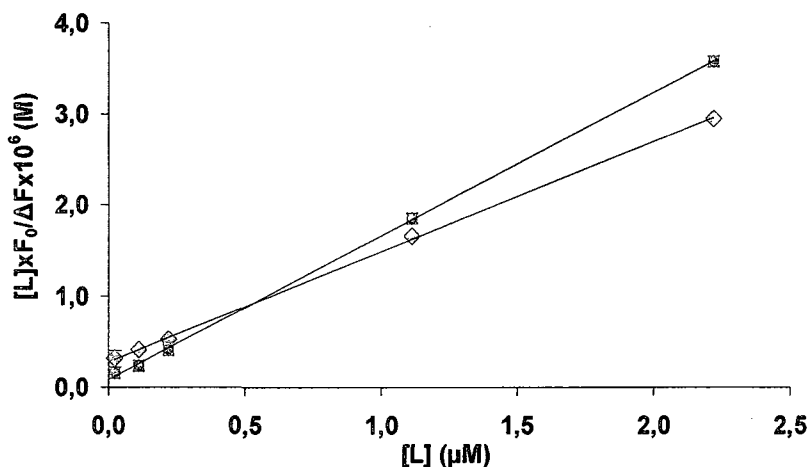


Figure 5.7: Courbes pour la détermination de K_a pour les complexes formés entre WGA-RITC (925 nM) et les GNP (L): (◇) Au-G0-NAcGlc; (◻) Au-G1-NAcGlc; (⊙) Au-G2-NAcGlc.

Les valeurs de constante d'affinité K_a calculées par cette méthode pour les complexes formés entre Con A et les GNP de type mannose (Au-G0-man, Au-G1-man, Au-G2-man) varient avec la génération de $5.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ à $17 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Tableau 5.1). Tandis que les valeurs de la constante d'affinité K_a pour les complexes formés entre Con A et les GD de type mannose (G0-man, G1-man, G2-man) varie selon la génération de 1.1×10^4 à $5.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, (Tableau 5.1). Des valeurs de K_a (déterminées par ITC) de Con A de $2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ pour α -D-man [211] de $11.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ pour Me- α -D-man [218], de $2.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ pour Me- α -D-glc [211] et de $1.86 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ pour G2-man, [106] ont été rapportées. Des études par ITC ont aussi effectuées pour des analogues du mannose multivalent et les valeurs de K_a pour Con A augmentent avec la valence de $2.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ pour des analogues mannoses divalents à $13.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ pour des trimanosides tétravalents [215]. Les glycodendrimères de type mannose ont également été testés comme inhibiteurs d'adhésion de Con A au

mannan. La valeur de IC_{50} correspondant à la concentration en GD pour laquelle l'inhibition d'adhésion des lectines au mannan est de 50 %, est de 12.4×10^{-6} M pour le tétramère (G0-man) et de 2.3×10^{-6} M pour le 32-mère (G3-man) comparé à 9.24×10^{-4} M pour Me- α -D-man [24].

Tableau 5.1: Constantes d'affinité (K_a), pour les complexes formés entre Con A-FITC et les GNP (Au-G0-man, Au-G1-man, Au-G2-man) et GD (G0-man, G1-man, G2-man).

	K_a (M^{-1})
Au-G0-man	$(5.6 \pm 0.1) \times 10^6$
Au-G1-man	$(16 \pm 0.1) \times 10^6$
Au-G2-man	$(17 \pm 0.1) \times 10^6$
G0-man	$(1.1 \pm 0.6) \times 10^4$
G1-man	$(4.2 \pm 0.3) \times 10^5$
G2-man	$(5.1 \pm 0.5) \times 10^5$

Les valeurs de la constante d'affinité K_a , pour les complexes formés entre WGA-RITC et les GNP de type NAcGlc (Au-G0-NAcGlc, Au-G1-NAcGlc, Au-G2-NAcGlc) déterminées par cette méthode, varient avec la génération de $4.7 \times 10^6 M^{-1}$ à $19 \times 10^6 M^{-1}$ (Tableau 5.2). La littérature [219] rapporte des valeurs de K_a de WGA pour NAcGlc de $0.4 \times 10^3 M^{-1}$ et de K_a de $13 \times 10^3 M^{-1}$ à $36 \times 10^3 M^{-1}$ pour les oligomères $\beta(1,4)$: (NAcGlc)₂, (NAcGlc)₃ et (NAcGlc)₄ (résultat obtenu par ITC). Les glycodendrimères de type

NAcGlc ont été utilisés comme inhibiteurs d'adhésion de WGA à une glycoprotéine, la mucine, qui provient de l'estomac de porc. La valeur de IC_{50} est de 3.1×10^{-3} M pour le dimère, de 5.1×10^{-4} M pour le trimère et de 8.6×10^{-5} M pour le tétramère comparé à 15×10^{-3} M pour allyl α -D-NAcGlc [204].

Tableau 5.2: Constantes d'affinité (K_a) pour les complexes formés entre WGA-RITC et les GNP (Au-G0-NAcGlc, Au-G1-NAcGlc, Au-G2-NAcGlc).

	K_a (M^{-1})
Au-G0-NAcGlc	$(4.7 \pm 0.1) \times 10^6$
Au-G1-NAcGlc	$(19.0 \pm 0.3) \times 10^6$
Au-G2-NAcGlc	$(19.0 \pm 0.4) \times 10^6$

À partir de l'équation (5.3) et des résultats de la Figure 5.8, les valeurs de K_a pour l'interaction de Au-G0-man pour Con A-FITC (320, 32 et 3.2 nM) et de la Figure 5.9, les valeurs de K_a pour l'interaction de Au-G0-NAcGlc pour WGA-RITC (925, 92.5, 9.25 nM) sont obtenues. Les résultats présentés dans le Tableau 5.3 montrent que les valeurs de K_a demeurent approximativement constantes pour Con A-FITC (320 et 32 nM) et WGA-RITC (92.5 et 9.25 nM).

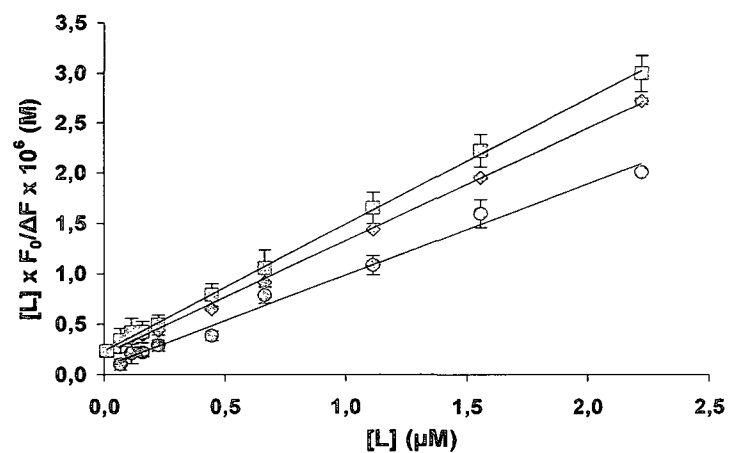


Figure 5.8: Courbes pour la détermination de K_a pour les complexes formés entre les GNP (L) Au-G0-man et Con A-FITC de concentration: (\diamond) 320 nM; (\square) 32 nM; (\circ) 3.2 nM.

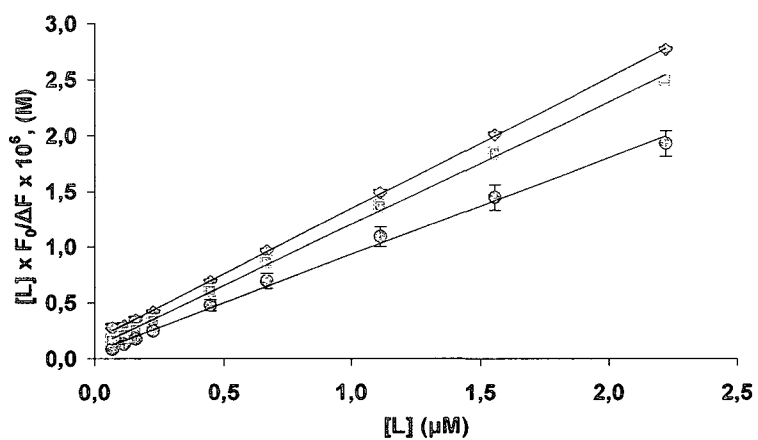


Figure 5.9: Courbes pour la détermination de K_a pour les complexes formés entre les GNP (L) Au-G0-NAcGlc et WGA-RITC de concentration: (\diamond) 925 nM; (\square) 92.5 nM; (\circ) 9.25 nM.

Tableau 5.3: Constantes d'affinité (K_a) pour les complexes formés entre Con A-FITC (320, 32 et 3.2 nM) et Au-G0-man et entre WGA-RITC (925, 92.5 et 9.25 nM) et Au-G0-NAcGlc.

	Conc. Lectine (nM)	K_a (M^{-1})
Con A-FITC	320	$(5.6 \pm 0.1) \times 10^6$
	32	$(5.9 \pm 0.5) \times 10^6$
	3.2	$(14.0 \pm 0.3) \times 10^6$
WGA-RITC	925	$(4.7 \pm 0.1) \times 10^6$
	92.5	$(11.0 \pm 0.1) \times 10^6$
	9.25	$(12.0 \pm 0.2) \times 10^6$

Lorsque l'on compare l'affinité du monosaccharide (Me- α -D-man) [106] pour la lectine Con A, on s'aperçoit que les constantes d'affinité de GD et GNP sont de 100 à 10000 fois plus grandes. La plus grande augmentation est obtenue pour le complexe GNP-Con A. La constante d'affinité K_a de Au-G0-man (10 mannoses) pour Con A est d'environ 100 plus grande que G0-man (4 mannose) et 10 fois plus grande que G2-man (16 mannose). Nos études montrent une augmentation de K_a avec la génération de dendrimères mais qui cesse d'augmenter à partir de la génération G1. Des résultats semblables ont été obtenus dans la littérature [24] par des tests d'inhibition de l'adhésion de Con A à la levure le mannan. Les résultats montrent une augmentation du potentiel d'inhibition des glycodendrimère de type mannose avec la génération PAMAM (G0-man, G1-man et G2-

man) comparé aux carbohydrates monovalentes (Me- α -D-man). Les valeurs d'IC₅₀ varient de 12.4, 4.1 et 3.1 μ M pour G0-man, G1-man et G2-man comparé à 924 μ M pour le Me- α -D-man.

Le potentiel d'inhibition des GD a aussi été calculé par unité de mannose. Le plus grand effet de valence a été obtenu avec le dendrimère ayant 8 mannoses (G1-man) où chaque résidu de mannose est 28 fois plus efficace que le monomère Me- α -D-man. Cependant, dans le cas des dendrimères ayant 4 mannoses (G0-man) et 16 mannoses (G2-man), chaque résidu de mannose est 18.8 fois plus efficace que le monomère Me- α -D-man. Donc le meilleur inhibiteur est le G1-man et le potentiel de G0-man est semblable au G2-man. Ceci est dû à l'encombrement stérique pour G2-man et un accès difficile aux sites de reconnaissance de Con A [24].

L'augmentation de l'affinité des carbohydrates multivalents pour des lectines peut être reliée à la formation des complexes lectine-carbohydrate, qui dépend du nombre de carbohydrates, de la flexibilité des molécules sur lesquelles ils sont greffés et de la distance entre les carbohydrates. La littérature montre que dans le cas où les carbohydrates et les récepteurs des lectines sont bivalents, des complexes unidimensionnels peuvent se former, [200, 201]. Dépendamment de la multivalence, la longueur de la molécule sur laquelle sont greffés les carbohydrates, il se peut que celle-ci s'attache à plusieurs sites de la même lectine. Dans ce cas on observerait un effet d'amplification dû à la multivalence. Il est aussi possible que la molécule se lie à plusieurs lectines ce qui implique la formation d'un réseau tridimensionnel et une

précipitation. Cette situation est fréquente puisque les lectines sont très souvent des tétramères (Con A) et elles présentent des sites de reconnaissance relativement éloignés (6.5 nm pour Con A) [2]. Les résultats pour la précipitation des lectines par les GNP, présentés dans le Chapitre 4, démontrent la formation d'un complexe avec un réseau tridimensionnel.

Dans le cas des analogues dimères de type mannose, K_a pour Con A est 2 à 5 fois plus grande comparée à Me- α -D-man, et cette valeur augmente avec l'espace entre les carbohydrates. La valeur théorique de n pour la liaison bivalente d'un carbohydrate à Con A est 1/2, soit deux carbohydrates pour une molécule de Con A. La valeur expérimentale de $n=0.54$ pour les analogues dimères de type mannose indique que des complexes bivalents avec la lectine sont formés car les carbohydrates divalents sont proches un de l'autre [105].

Les analogues tétramères de trimannose montrent un K_a pour Con A de 35 fois plus grand comparé à des analogues trimères de type mannose. L'augmentation de la constante d'affinité pour les tétramères de trimannoses est due à la formation de complexes tridimensionnels. La valeur expérimentale de $n=0.25$ est compatible avec la valeur théorique d'un carbohydrate quadrivalent qui se lie à quatre lectines. Ceci indique que chacun des quatre carbohydrates de trimannoside se lie avec un Con A pour former un arrangement tridimensionnel. La littérature montre aussi que l'augmentation d'affinité de trimannoside est due à des interactions supplémentaires des carbohydrates avec des sites secondaires de reconnaissance de la lectine Con A. Par exemple, le résidu mannose α

(1,6) de trisaccharides interagit avec le site pour le monosaccharide et le résidu mannose α (1,3) avec le site secondaire de Con A [8], tel que représenté sur la Figure 5.10.

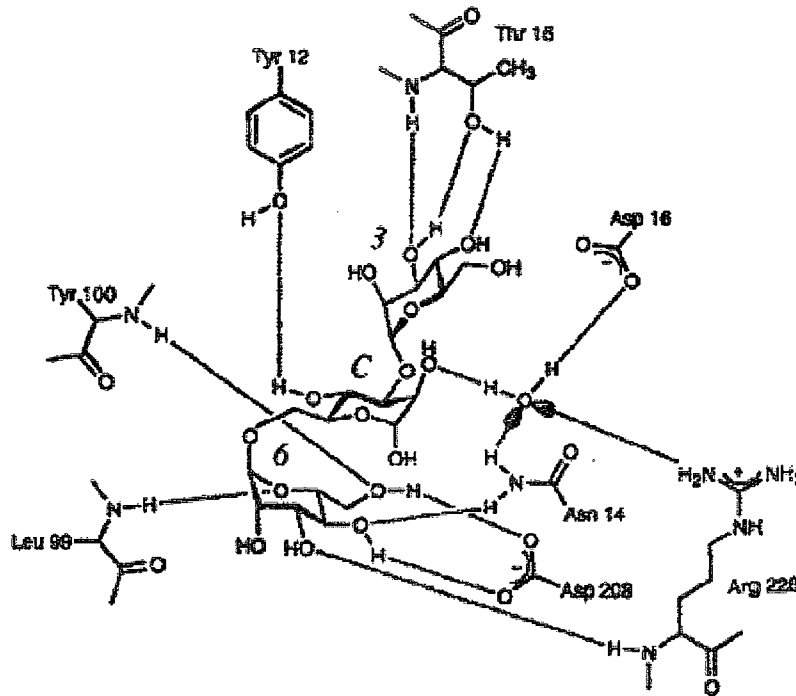


Figure 5.10: Structure cristallographique pour le complexe trimannoside-Con A. Le groupement central mannose est marqué avec C, le résidu mannose α (1,3) avec 3 et le résidu mannose α (1,6) avec 6 [8].

Dans le cas de pentamannoside, l'affinité pour Con A est encore plus grande comparée aux trimannosides. La structure obtenue par la diffraction de rayons X montre des interactions supplémentaires avec les unités d'acides aminées comparativement à ce qui a été observé pour les mono et trisaccharides sur la Figure 5.11 [220].

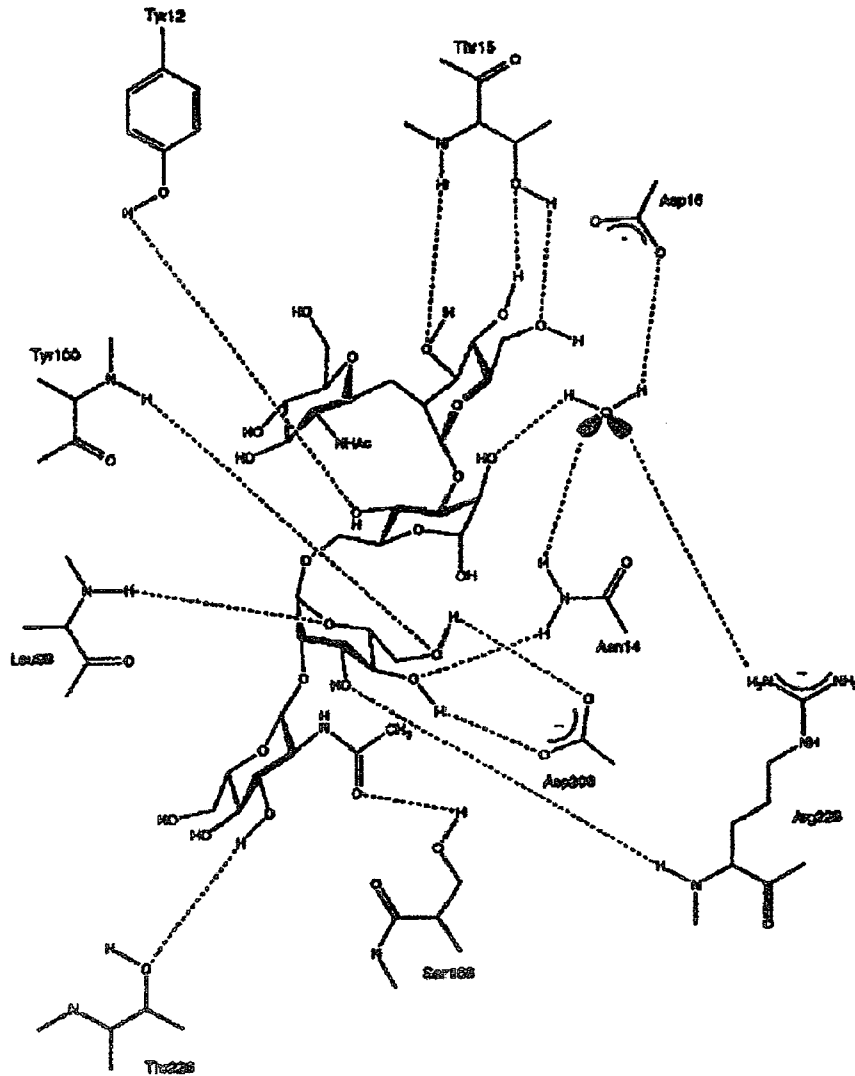


Figure 5.11: Structure cristallographique pour le complexe pentamannoside-Con A [220].

Les valeurs de K_a entre Con A et les GNP, qui sont de 10 à 100 fois plus grandes que dans le cas des GD, sont reliées à la multivalence, à la structure de GNP ainsi qu'à l'espacement entre les carbohydrates. L'adsorption de PAMAM sur les nanoparticules d'or suivie du greffage de carbohydrates a comme résultat l'augmentation de la

multivalence. L'augmentation de l'affinité des GNP est aussi reliée à la structure de GNP et à l'accessibilité des carbohydrates en surface pour les sites secondaires de lectine. Les GNP, ayant un groupement hydrophobe dans la position anomérique du carbohydrate, ont probablement une structure rigide et compacte avec des poches hydrophobes qui semblent favoriser des interactions secondaires avec d'autres sites de la lectine Con A. Ces interactions secondaires jouent un rôle dans l'augmentation de l'affinité des GNP pour Con A et dans la stabilité du complexe Con A-GNP.

Donc l'effet de multivalence obtenue par la synthèse de GNP a été observé par les mesures des constantes d'affinités. Cependant, les constantes d'affinité des Au-G1-man et Au-G2-man pour Con A sont presque identiques et ne sont que 10 fois supérieures à celle de Au-G0-man. Ces résultats montrent que le potentiel de GNP pour la reconnaissance des protéines est limité à la génération G1 car la génération G2 présente plus d'encombrement stérique sur les branches de PAMAM que les autres générations.

5.4. Stœchiométrie du complexe Con A-GNP

Les mesures de fluorescence permettent le calcul de la stœchiométrie du complexe (RL) formé entre les GNP (L) et la lectine Con A (R). Dans le modèle utilisé, chaque récepteur de lectine peut contenir n sites de liaison du ligand. Le taux de saturation des sites équivalents $Y = nL_f R_T$, où R_T est la concentration totale en récepteur et L_f la concentration

du ligand fixé (RL). Pour une fixation sur un seul site de la lectine Con A l'équation de Scatchard [221] (5.4) est utilisée.

$$Y = \frac{RL}{R_T} = \frac{RL}{[R + RL]} = \frac{1}{\left[1 + \frac{R}{RL}\right]} \quad (5.4)$$

$$Y = \frac{1}{(1 + K_d / L)} = \frac{L}{L + K_d} \quad (5.5)$$

En réarrangeant l'équation (5.5) on obtient, $Y + \frac{Y}{L} K_d = 1$ donc: $\frac{Y}{L} = \frac{(1 - Y)}{K_d}$ (5.6)

où $K_d = 1/K_a$

Les données obtenues pour le titrage d'une solution de lectine Con A-FITC, de concentration de 320 nM, avec des solutions de concentration variable de GNP (L) (Au-G0-man, Au-G1-man, Au-G0-man) allant de 0.011 à 2.2 μ M (après le mélange) dans le PBS à une température de 23°C ont été analysées selon la méthode de Scatchard en représentant dans l'équation (5.6) Y/L en fonction de Y. La Figure 5.12 montre des relations linéaires où les pentes des droites sont égales à $-1/K_d = K_a$. La valeur sur l'abscisse correspond à n et est égale à 1 GNP par chacune sous-unité identique du tétramère Con A. Les études par cristallographie rayons-X [213] montrent que les valeurs de n près de 1 correspondent à un récepteur de lectine pour un mannose monovalent.

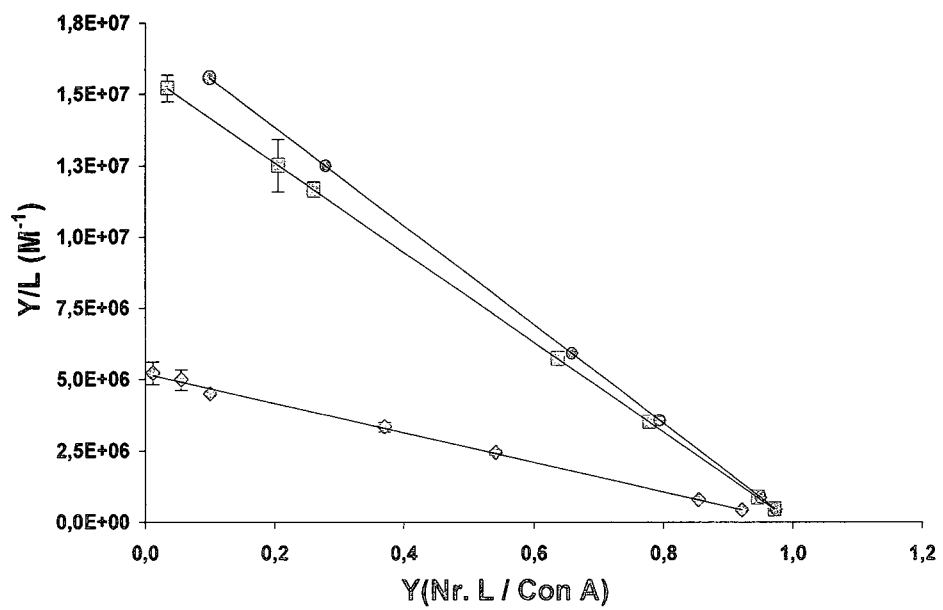


Figure 5.12: Courbes de Scatchard pour déterminer le nombre (n) de GNP (L): (◇) Au-G0-man; (◻) Au-G1-man; (⊙) Au-G2-man par Con A (320 nM).

5.5. Paramètres thermodynamiques pour le complexe Con A-GNP.

5.5.1. Introduction

La variation de la constante d'affinité K_a en fonction de la température permet de déduire les paramètres thermodynamiques à l'équilibre: enthalpie (ΔH^0), entropie (ΔS^0) et l'énergie libre de Gibbs (ΔG^0). L'enthalpie est calculée en utilisant l'équation de Vant Hoff (5.7):

$$\ln\left(\frac{Ka_2}{Ka_1}\right) = -\frac{\Delta H^0}{R}\left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right) \quad (5.7)$$

où K_{a1} et K_{a2} , correspondent aux constantes d'affinité pour les températures T_1 et T_2 .

La constante d'affinité K_a varie en fonction de l'énergie libre de Gibbs (ΔG^0), qui est représentée par l'Équation 5.8. Plus le ΔG^0 est négatif, plus l'affinité du carbohydrate pour la protéine est forte.

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_a \quad (5.8)$$

où T est la température (K) et $R = 8.31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

ΔG^0 , dépend de l'enthalpie ΔH^0 et de l'entropie ΔS^0 , selon l'Équation 5.9.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (5.9)$$

Les valeurs des paramètres thermodynamiques dépendent de plusieurs facteurs. La contribution enthalpique est liée aux interactions entre le ligand et la protéine et aussi

aux interactions avec le solvant. Ces interactions comprennent la formation de liaisons hydrogène et des interactions de type van der Waals. Une enthalpie favorable demande une bonne orientation des ligands dans le site de fixation. Les protéines et les ligands ont des groupes polaires et lors de la formation du complexe, l'eau d'hydratation peut-être perdue, le système devient alors moins stable et l'enthalpie sera plus positive.

L'entropie est reliée au degré de désordre lors de l'interaction protéine-ligand et c'est la somme de diverses contributions: translation (ΔS_{trans}), rotation (ΔS_{rot}), conformation (ΔS_{conf}), et l'eau d'hydratation ($\Delta S_{\text{H}_2\text{O}}$), (Équation 5.10) [25]. La dernière contribution est principalement due aux interactions hydrophobes. Ceci mène à un relargage des molécules d'eau solvatant les réactifs et à une augmentation de l'entropie ce qui favorise la formation du complexe.

$$\Delta S = \Delta S_{\text{trans}} + \Delta S_{\text{rot}} + \Delta S_{\text{con}} + \Delta S_{\text{H}_2\text{O}} \quad (5.10)$$

5.5.2. Résultats et discussion

Afin de calculer les paramètres thermodynamiques pour le complexe entre Con A-FITC et les GNP de type mannose, les constantes d'affinités ont été aussi mesurées à 23, 25, 30 et 35°C. On note que la constante d'affinité augmente avec la génération de GNP (Au-G0-man, Au-G1-man et Au-G2-man). À partir des valeurs de K_a à différentes températures, des courbes de van't Hoff (Figures 5.13) ont été tracées, soit $\ln(K_a)$ en fonction de $1/T$. Les valeurs des pentes de ces courbes correspondent à $(-\Delta H^0)/R$ et les

valeurs de l'ordonnée à l'origine à $(\Delta S^0)/R$. Les paramètres thermodynamiques obtenus sont présentés dans le Tableau 5.4.

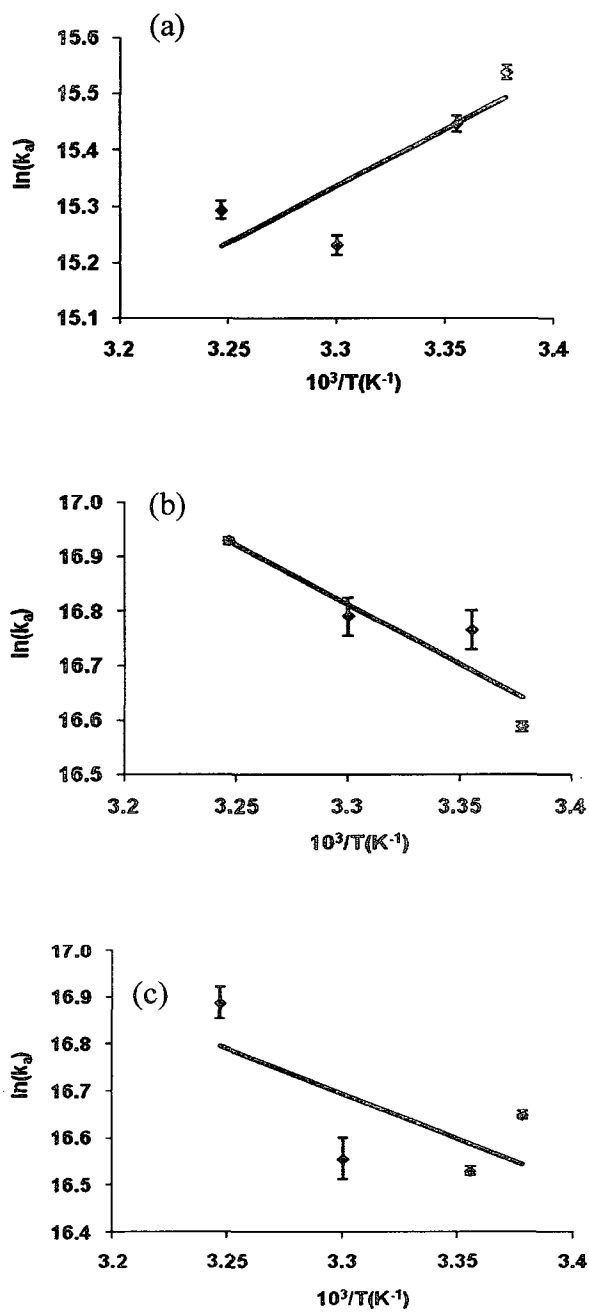


Figure 5.13: Variation de $\ln(K_a)$ en fonction de $1/T$ pour le complexe formé entre Con A et: (a) Au-G0-man; (b) Au-G1-man; (c) Au-G2-man.

La Figure 5.13a montre qu'il y a une diminution presque linéaire de K_a avec la température pour le complexe formé entre Con A-FITC et Au-G0-man. Celle-ci démontre qu'il n'y a pas des grands changements de conformation de la lectine dans le domaine étudié. Cependant, la constante d'affinité augmente avec la température pour Au-G1-man, tandis que pour Au-G2-man le comportement est plus complexe (Figure 5.13 b et 5.13c). Il se peut que dans le cas de Au-G1-man et Au-G2-man, la variation de K_a avec la température soit reliée à une solvation/désolvation différente pour chaque génération car les générations G1 et G2 de PAMAM adsorbées sur les GNP sont des molécules plus grandes que la génération G0 et ils forment plus des cavités intérieures où les molécules d'eau peuvent être englobées.

Tableau 5.4: Paramètres thermodynamiques pour le complexe formé entre Con A-FITC et GNP (Au-G0-man, Au-G1-man et Au-G2-man) à 23°C.

	ΔH^0 (kJmol ⁻¹)	ΔS^0 (Jmol ⁻¹ K ⁻¹)	$T\Delta S^0$ (kJmol ⁻¹)	ΔG^0 (kJmol ⁻¹)
Au-G0-man	-16.7 ± 0.9	72 ± 3	21.4 ± 0.8	-38.1 ± 0.6
Au-G1-man	18.2 ± 0.6	200 ± 2	59.1 ± 0.3	-40.9 ± 0.3
Au-G2-man	15.9 ± 1.4	191 ± 4	56.6 ± 0.6	-40.7 ± 0.6

L'énergie libre (ΔG^0) qui varie avec la génération PAMAM entre -38.1 à -40.7 kJmol⁻¹ pour le complexe entre Con A et les GNP (Au-G0-man, Au-G1-man Au-G2-man), a augmenté par rapport au complexe entre Con A et les GD (G0-man, G1-man, G2-man) qui varie avec la génération PAMAM de -22.6 à -31.8 kJmol⁻¹. Cette augmentation de l'énergie libre (ΔG^0) dans le cas de GNP par rapport aux GD est due à la contribution favorable de l'entropie et à la faible contribution de l'enthalpie de -16.7, 18.2 et 15.9 kJ mol⁻¹ pour Au-G0-man, Au-G1-man Au-G2-man. On constate que dans le cas de Au-G0-man, la valeur de (ΔH^0) de -16.7 kJ mol⁻¹ est 2 fois plus petite que ΔH^0 d'une interaction monovalente entre Con A et Me- α -D-man [105]. Ces résultats mettent en évidence que les mannoses de GNP ne se lient pas à plusieurs récepteurs sur la même molécule de Con A.

D'après l'équation de van't Hoff (Équation 5.7), une augmentation de K_a avec la température implique des valeurs positives de (ΔH^0). Les valeurs de l'enthalpie pour le complexe entre Con A et les GNP (Au-G1-man et Au-G2-man), ne sont du même ordre de grandeur que celle obtenue pour le complexe Con A-Au-G0-man. Dans le cas de ces deux générations, la contribution enthalpique est défavorable comparée à la contribution enthalpique favorable pour Au-G0-man. Ces valeurs positives d'enthalpie, pour les générations G1 et G2 de GNP, correspondent à des interactions moins favorables ou bien à des interactions hydrophobes autres qu'avec le site de liaison et elles sont probablement associées aux contraintes géométriques des GNP.

Cette étude montre qu'il n'y a pas de relation proportionnelle entre ΔH^0 et le nombre de mannose des GNP comme il n'y en a pas non plus dans le cas de GD [106]. Par exemple, G2-man contient 16 mannoses et la valeur (ΔH^0) correspond à seulement deux fois celle d'une interaction monovalente. Cependant, dans le cas des analogues divalents de mannose, les valeurs de ΔH^0 de -71 kJ mol^{-1} (approximativement deux fois l'enthalpie d'une interaction monovalente de Me- α -D-man) et de -222 kJmol^{-1} pour le tétra-trimannose (4 fois l'enthalpie d'une interaction monovalente de trimannose) montre que l'enthalpie augmente proportionnellement avec la valence de mannose [215].

Les valeurs de l'entropie ($T\Delta S^0$) pour le complexe entre Con A et les GNP, varie avec la génération de GNP de 21.4, 59.1 et 56.6 kJ mol^{-1} et ils sont du même ordre de grandeur pour Au-G1-man et Au-G2-man dans le complexe avec Con A. On observe que l'entropie la plus favorable de 59.1 kJ mol^{-1} est pour Au-G1-man. L'interaction est, dans le cas des trois générations, principalement dirigée par l'entropie et la valeur de $T\Delta S^0$ est plus grande que celle de ΔH^0 .

Comme représenté sur la Figure 5.14 les molécules d'eau présentes en solution interagissent avec la lectine et les GNP et elles sont éliminées de la sphère de solvation des carbohydrates et de Con A après la formation du complexe. Cet effet rend le changement d'entropie de solvation favorable lors de l'interaction Con A-GNP, car il y a une augmentation de l'entropie des molécules d'eau.

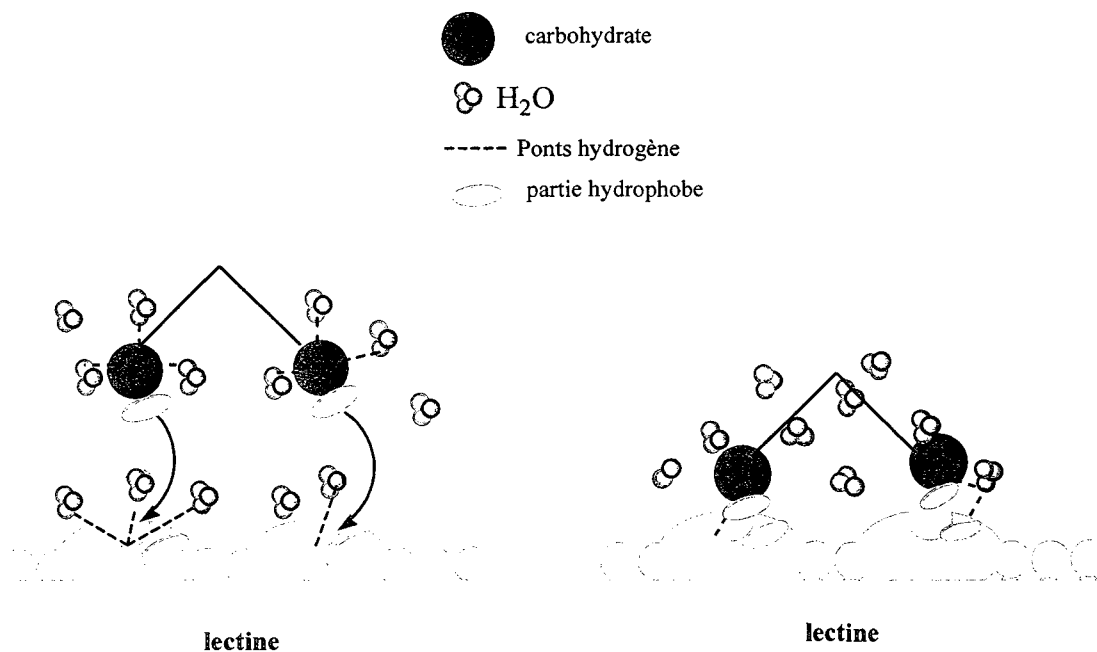


Figure 5.14: Désolvatation de carbohydrates et lectines, formation des liaisons hydrogènes et interactions hydrophobes après la fixation des carbohydrates dans le site de lectine.

Les paramètres thermodynamiques obtenus par ITC [222] sont présentés dans la Figure 5.15 qui montre que les interactions carbohydrates-protéines sont caractérisées par des liaisons hydrogène, des interactions hydrophobes et des changements de conformations. La formation de fortes liaisons hydrogène et les changements de conformations lors de la formation du complexe sont caractérisés par une contribution entropique défavorable et une contribution enthalpique favorable. Il y a, par contre, une contribution entropique favorable et une contribution enthalpique défavorable quand les interactions hydrophobes

et la libération des molécules d'eau de la sphère de solvatation des carbohydrates sont importantes et c'est ce qui a été observé pour les GNP.

Les groupements phényles des carbohydrates greffés à la surface de GNP jouent dans les interactions de type hydrophobes entre le ligand et la lectine. La littérature suggère que le groupement phényle dans le cas de $\text{NO}_2\text{-}\alpha\text{-D-man}$ est responsable d'une augmentation de l'affinité de 10 fois comparée au $\text{Me-}\alpha\text{-D-man}$ [24].

L'entropie favorable dans le cas du complexe GNP-Con A met en évidence un arrangement des carbohydrates plus compact que dans le cas de GD. Les groupements phényles des carbohydrates de GNP sont en surface près l'un de l'autre et leurs arrangements compacts favorisent plus des interactions de type hydrophobe avec les sites secondaires de Con A que dans le cas de GD.

Les paramètres thermodynamiques obtenus par ITC [222] pour les types d'interactions protéines-ligands sont représentés dans la Figure 5.15. La première situation 5.15a correspond aux interactions par liaisons hydrogène et interactions hydrophobes car le ΔH^0 et $T\Delta S^0$ sont favorables. Dans la deuxième situation 5.15b les contributions hydrophobes sont prépondérantes car ΔH^0 est défavorable et $T\Delta S^0$ est favorable. La troisième situation 5.15c correspond aux changements de conformation car le ΔH^0 est très favorable est $T\Delta S^0$ défavorable.

Par analogie avec les résultats présentés dans la Figure 5.15, on suggère qu'il y a moins de changements de conformation dans le complexe Con A-GNP que dans le cas de Con A-GD car les résultats thermodynamiques obtenus pour les GNP (entropie positive) montrent une situation semblable à celle présentée dans la Figure 5.15a et b. Cependant, l'entropie négative pour le GD (G2-man) [106], peut être reliée à des changements de conformation pour le complexe Con A-GD.

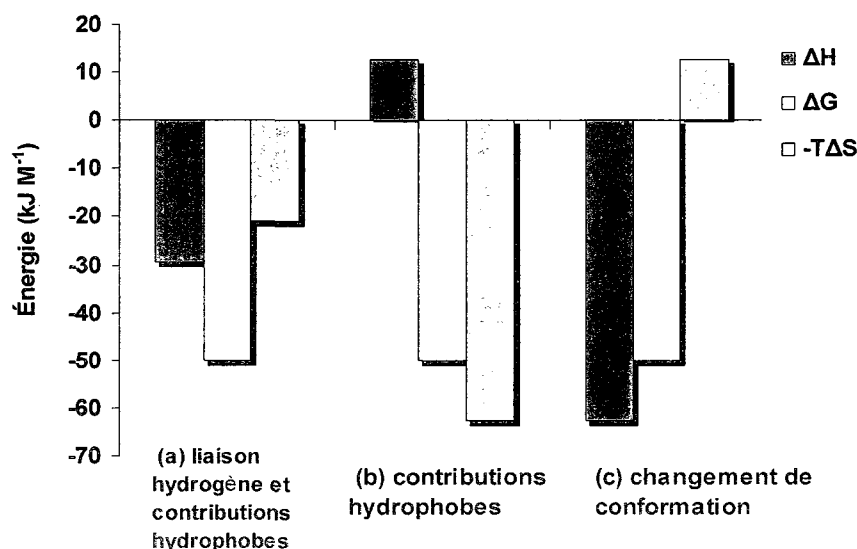


Figure 5.15: Paramètres thermodynamiques et différents types d'interactions entre protéines et ligands [222].

Des contributions entropiques favorables mais faibles sont observées lors de l'interaction entre Con A et Me- α -Glc [211], avec un $T\Delta S^0$ de 1.2 kJ mol⁻¹ ou bien entre la lectine PA IIL et Me- α -D-man où $T\Delta S^0$ est de 5.9 kJ mol⁻¹ [26]. Pour ce dernier exemple l'énergie libre ΔG^0 est de -23.7 kJ mol⁻¹ et l'enthalpie ΔH^0 de -17.8 kJ mol⁻¹. Lors de l'interaction entre Me- α -fuc et la lectine PA IIL, l'énergie libre ΔG^0 est de -36.4 kJ/mol, l'enthalpie

ΔH^0 est de $-41.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ et cette fois la contribution entropique est défavorable $T\Delta S^0$ est de -4.9 kJ mol^{-1} .

Dans le cas de GD, les paramètres thermodynamiques varient différemment des GNP (Figure 5.16). La littérature [106] rapporte des valeurs de ΔG^0 obtenues par des mesures ITC de $-21.75 \text{ kJ mol}^{-1}$ pour Me- α -man et de $-25.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ pour les GD (G2-man). Cette énergie libre pour Me- α -man et G2-man est compensée par une contribution favorable de l'enthalpie ΔH^0 de -33 et $-63.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ et une contribution entropique défavorable $T\Delta S^0$ de -10.8 et -38 kJ mol^{-1} . Les structures flexibles de GD favorisent la formation des liens hydrogène avec les molécules d'eau, en contribuant à stabiliser le système mais ceci implique une $T\Delta S^0$ défavorable.

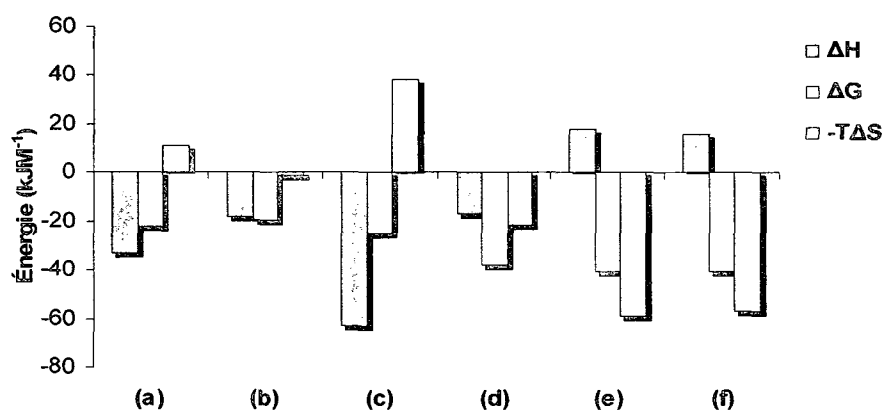


Figure 5.16: Paramètres thermodynamiques mesurés pour l'interaction entre Con A et (a) Me- α -man [106]; (b) Me- α -Glc [211]; (c) G2-man [106]; (d) Au-G0-man; (e) Au-G1-man; (f) Au-G2-man.

Les mesures effectuées pour cette thèse montrent une augmentation de la constante d'affinité et une évolution différente des paramètres thermodynamiques pour les GNP comparées aux GD [106]. Le changement d'énergie de Gibbs lors de la formation du complexe est donc plus négatif que dans le cas des GD. Cette énergie libre négative est constituée d'un ΔH^0 de faible valeur négative (favorable) ou positive (défavorable) et un ΔS^0 positif (favorable).

La différence entre les GNP et les GD est de nature entropique. Comme cela a été mentionné ci-dessus, l'interaction dans le cas des GNP est dominée par un changement d'entropie favorable tandis que dans le cas des GD le changement entropique est défavorable et plus faible que le changement enthalpique favorable. L'origine de cette différence est probablement liée au fait que les dendrimères adsorbés sur l'or adoptent une structure plus rigide que dans le cas des GD. Dans une solution aqueuse telle que le PBS, il est difficile pour ces dendrimères d'adopter une configuration dans laquelle les interactions entre les groupes hydrophobiques, tels que les phényles, et les molécules d'eau sont minimisées. Ceci est entropiquement peu favorable. Dans le cas des GD, leur plus grande flexibilité va permettre une meilleure minimisation de ce type d'interactions et cela est entropiquement plus favorable. Lors de la formation du complexe Con A-GNP, en plus de l'interaction du mannose avec le récepteur, le groupement phényle aura des interactions hydrophobes avec des groupements hydrophobes à l'intérieur du récepteur. Ceci va libérer des molécules d'eau et causer un changement entropique important et favorable. Dans le cas des GD, des changements similaires vont se produire cependant le changement sera moins important car les GD ont au départ une structure moins rigide.

On note que les entropies d'interactions pour les GNP (Au-G1-man et Au-G2-man) sont similaires et plus importantes que pour Au-G0-man. Les enthalpies sont défavorables et également similaires. Ce comportement est de type hydrophobique et implique la désolvatation des GNP et de Con A ainsi que des interactions secondaires (autre que le récepteur principal) de Con A. La similarité des paramètres thermodynamiques de ces deux GNP suggère que leurs interactions avec Con A sont peut-être déterminées par la surface de contact entre la GNP et Con A. Ce processus est probablement déterminé par la réorganisation de Con A puisque G1 et G2 adsorbés sur l'or perdent leur flexibilité. De plus, les dimensions des G1 et G2 sont similaires à la taille d'une Con A et il est raisonnable de croire que les surfaces de contact seront similaires pour les deux GNP avec Con A.

5.6. Cinétique de la formation du complexe Con A-GNP

5.6.1. Introduction

La détermination de constantes cinétiques de l'association entre les protéines et ligands permet d'étudier l'interaction directe des molécules biologiques dans l'environnement où elles sont actives. La fluorescence est utilisée lors de cette étude car elle est une méthode rapide et nécessite de faibles concentrations en ligands et récepteurs.

La cinétique de réaction est caractérisée par deux phénomènes: le phénomène de transport physique ou diffusion et le phénomène chimique de transformation ou réaction. Dans la théorie du complexe activé, lors de la réaction, un intermédiaire entre les réactifs et produits est formé.

Le processus d'association protéine-ligand est formé de deux étapes: la formation du complexe et sa transformation. Dans le cas d'une association bimoléculaire entre le ligand [L] et la protéine [R] (5.11), tel que celui entre Au-G0 et Con A, le premier changement d'intensité de la fluorescence est lié aux constantes cinétiques pour l'association (k_{+1}) et dissociation (k_{-1}).



5.6.2. Résultats et discussion

Les constantes d'affinité et les paramètres thermodynamiques (à l'équilibre), déterminés dans la section précédente indiquent une complexation entre Con A et GNP de type mannose dominée par un changement entropique important que l'on associe à un effet hydrophobique. Cependant, ces valeurs thermodynamiques ne fournissent aucune information sur la vitesse à laquelle la réaction a lieu. Pour obtenir cette constante de vitesse, la cinétique de complexation entre Con A-FITC et GNP de type mannose a été suivie à l'aide de mesures de fluorescence. Il faut préciser que, dans la littérature, aucune étude de la cinétique de la complexation des dendrimères ou GNP avec les lectines n'a été rapportée au meilleur de nos connaissances.

Pour ces mesures, Con A-FITC dans une solution de PBS (0.48 μM) a été mélangée rapidement avec une solution de GNP de type mannose également dans le PBS (1.67 μM) (Au-G0-man, Au-G1-man et Au-G2-man). La variation de la fluorescence à 520 nm a immédiatement été suivie pendant 180 s. Trois essais ont été effectués. Dans ce domaine de concentration, aucune précipitation lors de la formation du complexe n'est observée.

Les mesures cinétiques ont été effectuées à différentes températures (24, 33 et 37°C). La constante de vitesse pour la formation du complexe Con A-GNP a été calculée à partir de la variation de fluorescence $\Delta F = (F_0 - F)$ en fonction du temps (t) où F_0 et F correspondent respectivement à la fluorescence initiale ou en présence de GNP à un temps (t), selon un modèle de réaction du deuxième ordre décrit ci-dessous.

Dans la Figure 5.17, il est possible de constater que la fluorescence diminue avec le temps pour toutes les générations. Après le lissage des courbes sur la Figures 5.18, selon l'équation 5.12 [223] pour les premières 60 s, la constante de vitesse de la formation du complexe (k_v , $M^{-1} s^{-1}$) a été calculée pour chaque génération de GNP. La régression linéaire de ces courbes concorde avec une réaction biomoléculaire avec un ordre global de réaction de deux.

$$A = k_v t \quad (5.12)$$

où,

$$A = \frac{1}{a_0 - b_0} \ln \frac{b_0 a}{a_0 b}$$

a_0 = concentration initiale de Con A-FITC

b_0 = concentration initiale de GNP

a = concentration de Con A-FITC au temps t

b = concentration de GNP au temps t

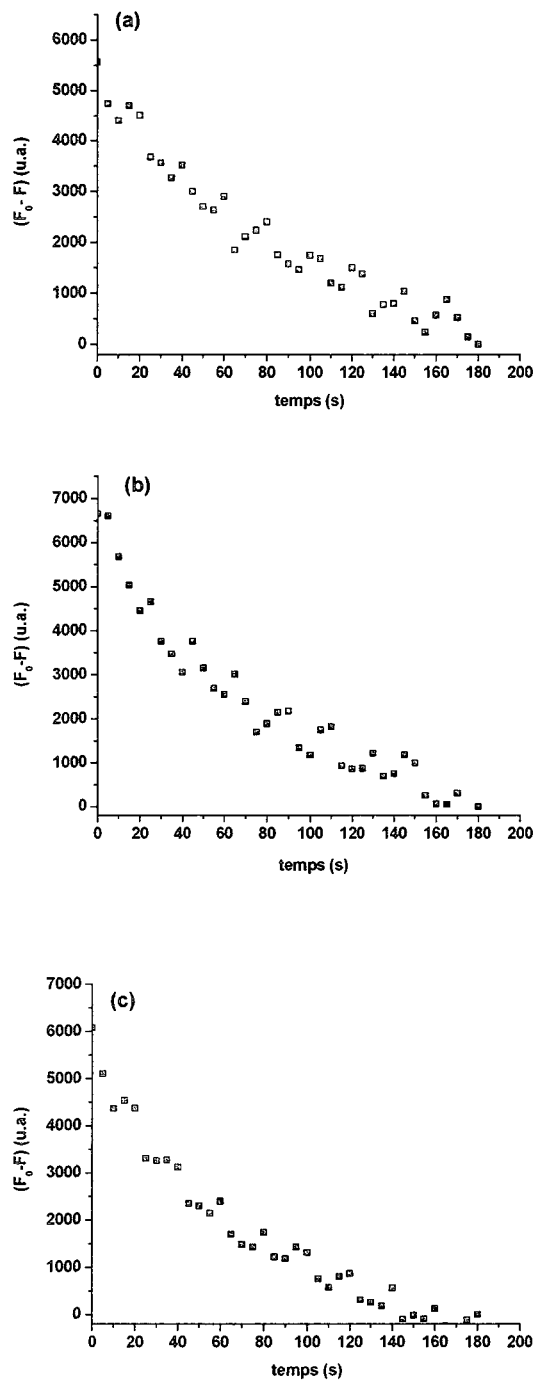


Figure 5.17: Variation de la fluorescence ($F_0 - F$) en fonction du temps (t) à 24°C pour le complexe formé entre Con A-FITC et GNP: (a) Au-G0-man; (b) Au-G1-man; (c) Au-G2-man.

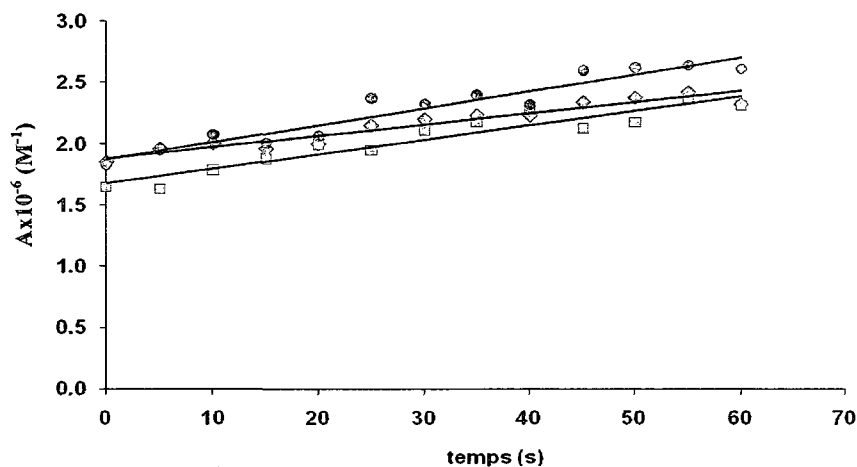


Figure 5.18: Variation de A en fonction du temps (s) à 24°C pour le complexe formé entre Con A-FITC et GNP: (◇) Au-G0-man; (◻) Au-G1-man; (◉) Au-G2-man.

À partir de l'équation 5.13, les valeurs d'ordonnée à l'origine et la pente pour les droites obtenues dans la Figure 5.19, fournissent les valeurs d'enthalpie et d'entropie d'activation. L'énergie d'activation pour la réaction d'association entre Con A et GNP a été calculée à partir de l'équation 5.14. L'énergie libre d'activation a été calculée en utilisant l'équation 5.15.

$$\ln\left(\frac{k_v}{T}\right) = -\frac{\Delta H^*}{RT} + \frac{\Delta S^*}{R} + \ln \frac{k}{h} \quad (5.13)$$

$$\Delta H^* = E_a - RT \quad (5.14)$$

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \quad (5.15)$$

où,

k_v est la constante de vitesse; A est le facteur pré-exponentiel; E_A est l'énergie d'activation; R est la constante des gaz parfaits; T est la température; k est la constante de Boltzmann; h est la constante de Planck; ΔH^* est l'enthalpie d'activation; ΔS^* est l'entropie d'activation; ΔG^* est l'énergie libre d'activation.

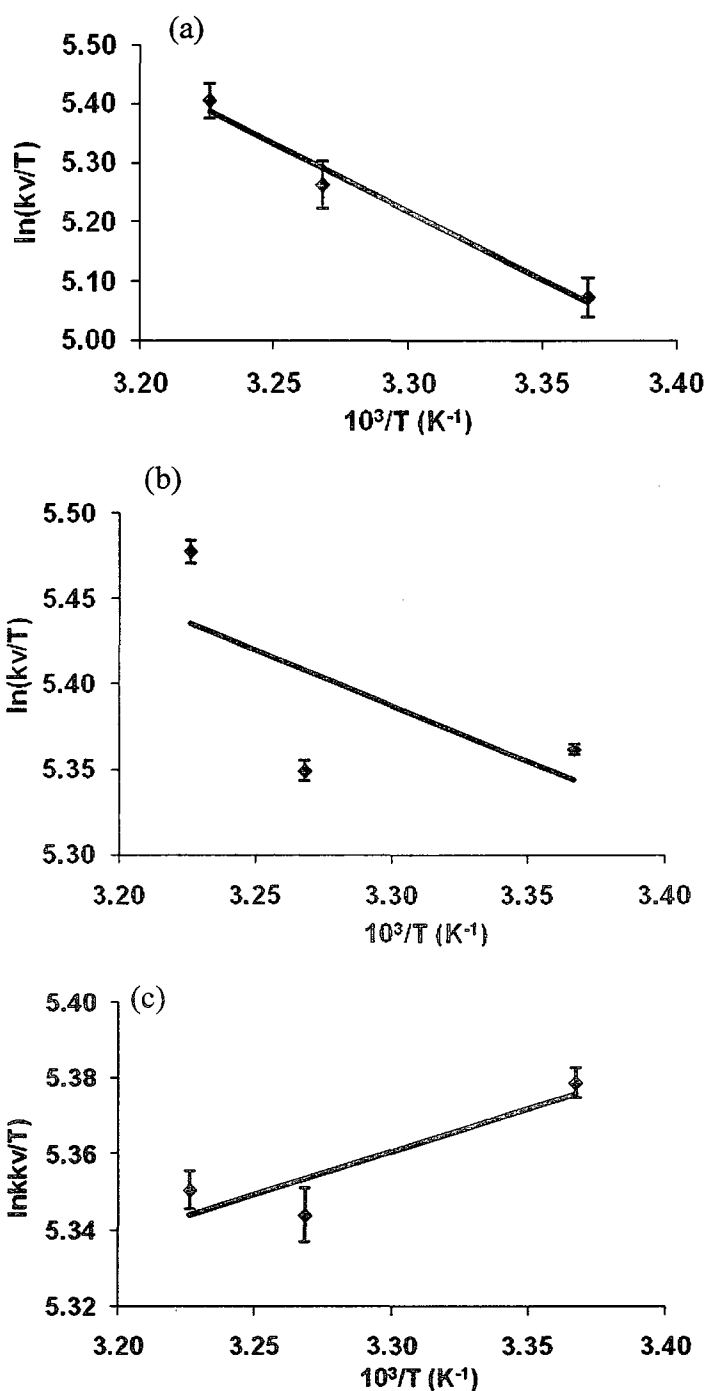


Figure 5.19: Variation de $\ln(k_v/T)$ en fonction de $1/T$ pour le complexe formé entre Con A-FITC et GNP: (a) Au-G0-man; (b) Au-G1-man; (c) Au-G2-man.

La littérature [108] montre une réaction biomoléculaire du premier ordre entre la lectine Con A et des carbohydrates car une variation linéaire de $\log(\Delta F)$ en fonction du temps est obtenue. Les paramètres cinétiques pour les complexes Con A-carbohydrates [108] reflètent la possibilité de formation rapide d'une intermédiaire qui change de structure pour former le complexe final. Les vitesses d'association sont semblables pour plusieurs complexes Con A-carbohydrates et elles sont inférieures aux vitesses contrôlées par diffusion [109]. Un autre exemple d'interactions protéine-carbohydrate, ayant une constante de vitesse d'association lente est celui des complexes l'agglutinine de germe de blé-carbohydrates [224].

Dans la littérature, la valeur de k_v pour l'association entre Con A et p-NO₂- α -D-man est de $5.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [107]. Cette valeur est de quatre ordres de grandeur plus basse que ce qui est prédit pour une réaction contrôlée par la diffusion et celle-ci est donc due aux contraintes stériques [108]. Ces faibles vitesses d'association pourraient être reliées au changement de conformation très rapide d'un des réactifs tel que seulement des espèces mineures réagiraient. Cependant, les études cinétiques entre Me-Umb-man et Con A [225] dans des conditions très diluées ont exclu la possibilité que seulement les espèces mineures de la protéine ou du ligand soient impliquées. Pour ce cas, les vitesses lentes d'association entre ces carbohydrates et Con A sont reliées à une étape de réaction ayant une énergie d'activation élevée.

Les résultats cinétiques obtenus pour la formation du complexe activé entre GNP de type mannose (Au-G0-man, Au-G1-man et Au-G2-man) et Con A sont présentés dans le

Tableau 5.5. La linéarité des courbes dans la Figure 5.18, correspond à une réaction biomoléculaire d'association d'ordre deux entre Con A et les GNP. Les constantes de vitesse pour le complexe Con A-GNP sont presque identiques avec la génération de GNP de 4.7×10^4 , 6.3×10^4 et 6.4×10^4 ($M^{-1}s^{-1}$) à 24°C. Ces résultats sont semblables au carbohydrate p-NO₂- α -D-man [107] et ils sont environ quatre ordres de grandeurs plus lentes que les constantes de vitesse contrôlées par diffusion.

Tableau 5.5: Paramètres cinétiques pour le complexe formé entre Con A et les GNP (Au-G0-man, Au-G1-man, Au-G2-man) à 24°C.

	k_v ($10^4 \times M^{-1}s^{-1}$)	ΔH^\ddagger (kJmol ⁻¹)	E_A (kJmol ⁻¹)	ΔS^\ddagger (Jmol ⁻¹ K ⁻¹)	$T\Delta S^\ddagger$ (kJmol ⁻¹)	ΔG^\ddagger (kJmol ⁻¹)
Au-G0-man	4.7 ± 0.2	19.0 ± 0.4	21.5 ± 0.5	-92 ± 1	-27.2 ± 0.1	46.2 ± 0.1
Au-G1-man	6.3 ± 0.1	5.4 ± 0.7	7.9 ± 0.9	-135 ± 2	-40.1 ± 0.1	45.5 ± 0.1
Au-G2-man	6.4 ± 0.7	-1.9 ± 0.2	0.6 ± 0.3	-159 ± 1	-47.3 ± 0.1	45.4 ± 0.1

Le profil cinétique de réaction pour le complexe formé entre Con A (R) et Au-G-man (L) est présenté dans la Figure 5.20. Plus la génération de GNP augmente, plus le facteur entropique ($T\Delta S^\ddagger$) qui représente la barrière énergétique pour la formation du complexe, devient presque l'unique contribution à ΔG^\ddagger . Comme cela a été mentionné précédemment, les GNP ont une structure rigide et les carbohydrates étant à la surface de la GNP sont bien solvatés. Ceci impose donc des contraintes stériques importantes pour la formation du complexe activé et la composante entropique est défavorable.

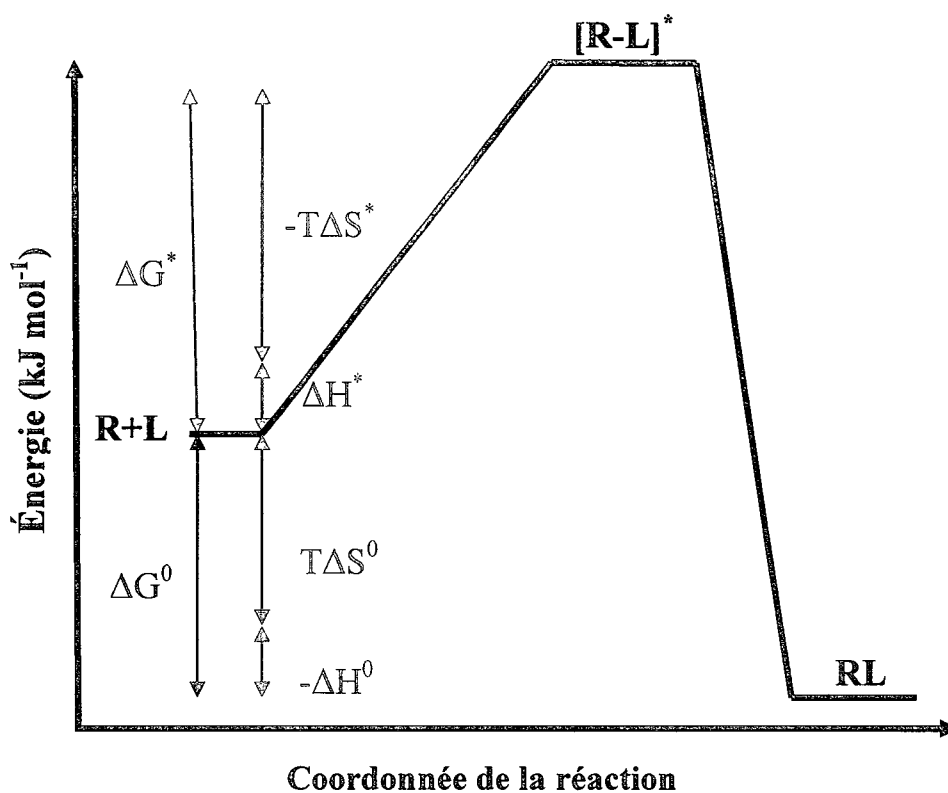


Figure 5.20: Profil cinétique de réaction pour le complexe Con A (R)-GNP (L).

Dans le cas de Au-G0-man, $\ln(k_v/T)$ augmente linéairement avec $1/T$ ($R^2=0.978$) dans la Figure 5.19 a. Ce résultat suggère qu'il n'y a pas de transformations majeures de la structure de Con A, de GNP et du complexe Con A-GNP dans le domaine des températures utilisées. Pour le complexe Con A-Au-G1-man, la relation entre $\ln(k_v/T)$ et $1/T$ n'est pas linéaire. La constante de vitesse demeure approximativement constante pour les premières deux températures et augmente pour la troisième ($R^2=0.443$), indiquant un changement dans le processus de formation du complexe activé. La structure des dendrimères G1 change possiblement et diminue les contraintes stériques associées à la formation du complexe activé lorsque la température est plus élevée. Cependant, pour le

complexe Con A-Au-G2-man, la constante de vitesse est du même ordre de grandeur que dans le cas de Au-G1-man et $\ln(k_v/T)$ est approximativement constant avec $1/T$ ($R^2=0.792$) car l'enthalpie d'activation est très faible.

Les GNP, Au-G0-man, qui ont une vitesse d'association avec Con A plus lente que les autres générations de GNP, ont besoin d'une d'énergie d'activation plus grande pour se positionner dans le site de la lectine, car la structure rigide des GNP est une contrainte stérique importante. Plus la génération de GNP augmente plus l'accès des mannoses aux sites de reconnaissance de la lectine Con A se produit avec un minimum d'énergie car les structures des générations G1 et G2 de GNP sont plus flexibles.

Une grande partie de l'énergie libre d'activation (ΔG^*) dans l'association de GNP (Au-G0-man, Au-G1-man, Au-G2-man) avec Con A de 46.2, 45.5, 45.4 kJmol^{-1} , est due à une contribution entropique élevée puisque la barrière enthalpique est petite. Ceci indique que l'interaction entre les GNP et le Con A est stériquement restreinte. La principale barrière pour le complexe GNP-Con A est l'entropie défavorable de l'association (ΔS^*) qui varie avec la génération de GNP (Au-G0-man, Au-G1-man, Au-G2-man) de -91.5, -134.9, -159.2 $\text{Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$. La littérature présente une valeur de l'entropie de l'association de -160 $\text{Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ entre l'agglutinine d'arachide et un monosaccharide [226]. Une telle valeur d'entropie de l'association a aussi été obtenue entre Con A et mannose [109]. Cette barrière dans l'interaction entre les GNP et Con A est due à l'énergie utilisée pour surmonter des contraintes stériques telles que les changements de conformation de la lectine et du complexe lectine-GNP. Après l'interaction de Con A avec le mannose, la

géométrie des accepteurs de Con A et des ions Ca^{2+} et Mn^{2+} (Figure 5.21), ne change pas [227]. Cependant, les changements de conformation sont susceptibles de se produire seulement au niveau structurel tertiaire et non pas au niveau secondaire de la protéine car aucun changement n'a pas été observé dans les spectres de dichroïsme circulaire de la lectine Con A [227].

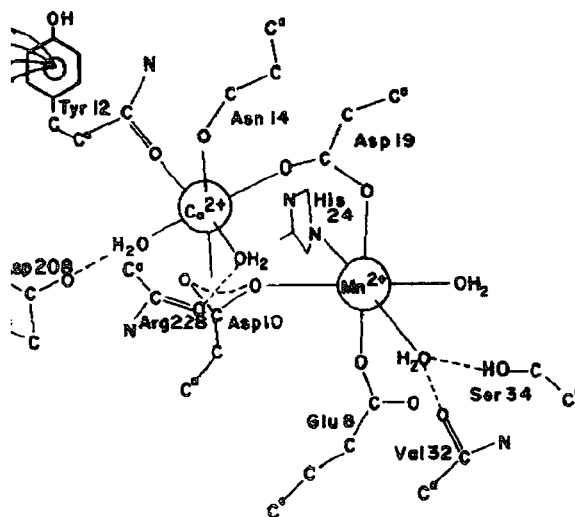


Figure 5.21: Interaction entre les ions Ca^{2+} et Mn^{2+} de Con A et Me- α -D-man [227].

5.7. Conclusion

La détermination des paramètres thermodynamiques et cinétiques a permis de déterminer l'origine de l'affinité des GNP pour les lectines. Le mécanisme de formation entre Con A et les GNP de type mannose est celui d'une réaction d'ordre deux où une GNP réagit avec une lectine. La plus grande affinité des GNP comparativement aux GD est due à un facteur entropique important. Ceci est relié à la diminution de flexibilité de PAMAM après l'adsorption sur l'or.

Plus spécifiquement, la synthèse des GNP implique que les dendrimères sont confinés à la surface des NP, ce les rend moins flexibles. Lorsque les GNP sont dans une solution de PBS, les groupes hydrophobes, que sont les phényles, entrent en contact avec les molécules d'eau et à cause de leur confinement, ils ne peuvent pas minimiser ce type d'interaction peu favorable. Les GNP sont donc dans un environnement peu favorable d'un point de vue entropique. Lors de la formation du complexe GNP-Con A, les groupes hydrophobes du GNP se trouvent dans un environnement plus hydrophobe. Il y a donc moins de contact avec les molécules d'eau. Ce complexe est donc entropiquement plus favorable. Les glycodendrimères sont plus flexibles ce qui leur permet d'adopter un arrangement qui minimise les interactions des régions hydrophobes et des molécules d'eau. Ceci résulte en des changements entropiques (ΔS^0) plus petits.

Chapitre 6. Applications des GNP en électrophorèse, pour la détection de *E. coli* et surfaces de silice recouvertes de carbohydrates pour la reconnaissance de lectines

6.1. Introduction

Les études effectuées dans les chapitres précédents ont démontré une bonne affinité et sélectivité des GNP pour les lectines. Toutefois, les échantillons biologiques sont complexes et composés d'un grand nombre de protéines qu'il faut isoler et ensuite marquer. Les méthodes conventionnelles pour la séparation et identification des protéines impliquent généralement une analyse par chromatographie, électrophorèse ou par spectrométrie de masse. Le marquage des protéines se fait généralement par des anticorps primaires et secondaires modifiés chimiquement avec des sondes fluorescentes ou des enzymes. Il sera donc intéressant de vérifier le potentiel des GNP pour la séparation des protéines et le marquage de ces dernières en utilisant des GNP fluorescentes. Les surfaces de silice recouvertes de carbohydrates seront aussi testées pour la reconnaissance de lectines. Cette étude permettra le développement de nouveaux substrats pour la chromatographie ou de biocapteurs.

Dans la première partie de ce chapitre, la séparation de lectines et leur détection en fonction de leur masse moléculaire en combinant la précipitation sélective des lectines par les GNP et leur identification après séparation par électrophorèse SDS-PAGE sont présentés. La masse moléculaire de GNP a été estimée par cette méthode.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, les GNP ont été utilisées pour le marquage d'une bactérie *E. coli* immobilisée à la surface d'une plaque de microscope recouverte de poly(lysine). Des images de microscopie confocale et MEB de la bactérie marquée par les GNP sont présentées.

La dernière partie de ce chapitre a pour but de vérifier la reconnaissance moléculaire des lectines par des nanoparticules de silice recouvertes de carbohydrates dont la synthèse est décrite au Chapitre 2. Des tests de précipitation et d'atténuation de la fluorescence des lectines sont présentés. L'adsorption sélective d'une lectine fluorescente à la surface d'une plaque de microscope recouverte de carbohydrates de type mannose a été examinée à l'aide de la microscopie confocale.

6.2. GNP pour la séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE

Les interactions spécifiques des GNP avec les lectines pourraient être utilisées pour isoler des protéines. Dans une étude précédente de Roy [24], la lectine Con A a été séparée d'une autre lectine, la WGA, après une précipitation en présence des glycodendrimères type mannose qui a duré plusieurs heures. Dans cette étude, le même mélange des deux lectines dissoutes dans le PBS soit Con A qui est sélectif au mannose et WGA qui est sélectif au NAcGlc, a été utilisé. Les GNP de type mannose de génération G0 (Au-G0-man) ont été ajoutées au mélange des lectines. Le précipité obtenu après 1h a été séparé

du surnageant et les deux fractions (précipité et surnageant) ont été analysées par électrophorèse SDS-PAGE.

La Figure 6.1 montre les bandes caractéristiques des deux lectines et du complexe formé. La colonne (2) de la Figure 6.1 montre une bande intense vers 31kDa et deux autres plus faibles à environ 12 et 15 kDa. Ces dernières correspondent aux fragments des unités de Con A [24, 228]. Dans la colonne (3), les deux bandes vers 21 et 36 kDa correspondent aux fragments des unités de WGA [24, 229]. Après le mélange de deux lectines avec les GNP de type mannose, le précipité obtenu présente seulement les bandes de Con A à 31 kDa, 12 et 15kDa (colonne 5) et le surnageant les deux bandes de WGA à 21 et 36 kDa (colonne 4). Ce résultat démontre que la reconnaissance de lectines est spécifique et que les GNP permettent la séparation de ces lectines.

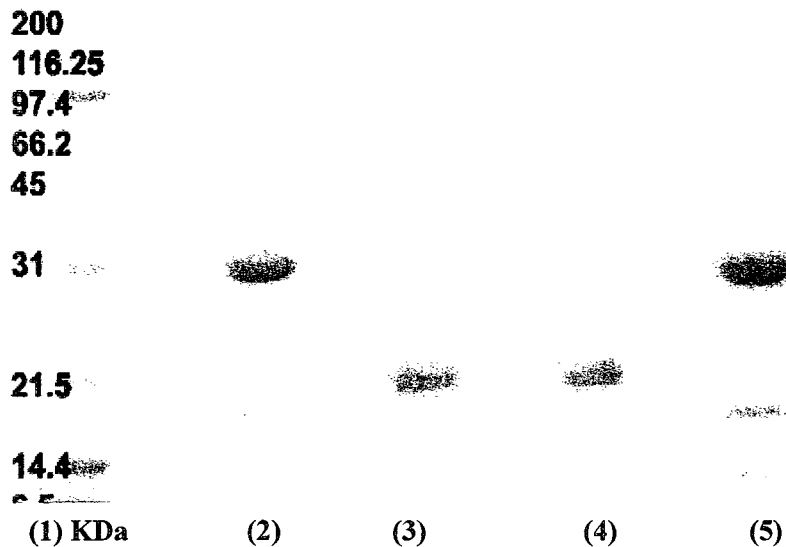


Figure 6.1: Électrophorèse SDS-PAGE sur le gel de séparation de 12 % pour: (1) Standard (Broad Range)[®]; (2) Con A; (3) WGA; (4) surnageant et (5) précipité du mélange Con A et WGA avec GNP (Au-G0-man); coloration avec bleu de Coomassie.

Les complexes formés entre les lectines Con A ou Con A fluorescente (Con A-FITC) et les GNP (Au-man-FITC) ont été visualisés par fluorescence sur le gel. Dans la Figure 6.2, la colonne (2) correspond à Con A-FITC, et les bandes à 31 kDa, 12 et 15kDa sont caractéristiques du monomère de cette lectine. La colonne (3) correspond au mélange de Con A-FITC et Au-man-FITC. Il y a accentuation de la bande à 15 kDa pour le complexe formé et elle est reliée non seulement à la Con A-FITC mais aussi à Au-man-FITC qui a une masse moléculaire d'environ 15 kDa, tel que le montre la colonne (5). La colonne (4) correspond au complexe formé entre Con A non fluorescente et Au-man-FITC. La bande caractéristique de Con A à 31 kDa n'est pas visible par fluorescence cependant la bande

intense vers 15kDa est reliée à Au-man-FITC dans le complexe avec Con A. Dans la colonne (5) la bande à environ 15 kDa correspond à la solution de Au-man-FITC en absence de Con A. Ce résultat confirme la masse de GNP d'environ 15 kDa estimée à partir des analyses TGA.

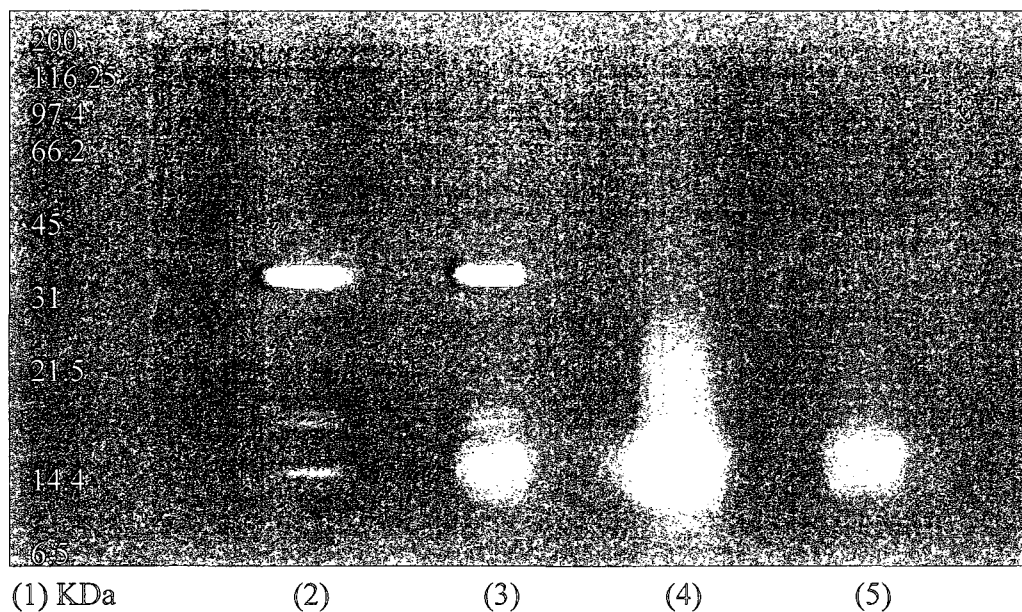


Figure 6.2: Électrophorèse SDS-PAGE sur le gel de séparation de 12 % pour : (1) standard (Broad Range)® ; (2) Con A-FITC ; (3) mélange Con A-FITC et Au-man-FITC; (4) précipité du complexe Con A-Au-man-FITC; (5) Au-man-FITC; Visualisation en fluorescence.

6.3. Marquage de la bactérie *E. coli* par des GNP fluorescentes

Certaines bactéries possèdent des récepteurs de carbohydrates sur des pili à l'extérieur de leur membrane. Ceux-ci sont impliqués dans l'adhésion des bactéries à la surface des cellules recouvertes de glycoprotéines par des interactions carbohydrates-protéines [5, 14]. Après l'adhésion, il y a infection des cellules. Certaines approches thérapeutiques visent à remplacer les antibiotiques, pour lesquelles les bactéries présentent plus de résistance, par des carbohydrates multivalents pour bloquer les récepteurs des bactéries [6, 41, 44, 77].

La croissance sélective des bactéries dans une solution ou sur un substrat peut prendre plusieurs jours. Plus récemment, des méthodes plus rapides ont été développées pour l'identification des agents pathogènes en utilisant des anticorps marqués avec des biomolécules (antigènes, anticorps, ADN) ou des sondes fluorescentes. Ces biocapteurs sont immobilisés à la surface des cellules au moyen d'interactions de type anticorps-antigène ou électrostatique. Le greffage des biomolécules ou fluorophores a été réalisé sur les glycodendrimères [95] et aussi sur une variété de substrats (polymères, quantum points quantiques, silice, SAM, particules métalliques) [85, 86, 154, 166, 230-232] pour immobiliser les cellules ou bactéries et étudier les interactions au niveau de la surface de membrane par microscopie confocale [230] ou AFM [233]. Pour la détection de la bactérie *E. coli*, sans la modifier avec des anticorps ou fluorophores, les études de Lin [87] ont utilisé des nanoparticules d'or recouvertes des carbohydrates pour visualiser, par

TEM, l'or présent sur la paroi membranaire de la bactérie dû à des interactions entre les carbohydrates et les récepteurs des bactéries.

Pour notre étude, le marquage du matériel biologique avec des anticorps-antigènes ou fluorophores n'a pas été considéré. Le marquage de la bactérie est réalisé par les GNP. Des images de microscopie confocale en mode fluorescence ont été enregistrées pour les bactéries *E. coli* en présence de Au-man-FITC ainsi que pour les blancs (les bactéries en absence ou en présence de Au-gal-RITC). Cette étude utilise la fluorescence émise par les GNP modifiés avec un fluorophore ainsi que la détection du signal de réflectance des particules d'or qui adhèrent à la paroi des bactéries *E. coli* immobilisées sur une plaque de microscope recouverte de poly(lysine). La Figure 6.3a est une image en mode de réflectance qui montre des régions en blanc correspondant aux bactéries agglomérées autour de taches noires représentant les glyconanoparticules d'or. Des bactéries individuelles sont aussi visibles. La même image en mode fluorescence sur la Figure 6.3b montre des régions fluorescentes qui correspondent aux GNP (Au-man-FITC) agglomérées autour de des bactéries. Ces dernières ne sont pas visibles sur cette image. En utilisant des Au-gal-RITC, des petites traces rouges de ces GNP sont visibles sur la Figure 6.4 b. La Figure 6.4 a montre qu'il y a moins d'agglomération des bactéries et la trace de Au-gal-RITC est due à des interactions non spécifiques avec ce type de nanoparticules, ou bien, est peut-être reliée à la préparation des plaques.

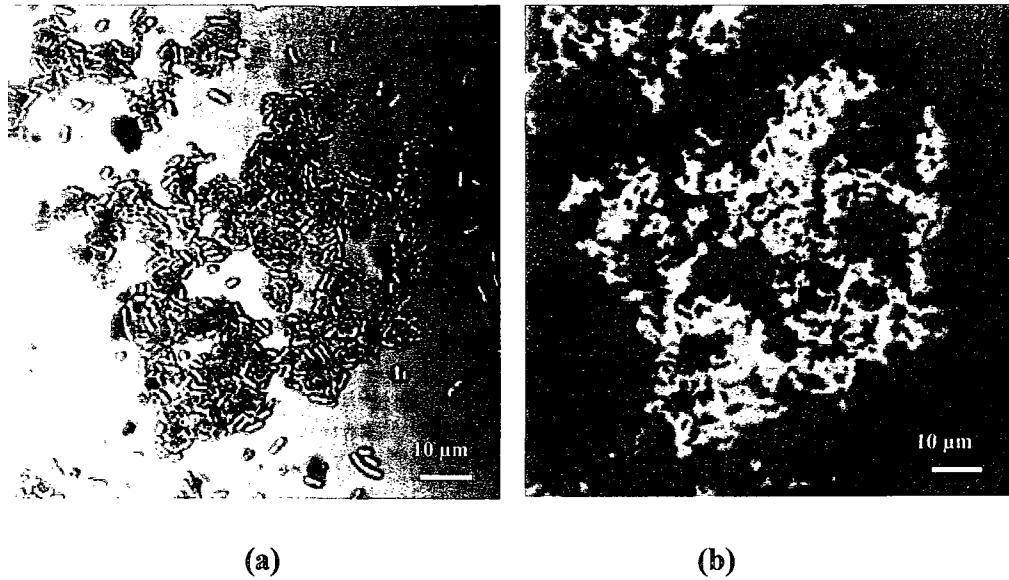


Figure 6.3: Détection de la bactérie *E. coli* marquée par les Au-man-FITC en utilisant la microscopie confocale en mode: (a) réflectance; (b) fluorescence.

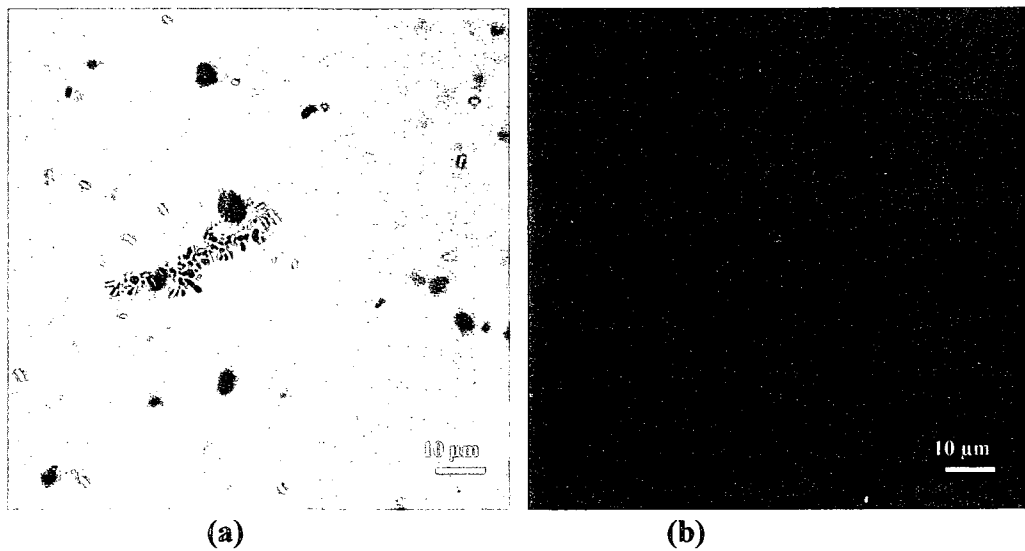


Figure 6.4: Détection de la bactérie *E. coli* marquée par Au-gal-RITC en utilisant la microscopie confocale en mode: (a) réflectance; (b) fluorescence.

La méthode MEB est aussi utilisée pour marquer les bactéries *E. coli* par l'or de Au-G0-man. Des images pour les bactéries en absence et en présence de GNP ont été effectuées. L'image du blanc dans la Figure 6.5a montre qu'en absence de Au-G0-man les bactéries (sous forme de bâtons de couleur noire) sont plus individuelles et que l'agglomération observée autour de Au-G0-man (de couleur blanche) dans la Figure 6.5b est due à la reconnaissance des récepteurs d'*E. coli* pour les mannoses de GNP.

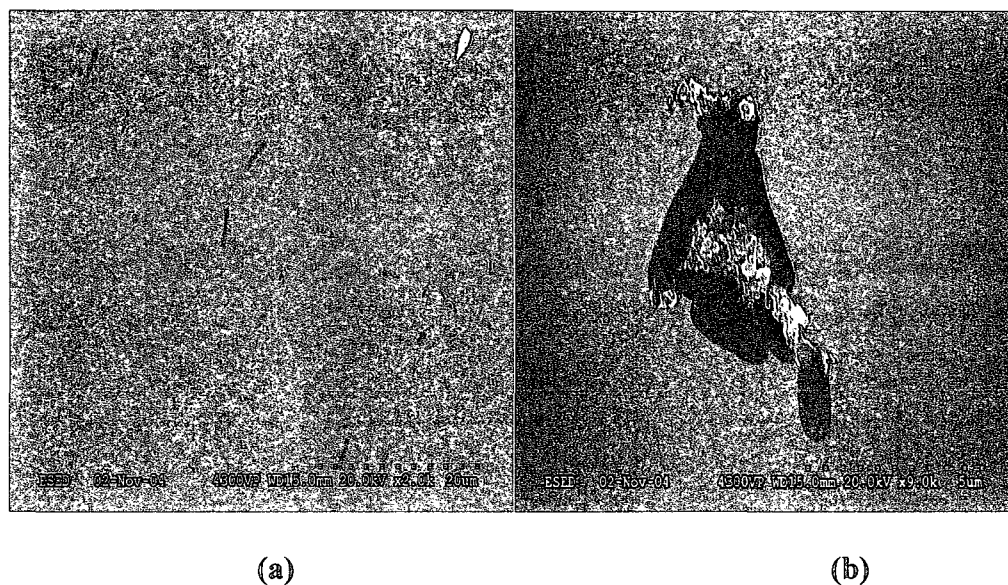


Figure 6.5: Image MEB pour les bactéries *E. coli*: (a) en absence et (b) en présence de Au-G0-man.

Des mesures MEB pour les bactéries *E. coli* en présence de Au-G0-gal ont aussi été effectuées. Les images MEB et l'analyse qualitative effectuée par EDX ont montré l'absence d'or de Au-G0-gal autour des bactéries.

Les résultats obtenus dans cette section montrent le potentiel de GNP pour la séparation sélective des lectines ainsi que pour la détection des bactéries par des méthodes rapides de microscopie.

6.4. Nanoparticules de silice pour la reconnaissance de lectines

Les NPSi sont utilisées dans la chromatographie comme matériel de purification ou de détection. Récemment, des nanoparticules (Ag/ZnS-CdSe/Fe₂O₃) modifiées avec de la silice et recouvertes des carbohydrates ont été utilisées comme des nanoparticules fluorescentes pour la détection des lectines [134].

Des applications potentielles pour la biodétection des protéines des substrats de silice recouverts de carbohydrates sont présentées. Dans cette section, les lectines Con A et WGA ont été étudiées en présence de nanoparticules de silice modifiées avec le mannose. La spectroscopie UV-VIS a été utilisée pour mesurer la cinétique de précipitation de Con A et la fluorescence pour mesurer l'atténuation de la fluorescence des lectines fluorescentes Con A-FITC et WGA-RITC en présence des nanoparticules de silice.

6.4.1. Immunoprécipitation de Con A par les particules de silice.

Pour cette étude, les nanoparticules de silice recouvertes de mannose (NPSi-man) synthétisées dans le Chapitre 2 (1 mg/mL PBS) ont été utilisées pour la précipitation de la lectine Con A (1 mg/mL PBS). Le rapport (v/v) Con A : NPSi-man est de 2 : 1 et les mesures de précipitation ont été effectuées par la spectroscopie UV-VIS à la même

longueur d'onde de 490 nm que celles utilisée pour les GNP. La Figure 6.6 montre une augmentation de l'absorbance à 490 nm dans les premières secondes jusqu'à 5 min. Après ce temps, le précipité commence à sédimenter et l'absorbance diminue continuellement. Ce résultat qualitatif montre une bonne affinité des nanoparticules de silice modifiées avec le mannose (NPSi-man) en présence de la lectine Con A. Les études d'Earhart [134] ont aussi montré la formation des complexes entre Con A et les nanoparticules (Ag/ZnS-CdSe/Fe₂O₃) recouvertes de silice et ayant des groupements dextrane en surface. Cependant, ces particules ont produit une précipitation totale de Con A en 4 h.

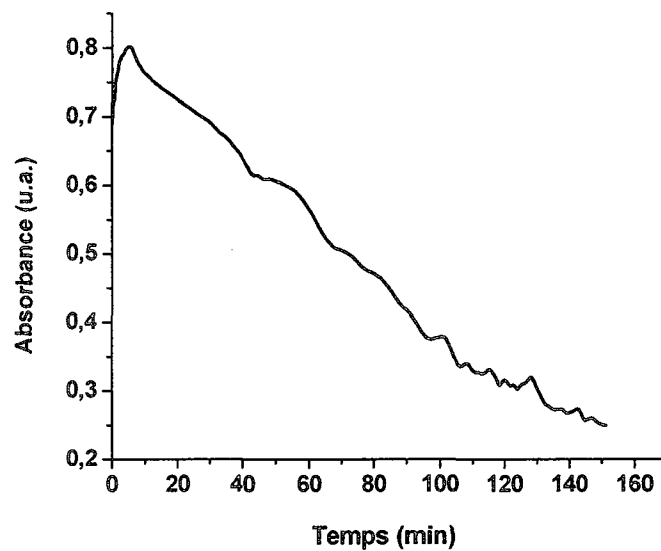


Figure 6.6: Variation de l'absorbance à 490 nm en temps pour le complexe formé entre Con A et NPSi-man.

6.4.2. Atténuation de la fluorescence des lectines par des particules de silice.

L'atténuation de la fluorescence de lectine Con A-FITC causée par des nanoparticules de silice de type mannose (NPSi-man) est examinée dans cette section. La sélectivité de la reconnaissance a été testée en effectuant des mesures d'atténuation de la fluorescence de WGA-RITC en présence NPSi-man. Des nanoparticules de silice activée avec des groupements hydroxyles (NPSi-OH) ont été aussi analysées en présence de ces lectines mentionnées ci-dessus. Une concentration en lectines et en particules de silice de 0.05 mg/mL (dans le PBS) a été utilisée pour ces mesures. Le blanc utilisé est le PBS. Pour Con A-FITC, la fluorescence a été mesurée à la longueur d'onde d'émission de 520 nm pour une excitation à 490 nm avec une fente de 5 nm. Pour WGA-RITC, la fluorescence a été mesurée à la longueur d'onde d'émission de 580 nm pour une excitation à 550 nm avec une fente de 5 nm.

Dans la Figure 6.7 on observe une atténuation de la fluorescence de Con A-FITC de 24% par les particules NPSi-OH. Ceci est dû à des interactions non sélectives de type hydrogène entre les groupements OH à la surface de la silice et la lectine. Une atténuation de la fluorescence de Con A-FITC de 45 % a été obtenue en présence de particules NPSi-man. Celle-ci est reliée à la complexation de NPSi-man avec Con A. Cependant le mécanisme de l'interaction n'est pas connu. Des mesures supplémentaires de taille des particules et de fluorescence devraient être effectuées en variant la concentration des particules de silice et des lectines ainsi qu'en utilisant des particules de silice modifiées avec un carbohydrate autre que le mannose pour voir si l'atténuation de la fluorescence

des lectines est reliée à la solubilité des particules, à la taille ou à la spécificité de l'interaction et de clarifier le processus de reconnaissance de lectines par les NPSi.

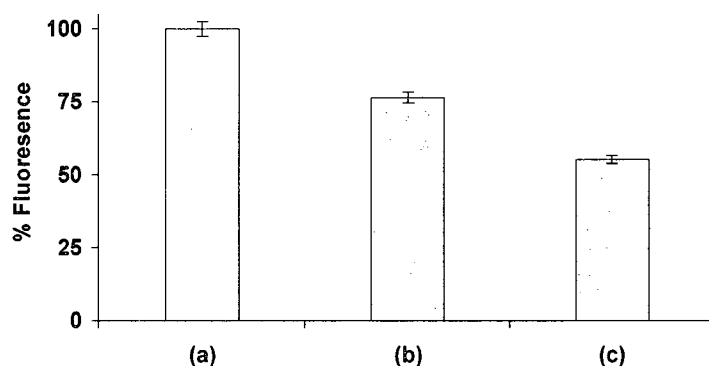


Figure 6.7: Variation de la fluorescence (%) pour la lectine Con A-FITC (0.05 mg/mL) (a) en absence des particules de silice; (b) en présence de NPSi-OH (0.05 mg/mL); (c) en présence de NPSi-man (0.05 mg/mL) ; $\lambda_{\text{ex}}=490$ nm, $\lambda_{\text{em}}=520$ nm.

Dans la Figure 6.8, il y a une faible atténuation de la fluorescence de WGA-RITC de 1.4 % par les particules de NPSi-OH. Ce résultat montre qu'il y a moins d'interactions de type hydrogène ou hydrophobes à la surface de silice et la lectine WGA. Cependant, une atténuation de la fluorescence de WGA-RITC de 20 % a été obtenue en présence de particules NPSi-man du à des interactions non spécifiques de type hydrogène et des interactions hydrophobes.

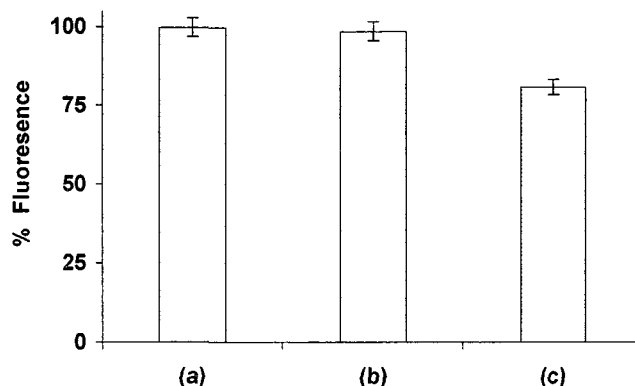


Figure 6.8: Variation de la fluorescence (%) pour la lectine WGA-RITC (0.05 mg/mL) (a) en absence des particules de silice; (b) en présence de NPSi-OH (0.05 mg/mL); (c) en présence de NPSi-man (0.05 mg/mL) ; $\lambda_{ex}=550$ nm, $\lambda_{em}=580$ nm.

Les mesures effectuées par UV-VIS ont montré que les particules NPSi-man précipitent la lectine Con A dans un temps plus long que les GNP de type mannose. Les mesures de fluorescence ont démontré une atténuation importante de la fluorescence de Con A-FITC en présence de NPSi-man. Cependant des interactions non spécifiques entre WGA-RITC et NPSi-man ont également été observées.

Ces résultats montrent les limites de l'utilisation des nanoparticules de silice pour la séparation et la détection des lectines. Comme mentionné dans la littérature [157], le greffage des dendrimères PAMAM à la surface de silice serait une alternative pour maximiser les sites réactifs à la surface de silice et optimiser la sélectivité des nanoparticules de silice.

6.5. Immobilisation sélective de la lectine Con A-FITC

L'objectif de cette étude est de développer un biocapteur d'utilisation réversible, recouverte des carbohydrates à la surface d'un support solide, afin d'immobiliser sélectivement les protéines et bactéries. Ce type de surface pourrait être utilisé pour détecter par microscopies MEB et confocale des biomolécules (bactéries, cellules) immobilisées sélectivement sur une surface modifiée avec des carbohydrates. Afin d'éliminer le marquage des protéines, la détection pourrait se réaliser à l'aide des glyconanoparticules d'or ou silice marqués de fluorophores.

Dans cette section, une surface de silice recouverte de mannose est utilisée pour l'immobilisation de ConA-FITC. Celle-ci a pour but de vérifier s'il est possible de remplacer les plaques recouvertes de poly(lysine) avec les plaques de silice recouvertes des carbohydrates pour une immobilisation plus sélective des bactéries.

Pour ce faire, la plaque sur laquelle des résidus mannose ont été greffés a été incubée pendant 1h avec une solution de Con A-FITC (1 mg/mL) en PBS. Après l'incubation, la plaque a été lavée avec une solution de PBS pendant 15 min et ensuite avec de l'eau pendant 10 min.

Pour obtenir des images de fluorescence, le filtre pour le FITC à une excitation à 490 nm et émission à 520 nm a été utilisé. Des plaques de verre non modifiées ont été utilisées

comme blanc et les images obtenues montrent que la surface des plaques n'est pas fluorescente car la Con A-FITC ne se lie pas à la surface.

Dans la Figure 6.9, il est possible de voir que la plaque est fluorescente et l'émission du FITC sur la Con A est en vert. Donc la protéine Con A-FITC (vert) est bien immobilisée et a tendance à s'agglomérer à la surface des groupements mannose. Toutefois, des mesures supplémentaires devraient être effectuées pour démontrer la sélectivité du support recouvert de mannose.

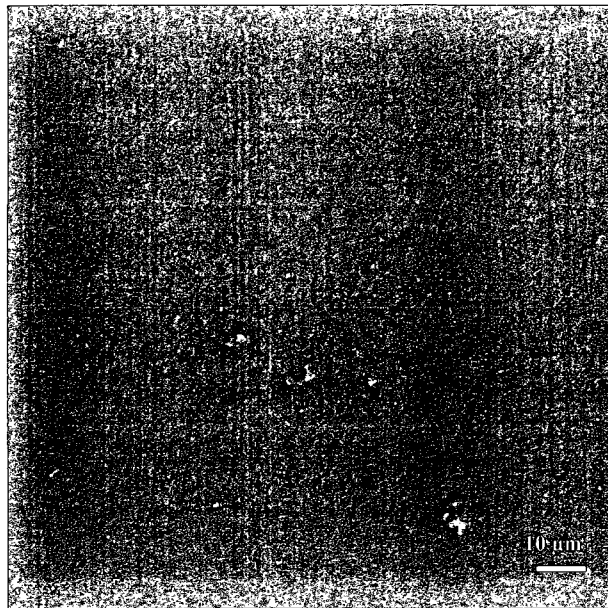


Figure 6.9: Détection de la lectine Con A-FITC sur une plaque de silice modifiée avec p-ITC- α -D-man.

6.6. Conclusion

Les glyconanoparticules d'or développées dans cette thèse ont montré leur potentiel pour la séparation sélective des lectines. L'or et le fluorophore des GNP assure une détection multiple de la bactérie *E. coli* par des méthodes rapides de microscopies sans les modifier chimiquement.

L'étude sur les surfaces de silice recouvertes des carbohydrates valide la méthode du greffage des carbohydrates sur d'autres supports que l'or. Cependant, les nanoparticules de silice présentent des limites pour la reconnaissance des lectines à cause des interactions non spécifiques entre les acides aminés des lectines et la surface de silice.

Conclusions générales

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont permis de développer de nouvelles méthodes de synthèse de nanoparticules recouvertes de carbohydrates et de démontrer leur potentiel comme biocapteurs pour la détection des lectines.

La première partie de ces travaux a porté sur la synthèse et la caractérisation de GNP. Les méthodes physico-chimiques de caractérisation ont démontré que des GNP solubles dans l'eau ayant une taille d'environ 2 nm, avec peu de défauts sur les branches de PAMAM et un bon rapport stœchiométrique N : S ont été synthétisées. Un titrage des amines terminales avec le TNBS permet de constater les bons rendements du greffage des carbohydrates.

Dans la deuxième partie de cette thèse, il a été démontré que les GNP ont une plus forte affinité pour les lectines que les glycodendrimères (GD). Un autre objectif de cette thèse visait à élucider l'origine de cette affinité accrue.

Des mesures de fluorescence utilisant des GNP en présence des lectines Con A et WGA, sans fluorophore ou modifiées avec des fluorophores ont été effectuées. Celles-ci ont montré que la surface de l'or de GNP est impliquée dans le processus d'atténuation de la fluorescence par un mécanisme de transfert d'énergie de type SET.

L'utilisation du couple lectine fluorescente-GNP a permis la détermination de paramètres thermodynamiques et cinétiques. Les paramètres thermodynamiques suggèrent que le confinement des dendrimères à la surface d'or leur confèrent une structure rigide comparée à la structure flexible de GD. Ceci se reflète par une contribution entropique favorable pour les GNP comparée à une contribution entropique défavorable pour les GD lors de la formation du complexe carbohydre-lectine. Ceci est causée par les groupes phényles et surfaces hydrophobes des GNP qui sont en plus grand contact avec l'eau avant la formation du complexe.

Les résultats cinétiques confirment que la formation du complexe lectine-GNP est une réaction biomoléculaire du deuxième ordre. Les paramètres cinétiques pour les complexes Con A-GNP montrent des vitesses d'association Con A-GNP inférieures aux vitesses contrôlées par diffusion et qui augmentent avec la génération de PAMAM. Les valeurs négatives pour l'entropie d'activation montrent la formation d'un complexe activé est ordonné. Cependant, l'augmentation des valeurs négatives pour l'entropie d'activation avec la génération de GNP est due aux contraintes stériques liée à la formation du complexe lectine-GNP.

Des approches diverses pour le marquage d'une bactérie, *E. coli* et la séparation de lectines par électrophorèse ont été aussi démontrées. Les GNP fluorescentes ou non, ont un bon potentiel pour la séparation des protéines ainsi que pour la détection des bactéries par la microscopie confocale ou MEB.

Un autre substrat soit la silice a été utilisée pour le greffage de carbohydrates. Les NPSi et les plaques de verre recouvertes de mannose ont été utilisées pour la reconnaissance des lectines. Les mesures effectuées ont apporté des informations importantes sur le potentiel de ces surfaces pour la reconnaissance de protéines. Cependant, il reste encore à améliorer la sélectivité de NPSi et de valider leur utilisation comme des biocapteurs.

Les propriétés obtenues pour les GNP telles que leur petite taille, leur bonne affinité et sélectivité pour les lectines ainsi que leur structure rigide montrent qu'ils sont de bons candidats pour la vectorisation de médicaments et leur utilisation comme biocapteur. Cependant, il reste à étudier la toxicité des GNP. Des études biochimiques seront nécessaires pour vérifier leur toxicité chez les plantes.

Références

- [1] <http://membres.lycos.fr/jjww/comm.gif/>, mars 2009.
- [2] Lis, H., Sharon, N., *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 637.
- [3] So, L. L., Goldstein I.J., *J. Biol. Chem.*, **1967**, *242*, 1617.
- [4] Simanek, E.E., McGarvey, G. J., Jablonowski, J.A., Wong, C.-H., *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 833.
- [5] Sharon, N. *FEBS Lett.* **1987**, *217*, 145.
- [6] Nagahori, N., Lee, R. T., Nishimura, S.-I., Pagé, D., Roy, R., Lee, Y. C., *ChemBioChem.*, **2002**, *3*, 836.
- [7] Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J., Wyns, L., *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, *1383*, 9.
- [8] Dam, T. K., Brewer, C. F., *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 387.
- [9] Parillo, F., Diverio S., Todini, L., Fagioli, O., *Vet. Res.*, **2001**, *32*, 581.
- [10] Sumner J. B., *J. Biol. Chem.*, **1919**, *37*, 137.
- [11] Sharon, N., Ofek, I., *Glycoconj. J.*, **2000**, *17*, 659.
- [12] Roberts, J. A., Marklund, B. I., Ilver, D., Haslam, D., Kaack, M. B., Baskin, G., Louis, M., Mollby, R., Winberg, J., Normark, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1994**, *91*, 11889.
- [13] Bergsten, G., Wullt, B., Svanborg, C., *Int. J. Med. Microbiol.*, **2005**, *295*, 487.
- [14] Ofek, I., Hasty, D. L., Abraham, S. N., Sharon, N., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2000**, *485*, 183.
- [15] Sharon N., *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, *1760*, 527.
- [16] Defez, C., Fabbro-Peray, P., Bouziges, N., Gouby, A., Mahamat, A., Daures, J. P., Sotto, A., J. *Hosp. Infect.*, **2004**, *57*, 209.
- [17] Garber, N., Guempel, U., Belz, A., Gilboa-Garber, N., Doyle, R. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, *1116*, 331.
- [18] Garber, N., Guempel, U., Gilboa-Garber, N., Royle, R. J., *FEMS Microbiol. Lett.*, **1987**, *48*, 331.
- [19] Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K. E., *Microbiol.*, **2005**, *151*, 1313.
- [20] Imberty, A., Wimmerova, M., Mitchell, E. P., Gilboa-Garber, N., *Microbes Infect.* **2004**, *6*, 221.

- [21] Davis, B. G., *J. Chem. Soc.*, **1999**, *1*, 3215.
- [22] Bouckaert, J., Berglund, J., Schembri, M., De Genst, E., Cools, L., Wuhrer, M., Hung, C.S., Pinkner, J., Slattegard, R., Zavalov, A., Choudhury, D., Langermann, S., Hultgren, S.J., Wyns, L., Klemm, P., Oscarson, S., Knight, S.D., De Greve, H., *Mol. Microbiol.* **2005**, *55*, 441.
- [23] Pagé, D., Aravind, S., Roy, R., *Chem. Commun.*, **1996**, 1913.
- [24] Pagé, D., Roy, R., *Bioconj. Chem.*, **1997**, *8*, 714.
- [25] Mammen, M., Choi, S. K., Whitesides, G. M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 2754.
- [26] Sabin, C., Mitchell, E. P., Pokorna, M., Gautiera, C., Utillea, J.-P., Wimmerova, M., Imberty, A., *FEBS Lett.*, **2006**, *580*, 982.
- [27] Gardiner, T., *GlycoSci.*, **2000**, *1*, 1.
- [28] Tomalia, D. A., Naylor, A. M., Goddard, W. A., *Angew. Chem.*, **1990**, *29*, 138.
- [29] Hawker, C.J., Fréchet, J.M.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 7638.
- [30] Fréchet, J. M. J. *Science*, **1994**, *263*, 1710.
- [31] Tomalia, D.A., *Macromol.Symp.*, **1996**, *101*, 243.
- [32] Esfand, R., Tomalia, D. A., *Drug Discov. Today*, **2001**, *6*, 427.
- [33] Tomalia, D. A., Huang, B., Swanson, D. R., Brothers, H. M., Klimash, J. W., *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 3799.
- [34] Svenson, S. Tomalia, D.A., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, *57*, 2106.
- [35] Tomalia, D. A., *Chem. Today*, **2005**, *23*, 41.
- [36] Lindhorst, T. K., Kieburg, C., *Synthesis*, **1995**, 1228.
- [37] Lindhorst T. K., Kieburg, C., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1953.
- [38] Lindhorst, T. K., Ludewig, M., Thiem, J., *J. Carbohydr. Chem.* **1998**, *17*, 1131
- [39] Ashton, P. R., Boyd, S. E., Brown, C. L., Nepogodiev, S. A., Meijer, E. W., Peerlings, H. W. I., Stoddart, J. F., *Chem. Eur. J.*, **1997**, *3*, 974.
- [40] Roy, R., *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **2003**, *15*, 291.
- [41] Autar, R., Khan, A. S., Schad, M., Hacker, J., Liskamp, R. M. J., Pieters, R. J., *ChemBioChem.*, **2003**, *4*, 1317.
- [42] Roy, R., Baek, M.-G, *Rev. Molecul. Biotechnol.*, **2002**, *90*, 291.

- [43] Roy, R., *Drug Discovery Today*, **2004**, *1*, 327.
- [44] Makimura, Y., Zhonghong, G., Roy, R., *Int. Congress Ser.*, **2001**, *1223*, 45.
- [45] Baek, M.-G., Roy, R., *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 11.
- [46] Vannucci, L., Fiserova, A., Sadalapure, K., Lindhorst, T., Kuldova, M., Rossmann, P., Horvath O., Kren, V., Krist, P., Bezouska, K., Luptovcova, M., Mosca, F., Pospisil, M., *J. Int. Oncol.*, **2003**, *23*, 285.
- [47] Barrientos, A. G., Fuente, J. M., Rojas, T. C., Fernandez, A., Penades, S., *Chem. Eur. J.*, **2003**, *9*, 1909.
- [48] Mrksich, M., *Chem. Soc. Rev.*, **2000**, *29*, 267.
- [49] Houseman, B.T., Gawalt, E.S., Mrksich, M., *Langmuir*, **2003**, *19*, 1522.
- [50] Turkevitch, J., Stevenson, P. C., Hillier, J., *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55.
- [51] Frens, G., *Nature: Phys. Sci.* **1973**, *241*, 20.
- [52] Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D.J., Whyman, R., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1994**, 801.
- [53] Brust, M. J., Fink, Bethell, D., Schiffrin, D.J., Kiely, C.J., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1995**, 1655.
- [54] Templeton, A. C., Chen, S., Gross, S. M., Murray, R. W., *Langmuir*, **1999**, *15*, 66.
- [55] Garcia, M. E., Baker, L. A., Crooks R. M., *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 256.
- [56] Alvarez, M. M., Khoury, J. T., Schaft, T. G., Shafigullen, M. N., Vezmar, I., Whetten, R. L., *J. Phys. Chem. B*, **1997**, *101*, 3706.
- [57] Palpant, B., Prével, B., Lermé, J., Cottancin, E., Pellarin, M., Treilleux, M., Perez, A., Vialle, J. L., Broyer, M., *Phys. Rev. B*, **1998**, *57*, 1963.
- [58] Link, S., El-Sayed, M. A., *J. Phys. Chem. B*, **1999**, *103*, 4212.
- [59] Jin, R., Cao, Y. W., Mirkin, C. A., Kelly, K. L., Schatz, G. C., Zheng, J. G., *Science* **2001**, *294*, 1901.
- [60] Yamada, M., Nishihara, H., *ChemPhysChem*, **2004**, *5*, 555.
- [61] Ghosh, S. K., Nath, S., Kundu, S., Esumi, K., Pal, T., *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108*, 13963.
- [62] Link, S., El-Sayed M. A., *J. Phys. Chem. B*, **1999**, *103*, 4212.

- [63] Shipway, A. N., Katz E., Willner, I., *Chem. Phys. Chem.*, **2000**, *1*, 18.
- [64] Niemeyer, C. M., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, *40*, 4128.
- [65] de la Fuente, J.M., Barrientos, A.G., Rojas, T.C., Rojo, J., Cañada, J., Fernández, A., Penadés, S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2257.
- [66] de la Fuente, J.M., Penadés S., *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, *1760*, 636.
- [67] Otsuka, H., Akiyama, Y., Nagasaki, Y., Kataoka, K., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8226.
- [68] Katz, E., Willner, I., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *33*, 6042.
- [69] Murray, C. B., Kagan, C. R., Bawendi, M. G., *Annu. Rev. Mater. Sci.*, **2000**, *30*, 545.
- [70] Daniel, M.-C., Astruc D., *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 293.
- [71] de la Fuente, J.M., Penadés, S., *Glycoconj. J.*, **2004**, *21*, 149.
- [72] Lin, C.-C., Yeh, Y.-C. Yang, C.-Y., Chen, G.-F, Chen, Y.-C., Wu, Y.-C., Chen, C.-C., *Chem. Commun.*, **2003**, 2920.
- [73] Nolting, B., Yu, J.-J., Liu, G.-Y., Cho, S.-J., Kauzlarich, S., Gervay-Hague, J., *Langmuir*, **2003**, *19*, 6465.
- [74] Svarovsky, S. A., Szekely, Z., Barchi, J. J., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, *16*, 587.
- [75] Oh, E., Hong, M.-Y., Lee, D., Nam, S.-H., Yoon, H.C., Kim, H.-S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 3270.
- [76] de Paz, J. L., Ojeda, R., Barrientos, A. G., Penadés, S., Martín-Lomas, M., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, *16*, 149.
- [77] Rojo, J., Diaz, V., de la Fuente, J.M., Segura, I., Barrientos, A. G., Riese, H. H., Bernad, A., Penades, S., *ChemBioChem.*, **2004**, *5*, 291.
- [78] Woller, E. K., Walter, E.D., Morgan, J.R., Singel, D. J., Cloninger, M. J., *J. Am. Chem Soc.*, **2003**, *125*, 8820.
- [79] Hone, D. C., Haines, A. H., Russell, D. A., *Langmuir*, **2003**, *19*, 7141.
- [80] Aslan, K., Lakowicz, J. R., Geddes, C. D., *J. Anal. Biochem.*, **2004**, *330*, 145.
- [81] Tsai, C.-S., Yu, T.-B., Chen, C.-T., *Chem. Commun.* **2005**, 4273.
- [82] Halkes, K. M., de Souza, A. C., Maljaars, C. E. P., Gerwig, G. J., Kamerling, J. P., *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3650.

- [83] Polak, J. M., Vamdell, I. M., *Elsevier Science Publishers*, 1984.
- [84] West, J., Halas, N., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2000, 11, 215.
- [85] Tkachenko, A. G., Xie, H., Coleman, D., Glomm, W., Ryan, J., Anderson, M. F., Frazen, S., Feldheim, D. L., *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 4700.
- [86] de la Fuente, J. M., Berry, C. C., *Bioconj. Chem.*, 2005, 16, 1176.
- [87] Lin, C.-C., Yeh, Y.-C., Yang, C.-Y., Chen, C.-L., Chen, G.-F., Chen, C.-C., Wu, Y.-C., *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 3508.
- [88] Clegg, R. M., *Methods Enzymol.*, 1992, 211, 353.
- [89] Gordon, G. W., Berry, G., Liang, X. H., Levine, B., Herman B., *Biophys J.*, 1998, 74, 2702.
- [90] Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York, second edition, 1999.
- [91] Wallrabe, H., Periasamy, A., *Curr Opin Biotechnol*, 2005, 16, 19.
- [92] Ballerstadt, R., Schultz J.S., *Anal. Chim. Acta*, 1997, 345, 203.
- [93] Blagoi, G., Rosenzweig, N., Rosenzweig Z., Design, *Anal. Chem.* 2005, 77, 393.
- [94] Boteva, R. N., Bogoeva, V. P., Stoitsova S. R., *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 1747, 143.
- [95] Ibey, B. L., Beier, H. T., Rounds, R. M., Cote G. L., *Anal. Chem.* 2005, 77, 7039.
- [96] Yun, C. S., Javier A., Jennings T., Fisher, M., Hira, S., Peterson S., Hopkins, B., Reich N.O., Strouse, G. F., *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 3115.
- [97] Lundquist, J. J., Debenham, S. D., Toone, E. J., *J. Org. Chem.*, 2000, 65, 8245.
- [98] Ling, H., Boodhoo, A., Hazes, B., Cummings, M. D., Armstrong, G. D., Brunton, J. L., Read, R. J. *Biochem.*, 1998, 37, 1777.
- [99] Bhattacharyya, L., Ceccarini, C., Lorenzoni, P., Brewer, C. F., *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 1288.
- [100] Dam, T. K., Brewer, C. F., *Methods in Enzymol.*, 2003, 362, 455.
- [101] Dam, T. K., Brewer, C. F., *Methods in Enzymol.*, 2004, 379, 107.
- [102] Dam, T. K., Oscarson, S., Roy, R., Das, S. K., Pagé, D., Macaluso F., Brewer, C. F., *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 8640.
- [103] Dimick, S. M., Powell, S. C., McMahon, S. A., Moothoo, D. N., Naismith, J. H., Toone, E. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 10286.
- [104] Burke, S. D., Zhao, Q., Schuster, M. C., Kiessling, L. L., *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 4518.

- [105] Dam, T. K., Roy R., Das, S. K., Oscarson, S., Brewer C. F., *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 14223
- [106] Mangold, S. L., Cloninger, M. J., *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 2458.
- [107] Lewis, S. D., Shafer, J. A., Goldstein, I. J., *Arch. Biochem. Biophys.* **1976**, 172, 689.
- [108] Clegg, R. M., Loontjens, F. G., Van Landschoot, A., Jovin, T.M., *Biochem.*, **1981**, 20, 4687.
- [109] Farina, R. D., Wilkins, R. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **1980**, 631, 428.
- [110] Katz, E., Willner, I., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 33, 6042.
- [111] Drechesler, U., Erdogan, B., Rotello, V. M., *Chem. Eur. J.*, **2004**, 10, 5570.
- [112] Wang, *J. Nanomat., Small*, **2005**, 1, 1036.
- [113] Huber, D.L., *Small* **2005**, 1, 482.
- [114] Rojas, T. C., de la Fuente, J. M., *Adv. Mater.*, **2002**, 14, 585.
- [115] de Souza, A. C., Halkes, K. M., Meeldijk, J. D., Verkleij, A. J., Vliegthart, J. F. G., Kamerling, J. P., *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 4323.
- [116] Ulman, A., *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 1533.
- [117] Hostetler, M. J., Wingate, J. E., Zhong, C.-J., Harris, J. E., Vachet, R. W., Clark, M. R., Londono, J. D., Green, S. J., Stokes, J. J., Wignall, G. D., Glish, G. L., Porter, M. D., Evans, N. D., Murray, R. W., *Langmuir*, **1998**, 14, 17.
- [118] Colowick, S. P., Kaplan, N. O., *Methods in Enzymol.*, Vol. XXVIII., Part B, Acad. Press, New York, **1972**.
- [119] Ingersoll, C. M., Bright, F. V., *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 403A.
- [120] Cordek, J. Wang X., Tan, W. *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 1529.
- [121] Fang, X. H., Liu, X., Schuster, S., Tan, W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 2921.
- [122] Pantano, P., Walt, D. R., *Anal. Chem.*, **1995**, 481A.
- [123] Liu, X., Tan, W., *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 5054.
- [124] Davis, S. S., *Trends Biotechnol.*, **1997**, 15, 217.
- [125] Wang, A. J. and M. A. Arnold, *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 1051.
- [126] Santra, J. S., Xu, S., Wang, K. M., Tan, W. H., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2004**, 4, 590.
- [127] Luo, D., Han, E., Belcheva, N., Saltzman, W. M., *J. Control. Release*, **2004**, 95, 333.
- [128] Stober, W., Fink, A., Bohn, E. J., *Colloid Interf. Sci.*, **1968**, 26, 62.

- [129] Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego, CA, 1996.
- [130] Qhobosheane, M., Santra, S., Zhang, P., Tan, W.H., *Analyst*, 2001, 126, 1274.
- [131] Santra, S., Tapeç, R., Theodoropoulou, N., Hebard A., Tan, W., *Langmuir*, 2001, 17, 3203.
- [132] Zhao, X., Dytioco, R., Tan, W., *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 11474.
- [133] Santra, S., Liesenfeld, B., Bertolino, C., Dutta, D., Cao, Z., Tan, W., Moudgil, B. M., Mericle, R. A., *J. Luminescence*, 2006, 117, 75.
- [134] Earhart, C., Jana, N. R., Erathodiyil, N., Ying, J.Y., *Langmuir*, 2008, 24, 6215.
- [135] Armistead, C. G., Tyler A. J., Hambleton, F. H., Mitchell, S. A., Hockey, J. A., *J. Phys. Chem.*, 1969, 73, 11.
- [136] Lochmuller, C. H., Kersey, M. T., *Langmuir*, 1988, 4, 572.
- [137] Morrow, B. A., McFarlan, A. J., *J. Phys. Chem.*, 1992, 96, 1395.
- [138] Tripp, C. P., Hair, M. L., *Langmuir* 1995, 11, 149.
- [139] Arakaki, L. N. H., Nunes, L. M., Simoni, J. A., Airoidi, C., *J. Coll. Int. Sc.*, 2000, 228, 46.
- [140] Yoshida, W., Castro, R. P., Jou, J.-D., Cohen, Y., *Langmuir*, 2001, 17, 5882.
- [141] Gestwicki, J. E., Cairo, C. W., Mann, D. A., Owen, R. M., Kiessling, L. L., *Anal. Biochem.*, 2002, 305, 149.
- [142] Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., Brown, P. O., *Science*, 1995, 270, 467.
- [143] Lal, S. P., Christopherson, R. I., Remedios, C. G., *DDT*, 2002, 7, S143.
- [144] Mitchell, E., Sabin, C., Snajdrova, L., Pokorna, M., Perret, S., Gautier, C., Hofr, C., Gilboa-Garber, N., Koca, J., Wimmerova, M., Imberty, A., *Proteins*, 2005, 58, 735.
- [145] Kusnezow, W., Hoheisel, J. D., *J. Mol. Recognit.*, 2003, 16, 165.
- [146] MacBeath, G., Schreiber, S. L., *Science*, 2000, 289, 1760.
- [147] Love, K. R., Seeberger P. H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, 41, 3583.
- [148] Mellet, C. O., Garcia Fernandez, J. M., *Chem. Bio. Chem.*, 2002, 3, 819.
- [149] Feizi, T., Fazio, F., Chai, W., Wong, C.-H., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2003, 13, 637.
- [150] Wilcheck, M., Bayer, E. A., *Methods in Ezymology*, Academic Press: New York, 1990, vol. 184.
- [151] Shao. M. C., *Anal. Biochem.*, 1992, 205, 77.

- [152] Shinohara, Y., Sota H., Gotoh, M., Hasebe, M., Tosu, M., Nakao, J., Hasegawa, Y., *Anal. Chem.*, **1996**, *68*, 2573.
- [153] O'Shannessy, D. J., Brigham-Burke, M., Peck, K., *Anal. Biochem.*, **1992**, *205*, 132.
- [154] Wang, D., Liu, S., Trummer, B.J., Deng, C., Wang, A., *Nat. Biotechnol.*, **2002**, *20*, 275.
- [155] Willats, W. G. T., Rasmussen, S. E., Kristensen, T., Mikkelsen, J. D., Knox, J. P., *Proteomics*, **2002**, *2*, 1666.
- [156] Kohn, M., Wacker, R., Peters, C., Schroder, H., Soulere, L., Breinbauer, R., Niemeyer, C. M., Waldmann H., *Ang. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 5830.
- [157] Benters, R., Niemeyer, C. M., Wohrle, D., *ChemBioChem*, **2001**, *2*, 686.
- [158] Pale-Grosdemange, C., Simon, E. S., Prime K.L., Whitesides, G. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 12.
- [159] Grönbeck, H.; Curioni, A.; Andreoni, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3839.
- [160] Revell, D. J., Knight, J. R., Blyth, D. J., Haines, A. H., Russell, D. A., *Langmuir*, **1998**, *14*, 4517.
- [161] Horan, N., Yan, L., Isobe, H., Whitesides, G. M., Kahne, D., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1999**, *96*, 11782.
- [162] Houseman, B. T., Mrksich M., *Chem. Biol.*, **2002**, *9*, 443.
- [163] Park, S., Shin, I., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 3180.
- [164] Fazio, F., Bryan, M. C., Blixt, O., Paulson, J. C., Wong, C. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 14397.
- [165] Bryan, M. C., Fazio, F., Lee, H. K., Huang, C. Y., Chang, A., Best, M. D., Calarese, D. A., Blixt, O., Paulson, J. C., Burton, D., Wilson, I. A., Wong, C. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 8640.
- [166] Mann, D. A., Kanai, M., Maly, D. J., Kiessling, L. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 10575.
- [167] Shin, I., Cho, J. W., Boo, D. W., *Comb. Chem. High Throughput Screen*, **2004**, *7*, 565.
- [168] Tong, Q.-Y. Gösele, U., *Science and Technology*, Wiley, New York, **1999**, 49.
- [169] Zammattéo, N., Jeanmart, L., Hamels, S., Courtois, S., Louette, P., Hevesi, L., Remacle C., *J. Anal. Biochem.*, **2000**, *280*, 143.
- [170] Dugas, V., Chevalier, Y., *J. Coll. Int. Sci.*, **2003**, *264*, 354.
- [171] Dugas, V., Depret, G., Chevalier, Y., Nesme, X., Souteyrand, E., *Sensors and Actuators B.* **2004**, *101*, 112.
- [172] Cayot, P., Tainturier, G., *Anal. Biochem.* **1997**, *249*, 184.

- [173] <http://www.pierce.com/>, mars 2009.
- [174] Briggs, D., Grant, J. T., *Surface Analysis by Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy*, Eds., IM Publications, Chichester, 2003.
- [175] Karlsson, A., Markfjäll, M., Lundqvist, H., Strömberg, N., Dahlgren, C., *Anal. Biochem.*, **1995**, 224, 390.
- [176] http://w3.jouy.inra.fr/unites/miaj/public/imaste/Projets/AI2M_v2/, mars 2009.
- [177] Balogh L. P., Ganser, T. R., Shi X., *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, **2005**, 847.
- [178] Hostetler, M.J., Stokes, J.J., Murray, R.W., *Langmuir*, **1996**, 12, 3604.
- [179] Vezmar, I., Alvarez, M., Khooury, J. T., Salisbury, B.E., Whetten, R. L., *Z. Phys. D.*, **1997**, 40, 147.
- [180] Manna, A., Imae, T., Yogo, T., Aoi, K., Okazaki, M., *J. Coll. Int. Sc.* **2002**, 256, 297.
- [181] Shibu, E.S., Habeeb Muhammed, M.A., Tsukuda, T., Pradeep, T., *J. Phys. Chem. C*, **2008**, 112, 12168.
- [182] Schaaff, T. G., Whetten, R. L., *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103, 9394.
- [183] Yonezawa, T., Yasui, K., Kimizuka, N., *Langmuir*, **2001**, 17, 271.
- [184] Weare, W. W., Reed, S. M., Warner, M. G., Hutchison, J. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 12890.
- [185] http://www.bibliotecapleyades.net/imagenes_cosmos/cosmosdivine3_7.gif, mars 2009
- [186] <http://www.uni-ulm.de/fkp/hilights/feb2002/au55.gif>, mars 2009
- [187] Bozoukova, M., *Mémoire de maîtrise*, UQAM, 2006.
- [188] Maye, M. M., Luo, J., Lin, Y., Engelhard, M. H., Hepel, M., Zhong, C.-J., *Langmuir*, **2003**, 19, 125.
- [189] Boumabraz, M., Davydov, V. Y., Kiselev, A. V., *Chromatographia*, **1982**, 15, 751.
- [190] Vollet, D. R., Moreira, J. C., Kubota, L. T., Varella, J. A., Gushi- Y., *Colloids Surf.*, **1989**, 40, 1.
- [191] Kneuer, C., Sameti, M., Haltner, E. G., Schiestel, T., Schirra, H., Schmidt, H. Lehr, C-M., *Int. J. Pharm.*, **2000**, 196, 257.
- [192] Liu, S., Zhu, T., Hu, R., Liu, Z., *Phys. Chem.* **2002**, 4, 6059.
- [193] Nalwa, H. S., *Handbook of nanostructured materials and nanotechnology*, San Diego, Academic Press, **1999**, IV, 621.
- [194] Gambero, A., *J. Coll. Int. Sc.*, **1997**, 185, 313.
- [195] Zhuravlev, L. T., *Langmuir*, **1987**, 3, 316.

- [196] Belyakova, L. A., Varvarin, A. M., *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **1999**, *154*, 285.
- [197] Morrow, B. A., McFarlan, A. J., *J. Phys. Chem.*, **1992**, *96*, 1395.
- [198] Azour, H., Derouault, J., Lauroua, P., Vezon, G., *Spectrochim. Acta A*, **2000**, *56*, 1627.
- [199] McCool, B., Murphy L., Tripp, C. P., *J. Coll. Int. Sc.*, **2006**, *295*, 1, 294.
- [200] Brewer, C. F., *Chemtracts Biochem. Mol. Biol.*, **1996**, *6*, 165.
- [201] Olsen, L. R., Dessen, A., Gupta, D., Sabesan, S., Sacchettini, J. C., Brewer, C. F., *Biochem.*, **1997**, *36*, 15073.
- [202] Chen, C.-P., Song, S.-C., Gilboa-Garber, N., Chang, K.S., Wu, M., *Glycobiol.*, **1998**, *8*, 7.
- [203] Cioci, G., Mitchell, E.P., Gautier, C., Wimmerová, M., Sudakevitz, D., Pérez, S., Gilboa-Garber, N., Imberty, A., *FEBS Lett.*, **2003**, *555*, 297.
- [204] Zanini, D., Roy, R., *Bioconj. Chem.*, **1997**, *8*, 187.
- [205] Rebiere-Huët, J., Martino, P.D., Hulen, C., *Can., J. Microbiol.*, **2004**, *50*, 303.
- [206] Babu, P., Sinha, S., Surolia A., *Bioconj. Chem.*, **2007**, *18*, 146.
- [207] Daly, C. J., McGrath, J.C., *Pharmacology & Therapeutics*, **2003**, *100*, 101.
- [208] Madison, B., Ofek, I., Clegg, S., Abraham, S. N., *Infect. Immun.*, **1994**, *62*, 843.
- [209] Wong, C.-H., *Carbohydrate-based Drug Discover*, First Edition, **2003**.
- [210] Jelinek, R., Kolusheva, S., *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 5987.
- [211] Ambrosi, M., Cameron N.R., Davis, B.G., *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 1593.
- [212] Derewenda, Z., Yariv, J., Helliwell, J. R., Kalb (Gilboa), A. J., Dodson, E., Paiz, M., Wan, T., Campbell, J.W., *EMBO J.*, **1989**, *8*, 2189.
- [213] Naismith, J. H., Emmerich, C., Habash, J., Harrop, S. J., Helliwell, J. R., Hunter, W. N., Raftery, J., Kalb-Gilboa, A. J., Yariv, J., *ActaCrystallogr. D*, **1994**, *50*, 847.
- [214] Corbell, J. B., Lundquist J. J., Toone, E. J., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, *11*, 95.
- [215] Dam, T. K., Roy, R., Pagé, D., Brewer, C. F., *Biochem.*, **2002**, *41*, 1351.
- [216] Tinoco, I., Sauer, K., J. C. Wang, *Phys. Chem.*, Third Edition, **1995**.
- [217] Hasegawa, T., Kondoh, S., Matsuura, K., Kobayashi, K., *Macromolec.*, **1999**, *32*, 6595-6603.
- [218] Schwarz, F. P., Puri, K. D., Bhat R. G., Surolia, A., *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 7668.
- [219] Bains, G., Lee R. T., Lee, Y .C., Freire E., *Biochem.*, **1992**, *31*, 12624.

- [220] Moothoo, D. N., Naismith, J. H., *Glycobiol.*, **1998**, *8*, 173.
- [221] Scatchard, G., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1949**, *51*, 660.
- [222] <http://www.microcal.com/>, mars 2009.
- [223] Laidler, K. J., *Chemical Kinetics*, Third Edition, N.Y, **1987**.
- [224] Clegg, R. M., Loontjens, F. G., Van Landschoot, A., Sharon, N., De Bruyne, C. K., Jovin, T. M., *Arch. Znt. Physiol. Biochem.*, **1980**, *88*, B69.
- [225] Loontjens, F.G., Clegg, R. M., Van Landschoot, A., Jovin, T. M, *Eur. J. Biochem.*, **1977**, *78*, 465.
- [226] Neurohr, K. J., Young, N. M., Smith, I.C.P., Mantsch, H. H., *Biochem*, **1981**, *20*, 3499.
- [227] Cardin, A. D., Behnke, W. D., *J. Biol. Chem.*, **1979**, *254*, 8877.
- [228] Liener, I. E., Sharon, N., Goldstein, I. J. *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*, Academic Press, N. Y., **1986**.
- [229] Kamemura, K., Kato S., *Anal. Biochem.*, **1998**, 305.
- [230] Disney, M. D., Zheng, J., Swager, T. M., Seeberger, P. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 13343.
- [231] Li, Z. F., Ruckenstein, E., *Water, Nano Lett.*, **2004**, *4*, 1463.
- [232] Chen, F., Gerion, D., *Nano Lett.*, **2004**, *10*, 1827.
- [233] Tanaka, T., Nakamura, N., Matsunaga T., *Electrochim. Acta*, **1999**, *44*, 3827.