

Table des matières

Symboles et Abréviations.....	7
Introduction.....	11
Chapitre 1 — Assemblages "plasmon-émetteur" : propriétés optiques et couplage.....	15
I - Propriétés optiques intrinsèques des nanoparticules plasmoniques ou luminescentes.....	15
I.1 - Assemblages "plasmon-émetteurs" : quels enjeux ?	15
I.2 - Des plasmons de surface à la plasmonique	17
I.2.1 - <i>Les plasmons-polaritons de surface (SPP)</i>	17
I.2.2 - <i>Les plasmons de surface localisés (LSP)</i>	20
I.2.3 - <i>Densité locale d'états plasmoniques (SPLDOS)</i>	22
I.3 - Propagation et délocalisation des modes plasmoniques	24
I.4 - Confinement et structure modale des plasmons dans des particules	26
I.5 - Choix du métal plasmonique.....	27
I.6 - Les émetteurs	29
I.6.1 - <i>Les molécules fluorescentes</i>	29
I.6.2 - <i>Les quantum dots</i>	29
I.6.3 - <i>Les oxydes dopés lanthanides</i>	31
I.6.4 - <i>Les clusters d'or</i>	32
I.6.5 - <i>Les nanodiamants</i>	35
I.7 - Choix des émetteurs	36
II - Propriétés optiques émergentes par couplage « plasmon-émetteur »	38
II.1 - Effets de couplage.....	38
II.1.1 - <i>L'exaltation et l'extinction de fluorescence</i>	38
II.1.2 - <i>Modification de la LDOS photonique par les plasmons</i>	41
II.1.3 - <i>Effet de la cristallinité sur le facteur de Purcell</i>	42
II.2 - Caractérisation des phénomènes optiques hybrides.....	43

<i>II.2.1 - Mesures résolues spatialement</i>	44
<i>II.2.2 - Mesures résolues temporellement.....</i>	45
III - Couplage de nanoparticules par auto-assemblage.....	48
III.1 - Auto-assemblages par effet « template ».....	48
<i>III.1.1 - Immobilisation sur un substrat structuré</i>	48
<i>III.1.2 - Assemblage sur un brin d'ADN.....</i>	49
<i>III.1.3 - Assemblage sur un réseau ordonné de protéines</i>	50
<i>III.1.4 - Ingénierie de l'appariement d'ADN et origami.....</i>	51
III.2 - Auto-assemblages directs	53
<i>III.2.1 - Peptides complémentaires « coiled coil »</i>	53
<i>III.2.2 - Paires de protéines complémentaires</i>	55
IV - Les protéines α-Repin.....	56
IV.1 - Qu'est-ce qu'une protéine artificielle ?	56
IV.2 - Genèse des α -Repin et construction d'une banque de « phage display »..	57
IV.3 - Sélection par évolution dirigée de protéines à fonction ciblée	60
V - Conclusion.....	63
Références.....	64
Chapitre 2 — Matériel et Méthodes.....	73
I - Réactifs et composants chimiques.....	73
II - Synthèses des particules d'or plasmoniques	73
<i>II.1 - Les microplaquettes d'or (2 - 20 μm).....</i>	73
<i>II.2 - Les nanoprismes d'or, (500 - 1 000 nm).....</i>	75
III - Méthodes de caractérisation structurale	76
III.1 - Spectrométrie de masse (ESI-MS).....	76
III.2 - Diffusion des rayons X aux petits angles.....	77
III.3 - Microscope à force atomique (AFM)	78
III.4 - Microscopie électronique à balayage (SEM).....	79
III.5 - Microscopie électronique en transmission (TEM).....	81
<i>III.5.1 - Présentation générale.....</i>	81
<i>III.5.2 - Protocole de coloration des échantillons organiques.....</i>	82
<i>III.5.3 - Cryomicroscopie.....</i>	83
IV - Méthodes de caractérisation optiques	85
IV.1 - Spectrophotométrie UV-visible.....	85
IV.2 - Spectroscopie de fluorescence en solution	85

<i>IV.2.1 - Principe général</i>	85
<i>IV.2.2 - Spectroscopie en solution.....</i>	86
<i>IV.2.3 - Mesure de durée de vie en solution.....</i>	86
<i>IV.2.4 - Mesure du rendement quantique.....</i>	87
<i>IV.2.5 - Mesure de la fluorescence sous excitation large bande</i>	88
IV.3 - Microscopies optiques	88
<i>IV.3.1 - Microscopie en champ sombre par réflexion</i>	88
<i>IV.3.2 - Microscopie d'intensité et de durée de vie de fluorescence</i>	89
IV.4 - La cathodoluminescence	91
Références.....	93

Chapitre 3 — Les protéines α -Rep, des modules pour l'auto-assemblage 95

I - Une protéine biface pour la morpho-synthèse et la détection.....	95
I.1 -Des α-Rep à forte affinité pour la surface Au(111).....	95
<i>I.1.1 - Morpho-synthèse de nanocristaux d'or dirigée par les α-Rep anti-Au(111).....</i>	95
<i>I.1.2 - Ajustement spectral et enrichissement en nanocristaux 2D</i>	97
I.2 - Micro-Spectroscopie par résonance plasmon sur nanoprisme individuel ..	98
<i>I.2.1 - Spectres en champ sombre de particules uniques.....</i>	98
<i>I.2.2 - Sensibilité spectrale à l'indice ambiant</i>	99
I.3 - Détection plasmonique de la streptavidine sur prisme individuel	101
<i>I.3.1 - Fonctionnalisation de la plateforme colloïdale.....</i>	101
<i>I.3.2 - Mesure du décalage spectral en présence de la streptavidine</i>	101
II - Ingénierie de protéines comme stratégie de couplage plasmon-émetteur 103	
II.1 - Couplage direct par appariement de biomolécules complémentaires	103
II.2 - Origami de protéines : vers un nouveau « template » multifonctionnel ..	104
III -Assemblage et structure d'un template super-hélicoïdal d'αRep.....	109
III.1 - Protocoles biochimiques d'auto-assemblages.....	109
<i>III.1.1 - Clivage et purification des protéines.....</i>	109
<i>III.1.2 - Induction de l'auto-assemblage des super-hélices αRep.....</i>	109
III.2 - Caractérisation structurale.....	109
<i>III.2.1 - Microscopie en coloration négative</i>	110
<i>III.2.2 - Diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS)</i>	113
<i>III.2.3 - Imagerie cryoTEM.....</i>	115

<i>III.2.4 - Comparaison entre cryoTEM et SAXS.....</i>	117
<i>III.2.5 - Cryotomographie électronique</i>	121
<i>III.2.6 - Élaboration d'un modèle.....</i>	122
<i>III.3 - Conclusion.....</i>	124
Références.....	125
Chapitre 4 — Physico-chimie d'agrégats d'or et de centres colorés NV comme émetteurs hyperspectraux.....	127
I - Synthèse et caractérisation des clusters d'or rouges, verts et bleus.....	127
I.1 - Synthèse de clusters Aun ($5 \leq n \leq 22$) fonctionnalisés.....	128
<i>I.1.1 - Découverte de clusters fluorescents.....</i>	128
<i>I.1.2 - Protocole de synthèse.....</i>	129
<i>I.1.3 - Expérience de contrôle.....</i>	130
I.2 - Caractérisation morphologique et structurale	132
<i>I.2.1 - Microscopies électronique (HRTEM) et à force atomique (AFM).....</i>	132
<i>I.2.2 - Thiopégylation hydophile</i>	136
<i>I.2.3 - Spectrométrie de photoélectrons X (XPS)</i>	137
<i>I.2.4 - Spectrométries de masse (ESI-MS)</i>	139
I.3 - Propriétés photo-physiques	141
<i>I.3.1 - Cartographie émission-excitation de fluorescence</i>	141
<i>I.3.2 - Modèle du Jellium.....</i>	145
<i>I.3.3 - Rendement quantique et durée de vie</i>	146
<i>I.3.4 - Récapitulatif des caractéristiques optiques des AuNC.....</i>	149
I.4 - Emission blanche du mélange RGB	149
II - Chimie de surface des nanodiamants.....	152
II.1 - Nettoyage de la surface des nanodiamants	152
II.2 - Fonctionnalisation avec des ligands de surface.....	153
II.3 - Nanodiamants Adamas Nanotechnologies.....	153
III -Réalisation des assemblages "plasmon-émetteur"	154
III.1 - Assemblage à base de prismes protéinés	154
<i>III.1.1 - Prismes protéinés et clusters d'or</i>	154
<i>III.1.2 - Prismes protéinés et nanodiamants</i>	155
III.2 - Assemblage à base de microplaquettes.....	156
IV -Conclusion.....	158

Références.....	159
Chapitre 5 — Études optiques des modes plasmoniques : de la nanoparticule d'or à l'assemblage hybride.....	163
I - Étude de nanoprismes d'or par cathodoluminescence.....	163
I.1 - Étude par cathodoluminescence : motivation et mesures	163
I.2 - Outil de simulation : GDM.....	167
I.2.1 - <i>Présentation de GDM</i>	167
I.2.2 - <i>Application à la cathodoluminescence</i>	169
I.3 - Données CL comparées avec les simulations	171
I.3.1 - <i>Triangle pointu (560 nm)</i>	172
I.3.2 - <i>Triangle tronqué (480/900 nm)</i>	177
I.3.3 - <i>Effet de la taille des particules sur le signal</i>	180
I.4 - Cathodoluminescence sur structures hybrides.....	182
II - Cartographie de temps de vie des assemblages hybrides	183
III -Conclusion.....	185
Références.....	186
Conclusion.....	189
I - Conclusion.....	189
II - Perspectives	192
II.1 - Contrôle de la longueur par ajout de terminateurs	192
II.2 - Ingénierie fonctionnelle de la face interne de la brique	192
II.3 - Application du « backbinder » au couplage direct	194
II.4 - Utilisation des modes plasmons pour l'adressage.....	194
II.5 - Activation d'une biomolécule par génération locale d'électrons chauds	195
Références.....	197
Liste des Tables.....	199
Liste des Figure.....	201
Liste des publications et communications.....	214

Symboles et Abréviations

Bien que cette thèse soit écrite en français, certains acronymes, pour les techniques expérimentales notamment, sont plus connus dans leur forme anglophone. D'autres ne possèdent tout simplement pas d'abréviation francophone. Afin de garder une cohérence pour les sigles utilisés par la suite, ceux-ci seront donc en version anglaise.

2D :	bidimensionnel
3D :	tridimensionnel
α -Rep :	protéine artificielle composée de motifs répétés d' α -hélices
\AA :	angström, 1 $\text{\AA} = 10^{-10}$ m
ADN :	acide désoxyribonucléique
AFM :	<i>atomic force microscope</i> , le microscope à force atomique
Ag :	symbole chimique de l'argent
AgNO_3 :	formule chimique du nitrate d'argent
Al :	symbole chimique de l'aluminium
Arg :	symbole de l'acide aminé de l'arginine
Au :	symbole chimique de l'or
AuNC :	nanocluster
AuNC_a :	nanocluster produit avec de l'aniline
AuNC_i :	nanocluster produit avec de l'indole
AuNP :	Nanoparticule d'or
bBE3 :	nom de la protéine α -Rep « agrafe »
BC :	bande de conduction
BSA :	<i>bovine serum albumin</i> , albumine de sérum bovin
BV :	bande de valence
C-cap :	extrémité carboxyl-terminale d'une protéine
Ce :	symbole chimique du cérium
CIE :	commission internationale de l'éclairage
CL :	cathodoluminescence
cryoTEM :	microscopie électronique en transmission cryogénique
cts/kg :	carats par kilogramme (1 cts = 0,0002 kg)
Cu :	symbole chimique du cuivre
Cys :	symbole de l'acide aminé de la cystéine
Da :	Dalton, 1 Da = 1 g.mol ⁻¹
DFM :	<i>dark-field microscopy</i> , microscopie en champ sombre
DFT :	<i>density functional theory</i> , théorie de la fonctionnelle de la densité
D.O. :	densité optique
DOS :	<i>density of states</i> , densité d'états
dsDNA :	<i>double-stranded DNA</i> , ADN double brin
DTT :	dithiothréitol
EDC :	N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride

EDTA :	acide éthylènediaminetétraacétique
EDS :	<i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i> , spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie
EELS :	<i>electron energy loss spectroscopy</i> , spectroscopie des pertes d'énergie électroniques
EG :	éthylène glycol
ELISA :	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
FFT :	<i>fast Fourier transform</i> , transformée de Fourier rapide
FLIM :	<i>fluorescence lifetime microscope</i> , microscope de durée de vie en fluorescence
G8 :	nom de la protéine α -Rep anti-Au(111)
GDM :	<i>Green dyadique méthode</i> , méthode des dyades de Green : méthode numérique
GFP :	<i>green fluorescent protein</i> , protéine fluorescente verte : molécule fluorescente
Gln :	symbole de l'acide aminé de la glutamine
H ₂ O :	formule chimique de l'eau
H ₂ SO ₄ :	formule chimique de l'acide sulfurique
HA :	hydrochlorure d'hydroxylamine
HAADF :	<i>high-angle annular dark-field</i> , champ sombre annulaire à angle élevé
HAu ^(III) Cl ₄ .3H ₂ O :	formule chimique des sels d'or sous la forme d'acide tétrachloraurique (III) trihydraté
HCl :	formule chimique de l'acide chlorhydrique
HNO ₃ :	formule chimique de l'acide nitrique
HT :	His-tag, étiquette poly-histidine
Imp59 :	nom de la protéine α -Rep « brique »
ITO :	<i>indium tin oxide</i> , oxyde d'indium-étain
IPA :	isopropanol
KI :	formule chimique de l'iodure de potassium
Kd :	constante de dissociation
LDOS :	<i>local density of states</i> , densité d'états locale
L :	litre, 1 L = 10 ³ mL = 10 ⁶ µL
Ln :	symbole des lanthanides, terres rares
LRM :	<i>leakage radiation microscopy</i> , microscopie à rayonnement de fuite
LSP :	<i>localized surface plasmons</i> , plasmons de surface localisés
LSPR :	<i>localized surface plasmons resonance</i> , résonance plasmons de surface localisés
Lys :	symbole de l'acide aminé de la lysine
NC :	nanocluster
nc-AFM	<i>non-contact atomic force microscope</i> , microscope à force atomique sans contact
N-cap :	extrémité amine-terminale d'une protéine
ND :	nanodiamant
NINTA :	résine d'affinité chargée de nickel qui peut être utilisée pour purifier des protéines contenant une séquence de polyhistidine
NP :	nanoparticule
NPL :	<i>non linear photon luminescence</i> , photoluminescence non linéaire
NV :	<i>nitrogen-vacancy</i> , lacune d'azote dans les nanodiamants
M :	molaire, 1 M = 1 mol.L ⁻¹
m :	Mètre, 1 m = 10 ⁶ µm = 10 ⁹ nm

MB :	molybdate d'ammonium : colorant TEM
MS :	<i>mass-spectrometry</i> , spectrométrie de masse
NaOH :	formule chimique de l'hydroxyde de sodium
NaP :	solution tampon de phosphates de sodium
PBS :	solution tampon de phosphate salin
PPEM :	<i>photoemission electron microscopy</i> , microscopie électronique à photoémission
PEG :	polyéthylène glycol
pH :	<i>potential of hydrogen</i> , potentiel hydrogène = échelle utilisée pour spécifier l'acidité ou la basicité
pI :	<i>isoelectric point</i> , point isoélectrique : pH auquel une molécule est électriquement neutre
PLls :	poly-L-lysine
POCl ₃ :	formule chimique du trichlorure de phosphore
POPOP :	1,4-bis(5-phenyloxazol-2-yl) benzène, molécule fluorescente
PTA :	<i>phosphotungstic acid</i> , acide phosphotungstique : colorant TEM
PVP :	polyvinylpyrrolidone
QD :	quantum dot
QY :	<i>quantum yield</i> , rendement quantique
R6G :	rhodamine 6G, molécule fluorescente
RGB :	<i>red, green, blue</i> : rouge, vert, bleu
RIU :	<i>Refractive index unit</i> , unité d'indice de réfraction
Rpm :	rotation par minute
SAXS :	<i>small angle X-ray scattering</i> , Diffraction des rayons X aux petits angles
SEM :	<i>scanning electron microscope</i> , microscope électronique à balayage
Ser :	symbole de l'acide aminé de la sérine
SFS :	sulfoxylate formaldéhyde de sodium
Si ₃ N ₄ :	Formule chimique du niture de silicium
SNOM :	<i>scanning near-field optical microscope</i> , microscope optique à balayage en champ proche
SP :	<i>surface plasmon</i> , plasmon de surface
SPASER :	<i>surface plasmon amplification by stimulated emission of radiation</i> , amplification du plasmon de surface par émission stimulée de rayonnement, laser à plasmon
SPLDOS :	<i>surface plasmon local density of states</i> , densité d'états locale des plasmons de surface
SPP :	<i>surface plasmon polaritons</i> , plasmons polaritons de surface
SPR :	<i>surface plasmon resonance</i> , résonance des plasmons de surface
ssDNA :	<i>single-stranded DNA</i> , ADN simple brin
STEM :	<i>scanning transmission electron microscope</i> , microscope électronique en transmission et à balayage
STV :	streptavidine
TCSCP :	<i>time-correlated single photon counting</i> , compteur de photons uniques corrélés dans le temps
TE :	<i>transverse electric mode</i> , mode électrique transverse
TEM :	<i>transmission electron microscope</i> , microscope électronique en transmission

TeV :	protéase TEV (<i>Tobacco Etch Virus</i>), ou protéase du virus de la gravure du tabac
Tb :	symbole chimique du terbium
TIR :	<i>total internal reflexion</i> , réflexion totale interne
TM :	<i>transverse magnetic mode</i> , mode magnétique transverse
TRITC :	Tetramethylrhodamine, molécule fluorescente
UA :	<i>uranyl acetate</i> , acétate d'uranylique : colorant TEM
UHV :	<i>ultra high-vacuum</i> , ultra-vide
UV :	ultra-violet
Y :	symbole de l'acide aminé de la tyrosine
Yb :	symbole chimique de l'ytterbium

Introduction

Les nanoparticules désignent, selon la norme ISO TS/27687, tout objet dont les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique (diamètre inférieur à 100 nm). Elles sont aujourd'hui de plus en plus présentes dans notre quotidien : dans les aliments (notamment en guise de colorant), [1] dans les médicaments ou pansements pour leurs propriétés anti-bactériennes, [2] dans les textiles afin de créer des tissus anti-UV ou ignifugés, [3,4] dans les cosmétiques (comme les filtres solaires ou le noir de carbone), [5,6] mais aussi dans l'électronique [7] ou le bâtiment. [8] Leur utilisation ouvre des perspectives incroyables.

Les dimensions nanoscopiques de ces particules offrent des propriétés physiques qui sont souvent complètement distinctes de celles observées pour leur matériau macroscopique respectif. [9] Les nanoparticules métalliques présentent des propriétés intéressantes et utiles, notamment de nouvelles caractéristiques électroniques, optiques et chimiques. Le mouvement collectif des électrons confinés dans ces particules, appelé plasmon de surface, est l'une de ces nouvelles propriétés dont l'étude connaît un réel essor ces trente dernières années. Outre une localisation du champ électrique local, les plasmons de surface sont à l'origine d'une exaltation de ce champ au voisinage de la surface métallique. [10]

De manière étonnante, ces plasmons de surface localisés sont exploités depuis des siècles par l'Homme. Particulièrement, les propriétés d'absorption de grains métalliques ont été largement utilisées sous forme d'inclusions dans des objets en verre afin de leur donner une coloration intense lorsque la lumière les traverse, l'exemple le plus connu étant celui de la coupe de Lycurgue. [11] Mais ce n'est que bien plus tard, au milieu du XIXe siècle, que M. Faraday a étudié la synthèse de suspensions colloïdales d'or et leur interaction avec la lumière. [12] Il y a donc longtemps que l'existence des propriétés optiques étonnantes des nanoparticules métalliques est connue, mais c'est seulement depuis une trentaine d'années que l'essor de la lithographie électronique et de la chimie colloïdale permet de produire de petites nanoparticules de formes variées, et que les avancées des techniques de caractérisation permettent de les étudier en détail.

L'assemblage de nanoparticules plasmoniques entre elles ou avec d'autres nanoparticules, notamment fluorescentes, montre des propriétés de couplage élargissant les possibilités de contrôle de la réponse optique de ces structures. [13-15] Les propriétés de ces systèmes assemblés sont ajustées par le contrôle des caractéristiques intrinsèques des nanoparticules, telles que la forme, la taille et le matériau, ainsi que par des caractéristiques environnementales telles que l'espacement entre les particules et l'environnement diélectrique. Ces nanoparticules sont, après synthèse, stabilisées par des ligands qui servent notamment aux auto-assemblages. Les interactions intermoléculaires utilisées comprennent la liaison hydrogène, la coordination des métaux, l'attraction/répulsion électrostatique, les interactions dipolaires, les forces de Van der Waals et les interactions hydrophobes. [16,17] L'assemblage biomoléculaire est également utilisé pour incorporer les propriétés intrinsèques des biomolécules dans des structures nanocomposites. [18] La réalisation de ces assemblages présente encore de nombreux défis notamment sur le positionnement relatif des objets.

Dans ce contexte, ce manuscrit présente des travaux expérimentaux originaux sur la synthèse, les méthodes d'assemblage et la caractérisation optique de structures hybrides à base de nanoparticules plasmoniques et émettrices. Les objectifs principaux que nous souhaitons atteindre dans ce travail de thèse sont l'exploration de nouvelles synthèses de nanoparticules, la réalisation de nouvelles méthodes d'assemblage, une connaissance approfondie des différents modes plasmons localisés des structures plasmoniques, ainsi que la caractérisation optique de couplage plasmon-émetteur. Pour cela, nous utiliserons des techniques expérimentales de microscopie électronique, de spectrométrie de masse et de spectroscopie. Nous nous appuierons également sur des simulations utilisant la méthode des dyades de Green pour produire des résultats numériques. La structure détaillée de ce manuscrit, articulé en cinq chapitres, est la suivante.

- Le premier chapitre introduit succinctement les différents types d'oscillations collectives électroniques pouvant exister dans un métal, les principales propriétés optiques des émetteurs connus ainsi que les propriétés optiques qu'un couplage entre ces deux types de particules peut engendrer. Les techniques généralement utilisées pour caractériser ces structures sont ensuite brièvement décrites. Les différentes stratégies d'assemblage ayant inspiré celles utilisées dans cette thèse sont ensuite présentées, puis une description des protéines α -Rep sur lesquelles repose notre travail clôt ce chapitre.
- Le second chapitre est dédié à la présentation des diverses synthèses et techniques de caractérisation structurales et optiques utilisées.

- Le troisième chapitre décrit l'ingénierie et l'exploitation de protéines artificielles α -Rep avec deux approches pour l'auto-assemblage, une directe et une par gabarit. Elles sont tout d'abord utilisées comme inhibiteur de croissance pour la création de nanoprismes, dont la sensibilité et la fonctionnalisation permettent une utilisation pour la biodétection et l'auto-assemblage. Les deux stratégies d'assemblage utilisant α -Rep sont ensuite détaillées en détail. Pour finir, nous introduisons un nouveau concept d'origami de protéines en forme de superhélice grâce à la construction d'une paire de protéines à forte affinité. Les superhélices sont caractérisées structuralement par microscopie électronique en transmission cryogénique (cryoTEM) et par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).
- Le quatrième chapitre présente les émetteurs étudiés dans ces travaux et notamment la synthèse originale, la fonctionnalisation et les caractérisations structurales et photo-physiques de clusters d'or à émission bleue, verte et rouge, ainsi que la fonctionnalisation de nanodiamants. Les assemblages induits avec ces particules sont ensuite présentés.
- Le cinquième et dernier chapitre présente des données expérimentales de cathodoluminescence caractérisant les modes plasmons de nanoprismes d'or, ainsi que l'utilisation d'une méthode de simulation numérique basée sur les dyades de Green. De premières mesures de temps de vie en fluorescence d'assemblages hybrides sont également présentées.

Références

1. L. Voss, I.-L. Hsiao, M. Ebisch, J. Vidmar, N. Dreiack, L. Böhmert, V. Stock, A. Braeuning, K. Loeschner, P. Laux, A. F. Thünemann, A. Lampen, and H. Sieg, "The presence of iron oxide nanoparticles in the food pigment E172," *Food Chemistry* **327**, 127000 (2020).
2. V. Rattanaruengsrikul, N. Pimpha, and P. Supaphol, "In vitro efficacy and toxicology evaluation of silver nanoparticle-loaded gelatin hydrogel pads as antibacterial wound dressings," *J. Appl. Polym. Sci.* **124**, 1668-1682 (2012).
3. Z. Lu, C. Mao, M. Meng, S. Liu, Y. Tian, L. Yu, B. Sun, and C. M. Li, "Fabrication of CeO₂ nanoparticle-modified silk for UV protection and antibacterial applications," *Journal of Colloid and Interface Science* **435**, 8-14 (2014).
4. Z. Yu, A. Suryawanshi, H. He, J. Liu, Y. Li, X. Lin, and Z. Sun, "Preparation and characterisation of fire-resistant PNIPAAm/SA/AgNP thermosensitive network hydrogels and laminated cotton fabric used in firefighter protective clothing," *Cellulose* **27**, 5391-5406 (2020).
5. N. A. Monteiro-Riviere, K. Wench, R. Landsiedel, S. Schulte, A. O. Inman, and J. E. Riviere, "Safety Evaluation of Sunscreen Formulations Containing Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles in UVB Sunburned Skin: An In Vitro and In Vivo Study," *Toxicological Sciences* **123**, 264-280 (2011).
6. Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) and Q. Chaudhry, "Opinion of the Scientific Committee on Consumer safety (SCCS) - Second revision of the opinion on carbon black, nano-form, in cosmetic products," *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **79**, 103-104 (2016).
7. M. K. Choi, J. Yang, T. Hyeon, and D.-H. Kim, "Flexible quantum dot light-emitting diodes for next-generation displays," *npj Flex Electron* **2**, 10 (2018).
8. H. Kim and S. Yang, "Responsive Smart Windows from Nanoparticle-Polymer Composites," *Adv. Funct. Mater.* **30**, 1902597 (2020).
9. J. A. Blackman, ed., *Metallic Nanoparticles*, 1st ed, Handbook of Metal Physics (Elsevier, 2009).
10. W. A. Murray and W. L. Barnes, "Plasmonic Materials," *Adv. Mater.* **19**, 3771-3782 (2007).
11. I. Freestone, N. Meeks, M. Sax, and C. Higgitt, "The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology," *Gold Bull* **40**, 270-277 (2007).
12. "X. The Bakerian Lecture.—Experimental relations of gold (and other metals) to light," *Phil. Trans. R. Soc.* **147**, 145-181 (1857).
13. A. Teulle, M. Bosman, C. Girard, K. L. Gurunatha, M. Li, S. Mann, and E. Dujardin, "Multimodal plasmonics in fused colloidal networks," *Nature Materials* **14**, 87-94 (2014).
14. J. de Torres, P. Ferrand, G. Colas des Francs, and J. Wenger, "Coupling Emitters and Silver Nanowires to Achieve Long-Range Plasmon-Mediated Fluorescence Energy Transfer," *ACS Nano* **10**, 3968-3976 (2016).
15. X. Zhou, J. Wenger, F. N. Visconti, L. Le Cunff, J. Béal, S. Kochtcheev, X. Yang, G. P. Wiederrecht, G. Colas des Francs, A. S. Bisht, S. Jradi, R. Caputo, H. V. Demir, R. D. Schaller, J. Plain, A. Vial, X. W. Sun, and R. Bachelot, "Two-Color Single Hybrid Plasmonic Nanoemitters with Real Time Switchable Dominant Emission Wavelength," *Nano Letters* **15**, 7458-7466 (2015).
16. B. Kim, S. L. Tripp, and A. Wei, "Self-Organization of Large Gold Nanoparticle Arrays," *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 7955-7956 (2001).
17. J. Liu, J. Alvarez, and A. E. Kaifer, "Metal Nanoparticles with a Knack for Molecular Recognition," *Advanced Materials* **12**, 1381-1383 (2000).
18. C. M. Niemeyer, "Nanoparticles, Proteins, and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Materials Science," *Angewandte Chemie International Edition* **40**, 4128-4158 (2001).

Chapitre 1

Assemblages "plasmon-émetteur" : propriétés optiques et couplage

I - Propriétés optiques intrinsèques des nanoparticules plasmoniques ou luminescentes

I.1 - Assemblages "plasmon-émetteurs" : quels enjeux ?

Le couplage des propriétés optiques d'émetteurs fluorescents, tels que les quantum dots (QD), les agrégats métalliques (NC pour nanoclusters) ou les centres colorés des nanodiamants (ND), avec celles de nanoparticules métalliques offrent de nouvelles possibilités d'applications. En effet, des propriétés uniques découlent de ces assemblages dont la fluorescence exaltée ou encore le couplage photon unique — plasmon unique, par exemple, offrent de nouvelles perspectives scientifiques et technologiques pour des applications variées comme la détection de biomolécules, l'imagerie médicale, l'information quantique ou la réduction des pertes d'énergie en électronique et l'amélioration des rendements photovoltaïques. Ce couplage gagnerait cependant à être mieux contrôlé et exploité au sein de ces assemblages hybrides.

La construction des circuits hybrides, dans lesquels le transfert d'information d'un émetteur à un autre par des modes plasmons est possible, demande un couplage efficace entre des émetteurs et des guides d'ondes plasmoniques. Un couplage efficace permet l'excitation des plasmons de surface, tout en maximisant leur longueur de propagation dans la structure métallique afin de rendre possibles les transferts d'énergie à longue distance entre émetteurs. Prenons un exemple simple et illustré. En 2016, une collaboration entre l'équipe de J. Wenger et celle de G. Colas des Francs a démontré la création d'un modèle de transfert d'énergie guidé par plasmons entre deux émetteurs séparés d'un micromètre sur un nanofil d'argent (figure 1.1). [1] Bien que le transfert d'énergie par plasmon à longue distance ait été étudié précédemment, [2] ils sont les premiers à avoir démontré un transfert d'énergie assisté par des plasmons entre deux particules fluorescentes à longue distance. Deux émetteurs de longueurs d'onde différentes, un donneur émettant dans le rouge et un accepteur émettant dans le vert, sont disposés au hasard sur un nanofil d'argent. La détection de la fluorescence est ensuite fixée soit sur le donneur soit sur l'accepteur (figures 1.1.a-b) pendant

qu'un laser excite la structure. Lorsqu'on excite uniquement l'accepteur (point 4 de la figure 1.1.d), aucune fluorescence n'est perçue pour le donneur (point 5 de la figure de la 1.1.d). Alors que dans le cas inverse, lorsque le donneur est excité par le laser (point 2 de la figure 1.1.c), un transfert de fluorescence est observé pour l'accepteur (point 1 de la figure 1.1.c) et pour un autre donneur délocalisé (point 3 de la figure 1.1.c). L'efficacité du transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur dans le deuxième cas, environ 7 fois supérieure à celui de l'excitation directe de l'accepteur par le laser, met en évidence l'intérêt de l'excitation à distance des plasmons de surface pour maximiser les interactions lumière - matière.

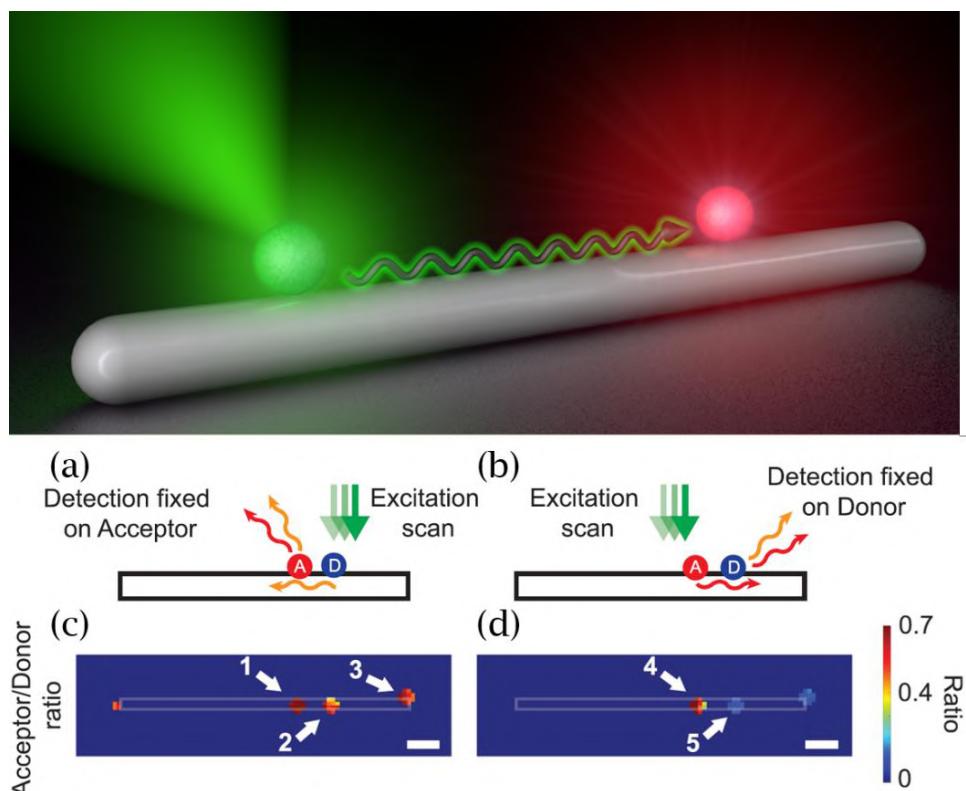


Figure 1.1 : Schéma de principe du transfert d'énergie entre les nanoparticules fluorescentes du donneur et de l'accepteur. (a, b) Schéma expérimental avec la détection fixée sur l'accepteur (a) ou le donneur (b) pendant que l'excitation laser balaye le nanofil d'argent. Des images de fluorescence de deux canaux de détection correspondant à l'émission de l'accepteur et à l'émission du donneur sont enregistrées. Ces images sont ensuite utilisées pour calculer les rapports (c,d) des intensités mesurées de l'accepteur et du donneur. Les points désignent les positions de : 1 et 4 l'accepteur, 2 et 5 le donneur, 3 un donneur délocalisé. Les barres d'échelles font 1 μm . Schémas et figures reproduits avec autorisations de la référence [1].

Cependant, les assemblages de cet article ont été réalisés par dispersion aléatoire des émetteurs sur un substrat recouvert de nanofils. L'utilisation de ce phénomène reste donc actuellement limitée par le manque de contrôle structural et fonctionnel de ces assemblages. Le passage sur des systèmes 2D permet par ailleurs d'utiliser ce transfert d'énergie pour faire du routage, mais demande un positionnement très précis. Les études sur des structures plasmoniques permettant

de faire du routage sont donc actuellement excitées par un laser en champ lointain. [3] Pouvoir contrôler le positionnement de particules émettrices est donc un point clé pour le contrôle de ce genre de structures.

Dans ce chapitre, nous allons introduire les principes nécessaires à la compréhension des systèmes hybrides plasmon-émetteurs, dont la construction est le but de cette thèse. Ce chapitre est construit selon le plan imagé figure 1.2.

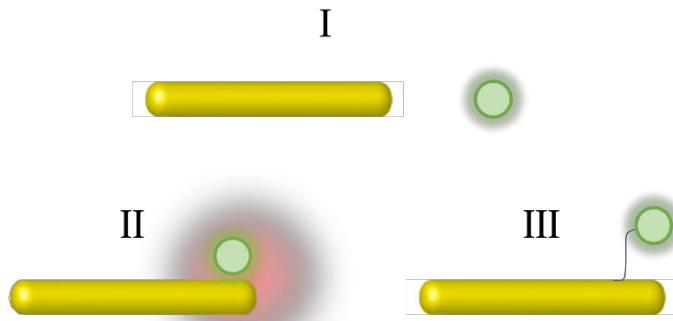


Figure 1.2 : Figure illustrant le plan de chapitre. I : Description des propriétés des particules plasmoniques et émettrices seules. II : Description des propriétés des structures hybrides. III : Description des différentes méthodes d'assemblage de la littérature.

Nous allons tout d'abord parler des propriétés optiques des particules plasmoniques et émettrices seules, puis des propriétés optiques des structures hybrides, avant de nous intéresser aux diverses méthodes d'assemblage connues qui nous ont inspiré pour la réalisation de nos assemblages hybrides.

I.2 - Des plasmons de surface à la plasmonique

I.2.1 - Les plasmons-polaritons de surface (SPP)

Les plasmons polaritons de surface (SPP pour *surface plasmon polaritons*), sont des ondes électromagnétiques de surface qui consistent en oscillations cohérentes d'électrons délocalisés existants à l'interface entre deux matériaux. [2] L'application des équations de Maxwell pour une interface plane entre un métal (de constante diélectrique $\epsilon_m(\omega)$, avec $\text{Re}[\epsilon_m] < 0$) et un milieu diélectrique (de constante ϵ_d , avec $\epsilon_d > 0$) identifie des solutions avec une propagation le long de l'interface (direction Ox) pénétrant de manière évanescente perpendiculairement à celle-ci (direction Oz). La figure 1.3 représente la progression des SPP entre un métal et un diélectrique.

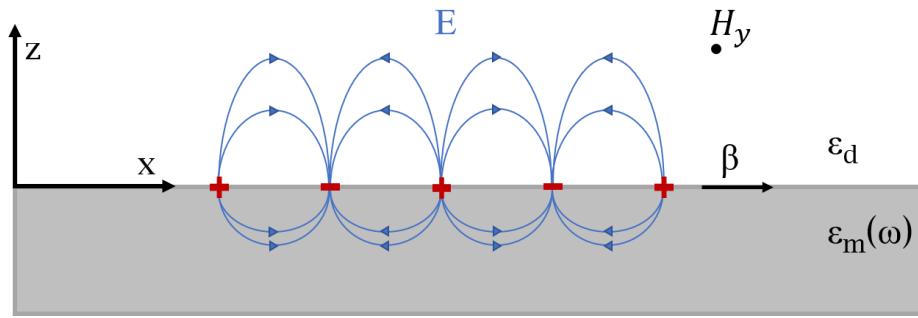


Figure 1.3 : Schéma de la propagation des SPP à une interface entre un métal et un diélectrique avec des constantes diélectriques $\epsilon_m(\omega)$ et ϵ_d .

Deux solutions avec des propriétés de polarisation différentes peuvent être prises en compte pour la propagation de ces ondes. La première, où seules les composantes des champs électrique \mathbf{E} et magnétique \mathbf{H} : H_x , H_z et E_y sont non nulles, est appelée mode à polarisation électrique transverse (TE pour *transverse electric*). Les expressions associées à ce mode sont :

pour $z > 0$

$$E_y(z) = A_d e^{i\beta x} e^{-k_d z} \quad (1.1)$$

$$H_x(z) = -iA_d \frac{1}{\omega\mu_0} k_2 e^{i\beta x} e^{-k_d z} \quad (1.2)$$

$$H_z(z) = A_d \frac{\beta}{\omega\mu_0} e^{i\beta x} e^{-k_d z} \quad (1.3)$$

pour $z < 0$

$$E_y(z) = A_m e^{i\beta x} e^{k_m z} \quad (1.4)$$

$$H_x(z) = iA_m \frac{1}{\omega\mu_0} k_1 e^{i\beta x} e^{k_m z} \quad (1.5)$$

$$H_z(z) = A_m \frac{\beta}{\omega\mu_0} e^{i\beta x} e^{k_m z} \quad (1.6)$$

où β est la constante de propagation dans la direction Ox ; k_i ($i = d, m$) est la composante du vecteur d'onde perpendiculaire à l'interface du milieu diélectrique et du métal respectivement ; μ_0 est la perméabilité magnétique du vide ; ω est la pulsation de l'onde plane. La continuité des composantes E_y et H_x à l'interface, impose que les conditions suivantes doivent être observées : $A_m(k_m + k_d) = 0$ et $A_m = A_d$. Les ondes étant confinées à la surface du métal, les vecteurs d'onde doivent respecter $\text{Re}[k_m] > 0$ et $\text{Re}[k_d] > 0$, menant à $A_m = 0$ donc $A_m = A_d = 0$. Il n'existe donc pas de SPP pour le mode TE.

La seconde, appelée mode à polarisation magnétique transverse (TM pour *transverse magnetic*) correspond à la configuration où les composantes non nulles du champ sont : E_x , E_z et H_y . Les expressions associées à ce mode sont :

pour $z > 0$

$$H_y(z) = A_d e^{i\beta x} e^{-k_d z} \quad (1.7)$$

$$E_x(z) = iA_d \frac{1}{\omega\epsilon_0\epsilon_d} k_d e^{i\beta x} e^{-k_d z} \quad (1.8)$$

pour $z < 0$

$$H_y(z) = A_m e^{i\beta x} e^{k_m z} \quad (1.10)$$

$$E_x(z) = -iA_m \frac{1}{\omega\epsilon_0\epsilon_m(\omega)} k_m e^{i\beta x} e^{k_m z} \quad (1.11)$$

$$E_z(z) = -A_m \frac{\beta}{\omega \varepsilon_0 \varepsilon_d} e^{i\beta x} e^{-k_d z} \quad (1.9) \quad E_z(z) = -A_m \frac{\beta}{\omega \varepsilon_0 \varepsilon_m(\omega)} e^{i\beta x} e^{k_m z} \quad (1.12)$$

où ε_0 est la permittivité électrique du vide. Afin d'observer la continuité des composantes H_y et E_z à l'interface, les composantes A_d et A_m doivent être égales et l'expression suivante doit être respectée :

$$\frac{k_d}{k_m} = -\frac{\varepsilon_d}{\varepsilon_m(\omega)}. \quad (1.13)$$

De plus, l'expression de H_y doit remplir l'équation différentielle suivante :

$$\frac{\partial^2 H_y}{\partial z^2} + (k_0^2 \varepsilon - \beta^2) H_y = 0, \quad (1.14)$$

avec $k_0 = \omega/c$ le vecteur d'onde de propagation dans le vide, entraînant les conditions suivantes :

$$k_m^2 = \beta^2 - k_0^2 \varepsilon_m \quad (1.15)$$

$$k_d^2 = \beta^2 - k_0^2 \varepsilon_d. \quad (1.16)$$

Ces équations nous donnent la relation de dispersion entre le vecteur d'onde β et la pulsation ω des SPP se propageant le long d'une interface entre deux milieux :

$$\beta = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_m(\omega) \varepsilon_d}{\varepsilon_m(\omega) + \varepsilon_d}}. \quad (1.17)$$

La relation de dispersion $f(\beta) = \omega$ pour une interface métal-diélectrique et la relation de la dispersion de la lumière dans le milieu diélectrique sont tracées en figure 1.4. Il est impossible pour les deux courbes de se croiser, ce qui implique qu'il est irréaliste de coupler une onde électromagnétique propagative avec un plasmon de surface.

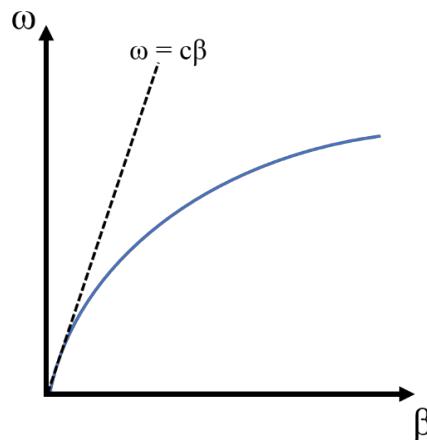


Figure 1.4 : Courbe de dispersion d'une onde plasmon de surface pour une interface métal/diélectrique. La droite en pointillé représente la relation de dispersion de la lumière dans le milieu diélectrique.

Pour pallier ce phénomène, diverses approches ont été explorées afin de coupler une onde lumineuse à un plasmon de surface. Dont en 1968, l'emploi d'un prisme en configuration de réflexion totale interne a été utilisé. Il génère une onde évanescante de Fresnel qui a pour effet de dissiper la différence de dispersion dans le verre pour se coupler à un plasmon à la surface d'un métal avec l'air. [3,4] D'autres méthodes d'excitation des SPP consistent à utiliser une pointe de microscope en champ proche (fibre optique effilée), engendrant des ondes évanescentes ou encore un flux d'électrons émis par courant tunnel, depuis une pointe de STM placée à proximité de la surface. [7-9] L'excitation des ondes SPP nécessite donc souvent d'avoir recours à des dispositifs expérimentaux plutôt contraignants. Cependant, nous souhaitons dans cette thèse nous positionner dans le cas d'un émetteur ponctuel situé à la surface, où tous les vecteurs \mathbf{k} sont excités et où ce problème ne se pose plus.

I.2.2 - Les plasmons de surface localisés (LSP)

Les plasmons de surface localisés (LSP pour *localized surface plasmons*) proviennent d'une structure métallique et ne se propagent pas dans le matériau, contrairement aux SPP, mais peuvent être excités directement par irradiation lumineuse. [2] Ces modes surviennent naturellement dans le cas de petites nanoparticules conductrices placées dans un champ électromagnétique oscillant. La surface multifacettée des nanocristaux exerce une force de rappel sur les électrons excités par le champ électromagnétique, entraînant une résonance provoquant une amplification du champ à l'intérieur et dans le champ proche de la particule. Cette résonance est appelée résonance plasmon de surface localisée (LSPR pour *localized surface plasmon resonance*).

Dans le cas simple d'une résonance plasmonique dipolaire d'une sphère métallique avec un diamètre d très inférieur à la longueur d'onde λ du champ incident $\mathbf{E} = E_0 \mathbf{z}$, nous pouvons utiliser, dans une approximation quasi-statique, l'équation de Laplace réduite :

$$\nabla^2 \phi = 0 \quad (1.18)$$

où ϕ est le potentiel scalaire relié au champ électrique \mathbf{E} par :

$$\mathbf{E} = -\nabla \phi. \quad (1.19)$$

Le potentiel à l'extérieur de la sphère peut s'écrire avec le moment dipolaire \mathbf{p} comme :

$$\phi_{out} = -E_0 r \cos \theta + \frac{\mathbf{p} \cdot \mathbf{r}}{4\pi \epsilon_0 \epsilon_m r^3} \quad (1.20)$$

où θ est l'angle entre le vecteur position \mathbf{r} à un point P et l'axe z. Le champ appliqué induit un moment dipolaire à l'intérieur de la sphère d'une magnitude proportionnelle à $|E_0|$, $\mathbf{p} = \epsilon_0 \epsilon_m \alpha \mathbf{E}_0$ avec la polarisabilité de la nanoparticule :

$$\alpha = 4\pi d^3 \frac{\epsilon(\omega) - \epsilon_m}{\epsilon(\omega) + 2\epsilon_m}, \quad (1.21)$$

où ϵ_m et ϵ sont respectivement la permittivité du métal et du milieu environnant. Il est apparent que la polarisabilité possède une exaltation de la résonance pour $|\epsilon+2\epsilon_m|$ minimum. Ce qui, pour une variation de $3m[\epsilon]$ autour de la résonance, peut se simplifier par : $\Re[\epsilon(\omega)] = -2\epsilon_m$. Cette condition est satisfaite dans le cas de métaux avec une conductivité élevée dont la part réelle de la permittivité est négative dans le domaine du visible. L'équation précédente montre que la polarisabilité de la nanoparticule dépend de sa taille d , de sa forme ($4\pi d^3$ étant proportionnel au volume d'une sphère) et des permittivités ϵ_m et ϵ . La figure 1.5 présente le principe de résonance LSPR avec les spectres d'absorption associés pour un colloïde sphéroïdal.

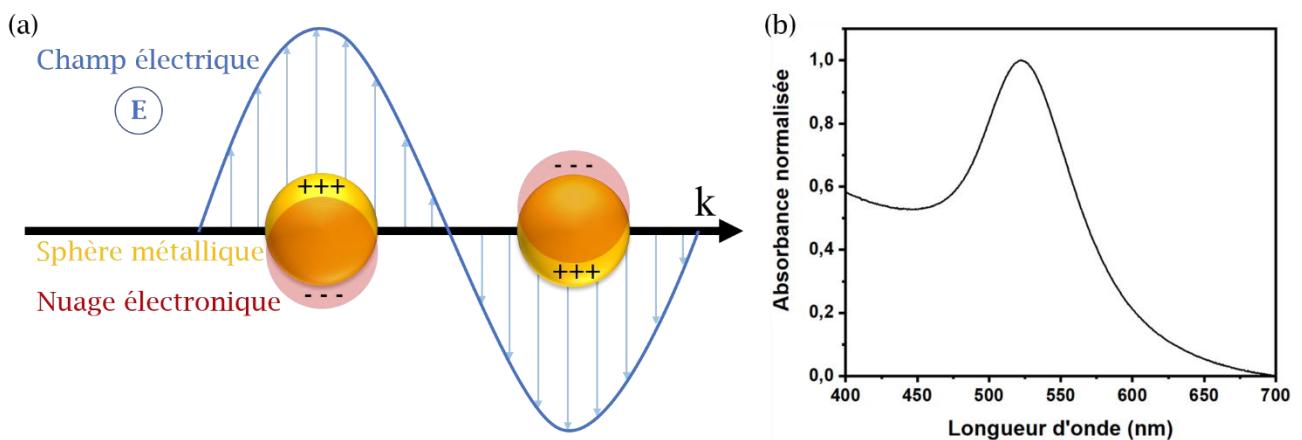


Figure 1.5 : (a) Schéma de l'interaction entre des particules métalliques sphériques et un champ électrique lumineux qui induit une résonance plasmon. (b) Spectre d'absorption d'une suspension colloïdale de particules d'or.

Pour des nanocristaux plus grands ou plus complexes, l'approche quasi-statique n'est plus valide et la force de rappel de Coulomb sur le nuage électronique diminue, ce qui résulte par l'émergence des modes de résonance d'ordre élevé. La polarisabilité de la particule peut alors s'exprimer comme :

$$\alpha = \frac{V}{L} \left(\frac{\epsilon(\omega) - \epsilon_m}{\epsilon(\omega) + \left(\frac{1-L}{L} \right) \epsilon_m} \right) \quad (1.22)$$

où L est le facteur de dépolarisation dépendant de la forme et V le volume de la particule. Dans les conditions de résonance, la permittivité devient $\epsilon(\omega) = -\left(\frac{1-L}{L}\right)\epsilon_m$. L'équation précédente prouve clairement l'influence de la forme sur la résonance plasmonique. Dans le cas de nanobâtonnet par exemple, l'asymétrie de la nanostructure induit deux états de polarisation du champ électromagnétique pour chaque axe de symétrie. Les schémas en figure 1.6.a illustrent les deux modes de résonance LSPR possibles pour un nanobâtonnet induit par l'asymétrie de la nanoparticule. La figure 1.6.b montre le spectre d'absorption associé aux deux pics issus des deux modes de résonance.

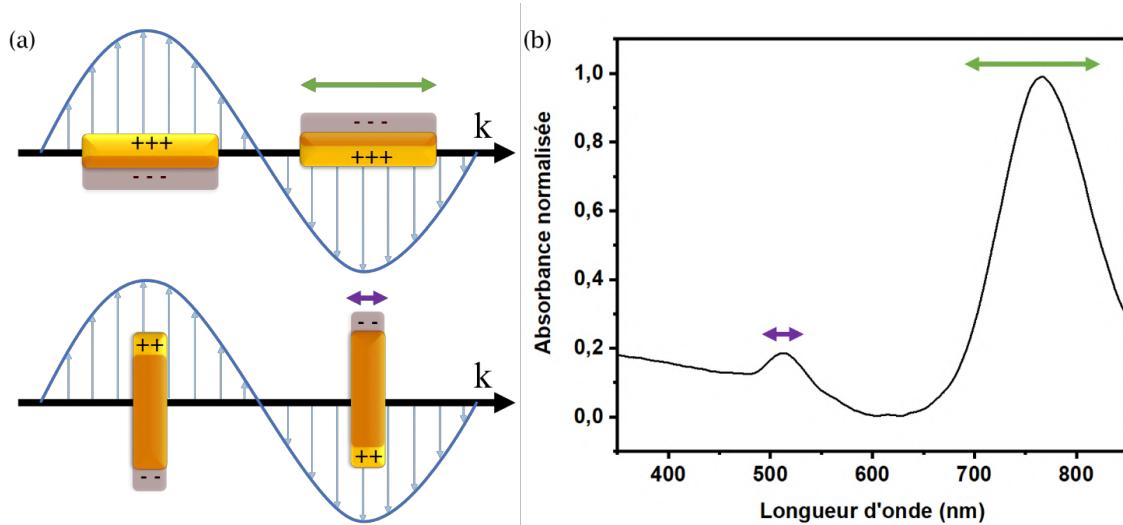


Figure 1.6 : (a) Schéma de l’interaction entre des nanobâtonnets métalliques et un champ électrique lumineux induisant une résonance plasmon. (b) Spectre d’absorption d’une suspension de particules d’or.

Les LSP, contrairement aux SPP, ne permettent pas la propagation longue distance d’un plasmon du fait de leur petite taille. Un transport d’énergie est toutefois possible lors d’un couplage entre particules. Cependant, ce type d’assemblage demande de limiter les pertes dissipatives et radiatives, ce qui nécessite un agencement et une orientation régulière. Les méthodes pour obtenir des structures avec une organisation précise sont détaillées dans la troisième partie de cette thèse.

I.2.3 - Densité locale d’états plasmoniques (SPLDOS)

La densité d’états (DOS pour *density of states*) est une fonction scalaire qui pour une énergie donnée permet d’accéder au nombre total d’états disponibles. Elle quantifie le nombre d’états que des particules (électrons, photons) ou des quasi-particules (phonons, trous électroniques) peuvent occuper à une énergie E dans un système et s’exprime avec une distribution de Dirac :

$$\rho(\omega) = \sum_n \delta(\omega_n - \omega) \quad (1.23)$$

où ω_n est la pulsation du champ électrique associé au n-ième mode propre. [5]

La densité locale d’états (LDOS pour *local density of states*) tient compte des variations spatiales. Pour un champ électromagnétique, cette grandeur s’appelle densité d’état photonique et se déduit de la DOS en multipliant chacun des termes qui la composent par le module au carré du champ E associé :

$$\rho(\mathbf{r}, \omega) = \sum_n |E_n(\mathbf{r}, \omega_n)|^2 \delta(\omega_n - \omega) \quad (1.24)$$

Elle décrit la probabilité de détecter, par unité de volume, l'intensité du champ électromagnétique à la position \mathbf{r} pour un photon d'énergie $\hbar\omega$. La version la plus pratique d'utilisation de cette équation est celle faisant intervenir la représentation spectrale du propagateur, le tenseur dyadique de Green $\mathcal{S}(\mathbf{r}, \mathbf{r}, \omega)$ dans la base formée par les vecteurs $E_n(\mathbf{r}, \omega_n)$.

$$\rho(\mathbf{r}, \omega) = \frac{1}{2\pi^2\omega} \operatorname{Im}[\operatorname{Tr} \mathcal{S}(\mathbf{r}, \mathbf{r}, \omega)] \quad (1.25)$$

Cette formule permet de calculer la LDOS photonique en fonction de la fréquence et en tout point de l'espace autour des objets métalliques. Elle décrit quantitativement le spectre continu des différents modes électromagnétiques du système, indépendamment du champ exciteur.

Cette relation est cependant nulle à l'intérieur du métal, remplacée par la densité locale plasmonique. En effet, les propriétés mesurées, comme la génération de chaleur et la perte d'énergie d'un électron incident aux points chauds de la particule, sont sondées par des techniques expérimentales, telles que la microscopie de photoluminescence non linéaire (NPL pour *non-linear photon luminescence microscopy*), la spectroscopie des pertes d'énergie électroniques (EELS pour *electron energy loss spectroscopy*) ainsi que par cathodoluminescence (CL) qui proviennent de la surface du métal et donc des plasmons. Il est communément accepté maintenant, que si le système ne subit pas de perte d'énergie ou de très faible, le formalisme peut être appliqué aux plasmons de surface qui peuvent être assimilés à des quasi-particules pour définir une densité locale d'états des plasmons de surface (SPLDOS pour *surface plasmon local density of states*). [6] Cette dernière correspond à la densité locale d'états occupés par des oscillations collectives d'électrons à l'intérieur d'un nanocristal métallique et est, contrairement à la LDOS photonique, nulle à l'extérieur du métal. Cependant, selon les équations de Maxwell, il doit y avoir une relation de continuité des champs électromagnétiques à l'extérieur et à l'intérieur de la particule. Ceci signifie que ces deux densités d'états sont étroitement liées au plus près de l'interface de l'objet.

La figure 1.7.a montre une carte simulée du carré de la SPLDOS d'un nanoprisme de 600 nm de côté par TPL convoluée avec un faisceau polarisé circulairement de longueur d'onde 800 nm et de 50 nm de diamètre. Elle est mise en vis-à-vis avec une carte de la LDOS photonique du même objet dans un plan placé à 25 nm au-dessus de sa surface. Nous pouvons remarquer que ces deux cartes sont très similaires à l'exception de la part dominante à la périphérie extérieure du prisme pour la LDOS photonique. [12]

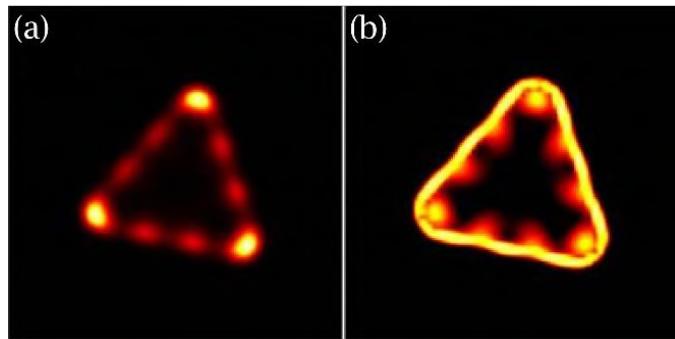


Figure 1.7 : (a) Carte TPL simulée d'un triangle de 600 nm de côté pour une mesure TPL avec un faisceau de diamètre 50 nm. (b) Carte de la LDOS photonique du même objet dans un plan placé 25 nm au-dessus de la surface. Figures reprises avec autorisations de la référence [12].

L'ingénierie des modes plasmons et notamment de leur LDOS à des fins applicatives aboutit à une technique appelée plasmonique.

I.3 - Propagation et délocalisation des modes plasmoniques

L'amplitude des SP le long de la direction de propagation en dehors de la zone d'excitation diminue sous la forme $e^{-2 I_m [\beta]}$, [13] où β est le vecteur d'onde complexe parallèle à la surface donné par la relation de dispersion (1.17). Dans un film non structuré, la longueur de propagation L est définie par la décroissance exponentielle de l'intensité des plasmons de surface et est donnée par :

$$L = \frac{1}{2 I_m [\beta]} \quad (1.26)$$

Par conséquent, L est déterminée par la partie imaginaire de β , qui tient compte entre autres, des processus d'amortissement internes dus à la conductivité électrique finie du métal aux fréquences de la lumière.

La particule plasmonique réagit également à l'émission du fluorophore. Si la plaquette possède des modes délocalisés, un de ceux-ci peut être adressé par l'émission de lumière de la particule émettrice et l'information est ensuite transmise à un autre endroit de la plaquette par propagation des plasmons, vus ici comme une onde transversale. Le temps de propagation de cette onde est cependant extrêmement rapide (entre 20 et 40 femto seconde pour un film métallique de 10 µm) et donc considéré comme immédiat dans des nanoparticules. [14] Un autre point de vue, formel, de ce phénomène est de considérer que l'excitation des plasmons entraîne le peuplement du mode délocalisé de manière instantanée.

Des études sur les plasmons de surface dans les métaux nobles ont révélé que l'énergie lumineuse peut être confinée dans des volumes de dimensions inférieures à la longueur d'onde [15] ou se propager dans des pistes [16] et des rainures métalliques [17] sur des dizaines de micromètres. Si on prend un guide plasmonique (par exemple une bande d'or faite par lithographie) et que l'on réduit

sa largeur, les SPP qui s'y propagent se dissipent très fortement quand la largeur devient inférieure à 1 μm. Dans ce cas, la propagation des plasmons n'offre pas d'avantage par rapport à la fibre optique. Pour éviter la dissipation, des alternatives à la bande d'or lithographiée ont été approchées, telles que les nanofils cristallins, des chapelets de petits disques faits par lithographie, où les modes dipolaires de chaque plot sont couplés ensemble en un mode délocalisé. [18] Le principal problème de ce dernier système est dû à la sensibilité de ce couplage à la taille, la forme et l'espacement des plots. Comme la lithographie ne permet pas de faire de petits espacements entre les plots, le couplage des modes dipolaires est donc faible. Dans le cas de chaînes de nanoparticules, la petite taille des particules et leur espacement, réduit à 1 nm environ, entraînent une augmentation locale importante du champ proche.

Ce phénomène est notamment mis en évidence dans des réseaux auto-assemblés de chaînes de nanoparticules d'or de 10 nm de diamètre. [19] Les structures sont obtenues par interactions dipolaires attractives et forment des chaînes de nanoparticules articulées en réseaux macroscopiques. La SP-LDOS est étroitement confinée latéralement à quelques dizaines de nanomètres autour des chaînes. Sous irradiation d'un faisceau électronique focalisé, les espaces interparticulaires se réorganisent et forment des ponts d'or métalliques par déplacement d'une petite fraction des atomes d'or ce qui préserve par ailleurs la morphologie native des chaînes de particules. Ces structures présentent alors une métallicité continue du fait de la fusion partielle des particules (figure 1.8.a). Il en résulte que les plasmons localisés, initialement portés par les nanoparticules individuelles et couplés entre eux dans les chaînes auto-assemblées, laissent la place à des modes plasmons délocalisés le long des chaînes fusionnées. Cependant, des motifs de points chauds fortement contrastés et dépendants de l'énergie apparaissent, ce qui suggère une adressabilité d'entrée/sortie spatiale et spectrale à l'échelle nanométrique de l'énergie lumineuse dans ces réseaux de chaînes fusionnées. L'émergence de modes des plasmons de surface (SP) est observée par EELS jusqu'à une énergie faible (0,38 eV) adaptée à la propagation à longue distance (plusieurs microns) dans des guides d'ondes de section nanométrique (figure 1.8.b).

La richesse des modes SP à haute et basse énergie dans les réseaux de chaînes fusionnées, ouvre la possibilité d'un adressage spectral et d'un contrôle spatial de l'énergie lumineuse à l'échelle du nanomètre. Deux modes de même énergie peuvent être reliés par un canal de transfert d'énergie.

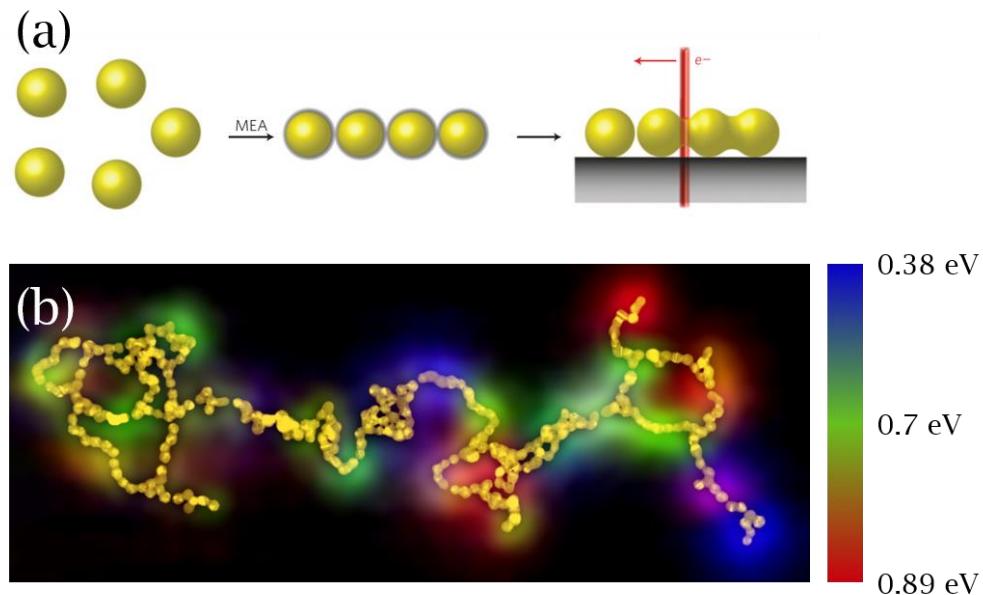


Figure 1.8 : (a), Schéma d'auto-assemblage d'une chaîne de particules d'or et leur conversion en chaîne de perles continues par soudage induit par faisceau d'électrons. (b) Carte modélisant une chaîne de particules montrant différents modes. Les couleurs sont associées à différents niveaux d'énergie. Basée sur des cartes EELS. Schéma et carte repris avec autorisations de la référence [19].

Les cartes EELS permettent de voir la SPLDOS d'une particule, mais pour caractériser la propagation d'un mode, d'autres mesures expérimentales sont nécessaires comme la microscopie de fuite radiative (LRM, *leakage-radiative microscopy*) [3] ou la microscopie par réflexion totale interne (TIR, *total internal reflection*). Les premiers travaux de propagation de plasmon dans une nanoparticule ont été reportés pour des nanofils par Dickson et coll. en 2000 [20] puis par Ditlbacher et coll. en 2005. [21]

Cette propagation des modes plasmons couplés à l'exaltation de fluorescence produite lors du couplage avec des émetteurs rend donc possible le transfert d'information d'un fluorophore donneur vers un accepteur, comme présenté dans l'avant-propos de ce chapitre. Ce qui rend également possible le transfert d'énergie par résonance sur des distances de quelques microns grâce à l'assistance de la propagation des plasmons. [1]

I.4 - Confinement et structure modale des plasmons dans des particules

Les structures métalliques macroscopiques possèdent des propriétés de propagation et de guides d'ondes des SPP, alors que les structures nanométriques possèdent des résonances LSP et un confinement fort. La combinaison de ces phénomènes se fait pour des tailles intermédiaires de structures métalliques micrométriques. Ces dernières possèdent des modes plasmons d'ordre élevé qui

comparés à ceux des nanoparticules, se rapprochent en énergie jusqu'à produire un pseudo-continuum. La figure 1.9 montre des images de microscopie électronique en transmission (TEM) et des cartes d'intensité EELS associées de nanobâtonnets d'argent de trois longueurs différentes : (a) 630 nm, (b) 1250 nm et (c) 3230 nm. On voit que plus les structures sont grandes, plus le nombre de modes disponibles augmente et plus les modes se rapprochent en distance.

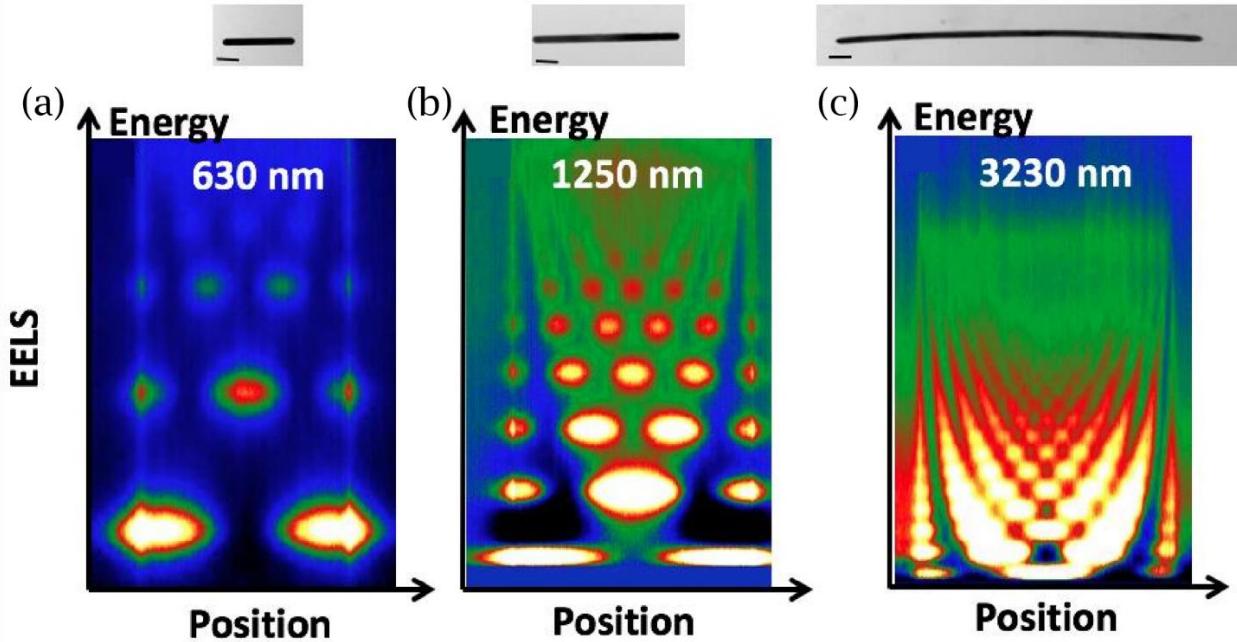


Figure 1.9 : Carte d'intensité de l'EELS mesurée sur des nano-bâtonnets métalliques de trois tailles différentes (a) 630 nm, (b) 1250 nm et (c) 3230 nm respectivement. Les images SEM des barres métalliques sont présentées au-dessus des cartes EELS. Les barres d'échelle en noir sont de 200 nm. Ce travail, non publié, a été réalisé précédemment en collaboration entre E. Dujardin et M. Bosman à l'IMRE de Singapour.

En fonction des propriétés plasmoniques que l'on souhaite utiliser, il est donc important de bien choisir la taille des colloïdes métalliques. Dans les travaux qui suivent, notre but est principalement de considérer le régime micrométrique, afin d'avoir un couplage efficace et donc des structures modales avec des SP délocalisés à une distance permettant le transfert d'énergie par plasmon de surface.

I.5 - Choix du métal plasmonique

Les plasmons de surfaces localisés n'interviennent que dans des nanoparticules constituées d'un métal très conducteur. Parmi les métaux les plus conducteurs, on retrouve notamment : l'or (Au), l'argent (Ag), l'aluminium (Al) et le cuivre (Cu) qui sont les éléments les plus utilisés pour la réalisation de structures plasmoniques. Dans cette thèse, nous avons décidé de nous focaliser sur les particules d'or.

Sous forme de nanoparticule, l'or garde une stabilité chimique. En effet, il ne se dégrade pas, même dans des milieux environnants jugés agressifs tout en affichant de nouvelles propriétés de catalyse et d'optique. Les nanoparticules d'or sont donc connues pour leur biocompatibilité et sont par conséquent beaucoup utilisées pour des applications médicales.

Les principales particularités qui ont guidé notre choix vers l'or sont l'existence d'une très vaste bibliographie pour la synthèse de diverses formes et la simplicité et reproductibilité de ces nanoparticules. Les structures réalisées sont par la suite chimiquement stables sur des mois, voire des années, sans presque aucune altération des caractéristiques. Leur utilisation lors d'assemblages est grandement facilitée par l'affinité du soufre pour les atomes d'or. Enfin, la position du pic de résonance LSP des prismes d'or se trouve dans la gamme de 500 à 1000 nm qui correspond aux émissions de fluorescence de la plupart des émetteurs connus, ce qui est également le cas des particules d'argent et de cuivre, voir figure 1.10. [22] Afin d'obtenir un couplage efficace entre ces deux types de particules au moment de l'assemblage hybride, il est primordial d'accorder leurs propriétés optiques spectralement. La résonance LSP des prismes d'argent, qui se situe dans la même gamme spectrale que l'or, mais bien que les synthèses de ces objets soient bien renseignées, leur reproductibilité ainsi que leur stabilité dans le temps n'atteignent pas celle de l'or. En effet, les particules d'argent doivent être utilisées pour les expériences optiques dans la semaine après la synthèse, car celles-ci s'oxydent. Pour ce qui est de l'aluminium, la chimie est très compliquée à maîtriser. Les études sur des objets en aluminium sont donc pour l'instant entièrement faites sur des objets issus de la lithographie. [23]

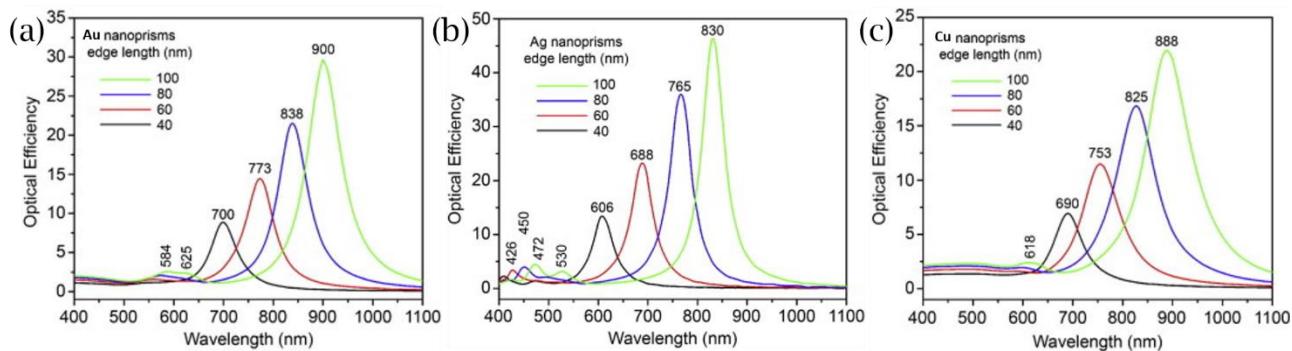


Figure 1.10 : (a) Spectres d'extinction UV-visible de nanoprismes triangulaires d'épaisseur 10 nm et de côté 40, 60, 80 et 100 nm (courbes noires, rouges, bleues et vertes, respectivement) pour (a) l'or, (b) l'argent et (c) le cuivre. Figures reproduites avec autorisation de la référence [22].

I.6 - Les émetteurs

La fluorescence est une émission lumineuse provoquée par l'excitation des électrons d'une molécule ou d'un matériau due à l'absorption d'un photon. La désexcitation non radiative des états vibrationnels permet à l'électron de rejoindre un niveau métastable. Le retour radiatif à l'état fondamental peut se faire par deux procédés : soit il peut être rapide, permis par symétrie et accompagné d'une émission spontanée appelée fluorescence, soit il est lent et l'émission spontanée dont il est accompagné, est appelée phosphorescence.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons envisagé d'utiliser différents types de particules émettrices en tant qu'émetteurs pour nos assemblages. Elles ont toutes des longueurs d'onde d'émission dans le domaine du visible non loin des résonances plasmons de nos systèmes. Les candidats sont présentés dans les paragraphes suivants. Nous conclurons sur les raisons qui nous ont poussés à en choisir certains plutôt que d'autres.

I.6.1 - *Les molécules fluorescentes*

Il existe une large diversité de molécules fluorescentes permettant de couvrir des émissions dans tout le champ du visible ainsi que le proche infrarouge et ultraviolet. Les fluorophores ont été utilisés dans l'imagerie médicale comme la fluorescéine (par son dérivé réactif aux amines et des applications étendues aux acides nucléiques (Carboxyfluorescein)), ou des dérivés de la rhodamine (TRITC), de la coumarine et de la cyanine. La plupart des fluorophores sont des composés organiques de petites molécules organiques de 20 à 100 atomes (200 à 1000 Daltons — le poids moléculaire peut être plus élevé en fonction des modifications greffées, et des molécules conjuguées). Des protéines fluorescentes naturelles beaucoup plus grandes sont également très utilisées : la GFP (pour *green fluorescent protein*) à 27 kDa est l'une des plus connues.

Ces molécules bien que pouvant fournir des signaux très intenses avec des rendements quantiques ϕ élevés (rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons ayant servi à l'excitation) qui manquent souvent de photo- et thermostabilité (par exemple, l'Alexa 488 $\phi = 92\%$ [24]).

I.6.2 - *Les quantum dots*

Les quantum dots (QD) sont des nanoparticules semi-conductrices composées à partir d'éléments des colonnes II-IV, III-V ou IV-VI du tableau périodique. [25] Ils sont fréquemment utilisés pour des applications optoélectroniques [26] (diodes, [27] cellules photovoltaïques, téléviseurs) ainsi qu'en biologie pour l'imagerie du vivant et les biocapteurs. [28] Ces particules permettent

d'obtenir des longueurs d'onde d'émission sur l'ensemble du spectre visible ainsi que dans l'ultraviolet et l'infrarouge, en faisant varier leur composition chimique et leur diamètre. Le rendement quantique des QD peut aller jusqu'à 90 %. Leur résistance au photoblanchiment est meilleure que pour les molécules fluorescentes, c'est-à-dire qu'ils se dégradent moins sous irradiation par lampe UV ou laser. Cependant, ceux-ci ont une tendance au photo-blinking, c'est-à-dire que leur état de fluorescence commute de manière aléatoire entre les états ON (lumineux) et OFF (sombre) sous une excitation continue. Bien que négligeable dans un grand ensemble (comme un film de molécules fluorescentes ou de QD), ces deux phénomènes sont très limitants lorsque l'on travaille sur particule individuelle.

Les quantum dots sont protégés par passivation de la surface avec une coquille qui enveloppe les cœurs. Elle est formée par un dépôt épitaxial cristallin constitué d'un autre semi-conducteur judicieusement choisi pour confiner les électrons dans le cœur (Figure 1.11) et protéger les propriétés optiques, afin d'empêcher des réactions de surface entre le cœur et le milieu environnant de se produire.

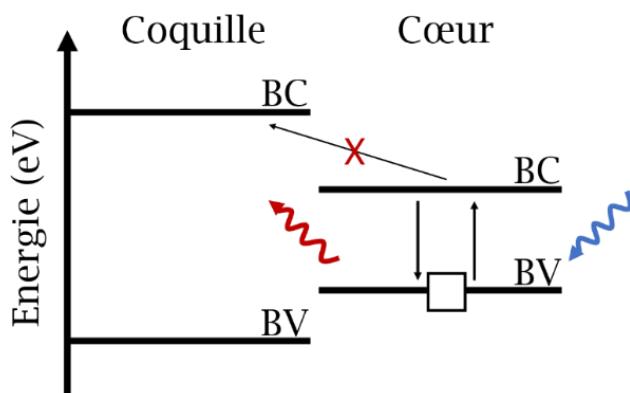


Figure 1.11 : Schéma d'absorption d'énergie par le cœur, suivie de la création d'une paire électron-trou. Le transfert vers la coquille est interdit, la désexcitation se fait donc de manière radiative.

La structure électronique des quantum dots est donc constituée de niveaux d'énergie discrets dont la bande de conduction (BC sur le schéma de la figure 1.11) est inoccupée (à $T = 0\text{K}$) et la bande de valence (BV) est remplie. De la même manière que l'absorption d'un photon par une molécule fluorescente permet d'exciter un électron, un apport énergétique suffisant par un quantum dot permet à un électron de quitter la bande de valence pour celle de conduction, provoquant un site vacant (un trou h^+) et formant une paire électron-trou appelée exciton. L'énergie nécessaire à sa création est supérieure à celle de la bande interdite E_{NC} , correspondant à l'écart entre BC et BV (figure 1.11). Elle dépend de celle du matériau E_{massif} ainsi que d'un terme lié au confinement quantique et d'un autre lié à l'interaction de l'exciton engendré lors du passage d'un électron de BV à BC. [24,29]

$$E_{NC} = E_{massif} + \frac{h^2\pi^2}{2r^2} \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) - \frac{1.8e^2}{4\pi\epsilon_r\epsilon_0 r} \quad (1.27)$$

où r est le rayon de la particule, h la constante de Planck et m_e^* et m_h^* les masses effectives respectives des électrons et des trous, ϵ_r et ϵ_0 Les permittivités diélectriques du matériau et du vide respectivement et e la charge élémentaire.

La désexcitation radiative (recombinaison de l'électron avec le trou localisé) engendre une émission de fluorescence, de la même manière que dans les molécules. L'énergie du photon émis est égale à celle de E_{NC} . Il a une longueur d'onde $\lambda = hc/E_{NC}$, où c est la vitesse de la lumière. En diminuant le rayon du semi-conducteur, on augmente l'écart de la bande interdite et la longueur d'onde du photon décroît. Les processus de recombinaison non radiatifs, quant à eux, sont responsables de la baisse du rendement quantique.

I.6.3 - Les oxydes dopés lanthanides

Les lanthanides désignent les 15 éléments situés à la sixième période et au groupe IIIB du tableau périodique, allant du lanthane au lutécium. Les ions lanthanides trivalents (Ln^{3+}) constituent l'état d'oxydation le plus courant et le plus stable, hormis Ce^{4+} , Tb^{4+} et Yb^{2+} .

Des transitions intraconfigurationnelles, partiellement autorisées confèrent des caractéristiques optiques avantageuses aux matériaux activés par le Ln^{3+} , notamment une excellente photostabilité, une longue durée de vie et des émissions à bande étroite. [30,31] Ln^{3+} est donc considéré comme un luminophore prometteur pour des applications telles que la bio-imagerie, [32] la détection, [33] la thérapie, [34–36] l'affichage [37] et les dispositifs photovoltaïques. [38] Selon les voies de transition concernées, la luminescence du Ln^{3+} peut être excitée par un photon à haute énergie ou lors de la conversion ascendante par des photons à plus faible énergie, généralement de la lumière proche infrarouge. [39] Ces particules d'oxyde dopées aux terres rares ont également montré une grande résistance au photoblanchiment, ainsi qu'un clignotement (photo-blinking) de la fluorescence très limité par rapport au QD. [40] Au cours de la dernière décennie, des méthodes de synthèse en solution ont été explorées pour préparer des nanoparticules à base de Ln^{3+} de différentes formes. Leur distribution de taille, la morphologie et les facettes sont contrôlées. La figure 1.12 montre un exemple de la variété de particules qui peuvent être obtenues. [41]

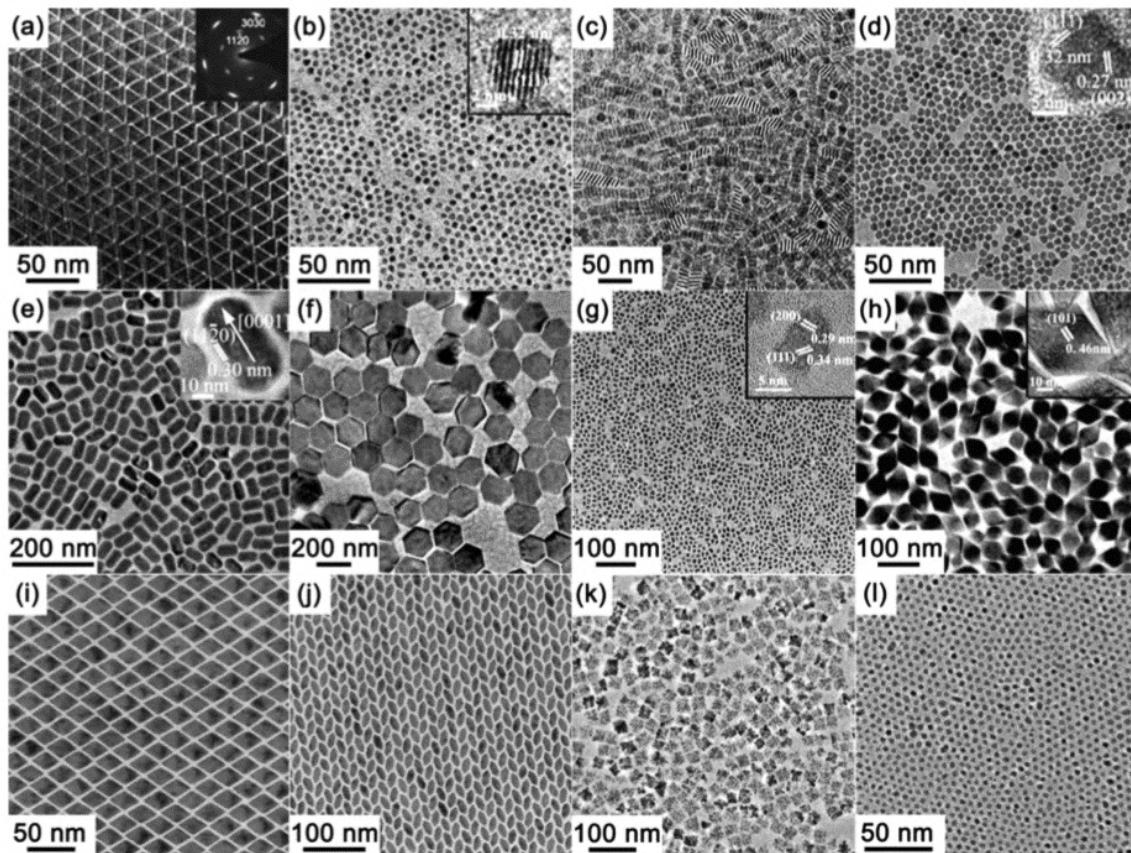


Figure 1.12 : Image TEM de particules de différentes tailles de (a) LaF_3 , (b) LaOF:Eu , (c) LaOCl , (d) NaYF_4 cubiques, (e) NaYF_4 hexagonales, (f) $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}$ hexagonales, (g) KPrF_4 , (h) LiErF_4 , (i) DyF_3 , (j) TbF_3 , (k) CeO_2 et (l) CeO_2 . Figures reprises avec autorisations de la référence [41].

I.6.4 - Les clusters d'or

Les clusters métalliques sont des agrégats composés d'un cœur comptant un nombre restreint et défini d'atomes de métaux nobles, typiquement de moins de dix à une centaine, entouré de ligands. [42-44] Lorsque la taille de l'amas atteint une longueur inférieure à celle de Broglie ($\sim 3 \text{ nm}$), le confinement des électrons de conduction induit des propriétés optiques (absorption et émission) nettement différentes de celles des nanoparticules plus grosses. [45] Les spectres d'absorption présentent de multiples bandes (sous forme de bosses), indiquant l'existence de niveaux d'énergie quantifiés, qui leur confèrent des propriétés de fluorescence tandis que le comportement plasmonique n'est plus observé (un spectre d'absorption typique d'un nanocluster d'or constitué de 25 atomes d'or est présenté sur la figure 1.13).

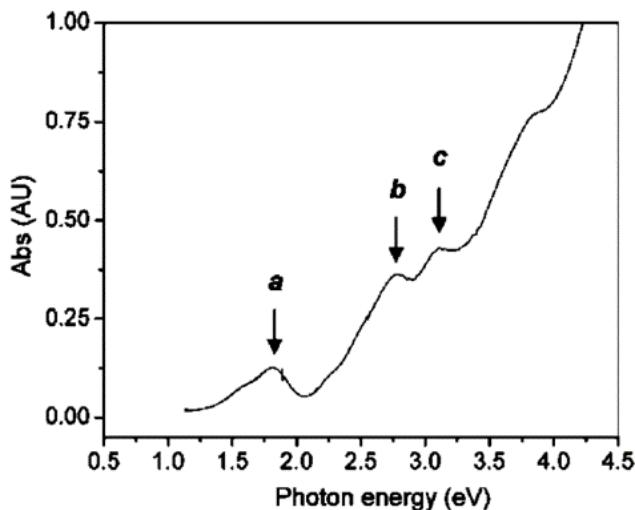


Figure 1.13 : Spectre d'absorption de nanoclusters Au_{25} dans du toluène. Les lettres a, b, c indiquent les bandes d'absorption du cluster. Reproduit avec autorisation depuis la référence [45].

Leur structure électronique a été interprétée par le modèle des superatomes, [46–48] qui est basé celui du « Jellium » correspondant à des électrons confinés dans un puit de potentiel sphérique symétrique du noyau métallique. La longueur d'onde d'émission des AuNCs fluorescents dépend alors de la taille de leurs noyaux :

$$\lambda_{em} = \frac{E_f}{N^{\frac{1}{3}}} \quad (1.28)$$

où λ_{em} est la longueur d'onde d'émission, E_f l'énergie de Fermi de l'or (5.26 eV) et N le nombre d'atomes du cluster. Le modèle de Jellium n'est pas strictement valide pour les petits clusters ($N < 20$), qu'ils soient stabilisés avec une enveloppe de ligands [49,50] ou avec des chaînes oligomériques. [51] Dans ce cas, les calculs basés sur la théorie de la fonctionnelle de la densité TD-DFT sont généralement appliqués à condition que la structure précise des AuNC soit connue. [52] Cependant, il a été démontré qu'une première approximation peut être faite avec le modèle simple du Jellium jusqu'à $N = 3$ (figure 1.14). [48]

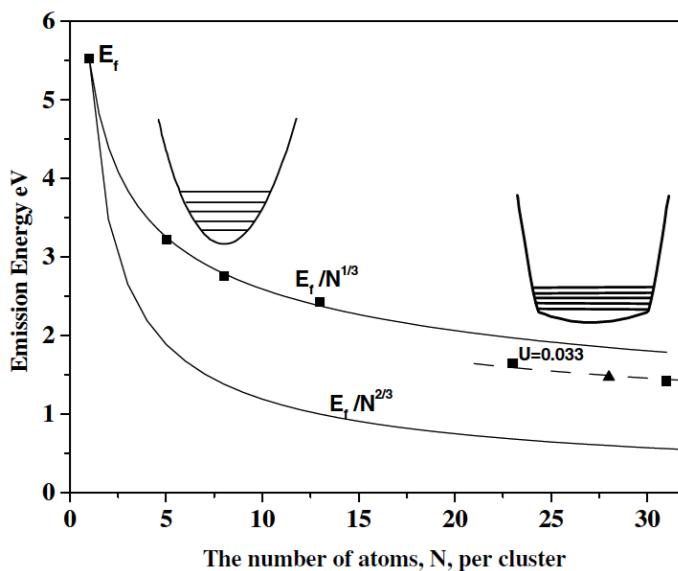


Figure 1.14 : Corrélation du nombre N d'atomes avec le modèle du Jellium ($E_f/N^{1/3}$) par nanocluster avec l'énergie d'émission. L'énergie d'émission diminue avec l'augmentation du nombre d'atomes. Le modèle de Bohr, utilisé pour les semi-conducteurs ($E_f/N^{2/3}$) est également montré pour délimiter les différentes lois d'échelle des métaux et semi-conducteurs confinés. Les mesures de l'émission de clusters Au_{11} , Au_{20} , Au_{23} , Au_{28} et Au_{31} (indiquées par des carrés et triangles), sont toutes cohérentes avec les relations d'échelle observées. Figure reproduite avec autorisation de la référence [53].

Ces matériaux luminescents présentent un intérêt et des atouts pour des applications telles que le biomarquage, [54] la détection d'ions métalliques lourds, [55] les réactions catalytiques [56]. Ils sont d'excellents substituts aux quantum dots grâce à une cytotoxicité plus faible (les viabilités cellulaires ont été estimées à plus de 90 % pour une gamme de doses allant de 0 à 40 mM), [57] une taille plus petite et une passivation de surface plus facile. [58-60] Cependant, à part les clusters Au_{25} émettant dans le rouge, comme ceux synthétisés avec de l'albumine de sérum bovin (BSA pour *bovine serum albumin*) [61] ou avec du glutathion, [51] ces objets présentent généralement des rendements quantiques (QY) inférieurs à ceux des molécules, en particulier les AuNC d'émission verte, dont le QY atteint à peine 5 %. [62-64] Parmi les différentes approches développées pour surmonter cette limitation, la plus efficace consiste à modifier le ligand à la surface des amas d'or. [65] Les exemples les plus connus étant, l'utilisation d'une matrice de dendrimères du PAMAM [53,66] ou d'une enveloppe de ligands des clusters d'Au(I) thiolés rigidifiée avec des cations tétraoctylammonium (TOA). [67,68]

Il est important de noter que lors de l'échange des ligands de surface, les clusters d'or ont tendance à s'agrégner entre eux, entraînant généralement une augmentation du nombre d'atomes composant le cœur, avec des effets sur la fluorescence. Les clusters d'or avec un nombre d'atomes réduit ($n < 13$) sont donc difficiles à fonctionnaliser sans modifications structurelles. [69]

I.6.5 - Les nanodiamants

Les nanodiamants synthétiques sont des particules de diamant de 10 à 100 nm environ, produites par explosion, par ablation laser d'une cible graphitique, par broyage à haute température et sous haute pression, ou encore par croissance. Ils peuvent aussi être trouvés, naturellement, au point d'impact de la foudre. La forme générale, déterminée par diffusion, est soit sphérique, soit ellipsoïdale. Le cœur conserve la structure diamant alors que la surface est graphitique. De plus, nativement ou après une étape d'irradiation ionique, la matrice diamant abrite durablement des défauts ponctuels de type lacune associés à un hétéroatome qui forme un centre coloré fluorescent. [70] Le défaut le plus commun est appelé centre N-V (pour nitrogen-vacancy), il est constitué d'un atome d'azote en substitution d'un atome de carbone et est accompagné d'une lacune (espace vide au lieu d'un atome). Cet ensemble forme un pseudo atome hydrogénoidé, responsable de l'émission de lumière visible (figure 1.15). [71] Ces centres sont protégés par la matrice de carbone, ce qui en fait des émetteurs extrêmement stables dont aucun clignotement ou blanchiment n'a été observé. L'absorption se situe à ~ 560 nm et induit une fluorescence large à ~ 700 nm par la désexcitation des états vibrationnels.

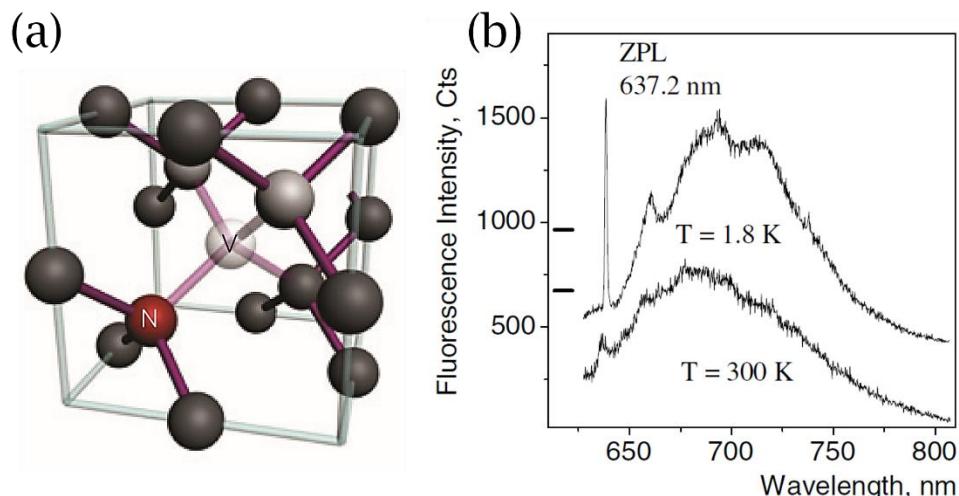


Figure 1.15 : (a) Représentation d'un centre NV où un atome d'azote remplace un atome de carbone créant une lacune. (b) Spectres d'émission de fluorescence d'un seul NV à température ambiante et à la température de l'hélium liquide. La longueur d'onde d'excitation était de 514 nm. Figures reprises avec autorisations des références (a) [72] et (b) [73].

Les matériaux sont chimiquement inertes, mais peuvent être fonctionnalisés après un traitement fortement acide à chaud créant des groupes carboxyles en surface. Leur modification ultérieure permet d'introduire des groupements de surface choisis, par exemple, la liaison peptidique permet le greffage d'acides nucléiques et de protéines. [74]

En raison de leur potentiel de fonctionnalisation de la surface et de leur biocompatibilité élevée, les nanodiamants sont largement étudiés en tant que matériau pour des applications en magnétométrie, [75-81] détections biologiques, [82,83] pour le traitement quantique de l'information, [84,85] l'optomécanique de spin, [86,87] l'optique quantique, [88-90] la nanophotonique [91-93] et la plasmonique quantique. [94-96] Il a été démontré que le centre NV peut être utilisé comme une source fiable de photons uniques [97]. Des nanodiamants individuels, contenant des centres N-V uniques, peuvent être intégrés comme émetteurs de photons uniques dans une structure plasmonique. [98]

I.7 - Choix des émetteurs

Dans cette thèse, nous voulons travailler avec des émetteurs adaptés à nos conditions de travail. Pour cela nous avons établi des critères de sélection que nous avons jugé nécessaire à nos systèmes, ils sont réunis dans le tableau Table 1.1.

Nous voulons travailler sur particules individuelles. Les émetteurs doivent donc être optiquement stables sous faisceau laser et électronique afin de pouvoir caractériser leurs propriétés optiques. Ils ne doivent pas présenter de photoblanchiment de la fluorescence, ce qui n'est pas le cas des molécules fluorescentes que nous avons donc éliminées. [99] Celles-ci sont utilisées le plus souvent en couche épaisse pour compenser leur dégradation, ce qui rend compliqué une utilisation sur une zone très localisée (quelques nanomètres) pour des applications plasmoniques.

Leur taille ne doit pas excéder 100 nm de diamètre pour pouvoir être utilisé comme point d'excitation ponctuelle, elles doivent donc être de taille inférieure à la moitié de la longueur des structures plasmoniques utilisées (entre 200 nm et 1 µm). Les oxydes de lanthanide ont la bonne taille et sont optiquement stables, mais leurs synthèses sont relativement compliquées et pas entièrement maîtrisées. Les oxydes commerciaux sont rares et nous n'avons pas trouvé où nous approvisionner pour des particules de petite taille. [41]

Souhaitant caractériser les propriétés optiques des structures hybrides avec des méthodes telles que la cathodoluminescence ou le EELS en TEM, les propriétés lumineuses doivent également résister à des irradiations lumineuses ou électroniques à de hautes énergies pour pouvoir imager et effectuer des mesures optiques. Ce dernier point est le plus essentiel pour nous ; or, il s'agit de celui sur lequel nous avons le moins d'informations. Des quantum dots ont déjà été utilisés pour des mesures EELS et avec succès. [100] Sauf que tous les quantum dots ne réagissent pas de la même manière. Certains ont conservé leur fluorescence qui restait stable sous le faisceau, mais la majorité a subi des dommages structurels endommageant leurs propriétés optiques. Cette forte tendance à la dégradation nous a donc incité à écarter les quantum dots de nos candidats pour l'utilisation. Nous les avons également écartés sur les microscopes optiques à cause de leur

photoblanchiment. Les nanodiamants sont eux réputés robustes sous faisceaux lumineux. [101] Nous ne savons cependant rien sur la stabilité des clusters d'or.

Les centres colorés dans le diamant, en particulier les centres NV, sont des émetteurs de photons uniques à température ambiante et leur photostabilité est bien établie (pas de clignotement, pas de blanchiment). [88,102] Ce qui peut représenter un plus pour le contrôle de l'information transmise.

Propriétés \ Emetteurs	Molécules	Quantum dots	Clusters d'or	Nanodiamants	Oxydes dopés lanthanide
Pas de photoblanchiment	✗	✓	✓	✓	✓
Pas de photoclignotement	✗	✗	✓	✓	✓
λ_{em} adaptées	✓	✓	✓	✓	✓
Taille adaptée	✓	✓	✓	✓	~
Résistants sous faisceaux à hautes énergies	✗	~	?	?	?
Photons uniques	✓	~	✗	✓	✗

Table 1.1 : Propriétés connues des émetteurs de la littérature permettant de choisir ceux utilisés dans cette thèse.

Nous avons d'abord écarté les molécules pour cause de photoblanchiment et les quantum dots dus à leur non-résistance sous irradiations lumineuses et électroniques. Puis, nous avons décidé, en l'absence de possibilité de trouver un fournisseur d'oxydes dopés de lanthanide de petite taille, de nous focaliser sur les couplages hybrides avec pour émetteurs des nanodiamants ou des clusters d'or.

II - Propriétés optiques émergentes par couplage « plasmon-émetteur »

II.1 - Effets de couplage

La disposition d'un émetteur sur une structure plasmonique engendre un couplage des propriétés optiques des deux particules sous certaines conditions de positionnement. Ce couplage peut se voir sous diverses approches. Un fluorophore excité émet un photon, qui va ensuite localement induire des oscillations des électrons dans la nanoparticule métallique. Sous un éclairage, les plasmons excités d'une particule métallique modifient le champ proche. Le champ électromagnétique local total dépend donc à la fois de l'éclairage incident et du champ électromagnétique produit par le métal. Dans le cas d'une excitation par les photons d'un fluorophore, le métal plasmonique modifie le champ local par le biais de sa SPLDOS même en l'absence d'un champ incident. Il y a donc interaction entre les états plasmoniques de la particule et le fluorophore excité, modifiant son émission. Les plasmons excités sous éclairage affectent le fluorophore. Les interactions des fluorophores avec des surfaces métalliques provoquent une augmentation des rendements quantiques (suite à l'exaltation du champ local qui induit une augmentation du nombre de photons absorbés localement), la création d'un canal de transfert dans la particule via les plasmons, et la diminution de la durée de vie (effet Purcell).

II.1.1 - *L'exaltation et l'extinction de fluorescence*

La fluorescence disparaît au voisinage immédiat de certains métaux. Par exemple, les surfaces d'argent de 50 Å d'épaisseur sont utilisées en microscopie pour éteindre les émissions des régions proches du métal et ainsi éviter certaines luminescences parasites. [103] L'émission de fluorescence comporte deux phases, une première phase d'excitation suivie d'une phase d'émission. La présence d'un métal plasmonique à la proximité d'un fluorophore peut avoir une influence sur ces deux phases.

Ces effets peuvent être compris en considérant un diagramme de Jablonski qui prend en compte la présence de la particule plasmonique (figure 1.16).

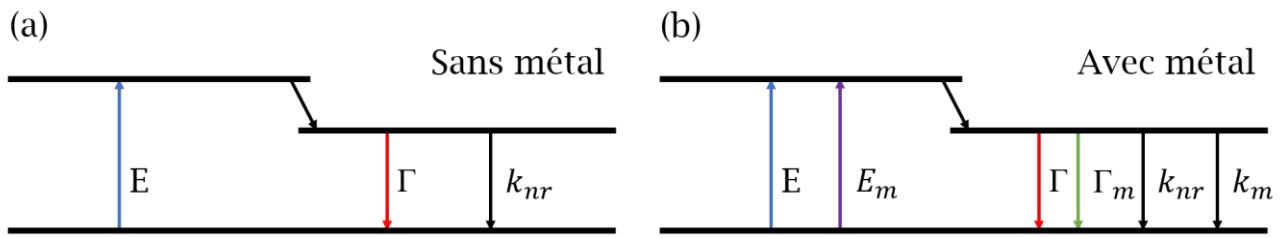


Figure 1.16 : Diagramme de Jablonski sans (a) et avec (b) les effets des surfaces métalliques proches. E est le taux d'excitation sans métal. E_m est l'excitation supplémentaire en présence de métal.

Nous considérerons ici la désexcitation radiative (Γ) et la désexcitation non radiative (k_{nr}). En l'absence de métaux, le rendement quantique et la durée de vie sont donnés par

$$Q_0 = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (1.29)$$

$$\tau_0 = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (1.30)$$

Comme Γ est presque constant pour tout fluorophore dans un milieu environnant donné, le rendement quantique ne peut être augmenté qu'en diminuant la valeur de k_{nr} qui est un facteur offrant peu de possibilités de contrôle.

Maintenant, si l'on couple ce fluorophore à un métal, une augmentation du taux d'excitation ($E + E_m$) est observée, c'est le phénomène d'exaltation du champ local par la structure plasmonique. Cette exaltation est particulièrement intense si une résonance est induite et coïncide avec l'énergie d'absorption. Il en résultera soit une augmentation du nombre de photons excités et donc de l'émission ou une augmentation du taux de décroissance radiative. Dans ce dernier cas, le rendement quantique et la durée de vie du fluorophore près de la surface du métal sont donnés par

$$Q_m = \frac{\Gamma + \Gamma_m}{\Gamma + \Gamma_m + k_{nr} + k_m} \quad (1.31)$$

$$\tau_m = \frac{1}{\Gamma + \Gamma_m + k_{nr} + k_m} \quad (1.32)$$

En maximisant la valeur de Γ_m , le rendement quantique augmente alors que la durée de vie diminue. Lorsque le taux de décroissance total ($\Gamma_T = \Gamma + \Gamma_m$) augmente le rendement quantique augmente. Cette augmentation est due au fait qu'une plus grande quantité de fluorophores émettent avant qu'ils ne puissent se désexciter de manière non radiative.

Les trois interactions dominantes sont présentées en figure 1.17. Premièrement, il peut y avoir une extinction de la fluorescence à courte distance du métal (k_m). Deuxièmement, il peut y avoir une augmentation du taux d'excitation (E_m),

et enfin une augmentation du taux de décroissance radiative (Γ_m) peut se produire. La distance entre les particules détermine le phénomène optique obtenu. À longue distance (300 Å sur le schéma en figure 1.17), l'exaltation du champ est faible et le métal n'a aucun effet sur l'intensité de la fluorescence. En approchant de la particule, le taux radiatif de la fluorescence augmente ainsi que l'excitation locale. Aux courtes distances, le taux de désexcitation k_m devient dominant, générant une extinction de fluorescence.

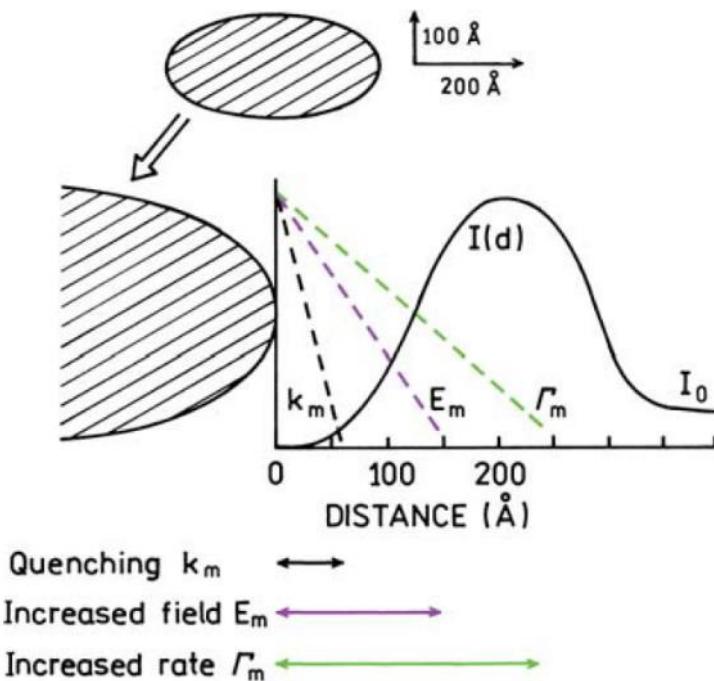


Figure 1.17 : Effets d'une particule métallique sur les transitions d'un fluorophore. Les particules métalliques peuvent provoquer une extinction (k_m), peuvent exalter le champ lumineux incident (E_m) et peuvent augmenter le taux de décroissance radiative (Γ_m). Schéma repris avec autorisations de la référence [104].

Plusieurs travaux ont été effectués pour déterminer ces distances, notamment en approchant un émetteur d'une surface métallique. Deux exemples sont soit l'approche à différente hauteur de surfaces métalliques (chrome, or, ou encore argent) d'un nanodiamant greffé sur le bout d'une fibre optique affinée, [105] soit à l'inverse l'approche d'une pointe métallique ou d'une particule sphérique d'or greffée sur une pointe de verre d'une surface recouverte de molécules fluorescentes. [106] Les distances de transitions d'un phénomène à l'autre dépendent principalement du matériau, de la taille et de la forme de la particule. Dans le cas d'une particule d'or de 50 nm de diamètre greffée sur une pointe en verre, le k_{nr} , donc le phénomène d'extinction, commence à dominer à $z \leq 12$ nm (voir figure 1.18) et entraîne un déclin du rendement quantique Q_m . L'égalité de Γ_T et de k_{nr} marque le point à $Q_m = 50\%$.

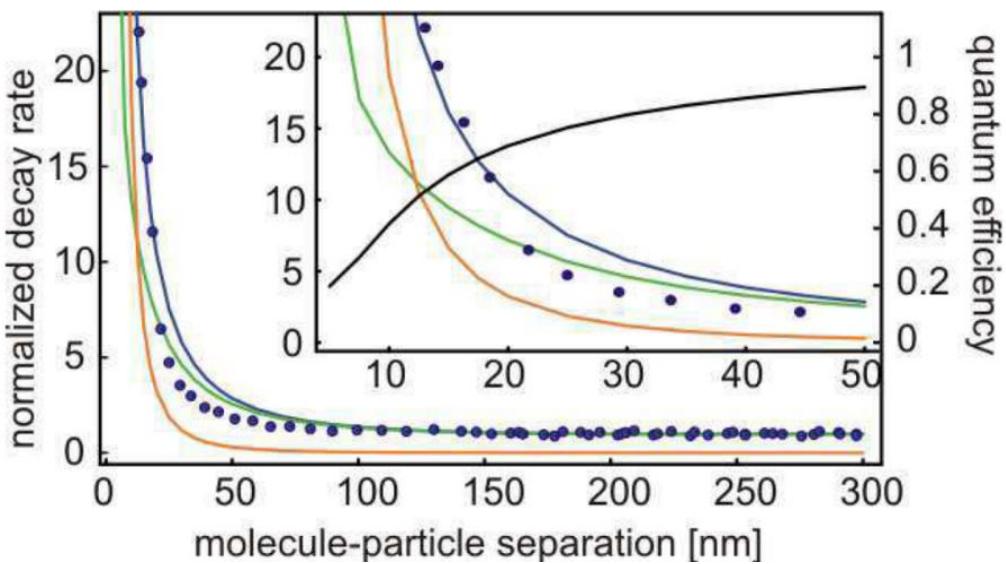


Figure 1.18 : Taux de décroissance de la fluorescence pour une approche de la distance particule-fluorophore. Les points bleus indiquent le taux de décroissance expérimental Γ_T et les lignes donnent les valeurs calculées de Γ_m (orange), k_{nr} (vert) et Γ_T (bleu). Encadré : parcelle agrandie avec rendement quantique Q_m (noir). Figure reprise avec autorisations de la référence [106].

II.1.2 - Modification de la LDOS photonique par les plasmons

La distribution spatiale et spectrale de la SPLDOS obtenue dans des structures métalliques influe directement sur la LDOS photonique dans son environnement immédiat. [107] Toutefois, cette modification décroît rapidement, typiquement en $1/d^6$, lorsque l'on s'éloigne de l'interface métal-environnement. En particulier, la LDOS photonique peut être localement augmentée par la présence des modes plasmons particulièrement confinés. Pour que les modes plasmons aient un effet sur l'émission d'un émetteur, il faut donc que celui-ci soit placé dans le champ proche où la LDOS photonique est modifiée par les plasmons, il pourra alors se produire une exaltation de l'absorption, par accroissement du champ local par les plasmons, et/ou un effet Purcell, c'est-à-dire une réduction du temps de vie d'émission par augmentation locale de la LDOS photonique. [108,109] Par contre, un couplage fort et direct du dipôle d'émission de l'émetteur avec les plasmons, à plus courte distance de l'interface, pourra résulter en une désexcitation non radiative indépendante de la LDOS photonique.

Lorsque l'émetteur a un spectre d'émission large, son couplage à des cavités plasmoniques peut conduire à une imagerie hyperspectrale dans laquelle chaque bande spectrale sondera un jeu différent de modes plasmons. [110]

Un petit nombre de centres NV indépendants rattachés à une fibre optique, agit comme une source de photons uniques avec longueur d'onde d'émission spectrale allant de 640 à 800 nm et permet d'enregistrer des images révélant la LDOS photonique en balayant la surface à proximité immédiate des résonateurs

plasmoniques. [110] Comme la taille de cette sonde peut être considérée comme ponctuelle par rapport aux variations des champs optiques, l'interprétation physique du mécanisme met en évidence le rôle de la photonique LDOS à la position de l'émetteur. De plus, en filtrant les images ainsi obtenues, la distribution spatiale est mesurée à différentes longueurs d'onde. Les plaquettes de forme prismatique, possèdent des modes SP d'ordre élevé dans le visible qui sont essentiellement confinés, et exaltés, le long des bords. La pointe émet un signal fluorescent constant à une énergie donnée lorsqu'elle est placée loin de la structure, comme prévu pour les centres NV photostables. En revanche, l'émission de l'ensemble des NV est modifiée lorsqu'ils s'approchent des bords de la cavité. Elle se traduit par un signal non évanescent au-dessus des structures le long du périmètre du prisme (indiqué par une flèche noire sur les figures 1.19.a et 1.19.c). Dans le cas des figures 1.19.a et 1.19.b, à la longueur d'onde 650 nm, le mode est d'ordre impair induisant l'émergence de lobes brillants situés au-dessus de chaque milieu des bords. Ce lobe est absent des figures 1.19.c et 1.19.d. En effet, à une longueur d'onde de 800 nm le mode est ici d'ordre pair. Les cartes 1.19.b et 1.19.c sont des cartes de la SPLDOS simulées. Les simulations de la SPLDOS et des cartes expérimentales de la photonique LDOS montrent un bon accord du nombre de lobes ainsi que de leur positionnement. Les cartographies expérimentales révèlent la distribution spatiale de la SPLDOS de la particule.

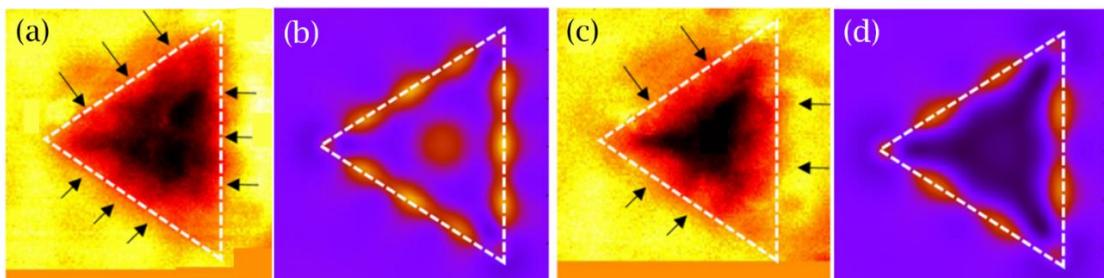


Figure 1.19 : Images de fluorescence enregistrées sur le dessus de la cavité prismatique de 900 nm de long pour différents filtres passe-bande de 10 nm de large centrés à 650 (a), et 800 nm (c). Cartes du taux de décroissance radiative normalisé calculé pour des émetteurs scalaires positionnés à 40 nm au-dessus de la structure et émettant à 650 (b) et 800 nm (d). Figures reprises avec autorisations de la référence [110].

II.1.3 - Effet de la cristallinité sur le facteur de Purcell

Les plasmons de surface sont sujets à des effets de dissipation, radiative ou non-radiative. Les premières sont minimisées dans le milieu à gain (qui permet d'amplifier la lumière le traversant) et les secondes le sont en minimisant les pertes engendrées par les phonons (notamment en diminuant la température ambiante) ou par les défauts cristallins de la particule.

En général, la réduction des pertes de Joule dans les structures plasmoniques peut être obtenue en abaissant la température ou en minimisant la rugosité de

surface. À 4 K, la diffusion électron-phonon est fortement réduite et la longueur de propagation des plasmons de surface augmente. [111,112] Entre 293 K et 11 K, le taux de décroissance de la fluorescence est réduit par un facteur de 2,3 alors que l'activité quantique radiative est 3 fois plus élevée. [113] Le fonctionnement à température cryogénique permet à lui seul d'atteindre des valeurs de l'efficacité quantique radiative (QE) proches de 10 %.

Alternativement, la réduction de la rugosité de surface, ou l'augmentation de la cristallinité de la structure plasmonique, réduit fortement l'amortissement des SPP. [114,115] Nous pouvons diminuer davantage les pertes non-radiatives des supports plasmoniques en maîtrisant leur cristallinité.

En parallèle de mon sujet de thèse, nous avons travaillé, avec le groupe de J.-P. Hermier de l'université de Versailles et de G. Colas des Francs de l'université de Bourgogne, sur le couplage de quantum dots CdSe/CdS colloïdaux à coquille épaisse avec des films d'or amorphe (FA) et des plaquettes d'or cristallin (PC) à 4 K. [116] Les expériences résolues temporellement montrent que la durée de vie de la photoluminescence passe de 2,4 ns (FA) à 5,1 ns (PC) grâce à la réduction des pertes de Joule. La comparaison des résultats expérimentaux avec les prédictions théoriques montre que QE est au moins deux fois plus élevée pour la structure cristalline. Les résultats présentés montrent que le remplacement de l'or amorphe par de l'or cristallin permet de dépasser 20 % en efficacité de couplage (Fp).

L'efficacité quantique radiative des FA à basse température a été déduite des mesures de photoluminescence et de calculs comme étant égale à 10 %. En ce qui concerne les PC, la Fp se situe entre 20 et 40 % pour la gamme considérée des parties réelles et imaginaire de la fonction diélectrique ϵ . La Fp pour les PC est alors au moins deux fois plus grande que celle des FA, ce qui permet de réduire considérablement les pertes de Joule.

II.2 - Caractérisation des phénomènes optiques hybrides

La plupart des caractérisations optiques de structures hybrides sont faites de manière macroscopique ou spectrale. Afin d'avoir accès à des techniques de mesure permettant des résolutions spatiales suffisantes pour voir le couplage entre une particule émettrice et une particule plasmonique, ou pouvant mesurer une émission délocalisée par rapport à l'excitation. Dans le cas d'un couplage avec un émetteur, la mesure du temps de vie de la fluorescence est un paramètre important sur son environnement et donc sur le couplage.

Les techniques de caractérisation permettant l'acquisition de ces informations sont introduites dans les sous-paragraphes suivants.

II.2.1 - Mesures résolues spatialement

Tout d'abord, la microspectroscopie optique en champ sombre (DFM pour *dark field microscopy*) offre une résolution spectrale standard pour les particules individuelles. Cependant, la DFM est limitée par la limite de diffraction à une résolution spatiale d'environ une demi-longueur d'onde ($\lambda/2$) alors que la microscopie optique en champ proche (NSOM pour *near-field scanning optical microscopy*) offre une résolution de 10 nm ($\lambda/20$), mais ne sonde que le champ proche et ne permet pas de mesurer la propagation des plasmons. [117] Un moyen de mesurer le phénomène propagatif des plasmons de surface, est d'utiliser un microscope à fuite radiative (LRM, *leakage radiation microscopy*) qui permet de mesurer l'émission sur toute une structure plasmonique. Elle est cependant limitée par la limite de diffraction. [118]

Un autre type de microscopie, la microscopie à photo-émission d'électrons (PEEM, *photoemission electron microscopy*), peut également être utilisée pour cartographier les plasmons de surface. Lorsque la lumière frappe un solide, elle peut déclencher l'émission de photoélectrons à partir de la surface du matériau par l'effet photoélectrique. Dans la PEEM, on image la variation spatiale de l'émission de photoélectrons (aussi appelée photo-émission) de la surface d'un échantillon illuminé. [119,120] Aujourd'hui, la PEEM est devenue une technique bien établie pour l'imagerie des champs proches plasmoniques et la mesure des relations de dispersion des plasmons polaritons de surface (SPP). [121,122] En maintenant les fluences laser à un niveau bas pour éviter les effets de charge spatiale, [123] on peut obtenir une résolution spatiale d'environ 50 nm avec les instruments conventionnels. Les correcteurs d'aberration peuvent encore abaisser cette résolution jusqu'à environ 10 nm.

Yamamoto et coll. ont montré pour la première fois qu'il est possible d'accéder à des informations sur les plasmons de surface, dans le domaine visible à des échelles de sous-longueurs d'onde, en détectant les photons émis sous excitation électronique (en spectroscopie de cathodoluminescence, CL) dans un microscope électronique à transmission à balayage (STEM pour *scanning transmission electron microscope*). [124] Une technique complémentaire, la spectroscopie de perte d'énergie des électrons (EELS pour *electron energy loss spectroscopy*) a suscité depuis 1957 un énorme intérêt pour la cartographie des plasmons de surface dans le domaine allant l'infrarouge à l'ultraviolet. [125,126] L'EELS et la CL, qui sont respectivement liées aux propriétés d'extinction et de diffusion des nanoparticules, sont des outils puissants pour la caractérisation des LSP, car ces techniques ont une résolution spatiale de l'ordre du nanomètre. [127]

La figure 1.20 compare des images réalisées avec différentes techniques décrites ci-dessus sur des nanoprismes.

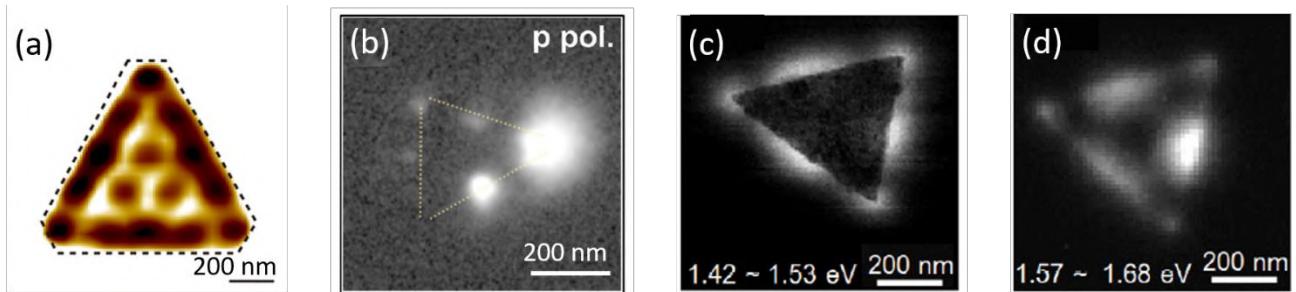


Figure 1.20 : Comparaison de l'imagerie de mode plasmonique par (a) SNOM pour un nanoprisme d'or de 820 nm de côté, (b) résonance quadripolaire par PEEM sur un prisme de 300 nm de côté avec un faisceau incident à 75°, (c-d) EELS et CL pour un nanoprisme d'argent de 555 nm de côté. Les images sont reproduites avec autorisation des références pour (a) [128], (b) [129] et (c-d) [127].

II.2.2 - Mesures résolues temporellement

Nous avons vu précédemment que la présence d'une surface métallique peut modifier considérablement les propriétés d'émission d'un fluorophore, ce qui entraîne une augmentation ou une diminution de l'émission de fluorescence en réduisant la durée de vie de l'état excité. L'imagerie de durée de vie de la fluorescence (FLIM pour *fluorescence lifetime microscopy*) permet de faire des cartographies d'intensité fluorescente, mais également de mesurer le temps de vie en chaque point de cette cartographie.

Le FLIM est surtout utilisé pour des applications biologiques sur des molécules fluorescentes, [130,131], mais il a également été utilisé pour observer des nanoparticules d'argent recouvertes d'une couche de polymère contenant des molécules fluorescentes de Rhodamine 6G (R6G). [132] Des variations localisées de l'intensité d'émission et des composantes supplémentaires de la durée de vie ont été observées. La figure 1.21 montre la carte d'intensité de fluorescence d'un film de R6G déposée sur des nanoparticules en couche simple. Cette carte montre soit une augmentation de la fluorescence lorsque les molécules sont proches des nanoparticules soit une absorption préférentielle de l'émission sur le métal. Pour les mesures de cartographie faites en excitation continue, il n'est pas possible de séparer les contributions de la fluorescence provenant des fluorophores directement et la fluorescence modifiée due au couplage entre les fluorophores et le métal.

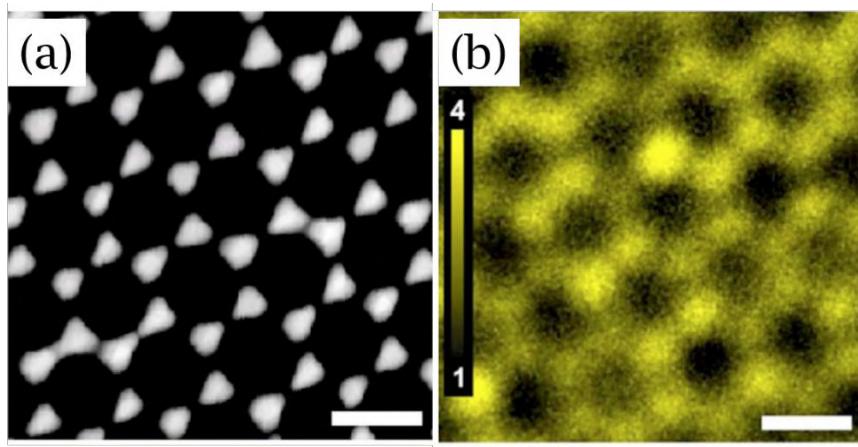


Figure 1.21 : (a) Image AFM de nanoparticules d'Ag formées à partir de sphères de latex. L'échelle des barres est de 500 nm et le contraste en hauteur est de 25 nm. (b) Carte d'intensité confocale en tension continue de la fluorescence des R6G déposées sur la région des nanoparticules similaires à (a). Figures reprises avec autorisations de la référence [132].

La fonction de décroissance de la fluorescence donne un aperçu direct de l'interaction moléculaire d'un fluorophore avec son environnement biologique. Le FLIM utilise le fait que la durée de vie de la fluorescence d'un fluorophore dépend de son environnement moléculaire. Ce paramètre évolue lors du couplage avec une nanoparticule.

La durée de vie de fluorescence fait référence au temps moyen pendant lequel le composé fluorescent reste dans son état excité avant d'émettre un photon. Elle suit une loi de décroissance exponentielle. Dans le cas du FLIM, le composé est excité par un pulse laser, puis une photodiode enregistre le flux des photons émis après chaque impulsion. Les événements à photon unique mesurés après la fin du pulse sont triés en canaux d'histogramme qui correspondent au temps qui s'est écoulé depuis le dernier pulse d'excitation, ce qui permet de tracer la courbe de l'évolution temporelle de l'intensité de fluorescence $I(t)$. La population excitée décroît en fonction du temps (figure 1.22).

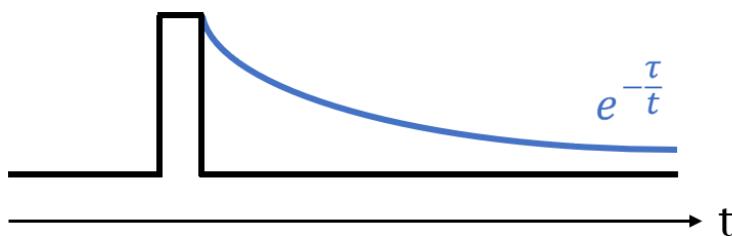


Figure 1.22 : La durée de vie est estimée à partir de la courbe de décroissance exponentielle d'intensité de fluorescence enregistrée après la fin du pulse laser.

La figure 1.23.a présente la décroissance exponentielle extraite des mesures FLIM de la surface présentée figure 1.21 : elle comprend une composante très piquée τ_0 de 3,6 ns des fluorophores non perturbés, et une composante τ_m de 0,5 ns plus large et rapide provenant des fluorophores aux taux de décomposition modifiés. Les

figures 1.23.b et 1.23.c montrent que la composante τ_m a une résolution localisée limitée autour des nanoparticules, tandis que la composante τ_0 correspond à la couverture homogène des fluorophores.

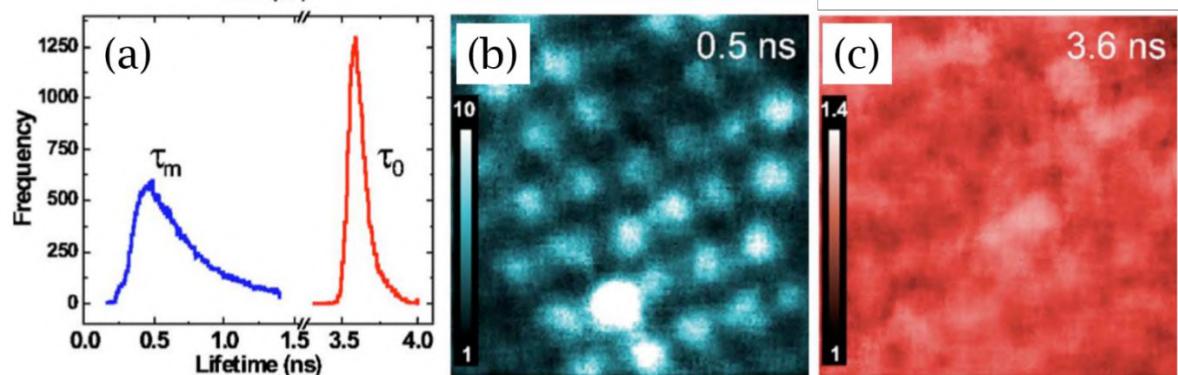


Figure 1.23 : (a) Histogramme des composantes des durées de vie (τ_m , τ_0) obtenues à partir d'ajustements bi-exponentiels des pixels de la zone de balayage. (b) Carte spatiale de l'intensité pré-exponentielle normalisée pour la composante τ_m 0,5 ns. (c) comme (b) pour la composante 3,6 ns τ_0 montrant l'homogénéité dans la région. Figures reprises avec autorisations de la référence [132].

Les propriétés optiques obtenues dans cette thèse ont été caractérisées dans le chapitre 5 par CL-TEM et FLIM, qui sont des équipements disponibles soit au CEMES, soit chez nos collaborateurs.

III - Couplage de nanoparticules par auto-assemblage

Le principal défi des couplages plasmon-émetteurs consiste à contrôler le nombre et la position des émetteurs à proximité des points chauds plasmoniques. Ceux-ci étant très localisés, obtenir un couplage efficace entre les particules plasmoniques et émettrices demande un contrôle du positionnement relatif entre ces dernières. Nous décrivons dans cette section les méthodes physico-chimiques qui ont été tentées pour assembler les nanoparticules en structures d'ordre supérieur. Ces méthodes se séparent en deux principales stratégies : l'assemblage direct et l'assemblage par effet template, qui offrent différents avantages exploitant les capacités d'organisation uniques des biomolécules.

Les stratégies d'assemblage utilisées dans cette thèse seront inspirées de ces méthodes et présentées dans le chapitre 3.

III.1 - Auto-assemblages par effet « template »

III.1.1 - *Immobilisation sur un substrat structuré*

L'auto-assemblage peut se faire par l'intermédiaire d'un substrat. Dans ce cas, les particules seront positionnées avec précision par des groupes d'ancrage présents sur la surface, mais il y aura peu de contrôle sur la distance interparticulaire. Pour illustrer cette approche, considérons la formation d'une monocouche de nanoparticules d'Au sur un substrat de silicium, décrite par Hsuen-Li et al. [133] Dans cette méthode, développée par Whitesides et coll. dès 1983, une monocouche auto-assemblée (SAM pour *self-assembled monolayer*) est créée sur silicium oxydé lorsque la modification de surface est effectuée par du 3-mercaptopropyl triméthoxysilane (MPS). [134-137] Une nucléation hétérogène de particule d'or est ensuite induite sur la surface modifiée de la couche SAM (figure 1.24.a)

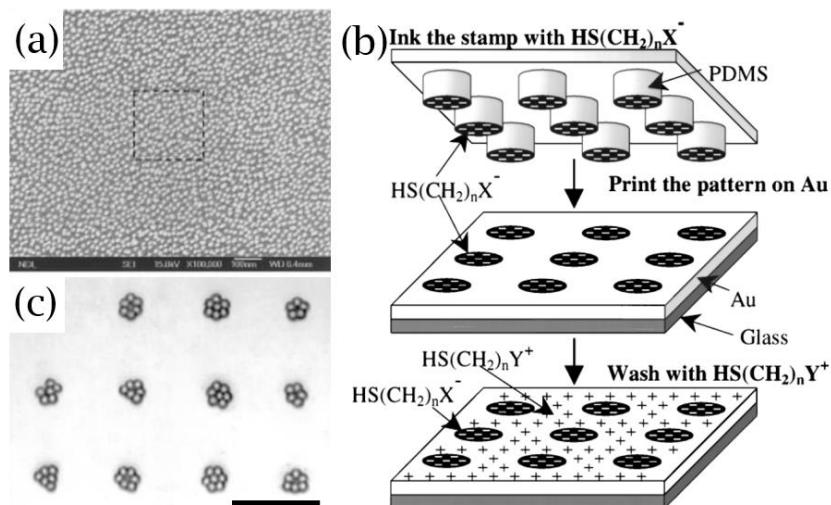


Figure 1.24 : (a) image SEM du film de nanoparticules sur un substrat de silicium. Image SEM reprise avec autorisations de la référence [133]. (b) Schéma de principe d'un moule de PDMS utilisé pour charger localement un substrat afin de diriger l'assemblage de particules en 2D, (c) image SEM de particules chargées, assemblées par la méthode (b). Schéma et image TEM reprises avec autorisations de la référence [138].

Un tampon peut également être utilisé pour assembler les nanoparticules à une échelle macroscopique de façon localisée (2D) sur un substrat (figures 1.24.b et 1.24.c), grâce à des interactions électrostatiques. Cette méthode exploite un moule en PolyDiMethylSiloxane (PDMS) pour « imprimer » les molécules chargées sur le substrat. [138] Toutefois, il ressort clairement de ces exemples, que la disposition des particules ne peut définir l'espacement interparticulaire qu'avec des espacements larges ou de contact.

III.1.2 - Assemblage sur un brin d'ADN

Les brins d'ADN très courts (oligonucléotides) ou plus longs (plasmide et ADN) font l'objet d'une attention soutenue pour l'assemblage depuis leur première utilisation en tant que jonction par N. Seeman. [139] Leur attrait principal, est que les projets de génomique ont généré des outils très efficaces pour produire des oligonucléotides, par le biais d'une procédure automatisée rapide et peu coûteuse. Le squelette de phosphate négatif est un modèle électrostatique idéal pour la fixation de nanostructures cationiques.

Dans ces systèmes, l'étendue de l'assemblage individuel dépend de la longueur des fils d'ADN, ce qui permet une variation de plusieurs nanomètres à quelques micromètres. Murray et Wang ont exploré l'assemblage contrôlé de nanoparticules d'or (AuNPs), passivées avec des monocouches cationiques de triméthyl(mercaptoundécyl) ammonium, sur de l'ADN anionique. [140] Ce couple engendre des chaînes unidimensionnelles, l'espacement entre les NPs étant

principalement déterminé par l'épaisseur de la monocouche. Des structures en réseau peuvent être générées en modifiant le rapport NP : ADN (figure 1.25). [141]

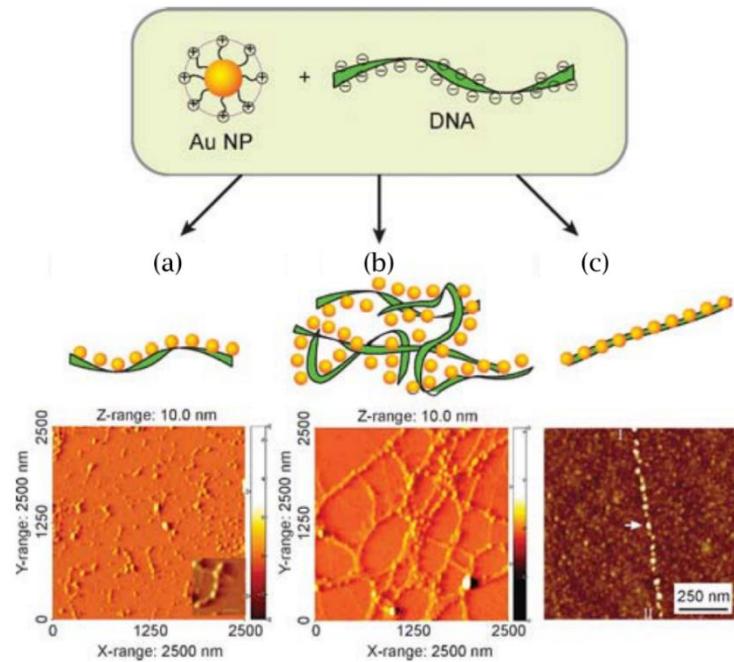


Figure 1.25 : Représentation schématique et images AFM des assemblages entre des nanoparticules cationiques et des molécules d'ADN anioniques : (a) en complexes linéaires de ratio 10 : 1, (b) en structures ramifiées de 100 : 1 et (c) en chaînes par peignage de l'ADN. Schéma et images AFM repris avec autorisations de la référence [142].

III.1.3 - Assemblage sur un réseau ordonné de protéines

Certaines protéines naturelles ont évolué pour former spontanément des templates 2D, par exemple, les couches de surface des cellules bactériennes cristallines (S-layers). Leur poids moléculaire varie de 40 à 200 kDa et elles sont dotées de la capacité de former des réseaux monomoléculaires sur l'enveloppe. La richesse des informations accumulées sur la structure, la chimie, la génétique et la fonction des S-layers en font un système très adapté pour l'auto-assemblage. [143]

Des réseaux de nanoparticules à grande échelle avec un espacement prédéfini par le choix de la protéine, ont été réalisés avec ces protéines. Les super-réseaux de nanoparticules ont été formés en fonction de l'espacement des réseaux et de la symétrie de la couche de protéines sous-jacente. Un super-réseau de particules d'or de 4-5 nm a été produit en utilisant la protéine S-layer des *Bacillus sphaericus* (avec des groupes thiols précédemment induits) pour former des moules pour la précipitation d'une solution d'acide tétrachloraurique (III) (figure 1.26.b). [144] Malheureusement, les méthodes chimiques par voie humide ne permettent pas de faire varier la composition des colloïdes dans le processus de fabrication. Des études sur les liaisons, entre des biomolécules (par exemple, des enzymes ou des anticorps)

et des couches de S-layers, ont démontré que des nanoparticules d'or ou des QD sont liés électrostatiquement (figure 1.26.c). [145]

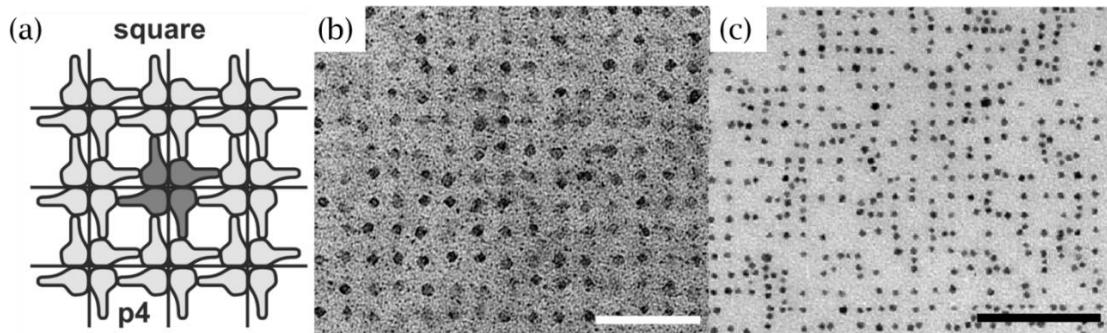


Figure 1.26 : (a) Illustration schématique du type de réseau carré d'une couche de S-layer. Le groupe de symétrie est ici p4. Schéma repris avec autorisations de la référence [144]. (b) Image TEM des nanoparticules d'or synthétisées sur une couche de S-layer avec une symétrie de réseau carré. La barre d'échelle est de 50 nm. (c) Image TEM de particules attachées de manière régulière sur la surface de S-layer avec une géométrie carrée. La barre d'échelle est de 100 nm. Images TEM reprises avec autorisations de la référence [145].

III.1.4 - Ingénierie de l'appariement d'ADN et origami

L'ADN offre une manière intuitive d'assembler des nanoparticules, autrement que par interactions électrostatiques. L'ADN simple brin (ssDNA) a été utilisé pour créer des réseaux et des structures chaînées de colloïdes par hybridation de séquences spécifiques de l'ADN. Le maniement de deux ssDNA complémentaires peut également induire un assemblage direct par reconnaissance et former une structure double brin (dsDNA). Ces approches permettent de contrôler leur arrangement dans l'espace. Pour former des dimères, une méthode consiste à assembler des couples simple brin avec des colloïdes d'or sur un brin template (figure 1.27). [146]

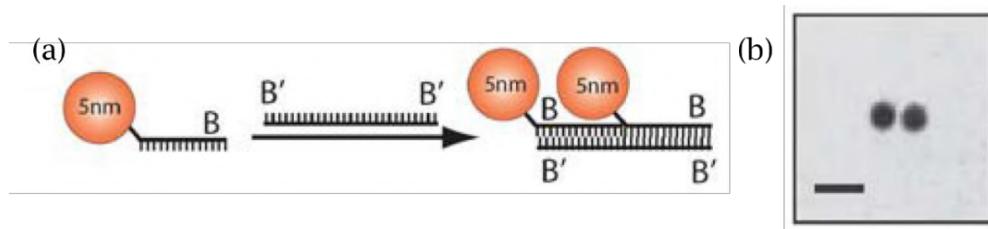


Figure 1.27 : (a) Stratégie d'assemblage basée sur la formation d'ADN double brin pour des assemblages de nanoparticules d'or. Deux ssDNA de séquence « B » reconnaissent la séquence « B' » d'un brin plus long, formant un dsDNA. (b) Image TEM montre la formation d'un dimère. Schéma et figure TEM repris avec autorisations de la référence [147].

Si le template ADN est un brin cyclique constitué de n séquences, la reconnaissance de chaque séquence se fait par un brin ssDNA complémentaire préalablement greffé sur des nanoparticules, qui s'assemblera spécifiquement à

l'endroit complémentaire du cycle. Les nanoparticules seront ainsi positionnées précisément le long de la boucle. La figure 1.28.a illustre cette approche pour n=3. On notera que la longueur de persistance (définis la rigidité intrinsèque) minimum du dsDNA étant de 40 nm, la boucle se rectifie lors de l'auto-assemblage et forme des triangles (figure 1.28.b). [148]

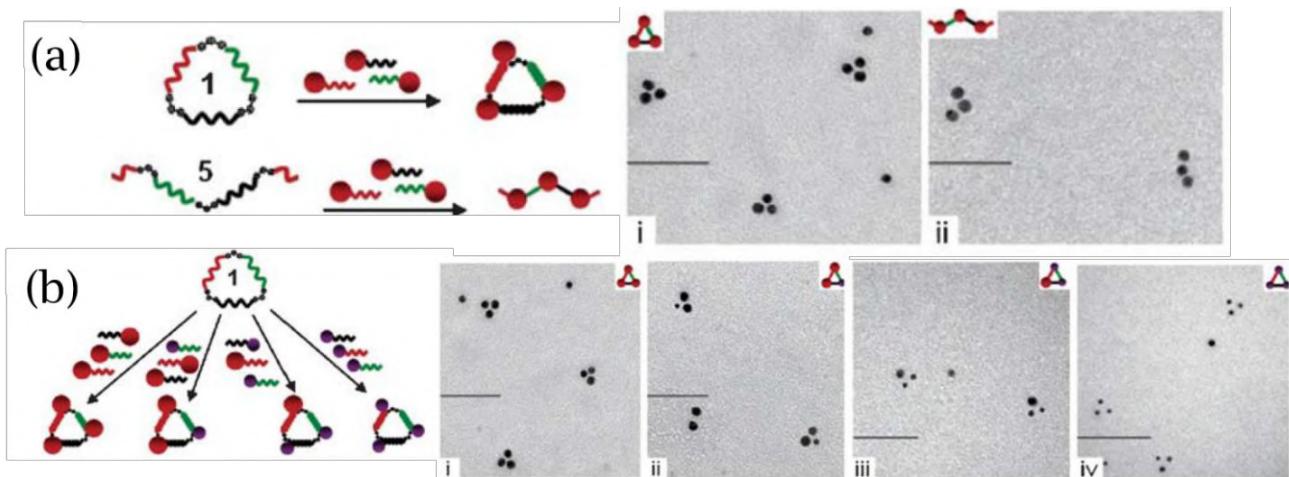


Figure 1.28 : (a) organisation de nanoparticules d'or en triangle et en ligne grâce à des oligomères d'ADN cyclique (i) et linéaire (ii). (b) Utilisation de l'oligomère cyclique pour générer des triangles composés de (i) trois particules larges, (ii) deux larges et une petite, (iii) une large et deux petites, et (iv) trois petites. Schéma et images TEM repris avec autorisations de la référence [148].

Une étape cruciale de la maîtrise des assemblages à base d'ADN a été l'invention des jonctions de croisements simples et doubles ainsi que de la jonction Holliday (figure 1.29.a-b). [139] Ces formations sont à la base de formes complexes appelées origami d'ADN (figure 1.29.c-e). [149] Ces origamis sont constitués d'un simple brin d'ADN long plié dans une forme prédéterminée en utilisant de petits nucléotides en guise d'agrafe. Ce système a été largement utilisé pour assembler des nanoparticules entre elles dans des géométries de plus en plus complexes. Les architectures plasmoniques rigides ont été réalisées pour la première fois par Kuzyk et coll. [150] Les auteurs ont conçu deux tiges en origami d'ADN de 100 nm de long composés de 24 hélices comme modèles pour organiser des AuNPs de 10 nm dans des formes hélicoïdales orientées gauche et droite (figure 1.29.f). Ces structures chirales montrent des propriétés optiques différentes en fonction de leur orientation. Les mesures de dichroïsme circulaire de la structure sont présentées sur la figure 1.29.g.

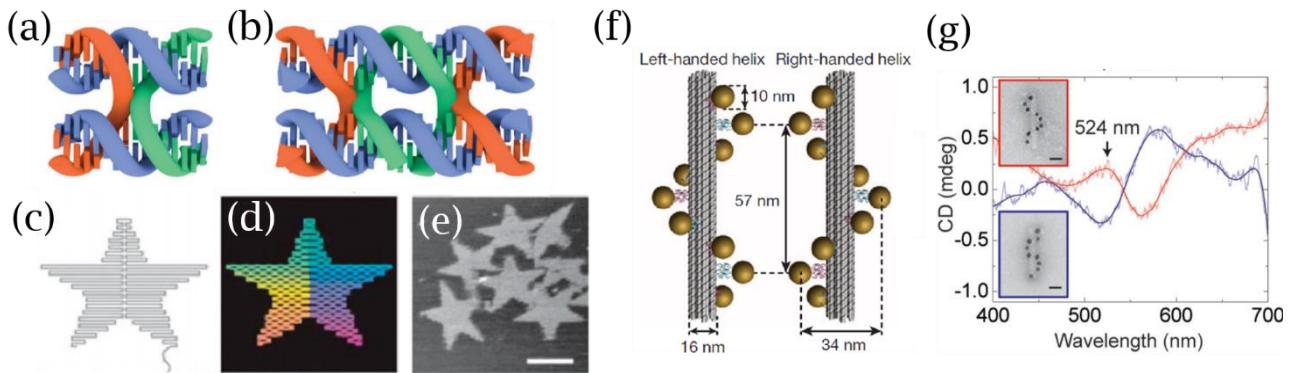


Figure 1.29 : (a) Schéma d'une Jonction Holliday, représentant un seul croisement entre deux doubles hélices. (b) Schéma d'un double croisement antiparallèle. Schémas repris avec autorisations de la référence [151]. (c) Schéma de construction d'un origami d'ADN. (d) Model du repliement des brins d'ADN reconstruit à partir des images AFM (e). Les étoiles font 100 nm de largeur, la barre d'échelle en (e) est de 1 μm . Schémas et image AFM repris avec autorisations de la référence [149]. (f) Nanohélices orientées gauche et droite. (g) Dichroïsme circulaire des nanohélix (f). Les cadres de couleur indiquent la correspondance entre les spectres et les nanohélix présentés dans les images TEM (barres d'échelle : 20 nm). Schéma et figure reproduits avec autorisation de la référence [150].

Bien que l'ADN soit souvent utilisé pour former des templates dirigeant les auto-assemblages, un dimère de particules peut également être formé par l'assemblage direct entre deux brins ssDNA en dsDNA (figure 1.30, dans le cas où une particule d'or est attachée à chaque brin, créant une structure dimérique). [152]

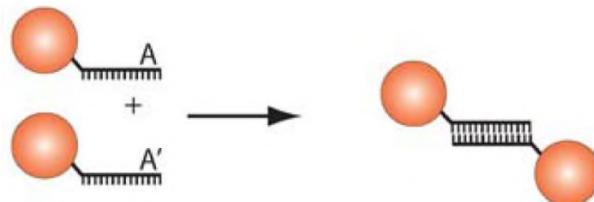


Figure 1.30 : Stratégie de formation d'un dimère de particule d'or suite à la formation directe d'un dsDNA entre deux brins ssDNA complémentaires « A » et « A' ». Chacun des deux brins étant préalablement fonctionnalisés avec une particule d'or. Schéma repris avec autorisations de la référence [147].

III.2 - Auto-assemblages directs

III.2.1 - Peptides complémentaires « coiled coil »

Les peptides et les protéines naturelles ont une chimie plus diversifiée que celle de l'ADN en raison de leur composition d'acides aminés. Certaines séquences polypeptidiques forment spontanément des hélices α , feuillets β , ou même des

structures 3D plus complexes qui ressemblent à des protéines repliées. Plusieurs motifs de pliage peptidique sont connus, comme les hélices triples de collagène [153] ou les fibrilles β -amyloïde. [154]

Le motif « coiled-coil » (figure 1.31), qui est l'un des motifs de repliement des protéines les plus abondants et les plus polyvalents dans les systèmes biologiques, se distingue particulièrement. Elles forment principalement des motifs pour la reconnaissance et l'association des protéines, et représentent un élément idéal pour la construction d'un objet nanométrique à base de peptides et de protéines. [155] Ces structures sont interdigitées par les chaînes latérales des hélices voisines au centre des paquets. Elles ont d'ailleurs été employées pour former des réseaux 2D et 3D de nanoparticules d'or. [156,157]

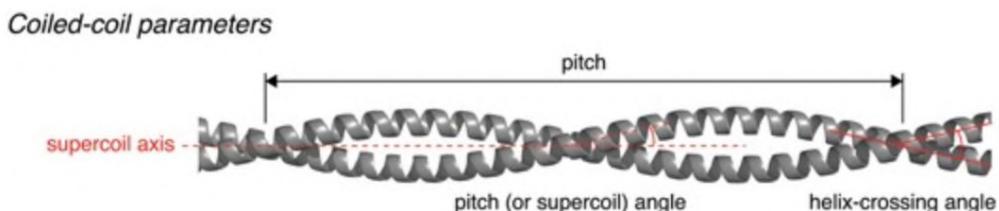


Figure 1.31 : Représentation d'un motif coiled-coil et des paramètres qui lui sont associés. Les paramètres de base sont le pas du motif (périodicité de la superhélice), l'angle du pas (angle de l'hélice par rapport à l'axe de la supercoil) et l'angle de croisement de l'hélice. Schéma repris avec autorisations de la référence [158].

Pour l'auto-assemblage, deux types de peptides composent un réseau de chaînes, le peptide « belt » dirigeant le co-assemblage de ses deux moitiés d'« armatures ». Individuellement, les peptides ne sont pas structurés, mais créent un nouvel assemblage de deux brins en spirale lorsqu'ils sont mélangés : la partie « belt » sert de template pour l'assemblage des deux peptides de l'armature. Les armatures sont orientées vers les extrémités opposées de la partie « belt » par différentes combinaisons d'interactions hydrophobes, électrostatiques et de liaisons hydrogènes formées par des placements d'acides aminés spécifiques (figure 1.32).

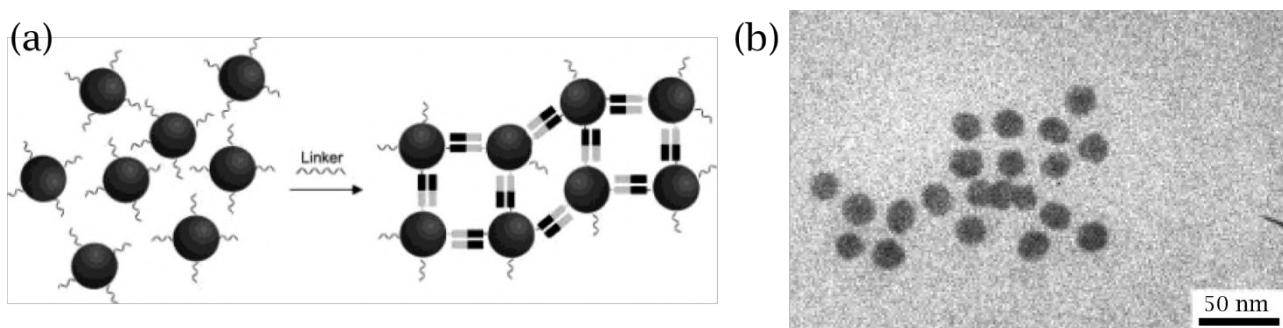


Figure 1.32 : (a) schéma de principe de l'assemblage de nanoparticules d'or dirigées par liens nanométriques ceintures et armatures. (b) images TEM de l'assemblage. Les particules sont séparées de 7 nm. Schéma et image TEM repris avec autorisations de la référence [156].

III.2.2 - Paires de protéines complémentaires

Les interactions de reconnaissance moléculaire entre protéines peuvent être utilisées pour créer des assemblages organisés de nanoparticules. L'un des couples les plus exploités est celui d'un anticorps avec un antigène. Les anticorps identifient l'antigène avec une sélectivité très élevée, une forte affinité et constituent une grande famille de protéines qui fournissent un large nombre de systèmes complémentaires. L'un des premiers exemples d'application de la reconnaissance antigène/anticorps pour l'assemblage de nanoparticules métalliques a été réalisé en 1999 de manière à concevoir un matériau macroscopique. [159] Leur emploi pour l'auto-assemblage de matériaux massifs est cependant limité par leur tendance à l'agrégation (due à une faible solubilité).

Au cours de la même année, le couple biotine/streptavidine a également été utilisé. La streptavidine est une molécule qui peut se lier avec quatre biotines, avec une très grande affinité (constante de dissociation $K_d = 10^{-14}M$). [160] Dans un exemple représentatif, les AuNP multibiotinylés ont été conçues pour s'assembler avec la protéine tétramérique streptavidine (figure 1.33). [161] Les agrégats sont réversibles à la suite de l'ajout de biotines libres.

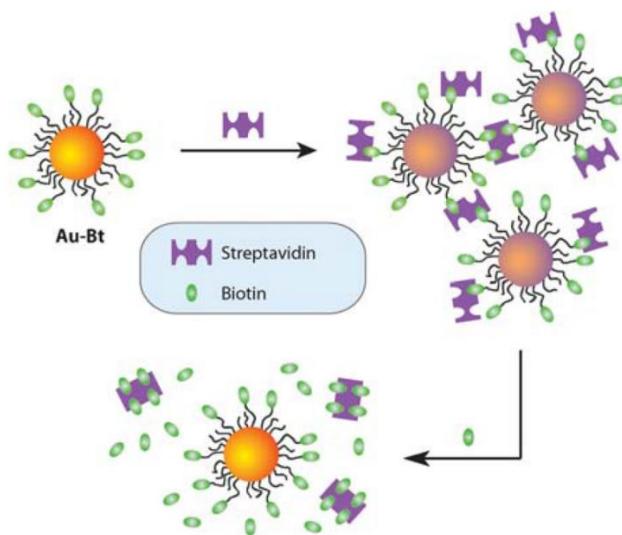


Figure 1.33 : Représentation schématique de l'interaction entre des nanoparticules biotinylées et de la streptavidine pour le processus d'assemblage et de désassemblage. Schéma repris avec autorisations de la référence [142].

Dans cette thèse, nous avons décidé d'utiliser des protéines artificielles inspirées de protéines naturelles. Les protéines naturelles sont les formes de pliage peptidique les plus avancées qui donnent des échafaudages 1, 2 et 3D très structurés et peuvent être utilisées en template. Elles offrent une chimie variée grâce aux acides aminés qui les composent permettant d'utiliser à la fois l'assemblage direct par reconnaissance de pair ou par fonctionnalisation avec un couple complémentaire. Cette grande versatilité permet de s'adapter sur une large gamme de systèmes.

IV - Les protéines α -Repin

IV.1 - Qu'est-ce qu'une protéine artificielle ?

Bien que toute protéine résultant d'une modification d'origine humaine de sa séquence pourrait être appelée artificielle, une classification des méthodes et approches imaginées peut être facilitée en considérant deux critères particuliers. Le premier qualifie à quel point la séquence d'acides aminés de la protéine artificielle se distingue de celle de la protéine naturelle la plus ressemblante (on parle de « distance mutationnelle »). Le second explicite si la méthode utilisée s'appuie sur une approche purement rationnelle et ciblée (comme la mutagénèse), sur une approche purement combinatoire (comme l'évolution dirigée) ou sur un mélange des deux (par exemple, la méthode d'altération de séquence). Une classification de plusieurs protéines en fonction de ces deux paramètres est représentée figure 1.34. [162]

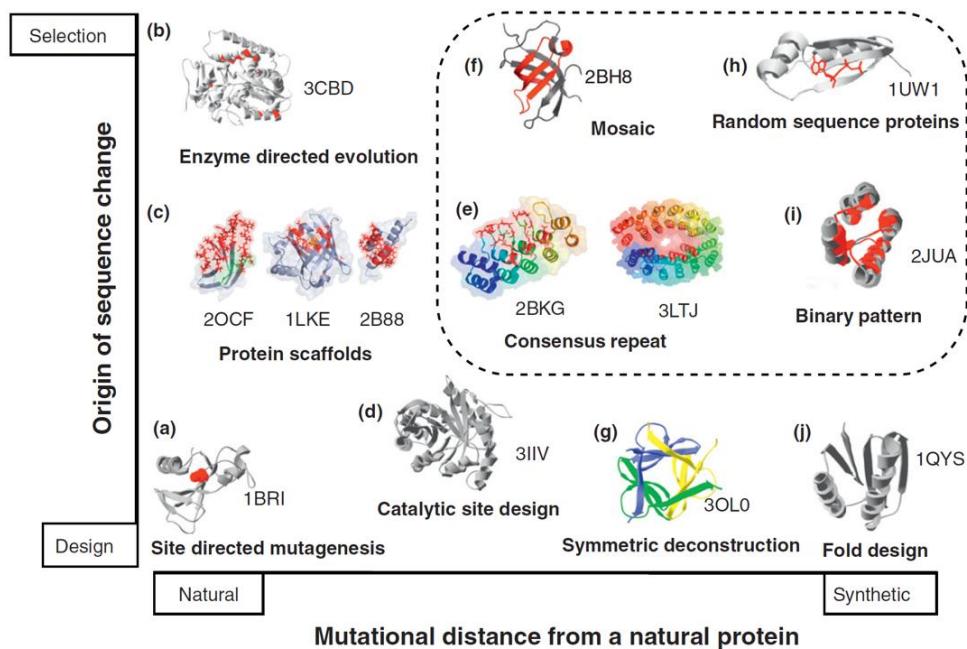


Figure 1.34 : vue panoramique des protéines artificielles. Des exemples de différentes familles de protéines artificielles sont présentés sur une carte en 2 D. Les protéines sur la partie droite de la carte ont une proportion plus élevée de leur séquence modifiée par rapport aux protéines naturelles. La partie supérieure de la carte représente les protéines modifiées par l'évolution dirigée, tandis que la partie inférieure représente les protéines modifiées par un design rationnel. Dans cette classification verticale en trois étapes, la ligne inférieure représente les protéines modifiées par des projets de conception rationnelle ; la rangée du milieu représente les changements de séquences aléatoires dans des positions conçues rationnellement ; et la rangée du haut représente les protéines dont les positions sont aléatoires le long de la séquence complète. Figure reprise avec autorisations de la référence [162].

La mutagenèse seule ne modifie pas beaucoup la structure 3D de départ, elle est très adaptée aux problématiques bio-théragnostiques. Cependant cette méthode est très lente et peu innovante. L'évolution dirigée, quant à elle, permet d'innover notamment à l'interface protéine-cible. Dans ce cas, une partie de séquence ciblée est modifiée par rapport à celle de la protéine naturelle par combinatoire de manière à conférer à la partie de séquence transformée la fonction souhaitée. Cette approche nécessite une large bibliothèque de protéines comportant des modifications différentes.

Le point de départ de l'évolution des protéines est un ensemble de protéines, avec des séquences pseudo aléatoires. Ces bibliothèques peuvent être utilisées pour étudier la répartition de leurs propriétés telles que la solubilité, la flexibilité et, finalement, la fonctionnalité. [163]

La création de ces protéines artificielles montre deux principaux intérêts. Premièrement, ces approches peuvent potentiellement répondre à des questions très fondamentales sur l'évolution des protéines. Les approches combinatoires des protéines artificielles peuvent explorer expérimentalement des scénarios plausibles d'évolution naturelle et aider à évaluer les contraintes sur l'évolution naturelle. Deuxièmement, les approches combinatoires peuvent être un moyen d'obtenir de nouvelles protéines avec des propriétés que l'on ne trouve pas forcément dans les protéines naturelles. La cible de la protéine peut par exemple être un matériau plutôt qu'une autre protéine. Un exemple de reconnaissance de la surface (111) de l'or est détaillé plus loin dans ce chapitre.

IV.2 - Genèse des α -Repin et construction d'une banque de « phage display »

Les anticorps sont des biomolécules à structures favorisant une optimisation combinatoire, cependant ils ont également des inconvénients comme leurs faibles propriétés biophysiques. Des biomolécules comblant ces lacunes sont développées. Des protéines robustes ont été développées pour des applications biologiques comme par exemple les Darpins et les alpha Rep. [164]

Les protéines avec des motifs internes répétitifs ont une organisation modulaire et une architecture régulière qui en font des modèles attrayants pour la conception et les expériences d'évolution dirigée. L'étude de tous les motifs séquentiels au sein d'une famille de motifs trouvés dans des protéines naturelles montre que certaines positions des amino-acides du motif sont hautement conservées et d'autres très variables. Les positions conservées correspondent aux résidus impliqués dans le maintien de la structure 3D de chaque motif et/ou l'interaction avec les motifs voisins. Les résidus variables sont moins susceptibles de contribuer à la stabilité des plis et à la formation de la surface des protéines répétées, créant une macro-surface hypervariable d'où peuvent émerger des interactions avec d'autres partenaires.

Les protéines utilisées dans cette thèse, les α -Rep, sont des protéines artificielles consistant en la concaténation de motifs internes composés de deux α -hélices antiparallèles (figure 1.35). Leur structure a été fortement inspirée de motifs se trouvant dans des protéines naturelles. [165] Les fonctions biologiques de ces protéines sont très diverses, mais les motifs de la famille de protéines montrant une stabilité sur une large gamme de température sont souvent impliqués dans les interactions protéine-protéine. Ces protéines sont repliées en une succession de paires d'hélices α formant une super-hélice droite.

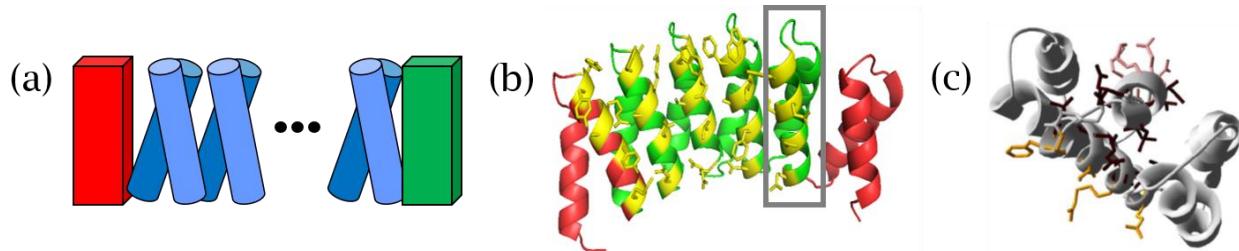


Figure 1.35 : (a) Schéma de la protéine composée d'un N-cap (brique rouge), d'un C-cap (brique verte) et d'un nombre modulable de repeats internes (doubles hélices antiparallèles bleues). (b) Modèle d'une protéine avec les caps en rouge et les répétitions de motifs en vert et jaune. Un repeat unique est présenté en (c). Modèles repris avec autorisation de la référence [165].

L'équipe du Pr. Phillippe Minard, qui a créé les α -Rep, s'est donc concentrée sur une classe spécifique de protéines de répétition HEAT classées comme PBS HEAT-like repeat, nommées d'après la protéine de la phycobiline synthase, dans laquelle elles ont été identifiées pour la première fois. Ce sous-type de répétition est intéressant pour plusieurs raisons : tout d'abord, ces motifs se trouvent couramment dans les micro-organismes thermophiles et pourraient donc fournir une plate-forme protéique stable. Deuxièmement, cette famille montre des motifs courts et sa distribution semble homogène en termes de longueur et de séquence.

Les différentes positions des acides aminés partagées par les motifs répétitifs de la collection de séquences des protéines naturelles ne sont pas également conservées. Certaines positions sont hautement conservées, voir les flèches noires sur la figure 1.36.a et d'autres sont hypervariables, voir positions signalées par les barres jaunes figure 1.36.a.

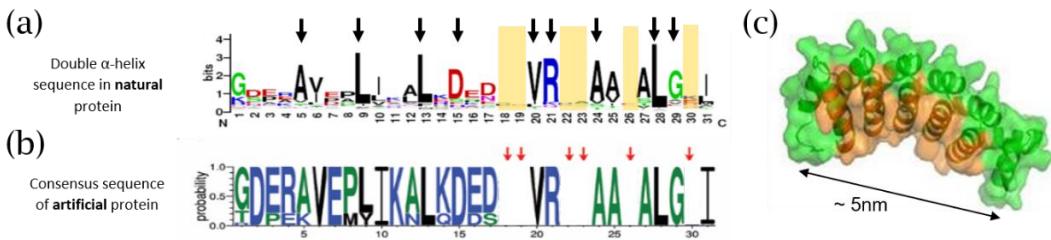


Figure 1.36 : (a) séquence de la double hélice α dans la protéine **naturelle**, (b) séquence consensus de la protéine **artificielle**. (c) Représentation 3D de la protéine artificielle avec en vert la partie rigide et conservée, en orange la partie hypervariable. Séquences et modèle repris avec autorisations de la référence [165].

Les positions les plus variables (18, 19, 22, 23, 26 et 30) sont situées sur la surface extérieure de la deuxième hélice du motif et sont occupées par une plus grande diversité de chaînes latérales et, notamment, une fraction significative de chaînes latérales aromatiques (figure 1.36.a en orange). Cela suggère que ces dernières pourraient être recrutées pour interagir avec des partenaires.

Sur la base de cette séquence consensus, une bibliothèque de phages produisant des protéines modifiées avec un nombre différent de répétitions a été créée. Un phage est un virus qui se réplique dans des bactéries qu'il a préalablement infectées. Ils sont composés de protéines qui encapsulent un génome d'ADN ou d'ARN, et peuvent avoir des structures simples ou élaborées, voir la représentation d'un phage figure 1.37. En insérant une séquence étrangère à la suite de la séquence de la protéine p3 (par exemple), le phage produira une version modifiée de p3 qui exposera la protéine encodée par la séquence étrangère. Une bibliothèque de phages est créée en faisant varier tout ou une partie de la séquence étrangère d'une large population de phages.

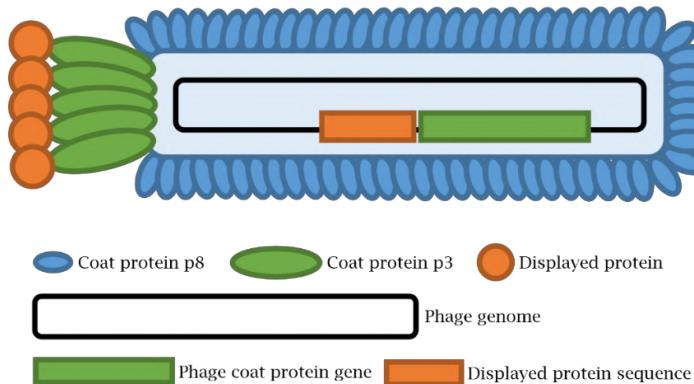


Figure 1.37 : Schéma d'un phage M13, clonant une séquence étrangère (celle d'une protéine α -Rep, par exemple) dans son génome afin de modifier les protéines p3 présentes sur une des faces de son enveloppe. Cette modification entraîne l'expression d'une séquence codant une protéine étrangère fusionnée à la protéine p3. Sur ce schéma, toutes les protéines p3 sont fusionnées à la protéine à exposer. Dans le but de limiter les effets d'avidité (accrochage multipoints) il est possible de modifier les phages pour qu'au plus une copie de la protéine (cercle orange) soit présente par virus.

Dans cette bibliothèque, les protéines diffèrent par le nombre de répétitions et par la séquence locale de chaque répétition dans les positions variables (flèches rouges présentes au-dessus de la structure des protéines α -Rep, illustrée figure 1.36.b). Le premier (N-cap) et le dernier (C-cap) motif ont une topologie similaire, mais leur séquence est adaptée pour protéger le noyau hydrophobe. Les répétitions internes comprennent 31 acides aminés. La séquence qui en résulte combine vingt-cinq positions hautement conservées (figure 1.36.b) qui assurent la structure robuste des protéines et six positions hypervariables spécifiques qui peuvent accueillir un large éventail de substitutions d'acides aminés. Une représentation 3D de la protéine est présentée figure 1.36.c.

IV.3 - Sélection par évolution dirigée de protéines à fonction ciblée

Les protéines α -Rep sont sélectionnées en exposant la bibliothèque de phages à une cible et en suivant les étapes décrites sur la figure 1.38, c'est ce qu'on appelle la sélection par « phage display ». La population de phages portant les protéines α -Rep est incubée à un pH de 7,5 avec les cibles choisies (étape A). Les phages faiblement liés sont élués (étape B) tandis que les clones liés à la cible sont collectés par élution acide (étape C) et multipliés dans des bactéries *E. coli* (étape D). Cette procédure itérative est répétée trois fois avant que les clones restants soient prélevés au hasard dans la sous-population émergente (étape E), exprimés, isolés et testés par des tests ELISA (plaqué de microtitrage pour vérifier la présence d'une biomolécule dans un échantillon, ici des protéines) standardisés par rapport à des cibles souhaitées (autre protéine ou matériaux). [166]

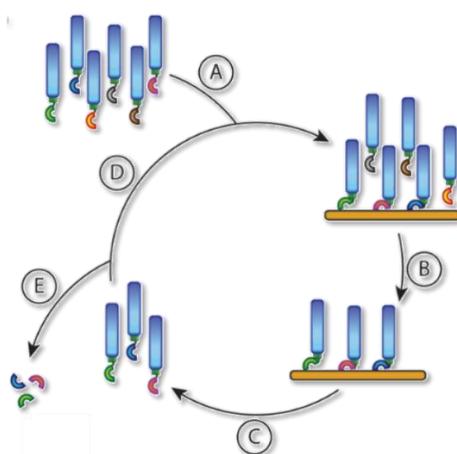


Figure 1.38 : Organigramme schématique montrant la conception du phage display et la sélection des protéines α -Rep (A-D). Ces étapes impliquent : (A) la construction de la phagothèque ; (B) la sélection des α -Rep sur une cible et le rinçage des phages non liés ; (C-D) élution acide des phages faiblement liés et amplification bactérienne de certains phages. (E) production et la purification à grande échelle des α -Rep sélectionnées. Schémas repris avec autorisations de la référence [167].

Un premier test de sélection de protéines avec une affinité déterminée a été fait et la méthode du phage display a été utilisée sur quatre cibles. Des signaux ELISA positifs significatifs ont été obtenus pour les quatre cibles, ce qui indique que les bibliothèques contiennent des liants potentiels pour chacune de ces 4 cibles. Pour chaque cible plusieurs liants sont obtenus, par exemple la protéine A3 qui est une protéine α -Rep choisie au hasard dans la bibliothèque. Après trois cycles de phage display, deux protéines complémentaires, nommées α 2 et α 17, ont été sélectionnées et multipliées. Elles possèdent un nombre de répétitions différent (respectivement deux et trois) et des séquences hypervariables différentes. Afin de greffer plus tard ces protéines sur des nanoparticules d'or, un tag de trois cystéines (ayant une grande affinité pour l'or) est inséré à l'extrémité C-terminale des A3 devenant Cys3.

Une analyse quantitative de l'affinité des liaisons α 2—Cys et α 17—Cys est obtenue par calorimétrie de titrage isotherme (ITC pour *isothermal titration calorimetry*), qui fournit notamment la constante de dissociation K_D . [131] Les valeurs K_D sont respectivement de $12,9 \pm 1,1$ nM pour Cys3-A3· α 2—Cys3 et 213 ± 25 nM pour Cys3-A3· α 17—Cys3.

Des assemblages de nanoparticules ont, par la suite, été réalisés par greffage des protéines complémentaires à la surface de deux populations de colloïdes d'or. [168] Elles sont ensuite mises en contact et l'assemblage se fait par la reconnaissance de paires formant un film de nanoparticules (figure 1.39). Ils sont réversibles par compétition grâce à l'ajout de protéines libres en solution.

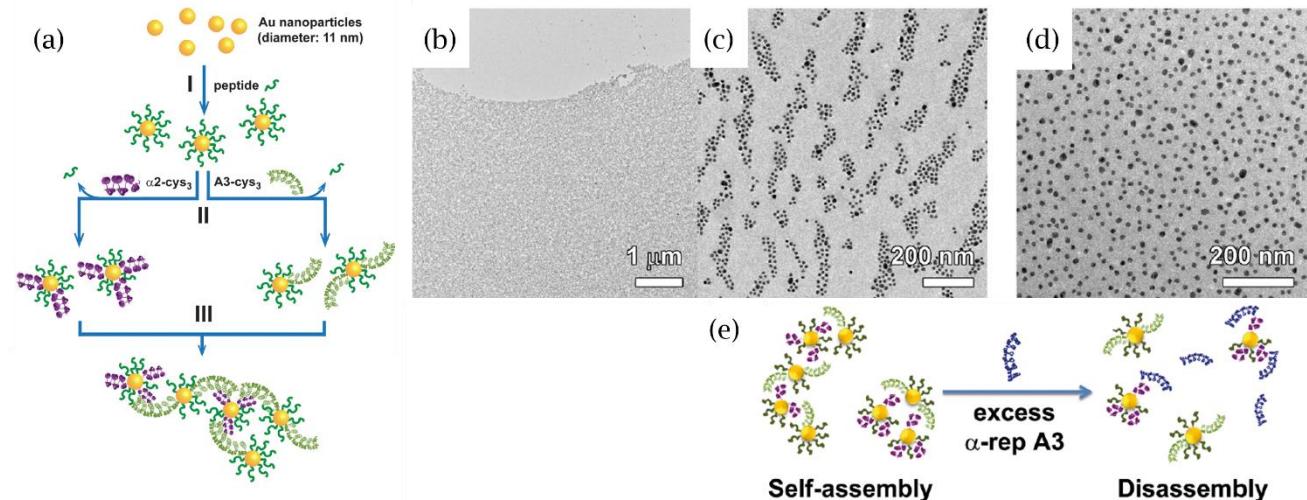


Figure 1.39 : Schéma de l'auto-assemblage de nanoparticules dirigé par la formation de la paire de protéines Rep. Étape I : recouvrement par un peptide des nanoparticules d'or stabilisées par du citrate. Étape II : fonctionnalisation des protéines par échange de ligands. Étape III : auto-assemblage des nanoparticules par reconnaissance de pairs. (b-c) Images MET de l'auto-assemblage de nanoparticules d'or induit avec un rapport molaire (nanoparticule : protéine) 1 : 30 (b) ou 1 : 20 (c). (e) Schéma des tests de compétition d'affinité où l'addition d'un excès de la protéine induit le désassemblage des nanoparticules. (d) image TEM après le désassemblage. Schéma et image TEM repris avec autorisations de la référence [168].

Enfin très récemment, juste avant mon arrivée en thèse, la bibliothèque des α -Rep a été mise en contact avec un film d'or d'orientation cristallographique (111). [167] La population de phages portant les protéines α -Rep est alors incubée à un pH de 7,5 avec des surfaces d'Au(111) fraîchement préparées. Le cycle de phage display décrit figure 1.38 est alors appliqué. Après séquençage, un total de 9 protéines reconnaissant Au(111) sont extraites avec un numéro de répétition interne (n) compris entre 1 et 10 et un pI allant de 5,3 à 9,05 et sont identifiés comme A12, C4, D5, D7, F2, F5, F9, F10, et G8. Les positions hypervariables des 9 protéines α -Rep sélectionnées sont dominées par les acides aminés de la glutamine (Gln), l'arginine (Arg), la lysine (Lys) et la sérine (Ser) qui, ensemble, représentent 43 % des positions hypervariables. Cela suggère que les protéines sélectionnées interagissent avec la surface principalement par la liaison des amines et des groupes hydroxyles.

Afin d'évaluer plus en détail la spécificité de la liaison avec l'or et d'estimer les constantes d'affinité, chacune des neuf protéines a été immobilisée sur des puces de détection à résonance plasmonique de surface (SPR). Une phase d'association positive significative est observée, qui montre une réponse maximale pour G8, suivi par F5, D5 et D7 et, à un niveau inférieur, par A12 (figure 1.40). La réponse SPR maximale est observée avec la plus grande protéine contenant 10 répétitions internes (G8). Ces analyses quantitatives donnent des constantes de dissociation inférieures à 10 nM, similaires à celles qui ont été auparavant mesurées pour les paires de protéines α -Rep.

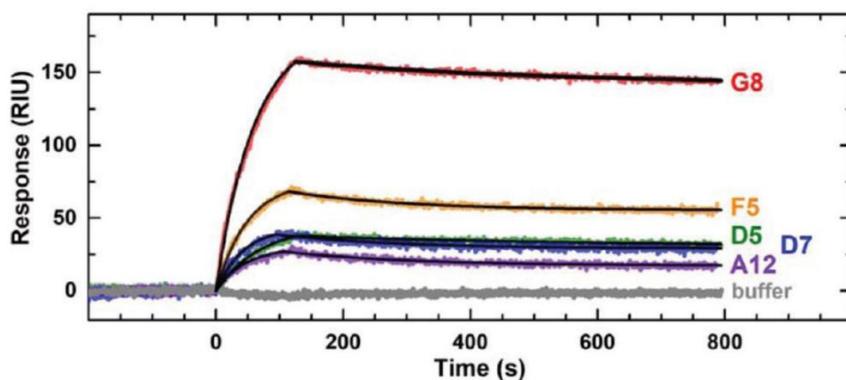


Figure 1.40 : Sensogrammes SPR pendant les phases d'adsorption et de désorption surveillant les interactions entre les protéines α -Rep immobilisées et les nanoparticules d'or stabilisées au citrate ($[Aucit] = 10 \text{ nM}$). Les lignes noires pleines sont les ajustements exponentiels des phases d'association et de dissociation. Figure reprise avec autorisations de la référence [167].

Compte tenu de leur forme intrinsèque rigide tridimensionnelle, de leur pH élevé et de leur stabilité thermique, ainsi que de leur potentiel d'expression élevé qui permet la production de solutions concentrées de l'ordre du mM, ces protéines possèdent un fort potentiel en tant qu'agents de surface sélectifs de Au(111) et même en tant qu'inhibiteur de croissance cristallin dans la synthèse des nanoparticules d'or. Ce sont ces protéines que nous allons utiliser pour la synthèse des nanoprismes d'or dans le chapitre 3.

V - Conclusion

Après une discussion sur les différents types des propriétés plasmoniques pouvant exister dans une particule métallique et une discussion sur les émetteurs les plus à même de nous intéresser pour la réalisation de nos systèmes hybrides, nous avons exposé les propriétés optiques que peuvent engendrer de tels couplages.

À la suite de quoi, nous avons fait un bref tour d'horizon des techniques expérimentales permettant de caractériser les oscillations d'électrons confinés à la surface des particules métalliques. Dans le dernier chapitre, nous utiliserons la cathodoluminescence, pour la caractérisation spectrale et spatiale de prismes d'or et le FLIM pour la caractérisation en temps de vie des échantillons.

Nous avons ensuite introduit diverses façons de produire des assemblages de nanoparticules, selon des méthodes dites template ou directe. Ces deux méthodes nous inspirerons pour le développement de nos assemblages présentés aux chapitres 3 et 4 respectivement.

Enfin, nous avons présenté les protéines α -Rep, qui sont des protéines artificielles dont la variation des acides aminés qui les composent permet de les utiliser à la fois pour l'assemblage direct par reconnaissance de pair ou par fonctionnalisation avec un couple complémentaire. Cette grande versatilité permet de s'adapter sur une large gamme de systèmes et d'envisager un grand nombre d'utilisations. Le chapitre 3 montrera les applications que nous en avons fait.

Le but de cette thèse est principalement de développer des particules métalliques et émettrices afin de former des structures 2D d'assemblages hybrides par assemblage direct ou template et de caractériser les propriétés optiques de ces objets.

Références

1. J. de Torres, P. Ferrand, G. Colas des Francs, and J. Wenger, "Coupling Emitters and Silver Nanowires to Achieve Long-Range Plasmon-Mediated Fluorescence Energy Transfer," *ACS Nano* **10**, 3968–3976 (2016).
2. P. Andrew, "Forster Energy Transfer in an Optical Microcavity," *Science* **290**, 785–788 (2000).
3. U. Kumar, S. Viarbitskaya, A. Cuche, C. Girard, S. Bolisetty, R. Mezzenga, G. Colas des Francs, A. Bouhelier, and E. Dujardin, "Designing Plasmonic Eigenstates for Optical Signal Transmission in Planar Channel Devices," *ACS Photonics* **5**, 2328–2335 (2018).
4. S. A. Maier, *Plasmonics: Fundamentals and Applications* (Springer, 2007).
5. A. Otto, "Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection," *Z. Für Phys. Hadrons Nucl.* **216**, 398–410 (1968).
6. E. Kretschmann and H. Raether, "Notizen: Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light," *Z. Für Naturforschung A* **23**, 2135–2136 (1968).
7. A. V. Zayats, I. I. Smolyaninov, and A. A. Maradudin, "Nano-optics of surface plasmon polaritons," *Phys. Rep.* **408**, 131–314 (2005).
8. T. Wang, E. Boer-Duchemin, Y. Zhang, G. Comtet, and G. Dujardin, "Excitation of propagating surface plasmons with a scanning tunnelling microscope," *Nanotechnology* **22**, 175201 (2011).
9. P. Bharadwaj, A. Bouhelier, and L. Novotny, "Electrical Excitation of Surface Plasmons," *Phys. Rev. Lett.* **106**, 226802 (2011).
10. C. Girard and E. Dujardin, "Near-field optical properties of *top-down* and *bottom-up* nanostructures," *J. Opt. Pure Appl. Opt.* **8**, S73–S86 (2006).
11. O. J. F. Martin and C. Girard, "Controlling and tuning strong optical field gradients at a local probe microscope tip apex," *Appl. Phys. Lett.* **70**, 705–707 (1997).
12. S. Viarbitskaya, A. Teulle, R. Marty, J. Sharma, C. Girard, A. Arbouet, and E. Dujardin, "Tailoring and imaging the plasmonic local density of states in crystalline nanoprisms," *Nat. Mater.* **12**, 426–432 (2013).
13. B. Lamprecht, J. R. Krenn, G. Schider, H. Ditlbacher, M. Salerno, N. Felidj, A. Leitner, F. R. Aussenegg, and J. C. Weeber, "Surface plasmon propagation in microscale metal stripes," *Appl. Phys. Lett.* **79**, 51–53 (2001).
14. P. Kahl, D. Podbiel, C. Schneider, A. Makris, S. Sindermann, C. Witt, D. Kilbane, M. H. Hoegen, M. Aeschlimann, and F. M. zu Heringdorf, "Direct Observation of Surface Plasmon Polariton Propagation and Interference by Time-Resolved Imaging in Normal-Incidence Two Photon Photoemission Microscopy," *Plasmonics* **13**, 239–246 (2018).
15. J. A. Schuller, E. S. Barnard, W. Cai, Y. C. Jun, J. S. White, and M. L. Brongersma, "Plasmonics for extreme light concentration and manipulation," *Nat. Mater.* **9**, 193–204 (2010).
16. W. L. Barnes, A. Dereux, and T. W. Ebbesen, "Surface plasmon subwavelength optics," *Nature* **424**, 824–830 (2003).
17. S. I. Bozhevolnyi, V. S. Volkov, E. Devaux, J.-Y. Laluet, and T. W. Ebbesen, "Channel plasmon subwavelength waveguide components including interferometers and ring resonators," *Nature* **440**, 508–511 (2006).
18. S. A. Maier, P. G. Kik, H. A. Atwater, S. Meltzer, E. Harel, B. E. Koel, and A. A. G. Requicha, "Local detection of electromagnetic energy transport below the diffraction limit in metal nanoparticle plasmon waveguides," *Nat. Mater.* **2**, 229–232 (2003).
19. A. Teulle, M. Bosman, C. Girard, K. L. Gurunatha, M. Li, S. Mann, and E. Dujardin, "Multimodal plasmonics in fused colloidal networks," *Nat. Mater.* **14**, 87–94 (2014).

-
20. R. M. Dickson and L. A. Lyon, "Unidirectional Plasmon Propagation in Metallic Nanowires," *J. Phys. Chem. B* **104**, 6095–6098 (2000).
21. H. Ditlbacher, A. Hohenau, D. Wagner, U. Kreibig, M. Rogers, F. Hofer, F. R. Aussenegg, and J. R. Krenn, "Silver Nanowires as Surface Plasmon Resonators," *Phys. Rev. Lett.* **95**, 257403 (2005).
22. W. Hermoso, T. V. Alves, C. C. S. de Oliveira, E. G. Moriya, F. R. Ornellas, and P. H. C. Camargo, "Triangular metal nanoprisms of Ag, Au, and Cu: Modeling the influence of size, composition, and excitation wavelength on the optical properties," *Chem. Phys.* **423**, 142–150 (2013).
23. P. R. Wiecha, M.-M. Mennemantueil, D. Khlopis, J. Martin, A. Arbouet, D. Gérard, A. Bouhelier, J. Plain, and A. Cuche, "Local field enhancement and thermoplasmonics in multimodal aluminum structures," *Phys. Rev. B* **96**, 035440 (2017).
24. X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale, and M. P. Bruchez, "Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots," *Nat. Biotechnol.* **21**, 41–46 (2003).
25. C. B. Murray, D. J. Norris, and M. G. Bawendi, "Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites," *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 8706–8715 (1993).
26. J. Pacifico, J. Jasieniak, D. E. Gómez, and P. Mulvaney, "Tunable 3D Arrays of Quantum Dots: Synthesis and Luminescence Properties," *Small* **2**, 199–203 (2006).
27. J. Kwak, W. K. Bae, D. Lee, I. Park, J. Lim, M. Park, H. Cho, H. Woo, D. Y. Yoon, K. Char, S. Lee, and C. Lee, "Bright and Efficient Full-Color Colloidal Quantum Dot Light-Emitting Diodes Using an Inverted Device Structure," *Nano Lett.* **12**, 2362–2366 (2012).
28. W. R. Algar, A. J. Tavares, and U. J. Krull, "Beyond labels: A review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction," *Anal. Chim. Acta* **673**, 1–25 (2010).
29. S. Link and M. A. El-Sayed, "Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods," *J. Phys. Chem. B* **103**, 8410–8426 (1999).
30. K. Binnemans, "Lanthanide-Based Luminescent Hybrid Materials," *Chem. Rev.* **109**, 4283–4374 (2009).
31. S. V. Eliseeva and J.-C. G. Bünzli, "Lanthanide luminescence for functional materials and bio-sciences," *Chem Soc Rev* **39**, 189–227 (2010).
32. J. Shen, L.-D. Sun, and C.-H. Yan, "Luminescent rare earth nanomaterials for bioprobe applications," *Dalton Trans.* 5687 (2008).
33. Y. Liu, S. Zhou, D. Tu, Z. Chen, M. Huang, H. Zhu, E. Ma, and X. Chen, "Amine-Functionalized Lanthanide-Doped Zirconia Nanoparticles: Optical Spectroscopy, Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Biodection, and Targeted Imaging," *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 15083–15090 (2012).
34. L. Cheng, C. Wang, and Z. Liu, "Upconversion nanoparticles and their composite nanostructures for biomedical imaging and cancer therapy," *Nanoscale* **5**, 23–37 (2013).
35. D. Yang, P. Ma, Z. Hou, Z. Cheng, C. Li, and J. Lin, "Current advances in lanthanide ion (Ln^{3+}) -based upconversion nanomaterials for drug delivery," *Chem. Soc. Rev.* **44**, 1416–1448 (2015).
36. N. M. Idris, M. K. G. Jayakumar, A. Bansal, and Y. Zhang, "Upconversion nanoparticles as versatile light nanotransducers for photoactivation applications," *Chem. Soc. Rev.* **44**, 1449–1478 (2015).
37. T. R. Hinklin, S. C. Rand, and R. M. Laine, "Transparent, Polycrystalline Upconverting Nanoceramics: Towards 3-D Displays," *Adv. Mater.* **20**, 1270–1273 (2008).
38. X. Huang, S. Han, W. Huang, and X. Liu, "Enhancing solar cell efficiency: the search for luminescent materials as spectral converters," *Chem Soc Rev* **42**, 173–201 (2013).
39. F. Auzel, "Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids," *Chem. Rev.* **104**, 139–174 (2004).

40. F. Wang and X. Liu, "Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals," *Chem. Soc. Rev.* **38**, 976 (2009).
41. H. Dong, S.-R. Du, X.-Y. Zheng, G.-M. Lyu, L.-D. Sun, L.-D. Li, P.-Z. Zhang, C. Zhang, and C.-H. Yan, "Lanthanide Nanoparticles: From Design toward Bioimaging and Therapy," *Chem. Rev.* **115**, 10725–10815 (2015).
42. C. M. Aikens, "Electronic Structure of Ligand-Passivated Gold and Silver Nanoclusters," *J. Phys. Chem. Lett.* **2**, 99–104 (2011).
43. R. Jin, C. Zeng, M. Zhou, and Y. Chen, "Atomically Precise Colloidal Metal Nanoclusters and Nanoparticles: Fundamentals and Opportunities," *Chem. Rev.* **116**, 10346–10413 (2016).
44. A. Fernando, K. L. D. M. Weerawardene, N. V. Karimova, and C. M. Aikens, "Quantum Mechanical Studies of Large Metal, Metal Oxide, and Metal Chalcogenide Nanoparticles and Clusters," *Chem. Rev.* **115**, 6112–6216 (2015).
45. M. Zhu, C. M. Aikens, F. J. Hollander, G. C. Schatz, and R. Jin, "Correlating the Crystal Structure of A Thiol-Protected Au₂₅ Cluster and Optical Properties," *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 5883–5885 (2008).
46. A. W. Castleman and S. N. Khanna, "Clusters, Superatoms, and Building Blocks of New Materials," *J. Phys. Chem. C* **113**, 2664–2675 (2009).
47. J. U. Reveles, S. N. Khanna, P. J. Roach, and A. W. Castleman, "Multiple valence superatoms," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 18405–18410 (2006).
48. M. Walter, J. Akola, O. Lopez-Acevedo, P. D. Jadzinsky, G. Calero, C. J. Ackerson, R. L. Whetten, H. Gronbeck, and H. Hakkinnen, "A unified view of ligand-protected gold clusters as superatom complexes," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 9157–9162 (2008).
49. M. P. Johansson, I. Warnke, A. Le, and F. Furche, "At What Size Do Neutral Gold Clusters Turn Three-Dimensional?," *J. Phys. Chem. C* **118**, 29370–29377 (2014).
50. M. P. Johansson, A. Lechtken, D. Schooss, M. M. Kappes, and F. Furche, "2D-3D transition of gold cluster anions resolved," *Phys. Rev. A* **77**, (2008).
51. A. Soleilhac, F. Bertorelle, C. Comby-Zerbino, F. Chirot, N. Calin, P. Dugourd, and R. Antoine, "Size Characterization of Glutathione-Protected Gold Nanoclusters in the Solid, Liquid and Gas Phases," *J. Phys. Chem. C* **121**, 27733–27740 (2017).
52. F. Bertorelle, I. Russier-Antoine, N. Calin, C. Comby-Zerbino, A. Bensalah-Ledoux, S. Guy, P. Dugourd, P.-F. Brevet, Ž. Sanader, M. Krstić, V. Bonačić-Koutecký, and R. Antoine, "Au₁₀(SG)₁₀: A Chiral Gold Catenane Nanocluster with Zero Confined Electrons. Optical Properties and First-Principles Theoretical Analysis," *J. Phys. Chem. Lett.* **8**, 1979–1985 (2017).
53. J. Zheng, C. Zhang, and R. M. Dickson, "Highly Fluorescent, Water-Soluble, Size-Tunable Gold Quantum Dots," *Phys. Rev. Lett.* **93**, (2004).
54. V. Bonačić-Koutecký and R. Antoine, "Enhanced two-photon absorption of ligated silver and gold nanoclusters: theoretical and experimental assessments," *Nanoscale* **11**, 12436–12448 (2019).
55. H.-C. Chang, Y.-F. Chang, N.-C. Fan, and J. A. Ho, "Facile Preparation of High-Quantum-Yield Gold Nanoclusters: Application to Probing Mercuric Ions and Biothiols," *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 18824–18831 (2014).
56. M. Haruta, N. Yamada, T. Kobayashi, and S. Iijima, "Gold Catalysts Prepared by Coprecipitation for Low-Temperature Oxidation of Hydrogen and of Carbon Monoxide," *J. Catal.* **115**, 301–309 (1989).
57. P. Bian, J. Zhou, Y. Liu, and Z. Ma, "One-step fabrication of intense red fluorescent gold nanoclusters and their application in cancer cell imaging," *Nanoscale* **5**, 6161 (2013).
58. A. M. Derfus, W. C. W. Chan, and S. N. Bhatia, "Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots," *Nano Lett.* **4**, 11–18 (2004).
59. M. C. Mancini, B. A. Kairdolf, A. M. Smith, and S. Nie, "Oxidative Quenching and Degradation of Polymer-Encapsulated Quantum Dots: New Insights into the Long-Term Fate and Toxicity of Nanocrystals in Vivo," *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 10836–10837 (2008).

-
60. R. Hardman, "A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors," *Environ. Health Perspect.* **114**, 165–172 (2006).
61. J. Xie, Y. Zheng, and J. Y. Ying, "Protein-Directed Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoclusters," *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 888–889 (2009).
62. L. Shang, N. Azadfar, F. Stockmar, W. Send, V. Trouillet, M. Bruns, D. Gerthsen, and G. U. Nienhaus, "One-Pot Synthesis of Near-Infrared Fluorescent Gold Clusters for Cellular Fluorescence Lifetime Imaging," *Small* **7**, 2614–2620 (2011).
63. H. Kawasaki, K. Hamaguchi, I. Osaka, and R. Arakawa, "ph-Dependent Synthesis of Pepsin-Mediated Gold Nanoclusters with Blue Green and Red Fluorescent Emission," *Adv. Funct. Mater.* **21**, 3508–3515 (2011).
64. Y. Bao, H.-C. Yeh, C. Zhong, S. A. Ivanov, J. K. Sharma, M. L. Neidig, D. M. Vu, A. P. Shreve, R. B. Dyer, J. H. Werner, and J. S. Martinez, "Formation and Stabilization of Fluorescent Gold Nanoclusters Using Small Molecules," *J. Phys. Chem. C* **114**, 15879–15882 (2010).
65. X. Kang and M. Zhu, "Tailoring the photoluminescence of atomically precise nanoclusters," *Chem. Soc. Rev.* **48**, 2422–2457 (2019).
66. J. Zheng, J. T. Petty, and R. M. Dickson, "High Quantum Yield Blue Emission from Water-Soluble Au₈ Nanodots," *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7780–7781 (2003).
67. K. Pyo, V. D. Thanthirige, K. Kwak, P. Pandurangan, G. Ramakrishna, and D. Lee, "Ultrabright Luminescence from Gold Nanoclusters: Rigidifying the Au(I)-Thiolate Shell," *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 8244–8250 (2015).
68. F. Bertorelle, C. Moulin, A. Soleilhac, C. Comby-Zerbino, P. Dugourd, I. Russier-Antoine, P.-F. Brevet, and R. Antoine, "Bulky Counterions: Enhancing the Two-Photon Excited Fluorescence of Gold Nanoclusters," *ChemPhysChem* **19**, 165–168 (2018).
69. S. Goel, K. A. Velizhanin, A. Piryatinski, S. A. Ivanov, and S. Tretiak, "Ligand Effects on Optical Properties of Small Gold Clusters: A TDDFT Study," *J. Phys. Chem. C* **116**, 3242–3249 (2012).
70. G. Davies, *Properties and Growth of Diamond* (IEE : INSPEC, 1994).
71. A. Gruber, "Scanning Confocal Optical Microscopy and Magnetic Resonance on Single Defect Centers," *Science* **276**, 2012–2014 (1997).
72. G. Balasubramanian, P. Neumann, D. Twitchen, M. Markham, R. Kolesov, N. Mizuochi, J. Isoya, J. Achard, J. Beck, J. Tissler, V. Jacques, P. R. Hemmer, F. Jelezko, and J. Wrachtrup, "Ultralong spin coherence time in isotopically engineered diamond," *Nat. Mater.* **8**, 383–387 (2009).
73. F. Jelezko and J. Wrachtrup, "Single defect centres in diamond: A review," *Phys. Status Solidi A* **203**, 3207–3225 (2006).
74. X. L. Kong, L. C. L. Huang, C.-M. Hsu, W.-H. Chen, C.-C. Han, and H.-C. Chang, "High-Affinity Capture of Proteins by Diamond Nanoparticles for Mass Spectrometric Analysis," *Anal. Chem.* **77**, 259–265 (2005).
75. C. L. Degen, "Scanning magnetic field microscope with a diamond single-spin sensor," *Appl. Phys. Lett.* **92**, 243111 (2008).
76. J. R. Maze, P. L. Stanwix, J. S. Hodges, S. Hong, J. M. Taylor, P. Cappellaro, L. Jiang, M. V. G. Dutt, E. Togan, A. S. Zibrov, A. Yacoby, R. L. Walsworth, and M. D. Lukin, "Nanoscale magnetic sensing with an individual electronic spin in diamond," *Nature* **455**, 644–647 (2008).
77. G. Balasubramanian, I. Y. Chan, R. Kolesov, M. Al-Hmoud, J. Tisler, C. Shin, C. Kim, A. Wojcik, P. R. Hemmer, A. Krueger, T. Hanke, A. Leitenstorfer, R. Bratschitsch, F. Jelezko, and J. Wrachtrup, "Nanoscale imaging magnetometry with diamond spins under ambient conditions," *Nature* **455**, 648–651 (2008).
78. P. Maletinsky, S. Hong, M. S. Grinolds, B. Hausmann, M. D. Lukin, R. L. Walsworth, M. Loncar, and A. Yacoby, "A robust scanning diamond sensor for nanoscale imaging with single nitrogen-vacancy centres," *Nat. Nanotechnol.* **7**, 320–324 (2012).

79. L. Rondin, J.-P. Tetienne, P. Spinicelli, C. Dal Savio, K. Karrai, G. Dantelle, A. Thiaville, S. Rohart, J.-F. Roch, and V. Jacques, "Nanoscale magnetic field mapping with a single spin scanning probe magnetometer," *Appl. Phys. Lett.* **100**, 153118 (2012).
80. L. Rondin, J.-P. Tetienne, T. Hingant, J.-F. Roch, P. Maletinsky, and V. Jacques, "Magnetometry with nitrogen-vacancy defects in diamond," *Rep. Prog. Phys.* **77**, 056503 (2014).
81. M. S. Grinolds, S. Hong, P. Maletinsky, L. Luan, M. D. Lukin, R. L. Walsworth, and A. Yacoby, "Nanoscale magnetic imaging of a single electron spin under ambient conditions," *Nat. Phys.* **9**, 215–219 (2013).
82. O. Faklaris, V. Joshi, T. Irinopoulou, P. Tauc, M. Sennour, H. Girard, C. Gesset, J.-C. Arnault, A. Thorel, J.-P. Boudou, P. A. Curmi, and F. Treussart, "Photoluminescent Diamond Nanoparticles for Cell Labeling: Study of the Uptake Mechanism in Mammalian Cells," *ACS Nano* **3**, 3955–3962 (2009).
83. W. W.-W. Hsiao, Y. Y. Hui, P.-C. Tsai, and H.-C. Chang, "Fluorescent Nanodiamond: A Versatile Tool for Long-Term Cell Tracking, Super-Resolution Imaging, and Nanoscale Temperature Sensing," *Acc. Chem. Res.* **49**, 400–407 (2016).
84. D. I. Schuster, A. P. Sears, E. Ginossar, L. DiCarlo, L. Frunzio, J. J. L. Morton, H. Wu, G. A. D. Briggs, B. B. Buckley, D. D. Awschalom, and R. J. Schoelkopf, "High-Cooperativity Coupling of Electron-Spin Ensembles to Superconducting Cavities," *Phys. Rev. Lett.* **105**, 140501 (2010).
85. Y. Kubo, F. R. Ong, P. Bertet, D. Vion, V. Jacques, D. Zheng, A. Dréau, J.-F. Roch, A. Auffeves, F. Jelezko, J. Wrachtrup, M. F. Barthe, P. Bergonzo, and D. Esteve, "Strong Coupling of a Spin Ensemble to a Superconducting Resonator," *Phys. Rev. Lett.* **105**, 140502 (2010).
86. O. Arcizet, V. Jacques, A. Siria, P. Poncharal, P. Vincent, and S. Seidelin, "A single nitrogen-vacancy defect coupled to a nanomechanical oscillator," *Nat. Phys.* **7**, 879–883 (2011).
87. S. Hong, M. S. Grinolds, P. Maletinsky, R. L. Walsworth, M. D. Lukin, and A. Yacoby, "Coherent, Mechanical Control of a Single Electronic Spin," *Nano Lett.* **12**, 3920–3924 (2012).
88. A. Beveratos, R. Brouri, T. Gacoin, J.-P. Poizat, and P. Grangier, "Nonclassical radiation from diamond nanocrystals," *Phys. Rev. A* **64**, 061802 (2001).
89. C. Kurtsiefer, S. Mayer, P. Zarda, and H. Weinfurter, "Stable Solid-State Source of Single Photons," *Phys. Rev. Lett.* **85**, 290–293 (2000).
90. A. Sipahigil, M. L. Goldman, E. Togan, Y. Chu, M. Markham, D. J. Twitchen, A. S. Zibrov, A. Kubanek, and M. D. Lukin, "Quantum Interference of Single Photons from Remote Nitrogen-Vacancy Centers in Diamond," *Phys. Rev. Lett.* **108**, 143601 (2012).
91. A. Cuche, A. Drezet, Y. Sonnemraud, O. Faklaris, F. Treussart, J.-F. Roch, and S. Huant, "Near-field optical microscopy with a nanodiamond-based single-photon tip," *Opt. Express* **17**, 19969 (2009).
92. R. Beams, D. Smith, T. W. Johnson, S.-H. Oh, L. Novotny, and A. N. Vamivakas, "Nanoscale Fluorescence Lifetime Imaging of an Optical Antenna with a Single Diamond NV Center," *Nano Lett.* **13**, 3807–3811 (2013).
93. A. W. Schell, P. Engel, J. F. M. Werra, C. Wolff, K. Busch, and O. Benson, "Scanning Single Quantum Emitter Fluorescence Lifetime Imaging: Quantitative Analysis of the Local Density of Photonic States," *Nano Lett.* **14**, 2623–2627 (2014).
94. R. Kolesov, B. Grotz, G. Balasubramanian, R. J. Stöhr, A. A. L. Nicolet, P. R. Hemmer, F. Jelezko, and J. Wrachtrup, "Wave-particle duality of single surface plasmon polaritons," *Nat. Phys.* **5**, 470–474 (2009).
95. A. Cuche, O. Mollet, A. Drezet, and S. Huant, "Deterministic Quantum Plasmonics," *Nano Lett.* **10**, 4566–4570 (2010).
96. O. Mollet, S. Huant, G. Dantelle, T. Gacoin, and A. Drezet, "Quantum plasmonics: Second-order coherence of surface plasmons launched by quantum emitters into a metallic film," *Phys. Rev. B* **86**, 045401 (2012).

-
97. Y. Dumeige, R. Alléaume, P. Grangier, F. Treussart, and J.-F. Roch, "Controlling the single-diamond nitrogen-vacancy color center photoluminescence spectrum with a Fabry-Perot microcavity," *New J. Phys.* **13**, 025015 (2011).
98. S. Schietinger, M. Barth, T. Aichele, and O. Benson, "Plasmon-Enhanced Single Photon Emission from a Nanoassembled Metal-Diamond Hybrid Structure at Room Temperature," *Nano Lett.* **9**, 1694–1698 (2009).
99. C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler, and C. A. M. Seidel, "Photobleaching of Fluorescent Dyes under Conditions Used for Single-Molecule Detection: Evidence of Two-Step Photolysis," *Anal. Chem.* **70**, 2651–2659 (1998).
100. Z. Mahfoud, A. T. Dijksman, C. Javaux, P. Bassoul, A.-L. Baudrion, J. Plain, B. Dubertret, and M. Kociak, "Cathodoluminescence in a Scanning Transmission Electron Microscope: A Nanometer-Scale Counterpart of Photoluminescence for the Study of II-VI Quantum Dots," *J. Phys. Chem. Lett.* **4**, 4090–4094 (2013).
101. G. Dantelle, A. Slablab, L. Rondin, F. Lainé, F. Carrel, Ph. Bergonzo, S. Perruchas, T. Gacoin, F. Treussart, and J.-F. Roch, "Efficient production of NV colour centres in nanodiamonds using high-energy electron irradiation," *J. Lumin.* **130**, 1655–1658 (2010).
102. A. Beveratos, S. Kühn, R. Brouri, T. Gacoin, J.-P. Poizat, and P. Grangier, "Room temperature stable single-photon source," *Eur. Phys. J. - At. Mol. Opt. Phys.* **18**, 191–196 (2002).
103. J. R. Lakowicz and C. D. Geddes, eds., *Topics in Fluorescence Spectroscopy* (Plenum Press, 1991).
104. J. R. Lakowicz, "Radiative Decay Engineering: Biophysical and Biomedical Applications," *Anal. Biochem.* **298**, 1–24 (2001).
105. A. Drezet, Y. Sonnefraud, A. Cuche, O. Mollet, M. Berthel, and S. Huant, "Near-field microscopy with a scanning nitrogen-vacancy color center in a diamond nanocrystal: A brief review," *Micron* **70**, 55–63 (2015).
106. S. Kuhn, G. Mori, M. Agio, and V. Sandoghdar, "Modification of single molecule fluorescence close to a nanostructure: radiation pattern, spontaneous emission and quenching," *Mol. Phys.* **106**, 893–908 (2008).
107. C. Girard, E. Dujardin, R. Marty, A. Arbouet, and G. C. des Francs, "Manipulating and squeezing the photon local density of states with plasmonic nanoparticle networks," *Phys. Rev. B* **81**, 153412 (2010).
108. G. Colas des Francs, A. Bouhelier, E. Finot, J. C. Weeber, A. Dereux, C. Girard, and E. Dujardin, "Fluorescence relaxation in the near-field of a mesoscopic metallic particle: distance dependence and role of plasmon modes," *Opt. Express* **16**, 17654 (2008).
109. G. C. des Francs, J. Barthes, A. Bouhelier, J. C. Weeber, A. Dereux, A. Cuche, and C. Girard, "Plasmonic Purcell factor and coupling efficiency to surface plasmons. Implications for addressing and controlling optical nanosources," *J. Opt.* **18**, 094005 (2016).
110. A. Cuche, M. Berthel, U. Kumar, G. Colas des Francs, S. Huant, E. Dujardin, C. Girard, and A. Drezet, "Near-field hyperspectral quantum probing of multimodal plasmonic resonators," *Phys. Rev. B* **95**, (2017).
111. M. Mayy, G. Zhu, E. Mayy, A. Webb, and M. A. Noginov, "Low temperature studies of surface plasmon polaritons in silver films," *J. Appl. Phys.* **111**, 094103 (2012).
112. S. V. Jayanti, J. H. Park, A. Dejneka, D. Chvostova, K. M. McPeak, X. Chen, S.-H. Oh, and D. J. Norris, "Low-temperature enhancement of plasmonic performance in silver films," *Opt. Mater. Express* **5**, 1147 (2015).
113. A. Coste, F. Eloi, C. Arnold, G. Colas des Francs, X. Quélin, S. Buil, A. Bouhelier, J. C. Weeber, M. Nasilowski, B. Dubertret, and J.-P. Hermier, "Significant decrease of the optical losses in the coupling between colloidal CdSe/CdS nanocrystals and a flat gold film at cryogenic temperature," *Phys. Rev. B* **96**, 195416 (2017).
114. M. Liu, M. Pelton, and P. Guyot-Sionnest, "Reduced damping of surface plasmons at low temperatures," *Phys. Rev. B* **79**, 035418 (2009).

115. M. Bosman, L. Zhang, H. Duan, S. F. Tan, C. A. Nijhuis, C. Qiu, and J. K. W. Yang, "Encapsulated Annealing: Enhancing the Plasmon Quality Factor in Lithographically-Defined Nanostructures," *Sci. Rep.* **4**, 5537 (2015).
116. A. Coste, L. Moreaud, G. Colas des Francs, S. Buil, X. Quélin, E. Dujardin, and J.-P. Hermier, "Dramatic decrease of Joule losses in the coupling between a crystalline gold film and single colloidal CdSe/CdS nanocrystals at 4 K," *Phys. Rev. B* **101**, 075406 (2020).
117. A. Hartschuh, "Tip-Enhanced Near-Field Optical Microscopy," *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 8178–8191 (2008).
118. S. Viarbitskaya, O. Demichel, B. Cluzel, G. Colas des Francs, and A. Bouhelier, "Delocalization of Nonlinear Optical Responses in Plasmonic Nanoantennas," *Phys. Rev. Lett.* **115**, 197401 (2015).
119. A. Losquin and T. T. A. Lummen, "Electron microscopy methods for space-, energy-, and time-resolved plasmonics," *Front. Phys.* **12**, 127301 (2017).
120. L. Douillard and F. Charra, "Photoemission electron microscopy, a tool for plasmonics," *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **189**, 24–29 (2013).
121. T. Leißner, C. Lemke, J. Fiutowski, J. W. Radke, A. Klick, L. Tavares, J. Kjelstrup-Hansen, H.-G. Rubahn, and M. Bauer, "Morphological Tuning of the Plasmon Dispersion Relation in Dielectric-Loaded Nanofiber Waveguides," *Phys. Rev. Lett.* **111**, 046802 (2013).
122. C. Lemke, T. Leißner, A. Klick, J. Fiutowski, J. W. Radke, M. Thomaschewski, J. Kjelstrup-Hansen, H.-G. Rubahn, and M. Bauer, "The complex dispersion relation of surface plasmon polaritons at gold/para-hexaphenylene interfaces," *Appl. Phys. B* **116**, 585–591 (2014).
123. N. M. Buckanie, J. Göhre, P. Zhou, D. von der Linde, M. Horn-von Hoegen, and F.-J. Meyer zu Heringdorf, "Space charge effects in photoemission electron microscopy using amplified femtosecond laser pulses," *J. Phys. Condens. Matter* **21**, 314003 (2009).
124. N. Yamamoto, K. Araya, and F. J. García de Abajo, "Photon emission from silver particles induced by a high-energy electron beam," *Phys. Rev. B* **64**, 205419 (2001).
125. J. Nelayah, M. Kociak, O. Stéphan, F. J. García de Abajo, M. Tencé, L. Henrard, D. Taverna, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán, and C. Colliex, "Mapping surface plasmons on a single metallic nanoparticle," *Nat. Phys.* **3**, 348–353 (2007).
126. M. Bosman, V. J. Keast, M. Watanabe, A. I. Maaroof, and M. B. Cortie, "Mapping surface plasmons at the nanometre scale with an electron beam," *Nanotechnology* **18**, 165505 (2007).
127. N. Kawasaki, S. Meuret, R. Weil, H. Lourenço-Martins, O. Stéphan, and M. Kociak, "Extinction and Scattering Properties of High-Order Surface Plasmon Modes in Silver Nanoparticles Probed by Combined Spatially Resolved Electron Energy Loss Spectroscopy and Cathodoluminescence," *ACS Photonics* **3**, 1654–1661 (2016).
128. K. Imaeda, S. Hasegawa, and K. Imura, "Imaging of Plasmonic Eigen Modes in Gold Triangular Mesoplates by Near-Field Optical Microscopy," *J. Phys. Chem. C* **122**, 7399–7409 (2018).
129. C. Awada, T. Popescu, L. Douillard, F. Charra, A. Perron, H. Yockell-Lelièvre, A.-L. Baudrion, P.-M. Adam, and R. Bachelot, "Selective Excitation of Plasmon Resonances of Single Au Triangles by Polarization-Dependent Light Excitation," *J. Phys. Chem. C* **116**, 14591–14598 (2012).
130. H. Wallrabe and A. Periasamy, "Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy," *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 19–27 (2005).
131. W. Becker, "Fluorescence lifetime imaging - techniques and applications: FLUORESCENCE LIFETIME IMAGING," *J. Microsc.* **247**, 119–136 (2012).
132. T. Ritman-Meer, N. I. Cade, and D. Richards, "Spatial imaging of modifications to fluorescence lifetime and intensity by individual Ag nanoparticles," *Appl. Phys. Lett.* **91**, 123122 (2007).
133. H.-L. Chen, H.-C. Cheng, T.-S. Ko, S.-Y. Chuang, and T.-C. Chu, "Characterizing Optical Properties of Self-Assembled Gold Nanoparticles for Surface Plasmon Resonance Device Applications," *Jpn. J. Appl. Phys.* **45**, 6984–6986 (2006).
134. R. G. Nuzzo and D. L. Allara, "Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces," *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 4481–4483 (1983).

-
135. C. D. Bain and G. M. Whitesides, "Correlations between wettability and structure in monolayers of alkanethiols adsorbed on gold," *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 3665–3666 (1988).
136. E. B. Troughton, C. D. Bain, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo, D. L. Allara, and M. D. Porter, "Monolayer films prepared by the spontaneous self-assembly of symmetrical and unsymmetrical dialkyl sulfides from solution onto gold substrates: structure, properties, and reactivity of constituent functional groups," *Langmuir* **4**, 365–385 (1988).
137. C. D. Bain, E. B. Troughton, Y. T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, and R. G. Nuzzo, "Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold," *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 321–335 (1989).
138. J. Aizenberg, P. V. Braun, and P. Wiltzius, "Patterned Colloidal Deposition Controlled by Electrostatic and Capillary Forces," *Phys. Rev. Lett.* **84**, 2997–3000 (2000).
139. N. C. Seeman, "Nucleic acid junctions and lattices," *J. Theor. Biol.* **99**, 237–247 (1982).
140. G. Wang and R. W. Murray, "Controlled Assembly of Monolayer-Protected Gold Clusters by Dissolved DNA," *Nano Lett.* **4**, 95–101 (2004).
141. M. Ganguli, J. V. Babu, and S. Maiti, "Complex Formation between Cationically Modified Gold Nanoparticles and DNA: An Atomic Force Microscopic Study," *Langmuir* **20**, 5165–5170 (2004).
142. Y. Ofir, B. Samanta, and V. M. Rotello, "Polymer and biopolymer mediated self-assembly of gold nanoparticles," *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1814 (2008).
143. C. M. Niemeyer and C. A. Mirkin, eds., *Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives* (Wiley-VCH, 2004).
144. S. Dieluweit, D. Pum, and U. B. Sleytr, "Formation of a gold superlattice on an S-layer with square lattice symmetry," *Supramol. Sci.* **5**, 15–19 (1998).
145. U. B. Sleytr, E. Györvary, and D. Pum, "Crystallization of S-layer protein lattices on surfaces and interfaces," *Prog. Org. Coat.* **47**, 279–287 (2003).
146. A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, and P. G. Schultz, "Organization of "nanocrystal molecules" using DNA," *Nature* **382**, 609–611 (1996).
147. C. J. Loweth, W. B. Caldwell, X. Peng, A. P. Alivisatos, and P. G. Schultz, "DNA-Based Assembly of Gold Nanocrystals," *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 1808–1812 (1999).
148. F. A. Aldaye and H. F. Sleiman, "Dynamic DNA Templates for Discrete Gold Nanoparticle Assemblies: Control of Geometry, Modularity, Write/Erase and Structural Switching," *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 4130–4131 (2007).
149. P. W. K. Rothemund, "Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns," *Nature* **440**, 297–302 (2006).
150. A. Kuzyk, R. Schreiber, Z. Fan, G. Pardatscher, E.-M. Roller, A. Högele, F. C. Simmel, A. O. Govorov, and T. Liedl, "DNA-based self-assembly of chiral plasmonic nanostructures with tailored optical response," *Nature* **483**, 311–314 (2012).
151. T. Tørring, N. V. Voigt, J. Nangreave, H. Yan, and K. V. Gothelf, "DNA origami: a quantum leap for self-assembly of complex structures," *Chem. Soc. Rev.* **40**, 5636 (2011).
152. C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, and J. J. Storhoff, "A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials," *Nature* **382**, 607–609 (1996).
153. F. W. Kotch and R. T. Raines, "Self-assembly of synthetic collagen triple helices," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 3028–3033 (2006).
154. S. H. Waterhouse and J. A. Gerrard, "Amyloid Fibrils in Bionanotechnology," *Aust. J. Chem.* **57**, 519 (2004).
155. C. A. Mirkin and C. M. Niemeyer, eds., *Nanobiotechnology II: More Concepts and Applications*, Nanobiotechnology No. 2 (Wiley-VCH, 2007).
156. M. G. Ryadnov, B. Ceyhan, C. M. Niemeyer, and D. N. Woolfson, "'Belt and Braces': A Peptide-Based Linker System of de Novo Design," *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 9388–9394 (2003).

157. M. M. Stevens, N. T. Flynn, C. Wang, D. A. Tirrell, and R. Langer, "Coiled-Coil Peptide-Based Assembly of Gold Nanoparticles," *Adv. Mater.* **16**, 915–918 (2004).
158. L. Truebestein and T. A. Leonard, "Coiled-coils: The long and short of it," *BioEssays* **38**, 903–916 (2016).
159. W. Shenton, S. A. Davis, and S. Mann, "Directed Self-Assembly of Nanoparticles into Macroscopic Materials Using Antibody-Antigen Recognition," *Adv. Mater.* **11**, 449–452 (1999).
160. S. Connolly and D. Fitzmaurice, "Programmed Assembly of Gold Nanocrystals in Aqueous Solution," *Adv. Mater.* **11**, 1202–1205 (1999).
161. K. Aslan, C. C. Luhrs, and V. H. Pérez-Luna, "Controlled and Reversible Aggregation of Biotinylated Gold Nanoparticles with Streptavidin," *J. Phys. Chem. B* **108**, 15631–15639 (2004).
162. A. Urvoas, M. Valerio-Lepiniec, and P. Minard, "Artificial proteins from combinatorial approaches," *Trends Biotechnol.* **30**, 512–520 (2012).
163. A. D. Keefe and J. W. Szostak, "Functional proteins from a random-sequence library," *Nature* **410**, 715–718 (2001).
164. H. K. Binz, P. Amstutz, and A. Plückthun, "Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains," *Nat. Biotechnol.* **23**, 1257–1268 (2005).
165. A. Urvoas, A. Guellouz, M. Valerio-Lepiniec, M. Graille, D. Durand, D. C. Desravines, H. van Tilbeurgh, M. Desmadril, and P. Minard, "Design, Production and Molecular Structure of a New Family of Artificial Alpha-helicoidal Repeat Proteins (α Rep) Based on Thermostable HEAT-like Repeats," *J. Mol. Biol.* **404**, 307–327 (2010).
166. A. Guellouz, M. Valerio-Lepiniec, A. Urvoas, A. Chevrel, M. Graille, Z. Fourati-Kammoun, M. Desmadril, H. van Tilbeurgh, and P. Minard, "Selection of Specific Protein Binders for Pre-Defined Targets from an Optimized Library of Artificial Helicoidal Repeat Proteins (alphaRep)," *PLoS ONE* **8**, e71512 (2013).
167. J. Prasad, S. Viollet, K. L. Gurunatha, A. Urvoas, A. C. Fournier, M. Valerio-Lepiniec, C. Marcelot, B. Baris, P. Minard, and E. Dujardin, "Directed evolution of artificial repeat proteins as habit modifiers for the morphosynthesis of (111)-terminated gold nanocrystals," *Nanoscale* **11**, 17485–17497 (2019).
168. K. L. Gurunatha, A. C. Fournier, A. Urvoas, M. Valerio-Lepiniec, V. Marchi, P. Minard, and E. Dujardin, "Nanoparticles Self-Assembly Driven by High Affinity Repeat Protein Pairing," *ACS Nano* **10**, 3176–3185 (2016).

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

I - Réactifs et composants chimiques

Les produits chimiques utilisés pour la synthèse et la fonctionnalisation des nanoparticules sont présentés ci-dessous. L'eau désionisée à 18,2 MΩ est produite par un système PureLab.

Les synthèses de particules d'or plasmoniques ou de clusters d'or fluorescents sont obtenues à partir d'acide tétrachloraurique (III) trihydraté ($\text{HAu}^{(III)}\text{Cl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $M=393.83 \text{ g.mol}^{-1}$) acheté chez Alfa Aesar. Les autres réactifs ont tous été achetés chez Sigma-Aldrich : acide chlorhydrique (HCl , 1 M), éthylène glycol anhydre (EG, 99,8 %), aniline ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$, ≥ 99,5 %), polyvinylpyrrolidone (PVP, $M=55\,000 \text{ g.mol}^{-1}$), iodure de potassium (KI , $M = 166 \text{ g.mol}^{-1}$), nitrate d'argent (AgNO_3 , $M=169.87 \text{ g.mol}^{-1}$), hydroxyde de sodium (NaOH , 1 M), sulfoxylate formaldéhyde de sodium (SFS, $M=154.12 \text{ g.mol}^{-1}$), hydrochlorure d'hydroxylamine (HA, $M=69.49 \text{ g.mol}^{-1}$) et indole ($\text{C}_8\text{H}_7\text{N}$, $M=117,15 \text{ g.mol}^{-1}$).

Les réactifs des protocoles de fonctionnalisation ont été achetés chez Sigma-Aldrich : streptavidine from streptomyces avidinii ($\geq 13 \text{ U/mg}$ de protéine), poly-L-lysine (PLls, $M \geq 50\,000 \text{ g.mol}^{-1}$), acide sulfurique (H_2SO_4 , 95-98 %), acide nitrique (HNO_3 , 70 %), trichlorure de phosphore (POCl_3 , 99,99 %). Les sels de sodium biotinylés N-Hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS-biotin, EZ-link No Weight) et le polymère HS-PEG₁₂-COOH ($M=634.77 \text{ Da}$) ont été achetés chez Thermofisher. L'hydrochlorure N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC, $M=171.70 \text{ g.mol}^{-1}$) a été acheté chez TCI, les polymères HS-PEG₁₂-NH₂ ($M \approx 600 \text{ Da}$) et HS-PEG₇₀-NH₂ ($M \approx 3\,400 \text{ Da}$) chez Uptima et le polymère HS-PEG₇₀-biotine ($M \approx 3\,400 \text{ Da}$) chez Biochem.

II - Synthèses des particules d'or plasmoniques

II.1 - Les microplaquettes d'or (2 – 20 µm)

Les microplaquettes d'or sont les plus grands cristaux d'or ultrafins utilisés lors de ce travail. De forme hexagonale ou triangulaire, leurs dimensions atteignent une dizaine de micromètres de taille latérale, mais seulement une cinquantaine de nanomètres d'épaisseur. Leur synthèse a été faite selon le protocole décrit dans

l'article de Z. Guo [1]. Il consiste à réduire des sels d'or en milieu aqueux et en présence d'aniline. La procédure complète est la suivante :

- 8,8 μL de HCl 1 M sont ajoutés à 18,2 mL d'EG pur afin d'ajuster le pH de la solution à 4. La solution est chauffée à 95 °C et agitée pendant 1 min.
- 1,8 mL de solution à 10 mM de HAu^{III}Cl₄ sont ensuite ajoutés et gardés sous agitation pendant 20 min à 95 °C.
- 180 μL d'aniline diluée à 0,1 M dans de l'EG sont ajoutés au précédent mélange en agitant à 95 °C pendant 5 minutes supplémentaires.
- Le milieu réactionnel est laissé sans agitation dans un four à 95 °C pendant 24 h.

Les dimensions moyennes de nos échantillons varient de $3,2 \pm 0,9 \mu\text{m}$ à $5,9 \pm 4,2 \mu\text{m}$ pour des épaisseurs de 20 nm à 50 nm respectivement. L'ajustement de la distribution en taille est obtenu en diminuant la quantité d'aniline de 180 μL à 100 μL et le pH de 4 à 3 par un ajout de 10 μL de HCl au lieu de 8,8 μL . Les microplaquettes sont observées et mesurées en microscopie électronique à balayage (SEM pour *scanning electron microscope*, technique présentée paragraphe III.4 de ce chapitre) comme l'illustre la figure 2.1. Cette synthèse donne une grande majorité de microplaquettes 2D, mais des petites particules sphériques sont également présentes. La quantité de ces dernières peut être fortement réduite par une centrifugation de 2 minutes à 8 000 rpm (7 779 g) puis par redispersion dans de l'éthanol pur pour prévenir leur agrégation.

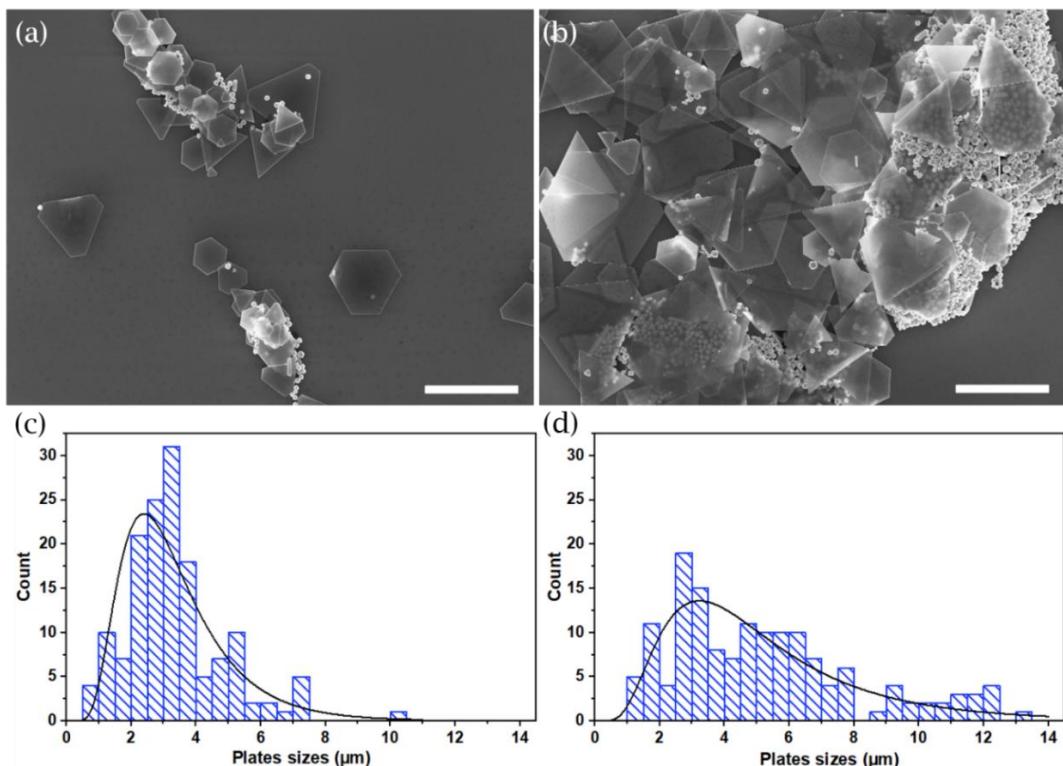


Figure 2.1 : Images SEM de microplaquettes obtenues par les protocoles avant centrifugation donnant de petits (a) et de grands (b) cristaux. Échelles 10 μm . (c) et (d) histogrammes de tailles des synthèses (a) et (b) respectivement.

II.2 - Les nanoprismes d'or, (500 – 1 000 nm)

Le polyvinylpyrrolidone, PVP, est largement connu comme un polymère inhibiteur de croissance dans la direction (111) de l'argent mais aussi de l'or. [2-6] Il a été démontré que le PVP subit une oxydation par des ions métalliques en raison de la présence de sites de réaction comme les groupes hydroxyle et peroxyde, qui forment des radicaux. [7] Cette oxydation est contrôlée par le pH du milieu réactionnel. Par conséquent, le taux de réduction des ions métalliques peut également être augmenté ou diminué en modifiant le pH. À pH alcalin, seul un petit nombre de sites de nucléation se forme dans la solution, laissant une quantité suffisante d'ions pour que la croissance hétérogène se poursuive à la surface (111) du métal selon une facette cristalline cinétiquement préférentielle, (100) et (110). Le PVP s'adsorbe rapidement sur la surface au fur et à mesure de la synthèse, stabilisant les particules. Cela conduit à la croissance latérale de nanoparticules formant des nanoprismes triangulaires plus grands. Le PVP active préférentiellement les facettes (111) conduisant à la croissance de nanoprismes plats, tout en étant également responsable de la réduction des ions Au(III).

Le protocole se déroule en une seule étape et consiste à mélanger 10 mL à 0,01 M de sel d'or en milieu aqueux avec 25 mL d'eau distillée, 300 µL à 0,1 M de KI, 300 µL à 0,1 M de AgNO₃, 4 mL à 1 M de PVP et 200 µL à 1 M de NaOH sous agitation magnétique et à température ambiante. Comme aucun autre agent tensioactif et réducteur n'a été ajouté, la seule possibilité est que le PVP joue un double rôle puis reste en surface. Les nanoprismes obtenus ont une taille moyenne de $1,1 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (Figure 2.2) et une épaisseur de l'ordre de $23 \pm 4 \text{ nm}$ dont 3 à 5 nm de PVP en surface. [8]

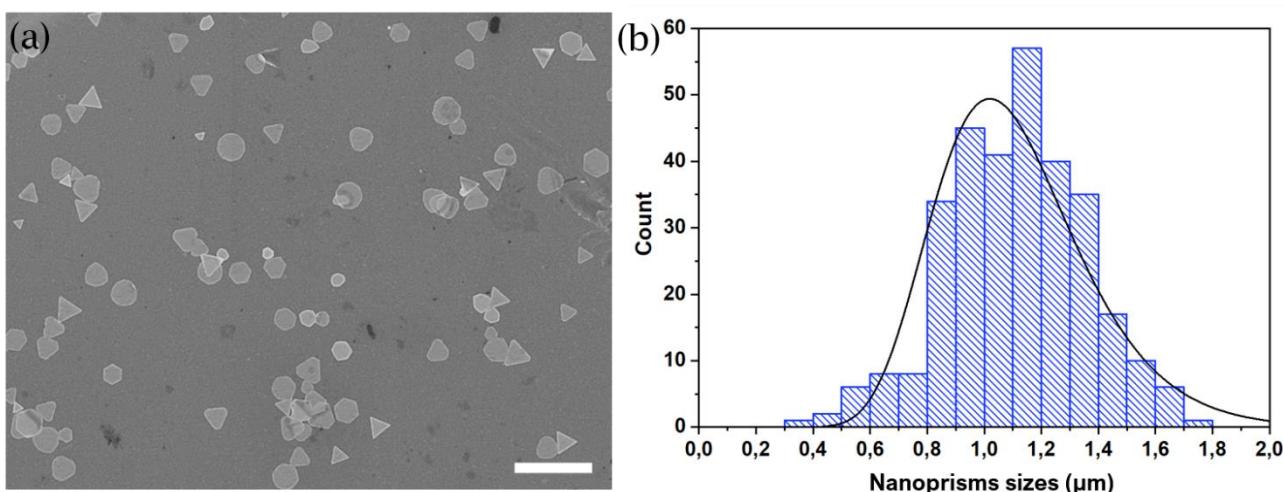


Figure 2.2 : (a) image SEM des nanoprismes. Échelle 3 µm. (b) histogramme de taille de la synthèse illustrée en (a).

III - Méthodes de caractérisation structurale

III.1 - Spectrométrie de masse (ESI-MS)

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant d'identifier des composés chimiques chargés (ions), en fonction de leur rapport masse-sur-charge (m/z). Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé cette technique exclusivement pour la caractérisation des nanoclusters d'or (Chapitre 3). Cette application très spécifique de la spectroscopie de masse est le cœur d'expertise de Rodolphe Antoine et Clothilde Comby-Zerbino de l'Institut Lumière Matière (ILM) à Lyon à qui nous avons confié nos échantillons. La technique de spectroscopie de masse utilisée pour les clusters est l'ionisation à l'électrospray (ESI, *electrospray ionisation*).

Des gouttelettes de la suspension de nanoclusters sont formées, à pression atmosphérique, à l'extrémité d'un capillaire porté à un potentiel électrostatique élevé. Sous l'effet d'un courant d'air chauffé, elles s'évaporent puis implosent à la suite d'une densité de charges trop grande, libérant des microgouttelettes contenant des clusters protonés (mode positif) ou déprotonés (mode négatif). Les ions ainsi formés sont ensuite guidés à l'aide de potentiels électriques et séparés par l'analyseur en fonction de leur rapport m/z . Un schéma d'une source d'évaporation par électrospray est présenté en figure 2.3.

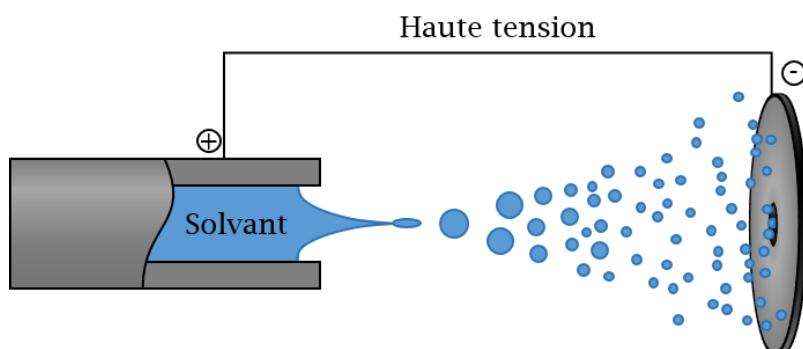


Figure 2.3 : Principe de fonctionnement source d'ionisation par électrospray. La solution contenant les clusters est évaporée sous l'effet de gouttelette sous l'effet d'un potentiel élevé. Puis ces gouttelettes implosent lorsque leur densité de charge devient trop élevée, libérant le composé sous forme protonés ou déprotonés correspondant au mode positif ou négatif respectivement. Ils sont ensuite séparés en fonction de leur rapport m/z .

Les spectres de masse obtenus après électrospray consistent en une série de pics associés à de multiples clusters chargés. Chaque pic peut être attribué à une taille de clusters et à un état de charge basé sur sa valeur m/z . Pour les molécules qui peuvent supporter des charges multiples, une distribution des états de charge est souvent observée dans le spectre de masse à charge. Cette multiplicité d'états donne lieu à une « enveloppe » de pics dans le spectre. Bien que la position des pics

dans les spectres de masse soit stable, l'abondance relative des différents pics s'avère légèrement dépendante des conditions ESI-MS et de la procédure de synthèse. [10]

L'algorithme de corrélation multiplicative (MCA) [9,10] a été utilisé pour estimer la masse moléculaire des nanoparticules à partir des spectres de masse produits par l'ESI-MS :

$$f(m) = \prod_{z=z_0}^{z_1} \frac{g(\frac{m}{z})}{g_{rms}} \quad (2.1)$$

où $f(m)$ est l'intensité calculée du spectre pour la masse m , $g(m/z)$ est l'intensité dans le spectre masse-charge et g_{rms} est la valeur quadratique moyenne du signal mesuré. Cette masse est ensuite comparée à la masse de clusters d'or de tailles différentes, correspondant à un nombre d'atomes et à un nombre de ligands de surface précis. Pour ce faire, un tableau contenant la masse de clusters d'or ayant de 1 à 30 atomes et de 0 à 30 ligands de poids moléculaires connus a été créé. Les masses obtenues par MS-ESI sont ensuite croisées avec ce tableau.

Les échantillons de cette thèse ont été caractérisés sur un appareil ESI (micro-qTOF, Brucker-Daltonics, résolution $\approx 10\,000$ Da) dans les modes positifs et négatifs par ionisation à l'électrospray. Les solutions ont, au préalable, été préparées par ultrafiltration (5 kDa) et diluées dans de l'eau désionisée pour obtenir une concentration finale de clusters de l'ordre de 1 mg.mL^{-1} .

III.2 - Diffusion des rayons X aux petits angles

Les rayons X sont des ondes électromagnétiques de longueur d'onde de l'ordre de quelques angströms, ce qui les rend particulièrement adaptés pour l'étude structurale de la matière aux échelles nanométriques et micrométriques[8].

Dans un diffractomètre aux petits angles (SAXS), un faisceau monochromatique de rayons X traverse un échantillon qui en diffuse une partie et laisse les autres passer simplement au travers sans aucune interaction. Les intensités de rayons X diffractés par rapport à la direction incidente forment un spectre (1D) ou un motif (2D) qui est enregistré sur un détecteur. L'analyse du spectre de diffraction permet d'inférer les caractéristiques structurales de l'échantillon.

Les mesures SAXS présentées dans ce manuscrit concernent exclusivement les auto-assemblages 3D de protéines α -Rep en superhélice. Les mesures ont été effectuées à l'Institut de Physique de Rennes (IPR) avec Franck Artzner et Christelle Mériadec en utilisant la ligne de faisceau Guinier faite maison [36]. Un détecteur Pilatus bidimensionnel à une distance de 232 mm des échantillons a été utilisé. Le faisceau a une longueur d'onde incidente de $\lambda = 1,541\text{ \AA}$. Une goutte de $10\text{ }\mu\text{L}$ de solution de protéines a été insérée dans un capillaire de 1,3 à 1,6 mm de diamètre. Ces capillaires sont disposés dans des portes-échantillons motorisés permettant de les déplacer horizontalement et verticalement dans la ligne du faisceau.

Les spectres obtenus tracent l'intensité diffractée en fonction de la distance réciproque q (en \AA^{-1}), norme du vecteur de diffusion $\mathbf{q} = \mathbf{Q}_d - \mathbf{Q}_i$ avec \mathbf{Q}_d vecteur d'onde du faisceau diffusé et \mathbf{Q}_i vecteur d'ondes du faisceau incident, où q s'écrit :

$$q = \frac{2\pi}{d} \quad (2.2)$$

avec d la distance entre deux plans réticulaires définissant les symétries du cristal (plans repérés par les indices de Miller hkl). Sachant que dans le cas d'un monocristal, la diffraction des rayons X par l'ensemble des atomes s'effectue dans le cadre de la formule de Bragg pour un cristal parfait :

$$2dsin\theta = n\lambda_{xray} \quad (2.3)$$

On peut donc écrire (2.2) sous la forme suivante :

$$q = \frac{4\pi sin\theta}{n\lambda_{xray}} \quad (2.4)$$

où θ est l'angle diffracté tel que 2θ est l'angle entre \mathbf{Q}_d et \mathbf{Q}_i , λ_{xray} est la longueur d'onde du faisceau incident et n est un entier correspondant aux ordres de diffraction. La figure 2.4 illustre la diffraction des rayons X dans les conditions de Bragg.

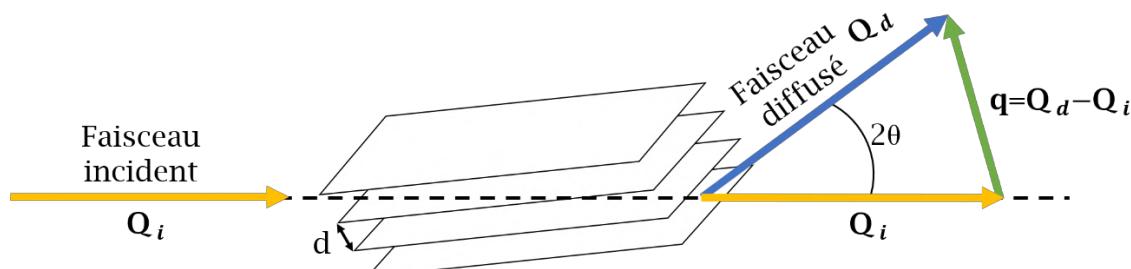


Figure 2.4 : Diffraction des rayons X par un réseau de plans hkl . Représentation du vecteur de diffusion \mathbf{q} en fonction des vecteurs d'onde incidents et diffusés \mathbf{Q}_i et \mathbf{Q}_d .

III.3 - Microscope à force atomique (AFM)

Le microscope à force atomique (AFM pour *atomic force microscope*) permet notamment la caractérisation topographique d'une surface en la balayant grâce à une pointe très fine ($< 10 \text{ nm}$), située à l'extrémité d'un microlevier flexible, se déplaçant dans les trois directions de l'espace à l'aide d'un tube piézoélectrique sur des distances de quelques nanomètres (en z) à quelques microns (en x,y).

Dans cette thèse, nous n'avons employé ce microscope que pour faire de la caractérisation topographique en mode intermittent (*tapping*). Le levier oscille à sa fréquence de résonance avec une amplitude fixée par l'utilisateur. L'échantillon exerce une force répulsive de courte portée sur la pointe. Au contact de l'échantillon,

l'amplitude de l'oscillation change alors. Ces variations sont détectées par des photodiodes mesurant la déviation de la réflexion du laser positionné au bout du microlevier. Puis la boucle de rétroaction déplace la pointe d'une hauteur z par rapport à l'échantillon afin de revenir à la valeur de l'amplitude fixée par l'opérateur. La figure 2.5 montre un schéma du principe de fonctionnement d'un AFM.

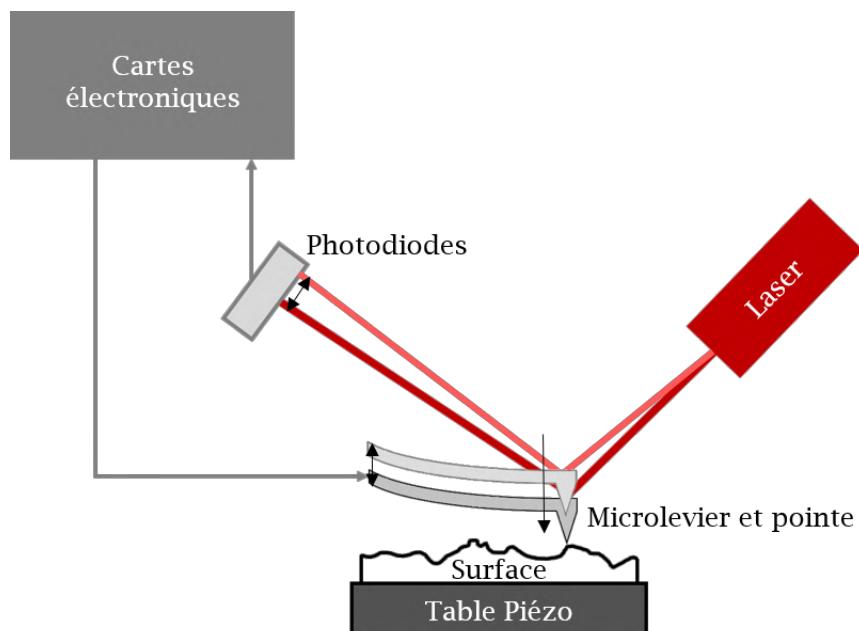


Figure 2.5 : Principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique. Le microlevier oscille à une fréquence et une amplitude donnée puis est attiré par la surface de l'échantillon, entraînant une variation de l'amplitude détectée par la photodiode. Ensuite, le circuit électrique ajuste la hauteur du point pour retrouver la valeur originale.

Les images AFM de ce manuscrit ont été faites sur un microscope Brucker Dimension 3000. Il est isolé des vibrations par un capot phonique et une table antivibrations sur une dalle isolée. Les pointes OTESPA (Bruker) sont faites de silicium et se terminent en un microlevier rectangulaire de 5,6 µm d'épaisseur et de 180 µm de long. Ces pointes ont une fréquence de résonance proche des 345 kHz.

Les échantillons présentés dans cette thèse ont été préparés en séchant une goutte de 100 µL de suspension colloïdale sur du mica fraîchement clivé ou un substrat de silicium et scannés en mode intermittent (*tapping*). Les images topographiques contiennent 512x512 points et sont acquises avec le logiciel Nanoscope V531rl.

III.4 - Microscopie électronique à balayage (SEM)

Le microscope électronique à balayage (SEM pour *scanning electron microscope*) est une technique de microscopie sous vide où un faisceau d'électrons focalisé par des lentilles magnétiques balaie un échantillon. En réponse à l'excitation

de la matière par des électrons, la surface observée émet des électrons secondaires ou rétrodiffusés et des rayons X qui sont analysés par divers détecteurs.

Les analyses SEM ont été faites sur un microscope Carl Zeiss 1540XB FIB Dual Beam/SEM. La source est de type Schottky avec une énergie comprise entre 5 kV et 30 kV. Les détecteurs d'électrons secondaires sont placés dans ou hors de la colonne (Inlens et SE2 respectivement).

Les échantillons ont été préparés en séchant une goutte de 100 µL de suspension colloïdale sur un substrat de silicium ou de verre/ITO (*indium tin oxide* pour oxyde d'indium-étain). Le verre/ITO est utilisé en microscopie optique et en SEM pour leur transparence et propriété de conduction. Ceux utilisés dans ces travaux sont marqués avec un réseau de croix d'aluminium ou d'or, séparées de 200 µm, pour un repérage plus facile du même objet par les différentes techniques de caractérisation (figure 2.6).

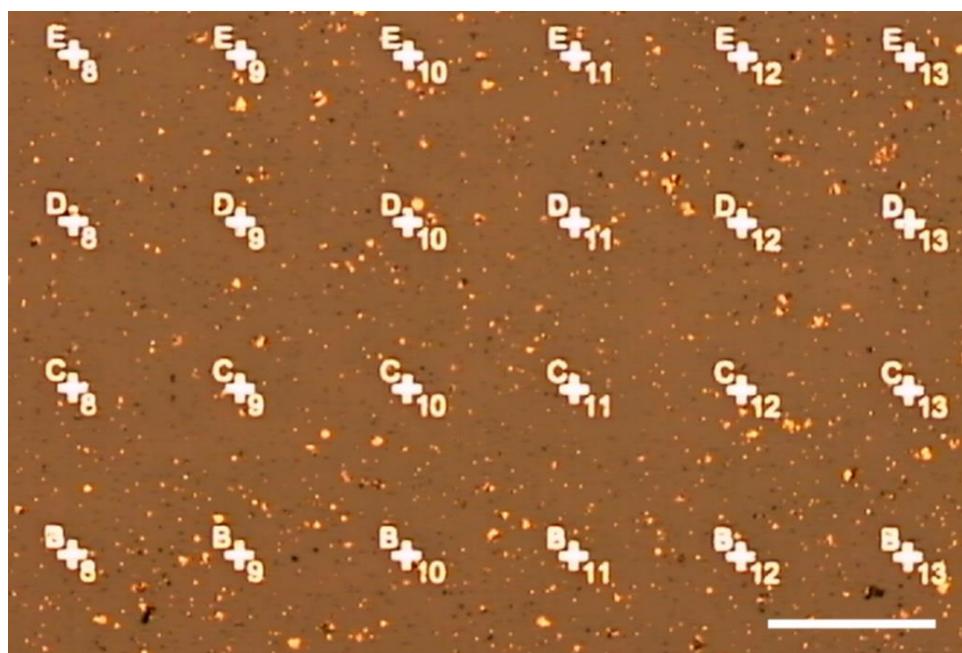


Figure 2.6 : Image optique d'un substrat verre/ITO avec des croix de marquage espacées de 200 µm sur lequel des microplaquettes d'or ont été déposées. Échelle 200 µm.

Les substrats marqués ont été préparés au CEMES avec l'aide de C. Bourgerette suivant ce protocole :

- Le substrat est nettoyé successivement 5 minutes dans de l'acétone et 5 minutes dans de l'isopropanol (IPA).
- Le substrat est ensuite installé sur la tournette, une goutte de résine AZ 1214 est déposée sur le côté conducteur du verre de façon en recouvrir les trois quarts.
- Un programme de 30 secondes à 4 000 g est lancé.
- Le substrat est chauffé 1 minute sur plaque chauffante à 105 °C.

-
- Puis il est déposé dans la machine UV recouvert par le masque de marquage. Il est insolé en mode « continu light » pendant 4 secondes à une puissance de 30 %. Le masque est ensuite retiré.
 - Le substrat est ensuite recuit pendant 1 minute à 110 °C.
 - Une deuxième insolation de 30 secondes à 30 % de toute la surface dans la machine à UV est effectuée en mode « continu light ».
 - La révélation du motif est faite dans une solution de MF 26 pendant 50 secondes puis le substrat est rincé à l'eau.
 - La métallisation du motif se fait ensuite, soit avec de l'aluminium au LAAS à Toulouse, soit avec de l'or au CEMES.
 - Finalement, le reste de résine est dissoute dans de l'acétone par trempage pendant 2 heures (lift off). Les cinq dernières minutes sont faites sous ultrasons.

III.5 - Microscopie électronique en transmission (TEM)

III.5.1 - Présentation générale

La microscopie électronique en transmission (TEM en anglais pour *transmission electron microscope*) est également une technique de microscopie sous vide, où un faisceau électronique traverse un échantillon mince (moins de 100 nm d'épaisseur). Les électrons traversent un système de lentilles magnétiques permettant de dévier et focaliser le faisceau. L'image (ou le cliché de diffraction, selon le mode de fonctionnement) est enregistrée à l'aide d'une caméra positionnée sur le plan image du microscope. La longueur d'onde de Broglie des électrons (2,5 pm pour un électron émis à 200 kV) étant plus faible que celle des photons (entre 400 et 800 nm pour un photon du domaine visible), cette technique permet de visualiser des objets bien plus petits, allant jusqu'à la résolution des colonnes atomiques (de l'ordre de quelques angströms).

Pour la caractérisation structurale des nanoparticules inorganiques, nous avons principalement utilisé dans cette thèse, deux modes de fonctionnement qui sont la diffraction et l'imagerie en champ clair. Un schéma d'une colonne électronique pour ces deux modes est présenté en figure 2.7 :

- Le mode de diffraction : lorsque le faisceau d'électrons traverse la matière, il est diffracté par les atomes de l'échantillon et est ensuite recombiné dans le plan focal par les lentilles magnétiques. On obtient une figure de diffraction qui renseigne sur la cristallinité du système.
- Le mode d'imagerie en champ clair : plus un matériau est lourd (Z élevé), plus il absorbera les électrons ou les diffusera aux grands angles. Ces derniers sont arrêtés par un diaphragme placé dans le plan focal de la lentille objectif du microscope. La zone qu'ils ont traversée apparaît en conséquence sombre sur l'écran. Au contraire, les électrons n'ayant pas traversé de matière dense,

notamment ceux des membranes, ne sont que peu déviés et la zone de l'échantillon qu'ils ont traversé apparaît blanche sur l'écran.

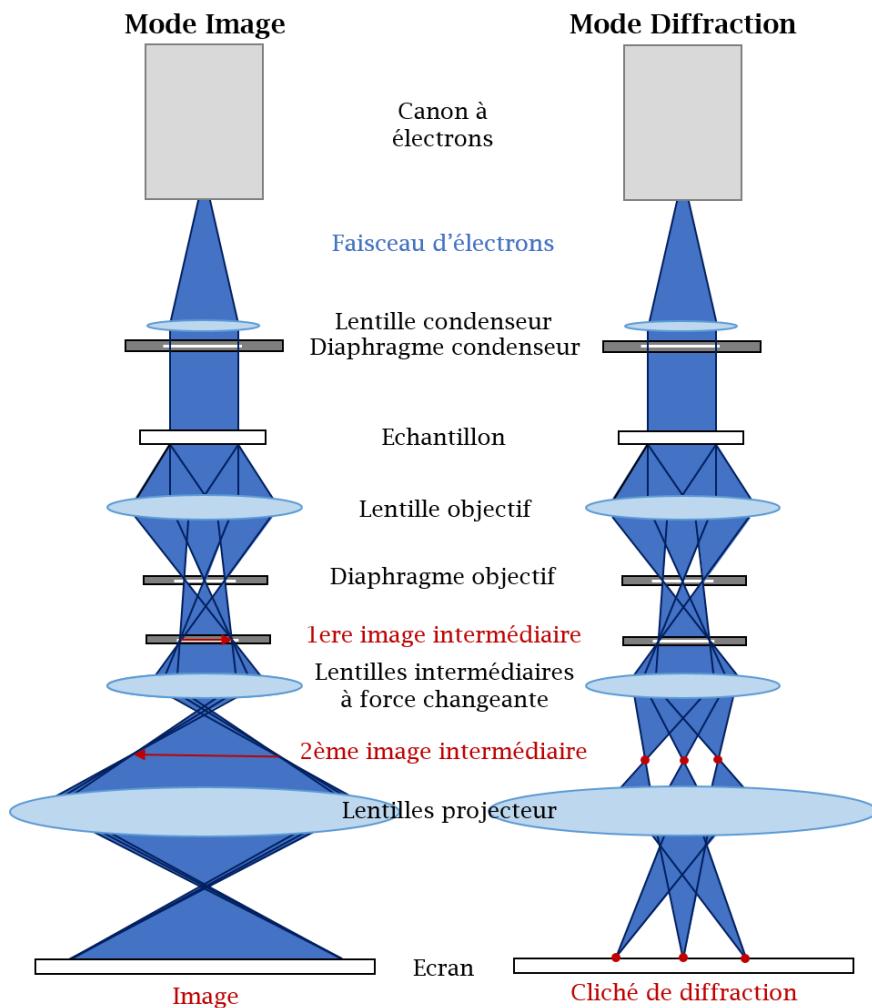


Figure 2.7 : Principe de fonctionnement du microscope électronique en transmission pour les modes image et diffraction.

Les échantillons inorganiques ont été observés en champ clair à 200 kV et les organiques à 110 kV. Les images sont acquises et traitées avec le logiciel Gatan Digital. Les échantillons ont été préparés par dépôt de 3 µL de suspension colloïdale sur une grille de carbone-formvar puis absorbée sur un papier au bout d'une minute. Les images en haute résolution (HRTEM, pour *high resolution TEM*) ont été obtenues sur le microscope Hitachi I2TEM à 300 kV au CEMES avec l'aide de Cécile Marcelot. Les autres images ont été obtenues sur le microscope Philips CM20 au CEMES.

III.5.2 - Protocole de coloration des échantillons organiques

Dans le chapitre 3, nous étudierons des assemblages de protéines dont la caractérisation structurale en TEM conventionnel requiert une méthode de préparation particulière. En effet, les protéines sont composées d'atomes légers à faible densité électronique. Dans ce cas, le contraste de cet échantillon sera proche

de celui de la membrane support qui est constituée de carbone. Afin d'améliorer la visibilité de l'échantillon, une solution de coloration à base d'un agent contrastant de forte masse atomique est utilisée. Lorsque le contrastant se fixe autour des structures à observer, la membrane et le contour des objets apparaissent sombres (par exemple les agents : molybdate d'ammonium, acétate d'uranylique, acide phosphotungstique). Cette technique est appelée coloration négative, car les objets apparaissent plus clairs que leur environnement. À l'inverse, un contrastant qui pénètre les structures, celles-ci apparaissent sombres sur fond clair de la membrane non teintée, la coloration est dite positive (par exemple les agents : citrate de plomb ou tétr oxyde d'osmium). Ces protocoles sont beaucoup utilisés en biologie et peuvent avoir une influence sur la taille de l'objet mesuré en fonction de la disposition du colorant par rapport à l'objet, par exemple pour imager des vésicules, voir figure 2.8. [12]

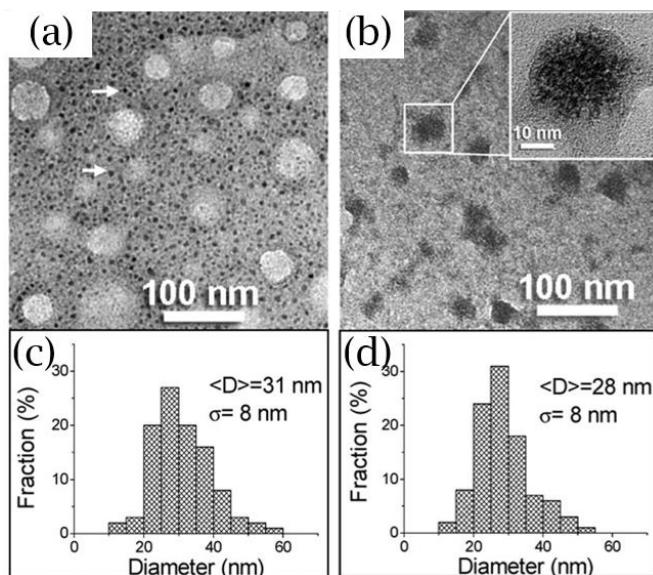


Figure 2.8 : Images TEM en mode clair de vésicules déposées sur des grilles de carbone et teintées avec (a) de l'acide phosphotungstique et (b) du tétr oxyde d'osmium. Les flèches blanches sur l'image (a) montrent les sels précipités de l'agent colorant. (c) et (d) histogrammes des tailles apparentes des vésicules pour les colorants (a) et (b) respectivement. $\langle D \rangle$ est le diamètre moyen et σ la déviation moyenne. Images TEM et figures reproduites avec autorisation de la référence [12].

En pratique, une goutte de 3 μL de solution de protéines est posée sur la grille puis absorbée sur un papier au bout d'une minute. Ensuite, 5 μL de colorant à 2 % w/v sont déposés avant d'être également absorbés après une minute.

III.5.3 - Cryomicroscopie

La cryomicroscopie électronique en transmission (cryoTEM) est une forme de microscopie électronique à très basse température (généralement à la température de l'azote liquide). Cette technique est très utilisée en biologie structural. [5] Les technologies de la cryomicroscopie électronique ont été mises au point afin de

conserver l'hydratation de l'échantillon et de réduire les dommages causés par les faisceaux d'électrons lors de l'imagerie directe et de la diffraction des électrons dans le TEM. [14] Le contraste est la différence d'intensité mesurée à deux endroits différents dans une image. Pour visualiser un objet dans une fine couche de solvant vitreux, il faut une différence appréciable de diffusion des électrons entre l'échantillon et le solvant vitreux. Les grilles TEM utilisées sont recouvertes d'un film de support en carbone amorphe troué « *lacey* ». On souhaite obtenir un film mince de l'échantillon liquide suspendu à travers les trous de la membrane et imager. Une image d'une membrane « *lacey* » recouverte de fibres composées de peptides est présentée figure 2.9.a. [15]

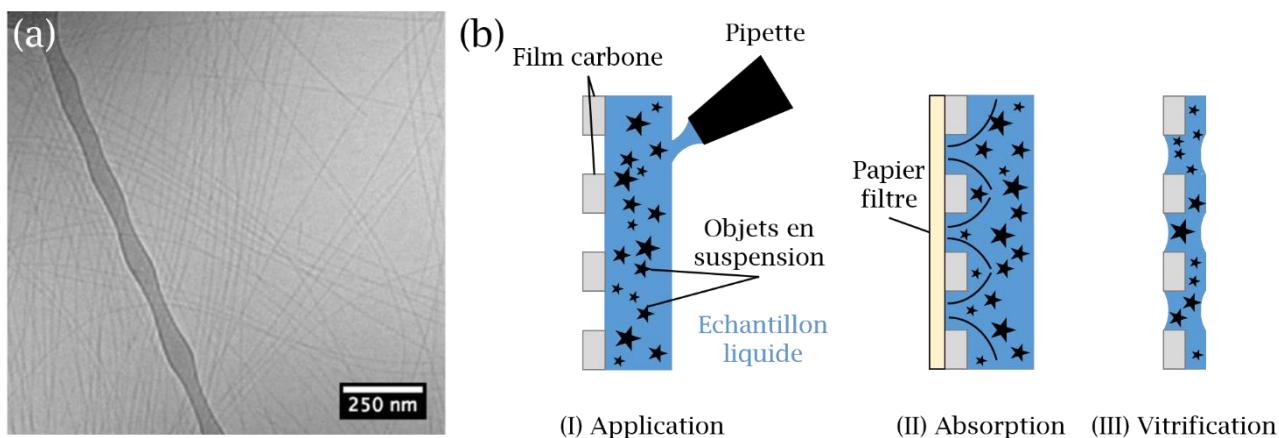


Figure 2.9 : (a) Image cryoTEM de fibres composées de peptides sur une grille « *lacey* ». Image cryoTEM reproduite avec autorisation de la référence [15]. (b) Schéma de principe de préparation d'un échantillon en trois étapes : (I) le dépôt de la solution, (II) l'absorption de l'excès et (III) la vitrification.

La plupart des échantillons aqueux sont préparés pour la cryoTEM ou la cryotomographie électronique en suivant trois étapes : (1) en appliquant le liquide sur un film de carbone troué supporté par une grille de cuivre TEM ; (2) en tamponnant la grille avec un papier filtre absorbant les solvants ; et (3) en plongeant rapidement la grille dans un réservoir cryogénique (figure 2.9.b). [16] Cette méthode permet de conserver efficacement l'échantillon biologique dans une fine couche de glace vitreuse et non cristalline. [17,18] Les spécimens cryoconservés sont ensuite chargés dans des supports de grille, qui maintiennent le spécimen à une température proche de celle de l'azote liquide afin de minimiser la dévitrification. Il faut faire attention à l'excès d'épaisseur pour éviter que les objets présents sur l'image ne soient à des hauteurs différentes. [19]

Idéalement, l'échantillon est vitrifié avec des particules disposées aléatoirement dans une couche de glace uniforme. Après l'imagerie, les particules sont identifiées, alignées et classées, puis reconstruites pour produire une carte en trois dimensions, cette technique est appelée tomographie. [20]

Les images cryoTEM de ce travail ont été réalisées à la plateforme METi du laboratoire CBI à Toulouse par S. Balor et V. Soldan.

IV - Méthodes de caractérisation optiques

IV.1 - Spectrophotométrie UV-visible

Le spectrophotomètre UV-visible mesure l'intensité de la lumière I passant au travers d'une solution et la compare à celle traversant une cuve de référence I_0 contenant le même solvant que l'échantillon. Le rapport I/I_0 appelé transmittance T est habituellement exprimé en pourcentage. L'absorbance A à une longueur d'onde λ est formulée à partir de la transmittance et de la loi de Beer-Lambert :

$$A(\lambda) = -\log(T) = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon(\lambda) \cdot L \cdot c \quad (2.5)$$

avec ε le coefficient d'extinction molaire de la solution, L la longueur du trajet parcouru par la lumière dans le milieu considéré, souvent égale à la taille de la cuve et c la concentration de la solution.

Cette technique a été utilisée pour enregistrer les spectres d'absorption des émetteurs et des suspensions de nanocristaux plasmoniques avec un spectromètre Shimadzu UV-2600 utilisant le logiciel UVProbe (version 2.43). La plupart des spectres ont été enregistrés sur une gamme allant de 200 nm à 800 nm avec une vitesse de balayage de 600 nm/min. Les échantillons et solutions de références sont contenues dans des cuves de polystyrène avec un trajet optique $L=10$ mm.

IV.2 - Spectroscopie de fluorescence en solution

IV.2.1 - *Principe général*

La fluorescence est une émission lumineuse provoquée par la désexcitation des électrons d'une molécule ou d'un matériau. Lorsqu'un composé fluorescent est éclairé par une lumière énergétique, par exemple des UV, des électrons de valence sont promus dans des états électroniques libres d'énergie supérieure. La désexcitation de ces électrons excités vers leur niveau fondamental peut s'accompagner de la libération d'énergie sous forme d'une émission spontanée de lumière. Il s'agit de fluorescence ou luminescence (figure 2.10).

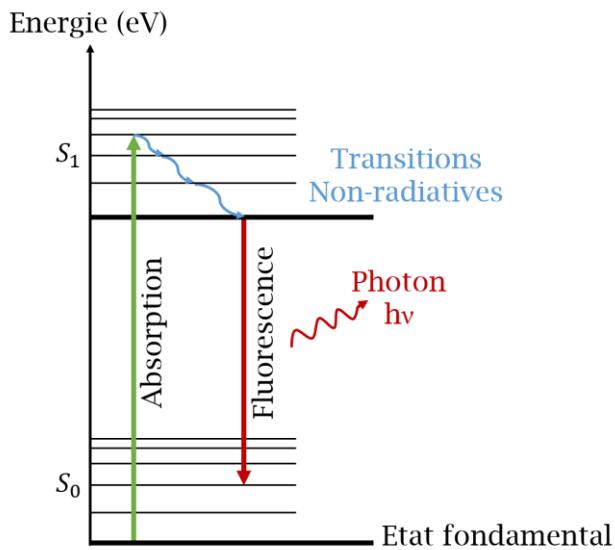


Figure 2.10 : Diagramme de Jablonski représentant les états électroniques d'une fluorophore et les transitions entre ces états. Il illustre ici le principe de fluorescence.

Toutes les mesures de spectroscopie de fluorescence ont été réalisées à l’Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) de Toulouse sous la supervision de Serge Mazères. Les solutions sont placées dans des cuves en quartz avec un trajet optique de 10 mm.

IV.2.2 - Spectroscopie en solution

Lors du cycle excitation-relaxation-émission de composés fluorescents plusieurs informations spectrales peuvent être obtenues outre le spectre d’absorbance. Le **spectre d’émission** est obtenu, à une longueur d’onde d’excitation fixée, en enregistrant l’intensité lumineuse émise en fonction de la longueur d’onde. Le **spectre d’excitation** mesure l’intensité émise à une longueur d’onde donnée lorsque la longueur d’onde d’excitation est variée. Le spectre d’excitation permet alors de déterminer quelle(s) est(sont) les longueurs d’onde d’excitation les plus efficaces pour produire une luminescence à la longueur d’onde d’émission fixée.

La combinaison de ces deux types de spectroscopie sous forme de cartes 2D présentées avec une excitation allant de 280 nm à 520 nm tous les 5 nm et une émission enregistrée entre 300 nm et 750 nm sera utilisée dans le chapitre 4. Les enregistrements ont été effectués sur un spectroscope FLSP920 de chez Edinburgh Instru.

IV.2.3 - Mesure de durée de vie en solution

La durée de vie de fluorescence fait référence au temps caractéristique pendant lequel le composé fluorescent reste dans son état excité avant d’émettre un

photon. Ce phénomène suit généralement une loi de cinétique de premier ordre en décroissance exponentielle : [21]

$$[S_1](t) = [S_0]e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2.5)$$

où $[S_1]$ est la concentration du composant à l'état excité au moment t, $[S_0]$ est la concentration initiale et τ est la durée de vie de fluorescence d'une espèce.

Expérimentalement [22,23], les taux de décroissance sont mesurés par un compteur de photons uniques corrélés dans le temps (TCSPC, *pour time-correlated single photon counting*) de chez Picoquant. Une impulsion laser pulsée excite périodiquement le composé pendant qu'une photodiode enregistre le flux des photons émis après chaque impulsion. Seuls les événements à photon unique sont triés en canaux d'histogramme qui correspondent au temps qui s'est écoulé depuis le dernier pulse d'excitation, ce qui permet de tracer la courbe de l'évolution temporelle de l'intensité de fluorescence I(t), d'où sont extraits les taux de décroissance de fluorescence par un ajustement des moindres carrés. La durée de vie moyenne d'un composé pouvant comporter plusieurs espèces fluorescentes différentes est calculée par :

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i^2}{\sum_i \alpha_i \tau_i} \quad (2.6)$$

avec α_i le préfacteur exponentiel normalisé et τ_i le temps de vie de la mesure i. Pour extraire ces valeurs, le fluorophore POPOP (1,4-bis(5-phenyloxazol-2-yl) benzène) est utilisé comme référence, car connu pour avoir une durée de vie à décroissance monoexponentielle $\tau_{POPOP}=1,35$ ns dans l'éthanol. [21]

IV.2.4 - Mesure du rendement quantique

Le rendement quantique de fluorescence définit l'efficacité du processus de fluorescence par le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés. Un ratio de 100 % indique que chaque photon absorbé entraîne l'émission d'un photon.

En pratique, ce paramètre est calculé par rapport à un échantillon de référence r avec la formule suivante :

$$\phi = \frac{S}{S_r} \frac{OD_r}{OD} \left(\frac{n}{n_r} \right)^2 \phi_r \quad (2.7)$$

où S est l'aire de l'intensité intégrée, OD est la densité optique et n l'indice de réfraction de l'environnement. Dans ce travail, nous avons utilisé la rhodamine G ($\phi=0,95$ dans l'éthanol) et le composé 9,10-bis(phenylethynyl) anthracène ($\phi=1$ dans le cyclohexane) en tant que références. [24,25]

IV.2.5 - Mesure de la fluorescence sous excitation large bande

Un montage spécifique, avec des pièces uniques faites à l'imprimante 3D, a été réalisé afin de mesurer le spectre d'émission visible global des solutions de clusters entre 400 nm à 700 nm pour une excitation large spectre de 350 nm à 500 nm d'une lampe blanche au mercure Hg fibrée. L'obstacle majeur était de réussir à éliminer, du spectre de fluorescence, la composante diffusée de la lumière excitatrice. Un filtre passe-bande 350-500 nm positionné à 45° a été utilisé pour sélectionner la gamme de longueurs d'ondes à l'excitation. Des panneaux opaques noirs ont été disposés pour couper la contribution de la lumière blanche au maximum. Puis un spectre de référence de la réflexion de la lumière blanche incidente sur une aiguille a été enregistré, pour normaliser les spectres d'émission des particules et ainsi supprimer toute contribution parasite de la lumière excitatrice dans les spectres enregistrés. La figure 2.11 montre des photos du montage expérimental.

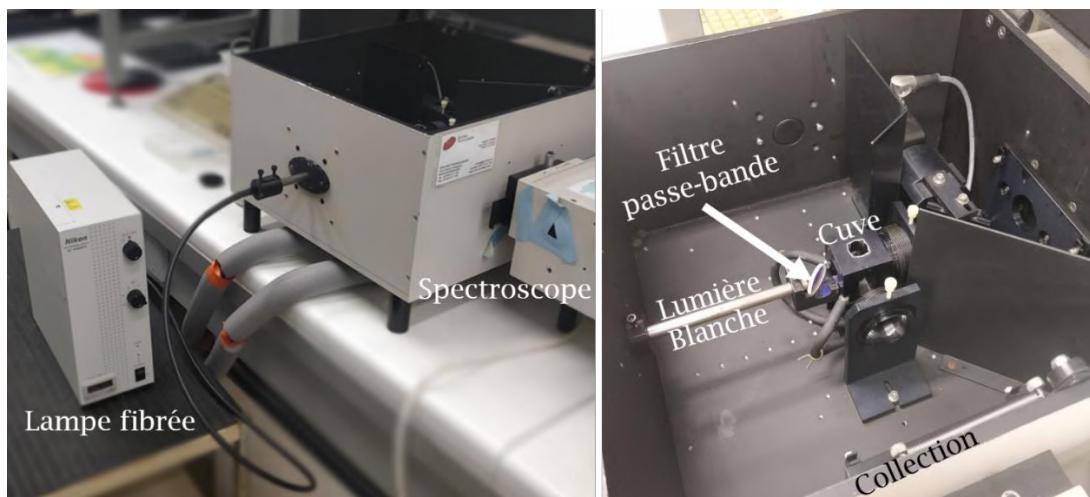


Figure 2.11 : Montage du spectromètre lors de la mesure des spectres en lumière blanche.

IV.3 - Microscopies optiques

IV.3.1 - Microscopie en champ sombre par réflexion

La microscopie et la spectroscopie en champ sombre permettent respectivement d'imager et d'enregistrer le spectre de la réponse diffuse de l'échantillon, c'est-à-dire la lumière diffusée par l'objet en direction du détecteur qui n'est pas la lumière incidente transmise. Un diaphragme de champ sombre cache le centre de l'objectif du faisceau incident et produit un anneau de lumière avec un angle oblique par rapport à la surface de l'échantillon, voir le schéma d'un faisceau lumineux traversant un diaphragme champ sombre en figure 2.12.

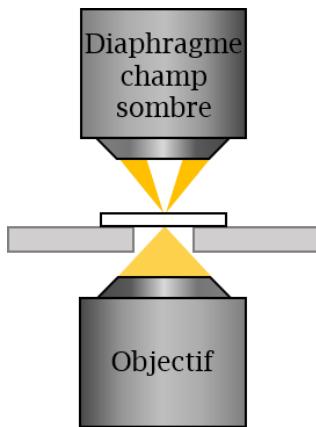


Figure 2.12 : Schéma de la configuration de la spectroscopie en champ sombre. La lumière blanche est focalisée sur l'échantillon avec un diaphragme champ sombre et la lumière diffusée vers l'avant est collectée en transmission par un objectif.

Cette méthode est employée pour la caractérisation des propriétés optiques de particules métalliques de quelques microns à quelques dizaines de nanomètres. En effet, il s'agit d'une méthode facile à mettre en place pour observer des petits objets en dessous de la limite de résolution, mais qui en revanche diffusent fortement la lumière et peuvent être observés avec un fort contraste si l'éclairage est suffisamment intense.

Dans le cas d'un système en réflexion, utilisé dans le chapitre 5, la lumière incidente diffuse est enregistrée en plus de la lumière diffusée par l'échantillon. Dans le cas d'un système en transmission, comme utilisé pour la détection sur particules uniques dans le chapitre 3, la lumière incidente est tellement diffuse qu'elle ne rentre pas ou très peu dans l'objectif de collection.

Dans tous les cas, les spectres de champ sombre des structures sont alors obtenus avec la formule de normalisation suivante :

$$\frac{I(\text{échantillon}) - I(\text{substrat})}{I(\text{laser})} \quad (2.8)$$

avec $I(\text{échantillon})$ l'intensité mesurée de l'échantillon, $I(\text{substrat})$ l'intensité mesurée sur le substrat loin de toute structure et $I(\text{laser})$ l'intensité du spectre du laser mesurée sur un miroir.

Les mesures du chapitre 5 ont été faites au CEMES sur un spectromètre Xplora MV 2000 (Horiba) équipé d'une caméra CCD et d'un objectif x100 d'ouverture numérique $\text{NA} = 0,9$ avec une lampe halogène de 100 W. Deux accumulations successives de spectres de 10 secondes afin de réduire le bruit instrumental.

IV.3.2 - Microscopie d'intensité et de durée de vie de fluorescence

Les microscopes en fluorescence utilisent un laser pour exciter un composé fluorescent, les résidus de la lumière d'excitation non absorbée par l'échantillon ainsi que la lumière diffusée par ce dernier, sont ensuite récoltés par une

photodiode. Un miroir dichroïque et un filtre en sortie de l'appareil permettent de ne mesurer que la longueur d'onde d'émission du composé.

Ce type d'instrument est principalement employé pour faire de l'imagerie en fonction de l'intensité lumineuse locale engendrée. Dans ce manuscrit, les images en fluorescence présentées ont été enregistrées sur un équipement présenté figure 2.13.

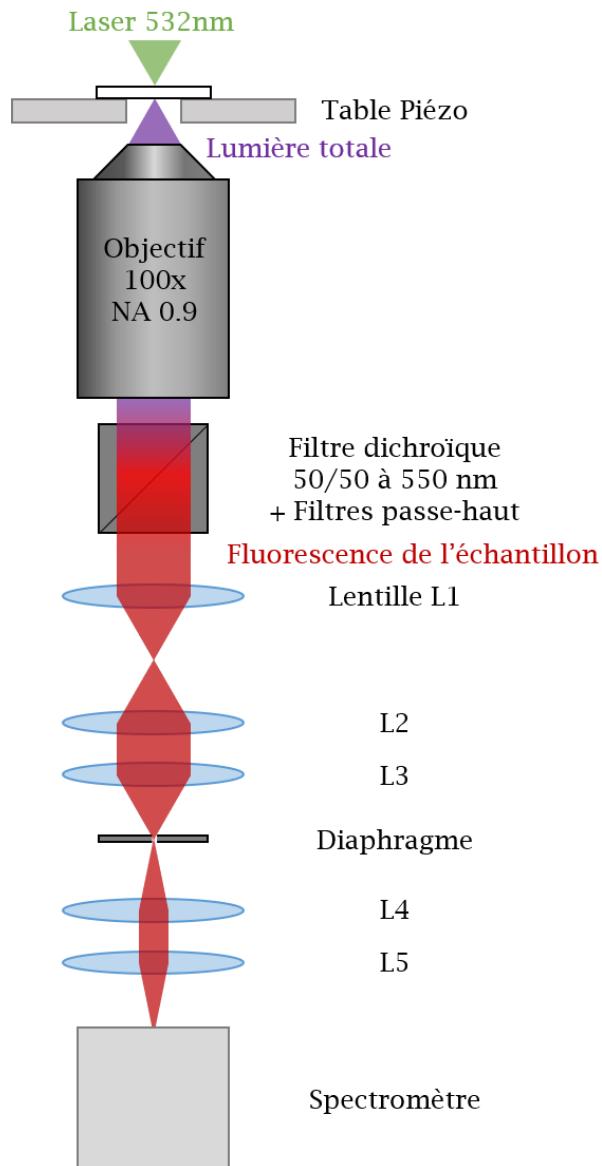


Figure 2.13 : Schéma du microscope en transmission utilisé pour les mesures de cartographie en fluorescence des échantillons.

Un microscope inversé Nikon est utilisé comme base de la configuration doté d'un objectif x100, d'ouverture numérique $NA = 0,9$. Un laser continu de 532 nm a été utilisé avec un filtre dichroïque à 550 nm et deux filtres passe-haut à 550 et 600 nm. Les intensités lumineuses ont été enregistrées avec une intégration de 100 ms par pixel et une puissance laser entre 3 et 10 %. Des spectres d'émission de

particule individuelle ont été acquis sur le même appareil pendant 30 secondes avec une puissance entre 5 et 20 % après une longueur d'onde de coupure de 620 nm.

Plus spécifiquement, le microscope de fluorescence de durée de vie (FLIM, pour *fluorescence lifetime microscope*), acquiert localement la durée de vie afin d'en faire des cartographies. Afin de calculer les τ locales, l'équation (2.5) est appliquée en chaque point de la carte. Ce paramètre étant dépendant de l'environnement proche de l'émetteur, cette technique permet notamment de visualiser le couplage entre un émetteur et une particule plasmonique en fonction de leur positionnement relatif. Les images FLIM de cette thèse sont effectuées sur un microscope inversé Nikon dans les conditions citées plus haut. Les mesures de temps de vie sont réalisées en mode pulsée avec un taux de répétition de fréquence du laser à 16, une densité optique de 2 et un temps d'acquisition de 5 à 10 secondes par point.

IV.4 - La cathodoluminescence

La cathodoluminescence est une technique de caractérisation consistant à exciter de la matière avec des électrons à haute énergie puis à analyser la lumière émise. Lorsqu'un faisceau excite les électrons d'un solide, laissant des trous, la recombinaison électron-trou se produisant génère de la lumière (de l'ultraviolet à l'infrarouge). Cette méthode permet l'étude des propriétés optiques d'un matériau avec la résolution du faisceau électronique incident (~ 1 nm), bien plus petite que la longueur d'onde. [26] Grâce à l'énergie élevée des électrons incidents, toutes les transitions radiatives peuvent être excitées.

La CL collectée à l'intérieur d'un TEM refroidi par de l'azote plutôt que dans un SEM, permet une meilleure résolution spatiale, mais aussi d'éviter les comportements non linéaires dus à des effets de saturation de l'émission dus à l'énergie. [27] Le faisceau d'électrons balaie l'échantillon, et pour chaque pixel, un spectre d'émission est enregistré. On obtient un cube de données en 3 dimensions appelé image spectrale : à chaque pixel (x,y) de l'image, un spectre est associé. Un schéma du dispositif est présenté en figure 2.14.

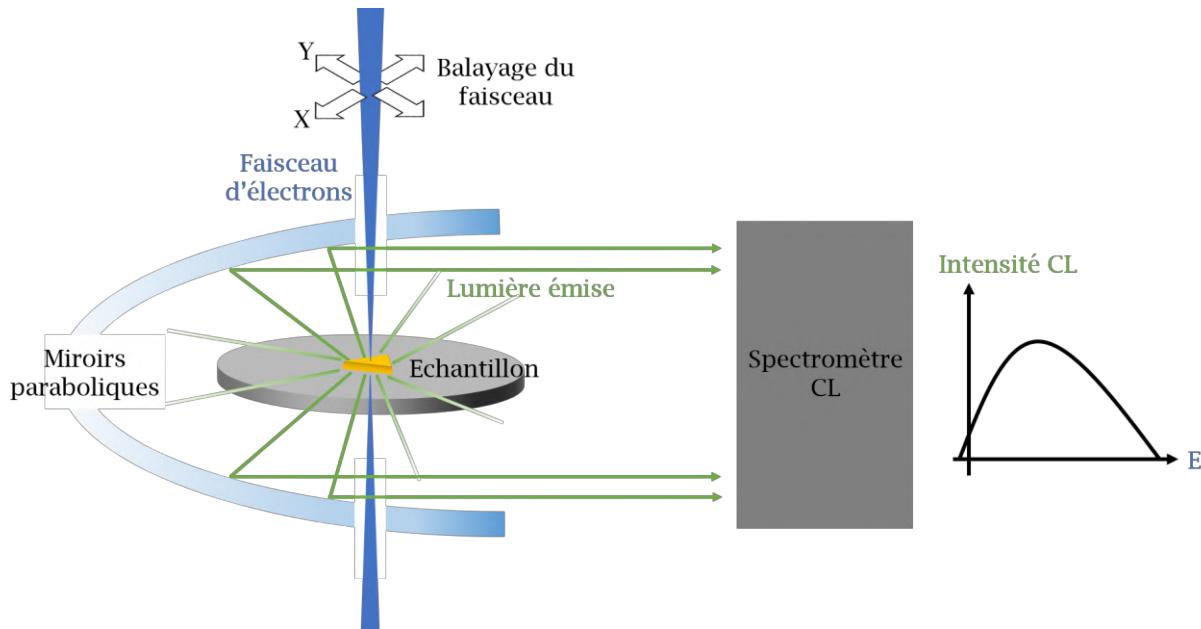


Figure 2.14 : Schéma de principe de fonctionnement de la CL dans un TEM. Le faisceau d'électrons balaye l'échantillon et excite la matière. L'émission de lumière émise par l'échantillon est ensuite renvoyée sur un spectromètre grâce à des miroirs paraboliques.

Cette méthode est notamment employée pour mesurer des états électroniques localisés (niveaux d'énergie) de particules métalliques. [28] En effet, les plasmons de surface peuvent être excités par des électrons rapides. Certains de ces modes des plasmons peuvent se coupler au champ lointain et se désexciter en émettant de la lumière. Ces modes, proches de la diffusion optique, sont appelés modes brillants et peuvent être observés en CL.

Les images CL-TEM de ce manuscrit ont été prises sur un microscope FEI Titan, avec une source d'électrons Schottky, refroidi à l'azote liquide et utilisé en mode balayage à 80 kV, au laboratoire ASTAR de Singapour lors d'une mission d'un mois avec Zackaria Mahfoud et Michel Bosman. Un demi-angle de convergence de 13 mrad a été utilisé et le faisceau d'électrons a été focalisé sur un diamètre d'environ 1 nm. Tous les spectres CL ont été acquis en 60 s à l'aide d'un détecteur de cathodoluminescence Gatan Vulan. Les nanoparticules ont été déposées sur membrane de SiN pour les expériences de cathodoluminescence. Une goutte de 10 µL de solution de nanoparticules est déposée sur la grille et absorbée au bout de 5 min.

Références

1. Z. Guo, Y. Zhang, Y. DuanMu, L. Xu, S. Xie, and N. Gu, "Facile synthesis of micrometer-sized gold nanoplates through an aniline-assisted route in ethylene glycol solution," *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **278**, 33–38 (2006).
2. Y. Zhai, J. S. DuChene, Y.-C. Wang, J. Qiu, A. C. Johnston-Peck, B. You, W. Guo, B. DiCiaccio, K. Qian, E. W. Zhao, F. Ooi, D. Hu, D. Su, E. A. Stach, Z. Zhu, and W. D. Wei, "Polyvinylpyrrolidone-induced anisotropic growth of gold nanoprisms in plasmon-driven synthesis," *Nat. Mater.* **15**, 889–895 (2016).
3. S. Preciado-Flores, D. Wang, D. A. Wheeler, R. Newhouse, J. K. Hensel, A. Schwartzberg, L. Wang, J. Zhu, M. Barboza-Flores, and J. Z. Zhang, "Highly reproducible synthesis of hollow gold nanospheres with near infrared surface plasmon absorption using PVP as stabilizing agent," *J Mater Chem* **21**, 2344–2350 (2011).
4. Y. Sun, "Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles," *Science* **298**, 2176–2179 (2002).
5. C. Kan, C. Wang, J. Zhu, and H. Li, "Formation of gold and silver nanostructures within polyvinylpyrrolidone (PVP) gel," *J. Solid State Chem.* **183**, 858–865 (2010).
6. L. Kemal, X. C. Jiang, K. Wong, and A. B. Yu, "Experiment and Theoretical Study of Poly(vinyl pyrrolidone)-controlled Gold Nanoparticles," *J. Phys. Chem. C* **112**, 15656–15664 (2008).
7. D. U. Staszewska, "The oxidation of poly(vinyl pyrrolidone) with Ce(IV)," *Angew. Makromol. Chem.* **118**, 1–17 (1983).
8. J. Fedou, S. Viarbitskaya, R. Marty, J. Sharma, V. Paillard, E. Dujardin, and A. Arbouet, "From patterned optical near-fields to high symmetry acoustic vibrations in gold crystalline platelets," *Phys Chem Chem Phys* **15**, 4205–4213 (2013).
9. J. J. Hagen and C. A. Monnig, "Method for Estimating Molecular Mass from Electrospray Spectra," *Anal. Chem.* **66**, 1877–1883 (1994).
10. C. Truillet, F. Lux, O. Tillement, P. Dugourd, and R. Antoine, "Coupling of HPLC with Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Studying the Aging of Ultrasmall Multifunctional Gadolinium-Based Silica Nanoparticles," *Anal. Chem.* **85**, 10440–10447 (2013).
11. B. E. Warren, *X-Ray Diffraction*, Dover ed (Dover Publications, 1990).
12. V. Bello, G. Mattei, P. Mazzoldi, N. Vivenza, P. Gasco, J. M. Idee, C. Robic, and E. Borsella, "Transmission Electron Microscopy of Lipid Vesicles for Drug Delivery: Comparison between Positive and Negative Staining," *Microsc. Microanal.* **16**, 456–461 (2010).
13. E. Callaway, "The revolution will not be crystallized: a new method sweeps through structural biology," *Nature* **525**, 172–174 (2015).
14. K. A. Taylor and R. M. Glaeser, "Electron Diffraction of Frozen, Hydrated Protein Crystals," *Science* **186**, 1036–1037 (1974).
15. E. T. Pashuck, H. Cui, and S. I. Stupp, "Tuning Supramolecular Rigidity of Peptide Fibers through Molecular Structure," *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 6041–6046 (2010).
16. H. Cui, T. K. Hodgdon, E. W. Kaler, L. Abezgauz, D. Danino, M. Lubovsky, Y. Talmon, and D. J. Pochan, "Elucidating the assembled structure of amphiphiles in solution via cryogenic transmission electron microscopy," *Soft Matter* **3**, 945 (2007).
17. J. Lepault, F. P. Booy, and J. Dubochet, "Electron microscopy of frozen biological suspensions," *J. Microsc.* **129**, 89–102 (1983).
18. J. Dubochet, M. Adrian, J.-J. Chang, J.-C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowall, and P. Schultz, "Cryo-electron microscopy of vitrified specimens," *Q. Rev. Biophys.* **21**, 129–228 (1988).
19. R. M. Glaeser, B.-G. Han, R. Csencsits, A. Killilea, A. Pulk, and J. H. D. Cate, "Factors that Influence the Formation and Stability of Thin, Cryo-EM Specimens," *Biophys. J.* **110**, 749–755 (2016).

20. Y. Cheng, N. Grigorieff, P. A. Penczek, and T. Walz, "A Primer to Single-Particle Cryo-Electron Microscopy," *Cell* **161**, 438–449 (2015).
21. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third edition, corrected at 4. printing (Springer, 2010).
22. D. V. O'Connor, *Time-Correlated Single Photon Counting* (Academic Press, 1984).
23. M. B. Akhtar, *Fluorescence Lifetime Measurement Using Time Correlated Single Photon Counting* (Lund University, 2010).
24. D. N. Dempster, T. Morrow, and M. F. Quinn, "The photochemical characteristics of rhodamine 6G-ethanol solutions," *J. Photochem.* **2**, 343–359 (1973).
25. C. A. Heller, R. A. Henry, B. A. McLaughlin, and D. E. Bliss, "Fluorescence spectra and quantum yields. Quinine, uranine, 9,10-diphenylanthracene, and 9,10-bis(phenylethynyl)anthracenes," *J. Chem. Eng. Data* **19**, 214–219 (1974).
26. B. G. Yacobi, *Cathodoluminescence Microscopy of Inorganic Solids*. (Springer, 2013).
27. L. F. Zagonel, L. Rigutti, M. Tchernycheva, G. Jacopin, R. Songmuang, and M. Kociak, "Visualizing highly localized luminescence in GaN/AlN heterostructures in nanowires," *Nanotechnology* **23**, 455205 (2012).
28. A. Losquin, L. F. Zagonel, V. Myroshnychenko, B. Rodríguez-González, M. Tencé, L. Scarabelli, J. Förstner, L. M. Liz-Marzán, F. J. García de Abajo, O. Stéphan, and M. Kociak, "Unveiling Nanometer Scale Extinction and Scattering Phenomena through Combined Electron Energy Loss Spectroscopy and Cathodoluminescence Measurements," *Nano Lett.* **15**, 1229–1237 (2015).

Chapitre 3

Les protéines α -Rep, des modules pour l'auto-assemblage

I - Une protéine biface pour la morpho-synthèse et la détection

I.1 - Des α -Rep à forte affinité pour la surface Au(111)

Pour contrôler les assemblages des particules, nous avons exploité des protéines artificielles conçues pour induire aussi bien des assemblages de type direct que des assemblages par l'effet template. Nous avons, pour cela, profités de l'ingénierie de protéines, appelées α -Rep, développées par le Pr. P. Minard et son équipe. Certaines de ces protéines ont notamment été sélectionnées par phage display pour montrer une forte affinité pour la surface (111) de l'or. [1] Le principe de sélection est expliqué en détail dans le Chapitre 1. Dans la partie qui suit, nous montrons comment nous avons utilisé ces protéines pour diriger la morpho-synthèse de nanocristaux prismatiques et servir ensuite de plateforme pour l'auto-assemblage.

I.1.1 - Morpho-synthèse de nanocristaux d'or dirigée par les α -Rep anti-Au(111)

La genèse des protéines α -Rep à forte affinité pour l'Au(111) est détaillée dans la partie IV.3 du Chapitre 1.

La synthèse des nanoprismes comporte deux étapes selon une méthode de morpho-synthèse mise au point par J. Prasad au CEMES. [1] Elle repose essentiellement sur la réduction de sels d'or en présence de protéines α -Rep sélectionnées par phage display, agissant en tant qu'inhibiteur de croissance des faces cristallines (111).

La première étape consiste en la formation de germes d'or. 50 μ L d'une solution à 100 μ M de protéines G8 dans un tampon de sodium phosphate (NaP) sont mélangés avec 100 μ L d'une solution aqueuse d'acide tétrachloraurique (III) trihydraté ($\text{HAu(III)}\text{Cl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) à 2 mM, auxquels sont ajoutés 10 μ L d'une solution 20 mM de sulfoxylate formaldéhyde de sodium (SFS), un agent réducteur modéré.

Cette addition est réalisée dans un tube Eppendorf LoBind sous une agitation à forte vitesse pendant 3 minutes, puis la solution de nuclei est laissée sans perturbation pendant 2 heures.

Deuxièmement, la croissance des nanoprismes est obtenue par le mélange de 190 μL d'acide chlorhydrique (HCl) à 10 mM avec 50 μL de HAu(III)Cl₄.3H₂O à 10 mM et 5 μL de protéine G8 à 100 μM dans un tampon NaP avec une solution contenant 15 μL des germes obtenus précédemment est dilués dans 205 μL d'eau désionisée et 5 μL d'hydroxylamine (HA) à 900 mM. La solution finale est homogénéisée à la micropipette puis avec un agitateur Eppendorf pendant 2 minutes et laissée au repos à température ambiante pour 24 heures.

La suspension finale est de couleur rose-violette et comprend trois sous-populations de nanocristaux, tous terminés par des facettes (111) : les nanoprismes 2D (environ 40 %), les décaèdres (30 %) et les icosaèdres (15 %), des images SEM de ces particules sont présentées figures 3.1.a-d. Seuls 15 % des structures n'ont pas pu être attribuées sans ambiguïté à ces sous-populations ou présentaient des formes polycristallines aléatoires. Le spectre d'absorbance de la suspension telle que synthétisée (voir figure 3.1.e en rose) montre deux résonances plasmoniques à 555 nm et 750 nm, qui sont dues respectivement aux nanocristaux sphéroïdaux et aux prismes 2D.

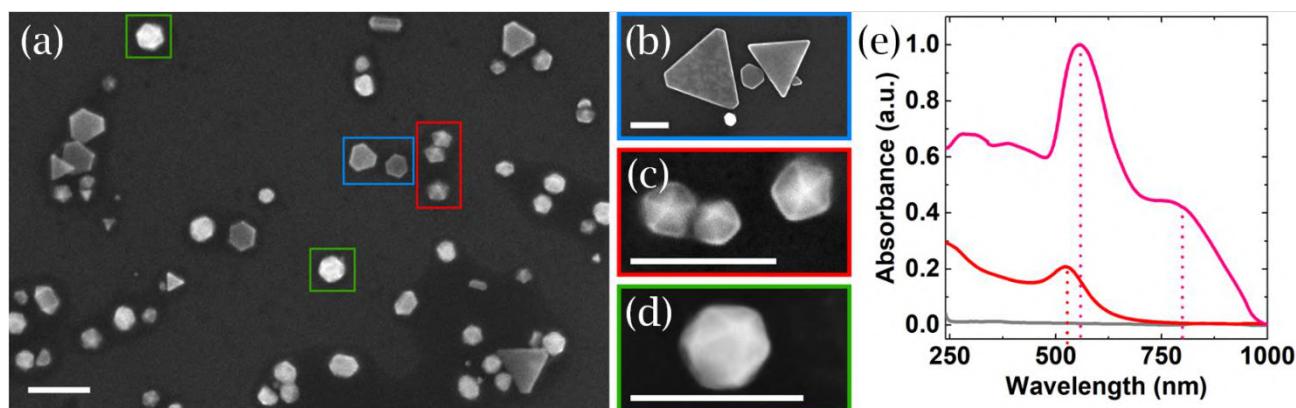


Figure 3.1 : (a) Image SEM des particules obtenues lors de la synthèse, avec des zooms sur (b) des nanoprismes 2D, (c) des décaèdres et (d) des icosaèdres respectivement. Les barres d'échelle sont de 200 nm. (e) Spectres caractéristiques UV-visible des germes d'or obtenus lors de la première phase de la synthèse (en rouge, $\lambda_{\max} = 524 \text{ nm}$), de la solution de croissance sans ajout de germes (gris) et des nanostructures synthétisées à la suite de l'ajout de germes d'or à la solution de croissance en présence de G8 (en rose), qui présentent deux pics à $\lambda_{\max} = 556 \text{ nm}$ et $\lambda_{\max} = 804 \text{ nm}$. Figure reproduites avec autorisations de la référence [1].

La surface de ces particules est recouverte de protéines après synthèse. [1] De l'imagerie AFM non-contact (nc-AFM) a été réalisée sous ultravide (UHV) sur des nanoprismes individuels déposés sur un substrat de silice (figure 3.2.a-c). Ce mode AFM est utilisé pour l'imagerie à résolution atomique et garantit que les protéines ne sont pas déformées lors du balayage de la pointe. On observe une surface uniforme qui est constellée d'objets globulaires de taille latérale typique de 5-15 nm

(figure 3.2.a) et une ondulation en hauteur d'environ 5-7 Å (figure 3.2.c, ligne rouge). Ce qui correspond à une surface dont la rugosité est due au recouvrement de l'or par des protéines. L'échantillon a ensuite été traité avec un plasma O₂ pour éliminer les adsorbats (figure 3.2.b). La hauteur totale apparente des nanoprismes est inférieure d'environ 5 nm après le nettoyage du plasma, ce qui correspond à l'élimination de la couche de protéines. De plus, la surface est extrêmement lisse et la rugosité est réduite à 1-1,5 Å. Cette taille est typique des terrasses d'Au atomiquement plates (figure 3.2.c, ligne noire). Des échantillons similaires déposés sur des grilles de microscopie électronique ont été analysés par spectroscopie de perte d'énergie électronique (EELS). Une analyse élémentaire STEM/EDS réalisée sur des nanocristaux montre clairement que les nanocristaux sont recouverts de protéines qui restent à la surface après les étapes de morpho-synthèse et de purification. [1]

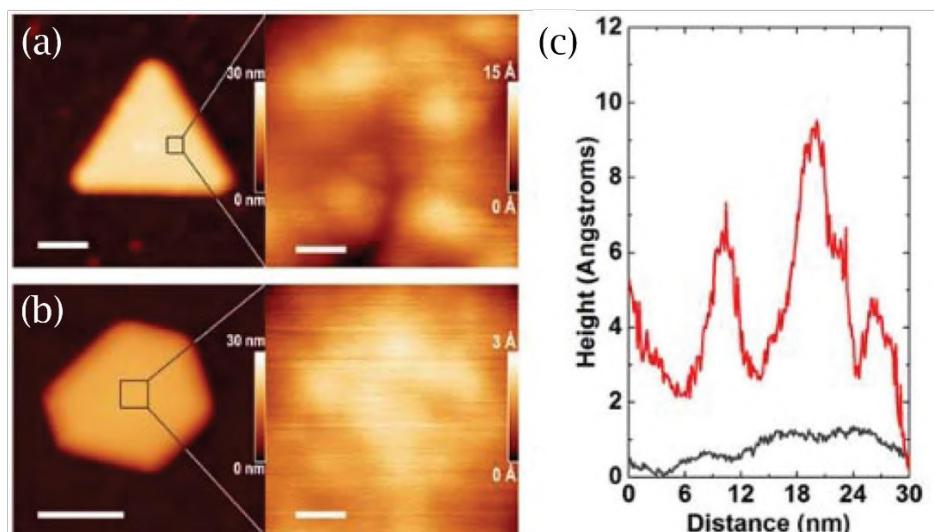


Figure 3.2 : (a, b) Images nc-AFM d'un nanoprisme (a) après synthèse et (b) après avoir été nettoyé au plasma O₂. Les carrés noirs indiquent les zones zoomées dans les panneaux de droite. Les barres d'échelle sont de 100 nm et 6 nm pour les panneaux de gauche et de droite respectivement. (c) Profils des hauteurs nc-AFM du nanoprisme recouvert de G8 (rouge) et du nanoprisme nettoyé au plasma (noir), respectivement en (b) et (c). Figure reproduites avec autorisations de la référence [1].

I.1.2 - Ajustement spectral et enrichissement en nanocristaux 2D

Pour la preuve de concept de l'utilisation de nos particules en biodétection, nous nous sommes intéressés particulièrement aux prismes 2D dans la fenêtre de transparence des tissus biologiques (750-1100 nm). Pour cela, nous avons adapté la synthèse précédente. La distribution de taille des nanoprismes peut être modifiée tout en maintenant l'épaisseur constante, par ajustement du rapport molaire nuclei/Au(III) dans la solution de croissance. En ajustant la quantité relative de germes de la seconde solution par rapport à la quantité de HAu(III)Cl₄.3H₂O, nous

varions la position spectrale du pic de résonance plasmon dite LSPR (pour *local surface plasmon resonance*) dans le plan sur toute la région visible, tout en préservant la même surface d’Au(111) revêtue de G8. La dimension latérale finale des nanoprismes varie entre 45 ± 15 nm et 115 ± 25 nm et permet de cibler une longueur d’onde de résonance plasmonique spécifique entre 745 et 835 nm (voir figure 3.3.a).

En outre, nous constatons qu’un ajustement du pH à 3 pendant l’étape de croissance favorise la prévalence des cristaux 2D par rapport aux autres formes sphéroïdales, ce qui conduit à une suspension considérablement enrichie en nanoprismes 2D (figure 3.3.b). Dans ce cas, la suspension a une couleur violette. Les nanocristaux isotropes restants (décaèdres, icosaèdres) sont éliminés par une centrifugation de 5 minutes à 5 000 rpm (4 900 g) puis les nanoprismes sont redispersés dans de l’eau désionisée à pH 7.

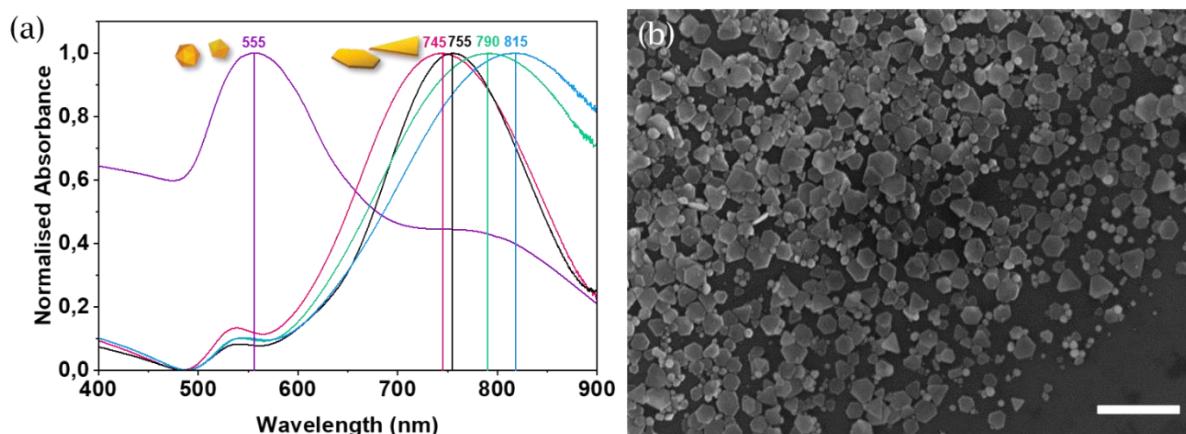


Figure 3.3 : (a) Spectres d’absorption de suspensions colloïdales avant optimisation pour les formes 2D (en violet) et après avec des pics de résonance dipolaire variants de 745 nm à 835 nm lors des variations du rapport molaire nuclei/Au(III) dans la solution de croissance. (b) Image SEM des nanocristaux 2D formés par la synthèse. Échelle 500 nm.

I.2 - Micro-Spectroscopie par résonance plasmon sur nanoprisme individuel

I.2.1 - Spectres en champ sombre de particules uniques

Lors d’une collaboration avec C. Sönnichsen de l’Université du Mainz en Allemagne, nous avons sondé les prismes individuellement par spectromicroscopie en champ sombre. Nous utilisons la synthèse avec une taille moyenne des objets d’environ 115 ± 24 nm montrant un pic de résonance plasmonique longitudinal maximum à 755 nm.

Les nanoprismes sont d’abord déposés sur un substrat de verre avant d’être éclairés par un laser permettant de cibler une particule unique. La figure 3.4.a est un

schéma de principe de la méthode. La lumière diffusée par la particule est collectée. Notre échantillon contient des triangles, des triangles tronqués, des particules hexagonales et quelques particules sphéroïdales plus petites. Cette hétérogénéité est notamment visible sur l'image de microscopie en champ sombre (figure 3.4.b), par la présence de particules diffusantes de différentes couleurs. La majorité des particules apparaissent en rouge, elles correspondent aux nanostructures 2D alors que les points de diffusion verts correspondent aux particules sphéroïdales (voir les zooms des particules en champ sombre figure 3.4.c).

Le spectre d'absorption d'un prisme isolé est enregistré puis tracé (en orange sur la figure 3.4.d) pour être comparé au spectre d'absorption de la solution (en noir sur la figure 3.4.d). Un léger décalage est visible en raison d'un élargissement du pic de résonance plasmonique longitudinal du visible présent pour cette particule particulière par rapport au comportement moyen de l'échantillon.

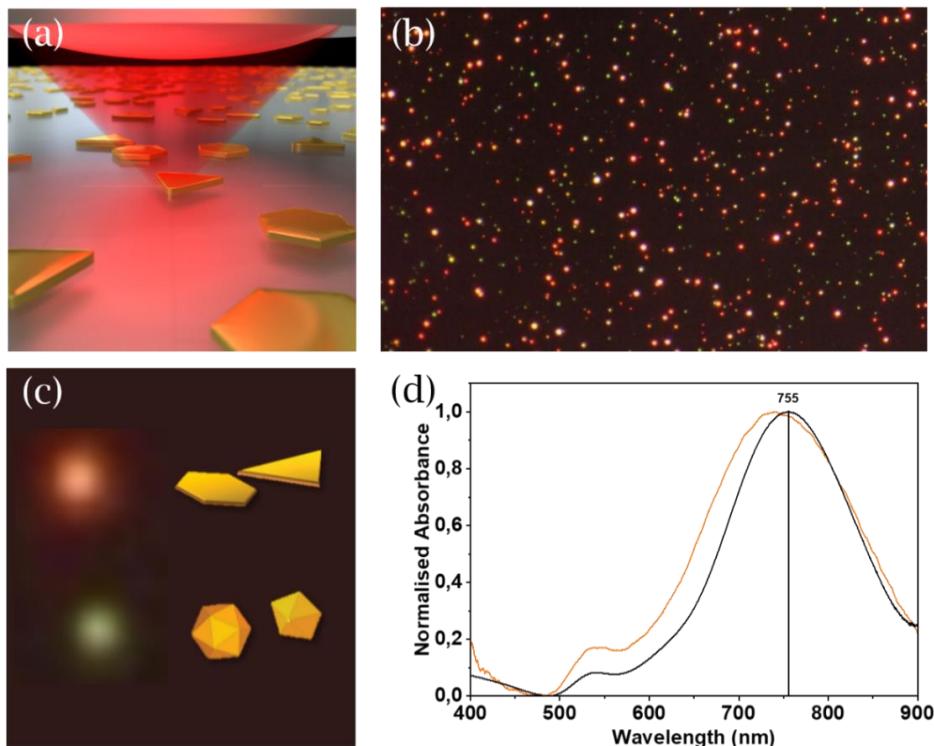


Figure 3.4 : (a) Schéma de principe de spectromicroscopie en champ sombre. (b) Image large champ de microscopie en champ sombre de l'échantillon. Les points rouges correspondent aux prismes 2D et les points verts aux autres particules : déca- et ico-saïdes, dont les zooms sont montrés respectivement en haut et en bas de l'image (c). (d) Spectre d'absorption UV-visible des particules en solution (noir) avec un pic LSPR maximum à 755 nm et d'une seule particule 2D déposée sur du verre (orange).

I.2.2 - Sensibilité spectrale à l'indice ambiant

La sensibilité à l'indice de réfraction environnant des particules est étudiée uniquement pour celles qui diffusent dans la région du rouge à l'infrarouge. Le

déplacement du pic de résonance LSPR des prismes est enregistré dans différents solvants dont les indices de réfraction sont $n_1=1,335\ 0$, $n_2=1,340\ 5$, $n_3=1,346\ 0$ et $n_4=1,355\ 5$. La réponse du déplacement des pics dipolaires d'une particule unique présente un décalage linéaire vers le rouge avec l'augmentation de l'indice de réfraction du solvant (figure 3.5.a). La sensibilité de l'indice de réfraction pour une particule spécifique est le coefficient directeur de la droite, formée par les points de mesure du décalage en longueur d'onde du pic de résonance LSPR, en fonction du changement de l'indice de réfraction du milieu. Cette droite est tracée figure 3.5.b pour une particule et correspond à une sensibilité d'environ 300 nm/RIU. Cette mesure de sensibilité est répétée pour plus d'une centaine de nanoparticules 2D. L'histogramme de ces mesures est présenté figure 3.5.c. La sensibilité moyenne des mesures est de 310 ± 100 nm/RIU.

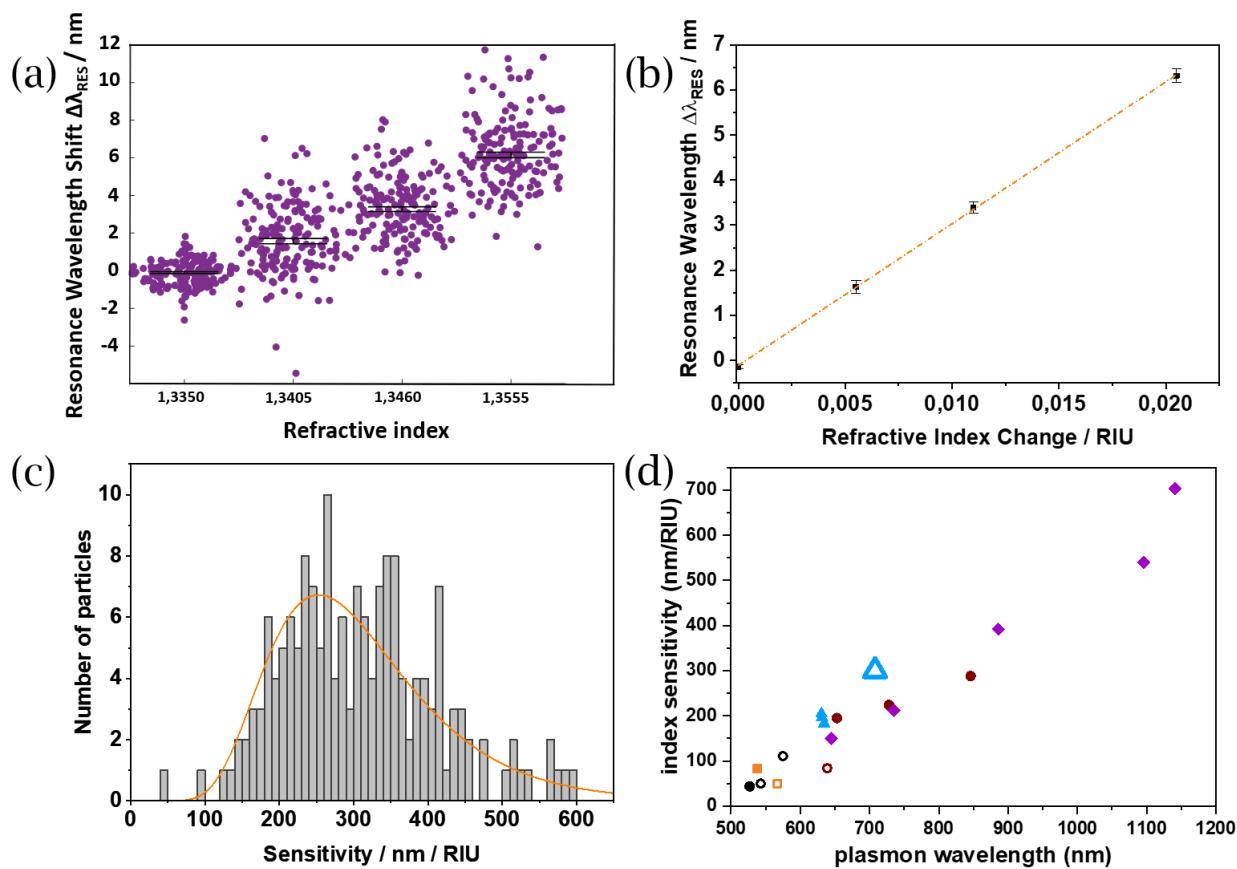


Figure 3.5 : Ensemble de mesures du décalage du pic de résonance d'une particule en fonction de : (a) l'indice de réfraction du solvant et (b) du changement de l'indice de réfraction en unité d'indice de réfraction (RIU). (c) Histogramme regroupant les différentes sensibilités de particules issues de la même synthèse. (d) Graphique regroupant les différentes sensibilités mesurées en solution (formes pleines) et sur particules uniques (formes creuses), dans la littérature, pour : des particules sphériques (cercles noirs), des nano-cubes (carrés orange), des nano-bâtonnets (cercles marron), des prismes (triangles bleus) et des particules de plus hautes symétries comme des nano-bipyramides et étoiles (losanges violets). [2-7]

Afin de situer cette valeur par rapport à la littérature, un graphique rassemblant des sensibilités mesurées pour différents types de particules d'or en solution ou sur particule unique est présenté figure 3.5.d. [2-7] Jusqu'à présent, les mesures sur particules uniques se sont principalement focalisées sur des particules sphériques ou en forme de nano-bâtonnets. Notre étude constitue donc ici, une des premières études de sensibilité réalisées par détection sur prismes individuels. Ce type de détection présente les avantages d'une faible consommation d'échantillon, d'une étude sélective et d'un temps d'analyse rapide. [8] La fluctuation de la sensibilité enregistrée d'une particule à l'autre dépend fortement de la forme et de la taille des particules. [9] La sensibilité des particules augmente de manière quasi-linéaire avec la longueur d'onde du pic de résonance plasmonique (figure 3.5.d). Les particules que nous avons synthétisées suivent cette tendance (seul triangle bleu creux) et ont même une sensibilité légèrement supérieure à ce qui pourrait être attendu. Les nano-bâtonnets (cercles marron) avec une longueur d'onde de résonance similaire (à 728 nm), voire plus élevée (à 846 nm), montrent, en effet, une sensibilité plus faible (224 nm/RIU et 288 nm/RIU). [2] La forme est donc également un facteur important permettant d'obtenir une sensibilité élevée. En effet, lorsque la troncature diminue et que le triangle devient plus pointu, le pic de résonance se déplace vers le rouge. [10] Dans notre cas, certaines particules sont des prismes pointus correspondant aux hautes valeurs de sensibilité de l'histogramme, alors que les particules tronquées et hexagonales participent à l'étirement du graphique vers les valeurs basses. Par ailleurs, les nanoprismes ont une surface active beaucoup plus grande et donc une intensité de signal plus élevée.

I.3 - Détection plasmonique de la streptavidine sur prisme individuel

I.3.1 - Fonctionnalisation de la plateforme colloïdale

Puisque les protéines sont sur la surface des nanocristaux d'or après la synthèse, nous pouvons produire des prismes biotinylés en surface directement pendant la synthèse de ces derniers. Le protocole reste inchangé à l'exception des protéines employées lors de la phase de croissance, dont les lysines externes servent de site de greffage aux ligands biotinylés avec l'ajout de 1 mg de sulfo-NHS-biotin dissout dans 50 µL à 100 nM de solution tampon de phosphates de sodium (NaP) pour 200 µL à 100 µM de protéines G8. Le mélange est ensuite laissé à 4 °C pour une nuit, le temps de permettre la réaction NHS-NH₂ de se produire, puis purifié sur colonne Zepa (coupe à 7 kD) avant d'être stocké à -20 °C pour une utilisation ultérieure.

I.3.2 - Mesure du décalage spectral en présence de la streptavidine

Nous avons testé le potentiel de notre système comme capteur LSPR avec un système biotine-streptavidine comme couple récepteur-analyte. La streptavidine (STV) est une protéine qui parvient à lier jusqu'à quatre biotines. Ce couple est bien connu comme modèle pour les biocapteurs LSPR. [6,9,11]

Pour les étapes de détection de la streptavidine, nous incubons 500 μL de prismes biotinylés avec 50 μL de STV à 0,1 mg.mL $^{-1}$. La solution est ensuite laissée au repos 2 heures. Au bout de 2 heures, un spectre UV-visible est enregistré et comparé au spectre pris juste après la synthèse (figure 3.6.a). Un décalage du pic de résonance plasmonique de 7 nm est enregistré. Il s'agit d'un décalage suffisamment significatif pour être détecté avec facilité, néanmoins la dérivée du spectre permet une mesure plus précise de ce décalage (figure 3.6.b). Il s'agit ici d'un résultat sur l'ensemble de la population de particules contenues dans la solution, à savoir les structures 2D et les particules sphéroïdales.

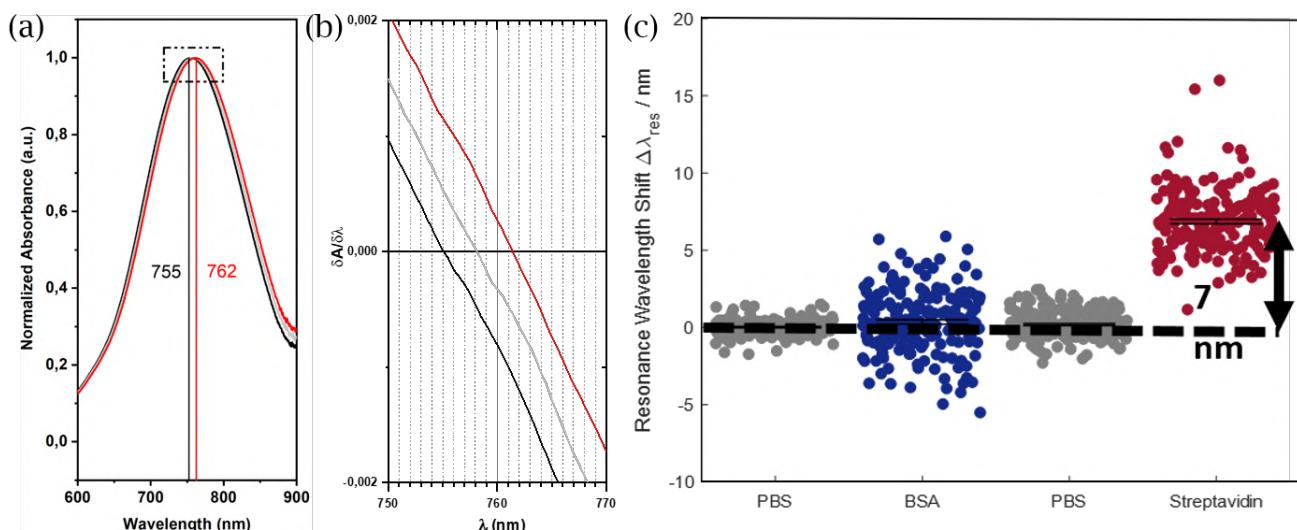


Figure 3.6 : (a) Spectres d'absorbance de la solution colloïdale de nanocristaux 2D biotinylés avant et après incubation avec de la streptavidine, dont les pics de résonances LSPR sont respectivement à 755 nm (en noir) et à 762 nm (en rouge). L'encadré noir en pointillés correspond à la zone zoomée des dérivées des courbes présentées en (b). (c) Ensemble de mesure du décalage de la longueur d'onde du pic de résonance après incubation de la streptavidine (en rouge) et des contrôles : buffer pur (PBS) et de la protéine BSA (en bleu).

La même détection de la STV est effectuée sur la mesure d'une seule particule. Le même décalage de 7 nm est présent (points rouges dans la figure 3.6.c). Des expériences de contrôle sont effectuées dans lesquelles la STV est remplacée soit par du tampon phosphate salin (PBS en gris) soit par des protéines d'albumine de sérum bovin (BSA en bleu). La liaison non spécifique de la BSA est négligeable, ce qui prouve que notre système permet une détection efficace et sélective de la STV.

II - Ingénierie de protéines comme stratégie de couplage « plasmon-émetteur »

II.1 - Couplage direct par appariement de biomolécules complémentaires

Chaque streptavidine pouvant se lier avec quatre biotines, ce couple de biomolécules est utilisé pour assembler des nanoparticules. Dans un premier temps, les prismes couverts de protéines α Rep biotinylées offrent une plateforme polyvalente pour conférer aux nanocristaux d'or des fonctionnalités d'auto-assemblage. Une démonstration de cette approche est illustrée sur les figures 3.7.a-c. [1] Des nanoprismes d'or α Rep streptavidinés sont couplés à d'autres nanoprismes d'or α Rep uniquement biotinylés. Ce mélange permet d'obtenir de grands auto-assemblages en 3D, principalement grâce à l'empilement face à face de nanocristaux 2D par reconnaissance de la streptavidine et de la biotine. Le suivi par spectroscopie UV-visible de mélanges équimolaires de nanocristaux d'or streptavidinés et biotinylés montre une diminution marquée du pic de résonance plasmonique et suggère que l'auto-assemblage se produit en solution. En l'absence de biotine (BT) sur le second partenaire, les nanocristaux restent isolés les uns des autres et aucune agrégation n'est observée (figure 3.7.d).

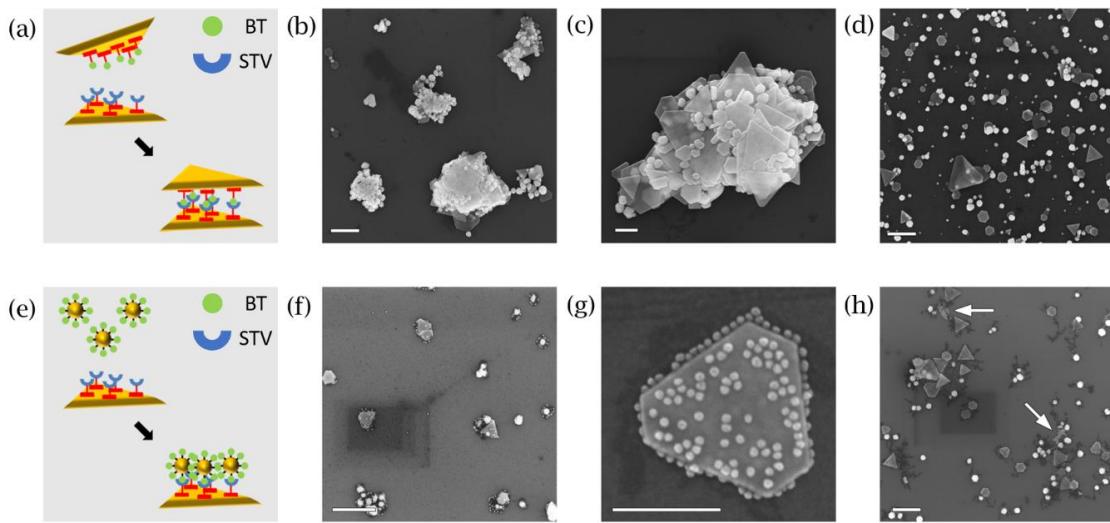


Figure 3.7 : (a) Schéma et (b,c) images SEM de l'empilement basal obtenu par auto-assemblage entre des nanoprismes streptavidinés et biotinylés. (d) Expérience de contrôle en l'absence de biotine ne montrant aucun empilement. (e) Schéma et (f,g) images SEM d'assemblages cœur-satellite obtenus avec des nanoprismes streptavidinés et des nanosphères d'or biotinylées. (h) Expérience de contrôle avec des prismes non streptavidinés. Aucun satellite n'est observé, mais les sphères sont présentes en amas (flèches blanches). Les barres d'échelle des images (b,d,f,h) font 500 nm et celles des images (c,g) font 200 nm. Figures reprises avec autorisations de la référence [1].

Les nanoprismes biotinylés peuvent être remplacés, par exemple par des nanosphères d'or de 30 nm fonctionnalisées avec des PEG-biotine. Ce mélange mène à des assemblages de type cœur-satellites comme le montrent les figures 3.7.e-g. Le recouvrement des nanoprismes par les nanosphères se fait de préférence sur les deux facettes basales orientées (111). Aucune structure cœur-satellites n'est formée lors de l'incubation de nanocristaux d'or α Rep non streptavidinés avec des nanosphères biotinylées, qui restent séparées de manière aléatoire (voir figure 3.7.h, où les flèches blanches indiquent des agrégats aléatoires de nanoparticules d'or).

Ce dernier exemple montre que les protéines α Rep, résidant en surface des prismes d'or, peuvent être utilisées comme plateforme pour assembler d'autres éléments sur les deux faces (111). Jusqu'à présent, seul le principe de cet assemblage a été démontré. Dans le chapitre 4, nous appliquerons ce même procédé pour coupler des particules fluorescentes biotinylées sur les surfaces d'Au(111) des nanoprismes d'or. Cette approche directe du couplage offre une bonne maîtrise de l'espacement métal-émetteur mais ne permet pas de contrôler son positionnement que ce soit sur les bords, le centre, ou la pointe de la face (111) triangulaire. Une stratégie dérivée du couplage direct sera proposée en fin de manuscrit. Néanmoins, la possibilité d'agencer, entre elles, des protéines en un motif prédéfini et de les encoder avec des positions spécifiques de greffage de l'émetteur et de la nucléation de la structure plasmonique, est une voie alternative prometteuse mais peu explorée car elle requiert de relever le premier défi qui consiste à construire la superstructure de protéines. Notre contribution dans cette voie est abordée dans la section suivante. [12-14]

II.2 - Origami de protéines : vers un nouveau « template » multifonctionnel

Nous avons précédemment utilisé deux faces des protéines α -Rep. La face interne pour la morpho-synthèse de nanocristaux d'or et la face dorsale pour la fonctionnalisation avec des biomolécules. Nous pouvons encore jouer sur les faces perpendiculaires en les faisant croître, donc en augmentant le nombre de repeats composant la protéine.

Les protéines α Rep ont un squelette rigide courbe, qui pourrait générer des tubes de forme hélicoïdale si celles-ci étaient assez longues, voir modélisation figure 3.8.a-b. Cependant, du fait de leur longueur, elles seraient difficiles à produire ou encore à purifier. La stratégie que l'équipe du Pr. Minard (I2BC, Orsay) a alors envisagée, consiste à générer des plus petites protéines qui constitueront les briques de l'assemblage. Ces dernières sont reliées par des agrafes capables de reconnaître le dos et de maintenir les briques les unes à la suite des autres, voir modélisation figure 3.8.c-d.

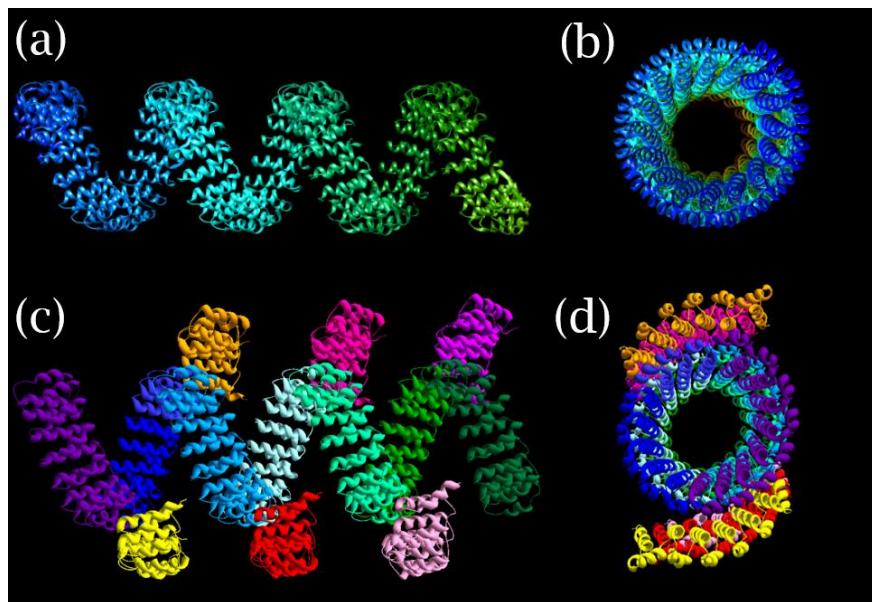


Figure 3.8 : Modélisations de l'hélice formée par une longue protéine α Rep vue de profil (a) et de face (b). Modélisation d'un assemblage d'une hélice formée par des protéines « briques », ici en couleurs froides (de violet foncé à vert foncé) maintenues ensemble par des protéines « agrafes », ici en couleurs chaudes (de jaune à fuchsia), vues de profil (c) et de face (d).

Imaginons qu'un tel assemblage (origami de protéines artificielles) soit réalisé. Nous pourrions alors envisager de l'utiliser comme un template multifonctionnel pour produire et assembler des structures hybrides à géométrie contrôlée. Par exemple, le template peut servir pour assembler des particules d'or préalablement immobilisées dans un tour d'hélice (grâce à des cystéines placées dans la face ventrale et connues pour leur affinité avec l'or) [15,16] avant de fusionner les nanoparticules (figure 3.9.a). [17] Cette méthode ferait cependant disparaître le template de protéines qui ne serait plus utilisable. Une autre méthode consisterait à utiliser une face interne anti-Au(111) pour diriger la morpho-synthèse dans la cavité interne de la superhélice (figure 3.9.b). Une telle structure comportant la séquence de l' α Rep G8 en face interne, utiliserait la superhélice comme template interne pour la création d'un nano-bâtonnet d'or. Dans un deuxième temps, les émetteurs pourraient être placés sur le dos des agrafes jouant une deuxième fois le rôle de template, mais cette fois pour contrôler le positionnement des émetteurs le long du bâtonnet (figure 3.9.b).

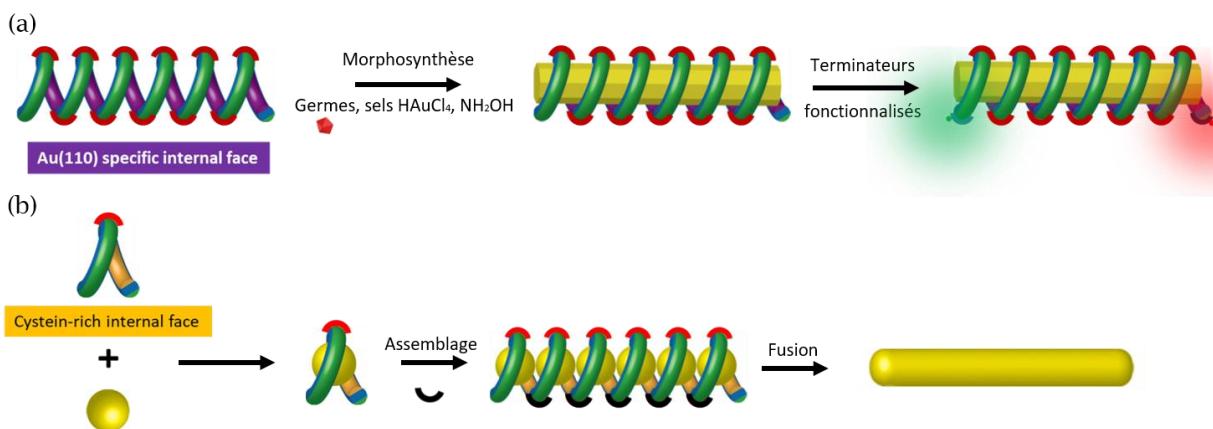


Figure 3.9 : (a) Schéma de l'utilisation, pour la morphosynthèse, d'un template de protéines en forme d'hélice composée de briques reliées par des agrafes. Cette morphosynthèse se fait entre les germes, les sels de HAuCl₄, le réducteur NH₂OH et les faces internes des briques présentant une affinité avec l'or (110). Le template de protéines étant toujours présent, nous pouvons envisager l'utilisation d'agrafes fonctionnalisées avec des émetteurs. (b) Schéma de l'association d'un tour d'hélice, composée de deux briques reliées par une agrafe, avec des particules d'or sphériques grâce à des cystéines disposées sur la face interne des briques. Ces sphères enroulées de protéines sont ensuite assemblées avec un deuxième type d'agrafe. Cet assemblage est ensuite irradié avec un laser pour fusionner les particules entre elles, entraînant la disparition du template de protéines.

Cependant, une protéine qui se fixerait sur son propre dos polymériserait, rendant la méthode du phage display peu susceptible de fonctionner. Une nouvelle protéine, appelée « bait » jouant le rôle de brique, a donc été conçue avec une face dorsale destinée à servir de cible. Sa face ventrale a été choisie arbitrairement pour être polaire et favoriser les interactions électrostatiques stabilisant les intermodules. Cette protéine, composée de trois repeats entre un N-cap et un C-cap, diffère des autres α Rep, car les séquences des positions dorsales des repeats 2 et 3 ont été modifiées de façon à contenir deux tyrosines (acide aminé Y), la séquence de la protéine « bait » est présentée table 3.1.a. Les chaînes latérales des tyrosines sont connues pour leurs implications dans les interactions entre protéines, elles sont notamment surreprésentées dans les sites de fixation entre antigènes et anticorps. [18-20] Le but est d'induire localement une forte interaction pour favoriser l'ancre d'une α Rep de la bibliothèque après sélection par phage display. La protéine « binder », l'agrafe, sélectionnée et choisie pour la suite est nommée bBE3 et fixe la protéine « bait » avec un K_d de 68 nM. La figure 3.10.a-b montre le schéma et la modélisation du couple « bait » et « binder » bBE3. Ce « binder » montre une affinité faible avec la protéine sans tyrosine (K_d = 4 μ M), démontrant que bBE3 se fixe bien sur la face convexe de la cible. La protéine bBE3 comporte 191 acides aminés pour une masse molaire de 20,5 kDa.

(a) Séquence de la protéine alphaRep "bait" utilisée comme cible pour la sélection du back binder (bBE3)																																
Position dos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Repeats																																
N cap	T	D	P	E	K	V	D	M	Y	I	E	N	L	R	D	E	D	P	E	V	R	A	R	A	A	E	A	L	G	K	I	
I1	G	D	E	R	A	V	P	A	L	I	E	A	L	K	D	E	D	S	N	V	R	K	E	A	A	R	A	L	G	E	I	
I2	G	D	P	E	A	V	E	A	L	I	Y	A	L	R	D	E	D	A	D	V	R	K	E	A	A	A	A	L	G	Q	I	
I3	G	D	E	A	A	V	Y	P	L	I	Q	A	L	E	D	E	D	S	D	V	R	R	A	A	A	E	A	L	G	R	I	
Neo C cap	G	D	P	R	A	E	E	A	L	R	R	A	R	E	D	E	D	P	E	V	Q	K	E	A	E	K	A	E	G	E	I	

(b) Séquence de la protéine alphaRep brique Imp59																																
Position dos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
Repeats																																
His Tag N	M	R	G	S	H	H	H	H	H	H																						
N Cap	T	D	P	E	K	V	D	M	Y	I	E	N	L	R	D	E	D	P	E	V	R	A	R	A	A	E	A	L	G	K	I	
Tev N	G	S	G	S	G	E	N	L	Y	F	Q	G	G	S	G																	
I3	G	D	E	A	A	V	Y	P	L	I	Q	A	L	E	D	E	D	S	D	V	R	R	A	A	A	E	A	L	G	R	I	
X	G	D	E	R	A	V	P	A	L	I	E	A	L	K	D	E	D	P	E	V	R	K	E	A	A	K	A	L	G	E	I	
X	G	D	E	R	A	V	E	P	L	I	K	A	L	K	D	E	D	A	D	V	R	K	E	A	A	A	A	L	G	Q	I	
X	G	D	E	R	A	V	E	P	L	I	K	A	L	K	D	E	D	S	D	V	R	R	A	A	A	E	A	L	G	R	I	
X	G	D	E	R	A	V	E	P	L	I	K	A	L	K	D	E	D	S	N	V	R	K	E	A	A	R	A	L	G	E	I	
X	G	D	E	A	A	V	E	P	L	I	Q	A	L	E	D	E	D	P	E	V	R	A	R	A	A	E	A	L	G	K	I	
I1	G	D	E	R	A	V	P	A	L	I	E	A	L	K	D	E	D	S	N	V	R	K	E	A	A	R	A	L	G	E	I	
I2	G	D	P	E	A	V	E	A	L	I	Y	A	L	R	D	E	D	A	D	V	R	K	E	A	A	A	A	A	L	G	Q	I
Tev C	G	S	G	S	G	E	N	L	Y	F	Q	G	G	S	G																	
Neo C cap	G	D	P	R	A	E	E	A	L	R	R	A	R	E	D	E	D	P	E	V	Q	K	E	A	E	K	A	E	G	E	I	
His Tag C	G	S	G	S	G	H	H	H	H	H	H	H	K	S	L	I	S															

Table 3.1 : Séquences des protéines (a) « bait » et (b) Imp59. Les positions en bleu (4, 7, 11 et 14) correspondent aux positions dorsales hypervariables entre chaque « repeat ». Ici, seules les positions 7 et 11 ont été modifiées pour optimiser les interactions avec bBE3 par la présence des tyrosines indiquées par un Y jaune dans des cases jaunes. Les positions en orange (18, 19, 21, 22, 26 et 30) sont les positions hypervariables de la face ventrale utilisée pour la reconnaissance de l'Au(111). Les repeats X dans le tableau (b) sont des repeats internes arbitraires et ne participent pas à l'interaction avec bBE3. Les lignes de couleur grises dans le tableau (b) correspondent aux « repeats » supprimés lors du clivage à la TeV protéase (Tev N et Tev C : lignes avec l'écriture en rose).

La brique Imp59 a ensuite été créée par permutation circulaire (voir flèches rouges et bleues entre les figures 3.10.a et 3.10.c), de manière à placer les deux repeats contenant des tyrosines, aux extrémités de la protéine et non plus en son centre. Les modules centraux appelés X, ne contribuent pas à l'auto-assemblage. Une protéine sans cap aurait tendance à s'agréger pour masquer ses faces hydrophobes et donc serait difficile à produire. C'est pourquoi Imp59 a été produite avec un N-Cap et un C-cap. Cependant, pour permettre à bBE3 de servir d'agrafe entre deux briques, il faut les retirer. S. Viollet à l'I2BC a eu l'idée d'insérer des sites de coupure par la TeV protéase, une enzyme qui coupe les liaisons peptidiques des protéines, après le N-cap et avant le C-cap, comme on peut le voir dans la table 3.1 qui comporte la séquence de la protéine dans le schéma de la brique Imp59 avant et après clivage (figures 3.10.c-d respectivement). Le clivage par la TeV protéase libère trois fragments, la brique et les deux caps comportant des étiquettes poly-histidine (HisTag, HT). Ceux-ci sont éliminés en s'accrochant sur les parois d'une colonne de

NinNTA lors d'une étape de purification. La protéine Imp59 clivée est composée de 265 acides aminés pour une masse molaire de 28 kDa. L'auto-assemblage se fait donc entre deux briques coupées consécutives qui sont stabilisées par bBE3 comme sur le schéma et les modélisations (figures 3.10.f-h).

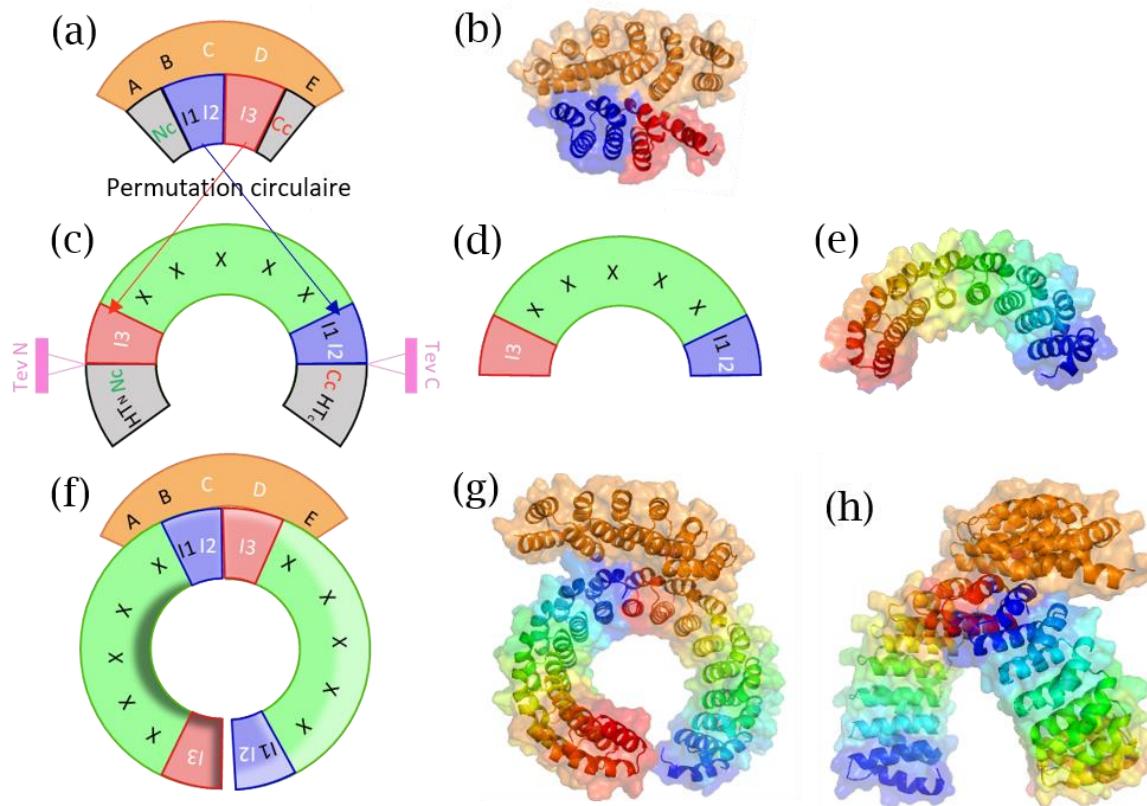


Figure 3.10 : Schémas représentatifs des protéines (a) lors de l'assemblage entre le « bait » et bBE3, (c) et (d) Imp59 avant et après clivage à la TeV protéase (en rose) et (f) lors de l'assemblage entre Imp59 et bBE3. Les lettres A à E représentent les « repeats » de bBE3, I1 à I3 les « repeats » de reconnaissance de bBE3. Les lettres blanches sont celles comportant la tyrosine et dirigeant l'assemblage entre les deux protéines. Nc et Cc sont respectivement les N-cap et C-cap des protéines. HT_N et HT_C sont respectivement les HisTag liés aux terminaux N-Cap et C-Cap respectivement. Une permutation circulaire (flèches bleues et rouges entre les schémas (a) et (c)) positionne le « repeat » de la protéine « bait ». I1 et I2 sont positionnés à la fin de la protéine Imp59 et I3 au début. Les modélisations des schémas (a), (d) et (f) sont représentées en (b), (e) et (g-h) respectivement. (g) et (h) étant les vues de face et de profil de (f) respectivement.

III - Assemblage et structure d'un template super-hélicoïdal d'αRep

III.1 - Protocoles biochimiques d'auto-assemblages

III.1.1 - Clivage et purification des protéines

Afin de garder la stabilité des briques sur une longue période, celles-ci sont congelées entières avec les caps terminaux. La coupure à la TeV protéase ne se fait qu'au moment de l'assemblage.

Pour cela, une mesure de densité optique de la solution est faite par spectroscopie UV-Visible. Une migration sur gel (kit Biorad) pendant 30 min à 250 V est faite pour vérifier l'état de la protéine. Le gel est rincé à l'eau et trempé dans un révélateur bleu 30 min avec agitation. Si la protéine est pure et non agrégée, celle-ci est récupérée et une nouvelle mesure de densité optique (DO) est faite. Un mélange de ratio 1:25 en DO de TeV et de protéines avec 530 µL d'une solution diluée vingt fois de 0,5 mM d'EDTA et de 1 mM de DTT est laissée au repos une heure à 30 °C.

Une étape de contre-purification est ensuite faite sur résine NiNNTA. La colonne est d'abord rincée une fois avec un tampon NaP, puis la protéine est ajoutée et récupérée. Ensuite pour récupérer la protéine restée dans la colonne, cette dernière est lavée avec 5 mL de tampon NaP, suivi d'un ajout de 5 mL avec un tampon d'élution. Ce lavage est réalisé trois fois.

Un autre gel de migration de 30 min à 250V est réalisé pour la protéine avant clivage, le mélange de protéine et de TeV, la protéine récupérée sur la colonne avant lavage, après chaque lavage (L1, L2, L3) et chaque élution (E1, E2, E3). Les solutions montrant la présence de la brique pure sont ensuite rassemblées en un seul Eppendorf.

III.1.2 - Induction de l'auto-assemblage des super-hélices αRep

Dans un Eppendorf Lobind, 50 µL à 20 µM de brique Imp59 et 50 µL à 20 µM du « *binder* » bBE3 sont directement mélangés à la pipette. Le mélange est laissé au repos pour 30 min. Un précipité blanc apparaît, comme le montre la photo en figure 3.11.a, confirmant la réaction entre les deux protéines.

Dans un premier temps, ce précipité a été observé par microscopie optique à l'IB2C. Un fluorophore Alexa fluor est couplé au « *binder* » bBE3 avant le mélange avec la brique Imp59. Le précipité obtenu est dispersé sur un substrat de verre, puis observé par microscopie confocale. Une partie des objets semble dispersée, mais la plupart sont agrégés en blocs fibreux, ce qui suggère que les tubes sont disposés en fagots (figure 3.11.b).

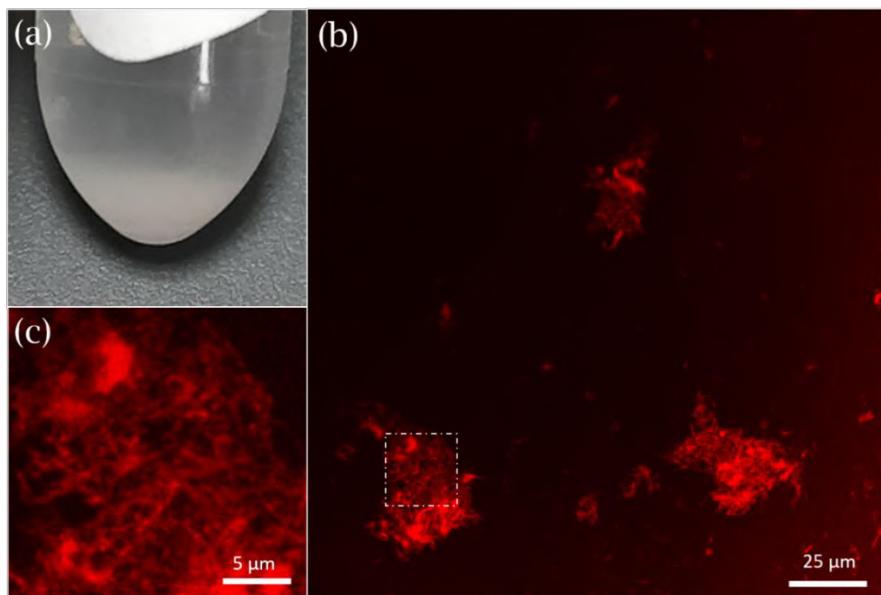


Figure 3.11 : (a) Photo du précipité blanc obtenu lors de l'assemblage entre la brique Imp59 et l'agrafe bBE3. (b) Image optique des assemblages lorsque bBE3 est fonctionnalisée avec un Alexa fluor. (c) zoom de la zone blanche en pointillés de (b).

III.2 - Caractérisation structurale

III.2.1 - Microscopie en coloration négative

Une goutte du précipité blanc ainsi obtenu a ensuite été observée en TEM par coloration négative. Nous avons essayé diverses teintures afin d'obtenir le meilleur résultat possible. Les teintures ont toutes une concentration de 3 % en masse (w/w). L'uranyle d'acétate (UA, $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{pKa} = 3,75$ avec un $\text{pH} = 3$ une fois l'acide dilué à 3 % w/w dans de l'eau distillée), qui est le colorant le plus utilisé, car il offre un très bon contraste, l'acide phosphotungstique (PTA, $\text{H}_3[\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4]$, $\text{pKa} = 4,4$ et $\text{pH} = 6/7$) et le molybdate d'ammonium (MB, $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, $\text{pKa} = 5,3$ et $\text{pH} = 8$).

Avec l'UA, nous observons les protéines sous forme de cristaux d'hélices parallèles (3.12.a-b). Un zoom sur les cristaux nous permet de voir l'arrangement en chevrons des protéines entre elles (encart de la figure 3.12.a). Avec le PTA, les protéines forment des masses moins bien organisées que précédemment, où des formes filamenteuses peuvent être observées. Ces formes sont indiquées par l'encadré de la figure 3.12.c.

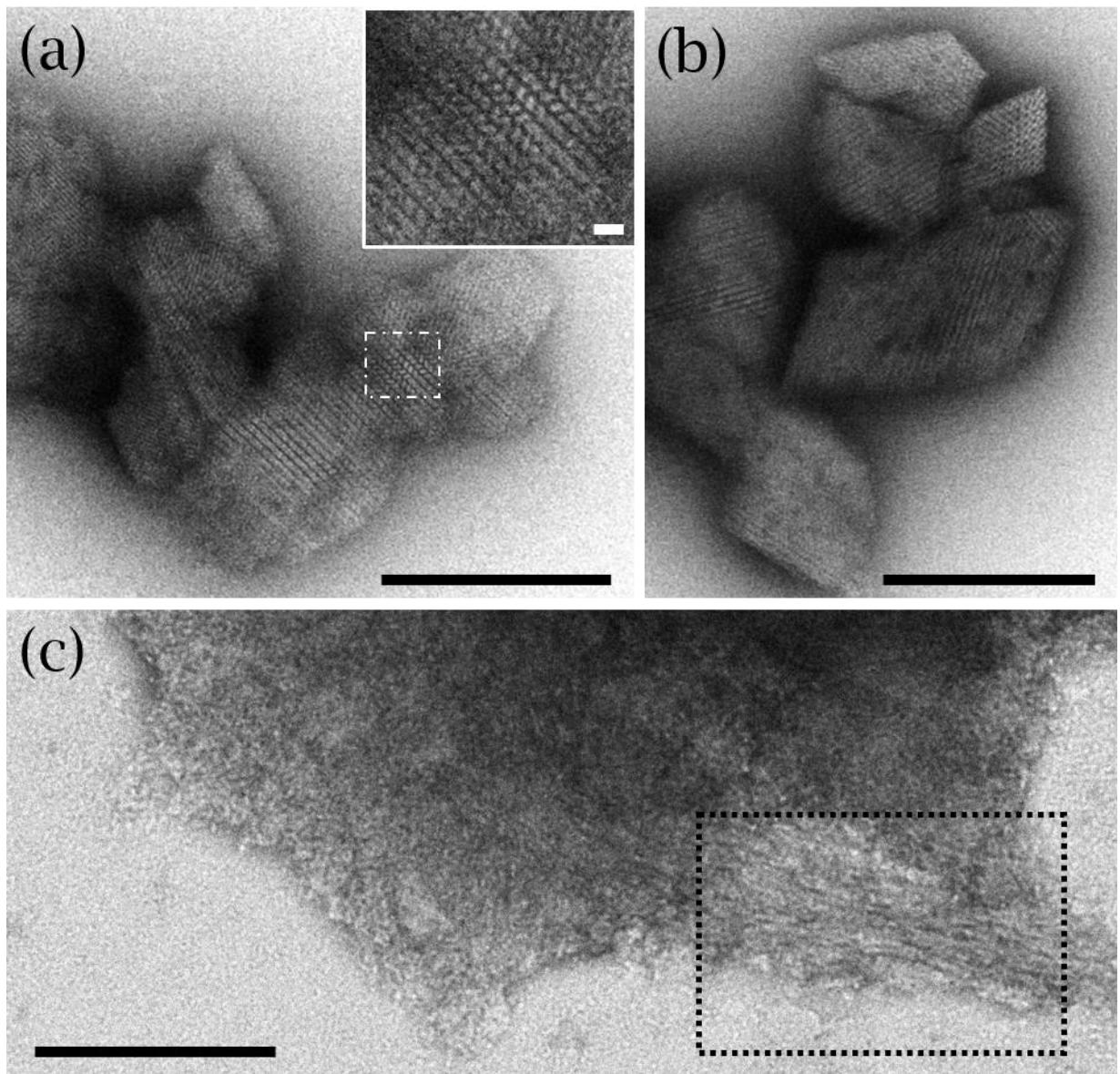


Figure 3.12 : Images TEM des assemblages de protéines réalisées en coloration négative avec (a-b) de l'UA et (c) du PTA. L'encart en (a) montre un zoom de la région encadrée. L'encadré de (c) montre la région où des formes tubulaires sont visibles. Les échelles sont de 200 nm pour les images (a-c) et de 10 nm pour le zoom en (a).

Enfin, seul le MB nous montre des hélices isolées et non plus sous forme de cristaux (figure 3.13.a-c). Un profil pris le long d'une hélice de protéines du zoom en encart de la figure 3.13.b, est présenté figure 3.13.d. Le diamètre moyen des tubes est de $9 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$, la distance entre deux binders du même côté est de $6 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$ et l'angle moyen entre deux binders opposés est de 57° . Nous comparons ces mesures avec le modèle pdb créé par les biologistes d'Orsay, qui est un modèle contenant tous les acides aminés des protéines, fait à partir des données cristallographiques des protéines Imp53 et bBE3 séparées et en paire, mais pas assemblées en tubes. Ce modèle est à l'origine de la modélisation montrée en figure 3.8.a et 3.13.c. Sur ce modèle, le diamètre moyen des tubes est de $8,4 \text{ nm} \pm$

0,8 nm, la distance entre deux binders du même côté est de $6 \text{ nm} \pm 0,5 \text{ nm}$ et l'angle moyen entre deux points opposés est de 56° . Nous avons ici un bon accord entre les valeurs expérimentales et celles attendues.

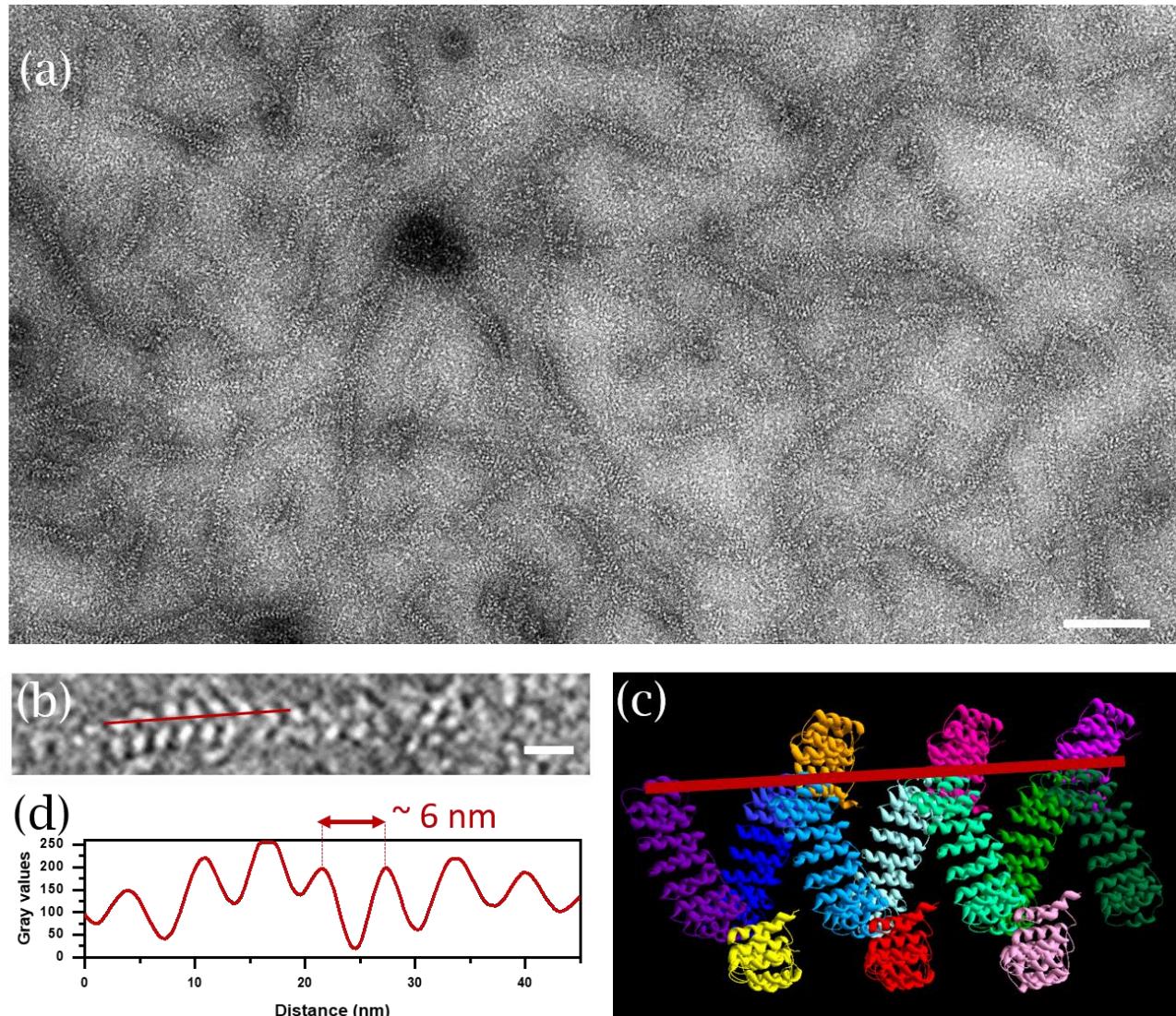


Figure 3.13 : (a-b) Images TEM des assemblages de protéines réalisées en coloration négative avec du MB. (c) Modèle de l'hélice vue selon les binders. (d) Profil pris le long d'une hélice sur le zoom de l'encart (b). L'échelle de (a) est de 100 nm et celle de (b) de 10 nm.

La concentration de protéines ($5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ ou $20 \mu\text{M}$) ne semble pas avoir d'impact sur les formes observées, seulement sur leur densité de présence sur la grille. Il semble probable que le pH et le pI des colorants influent sur le type de formation (hélices isolées ou cristaux). D'autres techniques de caractérisation sont nécessaires afin de déterminer leur état en solution avant altération par le colorant.

III.2.2 - Diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS)

Une méthode globale permettant de connaître l'état des superstructures de protéines dans le tampon est de caractériser les assemblages directement en SAXS. Le SAXS en capillaire permet de sonder les structures en suspension sans avoir à les congeler ou sécher. Nous avons donc passé nos échantillons sur un banc SAXS de l'IPR de Rennes avec l'aide de F. Artzner. Le signal SAXS typique est présenté figure 3.14.a. La tabulation des pics de ce spectre nous a permis d'identifier une structure, dont la symétrie est celles du groupe d'espace orthorhombique $P2_12_12$, correspondant à un cristal de superhélices parallèles. Le diagramme de ce groupe d'espace, consistant en une ou plusieurs projections des éléments de symétrie et une illustration d'un ensemble de points équivalents (en rouge) en position générale, est représenté figure 3.14.b. Les paramètres de maille associées à notre système sont $\mathbf{a} = 80 \text{ \AA}$, $\mathbf{b} = 65 \text{ \AA}$ et $\mathbf{c} = 58 \text{ \AA}$ pour la maille élémentaire et $\mathbf{a} = 477 \text{ \AA}$, $\mathbf{b} = 195 \text{ \AA}$ et $\mathbf{c} = 58 \text{ \AA}$ pour la supermaille 6×3 . L'axe \mathbf{c} étant le long de l'axe principal des hélices. Cette supermaille est due à un super enroulement tête bêche des hélices qui induit une oscillation hélicoïdale de faible amplitude des assemblages.

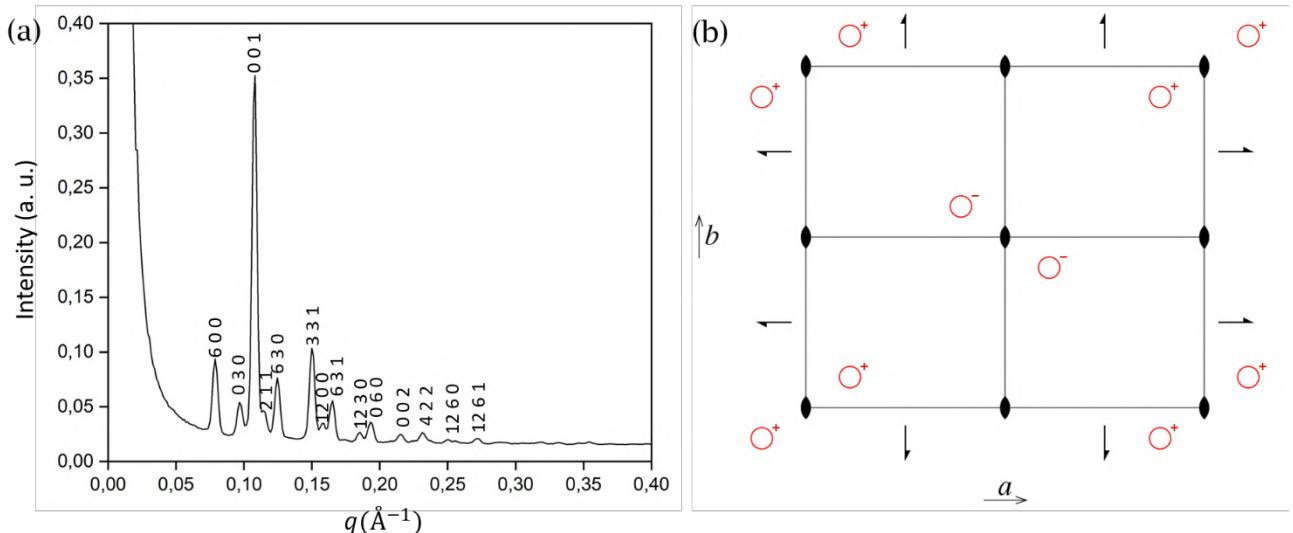


Figure 3.14 : (a) Signal SAXS de la solution contenant les assemblages en suspension. (b) Diagramme du groupe d'espace $P2_12_12$ identifié.

Au niveau de la reproductibilité de ces résultats, d'un assemblage à l'autre, on retrouve toujours la même structure générale d'hélices parallèles avec des paramètres de maille variants peu (figure 3.15.a). La disparition occasionnelle de certains pics et le décalage de quelques autres indiquent que le détail de l'agencement varie d'un assemblage à l'autre. Il est notamment probable que ce soit le superenroulement qui varie. Pour un même échantillon, des mesures en montée et descente de température ont été effectuées, montrant l'existence de deux phases (figure 3.15.b). Les variations en température ont montré que le spectre variait principalement pour les pics (12 0 0) et (3 3 1). L'intensité du premier augmente lors de la montée en température alors que le second diminue. Un basculement

symétrique de l'intensité des pics est observée à 55°C (figure 3.15.c). La transition de phase cristalline est réversible mais présente un hystérésis d'au moins 10°C. Un autre effet de ce changement de phase est le décalage d_{hkl} des pics (1 0 0) et (6 0 0) après la température de transition, aux alentours de 60°C (figure 3.15.d). On observe une contraction du paramètre de maille de 3-4 % à la montée en température. Cette fois, la transition observée suit un cycle d'hystérésis sur 15°C mais reste réversible (coïncidence à 20°C). Ces données laissent supposer une modification complexe de la structure après la température de transition selon le paramètre a . On note toutefois que l'organisation des cristaux est robuste entre la température ambiante et une température de transition de phase à 55°C.

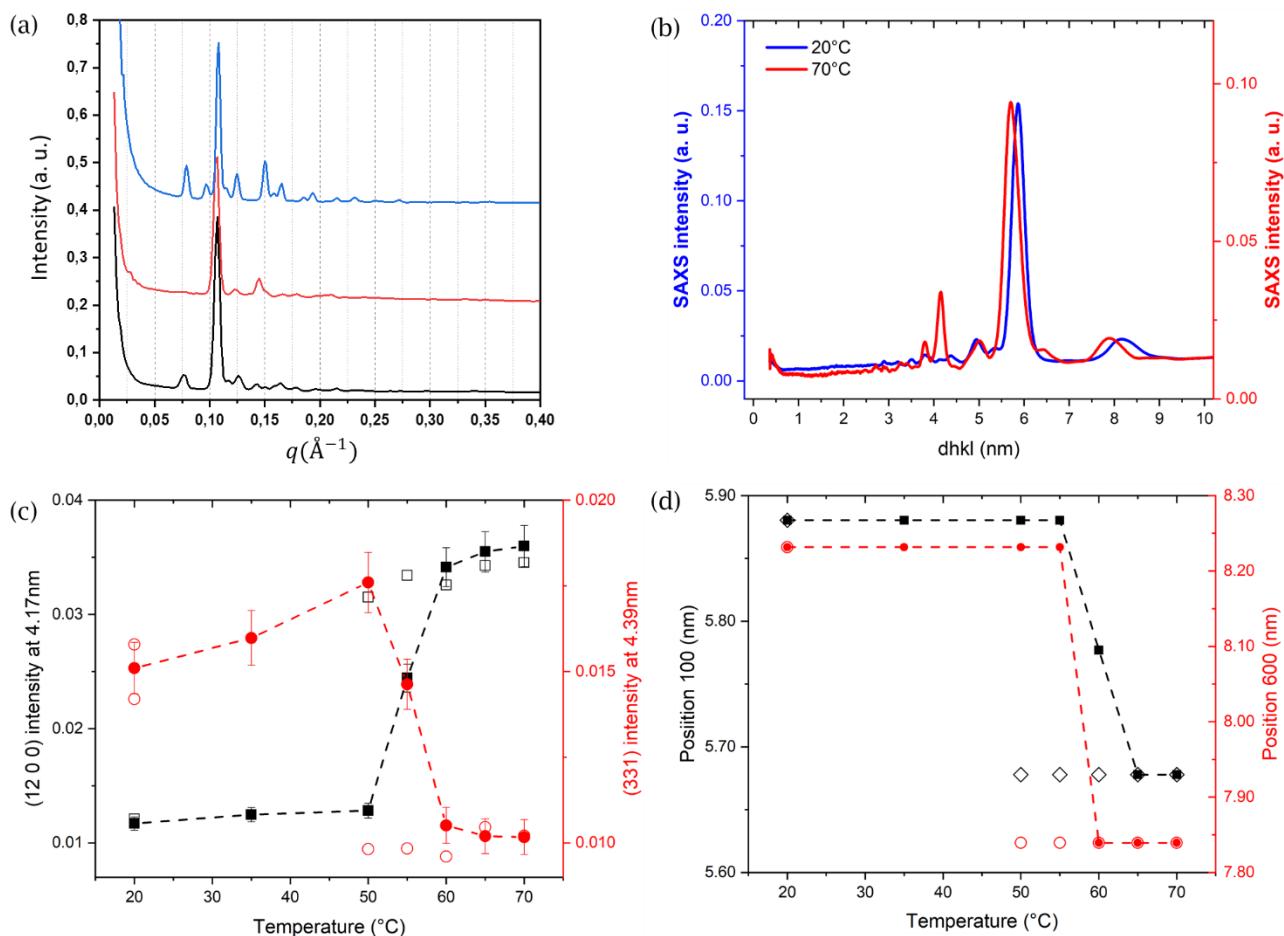


Figure 3.15 : (a) Superposition de spectres SAXS issus de divers échantillons. (b) Spectres SAXS d'un échantillon typique à 20°C et à 70°C. (c) Variation d'intensité en fonction de la température des pics : (12 0 0) en noir et (3 3 1) en rouge. (d) Variation de la position en fonction de la température des pics : (1 0 0) en noir et (6 0 0) en rouge. Les symboles pleins correspondent à la montée en température et les symboles creux à la descente en température.

Des mesures ont été réalisées en présence de MB dans les capillaires, afin de déterminer si la présence de colorant en solution perturbait l'organisation du cristal, l'assemblage de l'origami ou nous permettait de séparer les cristaux en superhélices individuelles. Les spectres obtenus pour différentes concentrations de MB sont

présentés figure 3.16.a. Ceux-ci ne montrent pas de pics particuliers mais une tendance légèrement courbe qui est due aux sels de MB qui ont un signal élevé. Nous pouvons déduire que les cristaux ne sont pas présents, car dû à leur grande symétrie leur diffraction devrait être très intense et ne serait pas couverte par les sels. En revanche, si des tubes isolés étaient présents des oscillations seraient censées apparaître comme le montre la simulation de spectre, réalisée avec le logiciel SasView, [21] pour des tubes de 8 nm de diamètre figure 3.16.b. Dans le cas présent, nous ne voyons pas les oscillations caractéristiques d'une structure tubulaire qui pourrait être cachée dans le bruit des sels. En effet, les tubes n'étant pas forcément orientés de la même manière dans le capillaire ceux-ci peuvent avoir un signal plus faible que les sels de MB. Le fait que nous ne voyons pas de cristaux est déjà une indication encourageante, même si nous ne pouvons pas ici conclure sur la présence d'hélice isolée. Nous avons essayé d'imiter le pH et le pI du MB avec d'autres sels moins lourds afin de limiter le signal venant des sels. Ces expériences ont été sans succès, pour le moment.

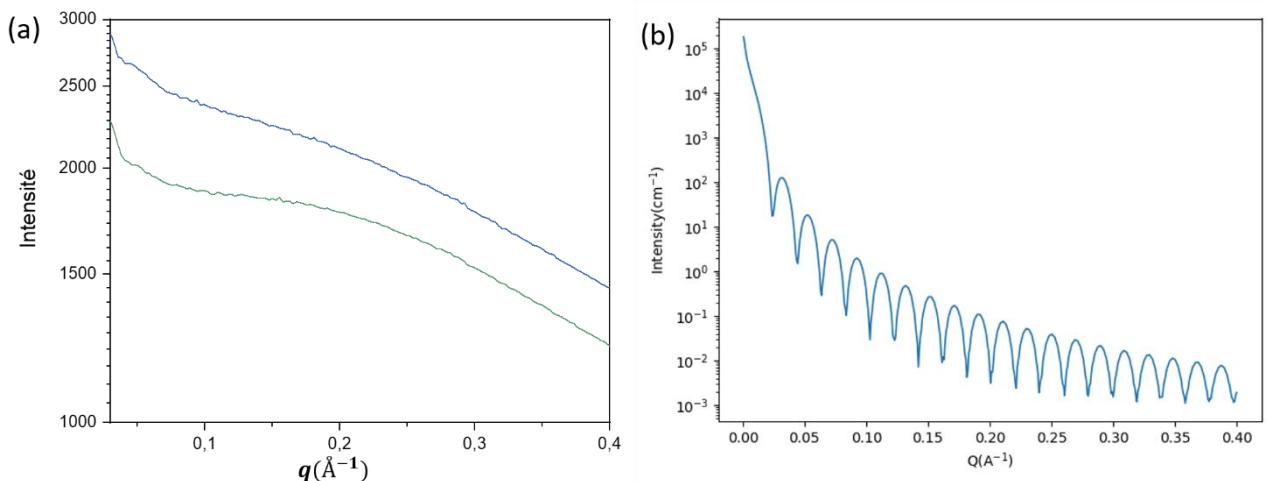


Figure 3.16 : (a) Signaux SAXS des suspensions des assemblages de protéines avec différentes concentrations en MB pour une force ionique $FI=1,25$ (en bleu) et $FI = 1,05$ (en vert). (b) Simulation du signal SAXS de tubes de 8 nm de diamètre avec le logiciel SasView. [21]

III.2.3 - Imagerie cryoTEM

Afin d'observer les superstructures dans un état quasi-natif en TEM ainsi que pour obtenir un contraste satisfaisant sans agent colorant, des images ont été prises en cryoTEM. Cette méthode nous montre que les tubes de protéines semblent être naturellement assemblés en paquet d'hélices parallèles de quelques couches (figure 3.17). Les tubes ne semblent pas tous être de la même longueur. Ils peuvent cependant atteindre des longueurs de plus de 27 μm (figure 3.17.a), ce qui correspond à environ 40 000 pas d'hélices.

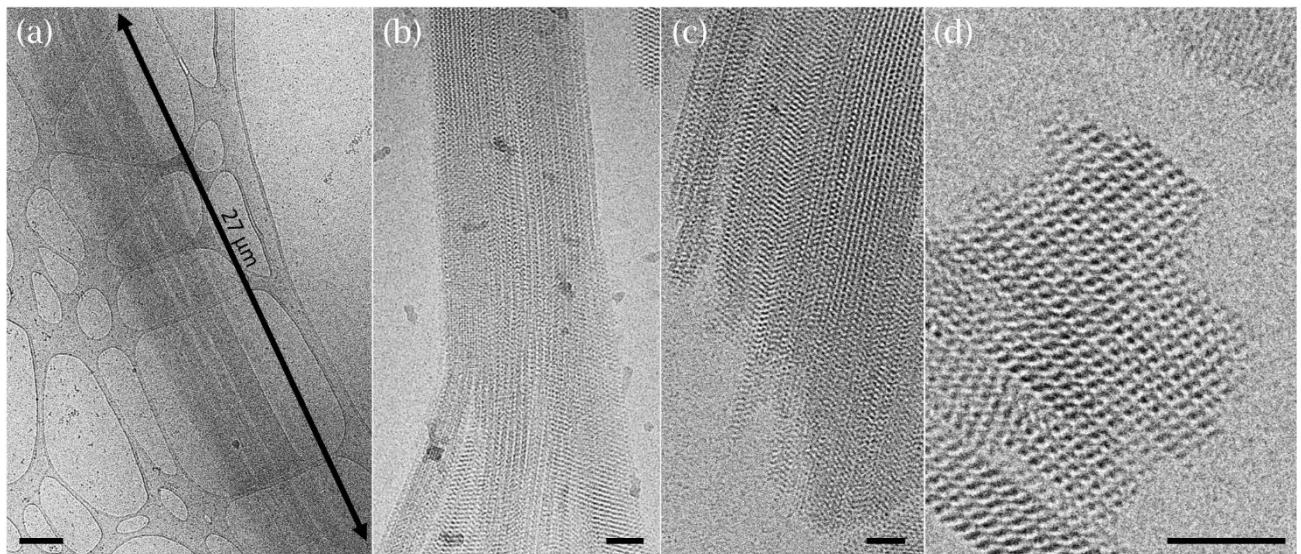


Figure 3.17 : (a-d) Images cryoTEM en champ large d'assemblage d'hélices. Les barres d'échelle sont de 2 μm pour (a) et 50 nm pour (b-d).

Trois types de contraste des formations de protéines montrant des cristaux de grande qualité ont particulièrement attiré notre attention et sont présentées figure 3.18.a-c. La première est une orientation particulière du cristal et les deux autres se sont avérés être des moirés.

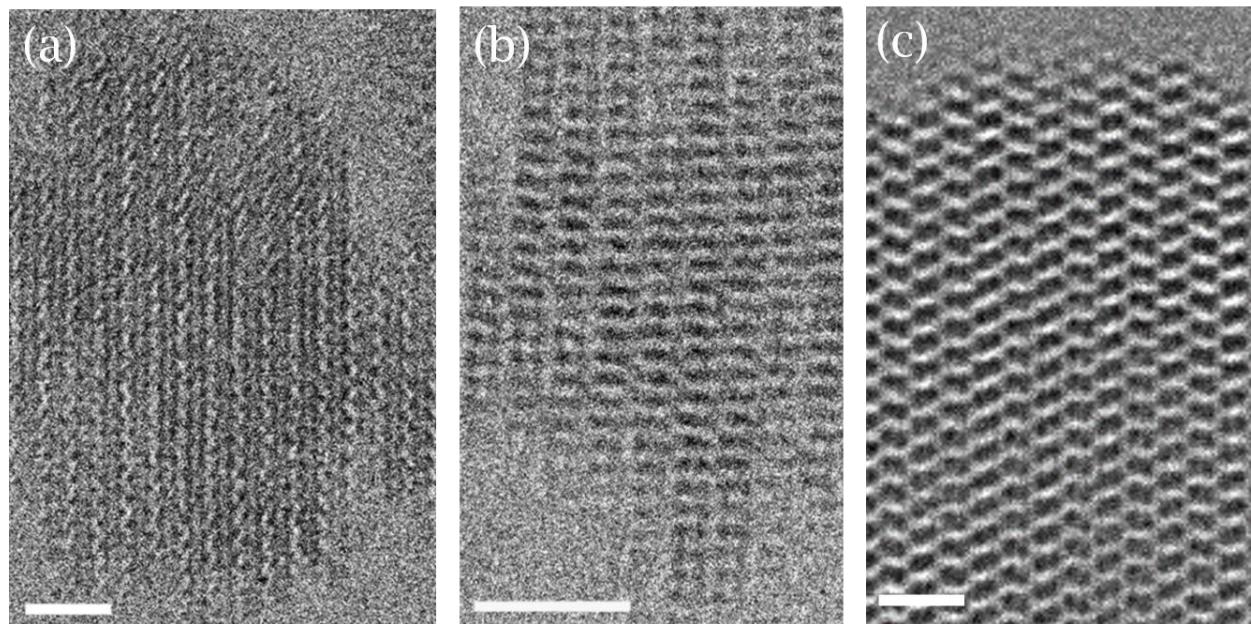


Figure 3.18 : Images cryoTEM des assemblages de protéines de trois formes différentes : (a) les ondulations, (b) les tirets et (c) les chevrons. Les barres d'échelle sont de 25 nm.

La figure 3.18.a montre une orientation des superhélices, que nous interprétons comme étant une vue du diamètre avec les back binders (points plus sombres). Un modèle de cette vue est présenté figure 3.19.a. Nous avons mesuré les distances entre les trois binders adjacents d'une même hélice et le binder opposé de

l'hélice parallèle suivante (figure 3.19.b). Ces quatre points forment un losange. Les mesures ont été faites sur 1 000 losanges, les mesures sont regroupées sur la figure 3.19.c. Les positions moyennes, relatives à un des binders pris comme référence, sont déterminées avec des gaussiennes (cercles de couleur). Le diamètre interne de l'hélice est alors estimé à $3,14 \text{ nm} \pm 0,9 \text{ nm}$ et l'espacement entre les centres de deux back binders de deux hélices différentes à $2,77 \text{ nm} \pm 0,96 \text{ nm}$. La distance mesurée entre deux binders présents sur le même côté de l'hélice est de $6,36 \text{ nm} \pm 1,19 \text{ nm}$. Cette mesure est cohérente avec les 6 nm mesurés en TEM à coloration négative et avec le pas de l'hélice trouvé en SAXS de 5,8 nm.

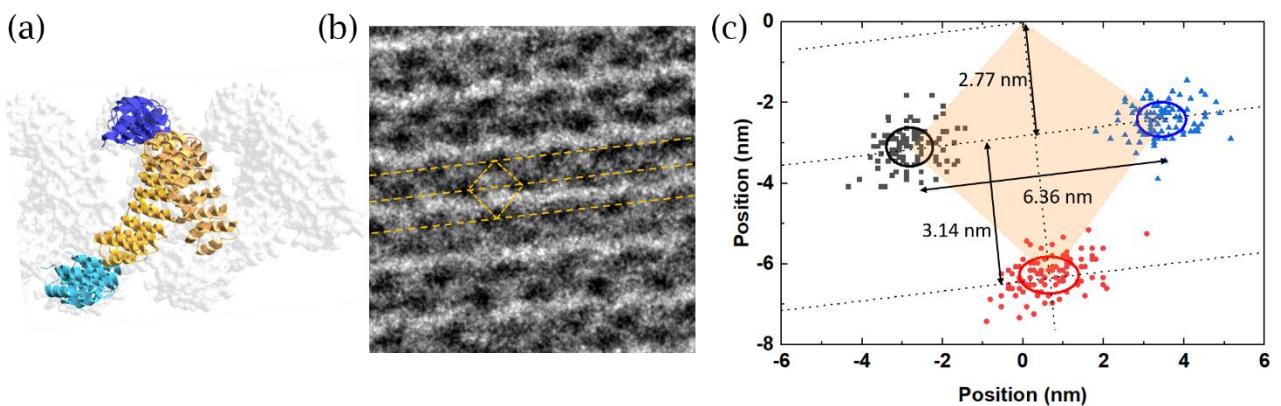


Figure 3.19 : (a) Modèle de la superhélice avec les back binders. (b) Image TEM zoomée, les traits pointillés indiquent les lignes de binders et le losange indique la distance entre trois binders adjacents de la même hélice et du binder le plus proche de la prochaine hélice.

III.2.4 - Comparaison entre cryoTEM et SAXS

Il est délicat d'enregistrer des clichés de diffraction électronique sur des objets fragiles comme les superstructures de protéines, nous avons donc réalisé des transformées de Fourier (FFT) sur certaines images cryoTEM qui présentaient des orientations particulières. Notons que certains des motifs très réguliers, sont des moirés difficiles à interpréter à priori. Des clichés de FFT sont présentés à côté de leur image TEM figure 3.20, pour trois motifs dont deux sont extraits de la même image (figure 3.20.g). L'une est un moiré (figure 3.20.c) et l'autre une orientation cristallographique interprétée plus loin dans ce paragraphe.

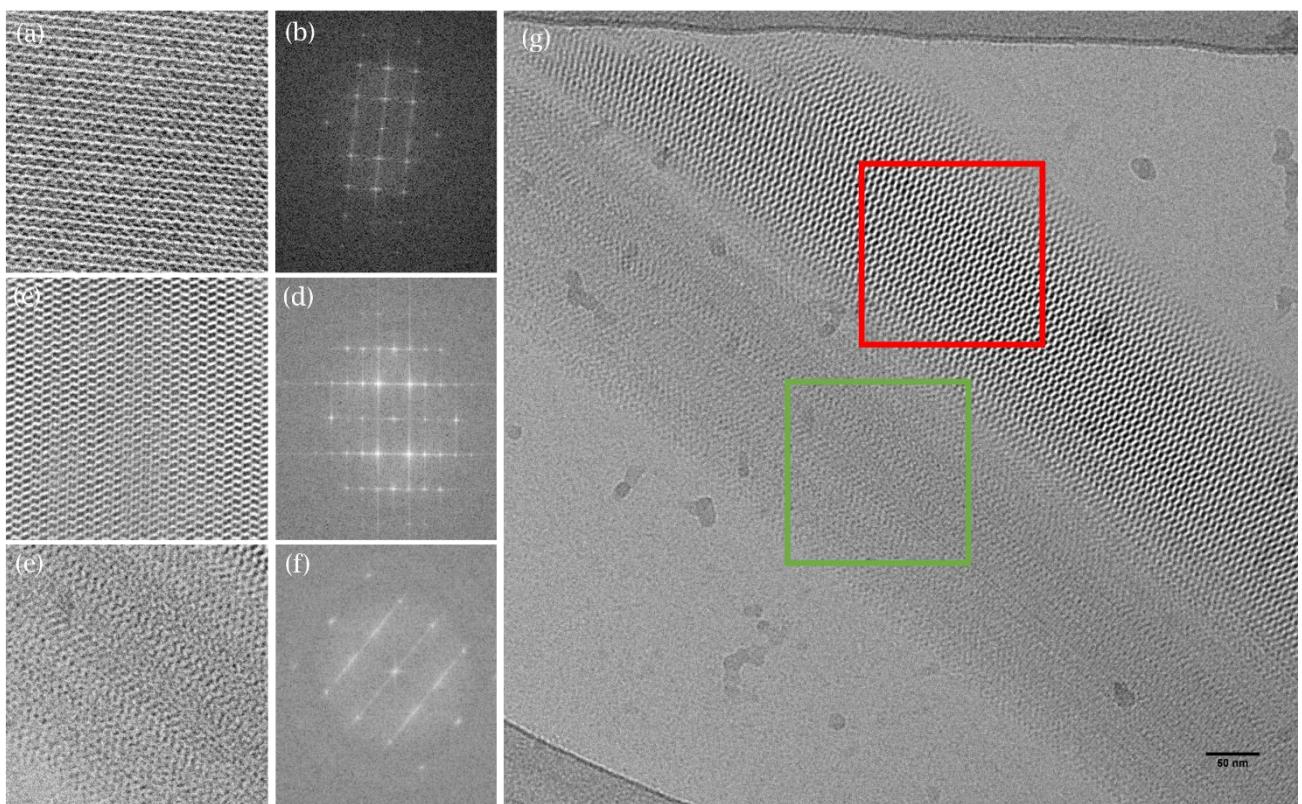


Figure 3.20 : Images cryoTEM des assemblages de protéines en formes de : (a) ondulations, (c) chevrons et (e) une autre orientation des hélices. Les images (c) et (e) sont des zoom issues de l'images, indiqués en rouge et vert respectivement. (b), (d) et (f) FFT des images (a), (c) et (e) respectivement.

Nous avons mesuré 236 distances, à partir du point central, présentes sur les 30 FFT des images et nous les avons regroupées dans un histogramme, afin de le comparer au spectre obtenu en SAXS. La figure 3.21.a montre l'histogramme obtenu avec les mesures des distances des FFT. La partie avec les petits d_{hkl} (< 10 nm) de l'histogramme, correspondant aux distances mesurées pour le spectre SAXS, est présentée figure 3.21.b. La superposition avec le spectre SAXS montre que certains pics semblent correspondre avec dans le meilleur des cas une légère dilatation du paramètre de la distance, comme le pic (001) très intense dans les deux cas. D'autres pics sont eux absents des mesures effectuées sur les images TEM, ce qui peut être expliqué par une orientation privilégiée des structures sur la membrane. La présence de certains pics absents du spectre SAXS peut être expliquée par une modification de l'agencement qui peut supprimer des extinctions.

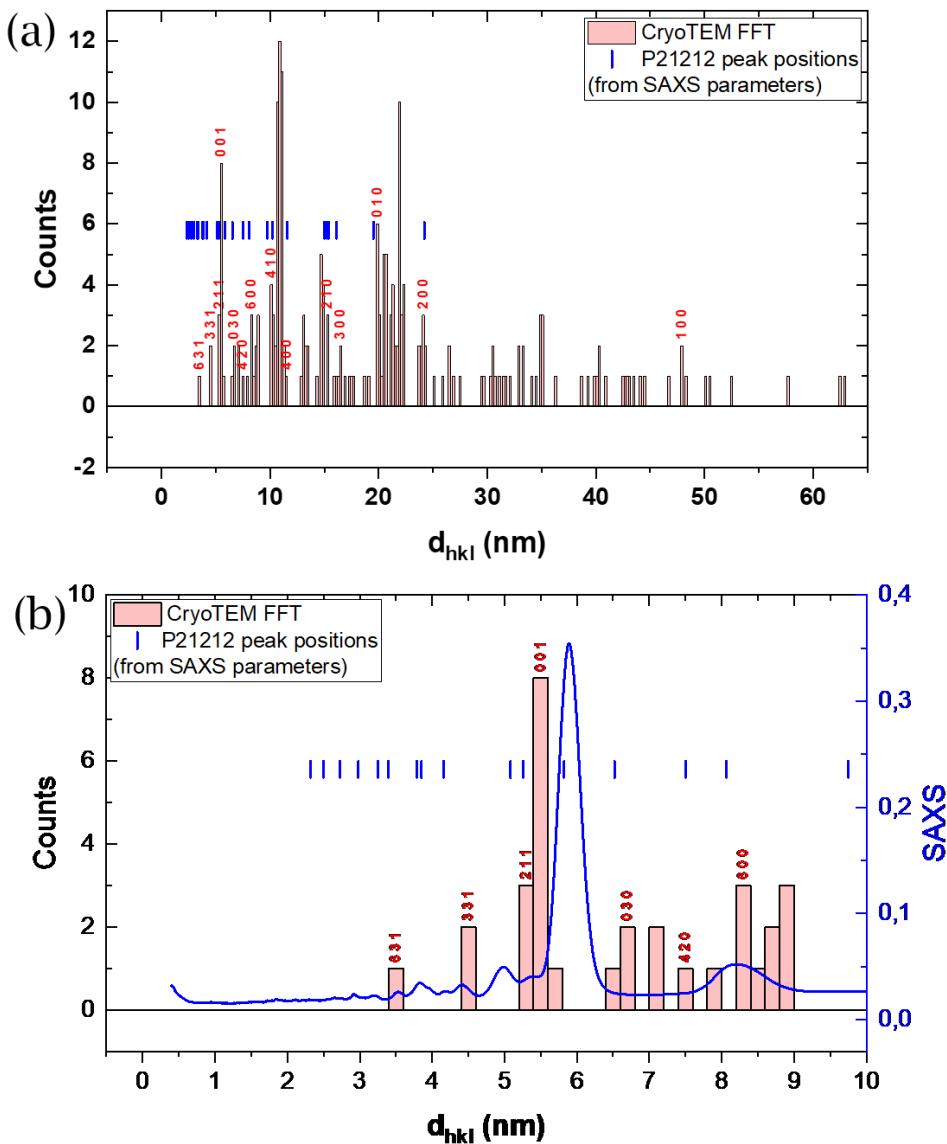


Figure 3.21 : (a) Histogramme regroupant les distances mesurées sur les FFT des images cryoTEM. (b) Superposition au petit d_{hkl} du spectre SAXS (en bleu) et de l'histogramme des distances mesurées sur les FFT des images cryoTEM (en rouge).

Nous avons ensuite essayé d'associer des directions cristallographiques aux images cryoTEM précédentes à partir de leur FFT. Jusqu'à maintenant, les directions présentées figures 3.20.a et 3.20.e sont les seules que nous ayons réussi à indexer, les autres directions sont toujours en cours d'indexation. La figure 3.22.a montre les points de la FFT 3.20.b qui ont été indexés en respectant les règles d'extinction du groupe de symétrie, à savoir : pour $h00$, h doit être pair ; pour $0k0$, k doit être pair et pour $hk0$, $h+k$ doit être pair. Le diagramme de diffraction simulé selon la direction {100} avec le logiciel Carine et les paramètres de maille obtenus par SAXS (figure 3.22.b), nous a ensuite permis d'indexer tous les points de la FFT sur la figure 3.20.c.

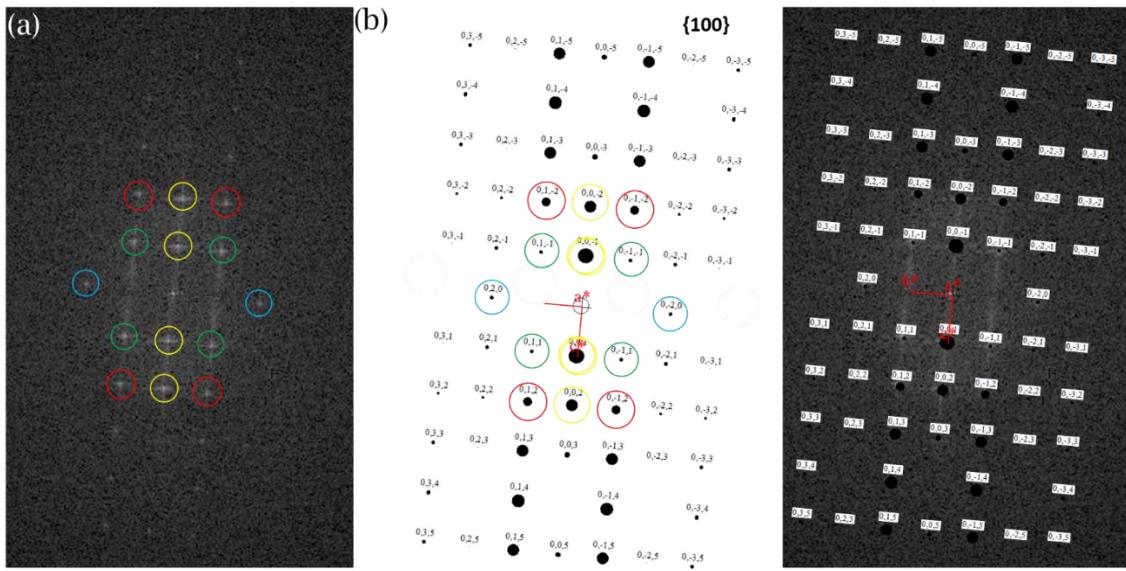


Figure 3.22 : (a) FFT de l'image de la figure 3.20.a. Les cercles de couleurs correspondent aux pics d'intensité identifiés par rapport au diagramme de diffraction simulé avec Carine avec les paramètres du SAXS selon la direction {100} en (b). (c) Recouvrement de (a) et (b).

Les mesures des principales distances ainsi indexées sont $d(001) = 6,23 \text{ nm}$, $d(011) = 4,61 \text{ nm}$ et $d(020) = 3,39 \text{ nm}$. En les comparant avec les distances simulées à partir des mesures SAXS ($d(001) = 5,82 \text{ nm}$, $d(011) = 4,37 \text{ nm}$ et $d(020) = 3,35 \text{ nm}$), nous observons une dilatation de la maille de 7 %, 6 % et 5 % respectivement pour les mesures effectuées sur les images cryoTEM. Nous pensons que la congélation de l'échantillon peut être à l'origine de cette légère dilatation de la structure.

De même, la FFT figure 3.20.f a pu être indexée comme étant la direction {101}. La simulation de cet axe de zone, avec Carine, correspond parfaitement au motif expérimental (figure 3.23).

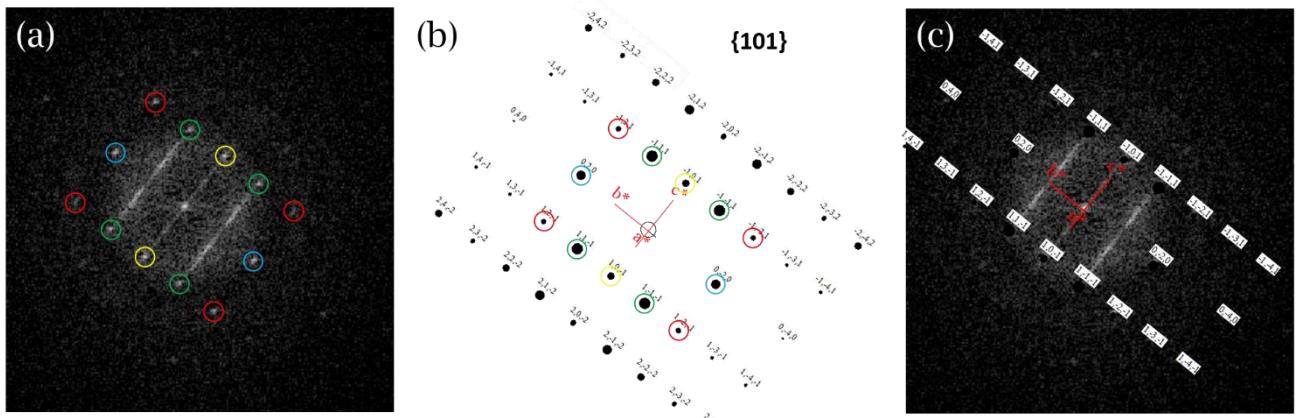


Figure 3.23 : (a) FFT de l'image de la figure 3.20.e. Les cercles de couleurs correspondent aux pics d'intensité identifiés par rapport au diagramme de diffraction simulé avec Carine avec les paramètres du SAXS selon la direction {101} en (b). (c) Recouvrement de (a) et (b).

Avec cette indexation, nous pouvons comparer deux directions par rapport aux données simulées avec les paramètres SAXS. Les positions et les distances des

points de diffraction calculées sont en très bonne adéquation et permettent de couvrir les spots lumineux des FFT tirées des images expérimentales. Bien que nous souhaiterions trouver un autre axe de zone pour pouvoir comparer les distances dans les trois directions de l'espace, nous savons que les objets filiformes ont tendances à se déposer selon des directions privilégiées sur les substrats TEM, ce qui pourrait nous empêcher de trouver des information selon la dernière direction. Cependant, nous pouvons d'ores et déjà affirmer que nous voyons les mêmes cristaux en SAXS et en cryoTEM.

III.2.5 - Cryotomographie électronique

Afin de visualiser l'agencement tridimensionnel des superstructures, nous avons essayé l'imagerie cryotomographique sur des échantillons. Les mesures ont été effectuées pour des angles allant de -30° à $+30^\circ$. La figure 3.24 montre 5 images à différents angles de tilts. On retrouve le même agencement 3D en fagot parallèle que dans les images cryoTEM et certaines orientations, ainsi que des moirés aperçus au paragraphe précédent. Cependant, la résolution et l'amplitude, bien que bonnes, ne sont peut-être pas suffisantes pour modéliser l'ensemble, notamment la position relative des agrafes. Une modélisation longue est toujours en cours.

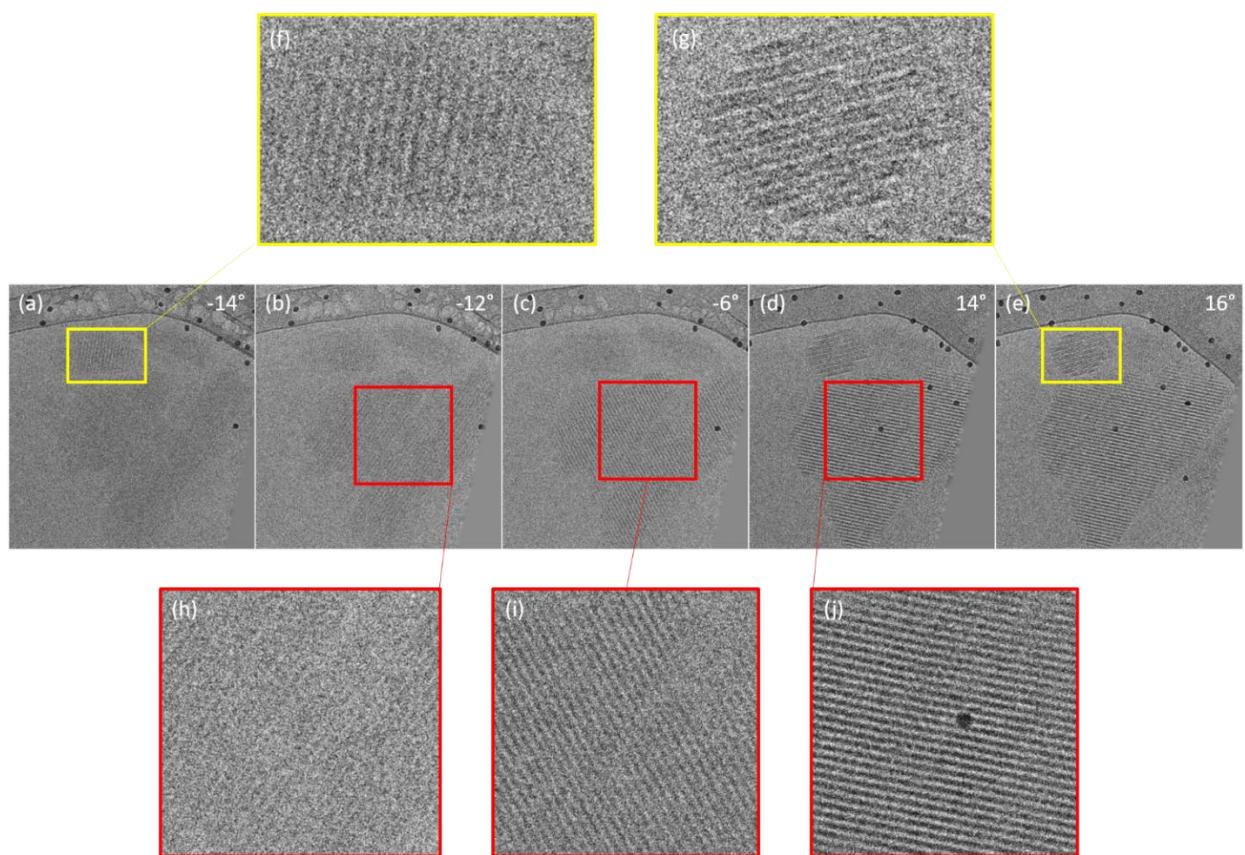


Figure 3.24 : Images cryoTEM obtenues à partir d'une vidéo de crytomographie pour cinq tilts : (a) -14° , (b) -10° , (c) -6° , (d) 14° et (e) 16° . (f) et (g) respectivement zoom des rectangles jaunes sur les images (a) et (e). (h), (i) et (j) respectivement zoom des rectangles rouges sur les images (b), (c) et (d).

III.2.6 - Élaboration d'un modèle

L'élaboration du modèle s'est faite en plusieurs étapes. Nous avons tout d'abord créé le modèle du tube avec les back binder à partir du fichier de simulation pdb créé par les biologistes d'Orsay (un modèle pdb est utilisé figure 3.8 et 3.25). Ce modèle, contenant tous les acides aminés des protéines, a été fait à partir des données cristallographiques des protéines Imp53 et bBE3 séparées et en paire, mais pas assemblées en tubes. À partir de ce modèle, nous avons créé des hélices plus simples qui correspondent à la partie dure du système qui ne pourra pas être pénétré par une autre hélice. Ce dernier modèle est représenté figure 3.25 recouvrant le modèle pdb.

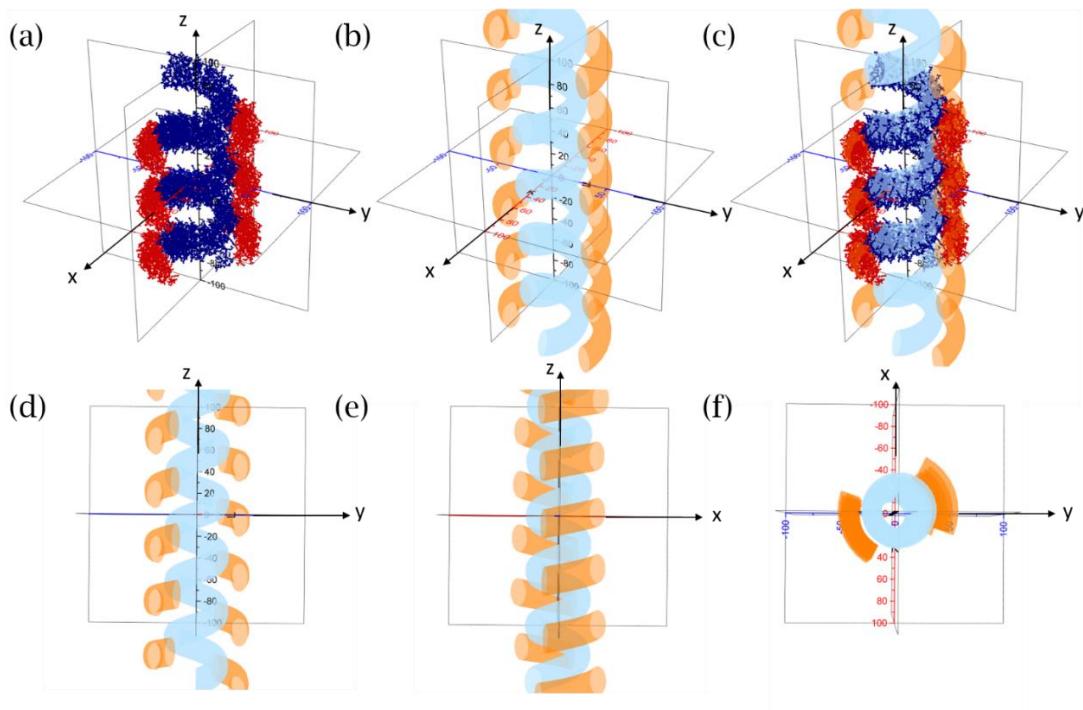


Figure 3.25 : (a) Vue du modèle pdb ayant servi de support à la création de l'hélice (b). (c) superposition de (a) et (b). (d-f) Vues du modèle de l'hélice selon 3 directions : (d) vue orthogonal au plan des binders, (e) vue selon le plan des binders et (f) vue de dessus.

À partir des données SAXS et cryoTEM, nous avons ensuite agencé les hélices de manière à respecter les paramètres de la maille élémentaire obtenue en SAXS et les axes de symétrie du groupe $P2_12_12$, tout en optimisant l'interdigitation entre les squelettes des hélices. On notera que l'espace entre les tours d'hélice est de charge opposée au binders, comme le montre le modèle pdb électrostatique figure 3.26.

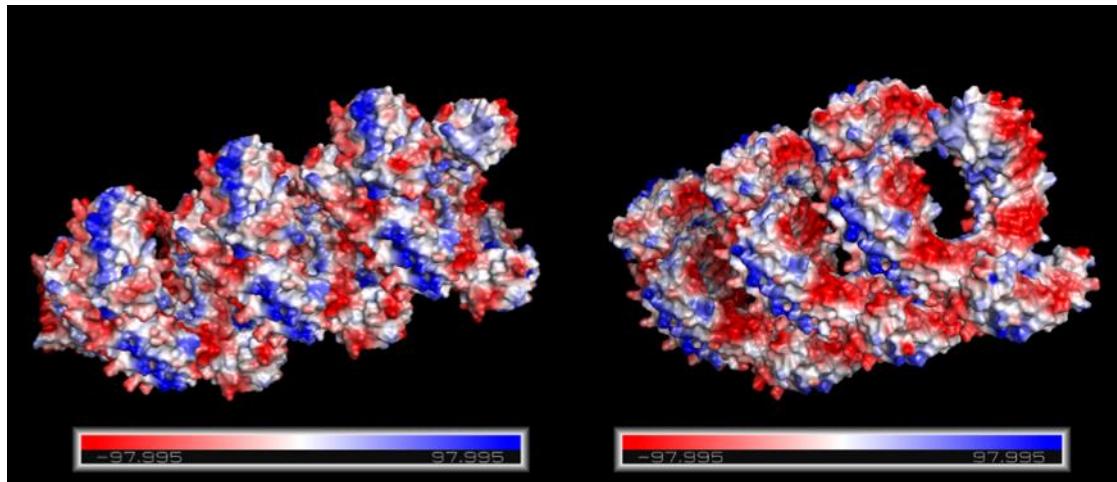


Figure 3.26 : Modèle pdb électrostatique des superhélices.

Le dernier modèle que nous avons réalisé est présenté figure 3.27, selon plusieurs orientations. L'orientation relative des binders entre eux est encore inconnue. Le modèle en figure 3.27 montre une orientation arbitraire, nous paraissant à ce stade comme étant l'une des plus fidèles aux mesures.

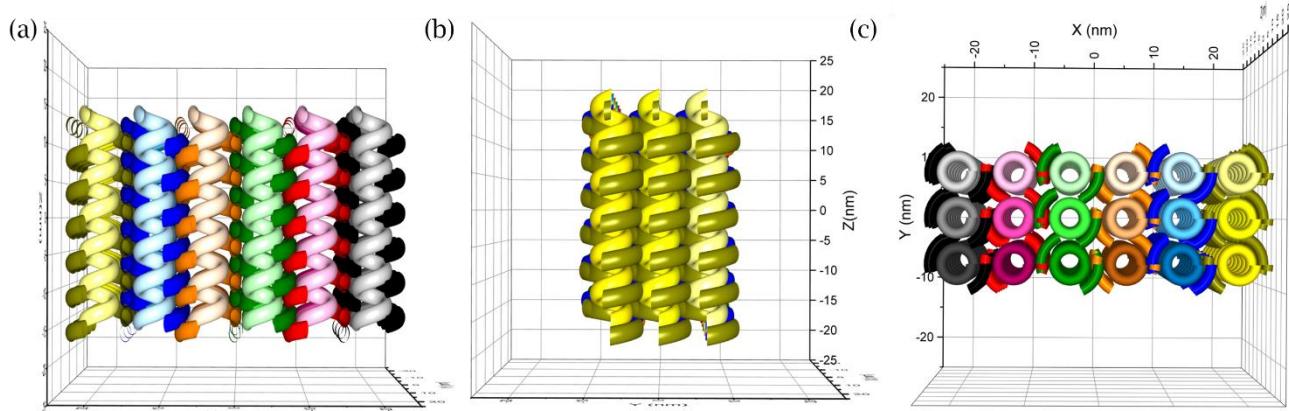


Figure 3.27 : Vues du modèle des cristaux selon 3 directions : (a) vue orthogonal au plan des binders, (b) vue selon le plan des binders et (c) vue de dessus.

III.3 - Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré la versatilité des protéines α -Rep en tant que plateforme pour la morphosynthèse et la fonctionnalisation de surface. La morphosynthèse engendre des particules dont les faces cristallographiques sont orientées (111) et dont la chimie de surface est grandement facilitée par l'existence de la protéine en surface après synthèse. Les particules alors réalisées montrent une sensibilité importante (300 nm/RIU) et peuvent être utilisées pour la biodétection spécifique comme le démontre notre travail avec le couple biotine-streptavidine.

D'une autre part, la même famille de protéines a été utilisée afin de former un template hélicoïdal par une méthode inspirée des origamis d'ADN. Une première protéine α -Rep peut être utilisée pour la reconnaissance du dos d'une seconde protéine de la même famille, mais plus longue. La forme de l'assemblage en résultant ayant été conçue pour obtenir une forme superhélicoïdale. Nous avons réalisé et caractérisé ces assemblages dont l'interaction est tellement forte que les tubes hélicoïdaux s'assemblent entre eux sous forme de cristaux orthorhombiques stables jusqu'à 50°C. Des tubes isolés sont cependant observés en TEM avec une coloration négative au MB. Ce qui laisse supposer que les charges électrostatiques engendrant la formation de cristaux peuvent être écrantées en modifiant soit le pH soit la force ionique de la solution. Après discussion avec nos collègues d'Orsay sur ce point, nous pensons que la brique et le back binder peuvent être modifiés afin de minimiser les interactions attractives inter-origamis et stabiliser les superhélices isolées.

Références

1. J. Prasad, S. Viollet, K. L. Gurunatha, A. Urvoas, A. C. Fournier, M. Valerio-Lepiniec, C. Marcelot, B. Baris, P. Minard, and E. Dujardin, "Directed evolution of artificial repeat proteins as habit modifiers for the morphosynthesis of (111)-terminated gold nanocrystals," *Nanoscale* **11**, 17485–17497 (2019).
2. H. Chen, X. Kou, Z. Yang, W. Ni, and J. Wang, "Shape- and Size-Dependent Refractive Index Sensitivity of Gold Nanoparticles," *Langmuir* **24**, 5233–5237 (2008).
3. J. Prasad, I. Zins, R. Branscheid, J. Becker, A. H. R. Koch, G. Fytas, U. Kolb, and C. Sönnichsen, "Plasmonic Core-Satellite Assemblies as Highly Sensitive Refractive Index Sensors," *J. Phys. Chem. C* **119**, 5577–5582 (2015).
4. H. B. Jeon, P. V. Tsalu, and J. W. Ha, "Shape Effect on the Refractive Index Sensitivity at Localized Surface Plasmon Resonance Inflection Points of Single Gold Nanocubes with Vertices," *Sci. Rep.* **9**, 13635 (2019).
5. R. Ahijado-Guzmán, J. Prasad, C. Rosman, A. Henkel, L. Tome, D. Schneider, G. Rivas, and C. Sönnichsen, "Plasmonic Nanosensors for Simultaneous Quantification of Multiple Protein-Protein Binding Affinities," *Nano Lett.* **14**, 5528–5532 (2014).
6. G. K. Joshi, P. J. McClory, S. Dolai, and R. Sardar, "Improved localized surface plasmon resonance biosensing sensitivity based on chemically-synthesized gold nanoprisms as plasmonic transducers," *J Mater Chem* **22**, 923–931 (2012).
7. L. J. Sherry, R. Jin, C. A. Mirkin, G. C. Schatz, and R. P. Van Duyne, "Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Single Silver Triangular Nanoprisms," *Nano Lett.* **6**, 2060–2065 (2006).
8. F. Ma, M. Ren, and C. Zhang, "Advances in single-particle detection for DNA sensing," *Sci. China Chem.* **60**, 1285–1292 (2017).
9. J. E. Millstone, S. J. Hurst, G. S. Métraux, J. I. Cutler, and C. A. Mirkin, "Colloidal Gold and Silver Triangular Nanoprisms," *Small* **5**, 646–664 (2009).
10. M. G. Blaber, A.-I. Henry, J. M. Bingham, G. C. Schatz, and R. P. Van Duyne, "LSPR Imaging of Silver Triangular Nanoprisms: Correlating Scattering with Structure Using Electrodynamics for Plasmon Lifetime Analysis," *J. Phys. Chem. C* **116**, 393–403 (2012).
11. A. J. Haes and R. P. Van Duyne, "A unified view of propagating and localized surface plasmon resonance biosensors," *Anal. Bioanal. Chem.* **379**, 920–930 (2004).
12. M. Fernandez, A. Urvoas, P. Even-Hernandez, A. Burel, C. Mériadec, F. Artzner, T. Bouceba, P. Minard, E. Dujardin, and V. Marchi, "Hybrid gold nanoparticle-quantum dot self-assembled nanostructures driven by complementary artificial proteins," *Nanoscale* **12**, 4612–4621 (2020).
13. J. de Torres, P. Ferrand, G. Colas des Francs, and J. Wenger, "Coupling Emitters and Silver Nanowires to Achieve Long-Range Plasmon-Mediated Fluorescence Energy Transfer," *ACS Nano* **10**, 3968–3976 (2016).
14. X. Zhou, J. Wenger, F. N. Visconti, L. Le Cunff, J. Béal, S. Kochtcheev, X. Yang, G. P. Wiederrecht, G. Colas des Francs, A. S. Bisht, S. Jradi, R. Caputo, H. V. Demir, R. D. Schaller, J. Plain, A. Vial, X. W. Sun, and R. Bachelot, "Two-Color Single Hybrid Plasmonic Nanoemitters with Real Time Switchable Dominant Emission Wavelength," *Nano Lett.* **15**, 7458–7466 (2015).
15. R. Di Felice, A. Selloni, and E. Molinari, "DFT Study of Cysteine Adsorption on Au(111)," *J. Phys. Chem. B* **107**, 1151–1156 (2003).
16. A. Mocanu, I. Cernica, G. Tomoaia, L.-D. Bobos, O. Horovitz, and M. Tomoaia-Cotisel, "Self-assembly characteristics of gold nanoparticles in the presence of cysteine," *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **338**, 93–101 (2009).
17. A. Teulle, M. Bosman, C. Girard, K. L. Gurunatha, M. Li, S. Mann, and E. Dujardin, "Multimodal plasmonics in fused colloidal networks," *Nat. Mater.* **14**, 87–94 (2014).

18. F. A. Fellouse, C. Wiesmann, and S. S. Sidhu, "Synthetic antibodies from a four-amino-acid code: A dominant role for tyrosine in antigen recognition," Proc. Natl. Acad. Sci. **101**, 12467-12472 (2004).
19. M. Shiroishi, K. Tsumoto, Y. Tanaka, A. Yokota, T. Nakanishi, H. Kondo, and I. Kumagai, "Structural Consequences of Mutations in Interfacial Tyr Residues of a Protein Antigen-Antibody Complex: THE CASE OF HyHEL-10-HEL," J. Biol. Chem. **282**, 6783-6791 (2007).
20. S. Koide and S. S. Sidhu, "The Importance of Being Tyrosine: Lessons in Molecular Recognition from Minimalist Synthetic Binding Proteins," ACS Chem. Biol. **4**, 325-334 (2009).
21. Doucet, Mathieu, Cho, Jae Hie, Alina, Gervaise, Attala, Ziggy, Bakker, Jurrian, Bouwman, Wim, Butler, Paul, Campbell, Kieran, Cooper-Benun, Torin, Durniak, Celine, Forster, Laura, Gonzales, Miguel, Heenan, Richard, Jackson, Andrew, King, Stephen, Kienzle, Paul, Krzywon, Jeff, Nielsen, Torben, O'Driscoll, Lewis, Potrzebowski, Wojciech, Prescott, Stewart, Ferraz Leal, Ricardo, Rozycko, Piotr, Snow, Tim, and Washington, Adam, *SasView Version 5.0.3* (Zenodo, 2020).

Chapitre 4

Physico-chimie d'agrégats d'or et de centres colorés NV comme émetteurs hyperspectraux

I - Synthèse et caractérisation des clusters d'or rouges, verts et bleus

Parmi les émetteurs fluorescents aux propriétés adéquates pour la construction d'assemblages hybrides, les nanoclusters d'or (AuNC) ont retenu notre intérêt. En effet, ces derniers ne montrent pas de photoblanchiment, ni de photocliquotement, leur émission peut en principe couvrir tout le spectre du visible en fonction de leur synthèse. Leur petite taille (< 3 nm) est particulièrement adaptée pour sonder avec une grande résolution spatial, les modulations de densité d'états plasmoniques. [1]

Les protocoles de synthèse utilisés actuellement produisent presque systématiquement des AuNC émettant dans le rouge. [2,3] Il existe très peu d'études sur les émetteurs bleus et verts. [4-6] Il est important de noter que les AuNCs souffrent généralement de rendements quantiques (QY) inférieurs à ceux des molécules fluorescentes, en particulier les AuNCs émettant du vert, dont le QY atteint à peine 5%. [4,5,7] Parmi les différentes approches développées pour surmonter cette limitation, [8] la plus efficace consiste à modifier le ligand à la surface des agrégats d'or. Par exemple, une protection par une matrice de dendrimères PAMAM [9,10] ou encore par une enveloppe de ligands rigidifiée avec des cations tétraoctylammonium (TOA) autour d'amas d' Au_{10} -thiolate [6,8,11] ont été signalés.

Dans ce chapitre, nous présentons la synthèse de AuNCs stables comprenant entre 5 et 22 atomes d'or et émettant dans le visible. Nous exposons une caractérisation structurelle et photophysique détaillée des différents AuNCs. La stabilisation des AuNC dans l'eau en fonctionnant leur surface avec des ligands cationiques ou anioniques est également étudiée. Les clusters d'or ont notamment été stabilisés avec un ligand biotinylé, adapté à l'auto-assemblage par affinité spécifique pour la streptavidine.

I.1 - Synthèse de clusters Au_n ($5 \leq n \leq 22$) fonctionnalisés

I.1.1 - Découverte de clusters fluorescents

La découverte fortuite de cette méthode de synthèse a commencé par une optimisation de la synthèse de microplaquettes d'or par réduction de HAu_(aq)Cl₄ dans l'éthylène glycol (EG) développée par Z. Guo, [12] afin d'augmenter la taille latérale des plaquettes. Le protocole de cette synthèse modifiée est décrit dans le chapitre 2 et consiste à diminuer la concentration de réducteur (aniline) de 100 à 55 mM et le pH de 5 à 3.

Pendant nos tests, nous sommes descendus jusqu'à une concentration d'aniline de 25 mM avec un pH à 3. Dans ces conditions, nous obtenons une solution transparente, légèrement orangée mais aucune particule n'était visible, même après centrifugation. Pensant à la possible formation de petits clusters d'or, nous avons donc vérifié la fluorescence de l'échantillon. Le spectre de fluorescence obtenu est présenté figure 4.1 et une fluorescence couvrant tout le domaine du visible selon la longueur d'onde d'excitation choisie.

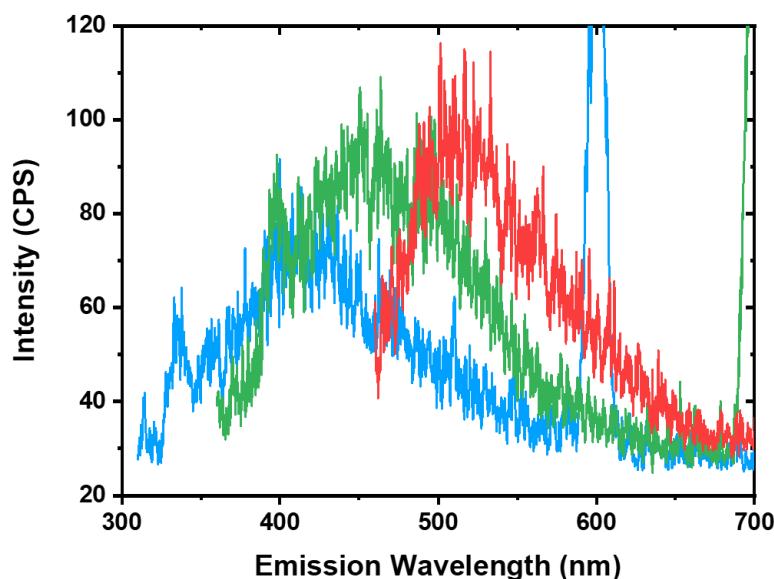


Figure 4.1 : Spectres de fluorescence de la solution orangée observée (après la diminution de la concentration du réducteur à 25 mM et du pH à 3, obtenus) pour des excitations à $\lambda_{ex1} = 300$ nm (en bleu), $\lambda_{ex2} = 350$ nm (en vert) et $\lambda_{ex3} = 410$ nm (en rouge). Les pics fins à 600 nm et 700 nm sont les harmoniques des longueurs d'onde d'excitation λ_{ex1} et λ_{ex2} .

I.1.2 - Protocole de synthèse

Après plusieurs essais en modifiant les concentrations d'EG, de HAu_(III)Cl₄ et d'aniline, nous sommes parvenus au protocole final suivant :

- 0,18 mL d'une solution de HAu^(III)Cl₄.3H₂O à 10 mM sont mélangés à 1,82 mL d'éthylène glycol (EG) à 55 °C avec un agitateur à Eppendorf pendant 20 minutes.
- 5 µL d'aniline, à 0,1 M dans de l'EG, sont ajoutés à la solution précédente qui est maintenue sous agitation pendant 5 minutes supplémentaires avant d'être laissée au repos pour 24 heures dans un four à 55 °C.
- Une centrifugation de 5 minutes à 14 500 rpm (14 100 g) permet d'enlever les plus grosses particules pouvant se former.

Une variante de cette synthèse consiste à remplacer l'aniline par l'indole, dans les mêmes conditions de volumes et de concentrations. Deux mécanismes différents sont à l'origine de la réduction de l'or. Dans le premier cas, il semblerait que le pouvoir redox de l'aniline soit suffisant pour réduire les sels d'or. [13] Dans le cas de l'indole en revanche, ce potentiel n'est pas suffisamment élevé. Selon la littérature, l'utilisation d'acides aminés simples (His, Trp, Pro et Tyr)) entraîne la formation de AuNC fluorescents suite à la coordination primaire des Au(III) avec ces acides aminés qui se fait par l'intermédiaire des atomes de groupes aromatiques (cas de l'imidazole, l'indole ou le benzène). [14] Pour des raisons pratiques, les clusters synthétisés par réduction avec de l'aniline seront appelés AuNC_a dans la suite de ce chapitre et ceux par réduction avec de l'indole AuNC_i.

Dans les deux cas, on obtient une solution transparente orangé d'AuNC. On estime la concentration finale de ces deux solutions, à partir de la concentration de HAu^(III)Cl₄ initial et pour des particules de 2 nm, à environ 20 µM.

Les molécules d'indole et d'aniline étant très courtes, nous pensons qu'en l'absence d'autre agent de stabilisation, l'excès d'EG assure la stabilité des AuNCs, notamment du fait de sa viscosité, et empêche les agrégations en particules non fluorescentes plus grosses. La figure 4.2 montre les spectres d'absorption UV-vis et de fluorescence des deux types de synthèse.

Les spectres d'absorption coïncident avec le spectre d'absorption typique de Au₂₅ reporté dans la littérature et présenté dans le chapitre 1. [1] Une décroissance de l'intensité avec la longueur d'onde est observé avec la présence de plusieurs épaulements qui sont dus aux transitions interbandes. Nos spectres d'absorption (figure 4.2.a-b), semblent présenter trois épaulements à 350 nm, 410 nm et 510 nm. Les spectres de fluorescence des clusters AuNC_a (figure 4.2.c), réalisés aux longueurs d'onde d'excitation correspondant aux épaulements du spectre d'absorption, montrent trois principales longueurs d'onde d'émission bleu (à 450 nm), verte (à 510 nm) et

rouge (625 nm), alors que les clusters AuNC_i (figure 4.2.d) montrent une fluorescence bleue-violette (à 410 nm) uniquement.

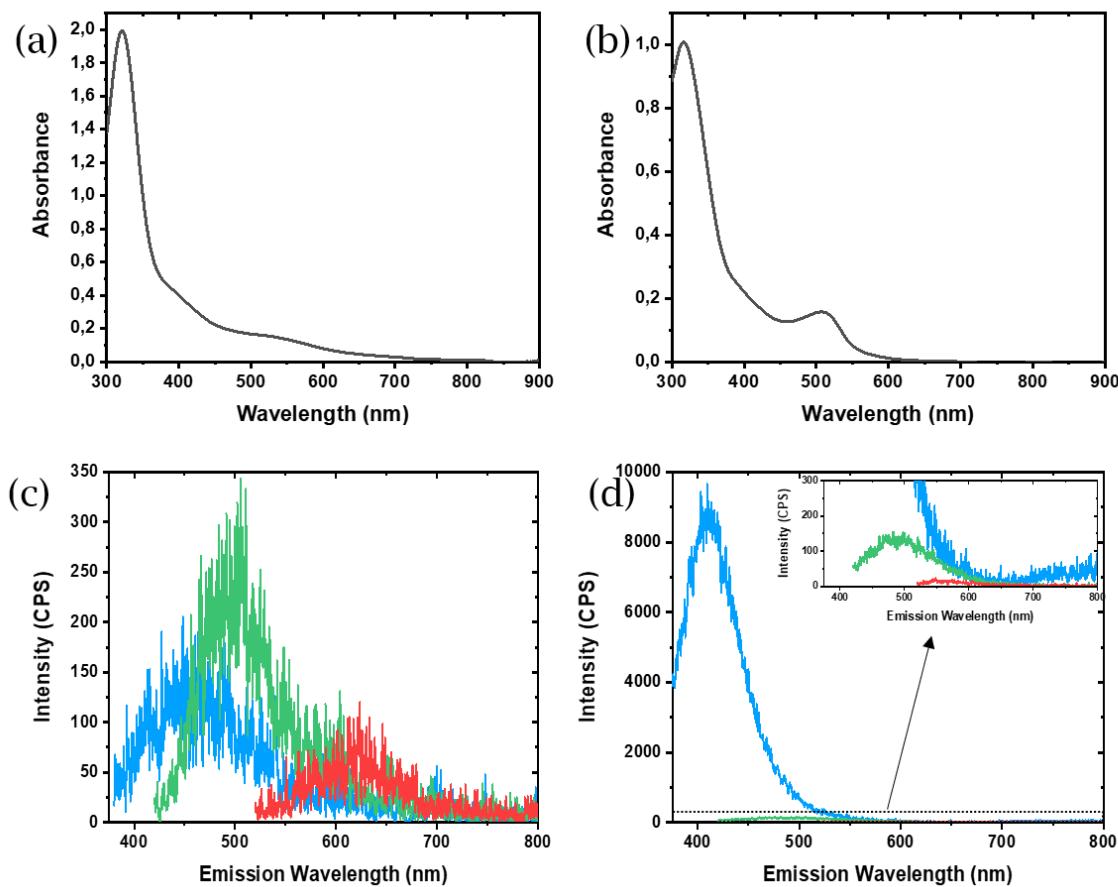


Figure 4.2 : Spectres d'absorption UV-vis des solutions de clusters (a) AuNC_a et (b) AuNC_i. Spectres de fluorescences des solutions de clusters (c) AuNC_a et (d) AuNC_i. Les longueurs d'ondes d'excitation des spectres de fluorescence sont $\lambda_{ex1} = 350$ nm (en bleu), $\lambda_{ex2} = 410$ nm (en vert) et $\lambda_{ex3} = 510$ nm (en rouge) pour (c) et $\lambda_{ex1} = 350$ nm (en bleu), $\lambda_{ex2} = 410$ nm (en vert) et $\lambda_{ex3} = 510$ nm (en rouge) pour (d). Un zoom en intensité est réalisé sur les courbes rouge et verte en encart de la figure (d).

I.1.3 - Expérience de contrôle

Des expériences de contrôle démontrent que la fluorescence n'est observée que lorsque des AuNC sont présents et ne peut être attribuée à l'aniline, à l'indole, à l'EG seuls ni aux autres réactifs de la synthèse (figure 4.3).

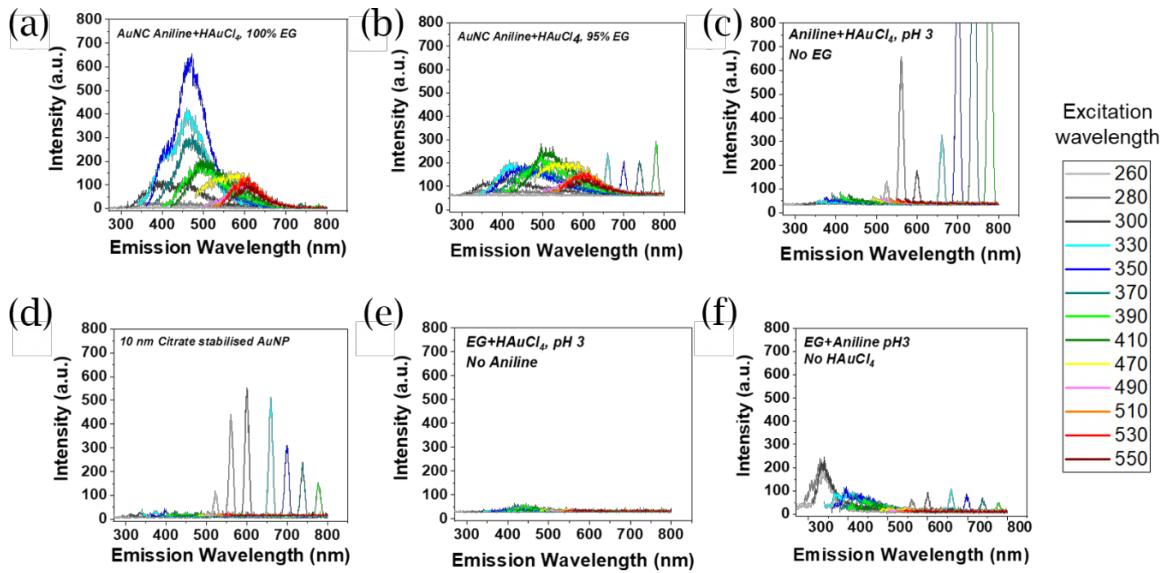


Figure 4.3 : Spectres de fluorescence de (a) les AuNCs après synthèse obtenue par le protocole standard de l'aniline, (b) une solution produite dans 95 % EG, (c) une solution produite en l'absence d'EG, (d) Spectres de fluorescence d'une solution de 10 nm d'AuNP stabilisés au citrate qui ne présentent qu'une diffusion harmonique d'excitation. (e,f) Spectres de fluorescence des solutions de contrôle obtenues par le protocole de synthèse du I.1.1, mais sans ajout (e) d'aniline ou (f) de HAuCl4. Tous les panneaux suivent le même code couleur indiqué à droite pour les longueurs d'onde d'excitation.

La présence d'EG pur est cruciale dans la formation des AuNCs fluorescents. Une légère dilution d'EG avec de l'eau entraîne une réduction immédiate de la fluorescence du mélange, indépendamment de l'énergie d'excitation, jusqu'à ce qu'elle disparaisse complètement et que seules des nanoparticules d'or plasmoniques non fluorescentes plus grosses soient obtenues à la place des AuNC fluorescents (figure 4.3.a-c). Dans les expériences standard de spectroscopie de fluorescence, la présence de nanoparticules d'or plus grosses, est révélée par le pic de seconde harmonique de l'excitation, correspondant à la diffusion de la lumière d'excitation par la surface métallique. Ainsi, ces pics sont les seuls présents dans les spectres de fluorescence des nanoparticules d'or de 10 nm stabilisées au citrate (figure 4.3.d) et sont clairement observés dans les solutions à un ratio EG:H₂O de 95:5 (figure 4.3.b) ou en l'absence d'EG (figure 4.3.c), mais ne sont pas vus dans les spectres des échantillons à un ratio EG:H₂O de 100:0 (figure 4.3.a).

Afin de mettre en évidence la possible fluorescence parasite due aux autres réactifs utilisés dans notre protocole, nous avons donc mené plusieurs expériences de contrôle en suivant le même protocole décrit dans le paragraphe I.1.2 avec 100 % EG, mais en omettant un des composants. Lorsque l'aniline n'est pas ajoutée, aucun signal de fluorescence n'est obtenu (figure 4.3.e). En l'absence de précurseur d'or, un petit pic d'émission centré à 340 nm est enregistré, mais celui-ci est absent de tous les spectres de

fluorescence de l'AuNC (figure 4.3.f). L'origine de cette fluorescence n'a pas été identifiée mais diffère énormément de la fluorescence des clusters.

I.2 - Caractérisation morphologique et structurale

I.2.1 - Microscopies électronique (HRTEM) et à force atomique (AFM)

Les images HRTEM des AuNCs non thiolés ne montrent aucun signe d'agrégation, les clusters ont une forme homogène et une distribution de taille de forme lognormale avec une moyenne globale et un écart-type du diamètre du noyau d'or mesuré de $2,9 \pm 1,6$ nm et de $2,4 \pm 0,7$ nm pour les clusters AuNC_a et AuNC_i respectivement. Une image TEM large champs typique des clusters est présenté figures 4.4.a, accompagnés des histogrammes de taille des clusters AuNC_a et AuNC_i figure 4.4.c.

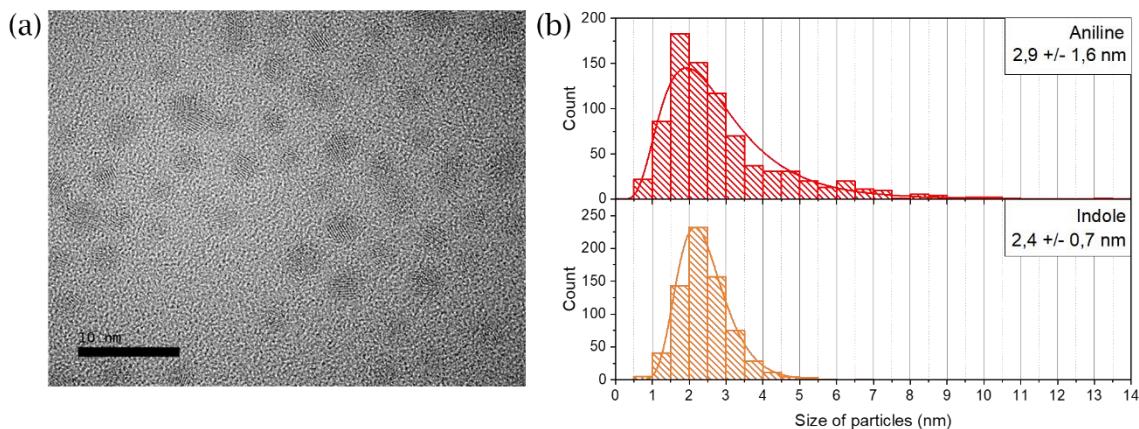


Figure 4.4 : (a) Image HRTEM typique des AuNC synthétisés. (b) Distributions de taille des AuNC_a (en rouge) avec une taille moyenne de $2,9 \pm 1,6$ nm et des AuNC_i (en orange) avec une taille moyenne de $2,4 \pm 0,7$ nm.

Nos mesures sous-estiment la population des plus petites particules qui ont un contraste TEM extrêmement faible. En examinant des zooms sur des particules, nous avons pu les ranger en différentes catégories en fonction de leur forme. Essentiellement, quatre structures différentes des AuNCs sont observées dans les échantillons AuNC_a et AuNC_i: composés de 5 mâcles (*pentatwin*), d'une mâcle simple (*single twin*), d'un monocristal isotrope, ou encore d'un monocristal oblong. Six images zoomées par catégorie sont présentées figure 4.5.

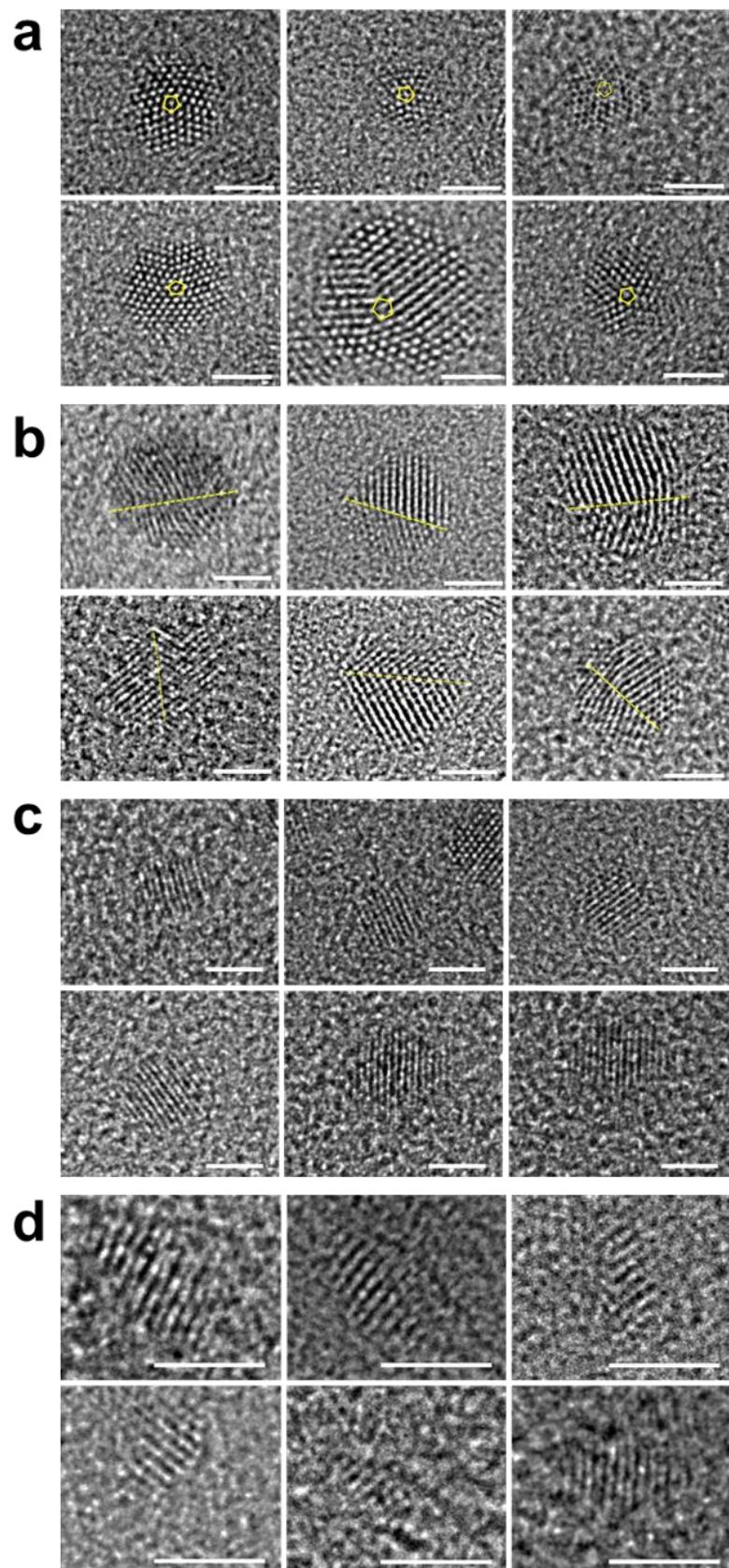


Figure 4.5 : Images HRTEM des clusters de formes (a) pentatwin, (b) single twin, (c) monocrystal isotropic, (d) monocrystal oblong. Les barres d'échelles font 2 nm.

Ces quatre formes (pentatwin, single twin, monocristal isotrope, monocristal oblong) ont des distributions de taille diminuant progressivement. Les histogrammes sont présentés en figure 4.6.a-d.

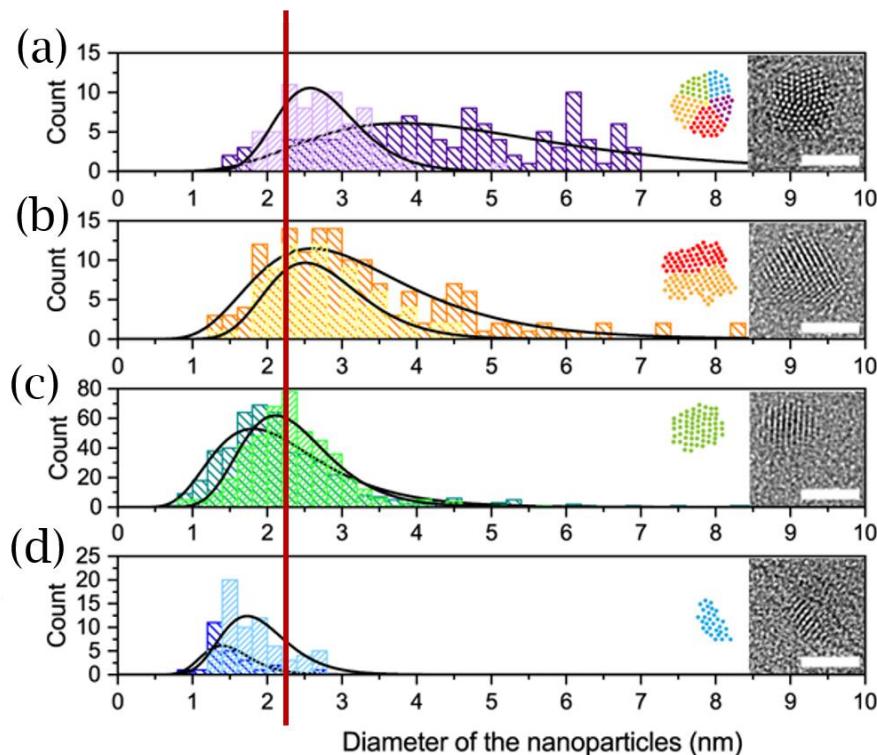


Figure 4.6 : (a-d) Histogrammes de taille des AuNC_i (couleurs claires) et AuNC_a (couleurs foncées) triés en classes de forme. Ces classes sont illustrées par les images HRTEM et les croquis colorés en insert à droite de chaque distribution : (a) pentatwin, (b) single twin, (c) monocristal isotrope, (d) monocristal oblong. Échelle de mesure 2 nm. Les lignes noires sont des ajustements lognormaux. La ligne rouge représente la démarcation entre les particules de plus de 2,2 nm et celle inférieure à cette taille.

Un paramètre de réseau de 0,235 nm a pu être observé pour toutes les formes, ce qui correspond à la famille de plans (111) d'un réseau cubique à faces centrées de cristaux d'or connu (0,23 nm). [7,15] Les AuNC les plus grands ($5,0 \pm 2,2$ nm pour les AuNC_a et $2,7 \pm 0,6$ nm pour les AuNC_i) sont composés de 5 mâcles (pentatwin), mais ne représentent que 14-16 % des particules mesurées. Les deuxièmes structures les plus grandes ($3,3 \pm 1,3$ nm pour les AuNC_a et $2,7 \pm 0,7$ nm pour les AuNC_i) sont composées de mâcles simples (single twin) et représentent 11 à 20 % de la population. Les deux plus petites sous-populations apparaissent monocristallines, mais présentent deux formes différentes. Les structures isotropes représentent 61-66 % des particules ($2,27 \pm 0,91$ nm pour les AuNC_a et $2,36 \pm 0,65$ nm pour les AuNC_i), alors que les AuNCs oblongs en représentent 3-9 %. Leur axe le plus long et le plus court sont respectivement de $1,51 \pm 0,35$ nm et $1,07 \pm 0,11$ nm pour les AuNC_a et de $1,90 \pm 0,47$ nm et $1,04 \pm 0,16$ nm pour AuNC_i . Nous pouvons ici séparer les particules en deux groupes : celles avec une taille moyenne

supérieure à 2,2 nm (figure 4.6.a-b) et celle inférieure à cette taille (figure 4.6.c-d). Dans la littérature, il est communément admis que cette taille est la charnière entre le comportement plasmonique et fluorescent des particules d'or. [16]

Afin d'obtenir une autre mesures de nos objets, nous les avons examinés par AFM. L'image AFM des AuNC, dispersés sur un substrat de mica fraîchement clivé est présentée sur la figure 4.7.a et est comparée à une image d'une surface de mica vierge sur la figure 4.7.d, qui est atomiquement plate. [17] Les profils et les histogrammes de hauteur des deux échantillons sont représentés sur les figures 4.7.b,e et 4.7.c,f respectivement.

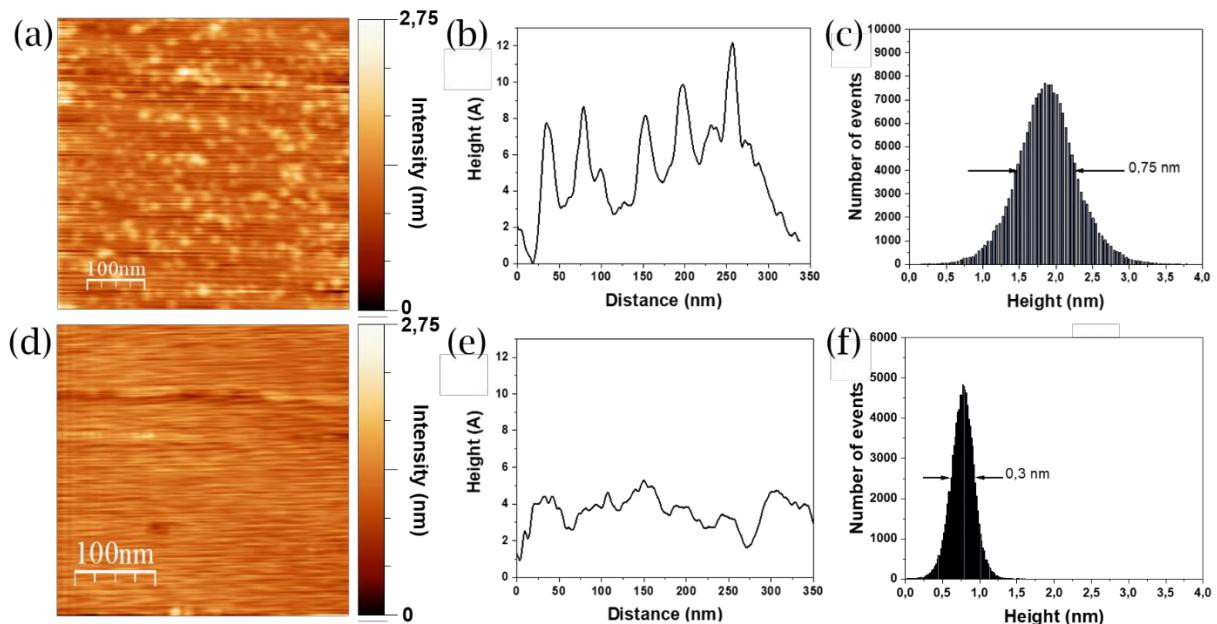


Figure 4.7 : Images de topographie AFM de (a) AuNC après centrifugation déposés sur mica et (d) une surface de mica seul. Les profils de hauteur des surfaces sont présentés en : (b) pour les AuNC sur mica et en (e) pour le mica seul. Les histogrammes de la hauteur des échantillons sont tracés en : (c) pour les AuNC sur mica et en (f) pour le mica seul avec une hauteur moyenne respective de $1,7 \text{ nm} \pm 0,7 \text{ nm}$ et de $0,7 \text{ nm} \pm 0,3 \text{ nm}$.

La présence évidente de points dispersés dont la taille latérale est d'environ 20 nm, limitée par la convolution de la pointe AFM, et de hauteur de quelques angström. Si l'on considère la hauteur mesurée par AFM comme la mesure de taille pertinente pour la taille apparente des AuNC, la hauteur moyenne de l'échantillon de $1,7 \text{ nm} \pm 0,7 \text{ nm}$, moins celle du mica de $0,7 \text{ nm} \pm 0,3 \text{ nm}$, nous donne une taille des AuNC comprise entre 0 et 2 nm. Cette taille est conforme aux images TEM et à l'histogramme de taille présentés figure 4.4 et peut être attribuée aux AuNC.

I.2.2 - Thiopégylation hydophile

Les techniques de caractérisation structurales précédentes, ne nous permettent pas de déterminer précisément la structure des plus petites particules ($< 2 \text{ nm}$), par manque de contraste pour le TEM et par manque de précision pour l'AFM à l'air libre. Nous avons décidé de nous tourner vers la spectroscopie de masse, cette technique permet de déterminer spécifiquement le nombre d'atomes constituant les clusters. Pour cela, nous avons dû stabiliser ces objets dans l'eau, afin de faciliter l'ionisation de la solution lors de l'étape d'électrospray. De plus, le passage en solution aqueuse facilite l'exploitation de nos clusters pour l'auto-assemblage hybrides avec nos prismes recouverts de streptavidine.

Pour la fonctionnalisation covalente de la surface, nous avons utilisé des ligands HS-PEGn-R (table 4.1). Des ligands courts ($n = 12$) avec des groupes terminaux amine ($R = (\text{CH}_2)_2\text{-NH}_2$) ou carboxylate ($R = (\text{CO}_2\text{H})$) ont été choisis afin de faciliter les mesures de spectroscopie de masse et des ligands longs ($n \sim 70$) avec des groupes terminaux aminés ($R = (\text{CH}_2)_2\text{-NH}_2$) ou biotine ($R = \text{CO-(CH}_2)_4\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$) ont été employés pour une stabilisation à long terme en prévision de leur emploi pour l'auto-assemblage.

	n	R
(1a), (1i)	12	$-(\text{CH}_2)_2\text{-NH}_2$
(2a), (2i)	12	$-\text{CO}_2\text{H}$
(3a), (3i)	70	$-(\text{CH}_2)_2\text{-NH}_2$
(4a), (4i)	70	$-\text{CO-(CH}_2)_4\text{-biotin}$

Table 4.1 : Structure des ligands thiopégyrés utilisés pour la fonctionnalisation des AuNC. Les indices *a* et *i* indiquent si l'agent réducteur utilisé était respectivement l'aniline ou l'indole.

Protocole de transfert des clusters dans l'eau : La solution de clusters est dialysée pendant 4 heures à l'aide d'un tube à dialyse *float-A-lyzer* avec une coupure à un poids moléculaire de 500-1000 Da, afin de remplacer l'éthylène glycol par de l'eau. Puis une centrifugation de 5 minutes à 14 500 rpm (14 100 g) permet d'enlever les particules supérieures à 5 nm.

Protocole de fonctionnalisation : Une solution de 50 μL de 10 mg.mL^{-1} de ces ligands est mélangée avec 2 mL de clusters tout juste dialysés et laissée au repos pour la nuit à température ambiante le temps de la pegylation.

Les spectres d'absorption UV-visible des AuNC_a et AuNC_i avant et après fonctionnalisation sont présentés sur la figure 4.8. La diminution de l'absorbance après la fonctionnalisation est attribuée à la dilution pendant l'étape de dialyse. Les spectres sont donc présentés avec une normalisation

par le facteur de dilution qui est de 2 à 4 suivant les échantillons. Les ligands semblent décaler légèrement les pics d'absorption des solutions, ce phénomène est notamment particulièrement visible pour les AuNC_i (figure 4.8.b).

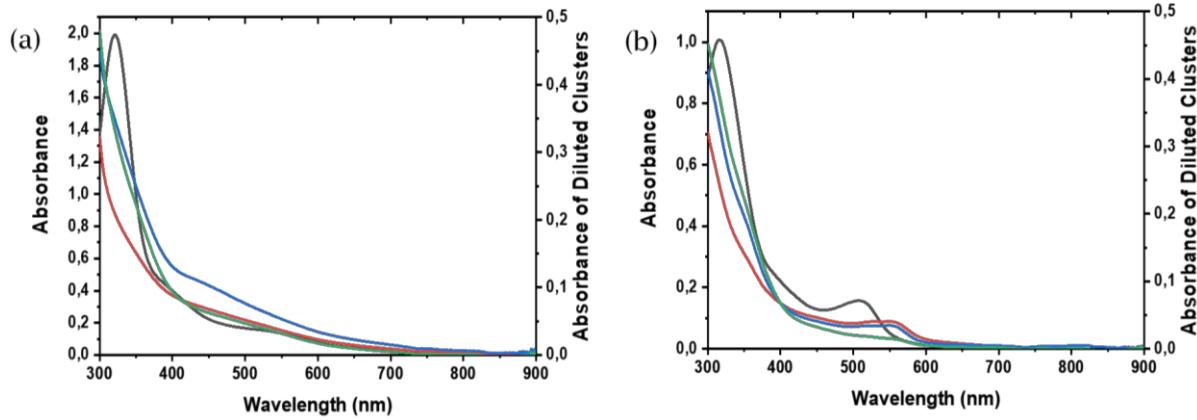


Figure 4.8 : Spectres d'absorption UV-visible de la solution telle que synthétisée (en noir) ainsi que de la solution dialysée et fonctionnalisée par des petits PEG aminés (1a,i en vert), des petits PEG carboxylés (2a,i en bleu) et de la biotine (4a,i en rouge) de (a) AuNC_a et (b) AuNC_i. Les spectres des solutions fonctionnalisées sont normalisés par le facteur de dilution résultant de la dialyse, leur axe d'absorbance est indiqué côté gauche.

I.2.3 - Spectrométrie de photoélectrons X (XPS)

Des premières mesures de spectrométrie de photoélectrons X (XPS, *X-ray photoelectron spectrometry*) à différents seuils (tabulés) ont été réalisées pour les clusters 1i, 2a, 4a au LICB de Dijon par C. Bernard-Nicod et O. Heintz. Les autres échantillons ont été envoyés mais pas encore analysés.

Les données que nous avons actuellement nous ont permis de confirmer la présence des ligands respectifs des clusters et d'estimer le ratio des degrés d'oxydation Au(I) et Au(0). La figure 4.9.a montre les mesures XPS au seuil 4f de l'or. Le couplage spin-orbit des électrons 4f produit un doublet 4f_{7/2} - 4f_{5/2}, dont l'écart et l'intensité relative peuvent être considérés comme constants. [18] Les pics XPS relatifs à l'or sont alors un doublet. Ces pics contiennent chacun l'information sur la présence d'Au(I) et Au(0) et sont donc décomposés en 2 gaussiennes, dont les intensités relatives sont fixées. Les largeurs à mi-hauteur d'un type d'atome Au sont également établies de manière à être égales pour les deux pics.

Les données indiquent que nous avons de l'Au(0) et de l'Au(I) dans tous les échantillons, nous sommes donc en présence de clusters avec un cœur métallique (présence de Au(0)) et non un oligomère (seul l'Au(I) serait présent). [19,20] Le ratio Au(I)/Au(0) est important (6.49 pour 1i, 4.14 pour 2a et 1.89 pour 4a, figure 4.9.b). La charge augmente relativement au nombre d'atome neutre, suggérant un nombre faible d'atomes de cœur. Cette

observation est cohérente avec des clusters de structures 2D comportant 8 à 13 atomes reportés dans la littérature (figure 4.9.c). Ces structures comportent entre 0 et 3 atomes de cœur.

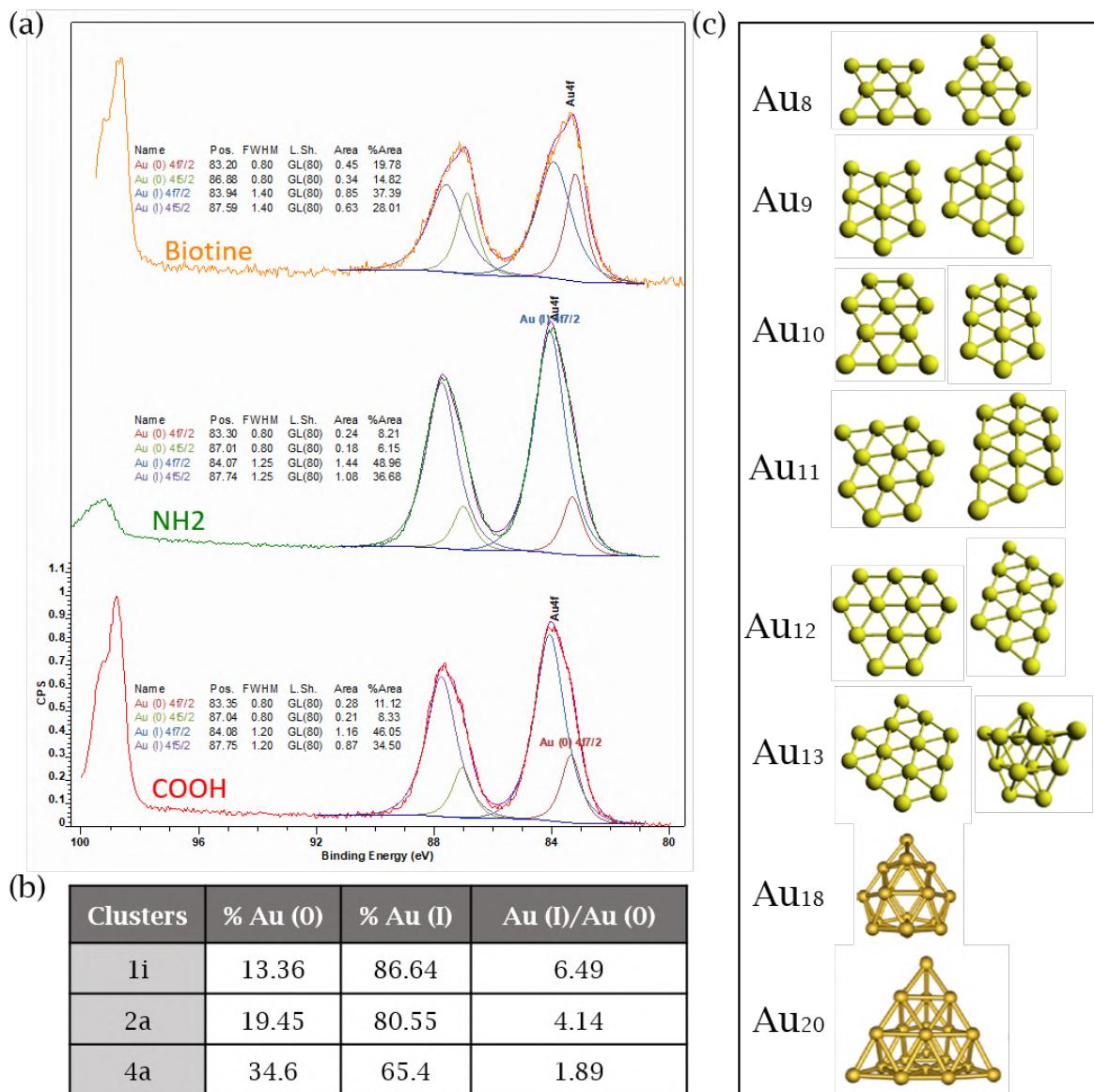


Figure 4.9 : (a) Spectres photo-électroniques X de clusters d'or 1i (en vert), 2a (en rouge) et 4a (en orange). L'or métallique est utilisé comme référence. Les paramètres des ajustements gaussiens sont indiqués à côté de chaque spectre. (b) Table comportant le pourcentage d'Au(I) et Au(0) ainsi que le ratio Au(I)/Au(0) pour chaque type d'échantillon. (c) Schématisations des structures des clusters stables calculées par DFT de clusters comportant entre 8 et 20 atomes. Reproduites avec autorisation des références [20] et [21].

De telles de structures plates auraient un contraste extrêmement faible en TEM et peuvent donc ne pas avoir été observés sur les images HRTEM réalisées. D'autres types de mesures structurales sont donc nécessaires pour caractériser la taille de ces objets.

I.2.4 - Spectrométries de masse (ESI-MS)

Afin de mieux comprendre la structure des plus petits clusters d'or, des mesures de spectroscopie de masse par électrospray ESI-MS ont été effectuées. Afin de faciliter l'étape d'ionisation de l'ESI-MS, les AuNCs ont été stabilisés dans de l'eau par fonctionnalisation avec des ligands thiopegylés comme résumé dans le tableau 4.1. du paragraphe I.1.2.

Le spectre de masse-sur-charge (m/z) en mode positif ESI-MS des AuNC (4a) montre une large distribution d'états de charge allant de m/z 1700 à 3500 (voir figure 4.10.a) qui est déconvoluée avec un algorithme de corrélation multiplicative dans la figure 4.10.b. [22,23] Cette méthode est détaillée dans la partie ESI-MS du chapitre 2. La distribution de masse estimée des AuNC révèle deux pics dans la gamme 20 000-27 000 Da qui peuvent être attribués aux compositions de clusters $\text{Au}_6(\text{S-PEG}_{70}\text{-Biotine})_6$ et $\text{Au}_7(\text{S-PEG}_{70}\text{-Biotine})_7$. Cependant, l'identification du signal ESI-MS des clusters d'or contenant un petit nombre d'atomes d'or est rendue difficile.

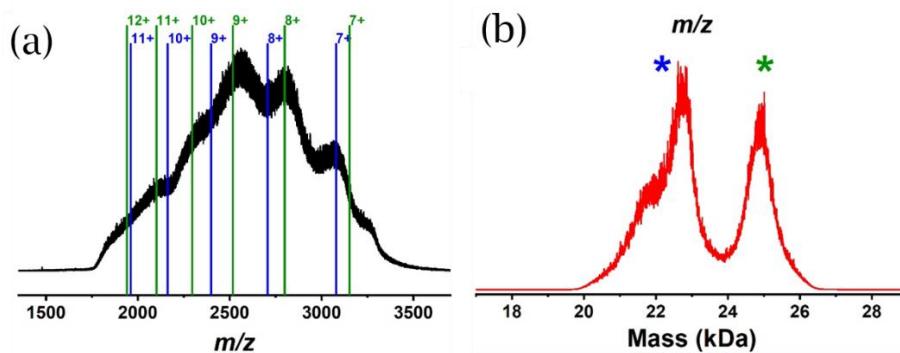


Figure 4.10 : (a) Spectres de masse-sur-charge des AuNCs (4a) stabilisés avec de longs ligands thioPEG biotinylés enregistrés en mode positif. Les états de charge possibles pour l' $\text{Au}_6(\text{S-PEG}_{70}\text{-Biotine})_6$ et l' $\text{Au}_7(\text{S-PEG}_{70}\text{-Biotine})_7$ sont indiqués respectivement par des lignes bleues et vertes. (b) Spectre ESI-MS déconvolué avec un algorithme de corrélation multiplicative et montrant deux pics compatibles avec les Au_6 (marqueur bleu) et Au_7 (marqueur vert) AuNCs.

En effet, la masse des molécules PEG₇₀ (~ 3400 Da) est importante par rapport à celle du noyau d'Au estimé (environ 1200-2000 Da). La présence d'AuNC de taille plus élevée, jusqu'à $\text{Au}_{10}(\text{S-PEG}_{70}\text{-Biotine})_{10}$ ou même de fragments de clusters plus importants ne peut être exclue. C'est pourquoi nous avons préparé de nouvelles familles de clusters fonctionnalisés (voir dans le tableau 4.1, les clusters 1i,a et 2i,a) avec des ligands PEG₁₂ plus courts. Les spectres m/z en mode positif des clusters $\text{Au}_n(\text{S-PEG}_{12}\text{-NH}_2)_n$ (1i) montrent des distributions multipiques d'états de charge qui peuvent être attribuées à de petits oligomères avec $8 \leq n \leq 10$ correspondant à des masses de 6400 à 8000 Da (figure 4.11). Il est intéressant de noter qu'avec les clusters (1a), des espèces ayant des masses plus importantes allant jusqu'à 16 500 Da sont observées,

ce qui suggère fortement la présence d'AuNCs plus grands allant jusqu'à $\text{Au}_{25}(\text{S-PEG}_{12}-\text{NH}_2)_{19}$.

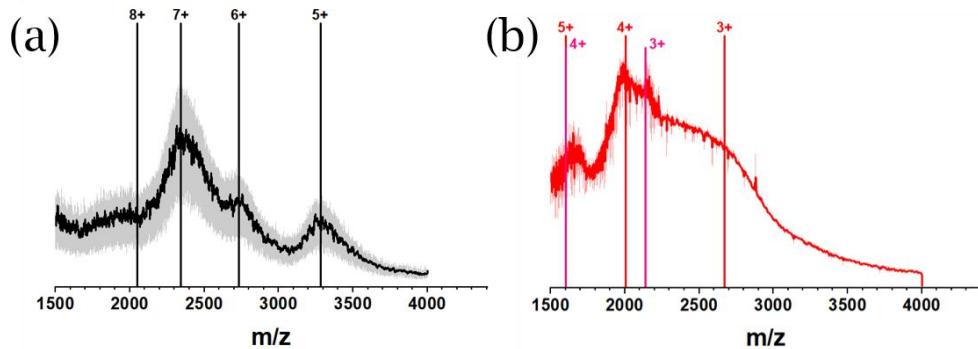


Figure 4.11 : Spectres masse-sur-charge ESI-MS en mode positif pour les clusters d'or (1a) et (1i) respectivement en (a) et (b). On observe dans les deux cas une large distribution des états de charge qui peuvent être attribués en (a) aux clusters $\text{Au}_{25}(\text{S-PEG}_{12}-\text{NH}_2)_{19}$ pour (1a), indiqué par les pics 5+ à 8, et en (b) aux clusters $\text{Au}_{10}(\text{S-PEG}_{12}-\text{NH}_2)_{10}$ avec $\text{Au}_8(\text{S-PEG}_{12}-\text{NH}_2)_8$ pour (1i), indiqué par les pics rouges 3+ à 5+ et les marqueurs roses 3+ à 4+ respectivement. Dans les deux cas, les données lissées sont affichées en couleur sombre par-dessus les données brutes.

Lorsque le groupe terminal amine de (1a,i) est remplacé par un groupe carboxyle de (2a,i), le mode négatif ESI-MS révèle la présence possible AuNC_a Au₄, Au₇ et Au₁₀ et AuNC_i Au₅, Au₁₀, Au₁₁ et Au₁₂ (figure 4.12). Dans le cas (2a), le spectre masse-sur-charge est présenté sur la figure 4.12.a, où le pic le plus élevé en $m/z = 4151$ est agrandi dans l'encadré (rouge) et comparé, avec un bon accord, à la distribution isotopique simulée (noir) du AuNC $[\text{Au}_{10}(\text{S-PEG}_{12}-\text{CO}_2\text{H})_{10}]^{2-}$. D'autres pics dominants, numérotés de (1) à (4), pourraient être associés à des espèces plus petites, possiblement fragmentées, telles que : (1), $m/z = 3275$ pour $[\text{Au}_7(\text{S-PEG}_{12}-\text{CO}_2\text{H})_3]^-$; (2), $m/z = 3222$ pour $[\text{Au}_7(\text{S-PEG}_{12}-\text{CO}_2\text{H})_8]^{2-}$; (3), $m/z = 2639$ pour $[\text{Au}_7(\text{S-PEG}_{12}-\text{CO}_2\text{H})_2]^-$; (4), $m/z = 1938$ pour $[\text{Au}_4(\text{S-PEG}_{12}-\text{CO}_2\text{H})_2]^-$.

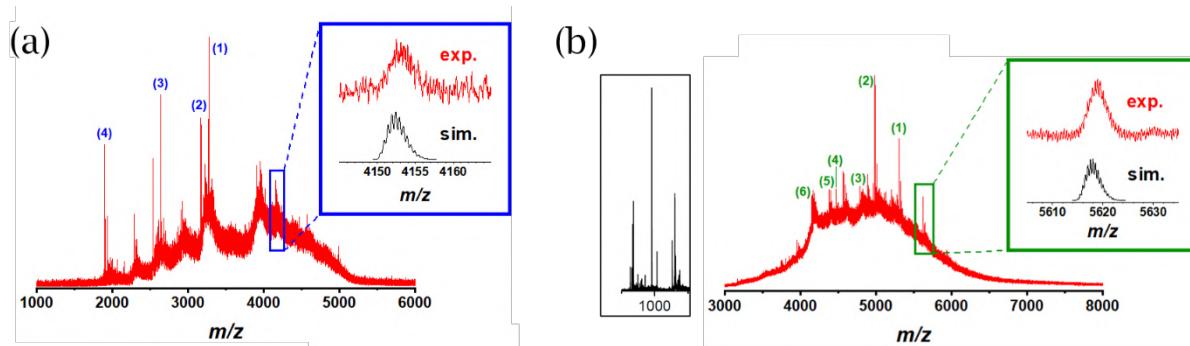


Figure 4.12 : Spectres ESI-MS masse-sur-charge en mode négatif pour les AuNC (2a) et (2i) respectivement en (a) et (b). Les inserts présentent des distributions isotopiques expérimentales (rouge) et simulées (noir) pour les pics de m/z les plus élevés de chaque échantillon. Les autres pics numérotés sont attribués à des clusters d'or plus petits. Le spectre (b) est interrompu en dessous $m/z = 3\,000$ car les pics au alentour de $m/z = 1\,000$ sont de faible intensité et zoomer 10 fois.

Pour les clusters à base d'indole (1i), le spectre m/z est montré en figure 4.12.b. Le pic le plus élevé en $m/z = 5619$ est agrandi dans l'encadré (rouge) et comparé, avec un bon accord, à la distribution isotopique simulée (noir) du AuNC $[\text{Au}_{12}(\text{S-PEG}_{12}\text{-CO}_2\text{H})_{14}]^{2-}$. D'autres pics dominants, numérotés de 1 à 6, suggèrent également la présence de clusters Au_{10} et Au_{11} : (1), $m/z = 5304$ pour $[\text{Au}_{12}(\text{S-PEG}_{12}\text{-CO}_2\text{H})_{13}]^{2-}$; (2), $m/z = 4984$ pour $[\text{Au}_{12}(\text{S-PEG}_{12}\text{-CO}_2\text{H})_{12}]^{2-}$; (3), $m/z = 4788$ pour $[\text{Au}_{12}(\text{S-PEG}_{12}\text{-CO}_2\text{H})_{11}]^{2-}$; (4), $m/z = 4471$ pour $[\text{Au}_{11}(\text{S-PEG}_{12}\text{-CO}_2\text{H})_{11}]^{2-}$; (5), $m/z = 4380$ pour $[\text{Au}_{10}(\text{S-PEG}_{12}\text{-CO}_2\text{H})_{11}]^{2-}$; (6), $m/z = 4168$ pour $[\text{Au}_{10}(\text{S-PEG}_{12}\text{-CO}_2\text{H})_{10}]^{2-}$. Le pic le plus intense de la zone encadrée vers $m/z = 1\,000$ est attribué à des clusters $[\text{Au}_5(\text{S-PEG}_{12}\text{-CO}_2\text{H})_{11}]^{2-}$.

Les clusters ($4 \leq n \leq 7$) coexistant avec des clusters de tailles intermédiaires ($10 \leq n \leq 12$) avec le ligand PEG carboxylé dans les échantillons AuNC_a et AuNC_i, sont plus petits que ceux mesurés par rapport aux ligands aminés. Ce qui suggère qu'une dissolution oxydante plus efficace pourrait avoir lieu pendant la liaison du ligand dans le cas des PEG carboxylés. Une oxydation de la surface par les groupes carboxyles, expliquerait que les clusters avec les ligands carboxylés soit de plus petites tailles.

Les formes les plus stables des AuNC comprenant 13 atomes ou moins, sont considérées comme des structures oligomères plates. [19,20,24] De telles structures ne montreraient que peu de contraste en TEM. Ceci expliquerait que seules les deux dernières catégories de nanostructures vues en TEM, les monocristaux isotropes et les monocristaux oblongs, pourraient correspondre aux Au_{10} à Au_{13} qui se situent au début entre les morphologies 2D et 3D.

I.3 - Propriétés photo-physiques

I.3.1 - Cartographie émission-excitation de fluorescence

Toutes les solutions d'AuNCs, que ce soit avant ou après fonctionnalisation, produisent une forte fluorescence à large bande. La largeur de cette bande diffère en fonction du réducteur utilisé (aniline ou indole). La figure 4.13 montre les spectres et les cartes 2D de l'intensité de fluorescence en fonction des longueurs d'onde d'émission (λ_{em}) et d'excitation (λ_{ex}) pour les clusters AuNC_a (figure 4.13.a,b) et AuNC_i (figure 4.13.c,d).

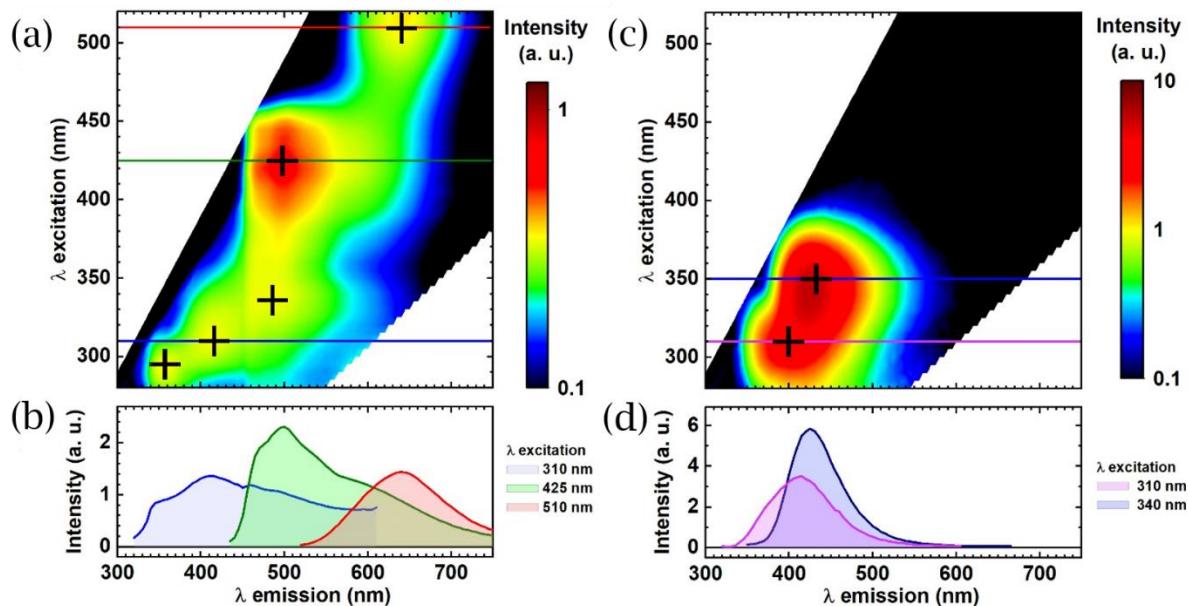


Figure 4.13 : (a) Carte 2D et (b) spectres représentatifs de l'intensité de la fluorescence à température ambiante des clusters AuNC_a en fonction des longueurs d'onde d'émission λ_{em} , et d'excitation λ_{ex} . (c) Carte 2D et (d) spectres représentatifs de l'intensité de la fluorescence des clusters AuNC_i. Les lignes colorées en (a) et (c) correspondent aux spectres en (b) et (d) respectivement. Les zones blanches des tracés en 2D ne contiennent aucune donnée, car la fluorescence est enregistrée de 10 nm au-dessus de λ_{ex} jusqu'à 10 nm avant le second harmonique, 2 λ_{ex} .

Dans les cartes en 2D, des zones de haute intensité qui peuvent être associées à des classes d'émetteurs sont clairement visibles. Pour les AuNC_a, la caractéristique prédominante de la figure 4.13.a est l'émission intense verte centrée sur $\lambda_{\text{em}} = 500$ nm et $\lambda_{\text{ex}} = 425$ nm. Les AuNC à émission verte sont rares [25,26], mais une émission à $\lambda_{\text{em}} = 510$ nm a été signalée pour Au₁₃ stabilisé par des dendrimères. [9] Deux autres zones moins intenses révèlent pour la première une émission rouge à $\lambda_{\text{em}} = 640$ nm et $\lambda_{\text{ex}} = 510$ nm et pour la deuxième une émission bleue à $\lambda_{\text{em}} = 425$ nm et $\lambda_{\text{ex}} = 310$ nm. Les premières rappellent la fluorescence rouge classique de Au₂₅ stabilisé par la BSA ($\lambda_{\text{em}} = 640$ nm) [27] et de Au₂₅ entouré de lysine ($\lambda_{\text{em}} = 657$ nm). [28] Les seconds sont plus rares. A l'exception de l'Au₈ encapsulé dans un dendrimère et émettant à $\lambda_{\text{em}} = 456$ nm, [9] deux cas ont été reportés. [4,10] La largeur des bandes d'émission et leur aspect bossu suggèrent que nous sommes en présence de plusieurs espèces. Cinq à six espèces de clusters différents pourraient être associés à la carte 4.13.a.

Les AuNC_i présentent une émission moins étendue, mais plus intense, et à des longueurs d'onde plus courtes (figure 4.13.c). La fluorescence est principalement centrée à $\lambda_{\text{em}} = 425$ nm et $\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm avec une zone adjacente secondaire d'émission violette à $\lambda_{\text{em}} = 400$ nm et $\lambda_{\text{ex}} = 310$ nm. Une telle luminescence à haute énergie n'a été observée que pour de très petits nanoclusters d'Au₅ encapsulés dans des dendrimères avec $\lambda_{\text{em}} = 386$ nm. [9]

Bien que la synthèse soit faite en une étape et sans purification, la position de ces zones de forte intensité est reproductible pour chaque type de synthèse (AuNC_a ou AuNC_i). La figure 4.14 montre deux paires de cartes de fluorescence correspondant à deux synthèses pour chaque type de clusters, AuNC_a et AuNC_i . On peut voir que les deux synthèses donnent les mêmes zones d'émission. Le bruit instrumental est plus élevé sur la seconde série, dû à une intensité plus faible de l'émission de la solution. Dans ces conditions des artefacts dus aux raies Raman de l'eau sont visibles, leur position varie en fonction de la longueur d'excitation. Ces derniers sont perceptibles sur les carte 2D sous forme de lignes diagonales. Ces artefacts sont d'ailleurs souvent utilisés pour calibrer les spectromètres de fluorescence. [29] La présence d'eau dans la deuxième synthèse peut être expliquée par le caractère hydrophile de l'EG. Celui utilisé en 4.14.a était neuf, alors que celui utilisé en 4.14.b avait été ouvert depuis plusieurs semaines.

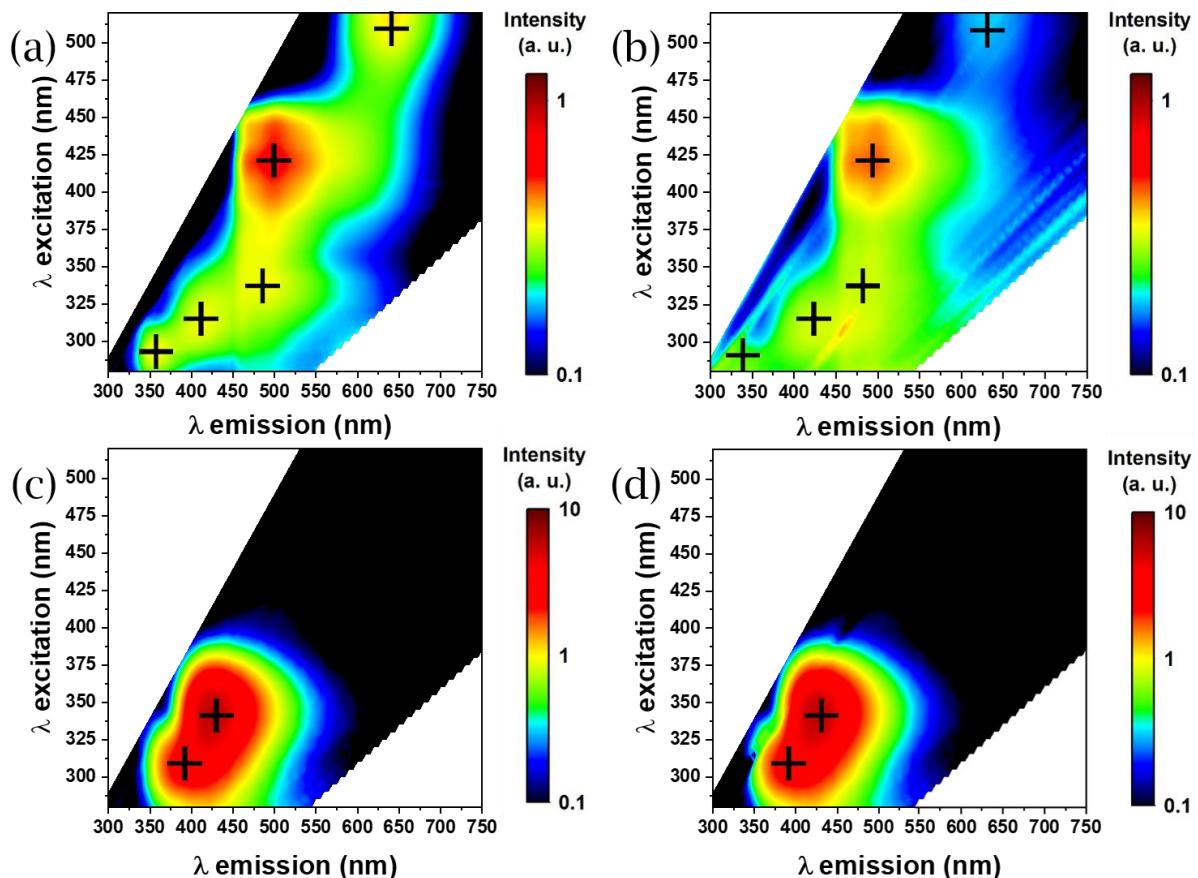


Figure 4.14 : Carte 2D représentatives de l'intensité de la fluorescence à température ambiante des clusters AuNC_a en fonction des longueurs d'onde d'émission λ_{em} , et d'excitation λ_{ex} issue de (a) la synthèse de la figure 4.13 et (b) une seconde synthèse. Carte 2D représentatives de l'intensité de la fluorescence à température ambiante des clusters AuNC_i en fonction des longueurs d'onde d'émission λ_{em} , et d'excitation λ_{ex} issue de (c) la synthèse de la figure 4.13 et (d) une seconde synthèse. Les zones blanches des tracés en 2D ne contiennent aucune donnée, car la fluorescence est enregistrée de 10 nm au-dessus de λ_{ex} jusqu'à 10 nm avant le second harmonique, $2\lambda_{\text{ex}}$.

La fonctionnalisation avec des ligands de surface modifie généralement la fluorescence initiale des clusters. [1] En effet, les caractéristiques photophysiques dépendent beaucoup de la structure du cœur d'or ainsi que de la nature et de l'arrangement des ligands. La littérature montre qu'un échange de ligands provoque généralement une réorganisation structurale ou électronique suffisante pour modifier les propriétés d'émission. [3]

Afin de vérifier l'effet de la fonctionnalisation sur nos objets, nous avons réalisé de mesures de fluorescence sur les clusters AuNC_a (4a) et AuNC_i (4b) que nous souhaitons utiliser comme émetteurs dans nos systèmes hybrides. Comme la figure 4.13, qui montre les données de fluorescence des AuNCs d'aniline et d'indole avant fonctionnalisation, la figure 4.15 rassemble les cartes 2D et les spectres représentatifs des AuNCs (4a) et (4i) fonctionnalisés avec HS-PEG₁₂-biotine.

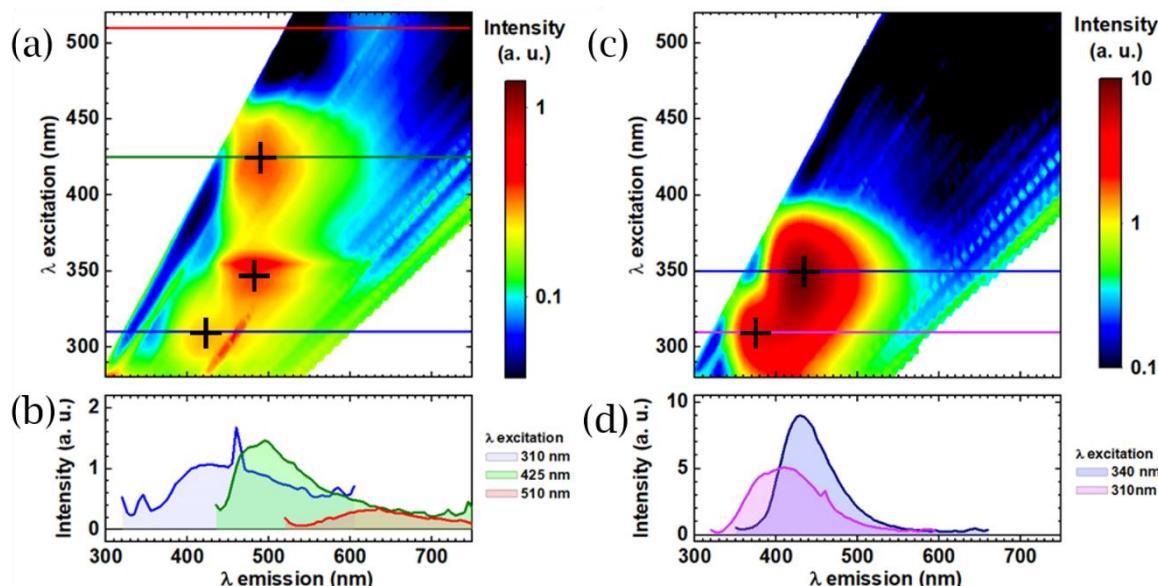


Figure 4.15 : (a) Carte 2D et (b) spectres représentatifs de l'intensité de la fluorescence à température ambiante des clusters à base d'aniline dans l'eau fonctionnalisés avec des ligands HS-PEG-biotine (4a) en fonction des longueurs d'onde d'émission λ_{em} , et d'excitation λ_{ex} . (c) Carte 2D et (d) spectres représentatifs de l'intensité de la fluorescence des clusters à base d'indole dans l'eau et fonctionnalisés avec des ligands HS-PEG-biotine (4i). Les lignes colorées en (a) et (c) correspondent aux spectres en (b) et (d) respectivement. Sur certains spectres, les résonances Raman de l'eau qui apparaissent comme des pics nets et se superposent au signal d'émission des clusters.

Il est intéressant de noter que toutes les caractéristiques décrites pour les AuNCs tels que synthétisés sont également observées ici après fonctionnalisation, dialyse et transfert dans l'eau. Pour (4a), les principaux émetteurs sont conservés avec les mêmes caractéristiques d'excitation et d'émission, sans décalage spectral. Ceci indique que la structure initiale des AuNC est essentiellement préservée. De même, les intensités relatives de tous les AuNC restent inchangées. À l'exception des clusters rouges qui semblent un peu moins abondants par rapport aux AuNC bleus et verts que

précédemment. Pour 4i, nous retrouvons également les deux types d'émetteurs violets et bleus avec une fluorescence intense aux mêmes excitation et d'émission.

Contrairement aux résultats rapportés dans la littérature qui suggéraient une augmentation de la taille du cœur des clusters Au₁₁ à Au₂₅ pendant l'échange de ligands, [3] la thio-pegylation et le transfert dans l'eau des AuNC à base d'indole et d'aniline n'ont pas induit de modifications observables des cartes 2D de fluorescence, sauf pour la diminution relative de la population des émetteurs rouges probablement due à la dissolution oxydante par les molécules thiolées. [1]

I.3.2 - Modèle du Jellium

Les caractéristiques d'excitation et d'émission des AuNC dépendent de la taille de leur noyau d'or, de la nature des ligands et de la structure des liaisons Au-ligand. [1,4] L'évolution de la longueur d'onde d'émission des AuNCs comprenant plus de 20 atomes est bien décrite par la loi de puissance du modèle du Jellium, dont le modèle, la formule (1.28) et le domaine de validité sont présentée dans le chapitre 1. [9] Pour les petits clusters ($n < 20$) stabilisés avec des ligands thiolés (L), le modèle de Jellium n'est pas valide en principe. Deux structures ont été proposés : un noyau Au_n pur avec une enveloppe de ligand [19,20] ou une chaîne Au_nL_n oligomérique [24]. Dans ces deux cas, des calculs de TD-DFT sont généralement appliqués lorsque la structure précise de l'AuNC est connue, par cristallographie par exemple. [30,31] Il a cependant été démontré expérimentalement que le modèle du Jellium reste prédictif jusqu'à $n = 3$. [32]

En l'absence de données permettant de résoudre leur structure exacte, nous estimons qualitativement la taille des clusters d'Au_n à partir du modèle de Jellium appliqué aux principales longueurs d'onde d'émission trouvées dans les figures 4.13.a et 4.13.c. Nous trouvons $n = 5 \pm 1$ et $n = 7 \pm 1$ pour les AuNCs de l'indole et $n = 6 \pm 2$, $n = 11 \pm 2$ et $n = 22 \pm 4$ pour les AuNCs de l'aniline (voir table 4.2).

Type de Clusters	λ_{em}^{max} (80% range) (nm)	E (eV)	$n = \left(\frac{E_f}{E}\right)^3$
Indole	400 (375-430)	3,10	5 (4-7)
	425 (400-450)	2,92	7 (5-8)
Aniline	410 (350-450)	3,02	6 (4-8)
	500 (460-540)	2,48	11 (8-13)
	640 (600-670)	1,94	22 (18-26)

Table 4.2 : Taille des AuNC estimée à partir des cartes de fluorescence 2D en utilisant le modèle Jellium pour les échantillons d'aniline et d'indole. La longueur d'onde d'émission de l'intensité maximale, λ_{em}^{max} , ainsi que les longueurs d'onde extrêmes correspondant à 80 % de ce maximum sont indiquées pour les AuNC aniline et indole dans la première colonne de la table. La deuxième colonne convertie λ_{em}^{max} en unité d'énergie. Dans la dernière colonne, le modèle du Jellium est utilisé pour estimer, avec un intervalle, le nombre d'atomes d'or d'un AuNC émettant à λ_{em}^{max} ($E_f = 5,46$ eV est l'énergie de Fermi de l'or bulk).

I.3.3 - Rendement quantique et durée de vie

Nous avons également étudié la durée de vie ou le rendement quantique de ces AuNCs. Il est important de caractériser ces deux paramètres qui sont nécessaire à de nombreuses applications, comme la microscopie en fluorescence [7,26] et ou le couplage avec des structures plasmoniques. [33]

La figure 4.16.a présente les courbes de décroissance d'intensité de fluorescence dont sont extraites les durées de vie des clusters AuNC_a et AuNC_i. L'ajustement des courbes est fait, pour chaque espèce, avec une, deux et trois fonctions exponentielles. La méthode des moindres carrés permet d'obtenir un résidu au plus proche de la ligne du zéro. Un exemple de fit non adéquat à une exponentielle pour les clusters AuNC_a est montré figure 4.16.c-d.

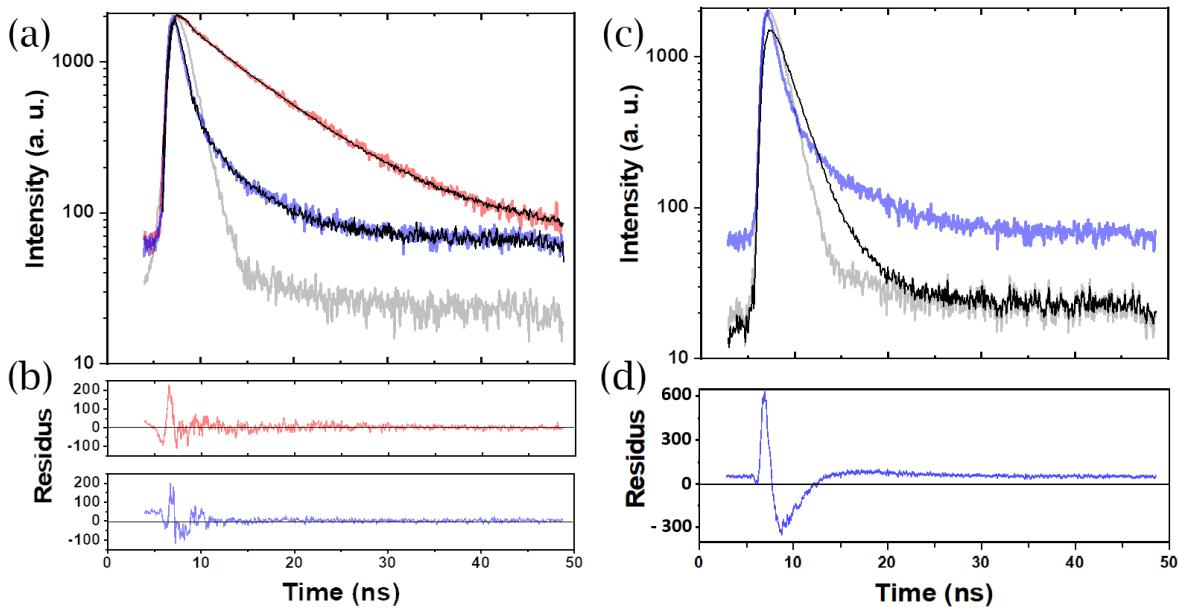


Figure 4.16 : (a) Mesures de la durée de vie de la fluorescence et (b) ajustement des résidus des clusters AuNC_a (en bleu) et AuNC_i d'indole (en rouge). Dans (a), les fits sont en noir et la référence du POPOP utilisée est en gris. (c) Ajustement de la courbe de décroissance exponentielle avec une exponentielle simple et (d) ajustement du résidu associé.

La littérature n'associe qu'un seul temps de vie par espèce de Au_n. [4,5,7] Un ajustement de courbes avec trois fonctions décroissantes résulte donc de la coexistence de 3 groupes d'espèces.

L'ajustement de la courbe de décroissance temporelle mesurée pour l'AuNC_a nécessite trois constantes temporelles et populations relatives de 0,6 ns ± 0,1 ns (89 %), 4,0 ns ± 0,1 ns (10 %) et 79,3 ns ± 0,6 ns (1 %). Un taux de décroissance beaucoup plus rapide est observé pour l'AuNC_i qui est bien représenté par deux types d'émetteurs avec une constante de temps et une population de 0,50 ns ± 0,1 ns (50 %) et 8,3 ns ± 0,1 ns (50 %). Comme la durée de vie diminue avec la taille des AuNC, [9] le taux de décroissance le plus court de 0,5 ns est associé aux émetteurs violet-bleu, Au₃-Au₈. Le taux de décroissance de 5 ns se situe dans la fourchette classique de 4-20 ns [4-7] connue pour les AuNC émetteurs verts, et est attribué aux Au₉-Au₁₄. La luminescence à longue durée de vie (80 ns) est observée seulement dans les AuNC_a et est attribuée aux émetteurs rouges, Au₁₈-Au₂₇. La durée de vie significativement prolongée, indicative de composés plus stables, est conforme aux observations de l'ESI-MS selon lesquelles les AuNC plus grands portent beaucoup plus de ligands capables de mieux stabiliser l'état excité. En effet, l'état excité possède des caractéristiques de transfert de charge significatives qui peuvent être stabilisées dans les milieux polaires. [6] Les mesures de la durée de vie de la fluorescence confirment la présence de trois ou de deux types principaux d'émetteurs dans les échantillons AuNC_a et AuNC_i respectivement.

Les mesures de durée de vie de fluorescence pour les AuNC aniline (4a) et indole (4i) fonctionnalisés avec de la biotine, présentées dans la figure 4.17, ne montrent aucune différence après pégylation par rapport aux données de la figure 4.16 pour les AuNC avant fonctionnalisation.

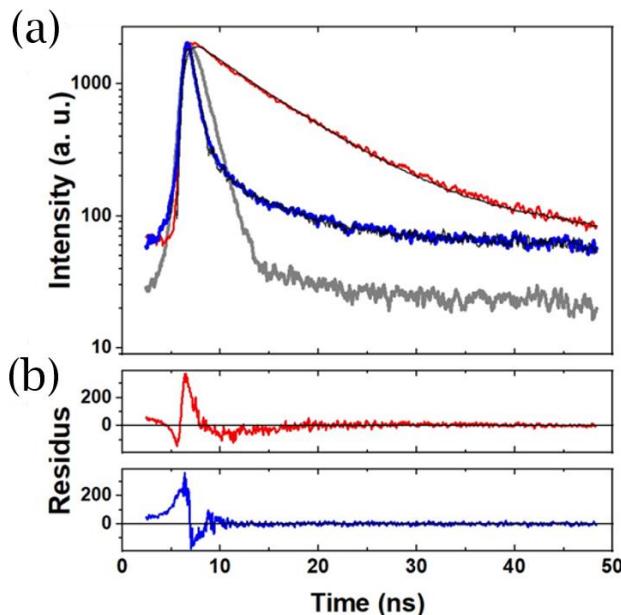


Figure 4.17 : (a) Mesures de la durée de vie de la fluorescence et (b) ajustement des résidus des clusters AuNC_a (bleu) et AuNC_i (rouge) fonctionnalisés avec de la biotine en rouge et bleu respectivement. Dans (a), les ajustements sont en noir et la référence du POPOP utilisée est en gris.

La mesure de durée de vie de AuNC_a (4a) résulte de la superposition de trois exponentielles décroissantes à $0,5\text{ ns} \pm 0,1\text{ ns}$ (89 %), $4,8\text{ ns} \pm 0,1\text{ ns}$ (10 %) et $77,0\text{ ns} \pm 0,4\text{ ns}$ (1 %). La mesure de durée de vie de AuNC_i (4i) est également composée de deux exponentielles à $0,4\text{ ns} \pm 0,1\text{ ns}$ (50 %) et $8,2\text{ ns} \pm 0,1\text{ ns}$ (50 %). La correspondance des paramètres d'ajustement reste très similaire et confirme en outre que l'introduction du ligand thiopégylé n'a pratiquement aucun effet sur les propriétés photo-physiques des AuNC. Cela suggère que l'échange de ligands n'affecte pas la structure au centre émetteur ni dans son environnement immédiat.

Dans les cartes 2D de la figure 4.13, les émetteurs bleus produits avec l'indole semblent beaucoup plus brillants que ceux produits avec l'aniline. La luminosité de l'émetteur est quantifiée en mesurant le rendement quantique (QY). En effet, le QY des AuNCs violet et bleu à base d'indole atteint un taux extrêmement élevé de 27 % lorsque le QY des AuNCs bleu et vert à base d'aniline est limité à 5 %, proche de la valeur habituelle de 5-10 % rapportée dans la littérature. [4,6,27]

Après la thiopégylation, le QY reste essentiellement inchangé, ce qui suggère une fois encore que l'introduction du ligand n'affecte pas la structure ni l'environnement immédiat du centre émetteur.

I.3.4 - Récapitulatif des caractéristiques optiques des AuNC

Les longueurs d'onde d'émission et d'excitation, ainsi que le QY et le temps de vie de chaque population de clusters identifiés sont résumés dans la table 4.3. Le nombre d'atomes du cœur d'or des AuNC dans la table sont les moyennes des tailles déduites du modèle du Jellium.

Reducing agent	Gold Cluster	Excitation nm (eV)	Emission nm (eV)	Quantum Yield (%)	Lifetime (ns)
Indole	Au_5	310 (4,00)	400 (3,10)	27	0.5
	Au_7	350 (3,54)	425 (2,92)	27	8
Aniline	Au_6	310 (4,00)	410 (3,02)	5	0.5
	Au_{11}	425 (2,92)	500 (2,48)	5	5
	Au_{22}	510 (2,43)	640 (1,94)	1	90

Table 4.3 : Propriétés photo-physiques des AuNCs avant fonctionnalisation.

Les clusters d'or AuNC_i, identifiés par ESI-MS pour contenir de petits Au_5 et des clusters plus gros Au_n avec $8 < n < 12$, est en accord avec le modèle du Jellium qui prévoit en fonction des longueurs d'onde d'émission deux populations de clusters Au_n avec $4 < n < 6$ pour la première population et $6 < n < 8$ pour la seconde. Ces clusters montrent également un QY de 27%, ce qui très élevé pour leur longueur d'onde d'émission. [4-6,27]

Les clusters d'or AuNC_a, identifiés par ESI-MS pour contenir de petits Au_n avec $4 < n < 7$, des moyens Au_{10} , mais aussi de gros clusters Au_{25} , est également en accord avec le modèle du Jellium qui prévoit trois populations de clusters Au_n avec $4 < n < 8$ pour la première population, $9 < n < 13$ pour la seconde et $18 < n < 26$ pour la troisième. Ces clusters montrent un QY inférieur à 5%, ce qui est une valeur assez classique dans la littérature. [4,5,7,27,28]

I.4 - Emission blanche du mélange RGB

La solution de clusters d'or AuNC_a telle que préparée avant fonctionnalisation comprend systématiquement des émetteurs rouges, bleus et verts. Or, la combinaison d'émetteurs rouges, verts et bleus est classiquement utilisée dans les LED pour créer une lumière blanche avec des teintes plus ou moins chaudes [34] résultant de la forme spectrale des trois composants. [35-37] Les émissions des ampoules sont souvent caractérisées par des cartes CIE, qui correspondent à un espace de couleur défini par la Commission internationale de l'éclairage (CIE) en 1931 pour la quantification de la couleur. La couleur blanche est disposée en $x = 0,33$ et $y = 0,33$. La

luminescence résultant d'une excitation à large bande de notre système d'émetteurs est simulée en additionnant les spectres d'émission de la figure 4.12.a pour $400 \leq \lambda_{\text{ex}} \leq 700$ nm et tracés dans la figure 4.18.a en bleu. Les coordonnées XY de la carte CIE sont ainsi calculées pour chaque synthèse AuNC et reportées sur la carte CIExy dans la figure 4.18.b. Les coordonnées CIE des spectres des clusters à base d'aniline sont toutes rassemblées près du centre de la carte correspondant à une émission blanche.

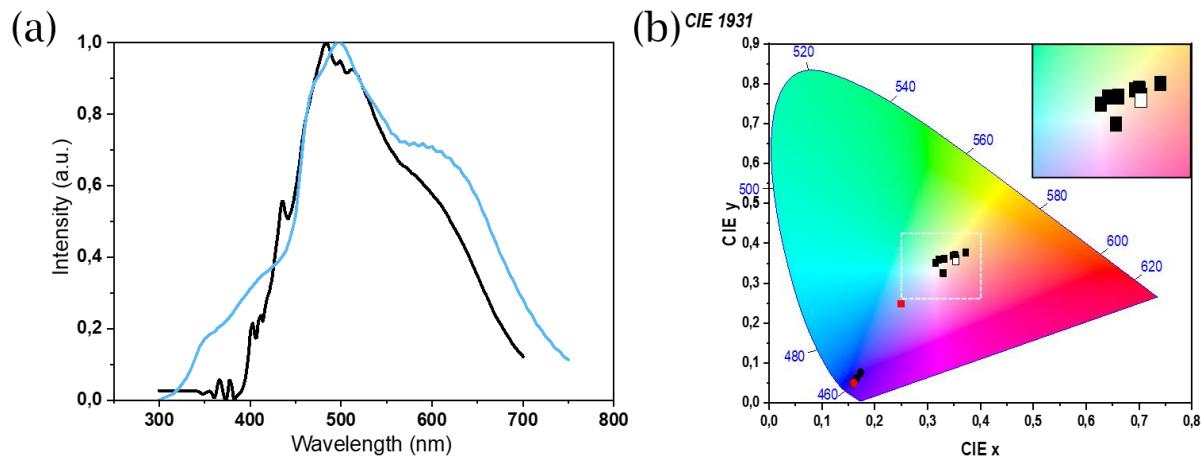


Figure 4.18 : (a) Spectres d'émission blancs normalisés d'une solution de clusters AuNC_a obtenus par sommation de tous les spectres de la figure 4.8.a pour $400 \leq \lambda_{\text{ex}} \leq 700$ nm (bleu) et par excitation à large bande 350-500 nm (noir). (b) Coordonnées trichromatiques des solutions de clusters à base d'aniline (carré) et d'indole (cercle) sur l'espace de couleur CIE de 1931 avant (noir) et après (rouge) thio-pégylation. Le carré blanc correspond à l'émission des AuNC_a lors d'une excitation à large bande (spectre noir en (a)). En encart de (b) un zoom sur la zone comprise entre $0,25 \leq \text{CIE } x \leq 0,4$ et $0,25 \leq \text{CIE } y \leq 0,425$.

Afin de vérifier si le spectre d'émission blanche simulé à l'émission réelle, nous avons enregistré cette émission blanche expérimentalement de 400 à 700 nm par l'excitation de la solution avec une lampe à Hg à travers un filtre passe-bande de 350 à 500 nm. Le spectre noir de la figure 4.18.a est très similaire au spectre cumulé numérique. Les faibles écarts en dessous de 350 nm et au-dessus de 650 nm sont attribués aux performances du filtre dans les régions de coupure. Les coordonnées CIE du spectre de luminescence expérimental (carré blanc de la figure 4.18.b) avec excitation à large bande sont également proches du point blanc central, validant ainsi la méthodologie basée sur le traitement des cartes 2D et confirmant l'émission blanche des solutions de clusters AuNC_a. En revanche, les clusters AuNC_i ne contenant pas de clusters rouges, ceux-ci sont situées dans le coin d'émission bleu (les ronds rouges et noirs figure 4.18.b), comme attendu.

Nous avons également placé les clusters thio-pégylés sur ce graphique. La fonctionnalisation et le transfert dans l'eau n'ont aucun effet sur la couleur d'émission des solutions d'AuNC_i. Un déplacement modéré de l'émission

blanche pure vers le coin bleu est obtenu pour les solutions d'AuNC_a après fonctionnalisation, ce qui est cohérent avec la moindre abondance relative des émetteurs rouges après fonctionnalisation.

Les clusters biotinylés AuNC_a et AuNC_i montrent dans les deux cas une fluorescence bleue-verte après fonctionnalisation. Disposant de prismes d'or streptavidine, dont la synthèse et les propriétés sont décrites dans le chapitre 3, ce sont ces types de clusters que nous utiliserons pour créer des assemblages entre particules plasmoniques et émettrices. Du fait de leur QY élevé, nous avons décidé pour la suite de nos expériences d'utiliser principalement les clusters AuNC_i.

II - Chimie de surface des nanodiamants

Les autres émetteurs ayant retenus notre attention pour la formation d'assemblage sont les nanodiamants. De même que pour les nanoclusters, leur utilisation pour l'auto-assemblage avec les nanoprismes d'or recouvert de streptavidine, demande de fonctionnaliser les nanodiamants avec de la biotine.

II.1 - Nettoyage de la surface des nanodiamants

Les nanodiamants, achetés chez Microdiamants sont fonctionnalisés selon le protocole décrit dans l'article de Walsworth et coll. [38] Ils ont un diamètre de 0-0,3 µm et une concentration de 50 cts/kg (c'est-à-dire 0,01 kg de diamants par kg de solution).

Le protocole qui suit est dangereux dû fait de la réaction fortement exothermique des acides utilisés et doit être réalisée avec précaution.

Les nanodiamants sont préalablement décapés avec l'addition, goutte à goutte, de 15 mL de suspension de nanodiamants sous agitation magnétique, à 80 mL d'un mélange de H_2SO_4 - HNO_3 - POCl_3 au ratio 1:1:1 refroidi dans un bain de glace. Une fois l'intégralité des particules ajoutée à la solution, la température est augmentée lentement, par pas de 10 °C, jusqu'à atteindre 85 °C sous reflux. La température et l'agitation sont maintenues pendant 3 jours. Les nanodiamants sont ensuite séparés des acides en les laissant décanter puis resuspendus dans 0,1 M de soude (NaOH) pendant 2 heures à 90 °C sous reflux. La même étape est répétée avec cette fois 0,1 M d'acide chlorhydrique (HCl). Elles sont, après chaque reflux, centrifugées à 5 000 rpm (4 024 g) pendant 5 minutes puis dispersées dans de l'eau distillée. A la fin de ce protocole, les nanodiamants sont considérés comme terminés par des groupements carboxyles de surface.

Les vapeurs toxiques (NO_x) sont poussées par un flux d'argon et absorbées par deux pièges remplis d'urée. La figure 4.19 montre le montage de verrerie final.

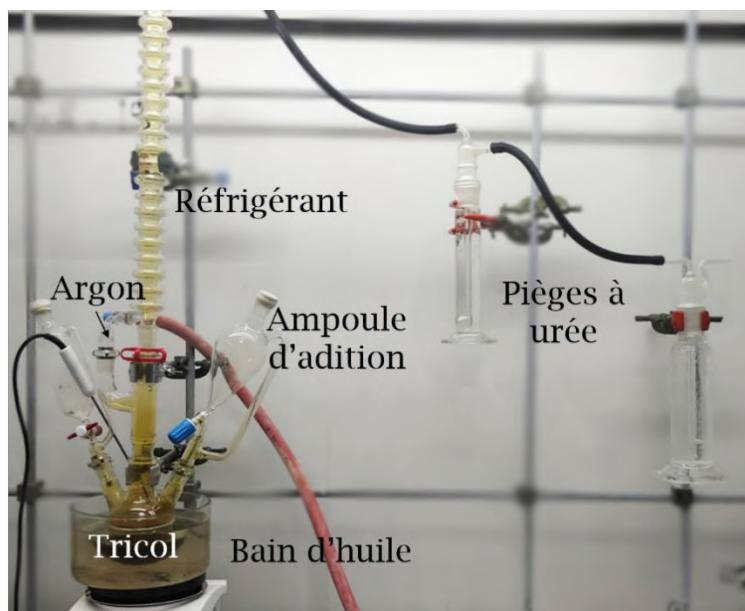


Figure 4.19 : Montage de la verrerie utilisée pour le nettoyage des nanodiamants.

II.2 - Fonctionnalisation avec des ligands de surface

La biotinylation des nanodiamants se fait dans un Eppendorf, où 1 mg de sulfo-NHS-biotin et 1 mg d'EDC (N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) sont dissous dans 50 µL de tampon de sodium de phosphate (NaP) avant l'ajout de 200 µL de particules fraîchement nettoyées. Enfin, 1 mg de poly-L-lysine (PLLs) est introduit et mélangé à la micropipette avant d'être laissé au repos pour la nuit à température ambiante.

II.3 - Nanodiamants Adamas Nanotechnologies

La suspension de nanodiamants de chez Microdiamants n'a qu'un faible pourcentage de particules avec un ou plusieurs centres fluorescents. Afin d'augmenter la probabilité de trouver un nanodiamond émetteur, lors du greffage d'un seul nanodiamond par nanostructure plasmonique, nous avons utilisé d'autres nanodiamonds contenant un haut pourcentage de centre NV (3 par million d'atomes de carbone), produits par Adamas Nanotechnologies. Il s'agit de particules carboxylées ou biotinyllées suspendues de 30-40 nm de diamètre dans de l'eau distillée. Le spectre de fluorescence et d'absorption des nanodiamonds Adamas utilisés est présenté en figure 4.20 (en rouge).

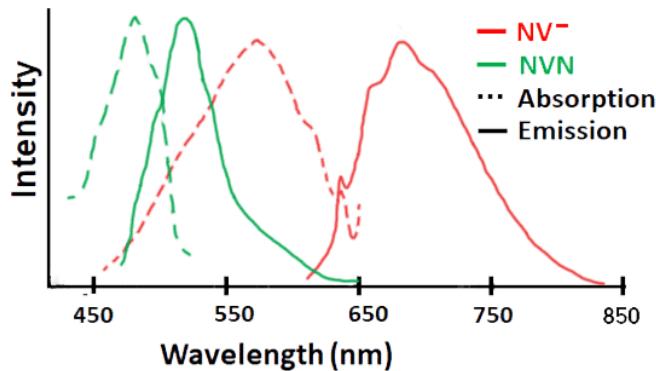


Figure 4.20 : Spectre d'absorption (en rouge pointillé) et d'émission (en rouge) des nanodiamants Adamas utilisés. [39]

III - Réalisation des assemblages "plasmon-émetteur"

III.1 - Assemblage à base de prismes protéinés

III.1.1 - Prismes protéinés et clusters d'or

Pour la réalisation des assemblages de prismes protéinés avec des nanoclusters d'or, 15 µL de prismes protéinés α -Rep fonctionnalisés avec de la streptavidine (chapitre 3) sont mélangés avec 15 µL de nanoclusters AuNC_i stabilisés avec des PEG-biotinylés (4i). Une expérience contrôle remplace les clusters (4i) par des clusters fonctionnalisés aminés (3i), ne comportant donc pas la fonction biotine. Les concentrations des solutions de clusters ont été ajustées pour égaliser leur (densité optique) D.O. à 510 nm.

Les solutions d'assemblage ont ensuite été caractérisées par spectroscopie de fluorescence à $\lambda_{ex} = 330$ nm. Les spectres des deux mélanges ainsi que le spectre de la solution de clusters (4i) dilués deux fois sont présentés figure 4.21. On note une très forte diminution de la fluorescence du mélange entre les prismes protéinés et les clusters biotinylés (4i). Ceci suggère un quenching de la fluorescence des AuNC_i une fois qu'ils sont à proximité directe des surfaces d'or. Le spectre de l'expérience de contrôle montre une diminution de 43 % de la fluorescence, qui peut être attribuée à un quenching non spécifique. Cette diminution est faible en comparaison à celle de 96 % observée lors de l'assemblage dirigé des structures.

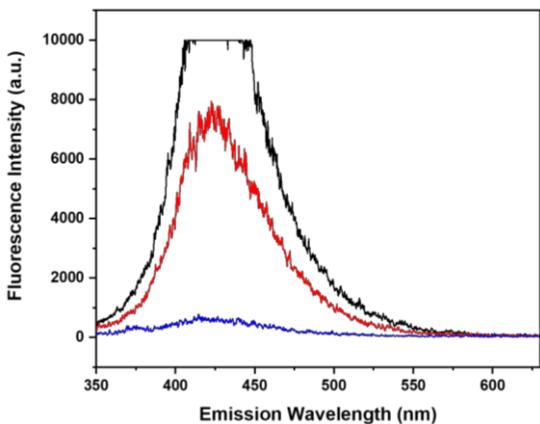


Figure 4.21 : Spectres de fluorescence à $\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}$: des clusters à base d'indole (4i) seuls (en noir), du mélange contrôle de prismes streptavidinés et de clusters non biotinylés (en rouge) et du mélange de prismes streptavinidés et de clusters biotinylés (en bleu).

III.1.2 - Prismes protéinés et nanodiamants

Pour la réalisation des assemblages de prismes protéinés avec des nanodiamants, 15 μL de prismes protéinés fonctionnalisés avec de la streptavidine sont mélangés avec 15 μL de solution de nanodiamants biotinylés.

Lorsque les diamants sont utilisés sans dilution préalable, ils recouvrent entièrement les plaquettes formant des structures satellites, rappelant celles réalisées avec des nanoparticules sphériques d'or présentées paragraphe II.1 du chapitre 3. [40] Les nanodiamants sont présents en léger défaut comme le montre l'absence de diamants isolés et la présence de quelques plaquettes isolées sur la figure 4.22. Les nanodiamants formant une gangue isolante autour des plaquettes, les images SEM paraissent légèrement floues.

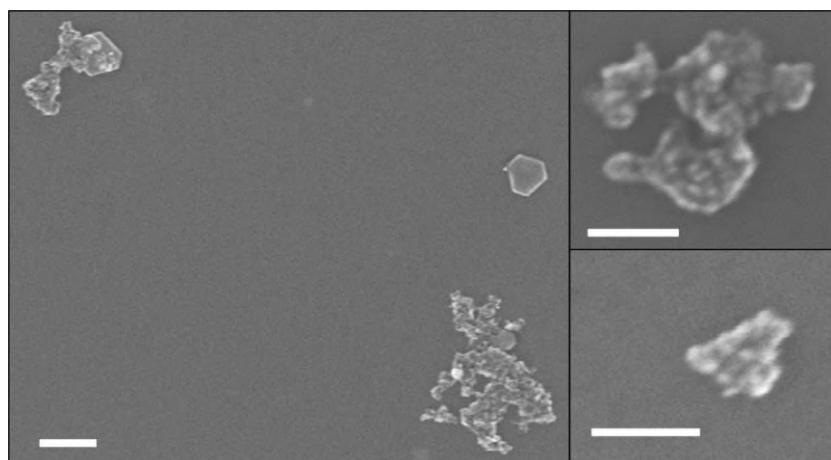


Figure 4.22 : Images SEM des assemblages de nanoprismes streptavidinés et de nanodiamants biotinylés déposés sur silicium. Les images à droite sont des zooms sur des assemblages contenant des nanodiamants. Échelles 200 nm.

En diluant 100 fois les suspensions de diamants fonctionnalisés biotine, nous obtenons des assemblages où les prismes sont soit fonctionnalisés avec quelques (< 3) diamants (figure 4.23). Les diamants sont le plus souvent disposés sur les faces (111) des prismes, indiqués par les flèches blanches dans les inserts de la figure 4.23.

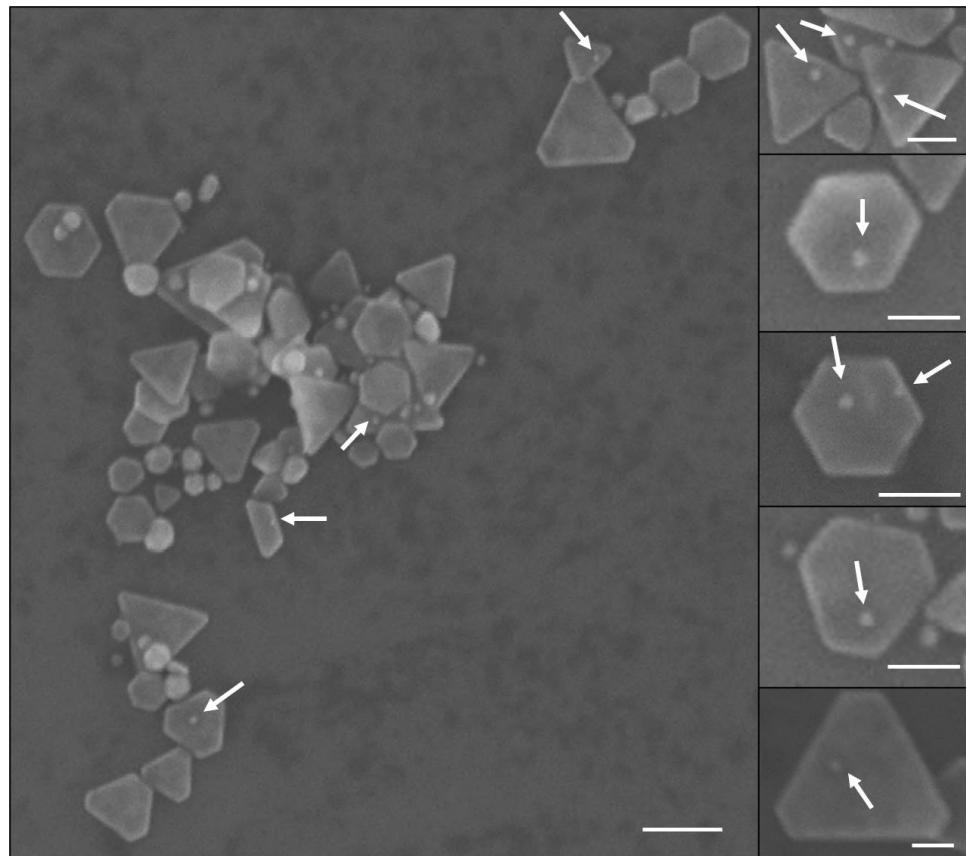


Figure 4.23 : Images SEM des assemblages de nanoprismes streptavidinés et de nanodiamants biotinylés déposés sur silicium. Les images à droite sont des zooms sur des assemblages contenant un nanodiamant. Échelles 200 nm à gauche et 100 nm à droite.

III.2 - Assemblage à base de microplaquettes

Des contraintes expérimentales des mesures optiques, qui seront détaillées au chapitre 5, nous ont amené à préparer des échantillons hybrides dans lesquels la structure plasmonique est obtenue à partir de suspensions de microplaquettes de grande taille. Dans ce cas, les assemblages hybrides sont faits par co-dépôt aléatoire.

Les microplaquettes sont déposées sur un substrat de verre/ITO, puis rincées avec une solution d'éthanol 10 %. Le substrat est ensuite placé dans une tournette, où 10 μL de nanodiamants Adamas dilués sont déposés par spin-coating. Les diamants sont alors aléatoirement dispersés sur la surface et sur les microplaquettes. Les images SEM de la figure 4.24 présentent des

échantillons où les nanodiamants sont dilués 10 fois (figures 4.24.a-c) ou 1 000 fois (figures 4.24.d-f) par rapport à la solution commerciale afin d'ajuster le nombre de diamants par plaquette. Dans les figures 4.24.d-f, les quelques nanodiamants positionnés sur ou contre les microplaquettes d'or sont indiqués par des flèches blanches.

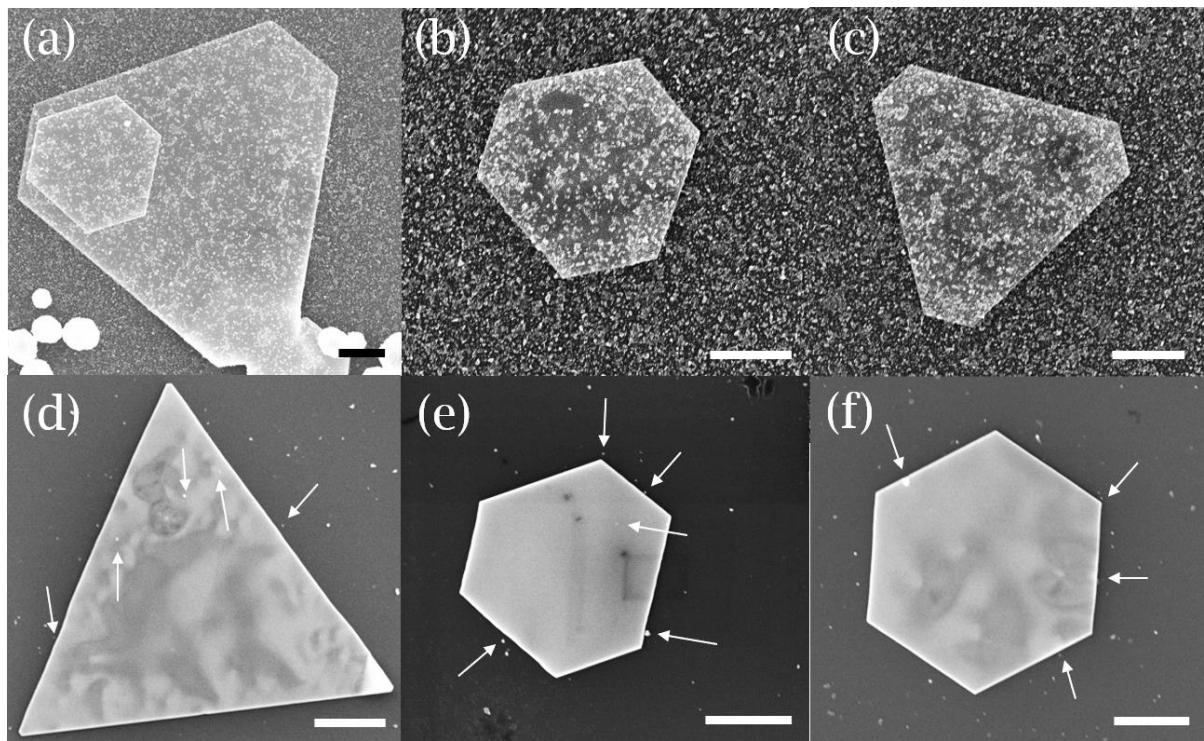


Figure 4.24 : Images SEM des échantillons de microplaquettes et de nanodiamants Adamas sur verre/ITO (a-c) dilués 10 fois et (d-f) dilués 1 000 fois. Les barres d'échelle sont de 1 μ m.

IV - Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté une synthèse en une seule étape, dans de l'EG, de clusters AuNC_a rouges, verts et bleus dont la solution montre une luminescence blanche assez pure lors d'une excitation à large bande de 350-500 nm. Une variante de cette synthèse permet d'obtenir des clusters AuNC_i avec une émission bleue vive. La taille de leur cœur d'atomes d'or a été identifiée en combinant des méthodes structurelles et photophysiques. La solution des AuNC_a est composée d'un mélange de clusters Au6 (bleu), Au11 (vert) et Au22 (rouge), tandis que la solution des AuNC_i est composée de clusters Au5 (violet) et l'Au7 (bleu). Ces derniers présentent un rendement quantique très élevé, qui les place parmi les clusters d'or les plus brillants de la littérature pour une émission bleue. De plus, nous avons montré que tous les AuNC pouvaient être fonctionnalisés avec des ligands thioPEG portant des groupes terminaux carboxylate, amine ou biotine et stabilisés dans l'eau. Aucun changement significatif de leurs propriétés optiques n'a été observé lors de la fonctionnalisation.

Cette fonctionnalisation avec de la biotine, a notamment permis de réaliser des assemblages entre des clusters d'or et des nanoprismes d'or protéinés. Un quenching de la fluorescence des clusters est observé en solution, indiquant le succès de l'assemblage.

Nous avons également choisi de réaliser des assemblages avec des nanodiamants, qui sont un autre type d'émetteur qui nous semblait adapté à ce sujet. Dans ce chapitre, des assemblages ont été réalisés de deux manières, par couplage biotine-streptavidine avec des nanoprismes d'or et par dispersion aléatoire sur des nanoplaquettes d'or. Ces deux systèmes résolus spatialement nous permettent d'avoir des structures hybrides adaptées aux mesures CL-TEM ou optiques qui nécessiteront, elles des objets commensurables avec les longueurs d'onde visible.

Références

1. I. Chakraborty and T. Pradeep, "Atomically Precise Clusters of Noble Metals: Emerging Link between Atoms and Nanoparticles," *Chemical Reviews* **117**, 8208–8271 (2017).
2. M. Zhu, C. M. Aikens, F. J. Hollander, G. C. Schatz, and R. Jin, "Correlating the Crystal Structure of A Thiol-Protected Au₂₅ Cluster and Optical Properties," *Journal of the American Chemical Society* **130**, 5883–5885 (2008).
3. Y. Shichibu, Y. Negishi, T. Tsukuda, and T. Teranishi, "Large-Scale Synthesis of Thiolated Au₂₅ Clusters via Ligand Exchange Reactions of Phosphine-Stabilized Au₁₁ Clusters," *Journal of the American Chemical Society* **127**, 13464–13465 (2005).
4. H. Kawasaki, K. Hamaguchi, I. Osaka, and R. Arakawa, "ph-Dependent Synthesis of Pepsin-Mediated Gold Nanoclusters with Blue Green and Red Fluorescent Emission," *Advanced Functional Materials* **21**, 3508–3515 (2011).
5. Y. Bao, H.-C. Yeh, C. Zhong, S. A. Ivanov, J. K. Sharma, M. L. Neidig, D. M. Vu, A. P. Shreve, R. B. Dyer, J. H. Werner, and J. S. Martinez, "Formation and Stabilization of Fluorescent Gold Nanoclusters Using Small Molecules," *The Journal of Physical Chemistry C* **114**, 15879–15882 (2010).
6. K. Pyo, V. D. Thanthirige, K. Kwak, P. Pandurangan, G. Ramakrishna, and D. Lee, "Ultrabright Luminescence from Gold Nanoclusters: Rigidifying the Au(I)-Thiolate Shell," *Journal of the American Chemical Society* **137**, 8244–8250 (2015).
7. L. Shang, N. Azadfar, F. Stockmar, W. Send, V. Trouillet, M. Bruns, D. Gerthsen, and G. U. Nienhaus, "One-Pot Synthesis of Near-Infrared Fluorescent Gold Clusters for Cellular Fluorescence Lifetime Imaging," *Small* **7**, 2614–2620 (2011).
8. X. Kang and M. Zhu, "Tailoring the photoluminescence of atomically precise nanoclusters," *Chemical Society Reviews* **48**, 2422–2457 (2019).
9. J. Zheng, C. Zhang, and R. M. Dickson, "Highly Fluorescent, Water-Soluble, Size-Tunable Gold Quantum Dots," *Physical Review Letters* **93**, (2004).
10. J. Zheng, J. T. Petty, and R. M. Dickson, "High Quantum Yield Blue Emission from Water-Soluble Au₈ Nanodots," *Journal of the American Chemical Society* **125**, 7780–7781 (2003).
11. F. Bertorelle, C. Moulin, A. Soleilhac, C. Comby-Zerbino, P. Dugourd, I. Russier-Antoine, P.-F. Brevet, and R. Antoine, "Bulky Counterions: Enhancing the Two-Photon Excited Fluorescence of Gold Nanoclusters," *ChemPhysChem* **19**, 165–168 (2018).
12. Z. Guo, Y. Zhang, Y. DuanMu, L. Xu, S. Xie, and N. Gu, "Facile synthesis of micrometer-sized gold nanoplates through an aniline-assisted route in ethylene glycol solution," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **278**, 33–38 (2006).
13. A. S. Pavitt, E. J. Bylaska, and P. G. Tratnyek, "Oxidation potentials of phenols and anilines: correlation analysis of electrochemical and theoretical values," *Environ. Sci.: Processes Impacts* **19**, 339–349 (2017).
14. Ungor, Dékány, and Csapó, "Reduction of Tetrachloroaurate(III) Ions With Bioligands: Role of the Thiol and Amine Functional Groups on the Structure and Optical Features of Gold Nanohybrid Systems," *Nanomaterials* **9**, 1229 (2019).
15. C. Wang, Y. Hu, C. M. Lieber, and S. Sun, "Ultrathin Au Nanowires and Their Transport Properties," *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 8902–8903 (2008).
16. S. H. Yau, O. Varnavski, and T. Goodson, "An Ultrafast Look at Au Nanoclusters," *Accounts of Chemical Research* **46**, 1506–1516 (2013).
17. F. Ostendorf, C. Schmitz, S. Hirth, A. Kühnle, J. J. Kolodziej, and M. Reichling, "How flat is an air-cleaved mica surface?," *Nanotechnology* **19**, 305705 (2008).
18. S. Peters, S. Peredkov, M. Neeb, W. Eberhardt, and M. Al-Hada, "Size-dependent XPS spectra of small supported Au-clusters," *Surface Science* **608**, 129–134 (2013).

19. M. P. Johansson, A. Lechtken, D. Schooss, M. M. Kappes, and F. Furche, "2D-3D transition of gold cluster anions resolved," *Physical Review A* **77**, (2008).
20. M. P. Johansson, I. Warnke, A. Le, and F. Furche, "At What Size Do Neutral Gold Clusters Turn Three-Dimensional?," *The Journal of Physical Chemistry C* **118**, 29370–29377 (2014).
21. A. J. Karttunen, M. Linnolahti, T. A. Pakkanen, and P. Pyykkö, "Icosahedral Au₇₂: a predicted chiral and spherically aromatic golden fullerene," *Chem. Commun.* 465–467 (2008).
22. C. Truillet, F. Lux, O. Tillement, P. Dugourd, and R. Antoine, "Coupling of HPLC with Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Studying the Aging of Ultrasmall Multifunctional Gadolinium-Based Silica Nanoparticles," *Anal. Chem.* **85**, 10440–10447 (2013).
23. J. J. Hagen and C. A. Monnig, "Method for Estimating Molecular Mass from Electrospray Spectra," *Anal. Chem.* **66**, 1877–1883 (1994).
24. A. Soleilhac, F. Bertorelle, C. Comby-Zerbino, F. Chiro, N. Calin, P. Dugourd, and R. Antoine, "Size Characterization of Glutathione-Protected Gold Nanoclusters in the Solid, Liquid and Gas Phases," *The Journal of Physical Chemistry C* **121**, 27733–27740 (2017).
25. F. Bertorelle, I. Russier-Antoine, N. Calin, C. Comby-Zerbino, A. Bensalah-Ledoux, S. Guy, P. Dugourd, P.-F. Brevet, Ž. Sanader, M. Krstić, V. Bonačić-Koutecký, and R. Antoine, "Au₁₀(SG)₁₀: A Chiral Gold Catenane Nanocluster with Zero Confined Electrons. Optical Properties and First-Principles Theoretical Analysis," *The Journal of Physical Chemistry Letters* **8**, 1979–1985 (2017).
26. C. Lavenn, F. Albrieux, A. Tuel, and A. Demessence, "Synthesis, characterization and optical properties of an amino-functionalized gold thiolate cluster: Au₁₀(SPh-pNH₂)₁₀," *Journal of Colloid and Interface Science* **418**, 234–239 (2014).
27. J. Xie, Y. Zheng, and J. Y. Ying, "Protein-Directed Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoclusters," *Journal of the American Chemical Society* **131**, 888–889 (2009).
28. H. Wei, Z. Wang, L. Yang, S. Tian, C. Hou, and Y. Lu, "Lysozyme-stabilized gold fluorescent cluster: Synthesis and application as Hg²⁺ sensor," *The Analyst* **135**, 1406 (2010).
29. A. J. Lawaetz and C. A. Stedmon, "Fluorescence Intensity Calibration Using the Raman Scatter Peak of Water," *Appl Spectrosc* **63**, 936–940 (2009).
30. K. L. D. M. Weerawardene, H. Häkkinen, and C. M. Aikens, "Connections Between Theory and Experiment for Gold and Silver Nanoclusters," *Annu. Rev. Phys. Chem.* **69**, 205–229 (2018).
31. V. Bonačić-Koutecký and R. Antoine, "Enhanced two-photon absorption of ligated silver and gold nanoclusters: theoretical and experimental assessments," *Nanoscale* **11**, 12436–12448 (2019).
32. M. Walter, J. Akola, O. Lopez-Acevedo, P. D. Jazdinsky, G. Calero, C. J. Ackerson, R. L. Whetten, H. Gronbeck, and H. Hakkinen, "A unified view of ligand-protected gold clusters as superatom complexes," *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 9157–9162 (2008).
33. T. Ritman-Meer, N. I. Cade, and D. Richards, "Spatial imaging of modifications to fluorescence lifetime and intensity by individual Ag nanoparticles," *Appl. Phys. Lett.* **91**, 123122 (2007).
34. J.-H. Jou, Y.-T. Su, S.-H. Liu, Z.-K. He, S. Sahoo, H.-H. Yu, S.-Z. Chen, C.-W. Wang, and J.-R. Lee, "Wet-process feasible candlelight OLED," *J. Mater. Chem. C* **4**, 6070–6077 (2016).
35. S. Muthu, F. J. P. Schuurmans, and M. D. Pashley, "Red, Green, and Blue LEDs for White Light Illumination," *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **8**, 333–338 (2002).
36. M. A. Baldo, D. F. O'Brien, Y. You, A. Shoustikov, S. Sibley, M. E. Thompson, and S. R. Forrest, "Highly efficient phosphorescent emission from organic electroluminescent devices," *Nature* **395**, (1998).

-
37. N. Thejokalyani and S. J. Dhoble, "Novel approaches for energy efficient solid state lighting by RGB organic light emitting diodes - A review," *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **32**, 448-467 (2014).
 38. D. R. Glenn, H. Zhang, N. Kasthuri, R. Schalek, P. K. Lo, A. S. Trifonov, H. Park, J. W. Lichtman, and R. L. Walsworth, "Correlative light and electron microscopy using cathodoluminescence from nanoparticles with distinguishable colours," *Sci Rep* **2**, 865 (2012).
 39. Adamas Nano, "Functionalized Fluorescent Nanodiamonds," <https://www.adamasnano.com/functionalized-fluorescent-bioprobe/#CarboxylatedRed>.
 40. J. Prasad, S. Viollet, K. L. Gurunatha, A. Urvoas, A. C. Fournier, M. Valerio-Lepiniec, C. Marcelot, B. Baris, P. Minard, and E. Dujardin, "Directed evolution of artificial repeat proteins as habit modifiers for the morphosynthesis of (111)-terminated gold nanocrystals," *Nanoscale* **11**, 17485-17497 (2019).

Chapitre 5

Études optiques des modes plasmoniques : de la particule d'or à l'assemblage hybride

I - Étude de nanoprismes d'or par cathodoluminescence

I.1 - Étude par cathodoluminescence : motivation et mesures

Dans le cadre de notre projet, nous nous intéressons principalement à la possibilité d'exciter une particule émettrice par les plasmons d'une particule métallique. Les électrons exciteraient un mode plasmon d'une particule métallique. Puis, ce plasmon se propagerait à travers un canal de transfert jusqu'à un émetteur. Ce phénomène est illustré figure 5.1.

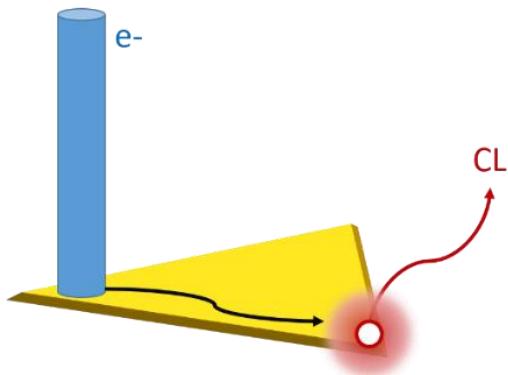


Figure 5.1 : Schéma de l'excitation d'un émetteur à distance par propagation d'un plasmon de surface.

Parmi les techniques permettant de sonder les modes plasmoniques d'un métal, les spectroscopies électroniques CL et EELS par TEM sont les plus résolues et donnent accès à la distribution spatiale des modes SP multipolaires et des modes optiquement sombres [1] avec une résolution sub-nanométrique. [2,3] La première donne des informations uniquement sur les modes radiatifs, alors que la seconde révèle également les modes sombres. [4]

Nous avons tout d'abord cherché à caractériser les modes présents dans les particules métalliques seules. Les petits prismes (< 400 nm) métalliques (or ou

argent) ne montrent que le mode dipolaire et ont été largement caractérisés en EELS et CL. [5,6] Ici, nous souhaitons utiliser de plus gros prismes (> 500 nm) où la propagation des modes plasmons pourra se faire. Des prismes de cette taille ont déjà été caractérisés en EELS, mais pas encore en CL. [5,7] Cette étude nous permettra de connaître les positions des modes rayonnants des prismes, aux longueurs d'onde pouvant exciter différentes particules émettrices (notamment les nanodiamants et nanoclusters).

Nous avons donc décidé de nous concentrer sur l'étude de nos particules par cathodoluminescence, où le rayonnement optique induit émis par la particule plasmonique est détecté et imaginé. [8] Les données ont été acquises lors de trois campagnes de mesures, avec nos collaborateurs de l'IMRE A*STAR à Singapour M. Bosman et Z. Mahfoud. Les échantillons ont été réalisés sur place afin de préserver les grilles TEM fragiles.

Les données CL sont regroupées dans des data-cubes comportant le spectre d'intensité de la luminescence, collectée lors de l'excitation de la surface métallique par le faisceau électronique en chaque point (x,y). La gamme de longueurs d'onde mesurée ici est 550-950 nm. Ces données permettent de tracer une cartographie du rayonnement CL émis à une longueur d'onde donnée. Sur la figure 5.2, on considère un prisme de 560 nm de côté représenté à gauche. Les deux cartes entourées en bleu et en vert sont prises respectivement à $\lambda = 661$ nm et $\lambda = 861$ nm. Ces deux longueurs d'onde correspondent au maximum d'intensité des pics relevés du spectre mesuré sur le coin d'un prisme d'or (spectre orange de la figure 5.2).

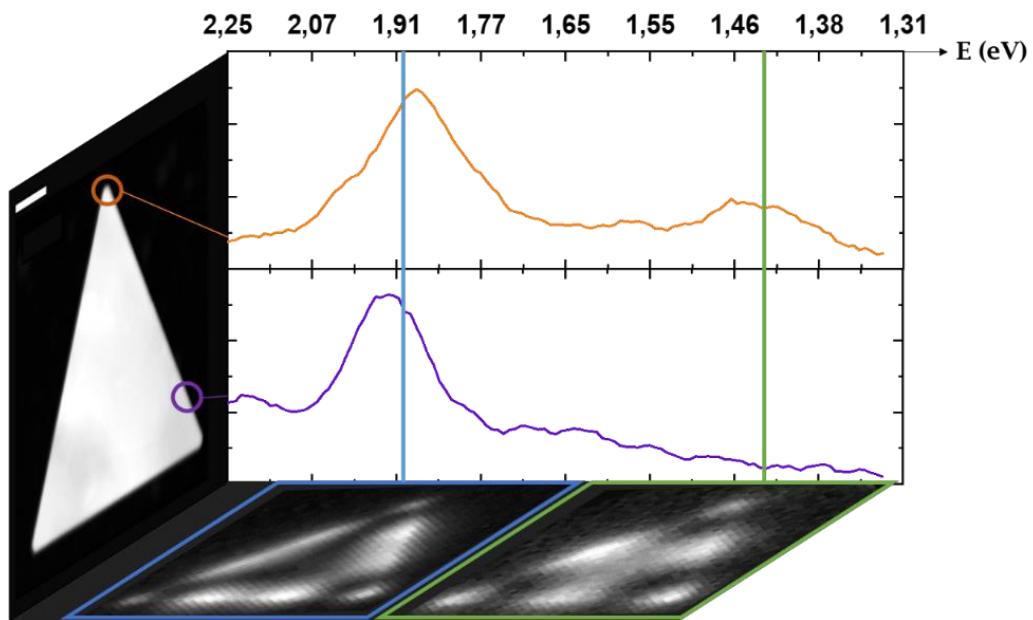


Figure 5.2 : Représentation d'un datacube de mesures. À gauche : image HAADF de la particule, la barre d'échelle est de 100 nm. Au fond : spectres de cathodoluminescence pris au coin (en orange) et à un quart de la longueur (en violet) du prisme. En bas : cartographie de l'intensité lumineuse mesurée au maximum des deux pics du spectre orange, à $\lambda = 661$ nm (en bleu) et $\lambda = 861$ nm (en vert).

Les cartes d'intensité CL obtenues sont très résolues spatialement et permettent de localiser précisément des modes. Sur la figure 5.3.a, l'intensité des modes sur les coins du triangle ne fait que 40 nm de large. La cathodoluminescence en TEM permet donc de séparer précisément les modes d'une particule contrairement à une technique optique comme la TPL où les modes plasmons sont étalés sur une centaine de nanomètres. Une telle résolution est particulièrement intéressante pour des systèmes avec des modes d'ordre élevé, comme c'est le cas de particules de taille supérieure à 400 nm.

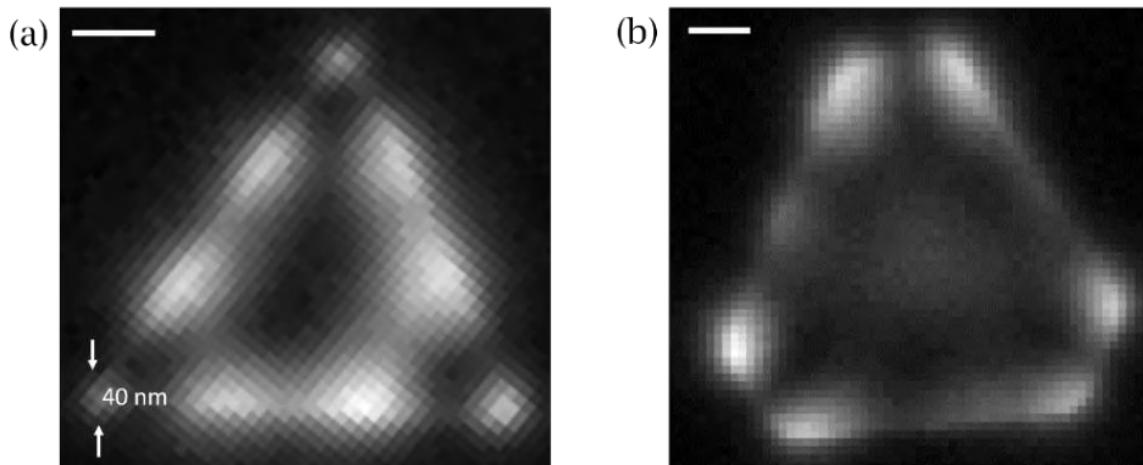


Figure 5.3 : Cartes CL d'un (a) triangle pointu de 560 nm de longueur et (b) triangle tronqué de 900 nm de côté avec une troncature de 210 nm. Les barres d'échelles sont de 100 nm.

La CL concerne la capacité de la nanostructure à diffuser le champ électromagnétique évanescents, porté par l'électron dans le champ lointain et sonde la somme des pertes radiatives de la particule. Une relation étroite entre les spectroscopies à base d'électrons rapides et les propriétés optiques a été soulignée dans les interprétations qualitatives des expériences de la CL en termes de diffusion. [5,9-11] La mesure de la CL globale de la particule est donc comparable à sa diffusion. La figure 5.4 compare la CL globale d'un prisme de 900 nm avec une troncature de 210 nm (figure 5.4.b) et la diffusion en champ sombre d'un prisme de 880 nm de côté avec une troncature de 165 nm (figure 5.4.c). Les formes de ces deux spectres sont très similaires. Précédemment, il a été admis que la diffusion en champ sombre était une somme des participations des différents modes radiatifs du prisme. [12] Dans le cas de particules aux environs de 500 nm de côté, les modes semblent tous radiatifs. La CL en TEM a pour avantage énorme de pouvoir sonder la particule en plusieurs points, donc des modes précis et non uniquement de manière globale.

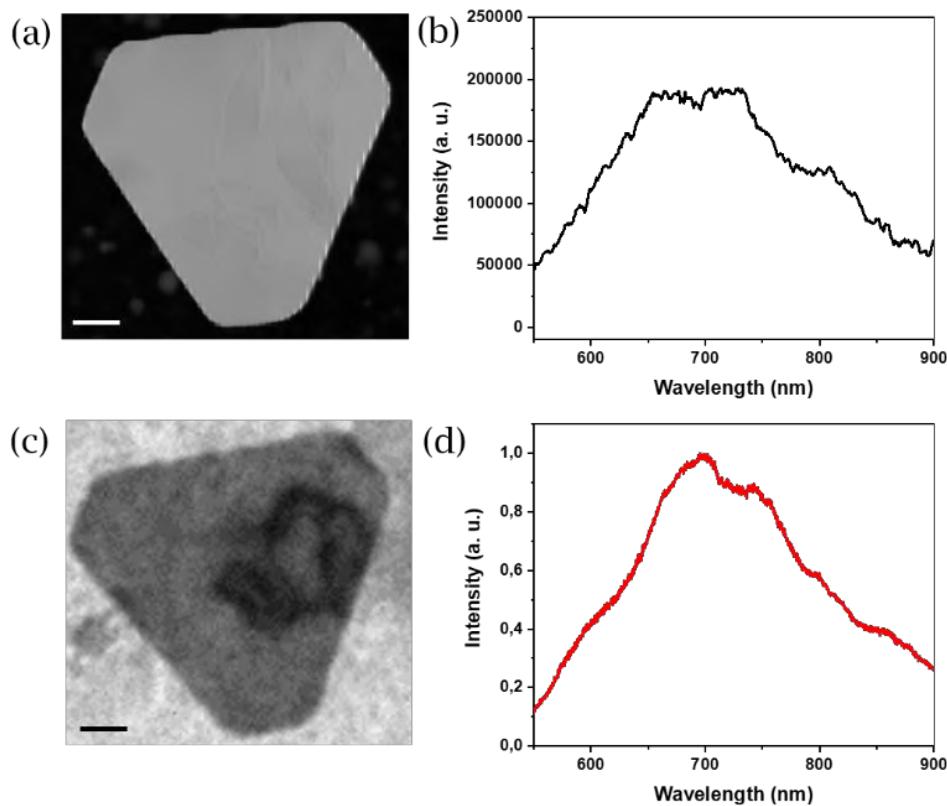


Figure 5.4 : (a) Image HAADF d'un prisme de 900 nm de côté avec une troncature de 210 nm. (b) Spectre CL global de (a). (c) Image TEM d'un prisme de 880 nm de côté avec une troncature de 165 nm. (d) Spectre CL global de (c). Les barres d'échelle font 100 nm.

Les spectres de cathodoluminescence présentés dans la suite de ce chapitre sont lissés avec la méthode de la moyenne des 5 plus proches voisins. Un exemple des spectres avant et après lissage est représenté sur la figure 5.5.

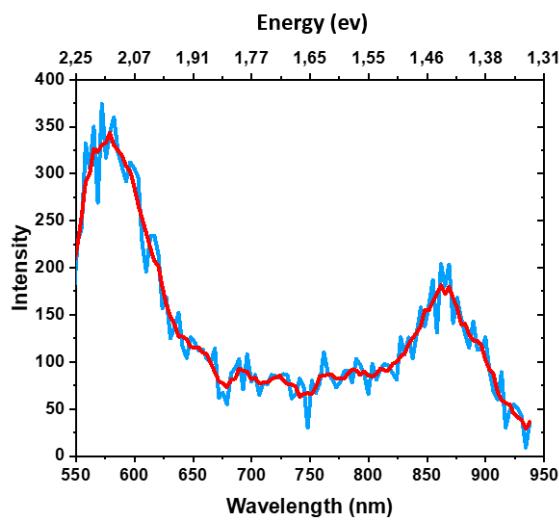


Figure 5.5 : Spectre CL pris au centre d'un triangle de 560 nm tel que mesuré (en bleu) et après lissage par la méthode de la moyenne des 5 plus proches voisins (en rouge).

I.2 - Outil de simulation : GDM

Afin d'interpréter ces mesures de cathodoluminescence, un modèle simple déjà utilisé avec succès pour interpréter des mesures EELS, [13] a été adapté par C. Girard à une configuration CL. Ce modèle a été traduit en outil numérique afin de simuler des spectres et des cartographies numériques des nanoparticules métalliques de géométrie arbitraire. Dans des métaux tels que l'or ou l'argent, la partie réelle de leur constante diélectrique devient négative dans le domaine du visible, compliquant fortement le calcul du champ électromagnétique au voisinage des objets. De plus, le confinement du champ existant à la surface métallique impose de discréteriser la particule en une maille fine. L'une des méthodes numériques permettant de simuler la réponse électromagnétique de particules métalliques, en tenant compte des difficultés citées, est la méthode des dyades de Green (GDM pour *Green dyadic method*) développée par C. Girard au CEMES. [14]

I.2.1 - Présentation de GDM

Cette méthode de calcul est basée sur la discréétisation en volume d'une particule. Considérons une nanoparticule de volume V et de permittivité $\varepsilon_m(\omega)$ disposée sur un substrat de susceptibilité S_s et entourée par un milieu homogène de permittivité $\varepsilon_{env}(\omega)$. La réponse électromagnétique de l'objet est décrite par les équations de Maxwell :

$$\nabla \cdot \mathbf{D}(\mathbf{r}, t) = 4\pi\rho(\mathbf{r}, t) \quad (5.1)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{B}(\mathbf{r}, t) = 0 \quad (5.2)$$

$$\nabla \wedge \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = -\frac{1}{c} \frac{\partial \mathbf{B}(\mathbf{r}, t)}{\partial t} \quad (5.3)$$

$$\nabla \wedge \mathbf{B}(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{c} \frac{\partial \mathbf{D}(\mathbf{r}, t)}{\partial t} + \frac{4\pi}{c} \mathbf{j}(\mathbf{r}, t) \quad (5.4)$$

où $\mathbf{E}(\mathbf{r}, t)$ et $\mathbf{B}(\mathbf{r}, t)$ sont respectivement les composantes électrique et magnétique du champ électromagnétique en présence d'un objet de charge $\rho(\mathbf{r}, t)$ et de densité de courant $\mathbf{j}(\mathbf{r}, t)$.

En combinant les transformées de Fourier de (5.3) et (5.4), nous obtenons l'équation d'onde du champ électromagnétique $\mathbf{E}(\mathbf{r}, \omega)$ en présence de la particule pour un développement multipolaire à l'ordre 1 des densités de courant et de charge [15] :

$$\Delta \mathbf{E}(\mathbf{r}, \omega) + k_0^2 \varepsilon_{env}(\omega) \mathbf{E}(\mathbf{r}, \omega) = -4\pi \left\{ k_0^2 + \frac{1}{\varepsilon_{env}(\omega)} \Delta \right\} \cdot \mathbf{P}(\mathbf{r}, \omega) \quad (5.5)$$

où k_0 est le nombre d'onde dans le vide et $\mathbf{P}(\mathbf{r}, \omega)$ la polarisation au point \mathbf{r} . La solution générale de cette équation avec le formalisme de Green a la forme :

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, \omega) = \mathbf{E}_0(\mathbf{r}, \omega) + \int \mathbf{S}_0(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \omega) \cdot \mathbf{P}(\mathbf{r}', \omega) d\mathbf{r}' \quad (5.6)$$

où $\mathbf{S}_0(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \omega)$ est un tenseur dyadique (c'est-à-dire d'ordre 2) s'écrivant :

$$\mathbf{S}_0(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \omega) = \frac{e^{ik|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|}}{\varepsilon_{env}(\omega)} [-k^2 \mathbf{T}_1(\mathbf{r}-\mathbf{r}') - ik \mathbf{T}_2(\mathbf{r}-\mathbf{r}') + \mathbf{T}_3(\mathbf{r}-\mathbf{r}')] \quad (5.7)$$

où $\mathbf{T}_1, \mathbf{T}_2$ et \mathbf{T}_3 sont trois tenseurs s'exprimant selon le tenseur identité \mathbf{I} comme :

$$\mathbf{T}_1(\mathbf{r}-\mathbf{r}') = \frac{(\mathbf{r}-\mathbf{r}')(\mathbf{r}-\mathbf{r}') - |(\mathbf{r}-\mathbf{r}')|^2 \mathbf{I}}{|(\mathbf{r}-\mathbf{r}')|^3} \quad (5.8)$$

$$\mathbf{T}_2(\mathbf{r}-\mathbf{r}') = \frac{3(\mathbf{r}-\mathbf{r}')(\mathbf{r}-\mathbf{r}') - |(\mathbf{r}-\mathbf{r}')|^2 \mathbf{I}}{|(\mathbf{r}-\mathbf{r}')|^4} \quad (5.9)$$

$$\mathbf{T}_3(\mathbf{r}-\mathbf{r}') = \frac{3(\mathbf{r}-\mathbf{r}')(\mathbf{r}-\mathbf{r}') - |(\mathbf{r}-\mathbf{r}')|^2 \mathbf{I}}{|(\mathbf{r}-\mathbf{r}')|^5} \quad (5.10)$$

Pour une réponse locale de la matière, la polarisation en fonction de la susceptibilité $\chi(\mathbf{r}', \omega)$ de la nanoparticule s'écrit :

$$\mathbf{P}(\mathbf{r}', \omega) = \chi(\mathbf{r}', \omega) \cdot \mathbf{E}(\mathbf{r}', \omega) \quad (5.11)$$

La susceptibilité de la particule est nulle en tout point extérieur à l'objet et vaut pour toute position \mathbf{r}' dans l'objet :

$$\chi(\mathbf{r}', \omega) = \frac{\varepsilon_m(\omega) - \varepsilon_{env}(\omega)}{4\pi} \quad (5.12)$$

Cette hypothèse de localité de la matière permet de réécrire l'équation (5.6) avec une forme de type Lippmann-Schwinger dans le cas général d'une particule de forme quelconque en fonction de la susceptibilité du champ du système $\mathbf{S}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \omega)$ par une méthode de résolution numérique [16] :

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, \omega) = \mathbf{E}_0(\mathbf{r}, \omega) + \int_V \mathbf{S}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \omega) \cdot \chi(\mathbf{r}', \omega) \cdot \mathbf{E}(\mathbf{r}', \omega) d\mathbf{r}' \quad (5.13)$$

où

$$\mathbf{S}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \omega) = \mathbf{S}_{surf}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \omega) + \int_V \mathbf{S}_{surf}(\mathbf{r}, \mathbf{r}'', \omega) \cdot \chi(\mathbf{r}'', \omega) \cdot \mathbf{S}(\mathbf{r}'', \omega) d\mathbf{r}'' \quad (5.14)$$

avec $\mathbf{S}_{surf} = \mathbf{S}_0 + \mathbf{S}_s$ étant le paramètre contenant la totalité de la contribution du substrat.

Ces deux dernières équations sont auto-cohérentes puisque l'inconnue apparaît de part et d'autre des équations. Pour résoudre l'équation (5.14) le volume V de la particule est discréteisé en N cellules élémentaires de volume V_i .

En plus du calcul du champ électrique, GDM permet de calculer d'autres observables, tels que la densité de charge, [17] la LDOS photonique, [18] la variation en température [19] ou encore les réponses EELS ou TPL d'une particule. [13,20]

I.2.2 - Application à la cathodoluminescence

Dans le cas des calculs de spectres et de cartes CL, on considère un faisceau électronique comme champ incident. Pour illustrer la manière dont un électron rapide convertit une partie de son énergie cinétique ΔE_0 en oscillations plasmoniques, considérons une trajectoire rectiligne d'un électron passant près d'une particule métallique sphérique. Un schéma représentant le système est présenté sur la figure 5.6.

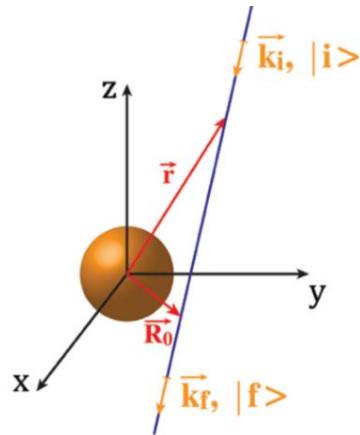


Figure 5.6 : Vue schématique de la trajectoire rectiligne d'un électron passant près d'une sphère métallique.

Un événement inélastique entre l'électron et la particule équivaut à une transition entre un premier état électronique occupé $|i\rangle$ et un état final inoccupé $|f\rangle$ de l'électron en mouvement. Les deux fréquences de Bohr, ω_i et ω_f , associées respectivement à $|i\rangle$ et $|f\rangle$ doivent vérifier $\omega_i \geq \omega_f$. L'élément matriciel de la densité de courant associé à cette transition électronique est donné par la relation [21] :

$$\mathbf{J}_{i,f}(\mathbf{r}, t) = -\frac{ie\hbar}{2m}\{(\nabla_r \psi_f^*(\mathbf{r}, t))\psi_i^*(\mathbf{r}, t) - \psi_f^*(\mathbf{r}, t)(\nabla_r \psi_i(\mathbf{r}, t))\} \quad (5.15)$$

où m et e sont la masse et la charge de l'électron respectivement, et $\psi_{i/f}$ définit les fonctions d'onde électroniques correspondant aux états $|i\rangle$ et $|f\rangle$. Dans le régime stationnaire correspondant à une vitesse constante de l'électron, avant et après l'événement du transfert d'énergie, les fonctions d'onde électroniques affichent des termes d'oscillations monochromatiques :

$$\psi_f(\mathbf{r}, t) = e^{i\omega_f t} \Phi_f(\mathbf{r}) = e^{i(\omega_i - \omega_0)t} \Phi_f(\mathbf{r}) \quad (5.16)$$

$$\psi_i(\mathbf{r}, t) = e^{i\omega_i t} \Phi_i(\mathbf{r}) \quad (5.17)$$

avec $\omega_0 = \Delta E_0 / \hbar$ la fréquence angulaire correspondant au transfert d'énergie par l'électron au système plasmonique et $\Phi_{i/f}(\mathbf{r})$ la partie spatiale des fonctions d'onde électroniques, avant et après l'interaction. En ajoutant (5.16) et (5.17) à l'équation (5.15), nous pouvons exprimer la partie réelle du courant inélastique comme :

$$\mathbf{J}_{i,f}(\mathbf{r}, t) = \frac{e\hbar}{2m} \mathbf{A}(\mathbf{r}) \cos(\omega_0 t + \Theta(\mathbf{r})) \quad (5.18)$$

où $\mathbf{A}(\mathbf{r})$ et $\Theta(\mathbf{r})$ sont respectivement le module et l'argument du vecteur complexe :

$$i\{(\nabla_r \Phi_f^*(\mathbf{r}, t))\Phi_i^*(\mathbf{r}, t) - \Phi_f^*(\mathbf{r}, t)(\nabla_r \Phi_i(\mathbf{r}, t))\} \quad (5.19)$$

À partir de l'équation (5.18), le courant inélastique est développé en intégrale de Fourier :

$$\mathbf{J}_{i,f}(\mathbf{r}, t) = \int \mathbf{J}_{i,f}(\mathbf{r}, \omega) e^{i\omega t} d\omega \quad (5.20)$$

avec

$$\mathbf{J}_{i,f}(\mathbf{r}, \omega) = \frac{e\hbar}{2m} \mathbf{A}(\mathbf{r}) \{\delta(\omega_0 + \omega) e^{i\Theta(\mathbf{r})} + \delta(\omega_0 - \omega) e^{-i\Theta(\mathbf{r})}\} \quad (5.21)$$

qui est associé avec le vecteur de polarisation tel que [14] :

$$\mathbf{P}_{i,f}(\mathbf{r}, \omega) = \frac{ie\hbar}{2m} \mathbf{A}(\mathbf{r}) \{\delta(\omega_0 + \omega) e^{i\Theta(\mathbf{r})} + \delta(\omega_0 - \omega) e^{-i\Theta(\mathbf{r})}\} \quad (5.22)$$

Selon l'équation (5.19), la fonction vectorielle $\mathbf{A}(\mathbf{r})$ est construite à partir du produit des deux paquets d'ondes électroniques, attendus avant et après l'apparition du processus inélastique élémentaire. Par conséquent, elle peut être schématisée par une distribution de Dirac (cette distribution est remplacée par une gaussienne de pondération des probabilités de transfert de l'énergie, dans le cas d'une intégration sur toute la trajectoire de l'électron [22]) centrée autour d'un emplacement $\mathbf{R}_0 = (X_0, Y_0, Z_0)$, définissant la position où l'électron a libéré un quantum d'énergie $\hbar\omega_0$:

$$\mathbf{A}(\mathbf{r}) = A\delta(\mathbf{r} - \mathbf{R}_0) \quad (5.23)$$

où le module A du vecteur $\mathbf{A}(\mathbf{r})$ a la dimension inverse d'une longueur. Cette dernière relation indique que chaque événement élémentaire inélastique se produisant à l'endroit \mathbf{R}_0 de la trajectoire de l'électron peut être représenté par un dipôle effectif fluctuant à la fréquence de perte ω_0 :

$$p_{i,f}(\omega) = \frac{ie\hbar A}{2m\omega} \{\delta(\omega_0 + \omega) + \delta(\omega_0 - \omega)\} \quad (5.24)$$

où l'origine de phase $\Theta(\mathbf{R}_0) = 0$ a été choisie égale à zéro pour $\mathbf{r} = \mathbf{R}_0$. Le dipôle de perte est placé dans le plan z à une distance constante D_0 . Dans ce chapitre, pour simuler une image CL, l'énergie diffusée à la fréquence ω est ensuite calculée, pour chaque position $\mathbf{L}_0 = (X_0, Y_0)$ du dipôle de perte à la distance D_0 . Dans le cas d'un spectre CL, l'énergie diffusée pour une position donnée position $\mathbf{L} = (X, Y)$ est calculée pour une gamme de fréquences ω . L'intensité diffusée par unité d'angle solide est donc approximée comme suivant :

$$I_{scat}(\mathbf{L}_0, D_0, \omega) \propto \iint_{\Omega} |\mathbf{S}(\mathbf{r}_{\infty}, \mathbf{R}_0, \omega) \cdot \mathbf{p}_{i,f}(\omega)|^2 d\Omega \quad (5.20)$$

où $\mathbf{S}(\mathbf{r}_{\infty}, \mathbf{R}_0, \omega)$ est la susceptibilité définie par l'équation (5.14) et \mathbf{r}_{∞} une position dans la zone d'émission.

Pour nos calculs, nous avons choisi de positionner le dipôle effectif à une distance z fixe, où l'électron a le plus de probabilité de perdre son énergie, à savoir à $z = 90$ nm pour des objets d'une taille comprise entre 100 nm et 1 μm ayant une épaisseur inférieure à 50 nm. Ce calcul peut être affiné en intégrant sur toute la trajectoire en z et en pondérant par cette probabilité pour éviter les divergences au voisinage immédiat et à une distance très éloignée de la particule. Cette méthode a été appliquée sur différents systèmes avec succès. [22] Cependant, ce type de calcul demande un temps de calcul bien supérieur par rapport à la méthode utilisée dans cette thèse.

I.3 - Données CL comparées avec les simulations

Nous considérons ici, les mesures CL sur trois triangles pointus de 520, 560 et 580 nm de côté et deux triangles tronqués de 745 et 900 nm de côté avec des troncatures de 180 et 210 nm respectivement.

Le volume des particules est discréétisé en un nombre N de cellules de volume élémentaire (entre 3 000 et 11 000 en fonction de la particule). Ce qui se traduit par la création d'un maillage de N points disposés en maille hexagonale de pas 10 nm sur trois couches pour correspondre au mieux avec la particule réelle. Les particules synthétisées n'étant pas toujours parfaitement symétriques, de légers décalages de formes peuvent être observés comme le montre la figure 5.7 avec la superposition du maillage d'un triangle tronqué sur son image TEM HAADF.

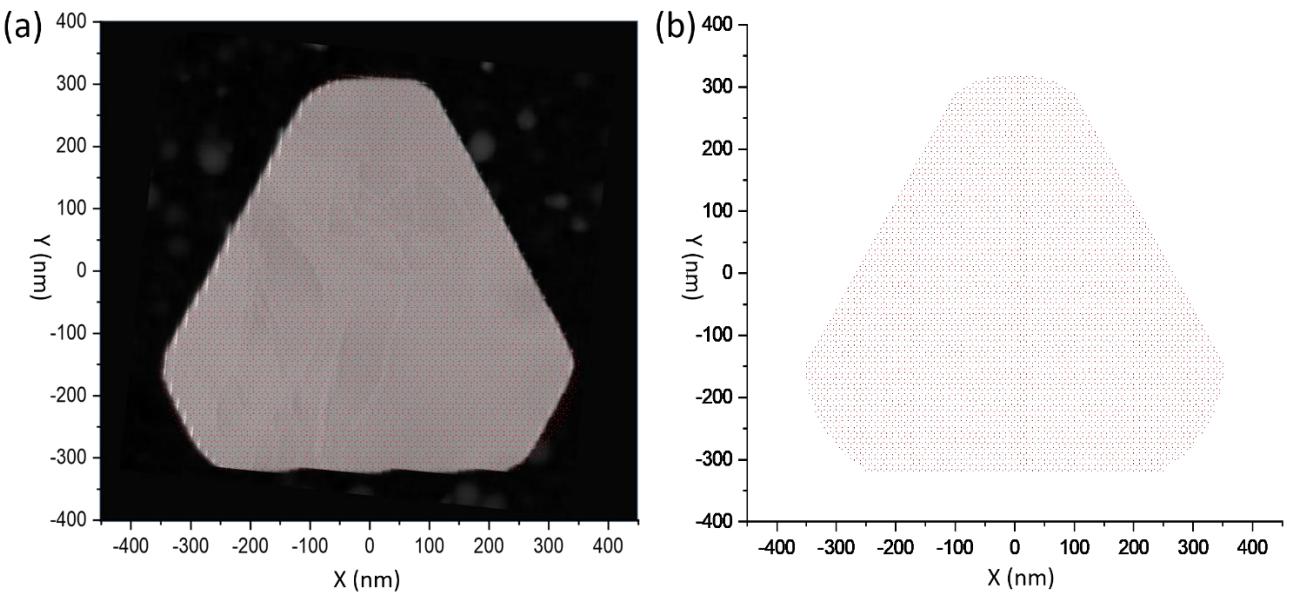


Figure 5.7 : (a) Superposition du maillage hexagonal (points rouges) d'un triangle tronqué de 900 nm avec une troncature de 210 nm sur son image TEM HAADF. (b) Maillage hexagonal seul.

I.3.1 - Triangle pointu (560 nm)

La figure 5.8.a présente une image TEM HAADF d'un triangle pointu de 560 nm de côté. La figure 5.8.b positionne sur un schéma du même triangle, des cercles de couleurs indiquant les points où les spectres ont été mesurés (figure 5.8.d) et simulés par la méthode GDM (5.8.c).

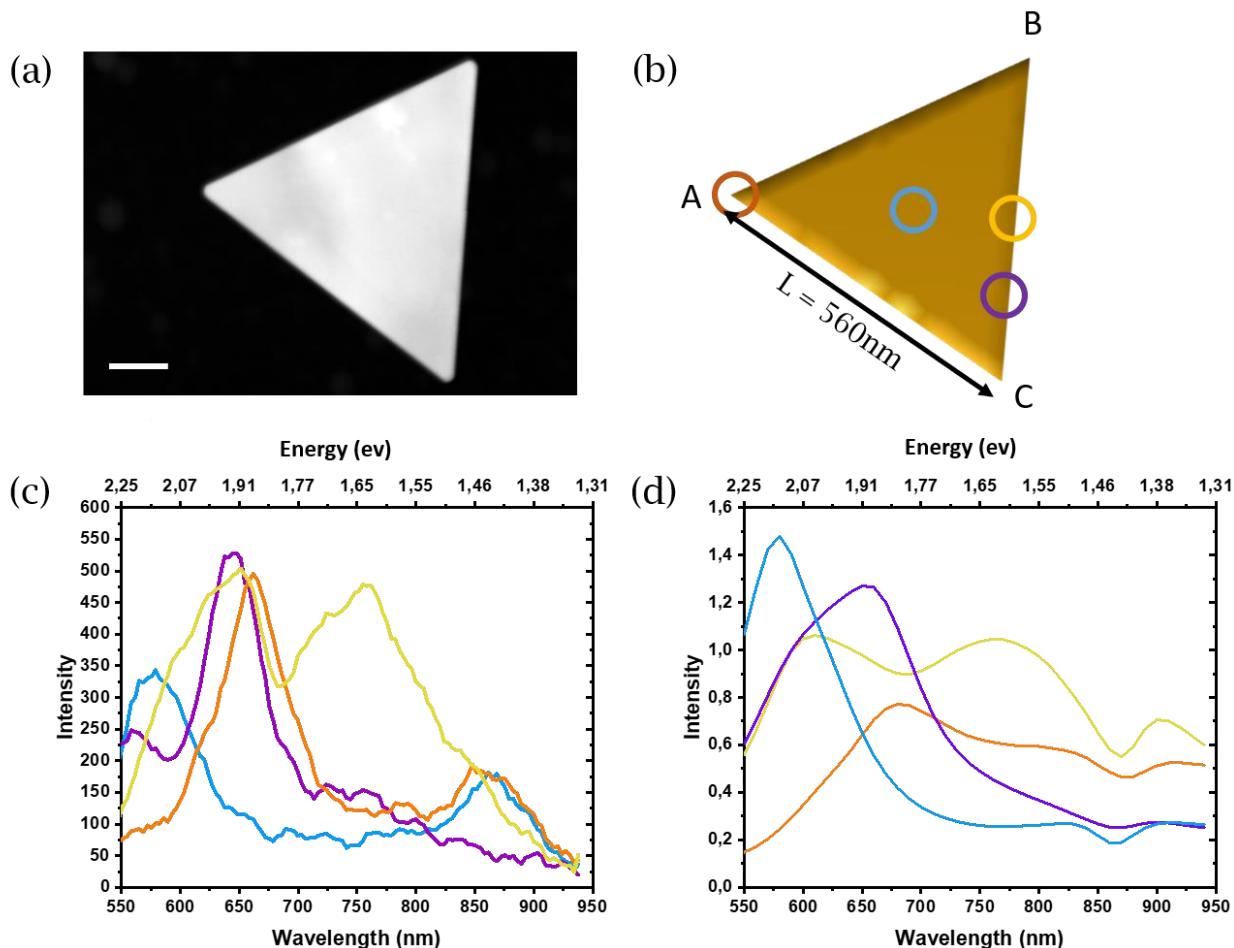


Figure 5.8 : (a) Image TEM HAADF d'un prisme d'or de 560 nm de côté, la barre d'échelle est de 100 nm. (b) Schéma présentant le même triangle que (a). Les cercles de couleurs indiquent les positions où les spectres ont été simulés et mesurés, placés en orange sur le coin A, en bleu au centre, en jaune au milieu du côté BC et en violet au quart du côté BC. (c) et (d) spectres CL respectivement mesurés et simulés, les couleurs des spectres correspondent aux couleurs des positions indiquées en (b).

Les spectres simulés semblent posséder le même nombre de pics que les spectres mesurés, bien que possédant des intensités relatives différentes. Les longueurs d'onde de résonance des pics simulés et mesurés sont en bonne adéquation en fonction de la zone sondée. Pour plus de visibilité sur ce point, les courbes ont été tracées par paire pour chaque point sur la figure 5.9. Nous notons toutefois, une petite différence des spectres vers 880 nm qui sera discutée plus loin.

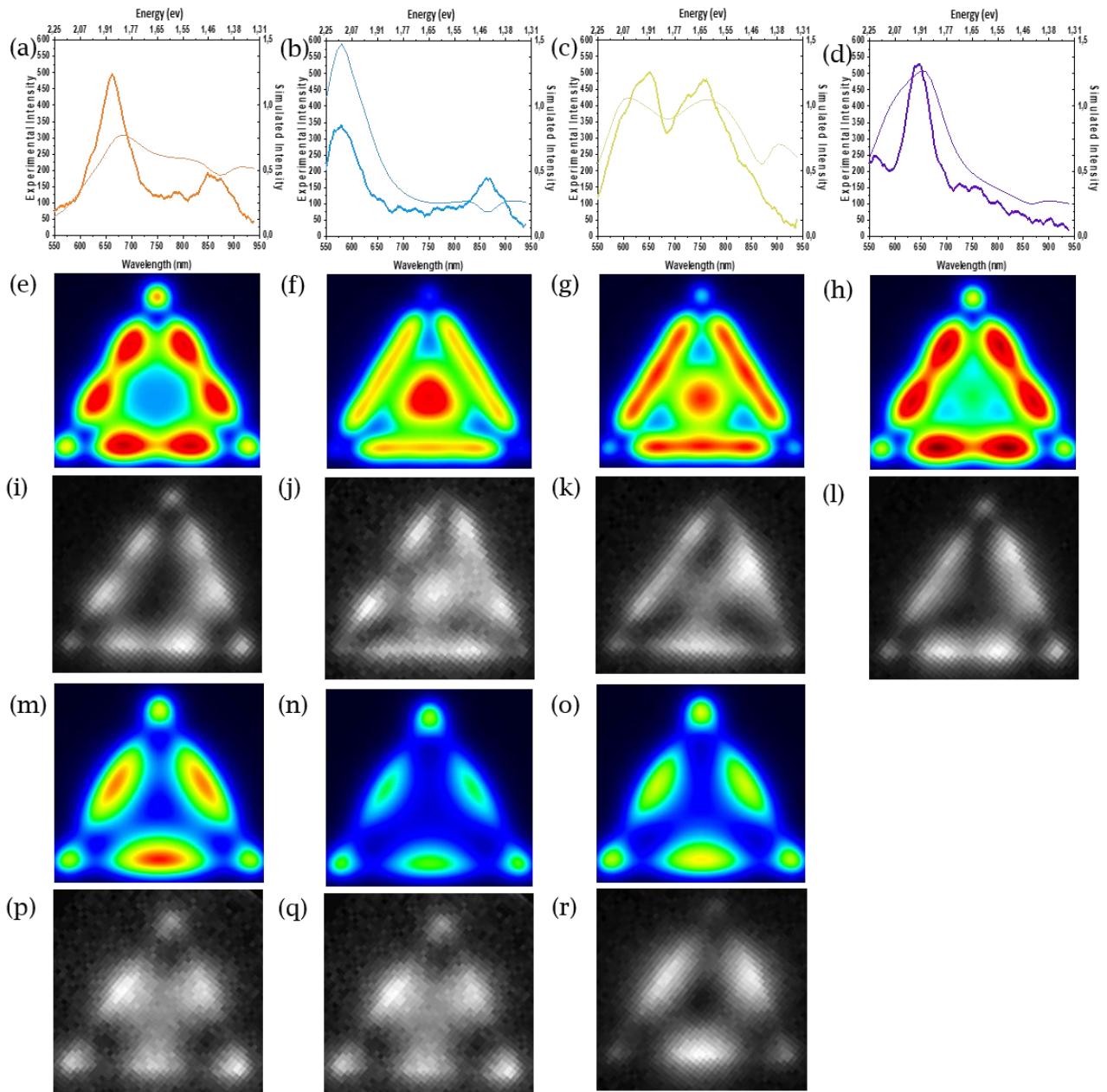


Figure 5.9 : (a-d) Spectres CL aux échelles (x1) simulés (trait fin) et mesurés (trait épais) sondés sur le coin A (a), au centre (b), au milieu du côté BC (c) et au quart du côté BC (d). (e-h) Cartes simulées aux longueurs d'onde des premiers pics de résonance des spectres simulés de (a-d). (i-l) Cartes mesurées aux longueurs d'onde des premiers pics de résonance des spectres mesurés de (a-d). (m-o) Cartes simulées aux longueurs d'onde des seconds pics de résonance des spectres simulés de (a-d) si ceux-ci existent. (p-r) Cartes mesurées aux longueurs d'onde des seconds pics de résonance des spectres mesurés de (a-d) si ceux-ci existent.

Dans le cas où la particule est sondée à un de ses coins, les spectres montrent deux résonances, présentées figure 5.9.a. Le spectre mesuré montre deux pics de résonance à $\lambda_m = 660$ nm et $\lambda_m = 860$ nm. Le spectre simulé montre lui deux résonances, dont les pics sont très larges avec leur maximum aux longueurs d'onde $\lambda_s = 680$ nm et $\lambda_s = 830$ nm. Les calculs des cartes CL à ces longueurs d'onde

(figures 5.9.e,i,m,p) montrent un excellent accord. On observe notamment que les modes présents au sommet sont délocalisés le long des bords et que la CL des pointes très sub-longueur d'onde. La figure 5.10 montre une vue en coupe le long du côté BC pour les deux longueurs d'onde de résonance identifiées.

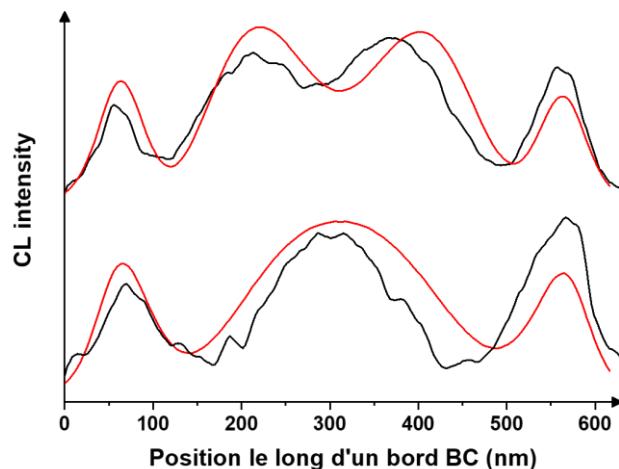


Figure 5.10 : Coupe de l'intensité CL le long du côté BC du prisme des cartes mesurées (en noir) et simulées (en rouge) pour $\lambda_s = 680 \text{ nm}$ (en haut) et $\lambda_s = 830 \text{ nm}$ (en bas).

Nous notons toutefois, que le centre de la particule ne produit aucune CL à $\lambda_s = 830 \text{ nm}$ dans le cas des simulations, alors que les cartes expérimentales (figure 5.9.p) semblent donner un faible signal.

Pour le vérifier, considérons une mesure au centre de la particule (figures 5.9.b,f,j,n,q). Le spectre mesuré montre clairement sur la figure 5.9.b, deux pics de résonances à $\lambda_m = 580 \text{ nm}$ et $\lambda_m = 860 \text{ nm}$ alors que le spectre simulé ne comporte qu'une résonance à $\lambda_s = 580 \text{ nm}$. L'émission obtenue à 580 nm provient majoritairement du centre, mais on observe une délocalisation isotrope sur les bords et une absence d'émission des pointes. L'émission à 860 nm est de faible intensité aussi bien en expérimental qu'en simulation et de répartition spatiale très similaire à celle des figures 5.9.m et 5.9.p. Cela semble provenir d'un mode de faible amplitude présent à la fois au centre, aux pointes et au milieu des côtés du prisme.

En effet, les spectres issus d'une excitation au milieu des côtés (figures 5.9.c,g,k,o,r) montrent également deux pics de résonances aux longueurs $\lambda_m = 600 \text{ nm}$ et $\lambda_m = 745 \text{ nm}$, et $\lambda_s = 600 \text{ nm}$ et $\lambda_s = 765 \text{ nm}$ respectivement. Les premiers pics des spectres simulés ont tendance à montrer un red-shift alors que les deuxièmes pics sont décalés vers les bleus de 20 nm maximum. Cette différence de comportement ne peut être assimilée au choix d'une mauvaise constante diélectrique de l'environnement ou du substrat qui aurait décalé légèrement les longueurs d'onde de résonance dans la même direction pour tous les spectres. Ceci à part, on observe que la luminescence à 600 nm, dans les motifs 5.9.e et 5.9.h, indique la délocalisation de modes radiatifs reliant les bords au centre. L'émission à 765 nm est due à un mode strident localisé au milieu des côtés.

De même en sondant au quart de la longueur de son côté (figures 5.9.d,h,l), les spectres mesurés et simulés ne montrent qu'un pic de résonance sur la figure 5.9.d à $\lambda_m = 640$ nm et $\lambda_s = 655$ nm respectivement. Ces deux premiers points ont des valeurs λ_m et λ_s quasi identiques. On retrouve le motif 5.9.g qui est effectivement intense au quart des bords à cette énergie.

Finalement, nous avons trois familles de motifs en CL pour cet objet. La première vers 600 nm où le signal des milieux de bords rejoint celui au centre (figures 5.9.f,g,j,k), la seconde vers 660 nm où les pointes fournissent le signal le plus intense (figures 5.9.e,h,i,l) et pour finir vers 800 nm (± 50 nm) où le signal est principalement localisé sur les côtés du prisme (figures 5.9.m-r).

Nous avons ici un bon accord des spectres et des cartes, cependant, nous pouvons noter deux différences notables entre les spectres simulés et les spectres mesurés. Tout d'abord, ces derniers montrent un pic entre 850 et 875 nm, au centre (en bleu) et au coin (en orange) du triangle, là où les spectres simulés montrent un creux. Une hypothèse pour expliquer cette différence de comportement, est une non-adéquation dans le proche infra-rouge d'une des constantes diélectriques utilisées dans la simulation par rapport au système étudié, à savoir soit celle de l'objet, soit celle du substrat. Le substrat utilisé ici est une membrane TEM de nitride de silicium (Si_3N_4). L'indice de réfraction de ce milieu n'est pas constant et varie faiblement en fonction de la longueur d'onde, $n = 2,25$ à 500 nm et $n = 2,12$ à 750 nm. [23] Les valeurs dans le proche infra-rouge devraient continuer à diminuer très légèrement. En pratique, due à la faible variation de l'indice, nous fixons cette valeur à 2,25 dans le code. Cette valeur a d'ailleurs déjà été utilisée par le passé avec succès pour des chaînes de nanoparticules d'or déposées sur le même type de membrane TEM. [13] Afin d'écartier cette théorie nous avons tout de même simulé les mêmes spectres pour deux autres valeurs $n = 2$ et $n = 2,5$. La figure 5.11 montre les différents spectres obtenus.

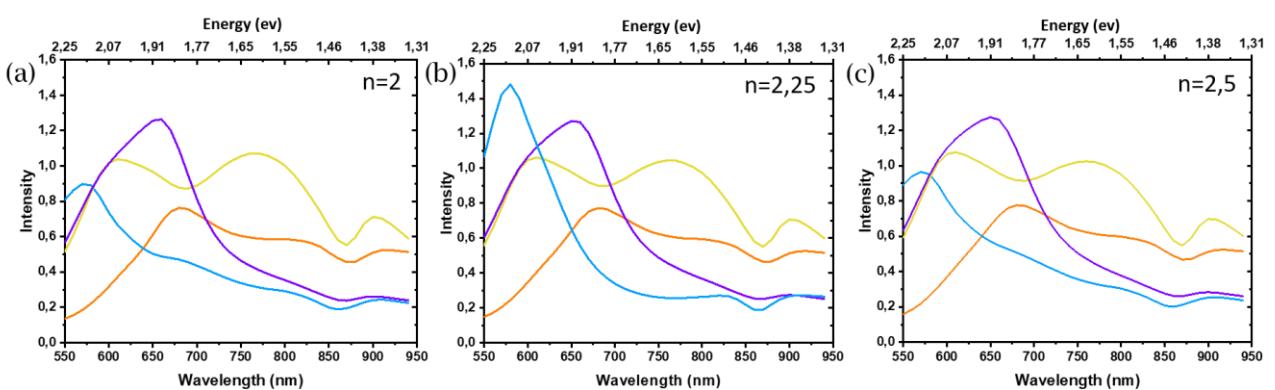


Figure 5.11 : Spectres CL simulés pour des indices de réfraction du substrat Si_3N_4 de (a) $n = 2$, (b) $n = 2,25$ et (c) $n = 2,5$.

La légère variation de l'indice n'a pas d'impact sur la présence du creux et n'est donc pas responsable de cette différence. Nous pouvons d'ailleurs noter qu'elle n'a pas non plus d'impact sur les longueurs d'onde de résonance des pics, ni sur leur largeur. Le seul effet observable est la diminution du pic sur le spectre pris au

milieu du triangle (en bleu). Une autre théorie serait une inadéquation, non pas de la constante diélectrique du substrat, mais de l'objet.

La permittivité de l'or (ϵ_m) a été mesurée et tabulée à de nombreuses reprises dans la littérature pour des fréquences du visible et du proche infra-rouge. La partie réelle de ϵ_m prend des valeurs fortement négatives (entre -2 et -45) entre 500 nm et 1000 nm alors que sa partie imaginaire prend des valeurs relativement faibles (< 6), mais positives. Cette dernière grandeur, $\Im(\epsilon_m)$, est liée à l'absorption du champ électromagnétique et est d'autant plus grande que la dissipation dans le métal est élevée. C'est pourquoi l'or est un candidat idéal pour la plasmonique. Nous utilisons dans nos simulations, le tableau de valeurs faites par mesure de réflectivité par P.B. Johnson and R.W. Christy sur de l'or bulk cristallin. [24] Il se peut que les prismes que nous utilisons soient d'un ordre cristallin supérieur à celui de l'or bulk mesuré, possédant une partie imaginaire inférieure à celle utilisée jusqu'à présent. Ce qui entraîne une différence pouvant être responsable du creux dans les spectres simulés. Cependant, il n'existe pas pour l'instant de mesure de la constante diélectrique de l'or cristallin d'un nanoprisme fortement cristallin, nous permettant d'affiner ce paramètre. D'autre part, la deuxième différence majeure entre les spectres simulés et mesurés est la largeur des pics qui est plus importante dans le premier cas. Ce phénomène est sûrement également lié à une constante diélectrique de l'or inadéquate avec une partie imaginaire trop élevée.

En comparant, les différents modes obtenus avec ceux des cartes et spectres EELS de la littérature, pour des objets de tailles supérieures à 400 nm (figure 5.12), [7] nous nous apercevons que nous obtenons les mêmes modes à une énergie décalée. Ce décalage est principalement dû aux différences de taille des deux objets.

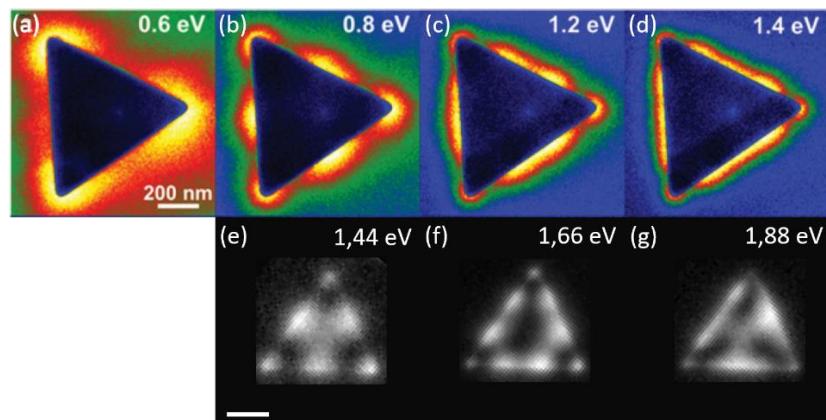


Figure 5.12 : (a-d) Cartes EELS d'un prisme d'or de 830 nm à différentes énergies. Reproduites avec autorisation de la référence [7]. (e-g) Cartes CL d'un prisme d'or de 560 nm à différentes énergies. Les barres d'échelle font 200 nm.

Dans le cas de la CL, nous n'avons pas pu mesurer le mode dipolaire (figure 5.12.a pour l'EELS). En effet, la limite de résolution des détecteurs de cathodoluminescence empêche de mesurer en dessous de 1,2 eV. Il nous est donc impossible de sonder le mode dipolaire qui est attendu pour des valeurs inférieures.

La capacité à mesurer tous les autres modes de notre objet, nous indique qu'aux environs de cette taille (> 400 nm) les modes de la particule semblent tous être visibles en CL et donc qu'ils sont tous radiatifs. Cette observation est en accord avec le comportement observé en champ sombre, pour des prismes de tailles similaires, où la diffusion totale de la particule est la somme de la contribution des différents modes de la particule. [12]

I.3.2 - Triangle tronqué (480/900 nm)

Une étude similaire a été effectuée sur un triangle de 900 nm avec une troncature de 210 nm. La figure 5.13.a présente une image TEM HAADF du triangle et la figure 5.13.b un schéma du même triangle avec des cercles de couleurs indiquant les points où les spectres ont été mesurés (figure 5.13.c) et simulés (figure 5.13.d).

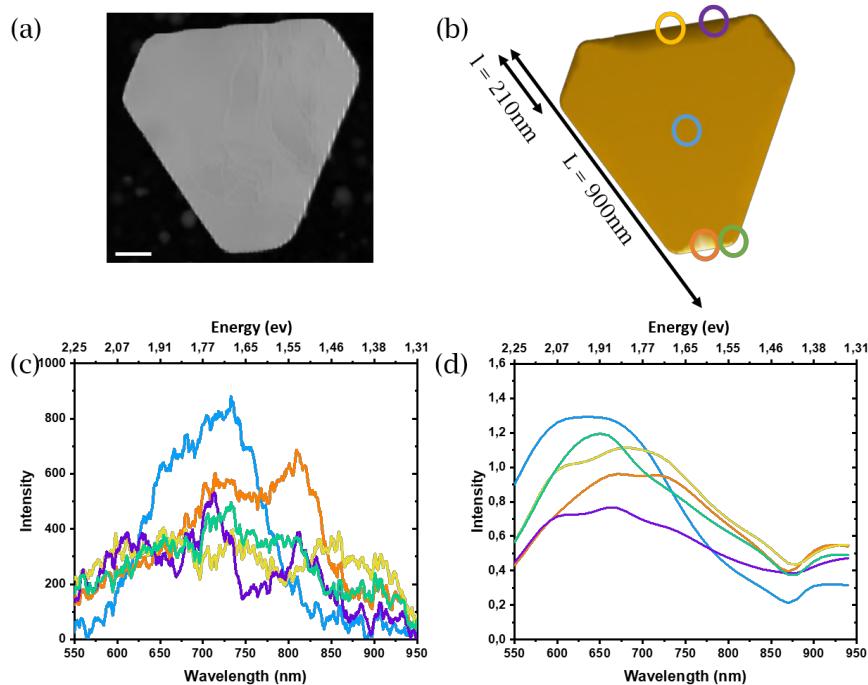


Figure 5.13 : (a) image TEM HAADF d'un prisme d'or de 900 nm de côté avec une troncature de 210 nm, la barre d'échelle est de 100 nm. (b) Schéma présentant le même triangle que (a). Les cercles de couleurs indiquent les positions où les spectres ont été simulés et mesurés, placés en bleu au centre, en violet sur un quart de côté, en orange sur le centre d'un coin tronqué, en jaune sur une moitié d'un côté et en vert sur le coin de la troncature. (c) et (d) spectres CL respectivement mesurés et simulés, les couleurs des spectres correspondent aux couleurs des positions indiquées en (b).

La largeur des pics et leur fusion sont ici également associées à la permittivité de l'or utilisée. La persistance du creux entre 850 nm et 875 nm et l'absence de décalage spectral, permet d'affirmer qu'il n'est donc pas lié à la géométrie ou à la taille de la particule. Le signal sur bruit des mesures expérimentales, présentées en

figure 5.13.c, est bien supérieur à celui du triangle pointu, rendant les données plus difficiles à analyser. Pour plus de visibilité sur ce point, les courbes ont été tracées par paire pour chaque point sur la figure 5.14.

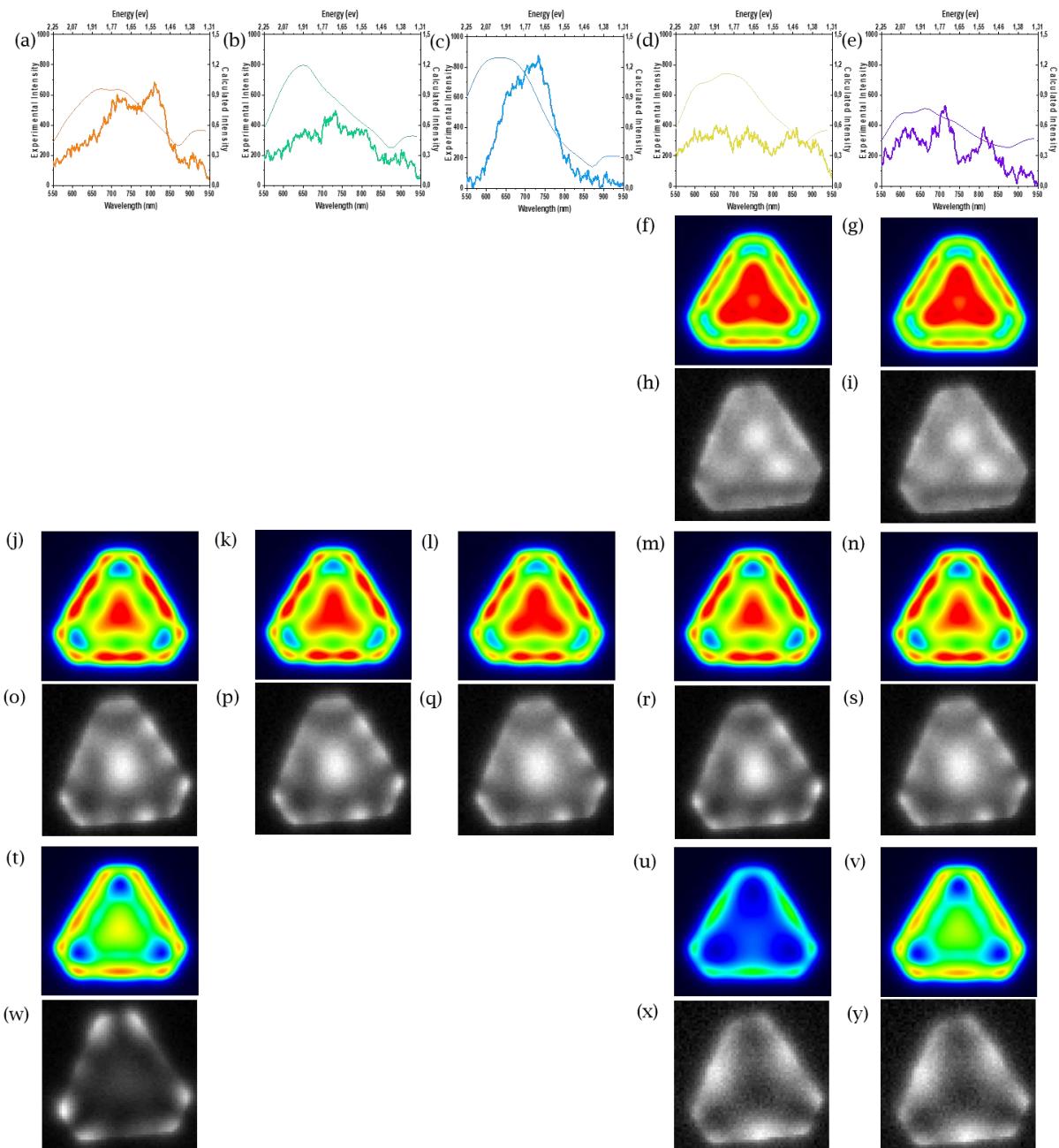


Figure 5.14 : (a-e) Spectres CL simulés (trait fin) et mesurés (trait épais) sondés au milieu d'un coin tronqué (a), au coin d'une troncature (b), au centre (c), au milieu d'un côté (d) et au quart d'un côté (e). (f-g) Cartes simulées des pics de résonance présents entre 600 nm et 610 nm, si ceux-ci existent. (h-i) Cartes mesurées des pics de résonance présents entre 620 nm et 630 nm, si ceux-ci existent. (j-n) Cartes simulées des pics de résonance présents entre 640 nm et 670 nm. (o-s) Cartes mesurées des pics de résonance présents entre 700 nm et 740 nm. (t-v) Cartes simulées des pics de résonance présents entre 730 nm et 740 nm, si ceux-ci existent.

(w-y) Cartes mesurées des pics de résonance présents entre 810 nm et 850 nm, si ceux-ci existent.

Quand la particule est sondée au milieu d'un bord tronqué, comme le présente la figure 5.14.a, le spectre mesuré montre deux pics de résonance à $\lambda_m = 720$ nm et $\lambda_m = 810$ nm. Le spectre simulé montre lui deux résonances dont les pics sont presque fusionnés avec leur maximum aux longueurs d'onde $\lambda_s = 670$ nm et $\lambda_s = 730$ nm. Les calculs des cartes pour ces longueurs d'onde (figures 5.14.j,o,t,w) montrent un excellent accord entre expériences et simulations. On observe que les modes au milieu des côtés tronqués sont en fait peu intenses et majoritairement dus au signal présent sur les coins de la troncature.

En effet, les spectres mesurés sur le coin d'une troncature, présentés figure 5.14.b, montrent ce que nous interprétons comme un pic très large centré à $\lambda_m = 725$ nm et $\lambda_s = 650$ nm respectivement, qui est très proche de la première résonance des spectres de la figure 5.14.a. Ce qui est confirmé par la ressemblance des cartes figures 5.14.j,o et 5.14.k,p. Une contribution d'un mode d'intensité moindre à plus faible énergie, est sûrement responsable de la largeur du pic, comme ce que laissait envisager les cartes figures 5.14.t,w.

Au centre de la particule, le spectre mesuré montre sur la figure 5.14.c, un pic de résonance à $\lambda_m = 705$ nm et le spectre simulé à $\lambda_s = 640$ nm. Les cartes simulées et expérimentales (figures 5.14.l,q respectivement) à ces longueurs d'onde, montrent en effet un mode très intense au centre de la particule. Nous notons que le centre de la particule semble produire une faible intensité pour $\lambda_m = 810$ nm et $\lambda_s = 730$ nm des cartes figures 5.14.t,w. Cette faible intensité ne donne pas de pic à part entière sur les spectres, mais peut être responsable de la largeur de celui mesuré.

Les spectres mesurés sur le milieu de la longueur d'un côté, présentés par la figure 5.14.d, montrent trois pics de résonance probables aux longueurs $\lambda_m = 625$ nm et $\lambda_m = 735$ nm, et $\lambda_m = 850$ nm, alors que le spectre simulé ne semble montrer que deux résonances à $\lambda_s = 600$ nm et $\lambda_s = 670$ nm. Le dernier pic simulé pouvant être supprimé par la présence du creux à 875 nm. Des pics très similaires sont observés lorsque la particule est sondée à un quart de la longueur de son côté. Le spectre mesuré montre trois pics de résonance sur la figure 5.14.e à $\lambda_m = 630$ nm, $\lambda_m = 710$ nm et $\lambda_m = 810$ nm. Le spectre simulé montre un spectre large semblant contenir trois résonances à $\lambda_s = 605$ nm, $\lambda_s = 670$ nm et $\lambda_s = 740$ nm. La concordance entre les cartes simulées et mesurées est, ici aussi, excellente pour les énergies les plus hautes. Avec les cartes, il est également facile de noter que les points pris à un quart de la longueur et à la moitié de la longueur sont excités à des énergies similaires et donnent les mêmes cartes pour tous les pics des spectres 5.14.d et 5.14.e, seules les cartes simulées 5.14.(u,v) pour les derniers pics sont différentes. La carte 5.14.u ayant été simulée à longueur de résonance du spectre mesuré et non simulé, peut expliquer cet effet. Cependant, en regardant les intensités des spectres, nous pouvons noter que le deuxième pic, à $\lambda_m = 710$ nm pour le quart de bord et $\lambda_m = 735$ nm pour le milieu de bord, est plus faible dans ce dernier cas. Ce qui est cohérent avec les cartes 5.14.(m,n,r,s) où un creux d'intensité est visible.

De même que pour le triangle pointu, nous pouvons ici identifier trois familles de motifs en CL pour cet objet. La première vers 620 nm (expérimentalement) où le signal au centre est très étalé et présent sur le milieu des bords (figures 5.14.f-i), la seconde vers 730 nm où les coins des troncatures fournissent le signal le plus intense avec une participation plus faible du centre (figures 5.14.j-s) et pour finir vers 830 nm (± 50 nm) où le signal est principalement localisé sur les côtés du prisme et le coin des troncatures (figures 5.14.t-y).

Les différences les plus notables entre la simulation et l'expérience, sont visibles pour les longueurs d'onde les plus élevées, où l'intensité relative du mode central faiblit plus vite que ce que prévoient les simulations. Cet effet est particulièrement visible sur les cartes 5.14.(t,w) où $\lambda_s = 730$ nm et $\lambda_m = 810$ nm, ainsi que sur les cartes 5.14.(v,y) où $\lambda_s = 740$ nm et $\lambda_m = 810$ nm.

En regardant attentivement les spectres mesurés 5.14.a-b, nous pouvons deviner un pic de résonance supplémentaire à $\lambda_m = 905$ nm. Le signal plus faible pouvant être assimilé à la sensibilité décroissante du détecteur après 900 nm. Un pic à la même longueur d'onde est observé sur tous les spectres simulés de la structure. Ne sachant pas si le pic observé après le creux artificiel est dû à la simulation, nous avons comparé les cartes de l'émission lumineuse CL simulée et mesuré à 905 nm dans la figure 5.15.

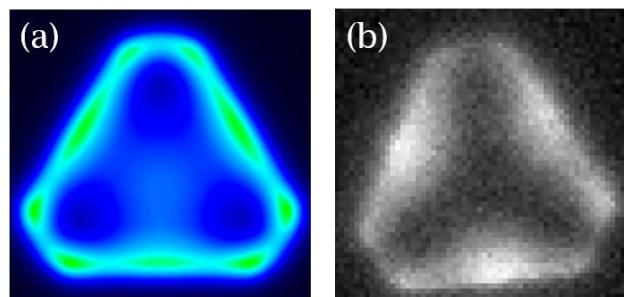


Figure 5.15 : (a) Carte simulée à $\lambda_s = 905$ nm et (b) Carte mesurée à $\lambda_m = 905$ nm.

Les cartes de la figure 5.15 ressemblent énormément à celles des figures 5.14.(u,x). Il peut s'agir ici du même mode qui serait étalé et dont la forme serait exacerbée sur les spectres simulés par la présence artificielle du creux entre 850 et 875 nm.

Nous constatons que notre outil de simulation montre des résultats très satisfaisants aux hautes énergies, avec des inadéquations en dessous de 1,55 eV. Ces dernières peuvent être dues soit à des valeurs erronées de la tabulation de la permittivité de l'or pour les valeurs mesurées dans le proche infra-rouge, soit par une perte des informations à ces énergies lorsque l'émission lumineuse est calculée pour à une hauteur fixe de la structure plutôt que sur la trajectoire complète de l'électron.

I.3.3 - Effet de la taille des particules sur le signal

Afin d'étudier l'effet de la taille des particules sur les spectres CL, nous avons comparé les mesures effectuées sur les trois triangles pointus de 580 nm, 560 nm et 520 nm respectivement (les spectres de ces particules sont tracés respectivement figures 5.16.g, h et i. Les écarts de tailles n'étant pas très élevées nous avons ajouté à cette comparaison deux séries de spectres simulés pour des triangles pointus de 620 nm (figure 5.16.f) et 480 nm (figure 5.16.j).

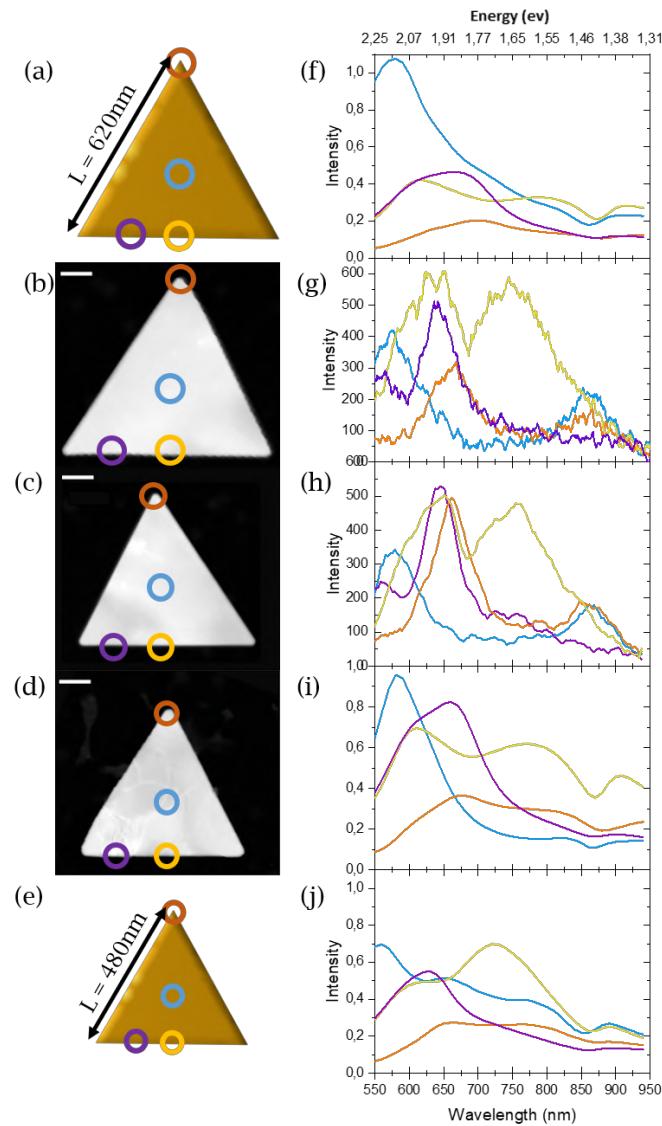


Figure 5.16 : (a) et (e) Schéma d'un prisme d'or de côté : (a) 620 nm et (e) 480 nm. (b-c) Images TEM HAADF d'un prisme d'or de côté : (b) 580 nm, (c) 560 nm et (d) 520 nm. Les barres d'échelle sont de 100 nm. Les cercles de couleurs indiquent les positions où les spectres ont été simulés et mesurés, placés en bleu au centre, en violet sur un quart de côté, en orange sur un coin et en jaune sur une moitié d'un côté. (f) et (i-j) spectres CL simulés des triangles (a) et (d-e) respectivement. (g-h) spectres CL mesurés des triangles (b-d). Les couleurs des spectres correspondent aux cercles de couleurs des figures (a-e).

En diminuant la taille, nous observons un décalage des pics vers les plus hautes énergies. Les écarts de tailles entre les particules étant faibles, cet effet est faible aussi, mais néanmoins visible. Le pic d'intensité visible au centre de la particule (spectre bleu) passe de $\lambda_s = 580 \text{ nm}$ à $\lambda_s = 560 \text{ nm}$ pour des triangles de 620 nm à 480 nm. De même les pics de résonance du spectre jaune passent de $\lambda_s = 615 \text{ nm}$ et $\lambda_s = 810 \text{ nm}$ à $\lambda_s = 590 \text{ nm}$ et $\lambda_s = 720 \text{ nm}$ pour des triangles de 620 nm à 480 nm. Cet effet est connu dans la littérature et était attendu ici. [12,25] L'intensité relative des pics en fonction de la zone sondée change également avec la taille. Enfin, nous pouvons noter que dans le cas du plus petit prisme, deux pics de résonance supplémentaire semblent apparaître sur le spectre bleu pris au centre du triangle. Avec une variation de 140 nm, nous n'avons vu l'apparition que d'une seule nouvelle résonance. Ce qui est cohérent avec ce que nous savons des prismes d'or, où les nouvelles résonances semblent apparaître tous les 100 nm environ. [12]

I.4 - Cathodoluminescence sur structures hybrides

Actuellement, les assemblages de nanoprismes protéinés avec des nanoclusters et des nanodiamants réalisés dans le chapitre 4, n'ont pas pu être caractérisés lors de ma campagne d'un mois à Singapour, notamment à cause de problème technique sur le TEM utilisé et sont en cours de caractérisation par nos collègues à Singapour. Malheureusement, ce travail a également subi un délai important lors de la fin de ma thèse et n'a pas pu être réalisé dans le temps imparti.

II - Cartographie de temps de vie des assemblages hybrides

La microscopie FLIM (*fluorescence life-time microscopy*) permet de cartographier le temps de vie d'émetteurs en fonction de leur position vis-à-vis d'une structure, plasmonique par exemple. De premières mesures FLIM d'objets hybrides ont été entreprises avec des nanoplaquettes d'or, sur lesquelles des nanodiamants ont été dispersés avec une tournette. La figure 5.17.a montre une carte d'intensité de fluorescence d'une plaquette superposée à une image SEM du même objet. Grâce au substrat marqué, les particules ciblées au microscope optique ont pu être retrouvées et imagées en SEM. La calibration du microscope optique peut entraîner un désaccord de 15 % entre la taille de l'objet mesurée en optique et celle visualisée au SEM. On observe que la cartographie d'intensité de luminescence est uniforme et reproduit la forme hexagonale de la plaquette d'or. La figure 5.17.b montre les temps de vie associés en chaque point de la mesure. Nous voyons qu'en dehors de la plaquette ce temps de vie est nul et que le signal enregistré (figure 5.17.d) n'est constitué que de bruit. Sur la plaquette elle-même, nous mesurons le temps de vie de $1 \text{ ns} \pm 0,1 \text{ ns}$ (figure 5.17.e). Ce temps de vie correspond à la luminescence de l'or et coïncide avec celui mesuré pour des nanoparticules d'or. [26] Les décroissances de fluorescence des figures 5.17.f-g, correspondent à des points où des nanodiamants étaient visibles sur les bords de la particule. Malheureusement, à ces endroits, la durée de vie ne dépasse pas les 1,2 ns. Ceci est loin des valeurs attendues pour les nanodiamants, entre 10-20 ns dans la littérature [27] et 13 ns annoncés sur le site commercial d'Adamas. La carte de temps de vie (figure 5.17.b) ne montre d'ailleurs aucun point avec un temps de vie supérieur à 2 ns.

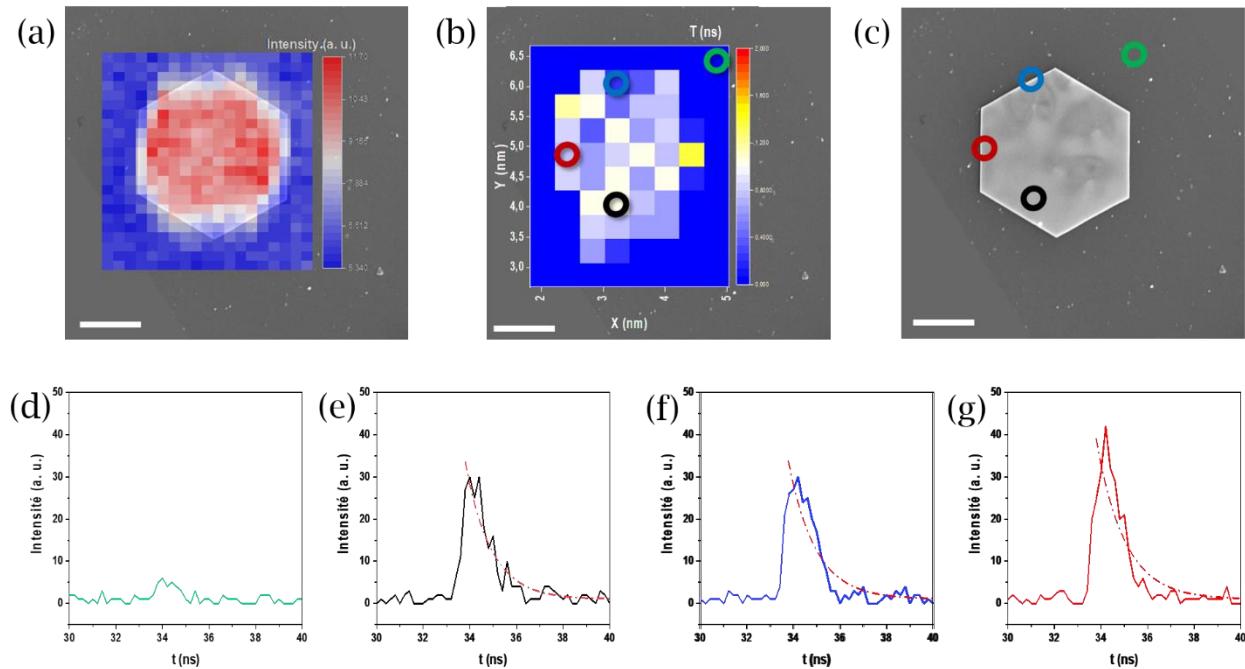


Figure 5.17 : (a) Superposition d'une image SEM et d'une carte d'intensité de la luminescence à 530 nm de la particule. (b) Cartographie FLIM de temps de vie de la particule. (c) Image SEM de la particule. Les cercles colorés des images (b-c) correspondent aux points où les temps de vie (d-g) ont été mesurés. Les codes couleurs des cercles correspondent aux couleurs des courbes (d-g). Les ajustements des exponentielles décroissantes des temps de vie sont en pointillés rouges. Les barres d'échelle font 1 μm .

Afin d'éliminer le doute sur la probabilité que seuls des nanodiamants non fluorescents se trouvaient près de la particule, nous avons tout d'abord augmenté la concentration en diamants sur le substrat (figure 5.18)

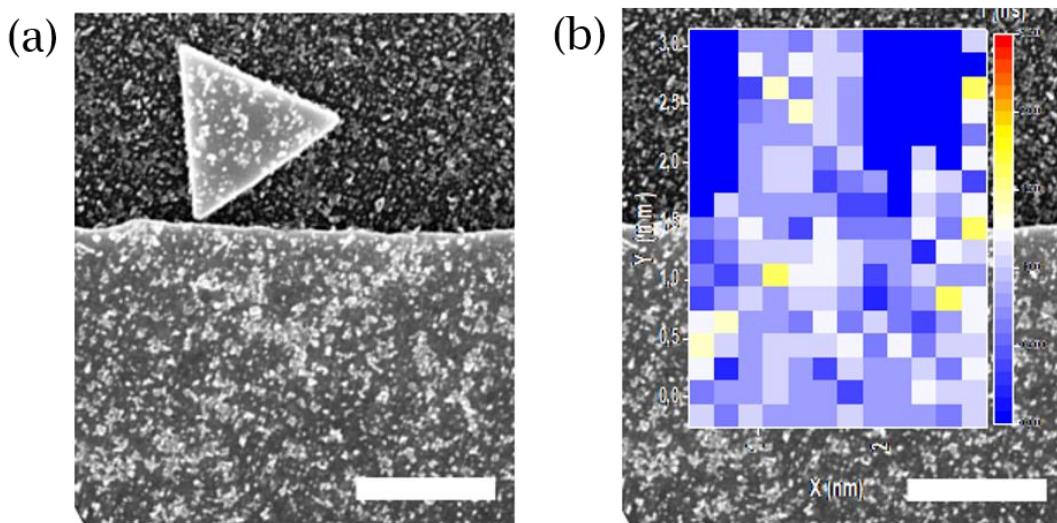


Figure 5.18 : (a) Image SEM d'une plaque d'or à proximité d'un repère (lettre de marquage en or) recouverte de nanodiamants. (b) Cartographie en temps de vie de l'image (a). Les barres d'échelle font 1 μm .

Une fois encore, les temps de vie mesurés ne dépassent pas les 2 ns et ne correspondent pas aux valeurs attendues pour des diamants. Vu la forte concentration en diamants, la probabilité de n'en trouver aucun qui ne soit fluorescent est nulle. Il semble donc plus pertinent de penser que nous n'avons pas enregistré leur fluorescence. Ceux-ci peuvent avoir été mal excités par un laser dont la longueur d'onde ne serait pas adaptée par exemple, ou dû à un mauvais alignement du faisceau sur le détecteur. Afin de déterminer la source du problème, de nouvelles mesures doivent être effectuées sur le banc optique, de plus, l'alignement ainsi que la source du laser doivent être contrôlés.

III - Conclusion

La caractérisation des prismes plasmoniques seuls, qui était une étape indispensable de cette étude, a été finalisée. Nous avons étudié le positionnement spatial et spectral des modes d'ordre élevé de prismes d'or de taille supérieure à 400 nm par cathodoluminescence. De telles mesures n'avaient pas encore été réalisées pour des particules de cette taille. Une comparaison avec les données EELS de la littérature et les travaux menés en champs sombre sur des particules semblables, nous permet d'envisager que tous les modes de la particule sont radiatifs à cette taille et sont donc tous visibles par cette technique.

Les simulations GDM effectuées sont en très bon accord avec les expériences et nous permettent de valider l'utilisation de ce modèle simplifié qui permet de gagner un temps non négligeable de calcul sans perdre en pertinence.

Références

1. M.-W. Chu, V. Myroshnychenko, C. H. Chen, J.-P. Deng, C.-Y. Mou, and F. J. García de Abajo, "Probing Bright and Dark Surface-Plasmon Modes in Individual and Coupled Noble Metal Nanoparticles Using an Electron Beam," *Nano Lett.* **9**, 399–404 (2009).
2. D. Rossouw, M. Couillard, J. Vickery, E. Kumacheva, and G. A. Botton, "Multipolar Plasmonic Resonances in Silver Nanowire Antennas Imaged with a Subnanometer Electron Probe," *Nano Lett.* **11**, 1499–1504 (2011).
3. L. F. Zagonel, S. Mazzucco, M. Tencé, K. March, R. Bernard, B. Laslier, G. Jacopin, M. Tchernycheva, L. Rigutti, F. H. Julien, R. Songmuang, and M. Kociak, "Nanometer Scale Spectral Imaging of Quantum Emitters in Nanowires and Its Correlation to Their Atomically Resolved Structure," *Nano Lett.* **11**, 568–573 (2011).
4. F.-P. Schmidt, A. Losquin, F. Hofer, A. Hohenau, J. R. Krenn, and M. Kociak, "How Dark Are Radial Breathing Modes in Plasmonic Nanodisks?," *ACS Photonics* **5**, 861–866 (2018).
5. A. Losquin, L. F. Zagonel, V. Myroshnychenko, B. Rodríguez-González, M. Tencé, L. Scarabelli, J. Förstner, L. M. Liz-Marzán, F. J. García de Abajo, O. Stéphan, and M. Kociak, "Unveiling Nanometer Scale Extinction and Scattering Phenomena through Combined Electron Energy Loss Spectroscopy and Cathodoluminescence Measurements," *Nano Lett.* **15**, 1229–1237 (2015).
6. N. Kawasaki, S. Meuret, R. Weil, H. Lourenço-Martins, O. Stéphan, and M. Kociak, "Extinction and Scattering Properties of High-Order Surface Plasmon Modes in Silver Nanoparticles Probed by Combined Spatially Resolved Electron Energy Loss Spectroscopy and Cathodoluminescence," *ACS Photonics* **3**, 1654–1661 (2016).
7. L. Gu, W. Sigle, C. T. Koch, B. Ögüt, P. A. van Aken, N. Talebi, R. Vogelgesang, J. Mu, X. Wen, and J. Mao, "Resonant wedge-plasmon modes in single-crystalline gold nanoplatelets," *Phys. Rev. B* **83**, 195433 (2011).
8. V. Myroshnychenko, N. Nishio, F. J. García de Abajo, J. Förstner, and N. Yamamoto, "Unveiling and Imaging Degenerate States in Plasmonic Nanoparticles with Nanometer Resolution," *ACS Nano* **12**, 8436–8446 (2018).
9. R. Gómez-Medina, N. Yamamoto, M. Nakano, and F. J. García de Abajo, "Mapping plasmons in nanoantennas via cathodoluminescence," *New J. Phys.* **10**, 105009 (2008).
10. N. W. Bigelow, A. Vaschillo, J. P. Camden, and D. J. Masiello, "Signatures of Fano Interferences in the Electron Energy Loss Spectroscopy and Cathodoluminescence of Symmetry-Broken Nanorod Dimers," *ACS Nano* **7**, 4511–4519 (2013).
11. S. M. Collins and P. A. Midgley, "Surface plasmon excitations in metal spheres: Direct comparison of light scattering and electron energy-loss spectroscopy by modal decomposition," *Phys. Rev. B* **87**, 235432 (2013).
12. U. Kumar, A. Cuche, J. Sharma, A. Moreau, G. Colas des Francs, C. Girard, and E. Dujardin, "Spectral Tuning of High Order Plasmonic Resonances in Multimodal Film-Coupled Crystalline Cavities," *Adv. Opt. Mater.* **7**, 1801787 (2019).
13. A. Teulle, M. Bosman, C. Girard, K. L. Gurunatha, M. Li, S. Mann, and E. Dujardin, "Multimodal plasmonics in fused colloidal networks," *Nat. Mater.* **14**, 87–94 (2014).
14. C. Girard, "Near fields in nanostructures," *Rep. Prog. Phys.* **68**, 1883–1933 (2005).
15. A. Teulle, "Façonnage de modes plasmons dans des colloïdes d'or," Université Toulouse III Paul Sabatier (2013).
16. O. J. F. Martin, C. Girard, and A. Dereux, "Generalized Field Propagator for Electromagnetic Scattering and Light Confinement," *Phys. Rev. Lett.* **74**, 526–529 (1995).
17. R. Marty, G. Baffou, A. Arbouet, C. Girard, and R. Quidant, "Charge distribution induced inside complex plasmonic nanoparticles," *Opt. Express* **18**, 3035 (2010).

-
18. C. Girard, E. Dujardin, R. Marty, A. Arbouet, and G. C. des Francs, "Manipulating and squeezing the photon local density of states with plasmonic nanoparticle networks," *Phys. Rev. B* **81**, 153412 (2010).
 19. G. Baffou, C. Girard, and R. Quidant, "Mapping Heat Origin in Plasmonic Structures," *Phys. Rev. Lett.* **104**, 136805 (2010).
 20. S. Viarbitskaya, A. Teulle, R. Marty, J. Sharma, C. Girard, A. Arbouet, and E. Dujardin, "Tailoring and imaging the plasmonic local density of states in crystalline nanoprisms," *Nat. Mater.* **12**, 426–432 (2013).
 21. C. Cohen-Tannoudji, B. Diu, F. Laloë, S. R. Hemley, N. Ostrowsky, and D. B. Ostrowsky, *Quantum Mechanics. Volume 1, Volume 1*, (2020).
 22. A. Arbouet, A. Mlayah, C. Girard, and G. C. des Francs, "Electron energy losses and cathodoluminescence from complex plasmonic nanostructures: spectra, maps and radiation patterns from a generalized field propagator," *New J. Phys.* **16**, 113012 (2014).
 23. M. Ghaderi and R. F. Wolffenbuttel, "Design and fabrication of ultrathin silicon-nitride membranes for use in UV-visible airgap-based MEMS optical filters," *J. Phys. Conf. Ser.* **757**, 012032 (2016).
 24. P. B. Johnson and R. W. Christy, "Optical Constants of the Noble Metals," *Phys. Rev. B* **6**, 4370–4379 (1972).
 25. M. Zhao, M. Bosman, M. Danesh, M. Zeng, P. Song, Y. Darma, A. Rusydi, H. Lin, C.-W. Qiu, and K. P. Loh, "Visible Surface Plasmon Modes in Single Bi₂Te₃ Nanoplate," *Nano Lett.* **15**, 8331–8335 (2015).
 26. S. Suarasan, A.-M. Craciun, E. Licarete, M. Focsan, K. Magyari, and S. Astilean, "Intracellular Dynamic Disentangling of Doxorubicin Release from Luminescent Nanogold Carriers by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) under Two-Photon Excitation," *ACS Appl. Mater. Interfaces* **11**, 7812–7822 (2019).
 27. A. Cuche, A. Drezet, Y. Sonnefraud, O. Faklaris, F. Treussart, J.-F. Roch, and S. Huant, "Near-field optical microscopy with a nanodiamond-based single-photon tip," *Opt. Express* **17**, 19969 (2009).

Conclusion et perspectives

I - Conclusion

La construction de structures hybrides plasmon-émetteur à géométrie contrôlée pose encore de nombreux défis. La synthèse et la physico-chimie de chacun des partenaires, offrent la perspective de maîtriser la taille et les caractéristiques plasmoniques de la structure métallique, ainsi que les propriétés de l'émetteur. De plus, l'auto-assemblage peut alors être encodé dans des fonctions placées en surface des nanoparticules.

Dans cette thèse, nous avons étudié deux méthodes différentes pour l'auto-assemblage de particules plasmoniques avec des émetteurs : par assemblage direct par affinité mutuelle du couple biotine/streptavidine, ou par effet template avec la formation de superhélices composées de protéines. Nous avons mis au point une nouvelle synthèse simple et étudié en détails les propriétés optiques de clusters d'or à émission bleue, verte et rouge. La réponse optique des prismes d'or a été étudiée en cathodoluminescence. Des simulations ont été réalisées avec la méthode dyadique de Green, et nous ont permis de réaliser des cartes et des spectres CL simulés, en bon accord avec les données expérimentales. Enfin, nous avons réalisé des assemblages hybrides tout en commençant à recueillir des résultats optiques sur les objets choisis pour un couplage plasmon-émetteur.

Pour diriger le couplage par auto-assemblage d'émetteurs avec des structures plasmoniques, nous avons exploité l'ingénierie des protéines artificielles de deux manières.

La synthèse récente de nanoprismes d'or, dont les faces (111) étaient bloquées par des protéines α -Rep, a été utilisée pour modifier la face externe des protéines avec de la biotine et permettre le couplage par affinité avec la streptavidine. L'efficacité de ce couplage a été mesurée par microscopie par résonance des plasmons de surface (SPR) à l'échelle du nanoprisme individuel et s'est révélée très efficace montrant une sensibilité de 300 nm/RIU. Ce résultat pourrait être exploité dans le cadre de capteur à particule unique. Toutefois, nous l'avons appliqué au couplage dirigé de clusters d'or et de

nanodiamants sur les faces (111) des nanoprismes, réalisant ainsi des structures hybrides par une approche innovante et modulable.

L'ingénierie de protéines artificielles α -Rep a été portée à un niveau supérieur de contrôle et de complexité par nos collaborateurs de l'I2BC. Nous avons ainsi introduit le nouveau concept d'origami de protéines. La construction d'une paire de protéines à forte affinité, mais avec une reconnaissance face ventrale/face dorsale, a été imaginée afin qu'une des protéines serve de brique pour un motif de superhélice tandis que l'autre joue le rôle d'agrafe assurant la cohésion et le positionnement relatif de deux briques contigües. Le simple mélange de ces deux protéines entraîne, grâce à une affinité spécifique de l'ordre de la nanomolaire, la formation spontanée de superstructures macroscopiques. Nous avons élucidé la structure par une combinaison de techniques de microscopie électronique (à balayage SEM, en transmission TEM par coloration négative, cryogénique cryoTEM) et avec l'appui de la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS). Nous avons ainsi établi que les protéines s'assemblent en superhélices de 8 nm de diamètre et de 6 nm de pas d'hélice avec une cavité intérieure de 4 nm de diamètre. Dans des conditions usuelles de pH (7) et de force ionique ($0,20 \text{ mol.L}^{-1}$), ces superhélices s'assemblent en cristaux orthorhombiques compacts dans lesquels les superhélices sont parallèles. La cryoTEM et le SAXS ont permis de déterminer leur agencement. Nous avons par ailleurs montré que l'interaction électrostatique inter-superhélices pouvait être amenuisée afin d'isoler les origamis. Les conditions requises ont été obtenues avec le molybdate d'ammonium à pH = 8.

La structure de cet origami étant désormais établie, notre approche ouvre la voie à son utilisation comme template pour coorganiser de façon programmée des structures plasmoniques, par exemple dans la cavité intérieure qui pourrait être modifiée avec des cystéines ou des séquences anti-Au(111), et des émetteurs, par exemple liés aux agrafes.

Dans les assemblages hybrides plasmon-émetteur, la synthèse et la fonctionnalisation des émetteurs sont des étapes cruciales. Une partie de cette thèse a été consacrée à la synthèse de nouveaux clusters d'or par une méthode simple et à leur caractérisation structurale et photo-physique. Nous avons ainsi produit deux synthèses d'émetteurs, l'une en présence d'aniline comprenant des fluorophores bleus, verts et rouges, l'autre en présence d'indole comprenant des clusters violets et bleus. Notons que les clusters d'or émettant dans le rouge sont assez courants, mais que l'obtention de clusters stables plus petits émettant dans le vert, bleu ou violet sont remarquables. Produits dans de l'éthylène glycol, nous avons montré que nous pouvions fonctionnaliser ces clusters avec différents ligands hydrophiles en préservant les caractéristiques photo-physiques. L'étude détaillée par haute-résolution TEM (HRTEM), spectrométrie photo-électronique X (XPS), spectrométrie de masse (MS), complétée par les spectres d'excitation et d'émission ainsi que par

les mesures de temps de vie ont permis d'établir la nature des agrégats d'or. Nous avons obtenu des clusters : Au5-8 (bleu), Au10-12 (vert) et Au22 (rouge) en présence d'aniline ; Au4-7 (violet) et Au8-10 (bleu) en présence d'indole. On notera que ces derniers présentent un rendement quantique particulièrement élevé (27 %) pour des clusters d'or.

Enfin, parmi les fonctionnalisations, celle avec un thioPEG biotinylé a permis de réaliser un couplage direct avec la streptavidine immobilisée sur les nanoprismes protéinés et ainsi, de réaliser des assemblages hybrides.

Malgré plusieurs tentatives tout au long de cette thèse, nous n'avons pas pu réaliser de mesure optique résolue spatialement sur des assemblages hybrides. Les techniques envisagées combinaient des excitations électroniques faites par un faisceau de 1 nm avec une détection optique (cathodoluminescence en TEM), la microscopie en champ sombre et la microscopie de fluorescence en temps de vie (FLIM). Plusieurs types de structures hybrides ont été produites pour tenter d'en explorer le comportement, en collaboration avec M. Bosman à l'IMRE de Singapour, par les méthodes EELS et CL résolues spatialement et spectralement. Des résultats probants ne sont cependant pas encore disponibles. Les résultats FLIM n'ont fourni que des résultats trop préliminaires pour permettre de conclure. Nous avons toutefois exploré en détails la cathodoluminescence des structures plasmoniques (nanoprismes).

Les mesures STEM-CL sur prismes d'or ont montré l'existence de modes radiatifs à forte modulation spatiale qui coïncide avec la densité plasmonique. Un modèle simple du faisceau électronique sous forme d'un dipôle de perte a permis de simuler des cartes et des spectres de CL, grâce à un outil numérique développé par C. Girard avec la méthode des dyades de Green (GDM). L'excellent accord entre simulation et expérience nous a permis d'identifier des modes et leur sensibilité aux variations morphologiques des prismes. Ceci constitue une première, car des structures comportant à la fois des modes localisés et délocalisés n'avaient, à ce jour, pas été caractérisées par CL. Les cartes de CL nous indiquent, notamment, des positions et des longueurs d'onde où un plasmon excité peut efficacement se coupler à un accepteur. Ce travail constitue donc une étape importante dans la construction raisonnée de structure hybride 2D.

Nous souhaitons que la réalisation, même partielle, des objectifs fixés, contribuera à l'avancée de la création d'assemblages hybrides et inspirera d'autres personnes sur les couplages plasmon-émetteurs. Ces résultats nous ont inspiré pour le concept et le début de réalisation d'autres travaux, dont certains sont présentés dans les paragraphes de perspectives à suivre.

II - Perspectives

II.1 - Contrôle de la longueur par ajout de terminateurs

L'une des perspectives de ce travail, serait de contrôler la longueur des tubes en utilisant un back binder spécifique qui ne reconnaîtrait qu'une moitié de la séquence, c'est-à-dire soit les repeats ABC soit DE si on reprend la figure 3.10. De tels « terminateurs » interrompraient donc le cycle d'assemblage (figure P.1.a). Dans ce cas, en fonction de la concentration relative agrafe/terminateur nous pourrons contrôler, en moyenne, la longueur des tubes. Ces terminateurs ont déjà été créés et de premières images TEM en coloration négative ont déjà été réalisées avec un ratio terminateur:Imp59:bBE3 de 1:20:20 (figure P.1.b).

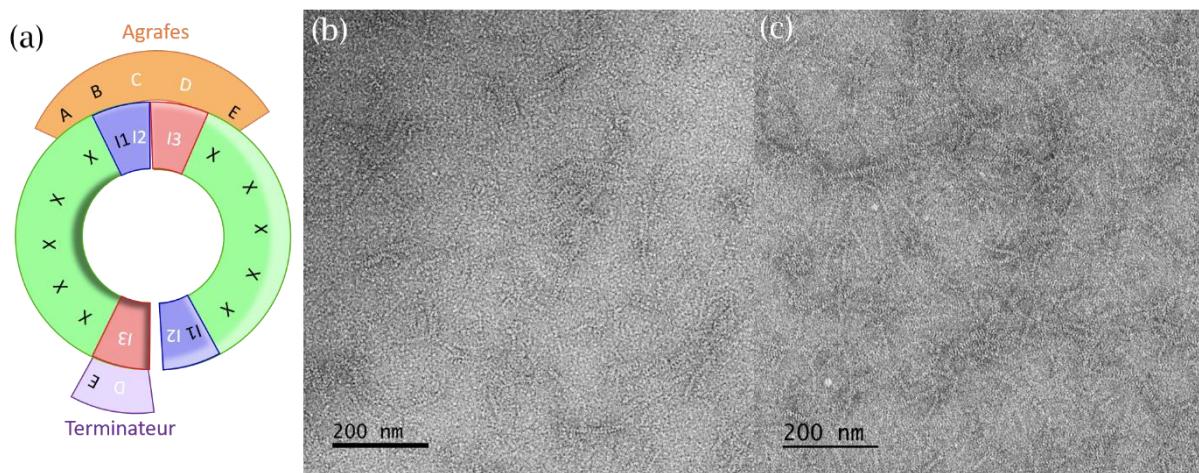


Figure P.1 : (a) Schéma de l'utilisation d'un terminateur afin de diminuer la longueur des tubes. (b-c) Image TEM de tubes en coloration négative par du MB, avec l'utilisation d'un terminateur et sans terminateur respectivement pour la même concentration de protéines.

En comparant qualitativement les images prises avec et sans terminateur pour la même concentration (figure 3.23.b et 3.23.c respectivement), il semble que les terminateurs raccourcissent effectivement la longueur des tubes. Une étude avec plusieurs ratios différents et des contrôles afin de mesurer quantitativement la longueur des tubes est envisagée à la suite de ces travaux.

II.2 - Ingénierie fonctionnelle de la face interne de la brique

Comme nous l'avons introduit dans la partie II.2, une fois que nous aurons réussi à isoler des tubes séparés, soit en jouant sur les conditions de pH et de pI des solutions, soit en désignant la brique afin de réduire les

interactions électrostatiques entre hélices, un objectif serait de modifier la face interne des protéines briques pour reconnaître les surfaces d'or. Pour cela, deux types de modifications sont envisagées. La première consistant à ajouter des cystéines sur la face interne, celles-ci sont connues pour leur affinité avec l'or. Une nanoparticule d'or pourrait alors être insérée avant ou après l'assemblage complet de la superhélice à l'intérieur de chaque pas de l'hélice. La seconde approche, consiste à utiliser la reconnaissance de l'or (111) des protéines α -Rep présentées dans la première partie de ce chapitre. La croissance dirigée de l'or par ces protéines se produisant sur leur face interne, nous pouvons imaginer ajouter les mêmes repeats I1, I2 et I3 que ceux utilisés sur les briques et reconnus par le back binder. Ce système permettrait de diriger la synthèse d'un bâtonnet d'or à l'intérieur du template hélicoïdal.

Le couplage des émetteurs pourra se faire par modification de l'agrafe ou du terminateur. En utilisant les terminaux mentionnés précédemment, nous pouvons envisager d'utiliser deux terminaux différents, un pour reconnaître I1 et I2 et un autre pour I3, fonctionnalisés avec deux émetteurs de luminescence différente. Et ainsi positionner deux émetteurs à une distance choisie par la longueur du tube (figure P.2.a), rappelant la structure présentée figure 1.1 dans le chapitre 1, [1] mais en contrôlant l'espacement entre les émetteurs. Alternativement, nous pourrons fonctionnaliser tous les back binders de la structure et ainsi positionner les émetteurs à des distances régulières les uns des autres (figure P.2.b). Ce genre de structure pourrait notamment être utilisé comme milieu à gain pour assurer la propagation plasmonique à longue distance [2] ou pour la réalisation de lasers plasmoniques (spasers, *surface plasmon amplification by stimulated emission of radiation*). [3]

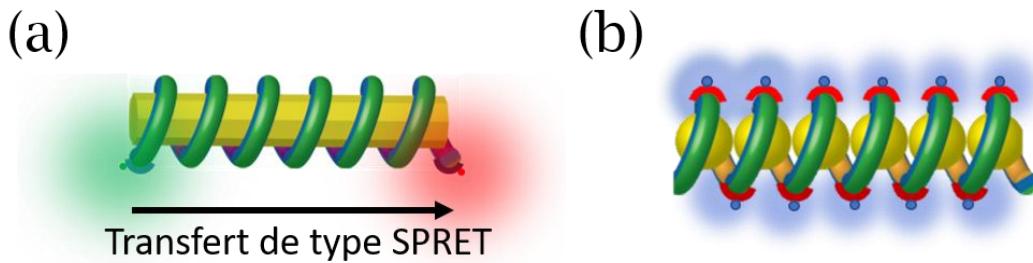


Figure P.2 : (a) Schéma de l'utilisation des terminateurs pour espacer deux émetteurs sur le template de protéines dont la face interne est fonctionnalisée pour reconnaître la surface (111) de l'or et ayant servi à la synthèse d'un nanobâtonnet. (b) Schéma de l'utilisation de back binders fonctionnalisés avec deux types d'émetteurs le long de la structure ayant permis l'assemblage de nanoparticules d'or grâce à la face interne des briques comportant avec des cystéines.

II.3 - Application du « backbinder » au couplage direct

Comme dit précédemment, les protéines utilisées pour la morphosynthèse (en rouge sur les schémas de la figure P.3) des prismes d'or, n'utilisent pour l'instant que la face interne des protéines pour la reconnaissance de l'or. Le dos de celle-ci est donc libre. Un back binder du dos de cette protéine est en cours de développement par nos collègues biologistes à Orsay (en bleu sur les schémas de la figure P.3). Ce back binder permettrait de s'émanciper totalement de la fonctionnalisation de surface avec un couple de biomolécules complémentaires comme la biotine et la streptavidine. En fonctionnalisant le dos de ce back binder avec un émetteur, celui-ci irait se positionner directement sur la protéine des nanoprismes par reconnaissance de dos (figure P.3.a). Mais plus important, nous pourrions créer plusieurs protéines se reconnaissant les unes les autres de cette manière, nous permettant de choisir l'épaisseur de l'espacement entre la surface d'or et les émetteurs en les empilant les unes sur les autres (figure P.3.b).

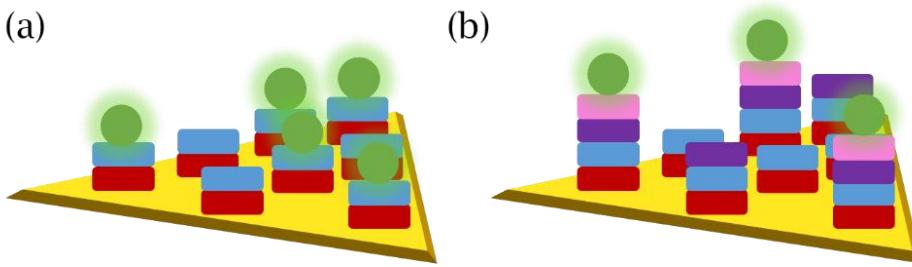


Figure P.3 : (a) Schéma montrant l'utilisation d'un back binder (brique bleue) reconnaissant le dos de la protéine α -Rep utilisée lors de la morphosynthèse (brique rouge) pour l'auto-assemblage avec des émetteurs. (b) Schéma montrant l'utilisation de plusieurs back binder (brique bleue, violette et rose) se reconnaissant les uns les autres et s'empilant sur la protéine utilisée lors de la morphosynthèse (brique rouge) pour contrôler l'espacement de l'auto-assemblage avec des émetteurs.

II.4 - Utilisation des modes plasmons pour l'adressage

Nous connaissons maintenant (à la suite du chapitre 5) la localisation des modes plasmons sur nos prismes. Dans la suite de ce travail, nous souhaitons positionner des émetteurs sur des lobes émettant à une longueur d'onde λ_{em} correspondant à la longueur d'onde excitatrice λ_{ex} de ces émetteurs. En utilisant des émetteurs avec des longueurs d'onde d'excitation différentes, par exemple deux nanodiamants, un d'émission verte à $\lambda_{\text{ex}} = 475 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ et un rouge à $\lambda_{\text{ex}} = 550 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 700 \text{ nm}$. À 475 nm, le mode au centre du prisme n'est pas excité (figure P.4.a) et l'intensité mesurée est d'ailleurs très faible sur toute la particule, seuls les milieux des côtés fournissent une légère réponse. En plaçant le nanodiamond vert au centre de la particule et le

nanodiamant rouge au quart de la longueur d'un côté, à 475 nm seul le nanodiamant vert sera excité, il émettra selon toute vraisemblance des photons à 525 nm. Ce qui à son tour excitera les modes plasmoniques du prisme d'or, avec la distribution visible sur la figure P.4.b. Le nanodiamant rouge, étant placé sur un point à forte SPLDOS de la particule à cette longueur d'onde, sera à son tour excité par les plasmons de surface et émettra de la lumière à 700 nm. Ainsi, on étendrait le couplage montré en figure 1.1 à des systèmes 2D plus favorables à des notions de routage et de modulation de couplage. [4]

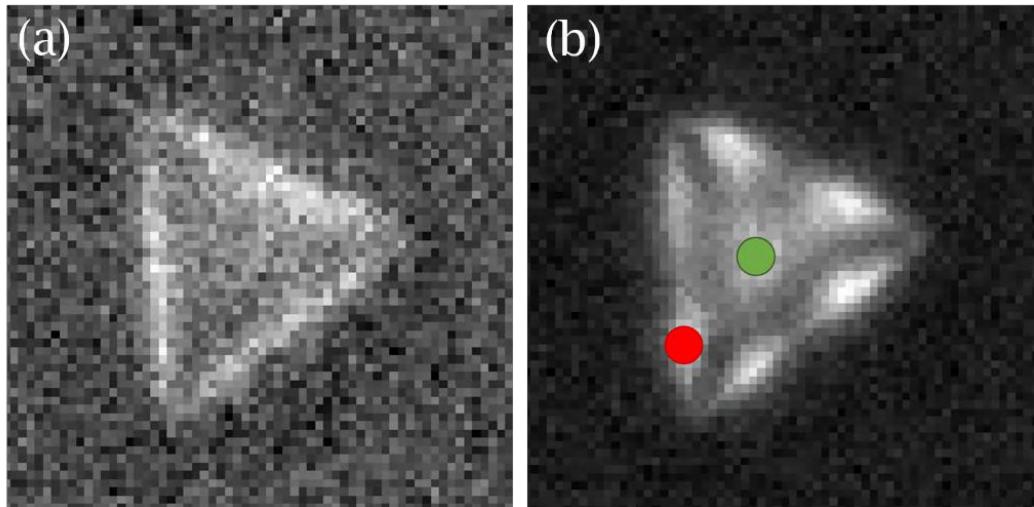


Figure P.4 : Cartes d'intensité CL d'un nanoprisme de 560 nm de côté à : (a) 475 nm et (b) 525 nm. Les ronds de couleurs rouge et vert représentent la position voulue des nanodiamants rouge et vert respectivement.

II.5 - Activation d'une biomolécule par génération locale d'électrons chauds

Cependant pour réaliser le type de couplage nécessaire au paragraphe précédent, le positionnement des émetteurs sur les modes plasmoniques est fondamental pour le couplage entre ceux-ci. L'éclairage de particules plasmoniques par un laser pulsé polarisé, est connu pour produire des électrons chauds, dont la relaxation produit une élévation de température significante et localisée à environ 50 nm (figures P.5.a-b). [5]

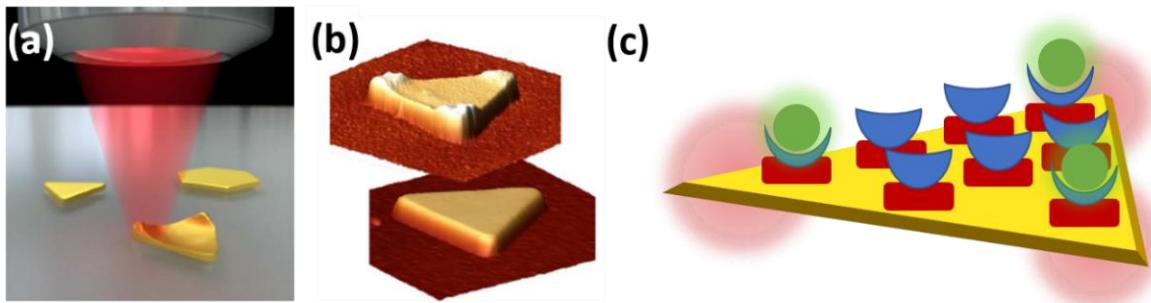


Figure P.5 : (a) Principe de la configuration optique utilisée pour fondre par plasmon. La morphologie des particules est modifiée lors de l'exposition au laser. (b) Rendu 3D des images AFM d'un prisme triangulaire avant (en bas) et après (en haut) l'irradiation laser. Le bord du prisme a une longueur de 700 nm, et l'épaisseur native est de 23 nm. Schéma et images reproduits avec autorisation de la référence [5]. (c) Schéma de l'utilisation d'une biomolécule, avant et après activation par irradiation (demi-cercle bleu avant activation et croissant bleu après activation), greffée au dos d'une α -Rep anti-Au(111) (en rouge).

Nous voulons utiliser ce phénomène thermique afin de changer les fonctions des ligands de surface à ces endroits. Une publication de S. Maier, mentionne le changement de groupes terminaux de ligands de surface grâce aux électrons chauds, suite au même type d'excitation. [6] Dans notre cas, nous souhaiterions modifier les protéines α -Rep en surface pour les rendre activables après un certain seuil de température (représentée par un demi-cercle bleu avant activation et un croissant bleu après activation sur la figure P.5.c), qui serait greffée sur le dos des protéines α -Rep anti-Au(111). Après synthèse des prismes protéinés, une irradiation laser des particules permettrait d'activer cette biomolécule et de changer la chimie de surface uniquement aux points chauds (indiqués par des zones rouges sur la figure P.5.c). Ces points serviraient ensuite de point de greffage pour des émetteurs.

Références

1. J. de Torres, P. Ferrand, G. Colas des Francs, and J. Wenger, "Coupling Emitters and Silver Nanowires to Achieve Long-Range Plasmon-Mediated Fluorescence Energy Transfer," *ACS Nano* **10**, 3968–3976 (2016).
2. D. S. Citrin, "Plasmon-polariton transport in metal-nanoparticle chains embedded in a gain medium," *Opt. Lett.* **31**, 98 (2006).
3. J. B. Khurgin and G. Sun, "Comparative analysis of spasers, vertical-cavity surface-emitting lasers and surface-plasmon-emitting diodes," *Nature Photon* **8**, 468–473 (2014).
4. U. Kumar, S. Viarbitskaya, A. Cuche, C. Girard, S. Bolisetty, R. Mezzenga, G. Colas des Francs, A. Bouhelier, and E. Dujardin, "Designing Plasmonic Eigenstates for Optical Signal Transmission in Planar Channel Devices," *ACS Photonics* **5**, 2328–2335 (2018).
5. S. Viarbitskaya, A. Cuche, A. Teulle, J. Sharma, C. Girard, A. Arbouet, and E. Dujardin, "Plasmonic Hot Printing in Gold Nanoprisms," *ACS Photonics* **2**, 744–751 (2015).
6. E. Cortés, W. Xie, J. Cambiasso, A. S. Jermyn, R. Sundararaman, P. Narang, S. Schlücker, and S. A. Maier, "Plasmonic hot electron transport drives nano-localized chemistry," *Nature Communications* **8**, 14880 (2017).

Listes des Tables

Chapitre 1 — Assemblages "plasmon-émetteur" : propriétés optiques et couplage

Table 1.1: Propriétés connues des émetteurs de la littérature permettant de choisir ceux utilisés dans cette thèse.....	37
---	----

Chapitre 3 — Les protéines α -Rep, des modules pour l'auto-assemblage

Table 3.1: Séquences des protéines (a) « bait » et (b) Imp59. Les positions en bleu (4, 7, 11 et 14) correspondent aux positions dorsales hypervariables entre chaque « repeat ». Ici, seules les positions 7 et 11 ont été modifiées pour optimiser les interactions avec bBE3 par la présence des tyrosines indiquées par un Y jaune dans des cases jaunes. Les positions en orange (18, 19, 21, 22, 26 et 30) sont les positions hypervariables de la face ventrale utilisée pour la reconnaissance de l'Au(111). Les repeats X dans le tableau (b) sont des repeats internes arbitraires et ne participent pas à l'interaction avec bBE3. Les lignes de couleur grises dans le tableau (b) correspondent aux « repeats » supprimés lors du clivage à la TeV protéase (TeV N et TeV C : lignes avec l'écriture en rose).....	107
---	-----

Chapitre 4 — Physico-chimie d'agrégats d'or et de centres colorés NV comme émetteurs hyperspectraux

Table 4.1: Structure des ligands thiopégylés utilisés pour la fonctionnalisation des AuNC. Les indices a et i indiquent si l'agent réducteur utilisé était respectivement l'aniline ou l'indole.....	136
Table 4.2: Taille des AuNC estimée à partir des cartes de fluorescence 2D en utilisant le modèle Jellium pour les échantillons d'aniline et d'indole. La longueur d'onde d'émission de l'intensité maximale, $\lambda_{\text{em}}^{\max}$, ainsi que les longueurs d'onde extrêmes correspondant à 80 % de ce maximum sont indiquées pour les AuNC aniline et indole dans la première colonne de la table. La deuxième colonne convertie $\lambda_{\text{em}}^{\max}$ en unité d'énergie. Dans la dernière colonne, le modèle du Jellium est utilisé pour estimer, avec un intervalle, le nombre d'atomes d'or d'un AuNC émettant à $\lambda_{\text{em}}^{\max}$ ($E_f = 5,46$ eV est l'énergie de Fermi de l'or bulk).....	146
Table 4.3: Propriétés photo-physiques des AuNCs avant fonctionnalisation.....	149

Liste des Figures

Chapitre 1 — Assemblages "plasmon-émetteur" : propriétés optiques et couplage

- Figure 1.1: Schéma de principe du transfert d'énergie entre les nanoparticules fluorescentes du donneur et de l'accepteur. (a, b) Schéma expérimental avec la détection fixée sur l'accepteur (a) ou le donneur (b) pendant que le l'excitation laser balaie le nanofil d'argent. Des images de fluorescence de deux canaux de détection correspondant à l'émission de l'accepteur et à l'émission du donneur sont enregistrées. Ces images sont ensuite utilisées pour calculer les rapports (c,d) des intensités mesurées de l'accepteur et du donneur. Les points désignent les positions de : 1 et 4 l'accepteur, 2 et 5 le donneur, 3 un donneur délocalisé. Les barres d'échelles font 1 μm . Schémas et figures reproduits avec autorisations de la référence [1].....16
- Figure 1.2: Figure illustrant le plan de chapitre. I : Description des propriétés des particules plasmoniques et émettrices seules. II : Description des propriétés des structures hybrides. III : Description des différentes méthodes d'assemblage de la littérature.....17
- Figure 1.3: Schéma de la propagation des SPP à une interface entre un métal et un diélectrique avec des constantes diélectriques $\epsilon_m(\omega)$ et ϵ_d18
- Figure 1.4: Courbe de dispersion d'une onde plasmon de surface pour une interface métal/diélectrique. La droite en pointillé représente la relation de dispersion de la lumière dans le milieu diélectrique.....19
- Figure 1.5: (a) Schéma de l'interaction entre des particules métalliques sphériques et un champ électrique lumineux qui induit une résonance plasmon. (b) Spectre d'absorption d'une suspension colloïdale de particules d'or.....21
- Figure 1.6: (a) Schéma de l'interaction entre des nanobâtonnets métalliques et un champ électrique lumineux induisant une résonance plasmon. (b) Spectre d'absorption d'une suspension de particules d'or22
- Figure 1.7: (a) Carte TPL simulée d'un triangle de 600 nm de côté pour une mesure TPL avec un faisceau de diamètre 50 nm. (b) Carte de la LDOS photonique du même objet dans un plan placé 25 nm au-dessus de la surface. Figures reprises avec autorisations de la référence [12].....24
- Figure 1.8: (a), Schéma d'auto-assemblage d'une chaîne de particules d'or et leur conversion en chaîne de perles continues par soudage induit par faisceau d'électrons. (b) Carte modélisant une chaîne de particules montrant différents modes. Les couleurs sont associées à différents niveaux d'énergie. Basée sur des cartes EELS. Schéma et carte repris avec autorisations de la référence [19].....26
- Figure 1.9: Carte d'intensité de l'EELS mesurée sur des nano-bâtonnets métalliques de trois tailles différentes (a) 630 nm, (b) 1250 nm et (c) 3230 nm respectivement. Les images SEM des barres métalliques sont présentées au-dessus des cartes EELS. Les barres d'échelle en noir sont de 200 nm. Ce travail, non publié, a été réalisé précédemment en collaboration entre E. Dujardin et M. Bosman à l'IMRE de Singapour.....27

Figure 1.10 : (a) Spectres d'extinction uV-visible de nanoprismes triangulaires d'épaisseur 10 nm et de côté 40, 60, 80 et 100 nm (courbes noires, rouges, bleues et vertes, respectivement) pour (a) l'or, (b) l'argent et (c) le cuivre. Figures reproduites avec autorisation de la référence [22].....	28
Figure 1.11: Schéma d'absorption d'énergie par le cœur, suivi de la une création d'une paire électron-trou. Le transfert vers la coquille est interdit, la désexcitation se fait donc de manière radiative.....	30
Figure 1.12: Image TEM de particules de différentes tailles de (a) LaF ₃ , (b) LaOF:Eu, (c) LaOCl, (d) NaYF ₄ cubiques, (e) NaYF ₄ hexagonales, (f) NaYF ₄ :Yb,Er hexagonales, (g) KPrF ₄ , (h) LiErF ₄ , (i) DyF ₃ , (j) TbF ₃ , (k) CeO ₂ et (l) CeO ₂ . Figures reprises avec autorisations de la référence [41].....	32
Figure 1.13: Spectre d'absorption de nanoclusters Au ₂₅ dans du toluène. Les lettres a, b, c indiquent les bandes d'absorption du cluster. Reproduit avec autorisation depuis la référence [45].....	33
Figure 1.14: Corrélation du nombre N d'atomes avec le modèle du Jellium ($E_i/N^{1/3}$) par nanocluster avec l'énergie d'émission. L'énergie d'émission diminue avec l'augmentation du nombre d'atomes. Le modèle de Bohr, utilisé pour les semi-conducteurs ($E_i/N^{2/3}$) est également montré pour délimiter les différentes lois d'échelle des métaux et semi-conducteurs confinés. Les mesures de l'émission de clusters Au ₁₁ , Au ₂₀ , Au ₂₃ , Au ₂₈ et Au ₃₁ (indiquées par des carrés et triangles), sont toutes cohérentes avec les relations d'échelle observées. Figure reproduite avec autorisation de la référence [53].....	34
Figure 1.15: (a) Représentation d'un centre NV où un atome d'azote remplace un atome de carbone créant une lacune. (b) Spectres d'émission de fluorescence d'un seul NV à température ambiante et à la température de l'hélium liquide. La longueur d'onde d'excitation était de 514 nm. Figures reprises avec autorisations des références (a) [72] et (b) [73].....	35
Figure 1.16: Diagramme de Jablonski sans (a) et avec (b) les effets des surfaces métalliques proches. E est le taux d'excitation sans métal. E _m est l'excitation supplémentaire en présence de métal.....	39
Figure 1.17: Effets d'une particule métallique sur les transitions d'un fluorophore. Les particules métalliques peuvent provoquer une extinction (k_m), peuvent exalter le champ lumineux incident (E_m) et peuvent augmenter le taux de décroissance radiative (Γ_m). Schéma repris avec autorisations de la référence [104].....	40
Figure 1.18: Taux de décroissance de la fluorescence pour une approche de la distance particule-fluorophore. Les points bleus indiquent le taux de décroissance expérimental Γ_T et les lignes donnent les valeurs calculées de Γ_m (orange), k_{nr} (rouge) et Γ_T (bleu). Encadré : parcelle agrandie avec rendement quantique Q _m (noir). Figure reprise avec autorisations de la référence [106].....	41
Figure 1.19: Images de fluorescence enregistrées sur le dessus de la cavité prismatique de 900 nm de long pour différents filtres passe-bande de 10 nm de large centrés à 650 (a), et 800 nm (c). Cartes du taux de décroissance radiative normalisé calculé pour des émetteurs scalaires positionnés à 40 nm au-dessus de la structure et émettant à 650 (b) et 800 nm (d). Figures reprises avec autorisations de la référence [109].....	42
Figure 1.20: Comparaison de l'imagerie de mode plasmonique par (a) SNOM pour un nanoprisme d'or de 820 nm de côté, (b) résonance quadripolaire par PEEM sur un prisme de 300 nm de côté avec un faisceau incident à 75°, (c-d) EELS et CL pour un nanoprisme d'argent de 555 nm de côté. Les images sont reproduites avec autorisation des références pour (a) [127], (b) [128] et (c-d) [126].....	45

Figure 1.21: (a) Image AFM de nanoparticules d'Ag formées à partir d'une seule des sphères de latex. L'échelle des barres est de 500 nm et le contraste en hauteur est de 25 nm. (b) Carte d'intensité confocale en tension continue de la fluorescence des R6G déposées sur la région des nanoparticules similaires à (a). Figures reprises avec autorisations de la référence [131].....	46
Figure 1.22: La durée de vie est estimée à partir de la courbe de décroissance exponentielle d'intensité de fluorescence enregistrée après la fin du pulse laser.....	46
Figure 1.23: (a) Histogramme des composantes des durées de vie (τ_m , τ_0) obtenues à partir d'ajustements bi-exponentiels des pixels de la zone de balayage. (b) Carte spatiale de l'intensité pré-exponentielle normalisée pour la composante τ_m 0,5 ns. (c) comme (b) pour la composante 3,6 ns τ_0 montrant l'homogénéité dans la région. Figures reprises avec autorisations de la référence [131].....	47
Figure 1.24: (a) image SEM du film de nanoparticules sur un substrat de silicium. Image SEM reprise avec autorisations de la référence [132]. (b) Schéma de principe d'un moule de PDMS utilisé pour charger localement un substrat afin de diriger l'assemblage de particules en 2D, (c) image SEM de particules chargées, assemblées par la méthode (b). Schéma et image TEM reprises avec autorisations de la référence [137].....	49
Figure 1.25: Représentation schématique et images AFM des assemblages entre des nanoparticules cationiques et des molécules d'ADN anioniques : (a) en complexes linéaires de ratio 10 : 1, (b) en structures ramifiées de 100 : 1 et (c) en chaînes par peignage de l'ADN. Schéma et images AFM repris avec autorisations de la référence [141].....	50
Figure 1.26: (a) Illustration schématique du type de réseau carré d'une couche de S-layer. Le groupe de symétrie est ici p4. Schéma repris avec autorisations de la référence [143]. (b) Image TEM des nanoparticules d'or synthétisées sur une couche de S-layer avec une symétrie de réseau carré. La barre d'échelle est de 50 nm. (c) Image TEM de particules attachées de manière régulière sur la surface de S-layer avec une géométrie carrée. La barre d'échelle est de 100 nm. Images TEM reprises avec autorisations de la référence [144].....	51
Figure 1.27: (a) Stratégie d'assemblage basée sur la formation d'ADN double brin pour des assemblages de nanoparticules d'or. Deux ssDNA de séquence « B » reconnaissent la séquence « B' » d'un brin plus long, formant un dsDNA. (b) Image TEM montre la formation d'un dimère. Schéma et figure TEM repris avec autorisations de la référence [146].....	51
Figure 1.28: (a) organisation de nanoparticules d'or en triangle et en ligne grâce à des oligomères d'ADN cyclique (i) et linéaire (ii). (b) Utilisation de l'oligomère cyclique pour générer des triangles composés de (i) trois particules larges, (ii) deux larges et une petite, (iii) une large et deux petites, et (iv) trois petites. Schéma et images TEM repris avec autorisations de la référence [147].....	52
Figure 1.29: (a) Schéma d'une Jonction Holliday, représentant un seul croisement entre deux doubles hélices. (b) Schéma d'un double croisement antiparallèle. Schémas repris avec autorisations de la référence [150]. (c) Schéma de construction d'un origami d'ADN. (d) Model du repliement des brins d'ADN reconstruit à partir des images AFM (e). Les étoiles font 100 nm de largeur, la barre d'échelle en (e) est de 1 μ m. Schémas et image AFM repris avec autorisations de la référence [148]. (f) Nanohélices orientées gauche et droite. (g) Dichroïsme circulaire des nanohélix (f). Les cadres de couleur indiquent la correspondance entre les spectres et les nanohélix présentés dans les images TEM (barres d'échelle : 20 nm). Schéma et figure reproduits avec autorisation de la référence [149].....	53

- Figure 1.30: Stratégie de formation d'un dimère de particule d'or suite à la formation directe d'un dsDNA entre deux brins ssDNA complémentaires « A » et « A' ». Chacun des deux brins étant préalablement fonctionnalisés avec une particule d'or. Schéma repris avec autorisations de la référence [146].....53
- Figure 1.31: Représentation d'un motif coiled-coil et des paramètres qui lui sont associés. Les paramètres de base sont le pas du motif (périodicité de la superhélice), l'angle du pas (angle de l'hélice par rapport à l'axe de la supercoil) et l'angle de croisement de l'hélice. Schéma repris avec autorisations de la référence [157].....54
- Figure 1.32: (a) schéma de principe de l'assemblage de nanoparticules d'or dirigées par liens nanométriques ceintures et armatures. (b) images TEM de l'assemblage. Les particules sont séparées de 7 nm. Schéma et image TEM repris avec autorisations de la référence [155].....54
- Figure 1.33: Représentation schématique de l'interaction entre des nanoparticules biotinylées et de la streptavidine pour le processus d'assemblage et de désassemblage. Schéma repris avec autorisations de la référence [141].....55
- Figure 1.34: vue panoramique des protéines artificielles. Des exemples de différentes familles de protéines artificielles sont présentés sur une carte en 2 D. Les protéines sur la partie droite de la carte ont une proportion plus élevée de leur séquence modifiée par rapport aux protéines naturelles. La partie supérieure de la carte représente les protéines modifiées par l'évolution dirigée, tandis que la partie inférieure représente les protéines modifiées par un design rationnel. Dans cette classification verticale en trois étapes, la ligne inférieure représente les protéines modifiées par des projets de conception rationnelle ; la rangée du milieu représente les changements de séquences aléatoires dans des positions conçues rationnellement ; et la rangée du haut représente les protéines dont les positions sont aléatoires le long de la séquence complète. Figure reprise avec autorisations de la référence [161].....56
- Figure 1.35: (a) Schéma de la protéine composée d'un N-cap (brique rouge), d'un C-cap (brique verte) et d'un nombre modulable de repeats internes (doubles hélices antiparallèles bleues). (b) Modèle d'une protéine avec les caps en rouge et les répétitions de motifs en vert et jaune. Un repeat unique est présenté en (c). Modèles repris avec autorisation de la référence [164].....58
- Figure 1.36: (a) Séquence de la double hélice α dans la protéine **naturelle**, (b) séquence consensus de la protéine **artificielle**. (c) Représentation 3D de la protéine artificielle avec en vert la partie rigide et conservée, en orange la partie hypervariable. Séquences et modèle repris avec autorisations de la référence [164].....59
- Figure 1.37: Schéma d'un phage M13, clonant une séquence étrangère (celle d'une protéine α -Rep, par exemple) dans son génome afin de modifier les protéines p3 présentes sur une des faces de son enveloppe. Cette modification entraîne l'expression des acides aminés étrangers en tant que partie fusionnée à la protéine p3.....59
- Figure 1.38: Organigramme schématique montrant la conception du phage display et la sélection des protéines α -Rep (A-D). Ces étapes impliquent : (A) la construction de la phagothèque ; (B) la sélection des α -Rep sur une cible et le rinçage des phages non liés ; (C-D) élution acide des phages faiblement liés et amplification bactérienne de certains phages. (E) production et la purification à grande échelle des α -Rep sélectionnées. Schémas repris avec autorisations de la référence [167].....60

Figure 1.39: Schéma de l'auto-assemblage de nanoparticules dirigé par la formation de la paire de protéines Rep. Étape I : recouvrement par un peptide des nanoparticules d'or stabilisées par du citrate. Étape II : fonctionnalisation des protéines par échange de ligands. Étape III : auto-assemblage des nanoparticules par reconnaissance de pairs. (b-c) Images MET de l'auto-assemblage de nanoparticules d'or induit avec un rapport molaire (nanoparticule : protéine) 1 : 30 (b) ou 1 : 20 (c). (e) Schéma des tests de compétition d'affinité où l'addition d'un excès de la protéine induit le désassemblage des nanoparticules. (d) image TEM après le désassemblage. Schéma et image TEM repris avec autorisations de la référence [168].....	61
Figure 1.40: Sensogrammes SPR pendant les phases d'adsorption et de désorption surveillant les interactions entre les protéines α -Rep immobilisées et les nanoparticules d'Au stabilisées au citrate ($[Aucit] = 10 \text{ nM}$). Les lignes noires pleines sont les ajustements exponentiels des phases d'association et de dissociation. Figure reprise avec autorisations de la référence [167].....	62

Chapitre 2 — Matériel et Méthodes

Figure 2.1: Images SEM de microplaquettes obtenues par les protocoles avant centrifugation donnant de petits (a) et de grands (b) cristaux. Échelles 10 μm . (c) et (d) histogrammes de tailles des synthèses (a) et (b) respectivement.....	74
Figure 2.2: (a) image SEM des nanoprismes. Échelle 3 μm . (b) histogramme de taille de la synthèse illustrée en (a).....	75
Figure 2.3: Principe de fonctionnement source d'ionisation par électrospray. La solution contenant les clusters est évaporée sous l'effet de gouttelette sous l'effet d'un potentiel élevé. Puis ces gouttelettes implosent lorsque leur densité de charge devient trop élevée, libérant le composé sous forme protonés ou déprotonés correspondant au mode positif ou négatif respectivement. Ils sont ensuite séparés en fonction de leur rapport m/z	76
Figure 2.4: Diffraction des rayons X par un réseau de plans hkl . Représentation du vecteur de diffusion \mathbf{q} en fonction des vecteurs d'onde incidents et diffusés \mathbf{Q}_i et \mathbf{Q}_d	78
Figure 2.5: Principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique. Le microlevier oscille à une fréquence et une amplitude donnée puis est attiré par la surface de l'échantillon, entraînant une variation de l'amplitude détectée par la photodiode. Ensuite, le circuit électrique ajuste la hauteur du point pour retrouver la valeur originale.....	79
Figure 2.6: Image optique d'un substrat verre/ITO avec des croix de marquage espacées de 200 μm sur lequel des microplaquettes d'or ont été déposées. Échelle 200 μm	80
Figure 2.7: Principe de fonctionnement du microscope électronique en transmission pour les modes image et diffraction.....	82
Figure 2.8: Images TEM en mode clair de vésicules déposées sur des grilles de carbone et teintées avec (a) de l'acide phosphotungstique et (b) du tétr oxyde d'osmium. Les flèches blanches sur l'image (a) montrent les sels précipités de l'agent colorant. (c) et (d) histogrammes des tailles apparentes des vésicules pour les colorants (a) et (b) respectivement. $\langle D \rangle$ est le diamètre moyen et σ la déviation moyenne. Images TEM et figures reproduites avec autorisation de la référence [12].....	83
Figure 2.9: (a) Image cryoTEM de fibres composées de peptides sur une grille « lacey ». Image cryoTEM reproduite avec autorisation de la référence [15]. (b) Schéma de principe de préparation d'un échantillon en trois étapes : (I) le dépôt de la solution, (II) l'absorption de l'excès et (III) la vitrification.....	84

Figure 2.10: Diagramme de Jablonski représentant les états électroniques d'une fluorophore et les transitions entre ces états. Il illustre ici le principe de fluorescence.....	86
Figure 2.11: Montage du spectromètre lors de la mesure des spectres en lumière blanche.....	88
Figure 2.12: Schéma de la configuration de la spectroscopie en champ sombre. La lumière blanche est focalisée sur l'échantillon avec un diaphragme champ sombre et la lumière diffusée vers l'avant est collectée en transmission par un objectif.....	89
Figure 2.13: Schéma du microscope en transmission utilisé pour les mesures de cartographie en fluorescence des échantillons.....	90
Figure 2.14: Schéma de principe de fonctionnement de la CL dans un TEM. Le faisceau d'électrons balaie l'échantillon et excite la matière. L'émission de lumière émise par l'échantillon est ensuite renvoyée sur un spectromètre grâce à des miroirs paraboliques.....	92

Chapitre 3 — Les protéines α -Rep, des modules pour l'auto-assemblage

Figure 3.1: (a) Image SEM des particules obtenues lors de la synthèse, avec des zooms sur (b) des nanoprismes 2D, (c) des décaèdres et (d) des icosaèdres respectivement. (e) Spectres caractéristiques UV-visible des germes d'or obtenus lors de la première phase de la synthèse (en rouge, $\lambda_{\max} = 524$ nm), de la solution de croissance sans ajout de germes (gris) et des nanostructures synthétisées à la suite de l'ajout de germes d'or à la solution de croissance en présence de G8 (en rose), qui présentent deux pics à $\lambda_{\max} = 556$ nm et $\lambda_{\max} = 804$ nm. Figure reproduites avec autorisations de la référence [1].....	96
Figure 3.2: (a, b) Images nc-AFM d'un nanoprisme (a) après synthèse et (b) après avoir été nettoyé au plasma O ₂ . Les carrés noirs indiquent les zones zoomées dans les panneaux de droite. Les barres d'échelle sont de 100 nm et 6 nm pour les panneaux de gauche et de droite respectivement. (c) Profils des hauteurs nc-AFM du nanoprisme recouvert de G8 (rouge) et du nanoprisme nettoyé au plasma (noir), respectivement en (b) et (c). Figure reproduites avec autorisations de la référence [1].....	97
Figure 3.3: (a) Spectres d'absorption de suspensions colloïdales avant optimisation pour les formes 2D (en violet) et après avec des pics de résonance dipolaire variants de 745 nm à 835 nm lors des variations du rapport molaire nuclei/Au(III) dans la solution de croissance. (b) Image SEM des nanocristaux 2D formés par la synthèse. Échelle 500 nm.....	98
Figure 3.4: (a) Schéma de principe de spectromicroscopie en champ sombre. (b) Image large champ de microscopie en champ sombre de l'échantillon. Les points rouges correspondent aux prismes 2D et les points verts aux autres particules : déca- et ico-saïdres, dont les zooms sont montrés respectivement en haut et en bas de l'image (c). (d) Spectre d'absorption UV-visible des particules en solution (noir) avec un pic LSPR maximum à 755 nm et d'une seule particule 2D déposée sur du verre (orange).....	99
Figure 3.5: Ensemble de mesures du décalage du pic de résonance d'une particule en fonction de : (a) l'indice de réfraction du solvant et (b) du changement de l'indice de réfraction en unité d'indice de réfraction (RIU). (c) Histogramme regroupant les différentes sensibilités de particules issues de la même synthèse. (d) Graphique regroupant les différentes sensibilités mesurées en solution (formes pleines) et sur particules uniques (formes creuses), dans la littérature, pour : des particules sphériques (cercles noirs), des nano-cubes (carrés orange), des nano-bâtonnets (cercles marron), des prismes (triangles bleus) et des particules de plus hautes symétries comme des nano-bipyramides et étoiles (losanges violets). [2-7].....	100

Figure 3.6: (a) Spectres d'absorbance de la solution colloïdale de nanocristaux 2D biotinylés avant et après incubation avec de la streptavidine, dont les pics de résonances LSPR sont respectivement à 755 nm (en noir) et à 762 nm (en rouge). L'encadré noir en pointillés correspond à la zone zoomée des dérivées des courbes présentées en (b). (c) Ensemble de mesure du décalage de la longueur d'onde du pic de résonance après incubation de la streptavidine (en rouge) et des contrôles : buffer pur (PBS) et de la protéine BSA (en bleu).....	102
Figure 3.7: (a) Schéma et (b,c) images SEM de l'empilement basal obtenu par auto-assemblage entre des nanoprismes streptavidinés et biotinylés. (d) Expérience de contrôle en l'absence de biotine ne montrant aucun empilement. (e) Schéma et (f,g) images SEM d'assemblages cœur-satellite obtenus avec des nanoprismes streptavidinés et des nanosphères d'or biotinylées. (h) Expérience de contrôle avec des prismes non streptavidinés. Aucun satellite n'est observé, mais les sphères sont présentes en amas (flèches blanches). Les barres d'échelle des images (b,d,f,h) font 500 nm et celles des images (c,g) font 200 nm. Figures reprises avec autorisations de la référence [1].....	103
Figure 3.8: Modélisations de l'hélice formée par une longue protéine α Rep vue de profil (a) et de face (b). Modélisation d'un assemblage d'une hélice formée par des protéines « briques », ici en couleurs froides (de violet foncé à vert foncé) maintenues ensemble par des protéines « agrafes », ici en couleurs chaudes (de jaune à fuchsia), vues de profil (c) et de face (d).....	105
Figure 3.9: (a) Schéma de l'utilisation, pour la morphosynthèse, d'un template de protéines en forme d'hélice composée de briques reliées par des agrafes. Cette morphosynthèse se fait entre les germes, les sels de HAuCl ₄ , le réducteur NH ₂ OH et les faces internes des briques présentant une affinité avec l'or (110). Le template de protéines étant toujours présent, nous pouvons envisager l'utilisation d'agrafes fonctionnalisées avec des émetteurs. (b) Schéma de l'association d'un tour d'hélice, composée de deux briques reliées par une agrafe, avec des particules d'or sphériques grâce à des cystéines disposées sur la face interne des briques. Ces sphères enroulées de protéines sont ensuite assemblées avec un deuxième type d'agrafe. Cet assemblage est ensuite irradié avec un laser pour fusionner les particules entre elles, entraînant la disparition du template de protéines.....	106
Figure 3.10: Schémas représentatifs des protéines (a) lors de l'assemblage entre le « bait » et bBE3, (c) et (d) Imp59 avant et après clivage à la TeV protéase (en rose) et (f) lors de l'assemblage entre Imp59 et bBE3. Les lettres A à E représentent les « repeats » de bBE3, I1 à I3 les « repeats » de reconnaissance de bBE3. Les lettres blanches sont celles comportant la tyrosine et dirigeant l'assemblage entre les deux protéines. Nc et Cc sont respectivement les N-cap et C-cap des protéines. HTN et HTC sont respectivement les HisTag liés aux terminaux N-Cap et C-Cap respectivement. Une permutation circulaire (flèches bleues et rouges entre les schémas (a) et (c)) positionne le « repeat » de la protéine « bait ». I1 et I2 sont positionnés à la fin de la protéine Imp59 et I3 au début. Les modélisations des schémas (a), (d) et (f) sont représentées en (b), (e) et (g-h) respectivement. (g) et (h) étant les vues de face et de profil de (f) respectivement.....	108
Figure 3.11: (a) Photo du précipité blanc obtenu lors de l'assemblage entre la brique Imp59 et l'agrafe bBE3. (b) Image optique des assemblages lorsque bBE3 est fonctionnalisée avec un Alexa fluor. (c) zoom de la zone blanche en pointillés de (b).....	110

Figure 3.12: Images TEM des assemblages de protéines réalisées en coloration négative avec (a-b) de l'UA et (c) du PTA. L'encart en (a) montre un zoom de la région encadrée. L'encadré de (c) montre la région où des formes tubulaires sont visibles. Les échelles sont de 200 nm pour les images (a-c) et de 10 nm pour le zoom en (a).	111
Figure 3.13: (a-b) Images TEM des assemblages de protéines réalisées en coloration négative avec du MB. (c) Modèle de l'hélice vue selon les binders. (d) Profil pris le long d'une hélice sur le zoom de l'encart (b). L'échelle de (a) est de 100 nm et celle de (b) de 10 nm.....	112
Figure 3.14: (a) Signal SAXS de la solution contenant les assemblages en suspension. (b) Diagramme du groupe d'espace P21212 identifié.....	113
Figure 3.15: (a) Superposition de spectres SAXS issus de divers échantillons. (b) Spectres SAXS d'un échantillon typique à 20°C et à 70°C. (c) Variation d'intensité en fonction de la température des pics : (12 0 0) en noir et (3 3 1) en rouge. (d) Variation de la position en fonction de la température des pics : (1 0 0) en noir et (6 0 0) en rouge. Les symboles pleins correspondent à la montée en température et les symboles creux à la descente en température.....	114
Figure 3.16: (a) Signaux SAXS des suspensions des assemblages de protéines avec différentes concentrations en MB pour une force ionique $FI=1,25$ (en bleu) et $FI=1,05$ (en vert). (b) Simulation du signal SAXS de tubes de 8 nm de diamètre avec le logiciel SasView. [21].....	115
Figure 3.17: (a-d) Images cryoTEM en champ large d'assemblage d'hélices. Les barres d'échelle sont de 2 μm pour (a) et 50 nm pour (b-d).....	116
Figure 3.18: Images cryoTEM des assemblages de protéines de trois formes différentes : (a) les ondulations, (b) les tirets et (c) les chevrons. Les barres d'échelle sont de 25 nm.....	116
Figure 3.19: (a) Modèle de la superhélice avec les back binders. (b) Image TEM zoomée, les traits pointillés indiquent les lignes de binders et le losange indique la distance entre trois binders adjacents de la même hélice et du binder le plus proche de la prochaine hélice.....	117
Figure 3.20: Images cryoTEM des assemblages de protéines en formes de : (a) ondulations, (c) chevrons et (e) une autre orientation des hélices. Les images (c) et (e) sont des zoom issues de l'images, indiqués en rouge et vert respectivement. (b), (d) et (f) FFT des images (a), (c) et (e) respectivement.....	118
Figure 3.21: (a) Histogramme regroupant les distances mesurées sur les FFT des images cryoTEM. (b) Superposition au petit dhkl du spectre SAXS (en bleu) et de l'histogramme des distances mesurées sur les FFT des images cryoTEM (en rouge).....	119
Figure 3.22: (a) FFT de l'image de la figure 3.20.a. Les cercles de couleurs correspondent aux pics d'intensité identifiés par rapport au diagramme de diffraction simulé avec Carine avec les paramètre du SAXS selon la direction {100} en (b). (c) Recouvrement de (a) et (b).....	120
Figure 3.23: (a) FFT de l'image de la figure 3.20.e. Les cercles de couleurs correspondent aux pics d'intensité identifiés par rapport au diagramme de diffraction simulé avec Carine avec les paramètre du SAXS selon la direction {101} en (b). (c) Recouvrement de (a) et (b).....	120
Figure 3.24: Images cryoTEM obtenues à partir d'une vidéo de crytomographie pour cinq tilts : (a) -14°, (b) -16°, (c) -6°, (d) 14° et (e) 16°. (f) et (g) respectivement zoom des rectangles jaunes sur les images (a) et (e). (h), (i) et (j) respectivement zoom des rectangles rouges sur les images (b), (c) et (d).....	121

Figure 3.25: (a) Vue du modèle pdb ayant servir de support à la création de l'hélice (b).
(c) superposition de (a) et (b). (d-f) Vues du modèle de l'hélice selon 3 directions : (d) vue orthogonal au plan des binders, (e) vue selon le plan des binders et (f) vue de dessus.....122

Figure 3.26: Modèle pdb électrostatique des superhélices.....123

Figure 3.27: Vues du modèle des cristaux selon 3 directions : (a) vue orthogonal au plan des binders, (b) vue selon le plan des binders et (c) vue de dessus.....123

Chapitre 4 — Physico-chimie d'agrégats d'or et de centres colorés NV comme émetteurs hyperspectraux

Figure 4.1: Spectres de fluorescence de la solution orangée observée (après la diminution de la concentration du réducteur à 25 mM et du pH à 3, obtenus) pour des excitations à $\lambda_{ex1} = 300$ nm (en bleu), $\lambda_{ex2} = 350$ nm (en vert) et $\lambda_{ex3} = 410$ nm (en rouge). Les pics fins à 600 nm et 700 nm sont les harmoniques des longueurs d'onde d'excitation λ_{ex1} et λ_{ex2}128

Figure 4.2: Spectres d'absorption UV-vis des solutions de clusters (a) AuNC_a et (b) AuNC_i. Spectres de fluorescences des solutions de clusters (c) AuNC_a et (d) AuNC_i. Les longueurs d'ondes d'excitation des spectres de fluorescence sont $\lambda_{ex1} = 350$ nm (en bleu), $\lambda_{ex2} = 410$ nm (en vert) et $\lambda_{ex3} = 510$ nm (en rouge) pour (c) et $\lambda_{ex1} = 350$ nm (en bleu), $\lambda_{ex2} = 410$ nm (en vert) et $\lambda_{ex3} = 510$ nm (en rouge) pour (d). Un zoom en intensité est réalisé sur les courbes rouge et verte en encart de la figure (d).....130

Figure 4.3: Spectres de fluorescence de (a) les AuNCs après synthèse obtenue par le protocole standard de l'aniline, (b) une solution produite dans 95 % EG, (c) une solution produite en l'absence d'EG, (d) Spectres de fluorescence d'une solution de 10 nm d'AuNP stabilisés au citrate qui ne présentent qu'une diffusion harmonique d'excitation. (e,f) Spectres de fluorescence des solutions de contrôle obtenues par le protocole de synthèse du I.1.1, mais sans ajout (e) d'aniline ou (f) de HAuCl₄. Tous les panneaux suivent le même code couleur indiqué à droite pour les longueurs d'onde d'excitation.....131

Figure 4.4: (a) Image HRTEM typique des AuNC synthétisés. (b) Distributions de taille des AuNC_a (en rouge) avec une taille moyenne de $2,9 \pm 1,6$ nm et des AuNC_i (en orange) avec une taille moyenne de $2,4 \pm 0,7$ nm.....132

Figure 4.5: Images HRTEM des clusters de formes (a) pentatwin, (b) single twin, (c) monocristal isotrope, (d) monocristal oblong. Les barres d'échelles font 2 nm.....133

Figure 4.6: (a-d) Histogrammes de taille des AuNC_{i,a} (couleurs claires) et AuNC_a (couleurs foncées) triés en classes de forme. Ces classes sont illustrées par les images HRTEM et les croquis colorés en insert à droite de chaque distribution : (a) pentatwin, (b) single twin, (c) monocristal isotrope, (d) monocristal oblong. Échelle de mesure 2 nm. Les lignes noires sont des ajustements lognormaux. La ligne rouge représente la démarcation entre les particules de plus de 2,2 nm et celle inférieur à cette taille.....134

Figure 4.7: Images de topographie AFM de (a) AuNC après centrifugation déposés sur mica et (d) une surface de mica seul. Les profils de hauteur des surfaces sont présentés en : (b) pour les AuNC sur mica et en (e) pour le mica seul. Les histogrammes de la hauteur des échantillons sont tracés en : (c) pour les AuNC sur mica et en (f) pour le mica seul avec une hauteur moyenne respective de $1,7 \text{ nm} \pm 0,7 \text{ nm}$ et de $0,7 \text{ nm} \pm 0,3 \text{ nm}$135

- Figure 4.9: (a) Spectres photo-électronique X de clusters d'or 1i (en vert), 2a (en rouge) et 4a (en orange). L'or métallique est utilisé comme référence. Les paramètres des ajustements gaussiens sont indiqués à côté de chaque spectre. (b) Table comportant le pourcentage d'Au(I) et Au(0) ainsi que le ratio Au(I)/Au(0) pour chaque type d'échantillon. (c) Schématisations des structures des clusters stables calculées par DFT de clusters comportant entre 8 et 20 atomes. Reproduites avec autorisation des références [20] et [21].....138
- Figure 4.10 : (a) Spectres de masse-sur-charge des AuNCs (4a) stabilisés avec de longs ligands thioPEG biotinylés enregistrés en mode positif. Les états de charge possibles pour l' $\text{Au}_6(\text{S-PEG}_{70}\text{-Biotine})_6$ et l' $\text{Au}_7(\text{S-PEG}_{70}\text{-Biotine})_7$ sont indiqués respectivement par des lignes bleues et vertes. (b) Spectre ESI-MS déconvolué avec un algorithme de corrélation multiplicative et montrant deux pics compatibles avec les Au_6 (marqueur bleu) et Au_7 (marqueur vert) AuNCs.....139
- Figure 4.11: Spectres masse-sur-charge ESI-MS en mode positif pour les clusters d'or (1a) et (1i) respectivement en (a) et (b). On observe dans les deux cas une large distribution des états de charge qui peuvent être attribués en (a) aux clusters $\text{Au}_{25}(\text{S-PEG}_{12}\text{-NH}_2)_{19}$ pour (1a), indiqué par les pics 5+ à 8, et en (b) aux clusters $\text{Au}_{10}(\text{S-PEG}_{12}\text{-NH}_2)_{10}$ avec $\text{Au}_8(\text{S-PEG}_{12}\text{-NH}_2)_8$ pour (1i), indiqué par les pics rouges 3+ à 5+ et les marqueurs roses 3+ à 4+ respectivement. Dans les deux cas, les données lissées sont affichées en couleur sombre par-dessus les données brutes.....140
- Figure 4.12: Spectres ESI-MS masse sur charge en mode négatif pour les AuNC (2a) et (2i) respectivement en (a) et (b). Les inserts présentent des distributions isotopiques expérimentales (rouge) et simulées (noir) pour les pics de m/z les plus élevés de chaque échantillon. Les autres pics numérotés peuvent être attribués à des amas d'or de taille plus petite et partiellement fragmentés.....140
- Figure 4.13: (a) Carte 2D et (b) spectres représentatifs de l'intensité de la fluorescence à température ambiante des clusters AuNC_a en fonction des longueurs d'onde d'émission λ_{em} , et d'excitation λ_{ex} . (c) Carte 2D et (d) spectres représentatifs de l'intensité de la fluorescence des clusters AuNC_i . Les lignes colorées en (a) et (c) correspondent aux spectres en (b) et (d) respectivement. Les zones blanches des tracés en 2D ne contiennent aucune donnée, car la fluorescence est enregistrée de 10 nm au-dessus de λ_{ex} jusqu'à 10 nm avant le second harmonique, $2\lambda_{ex}$142
- Figure 4.14: Carte 2D représentatives de l'intensité de la fluorescence à température ambiante des clusters AuNC_a en fonction des longueurs d'onde d'émission λ_{em} , et d'excitation λ_{ex} issue de (a) la synthèse de la figure 4.12 et (b) une seconde synthèse. Carte 2D représentatives de l'intensité de la fluorescence à température ambiante des clusters AuNC_i en fonction des longueurs d'onde d'émission λ_{em} , et d'excitation λ_{ex} issue de (c) la synthèse de la figure 4.12 et (d) une seconde synthèse. Les zones blanches des tracés en 2D ne contiennent aucune donnée, car la fluorescence est enregistrée de 10 nm au-dessus de λ_{ex} jusqu'à 10 nm avant le second harmonique, $2\lambda_{ex}$143
- Figure 4.15: (a) Carte 2D et (b) spectres représentatifs de l'intensité de la fluorescence à température ambiante des clusters à base d'aniline dans l'eau fonctionnalisés avec des ligands HS-PEG-biotine (4a) en fonction des longueurs d'onde d'émission λ_{em} , et d'excitation λ_{ex} . (c) Carte 2D et (d) spectres représentatifs de l'intensité de la fluorescence des clusters à base d'indole dans l'eau et fonctionnalisés avec des ligands HS-PEG-biotine (4i). Les lignes colorées en (a) et (c) correspondent aux spectres en (b) et (d) respectivement. Sur certains spectres, les résonances Raman de l'eau qui apparaissent comme des pics nets et se superposent au signal d'émission des clusters.....144

Figure 4.16: (a) Mesures de la durée de vie de la fluorescence et (b) ajustement des résidus des clusters AuNC _a (bleu) et AuNC _i d'indole (rouge). Dans (a), les fits sont en noir et la référence du POPOP utilisée est en gris. (c) Ajustement de la courbe de décroissance exponentielle avec une exponentielle simple et (d) ajustement du résidu associé.....	147
Figure 4.17: (a) Mesures de la durée de vie de la fluorescence et (b) ajustement des résidus des clusters AuNC _a (bleu) et AuNC _i (rouge) fonctionnalisés avec de la biotine en rouge et bleu respectivement. Dans (a), les ajustements sont en noir et la référence du POPOP utilisée est en gris.....	148
Figure 4.18: (a) Spectres d'émission blancs normalisés d'une solution de clusters AuNC _a obtenus par sommation de tous les spectres de la figure 4.8.a pour $400 \leq \lambda_{\text{ex}} \leq 700$ nm (bleu) et par excitation à large bande 350-500 nm (noir). (b) Coordonnées trichromatiques des solutions de clusters à base d'aniline (carré) et d'indole (cercle) sur l'espace de couleur CIE de 1931 avant (noir) et après (rouge) thio-pégylation. Le carré blanc correspond à l'émission des AuNC _a lors d'une excitation à large bande (spectre noir en (a)). En encart de (b) un zoom sur la zone comprise entre $0,25 \leq \text{CIE } x \leq 0,4$ et $0,25 \leq \text{CIE } y \leq 0,425$	150
Figure 4.19: Montage de la verrerie utilisée pour le nettoyage des nanodiamants.....	153
Figure 4.20: Spectre d'aborsption (en rouge pointillé) et d'émission (en rouge) des nanodiamants Adamas utilisés. [35].....	154
Figure 4.21: Spectres de fluorescence à $\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm : des clusters à base d'indole (4i) seuls (en noir), du mélange contrôle de prismes streptavidinés et de clusters non biotinyrés (en rouge) et du mélange de prismes streptavinidés et de clusters biotinyrés (en bleu).....	155
Figure 4.22: Images SEM des assemblages de nanoprismes streptavidinés et de nanodiamants biotinyrés déposés sur silicium. Les images à droite sont des zooms sur des assemblages contenant des nanodiamants. Échelles 200 nm...	155
Figure 4.23: Images SEM des assemblages de nanoprismes streptavidinés et de nanodiamants biotinyrés déposés sur silicium. Les images à droite sont des zooms sur des assemblages contenant un nanodiamant. Échelles 200 nm à gauche et 100 nm à droite.....	156
Figure 4.24: Images SEM des échantillons de microplaquettes et de nanodiamants Adamas sur verre/ITO (a-c) dilués 10 fois et (d-f) dilués 1 000 fois.....	157

Chapitre 5 — Études optiques des modes plasmoniques : de la particule d'or à l'assemblage hybride

Figure 5.1: Schéma de l'excitation d'un émetteur à distance par propagation d'un plasmon de surface.....	163
Figure 5.2: Représentation d'un datacube de mesures. À gauche : image HAADF de la particule, la barre d'échelle est de 100 nm. Au fond : spectres de cathodoluminescence pris au coin (en orange) et à un quart de la longueur (en violet) du prisme. En bas : cartographie de l'intensité lumineuse mesurée au maximum des deux pics du spectre orange, à $\lambda = 661$ nm (en bleu) et $\lambda = 861$ nm (en vert).....	164
Figure 5.3: Cartes CL d'un (a) triangle pointu de 560 nm de longueur et (b) triangle tronqué de 900 nm de côté avec une troncature de 210 nm. Les barres d'échelles sont de 100 nm.....	165
Figure 5.4: (a) Image HAADF d'un prisme de 900 nm de côté avec une troncature de 210 nm. (b) Spectre CL global de (a). (c) Image TEM d'un prisme de 880 nm de côté avec une troncature de 165 nm. (d) Spectre CL global de (c). Les barres d'échelle font 100 nm.....	166

Figure 5.5: Spectre CL pris au centre d'un triangle de 560 nm tel que mesuré (en bleu) et après lissage par la méthode de la moyenne des 5 plus proches voisins (en rouge).....	166
Figure 5.6: Vue schématique de la trajectoire rectiligne d'un électron passant près d'une sphère métallique.....	169
Figure 5.7: (a) Superposition du maillage hexagonal (points rouges) d'un triangle tronqué de 900 nm avec une troncature de 210 nm sur son image TEM HAADF. (b) Maillage hexagonal seul.....	171
Figure 5.8: (a) Image TEM HAADF d'un prisme d'or de 560 nm de côté, la barre d'échelle est de 100 nm. (b) Schéma présentant le même triangle que (a). Les cercles de couleurs indiquent les positions où les spectres ont été simulés et mesurés, placés en orange sur le coin A, en bleu au centre, en jaune au milieu du côté BC et en violet au quart du côté BC. (c) et (d) spectres CL respectivement mesurés et simulés, les couleurs des spectres correspondent aux couleurs des positions indiquées en (b).....	172
Figure 5.9: (a-d) Spectres CL aux échelles (x1) simulés (trait fin) et mesurés (trait épais) sondés sur le coin A (a), au centre (b), au milieu du côté BC (c) et au quart du côté BC (d). (e-h) Cartes simulées aux longueurs d'onde des premiers pics de résonance des spectres simulés de (a-d). (i-l) Cartes mesurées aux longueurs d'onde des premiers pics de résonance des spectres mesurés de (a-d). (m-o) Cartes simulées aux longueurs d'onde des seconds pics de résonance des spectres simulés de (a-d) si ceux-ci existent. (p-r) Cartes mesurées aux longueurs d'onde des seconds pics de résonance des spectres mesurés de (a-d) si ceux-ci existent.....	173
Figure 5.10: Coupe de l'intensité CL le long du côté BC du prisme des cartes mesurées (en noir) et simulées (en rouge) pour $\lambda_s = 680$ nm (en haut) et $\lambda_s = 830$ nm (en bas).....	174
Figure 5.11: Spectres CL simulés pour des indices de réfraction du substrat Si_3N_4 de (a) $n = 2$, (b) $n = 2,25$ et (c) $n = 2,5$	175
Figure 5.12: (a-d) Cartes EELS d'un prisme d'or de 830 nm à différentes énergies. Reproduites avec autorisation de la référence [7]. (e-g) Cartes CL d'un prisme d'or de 560 nm à différentes énergies. Les barres d'échelle font 200 nm.....	176
Figure 5.13: (a) image TEM HAADF d'un prisme d'or de 900 nm de côté avec une troncature de 210 nm, la barre d'échelle est de 100 nm. (b) Schéma présentant le même triangle que (a). Les cercles de couleurs indiquent les positions où les spectres ont été simulés et mesurés, placés en bleu au centre, en violet sur un quart de côté, en orange sur le centre d'un coin tronqué, en jaune sur une moitié d'un côté et en vert sur le coin de la troncature. (c) et (d) spectres CL respectivement mesurés et simulés, les couleurs des spectres correspondent aux couleurs des positions indiquées en (b).....	177
Figure 5.14: (a-e) Spectres CL simulés (trait fin) et mesurés (trait épais) sondés au milieu d'un coin tronqué (a), au coin d'une troncature (b), au centre (c), au milieu d'un côté (d) et au quart d'un côté (e). (f-g) Cartes simulées des pics de résonance présents entre 600 nm et 610 nm, si ceux-ci existent. (h-i) Cartes mesurées des pics de résonance présents entre 620 nm et 630 nm, si ceux-ci existent. (j-n) Cartes simulées des pics de résonance présents entre 640 nm et 670 nm. (o-s) Cartes mesurées des pics de résonance présents entre 700 nm et 740 nm. (t-v) Cartes simulées des pics de résonance présents entre 730 nm et 740 nm, si ceux-ci existent. (w-y) Cartes mesurées des pics de résonance présents entre 810 nm et 850 nm, si ceux-ci existent.....	178
Figure 5.15: (a) Carte simulée à $\lambda_s = 905$ nm et (b) Carte mesurée à $\lambda_m = 905$ nm.....	180

Figure 5.16: (a) et (e) Schéma d'un prisme d'or de côté : (a) 620 nm et (e) 480 nm. (b-c) Images TEM HAADF d'un prisme d'or de côté : (b) 580 nm, (c) 560 nm et (d) 580 nm. Les barres d'échelle sont de 100 nm. Les cercles de couleurs indiquent les positions où les spectres ont été simulés et mesurés, placés en bleu au centre, en violet sur un quart de côté, en orange sur un coin et en jaune sur une moitié d'un côté. (f) et (j) spectres CL simulés des triangles (a) et (e) respectivement. (g-i) spectres CL mesurés des triangles (b-d). Les couleurs des spectres correspondent aux cercles de couleurs des figures (a-e).....	181
Figure 5.17: (a) Superposition d'une image SEM et d'une image en FLIM en intensité de la particule. (b) Cartographie FLIM de temps de vie de la particule. (c) Image SEM de la particule. Les cercles colorés des images (b-c) correspondent aux points où les temps de vie (d-g) ont été mesurés. Les codes couleurs des cercles correspondent aux couleurs des courbes (d-g). Les ajustements des exponentielles décroissantes des temps de vie sont en pointillés rouges. Les barres d'échelle font 1 μm	184
Figure 5.18: (a) Image SEM d'une plaquette d'or à proximité d'un repère (lettre de marquage en or) recouverte de nanodiamants. (b) Cartographie en temps de vie de l'image (a). Les barres d'échelle font 1 μm	184
Conclusion et Perspective	
Figure P.1: (a) Schéma de l'utilisation d'un terminateur afin de diminuer la longueur des tubes. (b-c) Image TEM de tubes en coloration négative par du MB, avec l'utilisation d'un terminateur et sans terminateur respectivement pour la même concentration de protéines.....	192
Figure P.2: (a) Schéma de l'utilisation des terminateurs pour espacer deux émetteurs sur le template de protéines dont la face interne est fonctionnalisée pour reconnaître la surface (111) de l'or et ayant servi à la synthèse d'un nanobâtonnet. (b) Schéma de l'utilisation de back binders fonctionnalisés avec deux types d'émetteurs le long de la structure ayant permis l'assemblage de nanoparticules d'or grâce à la face interne des briques comportant avec des cystéines.....	193
Figure P.3: (a) Schéma montrant l'utilisation d'un back binder (brique bleue) reconnaissant le dos de la protéine α -Rep utilisée lors de la morphosynthèse (brique rouge) pour l'auto-assemblage avec des émetteurs. (b) Schéma montrant l'utilisation de plusieurs back binder (brique bleue, violette et rose) se reconnaissant les uns les autres et s'empilant sur la protéine utilisée lors de la morphosynthèse (brique rouge) pour contrôler l'espacement de l'auto-assemblage avec des émetteurs.....	194
Figure P.4: Cartes d'intensité CL d'un nanoprisme de 560 nm de côté à : (a) 475 nm et (b) 525 nm. Les ronds de couleurs rouge et vert représentent la position voulue des nanodiamants rouge et vert respectivement.....	195
Figure P.5: (a) Principe de la configuration optique utilisée pour fondre par plasmon. La morphologie des particules est modifiée lors de l'exposition au laser. (b) Rendu 3D des images AFM d'un prisme triangulaire avant (en bas) et après (en haut) l'irradiation laser. Le bord du prisme a une longueur de 700 nm, et l'épaisseur native est de 23 nm. Schéma et images reproduits avec autorisation de la référence [5]. (c) Schéma de l'utilisation d'une biomolécule, avant et après activation par irradiation (demi-cercle bleu avant activation et croissant bleu après activation), greffée au dos d'une α -Rep anti-Au(111) (en rouge).....	196

Listes des publications et communications

Liste des publications (en préparation et acceptés)

- ***Protein Origami: Design and self-assembly of a brick and staple artificial repeat protein pair leading to macroscopic tubular superhelix crystals.***
S. Viollet, **L. Moreaud**, A. Urvoas, M. Valerio-Lepiniec, A. Mesneau, S. Balor, V. Soldan, C. Mériaud, F. Artzner, E. Dujardin, P. Minard.
En préparation pour soumission *P. Nat. Acad. Sci.*
- ***Single-particle plasmon sensing platform based on designable 2D gold nanocrystals capped with artificial repeat proteins.***
L. Moreaud, Janak Prasad^a, Sirin Celiksoy^b, Sébastien Viollet^c, Agathe Urvoas^c, Marie Valerio-Lepiniec^c, Philippe Minard,^c Carsten Soennichsen^b and Erik Dujardin
En préparation pour soumission *J. Phys. Chem C.*
- ***Satellite self-assembly of quantum dots around gold nanorods programmed by artificial protein pair recognition.***
L. Moreaud, M. Fernandez, S. Viollet, P. Even-Hernandez, A. Urvoas, M. Valerio-Lepiniec, P. Minard, E. Dujardin, V. Marchi
En préparation pour soumission *ACS Nano*.
- ***Facile One-Pot Synthesis of Bright White Emitting Gold Nanocluster solutions composed of Red, Green and Blue Emitters.***
L. Moreaud, J. Prasad, S. Mazères, C. Marcelot, C. Comby-Zerbino, R. Antoine, E. Dujardin
En préparation pour soumission *J. Am. Chem. Soc.*
- ***Dramatic decrease of Joule losses in the coupling between a crystalline gold film and single colloidal CdSe/CdS nanocrystals at 4 K,***
A. Coste, **L. Moreaud**, G. Colas des Francs, S. Buil, X. Quelin, E. Dujardin, and J.-P. Hermier, *Physical Review B*, 101 (2020) 075406. DOI 10.1103/PhysRevB.101.075406
- ***Immobilization of synthetic gold nanoparticles on a three-dimensional porous electrode,***
M. Zaghdoudi, **L. Moreaud**, P. Even-Hernandez, V. Marchi, F. Fourcade, A. Amrane, H. Magharaoui-Meherzi, F. Geneste, *Electrochemistry Communication*, 88 (2018) 15-18. DOI: 10.1016/j.elecom.2018.01.010

Communications orales

- 06-2020 SFU Junior, Toulouse, France.
Programmed artificial protein origami super-helix, L. Moreaud, S. Viollet, A. Urvoas, M. Valerio-Lepiniec, A. Mesneau, E. Dujardin, P. Minard
- 02-2020 SPIE BiOS, San Francisco, Etats-Unis.
A single particle sensing platform based on 2D gold nanocrystals coated with designable artificial repeat proteins, L. Moreaud, J. Prasad, S. Celiksoy, S. Viollet, A. Urvoas, M. Valerio-Lepiniec, P. Minard, C. Soennichsen and E. Dujardin
- 10-2018 NICE 2018, Nice, France.
Artificial repeat protein as insitu capping agents of 2D gold nanocrystals for a singleparticle sensing platform, L. Moreaud, J. Prasad, S. Viollet, S. Celiksoy, A. Urvoas, C. Marcelot, M. Valerio-Lepiniec, C. Soennichsen, P. Minard and E. Dujardin
- 07-2018 GOLD 2018, Paris, France.
Engineered protein-driven synthesis and assembly of hybrid nanoplasmonic superstructure, L. Moreaud, J. Prasad, U. Kumar, S. Viollet, A. Urvoas, C. Marcelot, M. Valerio-Lepiniec, P. Minard and E. Dujardin

Posters

- 07-2019 Chirality 2019, Bordeaux, France.
Programmed artificial protein origami super-helix, L. Moreaud, S. Viollet, A. Urvoas, M. Valerio-Lepiniec, A. Mesneau, E. Dujardin, P. Minard
- 09-2018 SACS 2018, Bordeaux, France.
3D nanoparticle assembly driven by direct pairing or templating of designed artificial proteins, L. Moreaud, J. Prasad, S. Viollet, A. Urvoas, M. Valerio-Lepiniec, V. Marchi, P. Minard and E. Dujardin

Cette thèse propose plusieurs approches visant à contrôler la structure d'assemblages hybrides depuis la synthèse des éléments jusqu'à l'auto-organisation et en étudie les propriétés optiques émergentes.

Dans une première partie, nous montrons que ce couplage plasmon-émetteur peut être dirigé de deux manières : soit en fonctionnalisant des nanoparticules d'or avec un ligand ayant une fonction permettant de reconnaître et immobiliser les émetteurs, soit par la création d'un échafaudage de biomolécules portant des sites de greffage des particules fluorescentes et plasmoniques. Dans le premier cas, une synthèse de prismes d'or en présence de protéines artificielles, éventuellement biotinyllées, recouvrant leur surface est réalisée. La taille et la forme des prismes déterminent les propriétés spectrales souhaitées des résonances plasmons. Leur sensibilité élevée à une variation de leur environnement diélectrique (300 nm/RIU) a permis la détection de streptavidine sur prisme individuel. Alternative, l'ingénierie d'une paire de protéines artificielles dont la forte interaction mutuelle déclenche une précipitation spontanée. Une caractérisation par cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM) et par diffusion des rayons X montre la formation précise de superhélices tubulaires de 5,8 nm de diamètre et plusieurs microns de long. Les amino-acides de ces protéines pourront être modifiés pour greffer des particules différentes.

La deuxième partie de ce manuscrit porte sur une nouvelle synthèse, la caractérisation structurale et les propriétés photo-physiques de clusters d'or Au_n avec $4 \leq n \leq 25$. Ceux-ci sont rendus stables, en solutions aqueuses, par fonctionnalisation avec des thiols pegylés à fonction terminale, dont la biotine. La fluorescence blanche sous excitation large bande et un rendement quantique élevé (jusqu'à 27 %) font de ce mélange Au_n des émetteurs prometteurs pour les structures hybrides. Ces Au_n -biotine, mais aussi des nanodiamants biotinylés, ont été fixés sur les prismes d'or protéinés ci-dessus. Les protéines en surface des prismes permettent de maîtriser localement et spécifiquement le greffage des émetteurs à 5 nm de la surface d'or.

La dernière partie de cette thèse est consacrée à l'étude des propriétés optiques des structures plasmoniques seules puis couplées à des émetteurs. Une comparaison des images hyperspectrales de diffusion en champ sombre et de cathodoluminescence en TEM, adossée à une étude numérique combinant la méthode dyadique de Green et celle des éléments finis, permet d'identifier les modes plasmons brillants et sombres auxquels se couplent les photons émis par les fluorophores, en fonction de leur position.

Mots clés : plasmonique, nanoparticules émettrices, synthèse, fonctionnalisation, auto-assemblages hybrides, propriétés optiques.

This thesis proposes several approaches to control the structure of hybrid assemblies from element synthesis to self-organization and studies their emerging optical properties

In the first part we show that we can control the coupling in two ways. Either by functionalizing gold nanoparticles with a ligand able to recognize and immobilize the emitters or by creating a scaffolding biomolecule carrying fluorescent and plasmonic particle grafting sites. In the first case, a synthesis of gold prisms in the presence of artificial proteins, possibly biotinylated, covering their surface is carried out. The size and shape of the prisms determine the desired spectral properties of the plasmon resonances. Their high sensitivity to a variation of their dielectric environment (300 nm / RIU) allowed the detection of streptavidin on an individual prism. Alternatively, the engineering of a pair of artificial proteins whose strong mutual interaction triggers spontaneous precipitation. Transmission electron cryo-microscopy (cryo-TEM) and X-ray scattering characterization show the precise formation of tubular supercoils 5.8 nm in diameter and several microns in length. The amino acids of these proteins can be modified to graft different particles.

The second part of this manuscript deals with a new synthesis, structural characterization, and photo-physical properties of Au_n gold clusters with $4 \leq n \leq 25$. These are made stable, in aqueous solutions, by functionalization with thiols. terminal function pegylates, including biotin. White fluorescence under broadband excitation and high quantum efficiency (up to 27%) make this mixture a promising emitter for hybrid structures. These Au_n -biotin, but also biotinylated nanodiamonds, were attached to the protein gold prisms above. The proteins on the surface of the prisms make it possible to control locally and specifically the grafting of emitters at 5 nm from the gold surface.

The last part of this thesis is devoted to the study of the optical properties of plasmonic structures alone then coupled to emitters. A comparison of hyperspectral images of dark-field scattering and cathodoluminescence in TEM, backed by a digital study combining Green's dyadic method and that of the finite elements, makes it possible to identify the bright and dark plasmons modes to which the photons emitted by fluorophores, depending on their position.

Keywords: plasmonics, emitting nanoparticles, synthesis, functionalization, hybrid self-assemblies, optical properties.