



HAL
open science

Spectroscopie vibrationnelle d'assemblages biomoléculaires. Comprendre les processus de formation, d'interaction et de détection

Aline Percot

► **To cite this version:**

Aline Percot. Spectroscopie vibrationnelle d'assemblages biomoléculaires. Comprendre les processus de formation, d'interaction et de détection. Chimie. Sorbonne Université, 2023. tel-04188395

HAL Id: tel-04188395

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-04188395>

Submitted on 25 Aug 2023

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

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



SORBONNE UNIVERSITÉ

Spécialité Chimie

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Présentée par Aline Percot

Spectroscopie vibrationnelle d'assemblages biomoléculaires. Comprendre les processus de formation, d'interaction et de détection.

Soutenue le 8 Juin 2023

Composition du Jury

- Jean-François Bardeau, DR CNRS, Le Mans Université (rapporteur)
- Ludovic Bellot-Gurlet, Professeur, Sorbonne Université (examineur)
- Laurent Lebrun, Professeur, Université de Rouen (examineur)
- Sophie Lecomte, DR CNRS, Université de Bordeaux (examinatrice)
- Claire Mangeney, Professeur, Université Paris Cité (rapporteuse)
- Peter Vandenabeele, Professeur, Université de Ghent, Belgique (rapporteur)

MONARIS (UMR 8233) Sorbonne Université / CNRS

Faculté des Sciences et Ingénierie

4 place Jussieu, 75005 Paris

SOMMAIRE GENERAL

PARTIE A : CURRICULUM VITAE	2
1 - Formation, Expériences & Projets scientifiques	3
2 – Publications et Communications	8
3 – Activités de formation	14
 INTRODUCTION GENERALE	 20
 PARTIE B : TRAVAUX ANTERIEURS.....	 22
1 - Relation structure / propriétés au sein de divers biomatériaux.....	24
2 - Système polymère/peptide pour l’immobilisation de vésicules lipidiques	51
 PARTIE C : PROJETS EN COURS	 63
1 - Généralités : spectrométrie Raman exaltée de surface	66
2 - Détection de traces de molécules organiques par SERS	72
 PARTIE D : PERSPECTIVES	 100
1 - Caractérisation des interactions substrats / analytes.....	102
2 - Optimisation et développement de substrats SERS	106

PARTIE A - CURRICULUM VITAE

Aline Percot
Née le 18 mars 1972
Nationalité française

Laboratoire MONARIS UMR 8233
Sorbonne Université – Faculté des sciences et ingénierie
Tour 43-53- Bureau 218
4 place Jussieu, 75252 Paris cedex 05
+33 (0)1 44 27 36 20
aline.percot@sorbonne-universite.fr

1 – Formation, Expériences & Projets scientifiques

1.1 – Formation académique

- 2000** Doctorat en Chimie - Université de Montréal (Canada).
1995 DEA Chimie et Physicochimie des polymères - Université Pierre et Marie Curie, Paris 6.
1994 Maitrise en Chimie - Université de Rouen.

1.2 – Formation continue

- 2022 (14-15/03)** Atelier théorique et pratique sur les techniques traditionnelles de broderie en piquants de porc-épic par J. Jacobs Tonawanda, Musée du Quai Branly.
2019 (3-5/06) La mécanique expliquée aux chimistes (GFP) – Nice (France).
2016 - 2018 Art Conservation / Restauration - Istituto d'arte e d'artigiano di Roma (Italie)
Formation théorique et pratique (5 jours/semaine).
2008 Diplôme Universitaire (DU) en Droit de la propriété Industrielle et des Technologies Nouvelles, Université de Lille (CNED).
Stage : Cabinet Lecca, Conseils en Propriété industrielle

1.3 – Parcours professionnel

- 2003 – A ce jour** **Maître De Conférence (MCF)** - Sorbonne Université - CNRS UMR 8233
Laboratoire MONARIS (ex LADIR) - UFR de chimie
Recherche : Spectroscopie vibrationnelle et développement du SERS
Lors de mon arrivée au LADIR (UMR 7075 CNRS-UPMC) comme maître de conférences en 2003, j'ai rejoint l'équipe « Biomolécules et Systèmes d'intérêt biologique » et développé plus spécialement la Diffusion Raman Exaltée de Surface (DRES ou SERS en anglais : *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*) pour la caractérisation de biomolécules de type ADN, ARN, peptide.
Suite à la disparition de cette équipe et à la création du laboratoire Monaris (2014), j'ai intégré l'équipe NARCOS (NAnomatériaux et matériaux nanostructurés : Réactivité, Caractérisation et

spectroscopie) dont les activités vont de la synthèse raisonnée de nanoparticules métalliques et de supracristaux jusqu'à l'étude de ces objets et de leurs propriétés spécifiques par spectroscopie.

2015-2018 **Disponibilité** : formation en restauration et conservation des matériaux du patrimoine (Rome, Italie)

Cette formation effectuée à temps plein inclut une formation théorique (chimie, histoire de l'art, techniques de restauration...) et pratique (1^e année : chantier de restauration dans les laboratoires de la Basilique Saint Pierre de Rome ; 2^e année : chantier de restauration dans la basilique Sant'Anastasia al Palatino). J'ai acquis une solide connaissance des matériaux et techniques utilisés par les artistes et les restaurateurs, ce qui m'aide aujourd'hui pour collaborer avec les différentes institutions muséales, ainsi qu'avec l'Institut National du Patrimoine (INP).

Sept 2011 **Délégation au CNRS - Laboratoire LADIR**

(6 mois) Projet de Recherche : Fibres et films de soie comme modèles de la compréhension du désordre conformationnel hélices/feuilletés dans les fibres protéiques

Cette délégation m'a permis de m'investir pleinement dans les recherches en cours au laboratoire sur l'organisation des protéines fibreuses (ANR Blanche NANOSOIE). Il s'agissait d'utiliser des méthodes analytiques variées pour contribuer à l'amélioration de la compréhension de l'organisation de ces fibres, mais aussi d'effectuer une analyse spectroscopique fine en fonction de la structure secondaire de ces systèmes modèles. J'ai pu accompagner le démarrage d'une thèse et la co-encadrer durant 3 années.

2007-2009 **Congé d'éducation parentale & disponibilité** – Expatriation en Turquie

Mise à profit pour effectuer un DU en Droit de la propriété Industrielle et des Technologies.

Sept 2006 **CRCT** Département de chimie, Université de Montréal, Canada

(6 mois) Projet de Recherche : Diffusion dans les biofilms microbiens, affinité des détergents bactéricides contenant un ammonium quaternaire pour les membranes

Ce premier projet a été réalisé au sein du laboratoire du Prof. Michel Lafleur, à l'Université de Montréal, au Canada et concernait l'utilisation du SERS pour caractériser les surfactants et évaluer leur affinité pour des membranes lipidiques.

CRCT Département de chimie, Université d'Istanbul, Turquie

Projet de recherche : Caractérisation de biomolécules par GC/MS

Ce second projet a été réalisé au sein du laboratoire du Prof. Kasim Cemal Güven, à l'Université d'Istanbul, en Turquie et concernait l'extraction et la caractérisation de biomolécules par GC/MS. Le but était de me former et de développer l'utilisation de cette technique au laboratoire.

2002-2003 **Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Univ. de Médecine de Bobigny, UFR Santé Médecine Biologie Humaine, Paris 13

Projet de Recherche : Etude de la transfection d'ADN par des liposomes cationiques

J'ai eu l'opportunité de me former à la culture cellulaire et aux techniques biochimiques utilisées par les biologistes. Ce sujet développé au sein du département de physique était transdisciplinaire et j'ai pu utiliser toutes les méthodes de caractérisation disponibles, ainsi que mon expertise en

spectroscopie vibrationnelle pour suivre la transfection d'ADN, au sein de cellules, puis de rats pour améliorer notre connaissance des vecteurs et optimiser la transfection.

Enseignement : Toute ma charge d'enseignement a été effectuée dans le département de physique. J'assurais des enseignements de travaux dirigés de mathématiques, ainsi que des travaux pratiques de physique (optique géométrique et électricité) au niveau Licence.

2001-2002 **Chercheuse Post-doctorale** - UMR CNRS 5627, Université de Lyon 1

Projet de recherche : Préparation et caractérisation d'un polysaccharide d'origine naturelle, la chitine

Ces travaux ont été effectués au Laboratoire d'Etude des Matériaux Plastiques et des Biomatériaux (UMR 5627 Université de Lyon), sous la direction du Professeur Alain Domard et dans le cadre du projet de recherche Européen CARAPAX. J'étais responsable des relations avec les partenaires européens (communications écrites et orales en anglais).

Mon travail de recherche consistait à extraire et caractériser la chitine de la carapace de crevette et à fournir le matériel à des biologistes pour le renforcement métabolique de plantes. J'ai mis au point de nouvelles conditions d'extraction et optimisé les méthodes de caractérisation (suivi de l'extraction, caractérisation des produits, dosage de traces). Ces méthodes remplacent avantageusement celles utilisées dans la littérature et ont donné lieu à 3 publications, dont une qui fait l'objet d'une moyenne de 13,5 citations par an.

2000-2001 **Chercheuse Post-doctorale** - Département de chimie, Université de Montréal

Projet de recherche : Étude du *Stratum Corneum* par microscopie Raman confocale (cartographie et imagerie) sur de la peau humaine et des mélanges modèles lipidiques

Au laboratoire de Spectroscopie Biomoléculaire de l'Université de Montréal, dirigé par le Professeur Michel Lafleur, j'ai participé à l'installation d'un microspectromètre Raman. Par la suite, je l'ai utilisé pour des applications en imagerie et cartographie d'échantillons de polymères, d'échantillons biologiques (peau humaine), mais aussi pour caractériser des membranes lipidiques. Ayant supervisé l'installation du microspectromètre Raman, j'en suis devenue la responsable scientifique et technique au sein du laboratoire de caractérisation des matériaux.

1996-2000 **Doctorante** - Département de chimie, Université de Montréal

Projet de recherche : Développement de systèmes composites polymère/(poly)peptide en vue de l'immobilisation de vésicules lipidiques

Ces travaux ont été effectués aux laboratoires de Spectroscopie Biomoléculaire et de Polymères de l'Université de Montréal, sous la direction des Professeurs Michel Lafleur (Chimie physique et RMN des membranes) et Julian X. Zhu (Chimie physique et Polymères). Mon travail a consisté à mettre au point de nouveaux supports solides permettant d'immobiliser des liposomes (expérience en synthèse de polymères et synthèse peptidique), de les caractériser et de développer une application pour chacun d'entre eux.

Enseignement (total 484 h): au cours de ma thèse j'ai assuré des travaux dirigés en physico-chimie générale (notions fondamentales de mécanique quantique, orbitales atomiques et moléculaires, interactions intermoléculaires, spectroscopies) au niveau licence ainsi que des travaux pratiques en chimie-physique et chimie analytique.

1.4 – Projets scientifiques & Collaborations

PROJETS NATIONAUX :

- 1/ Projet de l'Initiative Sciences et ingénierie moléculaires de l'Alliance Sorbonne Université (iSiM), coordinateur Erwann Guénin (UTC), « Silk based Nanocomposites SERS Sensors for Detection of Organic Pollutants - SiNapSES », (Post-Doc 12 mois), 2022-2023 – Co-porteuse, co-encadrement du post doctorant.
- 2/ Projet CNES, coordinateur Marie-Christine Maurel (ISYEB-UMR 7205), « Detection of Biological bricks in space », 2012/2014/2017-2022 – Co-porteuse, co-encadrement de stagiaires.
- 3/ Projet CRoyAN2, Fondation des Sciences du Patrimoine (FSP), coordinateur Paz Núñez-Regueiro (Musée du quai Branly - Jacques Chirac), « Collections Royales d'Amérique du Nord - 2 », 2020-2021 – Co-porteuse, co-encadrement du post doctorant.
- 4/ Financement Ministère de la Culture, coordinateur Dominique de Reyer (LRMH), « Etude sur la consolidation de fibres textiles par pulvérisation de protéines de soie », 2014 – Co-porteuse, co-encadrement du stagiaire M2.
- 5/ Projet LabEx PATRIMA, responsable Anne-Solenn Le Hô (C2RMF), « Les Vies de Vernis Artistiques : procédés techniques et vieillissement d'un corpus d'objets vernis des Arts Décoratifs du XVIIIe siècle – ViVa », 2012-2013 – Co-porteuse, co-encadrement du post doctorant.
- 6/ Projet Convergence UPMC, coordinateur Chahrazade El Amri (IBPS UMR 8256), « Nanobiocatalyse couplée à la spectroscopie Raman Exaltée de Surface pour l'identification de molécules d'intérêt thérapeutique » 2011 – Co-porteuse, co-encadrement du stagiaire M2.

PROJETS INTERNATIONAUX :

- 1/ Projet Imhotep (partenariat Hubert Curien / PHC, France-Egypte), MONARIS / Grand Egyptian Museum (GEM) Conservation Center (Le Caire) / IFAO (Le Caire), « Polychrome Wood: archaeometric approaches for studying wooden coffins of Ancient Egypt and methodology of conservation », 2020-2021. Participation, réalisation des mesures sur site (Le Caire).
- 2/ Projet Cai Yuanpei (partenariat Hubert Curien / PHC, France-Chine), MONARIS / Centre d'Analyse et de Restauration du Musée du Palais de la Cité Interdite (Pékin), « Comparative research on enamels between China and France: diplomatic, cultural and technological interactions », 2019-2021. Participation, réalisation de mesures Raman (Musée du Louvre...).
- 3/ Projet appel à projets exploratoires de l'Observatoire des Patrimoines - Sorbonne Université (OPUS), « Étude des textiles du Ouadi el-Jarf – ETOF », 2019. Participation à l'encadrement de la doctorante.
- 4/ Projet « Torno Subito 2015 » Region of Lazio (Italy), coordinateur Diana Mancini, « Definizione delle procedure di controllo degli interventi conservativi e delle condizioni di esposizione ai fattori ambientali di alcune opere d'arte datate alla seconda metà del XX sec., custodite nei depositi della Galleria Nazionale d'Arte Moderna e Contemporanea (GNAM) di Roma », 2015. Participation, réalisation de mesures Raman et IR sur site (Rome).

PARTICIPATIONS ANR :

- 1/ Projet ANR PRC, coordinateur Bing Zhao (CRCAO UMR 8155), « Global émail : Une histoire à parts égales des échanges culturels et technologiques entre la France et la Chine (milieu 17e-fin 18e siècle) - EnamelFC », **2020-2024**. Participation MONARIS (un des quatre partenaires).
- 2/ Projet ANR JCJC, coordinatrice Anita Quiles (IFAO), « Modélisation chronologique de l'ancien empire égyptien – MERYT », **2020-2023**.
- 3/ Projet ANR blanc, coordinateur Martine Regert (CEPAM UMR 7264), « EXSUDats et goudrons végétaux en ARCHéologie : chimie, fabrication et utilisations - EXSUDARCH », **2011-2013** prolongation **2014**. Participation du LADIR (un des trois partenaires).
- 4/ Projet ANR blanc, coordinateur Philippe Colomban (LADIR UMR7075), « Nano-mécanique de fibres & films de soie - Nanosoie », **2008-2010**.

1.5 – Participations à des jurys & Evaluations

- 1/ Jury de thèse : Examinatrice de la thèse de F. Geinguenaud : Etude des interactions d'acides nucléiques avec des biomacromolécules et des nanoparticules – Application à la vectorisation, Université Paris 13, ED Galilée, direction : Pr L. Motte, **2015**
- 2/ Comité de suivi de thèse : Ola El Samrout , Ecole Doctorale Physique et Chimie des matériaux (ED 397) - Université de Turin (Sciences pharmaceutiques et Biomoléculaires), **2019-2022**
- 3/ Jury de Master: M1 **2021** : Rapporteur de 4 étudiants, **2022** : Rapporteur de 4 étudiants + Présidente de jury, M2 (CAPT) **2022** : Rapporteur de 2 étudiants
- 4/ Jury du concours CNRS n° 14 BAP B / année **2019**, Ingénieur-e de recherche en science des matériaux / caractérisation, Affectation: SOLEIL, Institut photonique d'analyse non-destructive européen des matériaux anciens, Gif sur Yvette
- 5/ Participation régulière à des activités d'expertise d'articles pour des revues internationales : Journal of Raman Spectroscopy, Biosensors, Journal of Cultural Heritage, Clay Journal, Proceedings conferences of Science of Ancient Egyptian Materials and Technology, ...
- 6/ Evaluation de projets : Appel à Projet Emergence Sorbonne Université (**2019-2020**)

1.6 – Interruption de carrière

- 1/ Disponibilité - Expatriation en Italie (**09/2015-09/2018**)
Mise à profit pour suivre une Formation en Art Conservation / Restauration
- 2/ Congé d'éducation parentale & disponibilité - Expatriation en Turquie (**03/2007-09/2009**)
Mise à profit pour effectuer un DU en Droit de la propriété Industrielle et des Technologies

1.7 – Valorisation de la recherche

- 1/ Manifestation « Les 117 heures de la chimie » dans le cadre de l'**année internationale de la chimie** à l'UPMC. Participation à la tenue d'un stand présentant la spectroscopie Raman et ses applications, 18-19 mai **2011**.
- 2/ Participation à l'Ecole thématique CNRS « Analyse non-destructive mobile des objets d'art et des matériaux du patrimoine applications en conservation, archéologie et histoire », Manufacture de Céramique de Sèvres, France, **2014**, Cours et TP : spectroscopie infrarouge (MIR & FIR).
- 3/ **Depuis 2016** participation à l'opération « Prof en Fac » destinée aux enseignants du secondaire. Visite du laboratoire MONARIS, présentation des activités de recherche et réalisation d'un TP illustrant l'utilisation des spectroscopies vibrationnelles pour l'étude du patrimoine (2 demi-journées par an).

- 4/ **2011 et 2012** : Participation à la fête de la science, organisation d'ateliers autour de l'utilisation de spectromètres Raman portables.
- 5/ **Depuis 2019** : Accueil régulier (1 à 2 fois par an) de stagiaires de 3e (stage général organisé par l'UFR de Chimie) pour des visites de la plateforme de spectroscopie vibrationnelle du laboratoire et la présentation des activités liées aux études du patrimoine.
- 6/ **Depuis 2021**: ambassadrice Declics, médiation scientifique auprès des lycéens, intervention annuelle dans des classes de première et terminale pour informer sur les carrières scientifiques.

1.8 – Vie du laboratoire

- 1/ **Depuis 2019** : Membre élue au conseil de laboratoire MONARIS
- 2/ **Depuis 2021** : Correspondante Science Ouverte pour le laboratoire MONARIS au sein de Sorbonne Université (1 réunion/mois)

2 – Publications et Communications

Publications : 33 articles publiés.

Présentations : 15 communications orales et 18 posters.

2.1 - Publications

[AP-33] Impact of Claudin 10 deficiency on amelogenesis: lesson from a HELIX tooth, Obtel N., Le Cabec A., Nghia Nguyen T., Giabbicani E., Van Malderen S. J. M., Garrevoet J., Percot A., Paris C., Dean C., Hadj-Rabia S., Houillier P., Breiderhoff T., Bardet C., Coradin T., Ramirez Rozzi F., Chaussain C., *Ann. NY Acad. Sci.*, **2022**, 1516, 197-211. DOI: 10.1111/nyas.14865

[AP-32] On-site contactless surface analysis of Modern paintings from Galleria Nazionale (Rome) by Reflectance FTIR and Raman spectroscopies, Mancini D., Percot A., Bellot-Gurlet L., Colomban Ph., Carnazza P., *Talanta*, **2021**, 227, 122159. DOI: 10.1016/j.talanta.2021.122159

[AP-31] Self-assembly/condensation interplay in nano-to-microfibrillar silicified fibrin hydrogels, Wang K., Albert K., Mosser G., Haye B., Percot A., Paris C., Peccate C., Trichet L., Coradin T., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2020**, 164, 1422-1431. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.220.

[AP-30] Comparison of embryonic and adult shells of *Sepia officinalis* (Cephalopoda, Mollusca), Dauphin Y., Luquet G., Percot A., Bonnaud-Ponticelli L., *Zoomorphology*, **2020**, 139, 151-169. DOI: 10.1007/s00435-020-00477-2

[AP-29] Detection of biological bricks in space. The case of adenine in silica aerogel, Percot A., Zins E.L., Al Araji A., Ngo A.T., Vergne J., Tabata M., Yamagishi A., Maurel M.C., *Life*, **2019**, 9(4). DOI: 10.3390/life9040082.

[AP-28] Synthesis of peptide-adenine conjugates as new tool for the protease activity monitoring, Masurier N., Soualmia F., Sanchez P., Lefort V., Roué M., Maillard L.T., Subra G., Percot A., El Amri C., *Eur. J. Org. Chem.*, **2019**, 1, 176-183. DOI: 10.1002/ejoc.201801490

- [AP-27] Regenerated silk matrix composite materials reinforced by silk fibres: relationship between processing and mechanical properties, Wojcieszak M., Percot A., Colomban P., *J. Composite Materials*, **2018**, 52 (17): 2301-2311. DOI: 10.1177/0021998317743563
- [AP-26] Micromechanics of fresh and 30-year-old *Nephila inaurata madagascariensis* dragline silk, Wojcieszak M., Gouadec G., Percot A., Colomban P., *J. Mater. Sci.*, **2017**, 52, 11759. DOI: 10.1007/s10853-017-1320-2
- [AP-25] First proteomic analyses of the dorsal and ventral parts of the *Sepia officinalis* cuttlebone, Le Pabic C., Marie A., Marie B., Percot A., Bonnaud-Ponticelli L., Lopez P.J., Luquet G., *J. Proteomics*, **2017**;150: 63-73. DOI:10.1016/j.jprot.2016.08.015
- [AP-24] High-resolution structural and elemental analyses of calcium storage structures synthesized by the noble crayfish *Astacus astacus*, Luquet G., Salomé M., Ziegler A., Paris C., Percot A., Dauphin Y., *J. Struct. Biol.*, **2016**, 196(2), 206-222. DOI: 10.1016/j.jsb.2016.09.001
- [AP-23] Amino-methyl coumarin as a potential SERS@Ag probe for the evaluation of protease activity and inhibition, Soualmia F., Touhar S.A., Guo L., Xu Q., Garland M.V., Colomban P., Percot A., El Amri C., *J. Raman Spectrosc.*, **2016**, 48 (1), 82-88. DOI: 10.1002/jrs.4995
- [AP-22] Calcium deposits in the crayfish, *Cherax quadricarinatus*: microstructure versus elemental distribution, Luquet G., Dauphin Y., Percot A., Salomé M., Ziegler A., Fernández M.S., Arias J.L., *Microsc. Microanal.*, **2016**, 22 (1), 22-38. DOI: 10.1017/S1431927615015767
- [AP-21] Combined approach of FT-Raman, SERS and IR micro-ATR spectroscopies to enlighten ancient technologies of painted and varnished works of art, Daher C., Drieu L., Bellot-Gurlet L., Percot A., Paris C., Le Hô A.-S., *J. Raman Spectrosc.*, **2014**, 45, 1207-1214. DOI: 10.1002/jrs.4565
- [AP-20] Origin of the variability of the mechanical properties of silk fibres: 4. Crystallinity/order variability in silkworm/spider silks, Wojcieszak M., Percot A., Colomban Ph., Noinville S., Gouadec G., *J. Raman Spectrosc.*, **2014**, 45, 895-902. DOI: 10.1002/jrs.4579
- [AP-19] Water dependent structural changes of silk from *Bombyx mori* gland to fibre as evidenced by Raman and IR spectroscopies, Percot A., Colomban P., Paris C., Manh Dinh H., Wojcieszak M., Mauchamp B., *Vibrational spectroscopy*, **2014**, 73, 79-89. DOI: 10.1016/j.vibspec.2014.05.004
- [AP-18] Small angle neutron scattering on an absolute intensity scale and the internal surface of diatom frustules from three species of differing morphologies, Garvey C.J., Strobl M., Percot A., Aroun J.S., Haug J., Vyverman W., Chepurinov V.A., Ferris J.M., *European Biophysics Journal*, **2013**, 42, 395-404. DOI: 10.1007/s00249-013-0889-x
- [AP-17] Alkaloids in marine algae, Güven K.C., Percot A., Sezik E., *Marine Drugs*, **2010**, 8, 269-284. DOI: 10.3390/md8020269
- [AP-16] Hairpin ribozyme catalysis: a Surface Enhanced Raman Spectroscopy study, Percot A., Lecomte S., Vergne J., Maurel M.C., *Biopolymers*, **2009**, 91, 384-390. DOI: 10.1002/bip.21143

- [AP-15] β -Phenylethylamine content in marine algae around Turkish coasts, Percot A., Yalçın A., Aysel V., Erduğan H., Dura B. I., Güven K.C., *Botanica Marina*, **2009**, 52, 87-90. DOI: 10.1515/BOT.2009.031
- [AP-14] Loliolide in marine algae, Percot A., Yalçın A., Aysel V., Erduğan H., Dural B., Güven K.C., *Natural Product Research*, **2009**, 23, 460-465. DOI: 10.1080/14786410802076069
- [AP-13] Hordenine in the marine alga, *Gelidium Crinale* (Hare ex Turner) gaillon, Yalçın A., Percot A., Erduğan H., Çoban B., Güven K.C., *Acta Pharmaceutica Scientia*, **2007**, 49, 213-218.
- [AP-12] Hordenine amount in *Phyllophora nervosa* (D.C.Grev) (Marine Alga) collected from Şile (the Black Sea) and Dardanelle, Percot A., Yalçın A., Erduğan H., Güven K.C., *Acta Pharmaceutica Scientia*, **2007**, 49, 127-132. https://www.actapharmsci.com/uploads/pdf/pdf_161.pdf
- [AP-11] DNA compaction into new DNA vectors based on cyclodextrin polymer : SERS Characterization, Burckbuchler V., Wintgens V., Lecomte S., Percot A., Leborgne C., Danos O., Kichler A., Amiel C., *Biopolymers*, **2006**, 81, 360-370.
- [AP-10] A hydroxethylated cholesterol-based cationic lipid for DNA delivery : Effect of conditioning, Percot A., Briane D., Coudert R., Reynier P., Bouchemal N., Lièvre N., Hantz E., Salzmänn J.L., Cao A., *Int. J. Pharm.*, **2004**, 278, 143-63. DOI: 10.1002/bip.20428
- [AP-9] Characterization of shrimp shell deproteinization, Percot A., Viton C., Domard A., *Biomacromolecules*, **2003**, 4, 1380-5. DOI: 10.1021/bm034115h
- [AP-8] Optimization of chitin extraction from shrimp shells, Percot A., Viton C., Domard A., *Biomacromolecules*, **2003**, 4, 12-18. DOI: 10.1021/bm025602k
- [AP-7] Optimization of chitin extraction and characterization, Percot A., Crepet A., Lucas J-M., Viton C., Domard A., *Advances in Chitin Science, Proceedings of the 5th International Conference of the European Chitin Society*, Edited by K.M. Vårum, A. Domard, O. Smidsrød, Norwegian University of Science and Technology, **2003**, Trondheim, Norway, 89-92.
- [AP-6] Direct observation of domains in model stratum corneum lipid mixtures by Raman Microspectroscopy. Percot A., Lafleur M., *Biophys. J.*, **2001**, 81, 2144-2153. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)75862-6
- [AP-5] Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances, Vigneault B., Percot A., Lafleur M., Campbell P. G. C., *Environ. Sci. Technol.*, **2000**, 34, 3907-3913. DOI: 10.1021/es001087r
- [AP-4] Immobilization of lipid vesicles on polymer support via an amphiphilic peptidic anchor: application to a membrane enzyme, Percot A., Zhu X.X., Lafleur M., *Bioconjugate Chemistry*, **2000**, 11, 674-678. DOI: 10.1021/bc9901806
- [AP-3] New hydrogels based on polyacrylamide crosslinked with polylysine: membrane immobilization systems, Percot A., Lafleur M., Zhu X.X., *Polymer*, **2000**, 41, 7231-7239. DOI: 10.1016/S0032-3861(00)00074-4
- [AP-2] A Simple FTIR spectroscopic method for the determination of the lower critical solution temperature of N-isopropylacrylamide copolymers and related hydrogels, Percot A., Zhu X.X.,

Lafleur M., Journal of Polymer Science part B - Polymer Physics, **2000**, 38, 907-915. DOI: 10.1002/(SICI)1099-0488(20000401)38:7<907::AID-POLB1>3.0.CO;2-5

[AP-1] Design and characterization of anchoring amphiphilic peptides and their interactions with lipid vesicles, Percot A., Zhu X.X., Lafleur M., Biopolymers, **1999**, 50, 647-655.

2.2 - Communications

- 2022** International Workshop on the Origins of Life, Paris, France (7-9 Sept 2022)
Oral : Organics on spatial dust from Tanpopo Mission (Percot A., Zins E.L., Baklouti D., Lambert J.F., Maurel M.C.)

5th International Conference on Innovation in Art Research and Technology, Paris, France (28 juin-1er juillet)
Oral : A multi-technical study of Native North American objects dating from the 17th to 19th centuries (Daher C., Stolle N., Kissel E., Sauvagnargues F., Robinet L., Heu S., Percot A., Paris C., Cuisin J., Nunez-Regueiro P.)
- 2019** Journée Biominéralisation - 2e édition, Labex Matisse, Paris, France (4 décembre)
Oral: Microspectroscopies Raman et Infrarouge appliquées à l'étude des biomatériaux (Gouadec G., Percot A.)

Journée thématique du DIM Matériaux anciens et patrimoniaux, Poils et plumes, Paris, France (15 novembre)
Poster: Dégradation mécanique et restauration d'« objets » en kératine (Colomban Ph., Gouadec G., Percot A., Yala-Pierre D.)
- 2018** 3rd International Conference on Innovation in Art Research and Technology, Parme, Italy (26-29 mars)
Poster : Contactless approach to identify Binders of German and Italian modern paintings through portable vibrational spectroscopy techniques (Mancini D., Percot A., Bellot-Gurlet L., Carnazza P., Colomban P.)

8ème Colloque Protéolyse Cellulaire, La Grande-Motte, France (15-17 octobre)
Poster : Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) as an emerging tool to monitor protease activity : Synthesis of peptide-Adenine conjugates as SERS probes (Masurier N., Soualmia F., Sanchez P.z, Lefort V., Roué M., Maillard L. T., Subra G., Percot A., El Amri C.)
- 2014** XXIV. ICORS International Conference on Raman Spectroscopy, Jena, Germany (10-15 août)
Oral : Order variations along silkworm/spider silk (Wojcieszak M., Percot A., Colomban Ph.)

Gordon Research Conference "Scientific Methods in Cultural Heritage Research. Challenges and Complexity in Characterization and Conservation", Newry, ME, USA (27 juillet-1er août)
Poster : Consolidation of silk fabrics by fibroin spraying and sericin dipping (Frayse A., Wojcieszak M., Percot A., Noinville S., Marcellan A., de Reyer D., Colomban P.)

XXe Journées du Groupe Français de Spectroscopie Vibratoire (GFSV), Paris, France (21-23 mai)
Oral : Variabilité, ordre et comportement mécanique de soies d'araignée et de ver à soie (Wojcieszak M., Percot A., Colomban Ph.)

- Poster : La spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS) comme outil pour l'étude du mécanisme d'action des inhibiteurs covalents de protéases à sérine, les kallikréines (Soualmia F., Percot A., El Amri C.)
- Séminaire chez Chanel, Paris, France
- Oral : La soie - Applications et développements (Percot A., Colomban P.)
- 2013** 18èmes Journées Nationales sur les Composites, Nantes, France (12-14 juin)
- Oral : Composites fibre de soie / matrice de soie régénérée (Wojcieszak M., Percot A., Tiennot M., Marcellan A., Colomban Ph.)
- Journées jeunes chercheurs éco composites et composites bio sourcés, Nevers, France (10-11 avril)
- Oral : Recherches préliminaires sur les composites fibre de soie / matrice de soie régénérée (Wojcieszak M., Percot A., Marcellan A., Noinville S., Colomban Ph.)
- 12th International Symposium on Biomineralization - Biomin12 University of Freiberg, Germany (27-30 août)
- Oral : Calcium turnover between calcified cuticle and storage structures in decapod crustaceans (Luquet G., Dauphin Y., Ziegler A., Robert F., Percot A., Bellot L., Fernandez M.S., Arias J.L., Cuif J.P.)
- 7th congress on the Application of Raman Spectroscopy in Art and Archaeology, Ljubljana, Slovenia (2-6 septembre)
- Oral : Multi-technical approach for the study of French Decorative Arts furniture and luxury objects (Daher C., Drieu L., Bellot-Gurlet L., Percot A., Paris C., Le Hô A.-S.)
- 2012** XVIIIe Journées de spectroscopie vibrationnelle (GFSV), Bordeaux, France (6-8 juin)
- Poster : Spectroscopie Raman couplée à la traction uniaxiale : la soie comme modèle de biomatériaux fibreux (Wojcieszak M., Percot A., Dinh H.-M., Gouadec G., Paris C., Colomban Ph., Mauchamp B.)
- International Conference on Biobased Polymers and Composites BiPoCo, Lake Balaton, Hongrie (27-31 Mai)
- Oral : Pure silk-fiber-reinforced composite materials (Percot A., Tiennot M., Colomban Ph.)
- 2010** International Conference on Natural Polymers and Biomaterials (ICNP – 2010), Kottayam, Kerala, India
- Oral : Understanding the mechanics of natural polyamide fibres: the effect of age, sericin coating, water content and structure of silks (Dinh H.M., Percot A., Colomban Ph.)
- 2007** Séminaire départemental, Département de chimie, Université d'Istanbul, Turquie
- Oral : Applications de la spectrométrie Raman exaltée de surface (Percot A.)
- 2006** Colloque National d'Exobiologie, Orléans, France
- Poster : Caractérisation de ribozymes par spectrométrie Raman exaltée de surface (Percot A., Lecomte S., Baron M.H., Tobé S., Vergne J., Maurel M.C.)
- Séminaire départemental, Département de chimie, Université de Montréal, Canada
- Oral: Caractérisation de deux types de vecteurs d'acides nucléiques : liposomes cationiques et polycyclodextrine (Percot A.)

- 2004** 19è Congrès de la société française de biophysique Anglet, France
 Poster : Vectorisation d'ADN par des liposomes cationiques : caractérisation des complexes (Percot A., Lecomte S., Baron M.H., Cao A., Coudert R.)
 5è Rencontre SifrARN, Bordeaux, France
 Poster : Caractérisation de ribozymes par spectrométrie Raman exaltée de surface (Percot A., Lecomte S., Baron M.H., Tobé S., Maurel M.C.)
- 2003** 6th International Conference on Liposome Advance, Londres, GB
 Oral : Cationic lipid-mediated transfer of tumour suppressor gene p16 into cancer cells (Piperno-Neuman S., Briane D., Oudar O., Reynier P., Percot A., Coudert R., Jaurand AC., Kraemer M., Cao A.)
- 2002** 5th International Conference of the European Chitin Society Trondheim, Norvège
 Oral : Optimization of chitin extraction and characterization (Percot A., Viton C., Lucas J.M., Crépet A., Domard A.)
 CARAPAX 3th meeting Heraklion, Crète
 Oral: Preparation and characterisation of high molecular weight chitins (Percot A., Viton C., Lucas J.M., Crépet A., Domard A.)
- 2001** Journée des Glycosciences 2001 6ème journées du groupe Lyonnais des Glycosciences, Lyon
 Oral : Extraction et caractérisation de la chitine, un polysaccharide d'origine naturelle (Percot A., Domard A.).
 CARAPAX 2nd meeting Lyon, France
 Oral : Preparation and characterisation of chitin and chitosan of high molecular weight II (Percot A., Viton C., Lucas J.M., Crépet A., Domard A.)
 CARAPAX 1st meeting Bonn, Germany.
 Oral: Preparation and characterisation of chitin and chitosan of high molecular weight I (Percot A., Viton C., Lucas J.M., Crépet A., Domard A.)
- 2000** ICORS 2000 17th International Conference on Raman Spectroscopy, Beijing, Chine (20-25 août)
 Poster : Raman microspectroscopic studies on phase separations in model stratum corneum lipids (Bian J., Percot A., Lafleur M.).
 Siba~I-ASMU 2000 2nd International Symposium on Advanced Biomaterials, 7th International Academy of Shape Memory Materials for Medical Use, Montréal, Canada.
 Poster : Development of polymer support for vesicles immobilization (Percot A., Zhu X.X., Lafleur M.).
 Association Canadienne-Française pour l'Avancement des Sciences (ACFAS), Montréal, Canada.
 Oral : Nouveaux systemes pour l'immobilisation de vesicules lipidiques (Percot A., Zhu X.X., Lafleur M.).
- 1999** Colloque 1999 du Centre de Recherche Appliquée sur les polymères, Canada
 Poster : Nouvel Hydrogel Polyacrylamide/Polylysine: Immobilisation de Membranes (Percot A., Lafleur M., Zhu X.X.)

- CERSIM'99 Centre de Recherche en Science et Ingénierie des Macromolécules, Canada
Poster : A New Hydrogel based on Polyacrylamide Crosslinked by Polylysine: A Membrane Immobilization System (Percot A., Lafleur M., Zhu X.X.).
- XVIIe Atelier Annuel du Groupe de Recherche en Transport Membranaire (GRTM), Canada
Poster : A new hydrogel based on polyacrylamide crosslinked by polylysine : a membrane immobilization system (Percot A., Lafleur M., Zhu X.X.).
- 1998** Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Summer Conference, Saxton's River, Vermont, USA
Poster : Design and characterization of an amphiphilic peptide to develop a new peptide/polymer assembly (Percot A., Lafleur M., Zhu X.X.).
- 1998** 25e Colloque Annuel de Toxicologie Aquatique, Québec, Canada (18-21 octobre)
Poster: Interaction of humic substances with model biological membranes and phytoplankton surfaces (Vigneault B., Percot A., Lafleur M., Campbell P.G.C.).
- 1997** ACFAS Association Canadienne-Française pour l'Avancement des Sciences, Canada
Oral : Synthèse et caractérisation conformationnelle d'un peptide amphiphile (Percot A., Xiang X., Zhu X.X.).
- CERSIM'97 Centre de Recherche en Science et Ingénierie des Macromolécules, Canada
Poster : Immobilisation de liposomes par des ligands peptidiques sur un support polymère (A. Percot, Lafleur M., Zhu X.X.).
- 1995** Société Française de chimie - SFC, Rouen, France
Poster : Production d'exopolysaccharides par des micro-organismes immobilisés dans un gel d'agar (Percot A., Lebrun L., Junter G.A.).

3 – Activités de formation

3.1 - Enseignements

J'ai eu l'opportunité d'enseigner tout au long de ma carrière, et ce, depuis ma thèse.

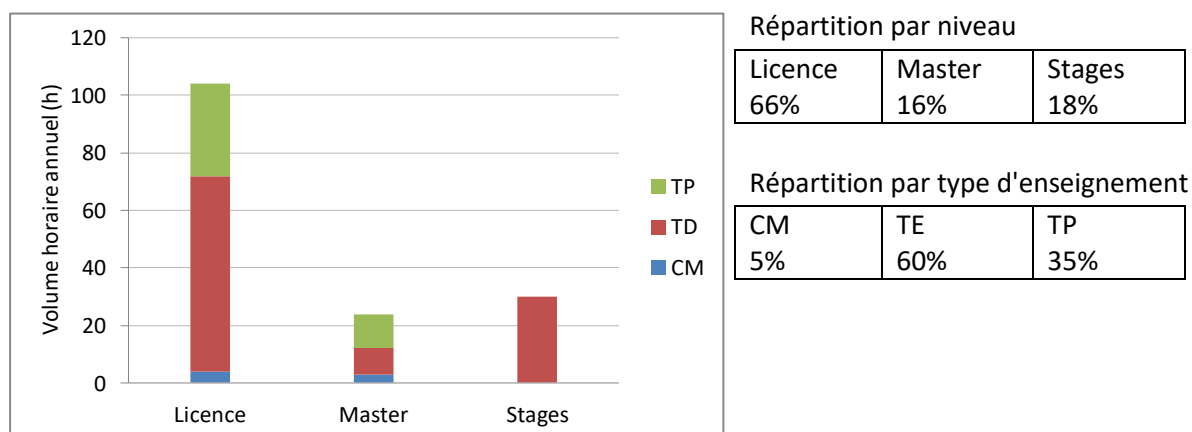
Au cours de ma thèse (1996-2000) à l'Université de Montréal, j'ai assuré des **travaux encadrés en physico-chimie générale** (notions fondamentales de mécanique quantique, orbitales atomiques et moléculaires, interactions intermoléculaires, spectroscopies) ainsi que des **travaux pratiques en chimie-physique et chimie analytique** (diagrammes d'état, propriétés à l'équilibre, titrages potentiométriques et spectrophotométriques) au niveau Licence (total 484 h).

Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER) à temps plein en 2002-2003, j'ai conduit des enseignements de **travaux encadrés de mathématiques et des travaux pratiques de physique** (optique géométrique et électricité), en Licence, à l'UFR Santé Médecine Biologie Humaine de l'Université de Paris XIII.

Depuis mon recrutement comme maître de conférences à l'UPMC en 2003, mes activités d'enseignement sont réalisées majoritairement à l'UFR de Chimie. J'enseigne à un public de niveau

Licence (1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} année), dans les UE suivantes : enseignements de chimie générale (TE et TP), Atelier de Recherche Encadré (ARE) à l'interface de la chimie et de la biologie (L1), UE de spectroscopie (L2), UE de chimie et formulation (L2). J'assure aussi des enseignements au niveau Master, notamment au sein du parcours CAPT (Chimie Analytique, Physique et Théorique) ainsi qu'à l'UFR de biologie au sein du Master Biochimie et génétique de l'ARN (BGA), où j'assure un cours de spectroscopies optiques appliquées à la biologie.

Enseignements effectués lors des 4 dernières années :



J'aime enseigner et mettre en place des **enseignements interdisciplinaires**. J'interviens au sein du Master Biochimie et génétique de l'ARN, via un cours sur les spectroscopies optiques appliquées à la biologie, ainsi que dans un cours et un TP en imagerie Infrarouge, dans le domaine du patrimoine (UE "Caractérisations et imagerie des systèmes complexes", ex-CHIM 529) (depuis 2004). Depuis Septembre 2019, j'ai participé à la mise en place d'un nouvel enseignement en Chimie et Formulation (L2). J'ai préparé un cours sur la formulation des peintures synthétiques et des matériaux utilisés dans l'art (8h).

D'autre part, j'ai créé un **Atelier de Recherche Encadré (ARE)** avec une collègue biologiste, l'ARE Multibio chimie/biologie (depuis 2013). Cette UE permet aux étudiants de premier cycle d'être sensibilisés au raisonnement scientifique et à la conduite d'un projet de recherche. Lors d'une séance de TP, les étudiants ont l'opportunité de visiter un laboratoire de recherche et réalisent un mini-projet de recherche expérimentale.

Ces enseignements sont en lien avec ma recherche et me permettent de partager mes connaissances.

J'ai eu l'occasion d'enseigner à des publics très divers, notamment dans le cadre de la formation professionnelle (formation des enseignants du secondaire durant 4 années, rédaction un polycopié de cours avec mon collègue L. Bellot-Gurlet), et dans le cadre de l'enseignement à distance (implication au CNED durant 5 années).

Chaque année, j'essaie d'accueillir et d'encadrer des étudiants de premier cycle (L3 Pro) et de M1 au laboratoire, ce qui est important dans leur formation. Je suis aussi tutrice de plusieurs stages de M1, ce qui consiste à rendre visite aux étudiants sur leur lieu de stage (en général une entreprise privée),

échanger avec leur encadrant, corriger le rapport et la présentation, participer au jury final. Ces activités m'ont donné envie de m'impliquer dans l'organisation des stages et depuis septembre 2022 j'ai rejoint l'équipe du M1 du Master de Chimie. Notre activité consiste à aider les étudiants à trouver un stage (entretien du vivier d'entreprises), à valider les sujets proposés, à gérer le volet administratif et à organiser les soutenances. La réalisation de ces stages en entreprise ou dans une université étrangère est très formatrice et professionnalisante pour les étudiants.

Responsabilités et mise au point de nouveaux enseignements :

- Coordinateur de Section LC101 (2005 ; 2012).
- Réforme LMD 2004 : Mise au point d'un TP en spectroscopie UV-Visible et préparation d'un polycopié de cours (CHIM 403, M1). Mise au point d'un TP en imagerie Infrarouge et d'un cours de Traitement d'image (CHIM 529, M2).
- Responsable d'un Atelier de Recherche Encadré (ARE) avec ma collègue biologiste C. El Amri (ARE Multibio, depuis 2013).
- Formation des enseignants du secondaire (AFIP : Accompagnement et Formation à l'Insertion Professionnelle) : préparation d'un polycopié de cours et mise en place d'un TP matériaux du patrimoine avec mon collègue L. Bellot-Gurlet.
- Création d'un cours en Chimie et Formulation (L2) sur la formulation des peintures synthétiques et des matériaux utilisés dans l'art (depuis 2019).

3.2 – Encadrements de stages, thèse et Post Doc

Stages de Licence : 7, IUT/BTS : 5, Master : 16 (11 M2), INP (Institut National du Patrimoine) 5^e année : 2

Co-encadrement de thèse : 1

Encadrement de Post Docs : 3

Stages de Licence, IUT/BTS et Master

- 2022-2023** - Farah Mahieddine, M2 Chimie, Parcours Chimie Analytique, Physique et Théorique (CAPT), SU
Analyse par SERS de traces d'acides nucléiques et aminés dans des analogues de poussières extraterrestres et des météorites
- Irene Bilbao, M2 Chimie, Le Mans Université
Etude de colorants textiles par spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS)
- 2021-2022** - Selya Ouali, M2 Chimie, Parcours Chimie Analytique, Physique et Théorique (CAPT), SU
Mise en place d'un protocole d'analyse de traces d'acides nucléiques et aminés dans des analogues de poussières extraterrestres, avec inclusion dans des aérogels de silice
- 2020-2021** - Gwenaél Fiot, M2 Génétique et Epigénétique, SU
Mise en place d'une méthode de caractérisation par SERS-Raman d'adénine dans des analogues de poussières extraterrestres

- Elisa Fagundes, L3 Formulation, SU
Préparation d'éprouvettes de tissus colorées afin de mettre en place des méthodes de détection de colorants et de mordants
- Clémence Laminette, M1, Université d'Evry Val d'Essonne
Caractérisation de fibres textiles colorées par spectroscopies vibrationnelles

2019-2020 - Zeinab Kanso, M2 Chimie Physique, Université Paris Saclay
Préparation et caractérisation de poussières extraterrestres modèles contenant des traces d'acides nucléiques, avec inclusion dans des aérogels de silice
- Léa Voisin, M2 de l'Ecole supérieure d'Art d'Avignon
Etude et caractérisation des colorants présents sur des échantillons textiles archéologiques péruviens provenant du complexe archéologique Animas Altas/Animas Bajas, région d'Ica.

2018-2019 - Amélie Al Araji, M2 Génétique et Epigénétique, SU
Développement d'un système modèle pour l'analyse de traces d'adénine dans un aérogel de silice
- Delphine Yala-Pierre, 5e année INP, restauration du patrimoine spécialité « Arts textiles »
« Entre cheveux et crin ». Etude et conservation-restauration de trois coiffes chinoises du Musée des Confluences de Lyon (XXème siècle). Etude scientifique : Comparaison de différents adhésifs pour la consolidation d'une résille en crin de cheval.

2014-2015 - Jasmine Obut, M2 Chimie, parcours Chimie des Matériaux (MAT), SU
Synthèse et caractérisation de nouveaux nanocomposites or/soie
- Sofiane Belhouli, IUT Mesures Physiques
Spectroscopie dans des microcanaux : caractérisation des puces microfluidiques par spectroscopie Raman
- Claire Benoit, 5e année INP, restauration du patrimoine spécialité « Arts textiles »
Conservation-restauration de huit fragments d'un manteau de prêtre taoïste chinois (musée Cernuschi, Paris). Etude technico-scientifique : Etude du procédé de préparation du fil de soie utilisé en restauration.

2013-2014 - Amandine Fraysse, IUT Paris Jussieu, Mesures physiques
Consolidation de fibres textiles par pulvérisation de protéines de soie
- Corentin Germain, M1 Mention Chimie - Université de Rennes 1
Détection par Spectrométrie Raman exaltée de Surface (SERS) de traces d'acides nucléiques. Préparation et caractérisation de roches/sols extraterrestres modèles
- Fériel Soualmia, M2, Master Mention « Biologie Moléculaire et Cellulaire », Spécialité Biochimie et Biologie Moléculaire, UPMC
Identification et caractérisation de nouveaux inhibiteurs organiques de kallikréines tissulaires
- Laura Dufeu, BTS Bioanalyses et contrôles, Lycée Pierre-Gilles de Gennes, Ecole nationale de chimie, physique et biologie
Préparation et caractérisation des films de soie de ver à soie

- 2012-2013** - Bouchra Salam, M1 Mention Chimie, Université de Rennes 1
Préparation, caractérisation et optimisation des films de soie « régénérée »
- Joan Bores, BTS Bioanalyses et contrôles, Lycée Pierre-Gilles de Gennes, Ecole nationale de chimie, physique et biologie
Caractérisation de films de soie. Dosage colorimétrique des protéines de la soie
- 2011-2012** - Joan Bores, BTS Bioanalyses et contrôles, Lycée Pierre-Gilles de Gennes, Ecole nationale de chimie, physique et biologie
Application du SERS à la détection de substrats enzymatiques
- Lucille Cukerman, L3, UPMC
Préparation de soie régénérée, influence du solvant
- Si Ammar Touhar, M2 Master « Mention Biologie Moléculaire et Cellulaire », Spécialité Biochimie et Biologie Moléculaire, Parcours Biologie et Pharmacologie du Vieillissement
Recherche de nouveaux inhibiteurs du protéasome par spectrofluorimétrie et mise au point d'un protocole basé sur la spectroscopie Raman exaltée de surface pour son utilisation en enzymologie
- 2010-2011** - Anahi Rakoto, M1 Chimie, UPMC
Préparation et caractérisation des films de fibroïne
- Mathilde Tiennot, M1 Mécanique des Matériaux et des Structures (ENS Cachan/UPMC)
Fibres, films et composites de soie
- Hubert Bounou Abassi, L3, UPMC
Préparation de films de soie
- 2009-2010** - Dado Kasse, L2, Paris 11 - Créteil
Mise au point des substrats actifs pour la Spectroscopie Raman Exaltée de Surface
- Alexandre Ma, L3, Chimie Parcours Physique Chimie, UPMC
Préparation et caractérisation de films de soie
- Alice Cador, L2, UPMC
Optimisation de films de soie
- 2005-2006** - Samira Hattab, Licence sciences chimiques et biologiques, Paris XII
Caractérisation d'un dipeptide par spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS)
- 2004-2005** - Lydie Caliste, Projet tutoré de Licence professionnelle MCB, spécialité formulation
Encapsulation de colloïdes dans des liposomes
- Amine Miloudi, Master 2 Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPMC
Etude, caractérisation et suivi in situ de la cinétique d'autocatalyse d'un ribozyme en épingle à cheveux HRW 85 par SERS

Co-encadrement de thèses

- 2011-2014** Marine Wojcieszak, ED388 : Chimie physique et chimie analytique de Paris Centre-soutenance 7/10/2014. La soie, « modèle » de polymères naturels fibreux : analyse vibrationnelle et nano/micromécanique, de la fibre au composite, Directeur de thèse : Philippe Colomban, co-encadrement (50%)

Stages post-doctoraux

- 2012-2013** Céline Daher
Projet LabEx PATRIMA, responsable Anne-Solenn Le Hô (C2RMF), « Les Vies de Vernis Artistiques : procédés techniques et vieillissement d'un corpus d'objets vernis des Arts Décoratifs du XVIIIe siècle – ViVa ».
- 2020-2021** Céline Daher
Projet CRoyAN2, AAP 2020 FSP, coordinateur Paz Núñez-Regueiro (Musée du quai Branly Jacques Chirac), « Collections Royales d'Amérique du Nord – 2 »
- 2022-2023** Chukwuka Bethel Anucha
Projet SiNapSES - Silk based Nanocomposites SERS Sensors for Detection of Organic Pollutants, vise à développer des échafaudages de protéines de soie pour la détection de polluants. Co-encadrement avec Erwann Guénin de l'UTC.

INTRODUCTION GENERALE

Ce mémoire présente une sélection de mes travaux de recherche effectués de septembre 1995, date de début de ma thèse, à aujourd'hui. Différents thèmes à l'interface de la chimie, de la biologie et de la physique sont abordés mais le fil conducteur est la compréhension de la relation structure / propriété au sein des différents biomatériaux rencontrés. En effet, résoudre les structures et comprendre les interactions au sein de ces assemblages est une problématique fondamentale car structure et fonction biologique sont liées.

Tout au long de mes années de formation, j'ai acquis des connaissances et des savoir-faire au sein de différentes communautés et mes activités de recherche se sont progressivement développées autour de la physico-chimie des biomatériaux. Pour accéder aux informations quant à leur nature, leur structure et leur organisation, de nombreuses techniques spectroscopiques sont disponibles. Une bonne connaissance de ces techniques, de leurs limites, de leurs avantages et de leur mise en œuvre permet de collecter les informations aux différentes échelles et d'obtenir une vision plus globale de la structure (chimique et physique), ce qui est indispensable pour tenter d'expliquer les propriétés de l'objet.

Lors de mon projet de doctorat, effectué sous la direction de Michel Lafleur au Laboratoire d'étude des auto-assemblages biomoléculaires de l'Université de Montréal, j'ai utilisé l'analyse par spectroscopie infrarouge pour caractériser des assemblages impliquant des polymères synthétiques, des protéines et des lipides. La spectroscopie vibrationnelle permet de sonder les liaisons chimiques ainsi que leur force ce qui en fait une technique de choix pour suivre les changements de conformation et d'interaction au sein de ces assemblages. Elle permet ainsi d'accéder à l'organisation des systèmes observés. Depuis la fin des années 90, la spectroscopie Raman fait aussi partie des outils indispensables pour la caractérisation des biomatériaux. L'utilisation de lasers émettant dans le visible permet le couplage avec un microscope pour obtenir des images physico-chimiques avec une résolution spatiale de l'ordre du micromètre, permettant d'accéder à l'hétérogénéité des organisations. Au fil des expériences, j'ai développé une expertise quant à l'utilisation de ces techniques, ce qui m'a permis d'établir diverses collaborations.

L'analyse comparative des structures et des caractéristiques moléculaires (propriétés et relations structure-fonction) de biomatériaux nous permet non seulement de corrélérer la nature des acides aminés avec les propriétés mécaniques des protéines fibreuses, ou encore la structure des lipides avec l'efficacité de la transfection, mais aussi de concevoir de nouveaux matériaux synthétiques. En effet, les concepts préalablement extraits des systèmes biologiques étudiés peuvent être mis à profit pour développer de nouveaux matériaux performants pour des applications ciblées, telles que l'immobilisation de cellules sur des supports solides, la synthèse d'hydrogel à base de soie comme matrice de culture cellulaire (en remplacement du collagène de mammifère) et le développement de nouveaux systèmes de dépollution.

Mon intégration au LADIR en 2003 m'a donné l'opportunité de poursuivre les recherches précédemment initiées sur les biomatériaux tout en ouvrant de nouvelles thématiques exploitant les potentialités de la spectroscopie Raman, à travers le Raman exalté de surface. Le savoir-faire

historique du laboratoire sur ces techniques et l'environnement instrumental offert ont été des ressources exceptionnelles pour permettre et soutenir de nouveaux projets. Les questions abordées et les objets d'étude se sont diversifiés. La sensibilité exceptionnelle de la Spectroscopie Raman Exaltée de Surface (SERS) permet de développer la détection de traces de molécules organiques, mesure qui présente un intérêt dans le domaine spatial, de la pollution mais aussi de la couleur, les colorants étant toujours présents en très faible quantité.

De plus, les mesures en spectroscopie Raman étant réalisées sans préparation spécifique, de façon totalement non-destructive et sans contact avec les objets, sont bien adaptées à l'étude des matériaux du patrimoine. Ces artefacts historiques utilisent majoritairement des biomatériaux (liants en peinture, colorants, fibres textiles, etc). Cette connaissance des matériaux constitutifs associée aux compétences de restauratrice acquises lors d'une formation en Italie et de nombreuses heures de pratique, permettent d'appréhender l'objet dans sa globalité, et d'aborder la conservation et la restauration de manière plus rationnelle. L'étude de la physico-chimie de ces matériaux du patrimoine contribue aux champs de l'histoire des techniques et des problématiques de la conservation/restauration.

Ce manuscrit est structuré comme suit :

Le premier chapitre est consacré à une sélection de mes travaux antérieurs : la relation structure / propriétés mécaniques au sein de la protéine fibreuse qui constitue la soie, la caractérisation de matériaux biominéralisés tels que les gastrolithes et la carapace de crevette, l'organisation au sein des lipides et leur utilisation pour des applications de vectorisation d'ADN. Deux matériaux hybrides peptide/polymère synthétiques sont alors conçus pour immobiliser des modèles de cellules.

Le deuxième chapitre traitera de la spectroscopie Raman exaltée de surface, et présentera trois projets sur lesquels je travaille actuellement : la détection de traces d'adénine dans le contexte de l'exobiologie, l'analyse des colorants dans des fibres textiles anciennes ainsi que la conception d'un filtre à base de soie pour la détection de traces de polluants.

Enfin, je présente dans la dernière partie les perspectives à plus long terme : la caractérisation spectroscopique avancée des systèmes efficaces en SERS, pour une meilleure compréhension du procédé d'exaltation et une optimisation des substrats actifs en SERS.

PARTIE B - TRAVAUX ANTERIEURS

PARTIE B - TRAVAUX ANTERIEURS	22
1 - Relation structure / propriétés au sein de divers biomatériaux	24
1.1 Un matériau protéique : la soie.....	24
1.1.1 Réflexion sur l'organisation et l'orientation de la fibroïne lors de la biosynthèse	25
1.1.2 Propriétés mécaniques des fibres de soie.....	31
1.2 Matériaux organo-minéraux	37
1.2.1 Les gastrolithes.....	37
1.2.2 Les carapaces de crevettes.....	40
1.3 Matériaux lipidiques.....	45
1.3.1 Organisation des lipides du <i>stratum corneum</i>	45
1.3.2 Vectorisation d'acides nucléiques par des lipides cationiques	47
2 - Système polymère/peptide pour l'immobilisation de vésicules lipidiques	51
2.1 Développement d'un système polymère-polypeptide amphiphile	51
2.2 Synthèse d'un polymère réticulé thermosensible	53
Bibliographie.....	57

1 - Relation structure / propriétés au sein de divers biomatériaux

1.1 Un matériau protéique : la soie

La soie est une protéine fibreuse, produite par de nombreux insectes et larves, par des araignées, ainsi que par des crustacés et mollusques. Elle est biocompatible et combine d'excellentes propriétés mécaniques avec une bonne stabilité chimique et thermique.

De nombreux débats existent quant à la microstructure de la soie et à l'organisation des protéines au sein de ses fibres. Selon les techniques utilisées et les communautés concernées, la soie est vue comme une protéine ou comme un polymère semi-cristallin (Figure 1). De nombreuses études cherchent à relier l'organisation des protéines de la soie à ses propriétés mécaniques exceptionnelles (Tableau 1).

Fibres		D ^a (μm)	E _{Max} ^b (GPa)	σ _{Rupture} ^c (MPa)	ε _{Rupture} ^d (%)	Références
Synthétiques	Polyamide 66 (nylon)	20	5	1000	20	1,2
	Polyester	15	15	800	15	1
	Kevlar 49	12	135	3000	2,5	1,3,4
	Carbone	5	300	3000	1,3	4
Naturelles	Coton	10-27	8	600	7	1
	Laine	15-40	2	170	35	1
	Cheveu	80	6,6	230	40	5
	Collagène (tendons)	ND	1,2	120	13	3
	Soie de vers	10-15	5-57	320-1410	4-35	2,6-9
	Soie d'araignée	3-8	11-13	800-1500	15-39	2,6,10-15
Métal	Acier	-	200	1500	0,8	3,4

Tableau 1 : Paramètres mécaniques de fibres synthétiques et naturelles et de l'acier. ^a diamètre ; ^b Module d'Young ; ^c Contrainte à rupture ; ^d déformation à rupture.

Dans un premier temps, nous nous intéresserons à l'organisation de ces protéines à l'état liquide (dans les glandes du ver) puis dans les fibres (après extrusion) à partir des informations obtenues par spectroscopie vibrationnelle. Une étude mécanique plus poussée sera effectuée sur la soie d'araignée, dont le fil est exempt d'enveloppe de sérécine. La spectroscopie Raman sera alors utilisée *in situ* pour déterminer les contraintes à l'échelle moléculaire et comprendre les propriétés mécaniques exceptionnelles de cette fibre protéique.

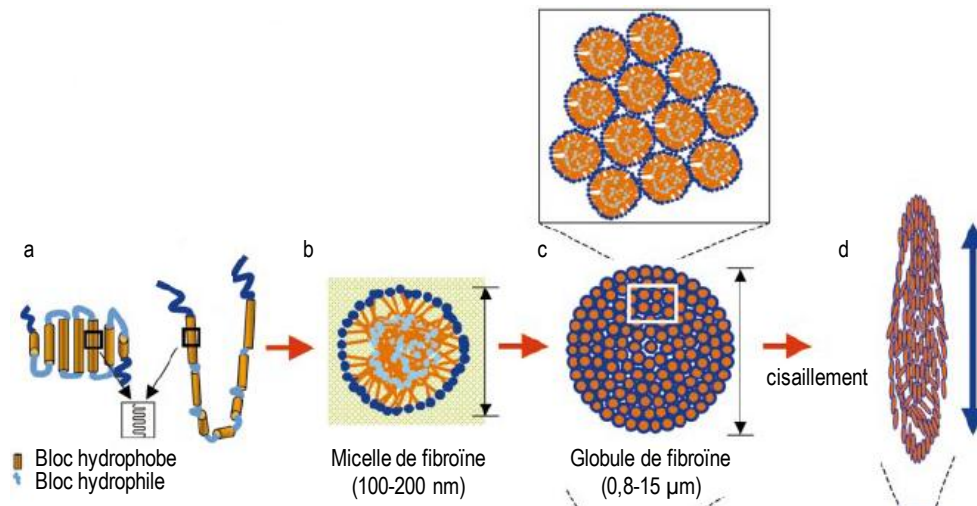


Figure 1 : Modèle de repliement de chaîne de fibroïne, de formation de micelles, de globules, puis d'alignement des globules par cisaillement des protéines de la soie. a. Repliement de la chaîne lourde de la fibroïne de la soie de *Bombyx mori*. b. Assemblage en micelles de la fibroïne de soie dans l'eau (8 %), reposant sur une structure co-polymère multibloc hydrophile-hydrophobe, avec des domaines hydrophiles internes et externes pour permettre la solubilité dans l'eau. c. Formation de " globules " sous l'effet d'une concentration accrue de fibroïne et d'une teneur en eau plus faible. d. Allongement et alignement des globules et interactions entre les globules favorisés par le cisaillement, conduisant à une structure fibrillaire

1.1.1 Réflexion sur l'organisation et l'orientation de la fibroïne lors de la biosynthèse

Les protéines sont des macromolécules biologiques composées d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques ou amides (CO-NH). La spectroscopie vibrationnelle permet de visualiser les contributions des modes de vibration du squelette polypeptidique (notamment ceux des liaisons amides) et des chaînes latérales d'acides aminés.

Le groupement amide induit des couplages entre modes de vibration et au lieu de distinguer les modes spécifiques des liaisons C-O, C-C, N-H... on parle des modes de vibration amide A, B et amide I à VII. Ces différents modes de vibration sont actifs ou non en Raman et en infrarouge^{17,18}. Les plus utiles pour l'étude de la conformation des protéines par spectroscopie Raman sont la bande amide A ainsi que les bandes amides I et III (Tableau 2). Ces vibrations sont sensibles aux liaisons hydrogène et à la structure secondaire de la protéine, ainsi qu'à l'orientation des liaisons impliquées (CO et CN). La bande amide I étant plus intense, elle est souvent utilisée pour l'analyse de la conformation. La décomposition de cette bande nous informe sur les différentes conformations de la protéine : hélices, feuillets β , coudes et pelotes statistiques.

Bande Amide	Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Activité IR	Activité Raman	Modes de Vibrations (adapté de ¹⁹)
Amide A	~ 3300	F	f	$\nu(\text{N-H}), \nu(\text{O-H})$
Amide I	1700-1600	F	F	80% $\nu(\text{C=O}), \nu(\text{C-N}), \delta(\text{N-H})$
Amide II	1600-1480	F	-	60% $\delta(\text{N-H}), \nu(\text{C-N})$
Amide III	1400-1200	F	F	$\delta(\text{N-H}), \nu(\text{C-N}), \nu(\text{C=O}), \delta(\text{N-C=O})$

Tableau 2 : Description des modes de vibration des bandes amide du squelette polypeptidique

L'ensemble du spectre Raman sera exploité afin d'obtenir des informations sur l'organisation de la protéine aux différentes échelles (Figure 2). Les modes de bas nombres d'onde donnent accès aux vibrations à longue distance des chaînes et des réseaux. Dans cette région, la bande observée peut être décomposée en plusieurs bandes (Figure 2 B, C). La bande large dont le maximum pointe à $\sim 70-80 \text{ cm}^{-1}$ est attribuée aux mouvements collectifs dans des régions désordonnées / amorphes. Une bande fine et intense peut être observée à $\sim 140-150 \text{ cm}^{-1}$. Elle est attribuée aux modes collectifs de translation des chaînes ordonnées²⁰. La bande à $\sim 230-250 \text{ cm}^{-1}$, de profil Gaussien, est attribuée aux modes collectifs inter-chaînes ou de libration.

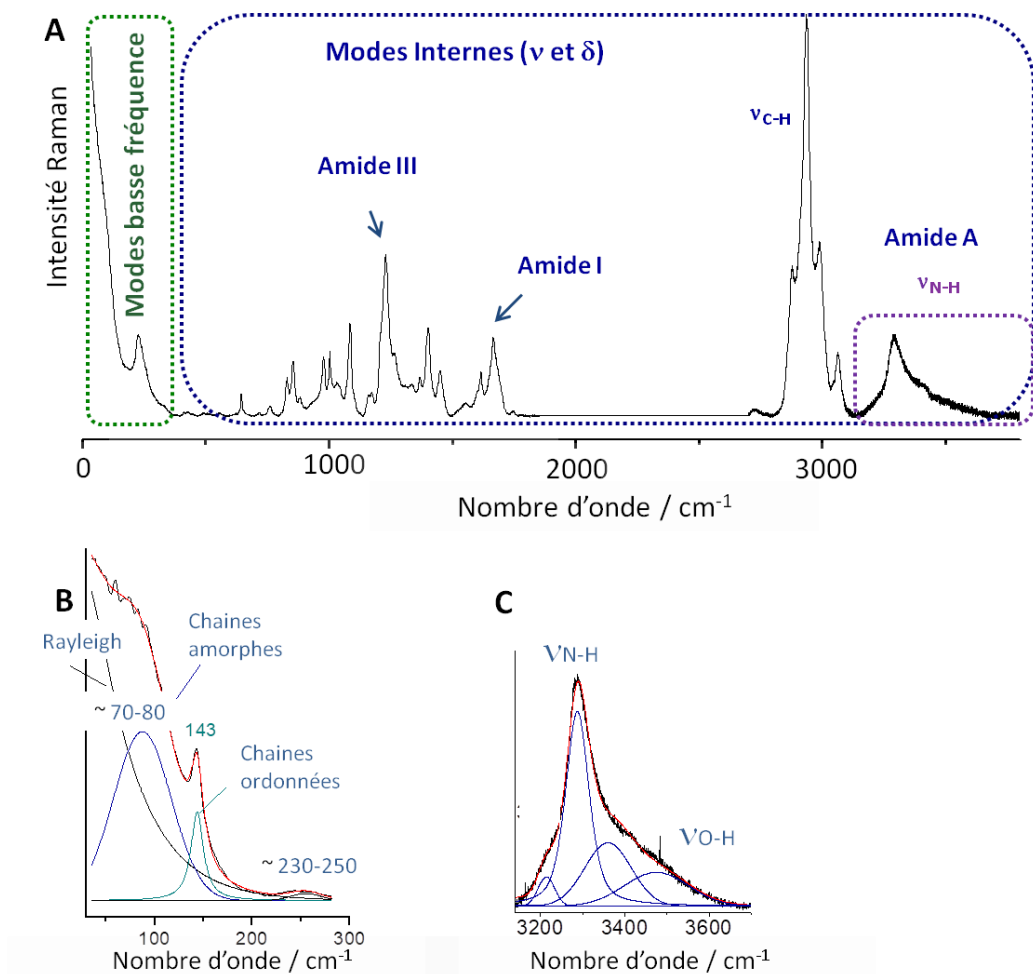


Figure 2 : Spectre Raman d'une fibre de Bombyx mori (A) et détails de la zone des basses fréquences (B) et des vibreurs NH (C)²¹

La partie du spectre située dans la région $3140-3700 \text{ cm}^{-1}$ se compose d'une large bande asymétrique attribuée aux vibrations d'élongation des groupements NH (amide) et OH (eau) (Figure 2C). Vibreur isolé de par le contraste de masse, le mode d'élongation N-H est très sensible aux liaisons hydrogène²² et peut être exploité pour estimer la distance accepteur-donneur N-H...O-H, d'après la relation établie par Novak et al.^{22,23}

Biosynthèse et structure primaire de la fibroïne

La fibroïne est synthétisée à l'état liquide dans les glandes du ver. Celles-ci peuvent être divisées en trois parties selon leur morphologie et les produits de sécrétion (Figure 3). Nous nous intéresserons dans la suite à la partie médiane (diamètre 3-4 mm au centre, 4-6 cm de long), en forme de S, qui fonctionne comme un immense réservoir de soie liquide et est le lieu de la production de sérécine. Cette partie de la glande est divisée en trois zones, Mid 1, 2 et 3

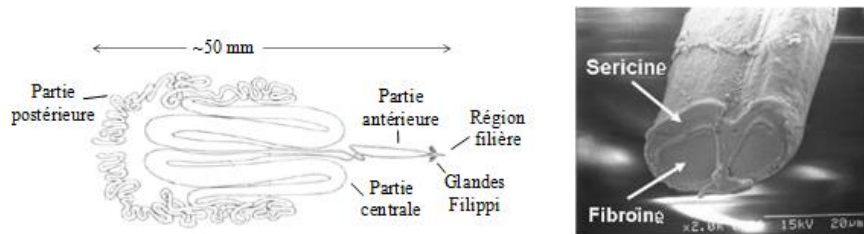


Figure 3: A gauche, un schéma des glandes séricigènes du *Bombyx mori* et à droite une fibre en sortie de filière (image MEB).

Les parties antérieures de chaque glande se réunissent pour aboutir à la filière placée sous la bouche. La « bave » ou fil de soie est une bi-fibre de fibroïne entourée d'une gaine de sérécine, une protéine hydrophile jouant le rôle de colle (Figure 3).

Pendant le filage, la larve effectue un mouvement répétitif en forme de 8 qui impose des tractions et compressions au matériau. Cette technique de filage entraîne des hétérogénéités ou défauts sur la bave, qui seront discutés par la suite. Le cocon est construit de l'extérieur vers l'intérieur avec un fil continu d'une longueur comprise entre 500 et 1500 m. Le diamètre des fibres varie entre 10 et 30 μm en fonction de l'animal, de sa procédure de filage, de la vitesse à laquelle il est réalisé (un filage plus rapide donne des fibres plus fines) et du moment auquel la bave est sécrétée (les fibres extérieures et intérieures au cocon sont différentes).

Le cocon de soie ainsi fabriqué joue un rôle de protection *via* les propriétés physico-chimiques exceptionnelles du fil obtenu (propriétés mécaniques et biologiques (antibactériennes...), stabilité chimique et thermique).

Les protéines fibreuses sont généralement caractérisées par une séquence limitée d'acides aminés. La nature chimique des acides aminés constituant la soie est majoritairement hydrophobe, ce qui favorise une organisation axiale des macromolécules dans la phase aqueuse à l'intérieur de la glande. La fibroïne (vers à soie) et son équivalent la spidroïne (araignée) sont majoritairement constituées de 3 acides aminés simples, de petite taille et hydrophobes :

- la glycine (G, R = -H, 44 %),
- l'alanine (A, R = -CH₃, 29 %),
- la sérine (S, R = -CH₂OH, 12 %) ²⁴

Considérons la fibroïne ; elle est constituée de trois entités : une macromolécule de haut poids moléculaire (FibH, « heavy fibroin », 350 kDa), une beaucoup plus légère (FibL, « light fibroin », 26 kDa) et une glycoprotéine nommée P25 (30 kDa) ²⁵⁻²⁷. Des ponts disulfures relient six molécules de chaînes lourdes à six molécules de chaînes légères et une molécule de P25 est connectée avec les chaînes lourdes et légères par interactions non covalentes (Figure 4) ²⁸. Cet assemblage est indispensable pour la bonne excrétion de la protéine. Le motif de répétition de l'unité élémentaire

de fibroïne est (GAGAS)₅-15(GX)₅-15GAAS²⁸. Par la suite, lorsque l'on parlera de fibroïne, on considèrera principalement la chaîne de haut poids moléculaire.

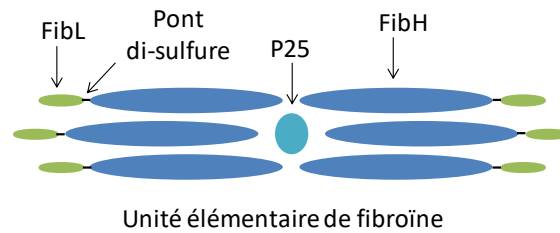


Figure 4: Schéma montrant l'assemblage de l'unité élémentaire de la fibroïne – FibH : fibroïne de haut poids moléculaire (« heavy fibroin », 350 kDa), FibL : fibroïne légère (« light fibroin », 26 kDa) et P25 : glycoprotéine (30 kDa).

Caractérisation par spectroscopie vibrationnelle de la conformation de la fibroïne

Nous avons utilisé les spectroscopies FTIR et Raman dans la région de la bande associée à la vibration amide I pour sonder l'évolution de la conformation de la fibroïne depuis la glande jusqu'à la fibre.

La Figure 5A compare les spectres FTIR-ATR obtenus pour la glande médiane hydratée (Mid1, 2 et 3 ; après soustraction de la contribution de l'eau), la fibre décreusée (sans gaine de séricine) et la référence glande « partiellement séchée » (<3 % pondéral en eau). L'ajustement des courbes dans la région amide I a été réalisé avec six composantes identifiées par dérivation (Figure 5C). Aucune différence significative n'est détectée entre les trois régions de la glande (Mid1, 2 et 3). Par contre, après déshydratation (glande « référence séchée ») et extrusion (fibre), la décomposition spectrale traduit un changement d'organisation de la protéine, d'une conformation en hélice vers une organisation à base de feuillets β .

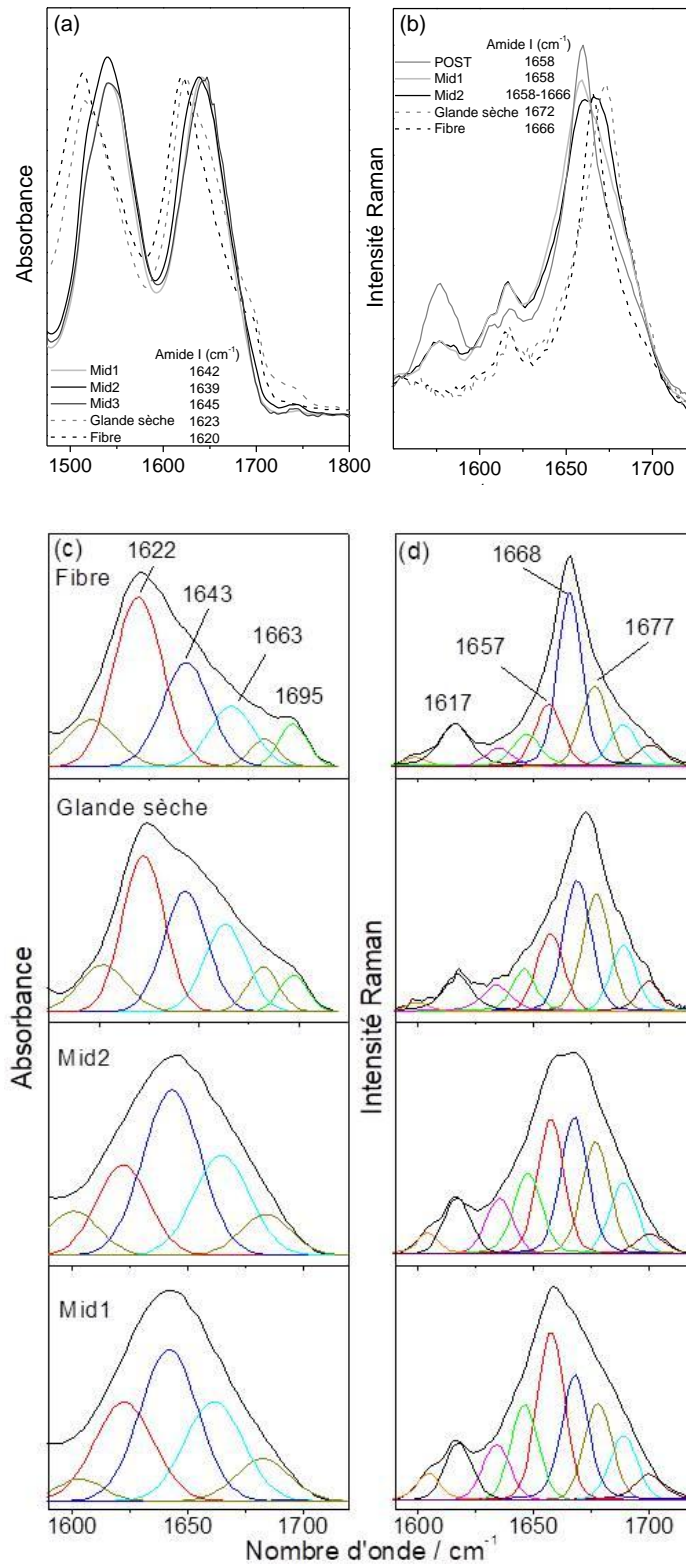


Figure 5 : Région spectrale amide I observée par spectroscopies FTIR-ATR (a, c) et Raman (b, d) dans les différentes parties de la glande hydratée, dans la fibre décreusée et dans la glande « référence séchée ». Les principales composantes sont observées à 1622 (Feuillets β), 1643 (hélices) et 1663 cm^{-1} (coudes β) en FTIR, à 1657 (hélices), 1668 (feuillets β) et 1677 cm^{-1} (coudes β) en Raman.

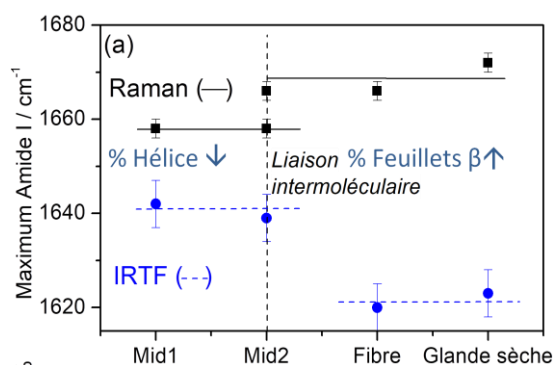


Figure 6: Comparaison de la position du maximum de la bande amide I en Raman et FTIR-ATR dans les régions hydratées de la glande, dans la glande « référence séchée » et dans la fibre décreusée.

Nous avons également utilisé la micro-spectroscopie Raman pour caractériser la section de la glande à l'état hydraté avec une meilleure résolution spatiale ($\sim 5 \mu\text{m}$ latéralement, $\sim 10 \mu\text{m}$ selon l'axe perpendiculaire à la surface) (Figure 5B/D et Figure 7). Cependant, pour l'analyse de la partie antérieure, une faible contribution de la membrane ne peut pas être exclue. La Figure 5b présente les spectres obtenus pour la partie postérieure, les parties Mid1 et Mid2, la partie médiane de la glande « référence séchée » et pour la fibre décreusée, dans la région de l'amide I. Comme mentionné précédemment, les plus grandes différences sont observées dans la région amide I, dominée par la vibration de la liaison C=O.

La Figure 6 résume l'évolution des maxima de la bande amide I extraits des spectres FTIR-ATR et Raman de la Figure 5. Cette Figure montre clairement le changement d'organisation entre l'état hydraté concentré dans la glande et l'état séché. On passe d'une organisation avec 20-30 % d'hélice à une organisation avec 20-30 % de feuillets β , le filage étant à l'origine de ce changement.

L'orientation de la fibroïne comme marqueur du filage

La Figure 7 présente les spectres Raman du contenu de la glande (étudié à l'état sec) et d'une fibre décreusée de *Bombyx mori*, obtenus pour des conditions de polarisation différentes : l'axe de la fibre ou de la glande sèche est soit parallèle, soit perpendiculaire au vecteur champ électrique du faisceau laser.

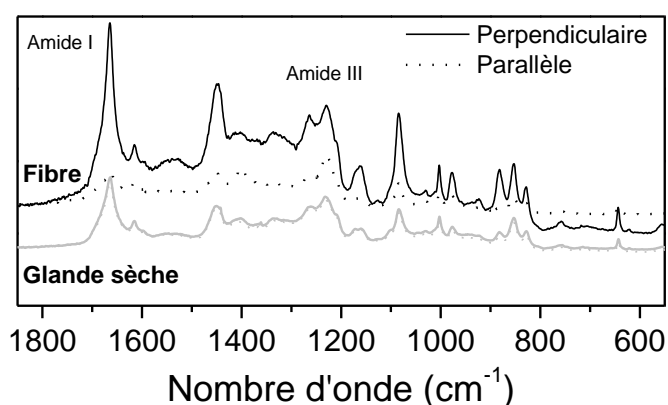


Figure 7: Spectres Raman caractéristiques de la fibre décreusée et de la glande « référence séchée » (partie centrale) en fonction de l'orientation par rapport au vecteur champ électrique du laser.

Pour la fibre, nous pouvons voir une grande différence des intensités relatives en fonction de l'orientation, comme également observé pour les fibres du ver à soie *Samia cynthia ricini* et de

l'araignée *Nephila Madagascariensis*^{21,29,30}. Les rapports d'intensité des bandes amide I sur amide III sont inversés lorsque l'axe de la fibre est tourné de 90° (Figure 7). Dans le cas de la glande séchée (fibroïne non filée), les spectres sont identiques. Ceci confirme le caractère isotrope de la solution de fibroïne dans la glande.

1.1.2 Propriétés mécaniques des fibres de soie

L'essai de traction uni-axiale est le test le plus couramment utilisé pour caractériser le comportement mécanique d'une fibre. L'essai consiste à soumettre une éprouvette à un allongement ΔL , par le déplacement relatif de ses extrémités, et à mesurer la force F nécessaire à cet allongement (Figure 8). La contrainte (σ) est définie par $\sigma = F/S_0$, où F désigne la force exercée et S_0 l'aire de la section transverse de la fibre. La déformation (ϵ) est l'allongement relatif, défini par $\epsilon = \Delta L/L_0$, où L_0 est la longueur initiale et ΔL la variation de longueur consécutive à l'étirement. La pente de la courbe de contrainte-déformation informe sur la rigidité / flexibilité du matériau (module de Young, E). La contrainte (σ_{\max}) et la déformation (ϵ_{\max}) à rupture sont les valeurs maximales de contrainte et de déformation au point où l'échantillon rompt. L'aire sous la courbe contrainte-déformation représente l'énergie dissipée pour casser la fibre.

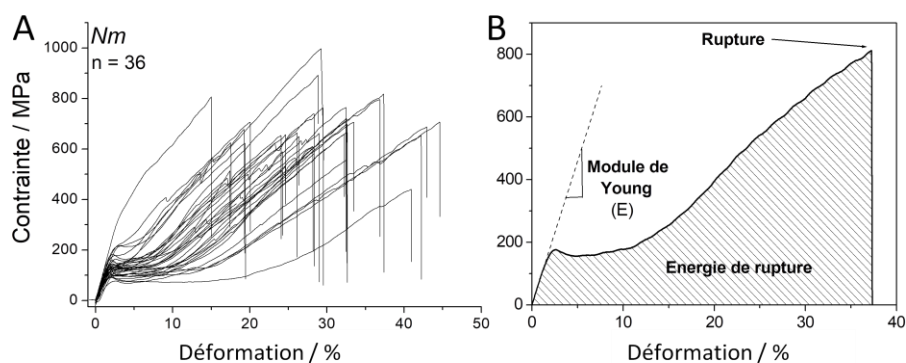


Figure 8 Courbes contrainte-déformation de 36 fibres de soie d'araignée *Nephila madagascariensis* (A) et description détaillée de l'une d'entre elles (B)³¹

La soie d'araignée présente l'avantage de ne pas être double et de ne pas présenter de gaine de séricine, ce qui simplifie la préparation des échantillons pour les essais de traction (l'élimination par voie chimique de la séricine peut dégrader la fibre de fibroïne). Le fil de trame de l'araignée *Nephila madagascariensis* est choisi pour évaluer les paramètres influençant le comportement mécanique de ces fibres naturelles. De façon générale, nous distinguons plusieurs domaines sur les courbes obtenues : un régime élastique au dessous de 2 à 4%, suivi d'un plateau puis d'une augmentation du module d'Young jusqu'à rupture. La Figure 8 A permet toutefois de constater une grande variabilité, qui concerne non seulement la contrainte et la déformation à rupture mais aussi la forme de la courbe et la valeur de la pente à l'origine (le module d'Young). Il est intéressant de noter que cette variabilité a été reliée aux différents degrés d'organisation le long de la fibre²¹. L'étude d'une centaine de fibres de survie de l'araignée *Nephila madagascariensis* a en revanche montré une bonne reproductibilité des propriétés mécaniques en fonction des individus et du vieillissement des fibres (Tableau 3).

Echantillons (n)	NM (n=33) Moy (sd)	NMf (n=27) Moy (sd)
Diamètre moyen (μm)	8.2 (1.7)	9.4 (2.4)
Module de Young (GPa)	8.1 (1.3)	8.6 (1.3)
Contrainte ultime (MPa)	662 (102)	619 (128)
Déformation ultime (%)	28.0 (7.7)	28.8 (11.1)

Tableau 3 : Diamètres et caractéristiques mécaniques mesurés pour les fibres de *Nephila madagascariensis* vieilles de 20 ans environ (NM) ou fraîchement filées (NMf) ³¹.

Les soies ont une contrainte à rupture inférieure à certains matériaux synthétiques (fibres de carbone, de Kevlar, ou d'acier) mais leur large extensibilité leur garantit un travail de rupture plus important (Tableaux 1 et 3).

Fiabilité des analyses

Les propriétés mécaniques de ruptures sont des propriétés extrinsèques, propres à l'objet. Elles ne sont pas des caractéristiques intrinsèques du matériau car la rupture est déclenchée par la présence de défauts aléatoires. Différents paramètres affectent les mesures de traction uni-axiales : la longueur de la jauge, le diamètre de la fibre, ainsi que des paramètres de mise en forme tels que le moulinage, des pré-contraintes (lors du montage par exemple), des paramètres chimiques via la préparation et le vieillissement, la teneur en eau (et sans doute l'histoire hydrique)...

Avec des mesures systématiques effectuées sur un grand nombre d'échantillons, nous avons pu proposer un protocole pour garantir la fiabilité de notre analyse spectrale. La séquence suivante résume les différentes conditions respectées:

- Pour évaluer l'effet du vieillissement sur les fibres et appréhender le comportement mécanique de ces fibres naturelles, des fibres « fraîches » (quelques semaines) et des fibres de plus de 20 ans, ont été étudiées statistiquement. Les propriétés mécaniques de ces fibres sont stables dans le temps. On note même une diminution de la variabilité avec le temps (Tableau 3).
- Afin de s'affranchir des effets dus aux mors et de respecter les normes ASTM (imposant une longueur 2000 fois supérieure au diamètre) nous avons privilégié une longueur de jauge intermédiaire de 30 mm. Augmenter la longueur de jauge revient à augmenter le nombre de défauts.
- Afin de prendre en compte la viscoélasticité, des tests de relaxation ont été effectués sur les fibres. La Figure 9 montre les courbes de contrainte et de déformation en fonction du temps. Une contrainte élastique (segment AB) apparaît instantanément lors de l'application de la déformation, le caractère viscoélastique se manifestant par une diminution progressive de la contrainte jusqu'à une valeur constante non nulle³². La période de relaxation, c'est-à-dire la période nécessaire pour obtenir une contrainte constante, est d'environ 30 min. Pour réaliser un spectre Raman sous contrôle de déformation, il sera donc nécessaire d'attendre 30 min avant de commencer l'analyse.

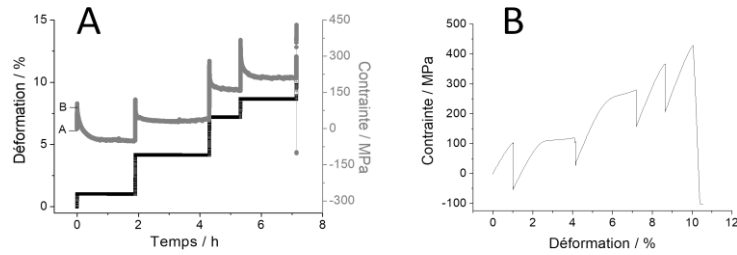


Figure 9 : Essai de relaxation sur une fibre de *Nephila madagascariensis* – (A) Contrainte et déformation mesurées en fonction du temps, (B) courbe contrainte déformation correspondante.

Nano-mécanique : comportement mécanique à l'échelle des liaisons chimiques

Cette partie s'attache à comprendre le comportement mécanique des fibres à l'échelle macroscopique en se basant sur les déformations mesurées à l'échelle de la liaison chimique par spectroscopie Raman. Pour cela, le testeur de fibre universel est placé sous le spectromètre Raman avec une longueur d'onde d'excitation à 514 nm (Figure 10). Trois zones d'intérêt sont étudiées : 0-300 cm^{-1} (bas nombres d'onde), 800-1800 cm^{-1} (déformation et élongation) et 3140-3800 cm^{-1} (zone N-H/O-H).

Région Amide I/Amide III : 800 -1800 cm^{-1}

Dans un premier temps, le comportement des modes internes a été étudié sous traction.

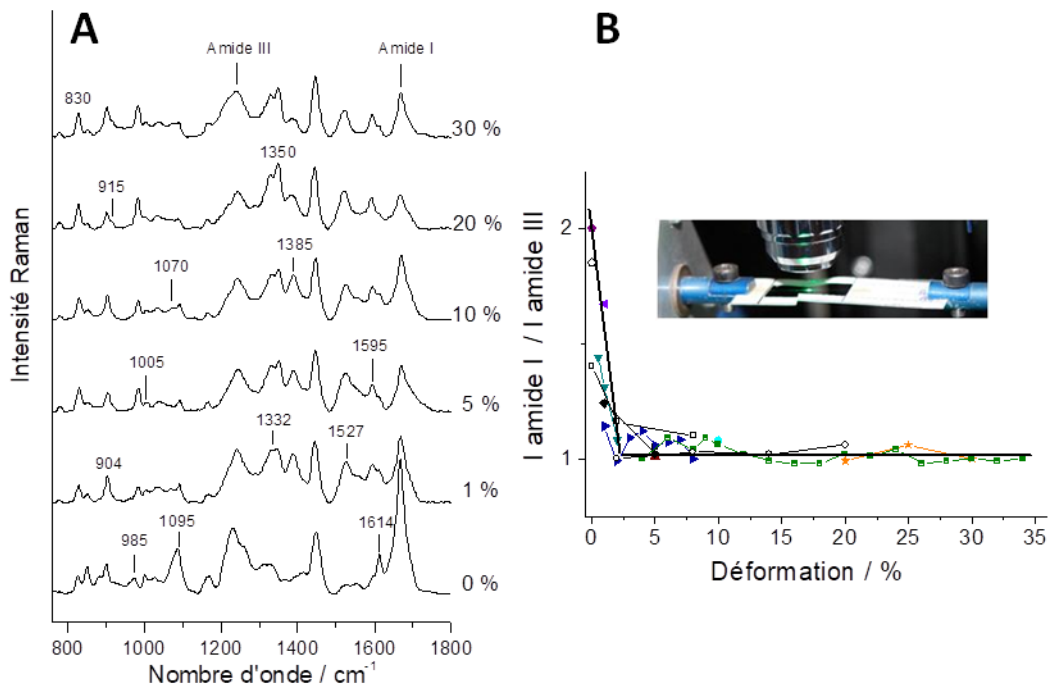


Figure 10 : Spectres Raman d'une fibre d'araignée *Nephila madagascariensis* étirée à 0, 1, 5, 10, 20 et 30 % de déformation (A) et évolution du ratio d'intensité amide I / amide III en fonction de la déformation de la fibre (B). L'insert montre le spot laser focalisé sur la fibre pendant l'acquisition d'un spectre.

Tous les changements observés se produisent dans le régime élastique linéaire de la courbe de contrainte-déformation ($\epsilon < 4\%$), et peuvent être attribués à une réorientation des chaînes de la phase amorphe (les plus faciles à solliciter et à réorienter). Contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature, nos mesures menées sur 13 fibres de *Nephila madagascariensis* (Figure 10) montrent

que seule la vibration amide III (correspondant principalement à une élongation de la liaison C-N) est affectée par la déformation. Sa position ne change significativement qu'entre 0 % de déformation (composante majoritaire située à $\sim 1230 \text{ cm}^{-1}$) et 1 % de déformation ($\sim 1240 \text{ cm}^{-1}$). Vollrath et al. l'ont attribué à des changements au niveau du réseau de liaisons hydrogène ou à une réorganisation structurale³³. Les autres changements observables sur les spectres concernent des variations de rapports d'intensité de bandes, sans tendance spécifique en fonction de la déformation. Le rapport d'intensité amide I / amide III a été tracé pour les différentes campagnes de mesures en fonction du pourcentage d'élongation (Figure 10B). Lors des analyses Raman sous contrôle de déformation, les fibres sont placées perpendiculairement au vecteur champ électrique du laser, le rapport initial (avant déformation) est environ égal à 2. Ce rapport diminue à 1 à partir de 1-2 % de déformation et est stable jusqu'à la rupture de la fibre. La variation du rapport d'intensité amide I / amide III suggère une réorientation du tenseur C=O par rapport au vecteur champ électrique du laser et par conséquent un changement d'orientation des chaînes par rapport à l'axe de la fibre.

Région des modes de réseau : 0 à 200 cm^{-1}

Comme mentionné précédemment, les modes de bas nombres d'onde donnent accès aux vibrations à longue distance des chaînes et des réseaux. Une bande fine et intense peut être observée à $\sim 140\text{-}150 \text{ cm}^{-1}$ (Figure 2). Elle n'est pas présente tout le long de la fibre (Figure 11). Elle est attribuée aux modes collectifs de translation des chaînes dans des domaines ordonnés. Comme attendu, cette bande est sensible à l'orientation par rapport à la polarisation du laser incident ce qui en fait un marqueur pertinent du changement d'orientation sous traction axiale (Figure 12B).

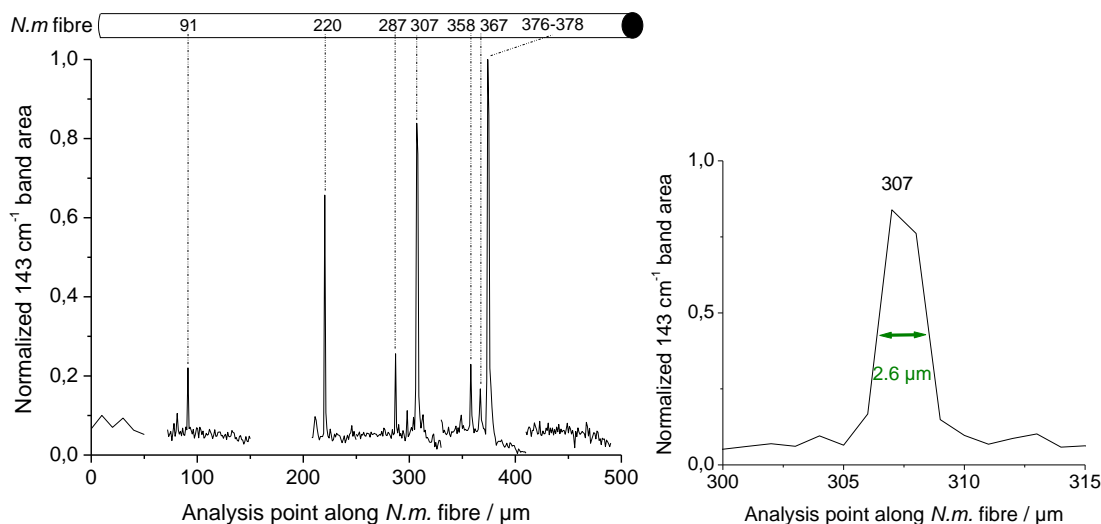


Figure 11 : Variabilité de l'aire de la bande située à 143 cm^{-1} le long d'une fibre de soie de N.m. perpendiculairement à la direction du vecteur électrique du laser (à droite, zoom du pic autour de $307 \mu\text{m}$).

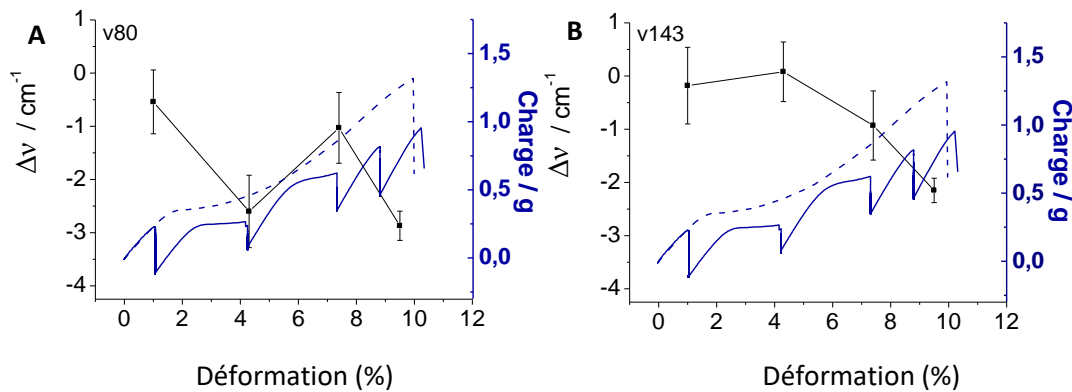


Figure 12 : Nombres d'onde des composantes à 80 cm^{-1} (A) et 143 cm^{-1} (B) du spectre Raman d'une fibre de *Nephila madagascariensis* testée en relaxation (Figure 9) - la courbe en pointillés donne le profil caractéristique d'un test conduit sans les arrêts à déformation imposée.

Comme attendu, dans le régime élastique linéaire et le plateau (au dessous de 4% d'élongation), la bande à 143 cm^{-1} relative aux vibrations de translation des chaînes ordonnées n'est quasiment pas affectée, le nombre d'onde associé à son maximum ne varie pas. A partir du régime de reprise de contrainte, cette bande voit son nombre d'onde diminuer (allongement des liaisons). La bande à $\sim 80 \text{ cm}^{-1}$, attribuée aux mouvements de translation des chaînes amorphes est plus difficile à suivre (Figure 12A). Elle se superpose à l'aile de Rayleigh, ce qui engendre un écart type important sur sa position lors des décompositions spectrales. Le nombre d'onde est relativement stable dans les deux premiers régimes des courbes de contrainte-déformation et a tendance à diminuer lors de la reprise de contrainte. Le même type de résultats a été obtenu sur des fibres du polyamide synthétique PA66 (ou Nylon©) sous sollicitation mécanique³⁴.

De façon générale, le comportement en traction est induit par l'allongement des liaisons et par les mécanismes de rupture de celles-ci^{5,35-38}. Par ailleurs, le comportement spécifique des bandes des bas nombre d'ondes caractéristiques des chaînes « ordonnées » et « amorphes » donne un aperçu direct sur la microstructure³⁵. Dans notre cas, les composantes « ordonnée » et « amorphe » présentent une diminution vers les bas nombres d'onde lorsque la fibre est soumise à une déformation, donc les régions ordonnées et amorphes appartiennent aux mêmes chaînes macromoléculaires (avec un ordre/désordre variable le long de chaque chaîne). Ceci correspond à une microstructure de type Prevorsek³⁹ rencontrée dans de nombreux polymères semi-cristallins (Figure 13A).

Grâce au couplage des méthodes de spectroscopie Raman et de traction uni-axiale, on observe que dans la phase initiale de traction, les chaînes s'accommodent de la déformation en se déroulant (suivi du ratio d'intensité amide I / amide III) (Phase 1, Figure 13). Puis, une fois que toutes les chaînes sont alignées avec la direction de sollicitation, les régions les plus ordonnées commencent à résister à la contrainte. Dans le régime associé au plateau (Phase 2, Figure 13), des transitions peu énergétiques ont lieu, telles que le déroulement des hélices, et/ou des régions désordonnées, pour former des chaînes de type feuillet bêta, et le glissement des chaînes.

A

Régions ordonnées



Modèle de
Prevorsek
(même chaîne)

B

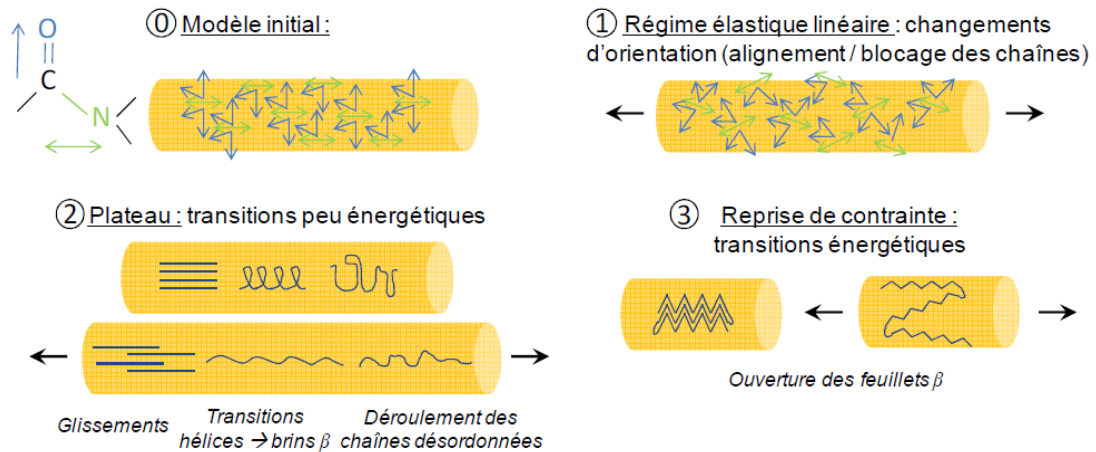


Figure 13 : Modèle d'organisation des chaînes macromoléculaires de la soie de *Nephila madagascariensis* (A) et représentations schématiques des phénomènes se produisant lors de l'étirement à rupture d'une fibre (B).

Une fois que toutes les chaînes sont alignées avec la direction de la sollicitation ou bloquées, les régions les plus ordonnées commencent à résister à la contrainte (transitions énergétiques, ouverture des feuillets β) et le module d'Young remonte. La Figure 13 résume le modèle proposé.

1.2 Matériaux organo-minéraux

Les biominéralisations (ou biominéraux) sont définies comme des structures minéralisées élaborées par des organismes vivants. Parmi les biominéralisations dites biologiquement contrôlées, la calcification est la plus importante quantitativement et la plus répandue chez les métazoaires. Elle correspond principalement au durcissement d'un exosquelette servant de support pour les muscles, mais aussi de protection contre les agressions environnementales. Les données fossiles révèlent que les premiers exosquelettes calcifiés sont apparus chez les métazoaires, probablement à la fin du Précambrien. En effet, suite à l'explosion Cambrienne, il y a environ 545 millions d'années, on met en évidence une diversification des classes et des espèces animales avec l'apparition quasi simultanée des squelettes calcifiés, phosphatés ou siliceux. Nous nous intéresserons en particulier aux crustacés qui sont capables de produire deux types de calcifications en lien avec un processus cyclique de mue permettant la croissance de l'animal : un squelette externe (ou cuticule) inextensible et durci notamment par calcification, mais également, chez de nombreuses espèces, des dépôts transitoires de calcium.

1.2.1 Les gastrolithes

Ces travaux sont effectués en collaboration avec G. Luquet et ont pour but la compréhension du processus concourant à l'élaboration par un organisme vivant de structures organo-minérales, dans le contexte général de l'évolution de ces systèmes calcifiants. Ces minéralisations ont-elles une origine génétique précambrienne unique ou, au contraire, chaque phylum a-t-il développé son propre mode de minéralisation à la base du Cambrien ?

Afin d'améliorer notre compréhension de ce processus évolutif, nous avons choisi d'effectuer l'étude structurale et moléculaire comparative des dépôts transitoires de calcium élaborés par des crustacés appartenant à plusieurs espèces. Nous nous intéresserons plus précisément aux crabes terrestres, écrevisses et homards qui élaborent à chaque cycle de mue, au niveau de la paroi stomacale, une ou deux paires de disques calcifiés appelés gastrolithes (Figure 14)⁴⁰⁻⁴⁴.

Au centre du phénomène de biominéralisation biologiquement contrôlée se trouve une matrice organique, nommée ainsi pour la première fois par Le Gros Clark en 1965⁴⁵. Cette matrice constitue une véritable interface entre l'organisme et le minéral et permet le contrôle de la majorité des processus nécessaires à l'élaboration d'une structure biominéralisée. La matrice synthétisée par l'organisme minéralisant s'assemble selon des interactions physico-chimiques inhérentes aux constituants. Elle est notamment considérée comme responsable de la précipitation des sels de calcium, de la forme minéralogique du précipité et de la morphologie de la calcification en guidant la croissance des cristaux. Quand un biominéral est formé de carbonate de calcium, les constituants de cette matrice déterminent le polymorphe final. Il existe 6 polymorphes : 3 formes cristallines (calcite, aragonite, vaterite), 2 formes hydratées (mono- et hexa-hydratée ou ikaïte) et 1 forme amorphe (Carbonate de Calcium Amorphe ou ACC). Ce dernier polymorphe, chimiquement le plus instable, a pourtant été observé dans certaines structures biominérales⁴⁶. On en rencontre notamment chez les pancrustacés au niveau de la carapace et dans les dépôts transitoires de calcium qu'élaborent cycliquement certaines espèces (gastrolithes). Il est à noter que malgré l'instabilité de l'ACC et le fait que les gastrolithes existent seulement pendant une brève période du cycle de mue, des fossiles en ont été découverts dans des dépôts datant de l'Eocène (-56 à -34 MA⁴⁷).

En ce qui concerne les structures de stockage de carbonate de calcium, notre étude portera sur l'écrevisse d'eau douce de l'espèce *Astacus astacus* (crustacé décapode), qui possède la particularité de synthétiser une paire de gastrolithes dans la paroi de son estomac à chaque cycle de mue ⁴⁸.

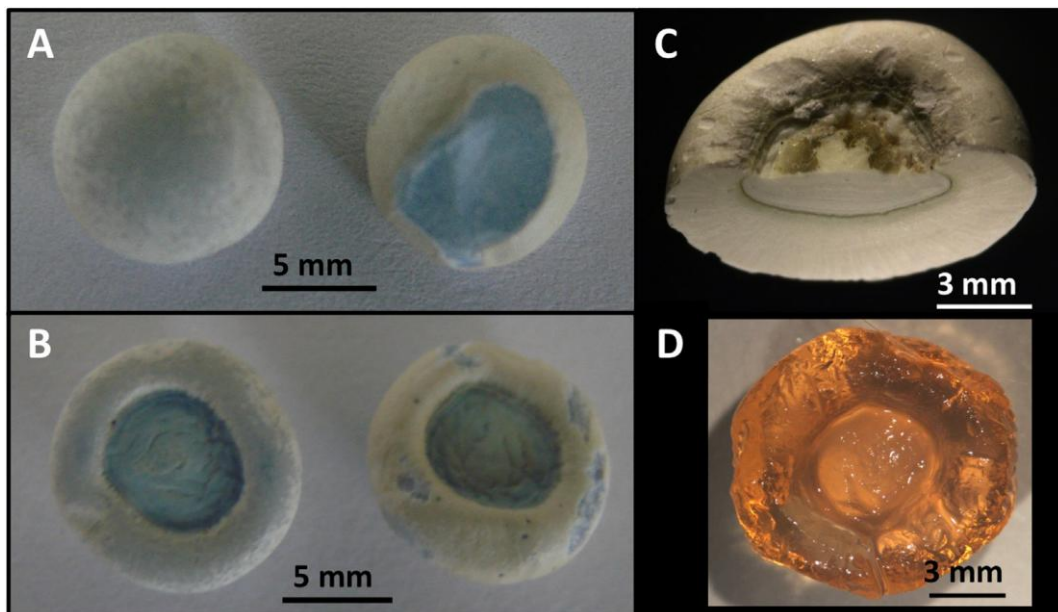


Figure 14 : Paire de gastrolithes d'*Astacus astacus*. (A) Face convexe en contact avec l'épithélium de l'estomac, (B) Face plate en contact avec la cuticule de l'estomac. (C) Coupe transversale polie (D) Décalcification complète d'un gastrolithe montrant la structure de la matrice organique. La couleur bleue en A et B et la couleur orange en D correspondent à la présence de pigments caroténoïdes. (A, B, C et D : microscopie optique) ⁴⁸.

Sur la coupe transversale polie de gastrolithe (Figure 14 C), un motif en couches concentriques est observé, ainsi que des striations perpendiculaires à ces couches au milieu et dans les couches les plus externes associées au stockage tardif. La Figure 14 D montre un réseau tridimensionnel organique très bien conservé après décalcification. Ceci est probablement dû aux ponts protéiques existant entre les fibres protéine-chitine ⁴⁹.

Des analyses EDX ont été effectuées pour suivre la répartition d'éléments choisis (O, Ca, Mg, Si, Sr, P, S) dans les gastrolithes, notamment l'évolution de leur concentration de la zone de stockage tardif (plus externe) vers la zone de stockage initial (au centre du gastrolithe). Les ratios molaires de Sr, Mg et S sont autour de 5%, avec une légère augmentation pour Mg en certains points. Au contraire, Ca et P montrent des variations importantes et corrélées.

Les mêmes échantillons ont également été analysés en spectroscopie Raman pour identifier les espèces minérales présentes et leur répartition.

La caractérisation de l'organisation des carbonates biogéniques est complexe, en raison de leur microstructure, de leur degré d'organisation, de leur hétérogénéité de composition et de leur hydratation. La spectroscopie Raman est un outil de choix qui permet une identification de la composition et du degré d'organisation de la matrice minérale et éventuellement de la matrice organique. Comme mentionné précédemment, le carbonate de calcium existe sous 4 formes polymorphes anhydres, la calcite (la plus stable), l'aragonite (métastable, souvent retrouvée dans les coquilles, coraux, perles...), la vaterite (peu retrouvée dans les minéraux naturels) et le CaCO_3 amorphe (ACC) (non cristallisé, souvent colloïdal). Pour les carbonates, 3 bandes de vibration Raman

sont attendues : élongation symétrique (pour la calcite : ν_1 , environ 1085 cm^{-1} , intense), élongation antisymétrique (ν_3 : 1316 cm^{-1} , faible), balancement dans le plan (ν_4 : 713 cm^{-1}). Au-dessous de 400 cm^{-1} , on trouvera les modes de réseau. Des cartographies Raman ont donc été effectuées dans 3 régions différentes correspondant à 3 périodes différentes du stockage de calcium. On retrouve des marqueurs spectroscopiques du phosphate et du carbonate de calcium ainsi que des signatures de pigments caroténoïdes et des traces de protéines. Le ratio entre l'aire de la bande à 1085 cm^{-1} ($\nu_1\text{ CO}_3^{2-}$) et l'aire de la bande à 960 cm^{-1} ($\nu_{\text{sym}}\text{ P-O}$) a été utilisé pour la production d'une image chimique (Figure 15). Les largeurs de bande ainsi que les absence/présence de bandes nous renseignent sur les polymorphes présents.

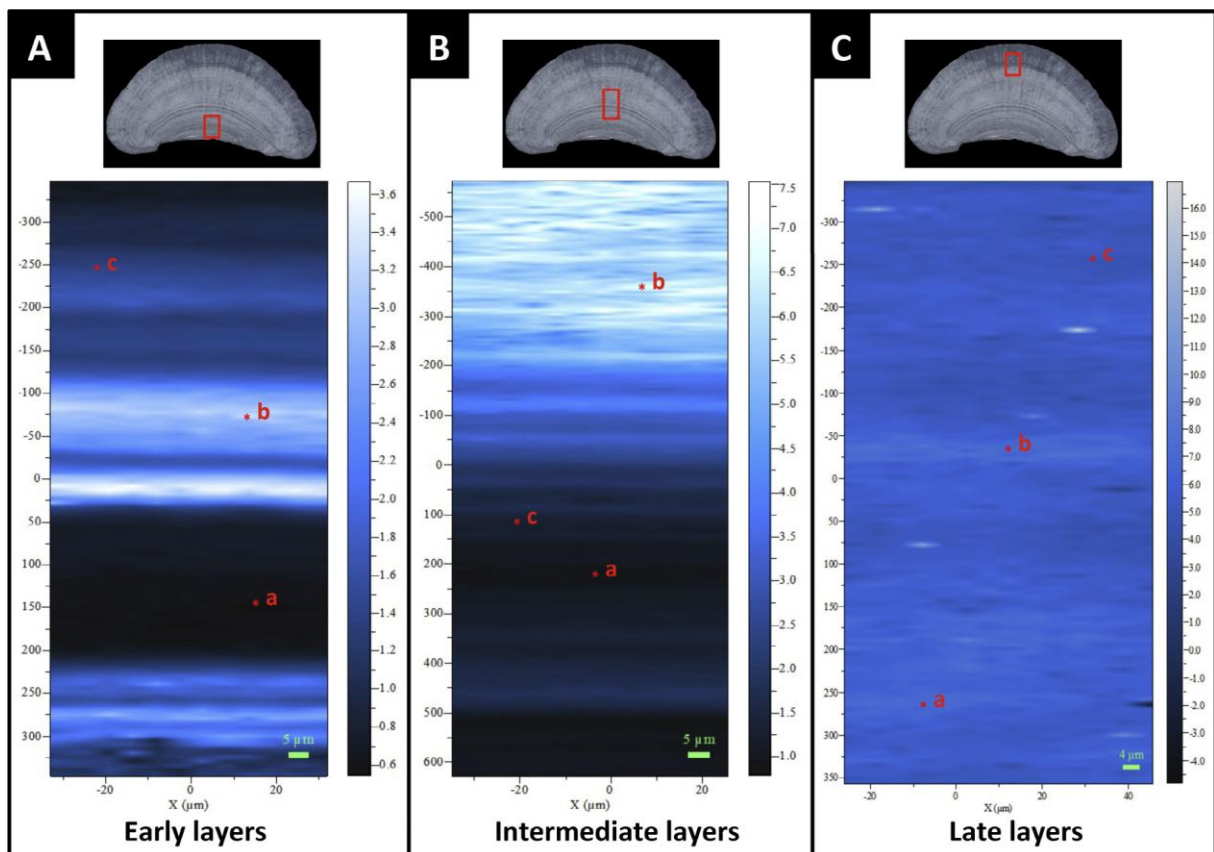


Figure 15 : Images chimiques Raman réalisées sur une section transversale de gastrolithe et obtenues à partir du ratio entre l'aire de la bande à 1085 cm^{-1} (νCO_3^{2-}) et l'aire de la bande à 960 cm^{-1} ($\nu_1\text{ PO}_4^{3-}$). Différentes zones correspondant à trois périodes de stockage (encarts ci-dessus) ont été analysées. Carte (A) : période de stockage précoce. Carte (B) : période de stockage intermédiaire. Carte (C) : période de stockage tardif. Le noir correspond à des régions riches en phosphate, alors que les zones claires correspondent à une prédominance des groupes carbonates.

La carte A (Figure 15) correspond à une région de stockage précoce (interne) et montre une alternance de régions riches en phosphate ou en carbonates. Une analyse approfondie des spectres obtenus dans cette zone montre la présence d'ACC polymorphe (position et largeur de la bande ν_1), et d'ions phosphates sur toute la surface, mais avec des changements de ratio entre ces 2 espèces chimiques.

La carte B correspond à une zone de transition entre une zone riche en phosphate (zone foncée) et une zone pauvre en phosphate. Quant à la carte C, correspondant à la zone de stockage tardif (plus

externe), elle présente une coloration homogène et donc une composition homogène. Les spectres sont tous majoritairement caractéristiques de l'ACC. Cependant, les spectres enregistrés présentent des variations de position du maximum de la bande attribuée au mode d'élongation symétrique ν_1 des ions carbonates, ce qui pourrait être attribué à des différences de cristallinité du carbonate de calcium au sein de cette région de stockage tardif.

Pour ce qui est du phosphore, il est présent dans tout le gastrolithe, la partie la plus interne présentant des couches épaisses riches en liaisons P-O alors que la seconde moitié (stockage tardif) est homogène et contient une quantité plus faible et décroissante. Ceci est observé par les différentes techniques et confirmé en Raman. La finesse des bandes suggère la présence d'ACP (Amorphous Calcium Phosphate) sous forme de nanoclusters colloïdaux. L'utilisation de la spectroscopie XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) confirme que le phosphore est présent dans 2 phases distinctes, dans la phase minérale (sous forme d'ACP) et dans la phase organique, sans doute associé à des protéines et dans une moindre mesure à des sucres⁴⁸.

Nous avons mis en évidence que le calcium était stocké exclusivement sous forme amorphe (ACC et ACP) dans les gastrolithes. Cette organisation est compatible avec une solubilisation et une remobilisation rapide du calcium stocké, en lien avec l'urgence vitale que représente pour l'animal le durcissement de l'exosquelette après chaque mue. Il est à noter que la présence de phosphate de calcium sous forme amorphe (ACP), de moindre dureté qu'une forme cristalline, pourrait faciliter là aussi la résorption du calcium associé⁵⁰.

Pour une meilleure compréhension de la formation de ces dépôts transitoires de calcium, une étude moléculaire de la matrice organique est indispensable en complément de l'analyse minéralogique. Le travail d'identification des constituants minéraux des gastrolithes de l'écrevisse *Astacus astacus* sera donc complété par l'analyse des protéines constitutives du réseau organique tridimensionnel intrinsèque à ces structures, molécules qui sont souvent multifonctionnelles, formées de l'adjonction de divers domaines, de fonctions et d'origines diverses. Il est à noter que de nombreuses protéines de matrices minéralisantes sont de nouvelles protéines non encore identifiées à ce jour. La partie phosphatée organique, présente essentiellement sous forme de phosphoprotéines, pourrait participer, en concentrant localement les ions calcium par interaction électrostatique, à la précipitation du calcium mais également à la stabilisation du polymorphe amorphe du carbonate de calcium (ACC biogénique), inhibant sa transformation en polymorphe cristallin.

1.2.2 Les carapaces de crevettes

Ce projet concerne l'extraction de la chitine, c'est-à-dire la matrice organique de la carapace de crevette. La chitine est incluse dans une matrice complexe constituée de minéraux (majoritairement le carbonate de calcium), de protéines (70%) et de lipides et pigments (en faible quantité). La chitine et son dérivé, le chitosane présentent de nombreuses applications dans des domaines divers tels que l'agriculture, la médecine, l'industrie du papier et l'agroalimentaire. Certaines applications nécessitent une architecture particulière, que l'on peut favoriser en jouant sur la distribution du poids moléculaire et le degré d'acétylation. Cette étude a été effectuée dans le cadre du projet européen CARAPAX (Chitosan Activates Resistance Against Pathogen After eXposure). L'objectif est d'utiliser la chitine comme leurre biologique afin de déclencher une réaction naturelle de

renforcement métabolique des plantes (réaction observée empiriquement en mettant les graines ou les racines en contact avec de la chitine).

La chitine est un polysaccharide fibreux constitué d'un enchaînement d'unités *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) et glucosamine (Glc) et s'appelle chitine ou chitosane selon la proportion de ces 2 unités (chitine : GlcNAc > 60%, chitosane : GlcNAc < 60%). Un des principaux problèmes est la production de chitine et de chitosane purs. La chitine commerciale est majoritairement extraite des carapaces de crabes et de crevettes. Lors de son extraction, les carapaces subissent donc des étapes de purification. Les méthodes utilisées sont assez brutales et les chitines obtenues très hétérogènes au point de vue structural et chimique. De plus, il peut rester des impuretés, telles que des minéraux ou des protéines liés à la chitine (Figure 16).

Nous avons donc optimisé les processus d'extraction, et mis au point de nouveaux protocoles de caractérisation des produits obtenus. Le suivi cinétique de la déprotéinisation nous a aussi permis de caractériser les interactions protéine / chitine.

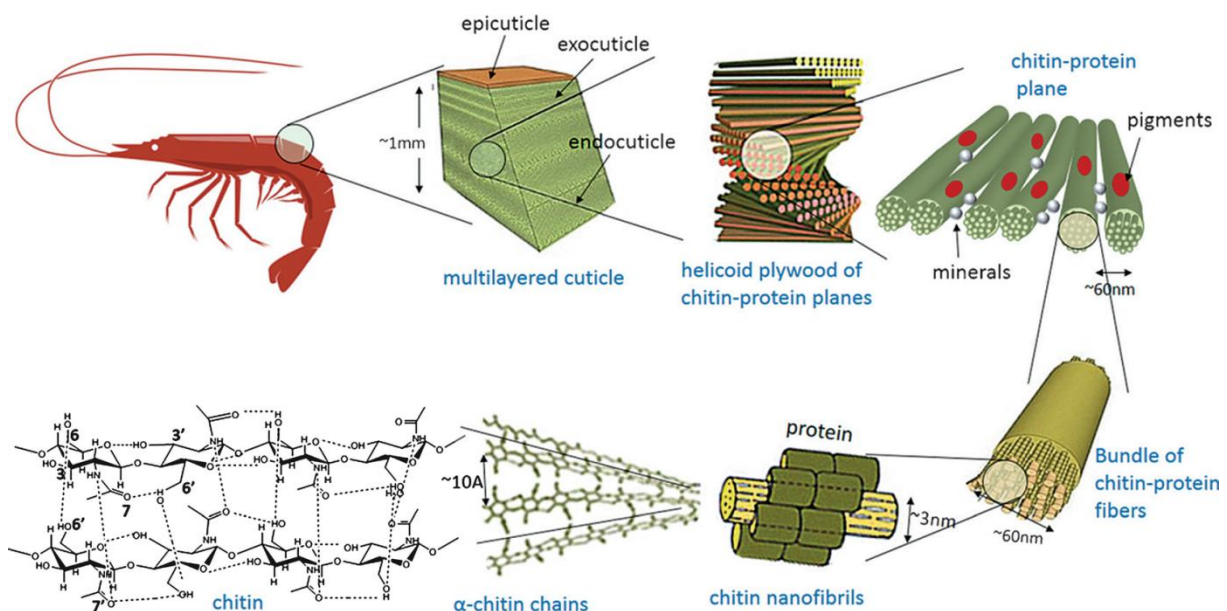


Figure 16 : Organisation de la chitine dans les carapaces de crevettes ⁵¹

Comme dans le cas de la soie, la chitine a un rôle de soutien mécanique (matrice biominérale) et un rôle de protection contre les agressions extérieures. Par conséquent, la chitine n'est soluble dans aucun solvant, ou alors dans des conditions drastiques telles que le mélange diméthylacétamine (DMAc)/LiCl (5%). Cette insolubilité complique toutes les analyses en solution généralement utilisées pour caractériser les polymères. De plus, la détection de protéines résiduelles est rendue complexe par les similitudes entre leurs structures chimiques et celle de la chitine.

Procédé d'extraction :

De façon générale, la chitine est extraite de la carapace de crevette selon le procédé présenté Figure 17. Il implique 2 étapes majeures, une étape de déminéralisation et une étape de déprotéinisation.

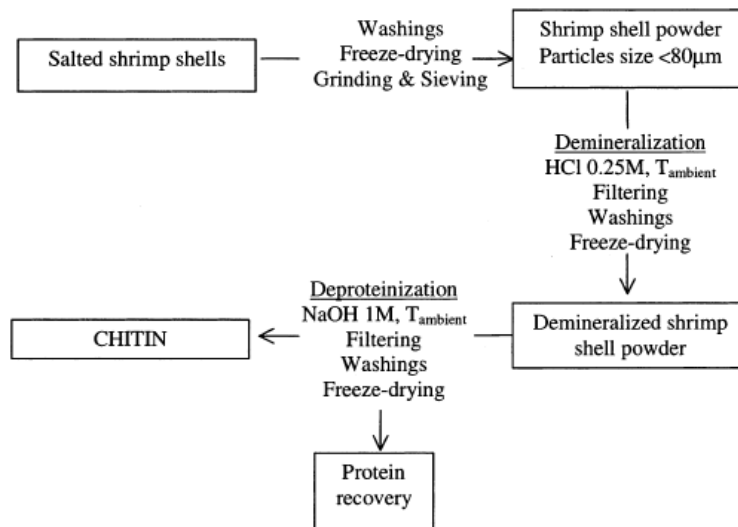


Figure 17 : Procédé d'extraction de la chitine à partir de carapaces de crevettes⁵²

Caractérisation de la chitine :

La chitine et les produits intermédiaires sont caractérisés par différentes méthodes, physicochimiques:

- L'analyse Thermogravimétrique (ATG) pour déterminer la quantité d'eau contenue dans les échantillons
- L'analyse élémentaire pour déterminer la quantité d'azote contenue dans l'échantillon et en déduire le pourcentage de protéines
- L'extraction et l'analyse gravimétrique pour déterminer la quantité de lipides
- La teneur en cendres et l'ICP pour évaluer et caractériser la partie minérale
- La RMN du ^1H et du ^{13}C pour déterminer le degré de N-acétylation
- La viscosimétrie pour déterminer la masse molaire de la chitine extraite

La structure chimique a été étudiée par FT-IR, RMN (liquide et solide), ainsi que par HPLC (après une dégradation chimique). La masse molaire a été mesurée par viscosimétrie (type Ubelhode et Couette) et par diffusion de la lumière dans le DMAc/LiCl 5%. Ces deux méthodes nous ont permis de mesurer de très hautes masses molaires, jamais observées dans la littérature. La mise au point d'une méthode de détermination de la masse molaire par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) a été amorcée.

Élimination de la matrice minérale

Bien que l'utilisation d'HCl puisse se faire au détriment des propriétés intrinsèques de la chitine, il reste l'agent décalcifiant le plus utilisé dans les laboratoires et dans l'industrie. Nous avons donc optimisé la concentration d'acide utilisée afin de limiter l'hydrolyse du polymère.

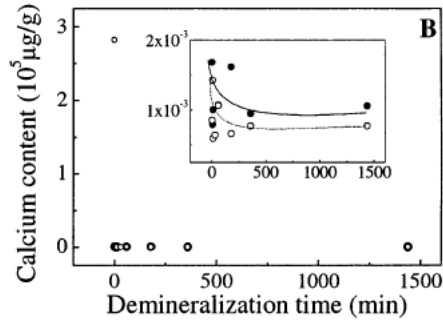


Figure 18 : Cinétique de déminéralisation dans HCl 0,25M à température ambiante. Contenu en calcium des carapaces de crevettes déminéralisées (●) et dans la chitine correspondante (○)⁵².

La Figure 18 confirme que les concentrations d'acide ainsi que les temps de déminéralisation utilisés dans la littérature sont trop longs. Avec un excès de 10 fois la quantité nécessaire d'HCl (à 0,25M), la réaction de déminéralisation est complète en 15 min.

L'effet des conditions acides de déminéralisation sur la viscosité intrinsèque (donc la masse molaire et l'hydrolyse du polymère) et sur le degré d'acétylation a été évalué. Les mesures ont mis en évidence une diminution de la viscosité après 3h de traitement, ce qui traduit l'hydrolyse du polysaccharide.

Élimination de la matrice protéique

Les méthodes classiques utilisent la détermination du % d'azote par la méthode de Kjeldahl et l'analyse élémentaire. On doit donc faire des approximations, à la fois sur le pourcentage d'azote dans les protéines présentes et sur le degré de déacétylation. Ces approximations impliquent une erreur expérimentale supérieure à 1%, c'est à dire une incertitude trop importante pour des applications biologiques. Pour optimiser les conditions de déprotéinisation et déterminer avec précision la quantité de protéines restant en fin de processus, nous avons utilisé l'analyse quantitative des acides aminés par chromatographie en phase liquide (après hydrolyse acide) et l'analyse élémentaire. L'analyse des acides aminés a été mise au point sur des échantillons modèles (à base de N-acétylglucosamine et de la protéine BSA) et nous avons pu détecter avec précision jusqu'à 0,25% ± 0,02% (w/w) de protéine. Au dessous de cette limite, on reste capable de détecter la présence des protéines mais avec une incertitude qui augmente très rapidement.

Cette méthode a été couplée à l'analyse élémentaire pour suivre la cinétique de deproteinisation (Figure 19).

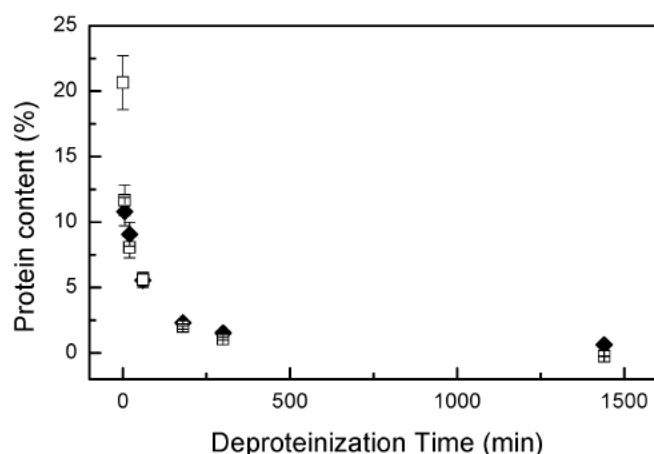


Figure 19 : Cinétique de déprotéinisation dans NaOH 1M à température ambiante. Variation du contenu en protéines dans la chitine obtenue mesurée par analyse élémentaire (□) et analyse des acides aminés (■)⁵³.

De façon générale, les 2 méthodes donnent les mêmes résultats. Après 6h, la déprotéinisation peut être considérée comme complète. La masse molaire et le degré de N-acétylation sont stables durant les 25h de traitement.

Après 24h, l'analyse élémentaire donne un taux de $0,0\% \pm 1,0\%$ et l'analyse des acides aminés un taux de $0,6\%$. Cette dernière analyse permet de connaître la composition en acides aminés (AA) des protéines présentes en fonction du temps de traitement.

Interactions protéines / chitine

Peu d'informations existent dans la littérature quant à l'organisation de la matrice chitine-protéines. Suite à cette mesure, on constate que les AA acides et non polaires partent en premier, et seraient plus libres ou impliqués dans des interactions plus faibles ou réversibles (à pH alcalin) que les AA basiques, impliqués dans des interactions particulières avec la chitine⁵⁴.

Des mesures effectuées à différentes températures ont montré que la cinétique de déprotéinisation obéit à une loi de premier ordre en 3 étapes. Les énergies d'activation ont pu être calculées et décroissent considérablement de la première à la troisième étape (Tableau 4).

	stages		
	1	2	3
E_a (kJ·mol ⁻¹)	21 ± 2	11 ± 2	0.00 ± 0.40
A (min ⁻¹)	55 ± 12	2 ± 2	1 ± 2

Tableau 4 : Energies d'activation (E_a) et facteurs de fréquence de collision (A) calculés à partir des constantes de vitesse mesurées à différentes températures⁵⁴.

Ces étapes sont liées au départ de séquences peptidiques plus ou moins fortement liées à la chitine ou plus ou moins accessibles. La première étape peut être attribuée au départ des séquences peptidiques principalement impliquées dans des interactions électrostatiques avec les rares sites cationiques de la chitine, la deuxième étape au départ de peptides impliqués dans de plus faibles liaisons type liaisons hydrophobes ou /et hydrogène. Les peptides hydrolysés lors de la 3^e étape sont peu accessibles, probablement protégés par leurs domaines hydrophobes. On peut faire l'hypothèse qu'il s'agit de protéines lipophiles.

1.3 Matériaux lipidiques

1.3.1 Organisation des lipides du *stratum corneum*

L'épiderme est l'épithélium de revêtement le plus externe de la peau humaine. Au cours de la kératination, des cellules de la couche basale vont migrer vers la surface épidermique. Lors de cette migration, les kératinocytes vont s'aplatir, perdre leur noyau, s'enrichir en lipides. Les cellules différenciées vont ainsi former quatre couches différentes, la plus externe correspondant à la couche cornée ou *stratum corneum*. Ainsi, de par sa composition, le *stratum corneum* est généralement représenté comme une structure composite «briques - mortier», où les briques représentent les cellules et le ciment la matrice lipidique.

Dans cet arrangement composite, nous nous intéresserons particulièrement aux lipides présents dans le *stratum corneum* (SC) et à leur organisation structurale, afin de mieux comprendre leurs propriétés physicochimiques et leur rôle de protection, notamment en ce qui concerne les échanges avec le milieu extérieur.

Contrairement à ce que laisse penser l'appellation « ciment », cette matrice lipidique n'est pas amorphe mais bien organisée. La diffraction des rayons X ainsi que la spectroscopie IR ont été utilisées pour évaluer et caractériser la présence de domaines cristallins^{55,56}. L'étude par diffraction des rayons X a révélé deux phases lamellaires : une de périodicité 6,4 nm et une seconde de périodicité 13,4 nm⁵⁷. Au sein de ces lamelles, les lipides présentent majoritairement une organisation orthorhombique⁵⁸. Le SC, et plus précisément la matrice lipidique intercellulaire qui le constitue est encore aujourd'hui l'objet de nombreuses investigations⁵⁹. De nombreuses informations manquent notamment sur la composition et la taille de ces domaines.

Au cours de ce travail, nous avons étudié par microspectroscopie Raman la distribution des lipides dans des mélanges équimolaires de céramides, acide palmitique et cholestérol (reproduisant les structures des mélanges de lipides extraits du SC).

Stratégie analytique : étude préalable du mélange binaire céramide/cholestérol

Les spectres Raman des mélanges céramides (Cer), cholestérol (Chol) sont complexes en raison du chevauchement des bandes Raman des deux composés. Aussi, pour séparer les contributions des céramides et du cholestérol dans la région de la vibration d'étirement C-H (ν_{C-H}), nous avons préparé des mélanges binaires et effectué une courbe d'étalonnage (Figure 20). Pour suivre individuellement l'acide palmitique, nous avons utilisé un acide gras perdeutérié.

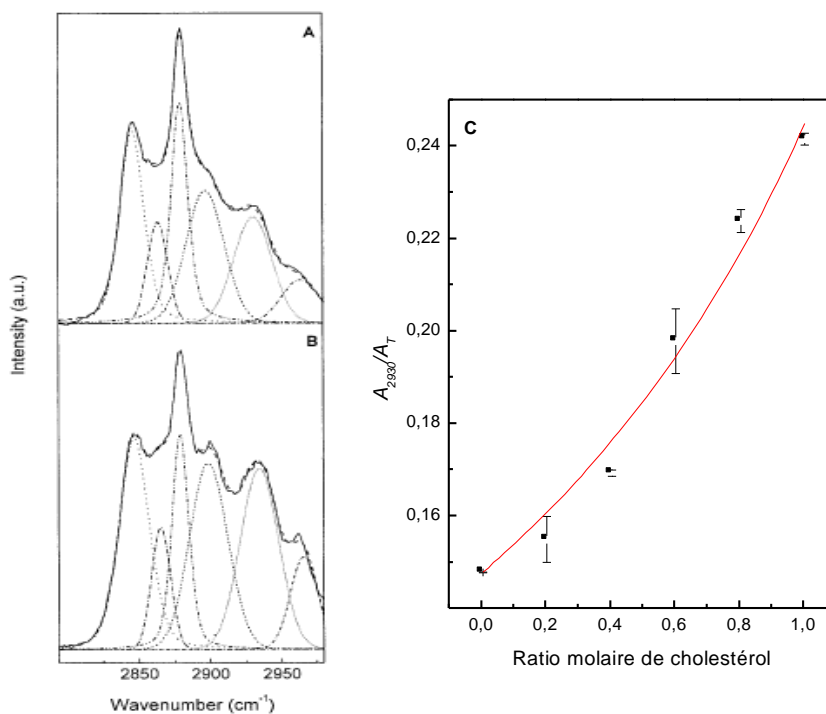


Figure 20 : Etude Raman, dans la région CH, du mélange hydraté Cer-Chol-PA-d31⁶⁰. Les spectres expérimentaux (en trait plein) et simulés (en pointillés) ont été enregistrés dans des domaines riches en céramide (A) ou en cholestérol (B). La courbe d'étalonnage de la teneur en cholestérol a été établie sur des mélanges binaires anhydres Cer-Chol (C). A_{2930}/A_T représente le rapport de l'aire de la bande simulée autour de 2930 cm^{-1} sur la surface totale de la région C-H.

Organisation du mélange ternaire céramide / cholestérol / acide palmitique

La préparation d'un mélange équimolaire de céramides, d'acide palmitique et de cholestérol reproduisant les structures observées pour les mélanges de lipides extraits du SC implique l'incubation du mélange hydraté (dans du D_2O), à $80^\circ C$ (3×10 min) puis à $36^\circ C$ (1h). L'échantillon est alors cartographié à température ambiante par spectroscopie Raman, à 514 nm , dans une cellule fermée assurant le maintien de l'hydratation.

Pour étudier la distribution spatiale de chaque composant dans l'échantillon, une analyse systématique et objective des spectres Raman a été menée. Tout d'abord, des images chimiques ont été obtenues par intégration des surfaces de trois régions du spectre caractéristiques : i) la région $2780\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ qui est associée au C-H du cholestérol et des céramides (carte C-H), ii) la surface du pic à 2930 cm^{-1} tel qu'obtenu par la procédure d'ajustement de la courbe dans la région C-H, qui a été utilisée pour quantifier la teneur en cholestérol, iii) la région $2015\text{-}2250\text{ cm}^{-1}$ qui est associée au C-D du PA-d31⁶⁰.

Les fractions molaires de cholestérol, céramides et acide palmitique ont donc pu être calculées pour chaque pixel. Trois cartes correspondant aux fractions molaires de chaque lipide ont été obtenues. Pour chacun des trois composants, les cartes ont montré la présence de domaines enrichis ou appauvris en un type de lipide. Ces 3 cartes sont superposées sur la Figure 21.

Les domaines ont été colorés en fonction de leur composant principal et les régions sans composant dominant ont été laissées en noir. On observe plusieurs domaines enrichis en cholestérol, en

céramides ou en acide palmitique, ce qui illustre bien une séparation de phase suite à l'incubation (le mélange équimolaire non incubé présente une carte parfaitement homogène)⁶⁰.

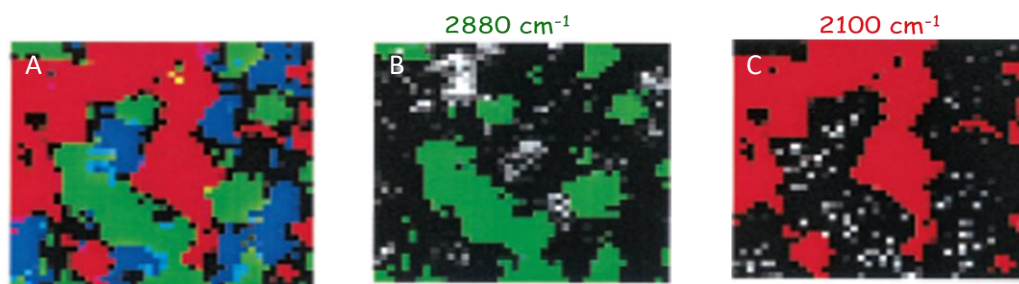


Figure 21 : Superposition des domaines riches en cholestérol (bleu), céramides (vert) et acide palmitique (rouge) (A). Superposition des valeurs de largeur de la bande à 2880 cm^{-1} et des domaines riches en céramides (B) et des valeurs de largeur de la bande à 2100 cm^{-1} avec les domaines riches en acide palmitique (C). La largeur des bandes 2880 et 2100 cm^{-1} est affichée en utilisant une échelle de gris de 14 à 16 cm^{-1} et de 17 à 20 cm^{-1} , respectivement⁶⁰.

Comme il est bien établi que les modes d'étirement CH_2 et CD_2 peuvent être utilisés pour mesurer le degré d'ordre de la chaîne alkyle, le désordre des chaînes C-H et C-D a été estimé en mesurant la largeur des bandes à 2880 et 2100 cm^{-1} ⁶¹⁻⁶⁵. Ces cartes montrent l'existence de domaines cristallins entourés d'une matrice lipidique fluide (Figure 21 B et C). La taille moyenne de ces domaines est de $27\text{ }\mu\text{m}^2$ pour les céramides, $22\text{ }\mu\text{m}^2$ pour le cholestérol et $65\text{ }\mu\text{m}^2$ pour l'acide palmitique⁶⁰. La présence de ces microcristallites serait à l'origine de la très faible perméabilité de la peau.

1.3.2 Vectorisation d'acides nucléiques par des lipides cationiques

Ce projet porte sur la vectorisation d'ADN dans des cellules par des liposomes cationiques. Ces travaux à l'interface de la physique, de la chimie et de la biologie vont de la compréhension du mécanisme au développement de nouveaux vecteurs d'ADN. Ceux-ci sont utilisables dans des domaines variés tels que la thérapie génique, le développement d'organismes génétiquement modifiés et la vaccination, qui nécessitent tous le transport d'un ADN d'intérêt intact dans une cellule.

Les liposomes cationiques apparaissent comme une alternative prometteuse face aux vecteurs viraux, plus efficaces mais dont l'utilisation présente des risques⁶⁶. Par l'intermédiaire de leurs charges positives, les lipides cationiques forment des complexes avec l'ADN chargé négativement et facilitent ainsi son passage à travers les barrières cellulaires.

Au cours de ce travail, notre but est de caractériser les transporteurs, d'optimiser le transfert cellulaire et de comprendre les mécanismes impliqués lors de la transfection, sur un modèle expérimental de mélanome. Nous nous intéresserons particulièrement à la relation entre la structure des complexes lipides/ADN et l'efficacité de la transfection.

Lipides cationiques utilisés

Une famille de lipides cationiques à base de cholestérol a été conçue au laboratoire. Ces lipides cationiques possèdent une tête polaire triméthylée ou triéthylée (plus hydrophobe) avec un espaceur de 2 ou 3 carbones entre la tête polaire et le groupement carbamoylé (groupement biodégradable influençant l'efficacité de la transfection⁶⁷). Nous nous intéresserons en particulier au

diméthyl hydroxyéthyl aminopropane carbamoyl cholestérol (DMHAPC-Chol), qui présente une tête polaire plus hydrophile (*via* un groupement hydroxyéthyle), ainsi qu'un espaceur de 3C. Ces lipides seront associés à un co-lipide zwitterionique, la dioléoylphosphatidylethanolamine (DOPE) pour former des liposomes^{67,68}. Ce co-lipide assure le double rôle d'aider les lipides cationiques à former des liposomes et de déstabiliser le complexe pour libérer l'ADN dans le cytosol^{69,70}.

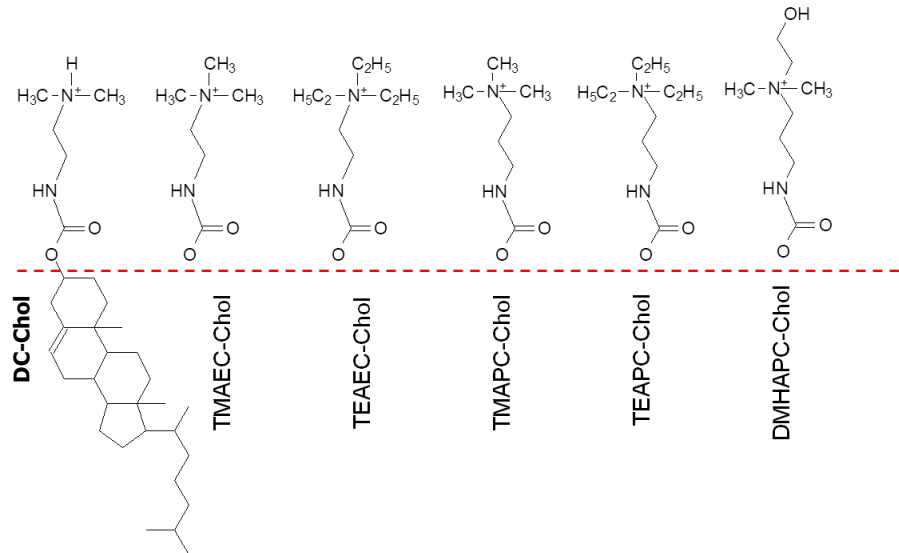


Figure 22 : Lipides cationiques utilisés, le diméthyl aminoéthane carbamoyl cholestérol (DC-Chol), le triméthylaminoéthane carbamoyl cholestérol iodure (TMAEC-Chol), le triméthylaminopropane-carbamoyl cholestérol iodure (TMAPC-Chol), le triéthylaminoéthane-carbamoyl cholestérol (TEAEC-Chol) et le triéthylaminopropane-carbamoyl iodure de cholestérol (TEAPC-Chol) DMHAPC-Chol (3-β[N-(N',N'-diméthyl N'-hydroxyéthyl aminopropane) carbamoyl] cholestérol iodure)

Mécanisme de transfection cellulaire des liposomes cationiques

Afin d'optimiser le transport du plasmide de l'extérieur de la cellule jusqu'au noyau, il est important de connaître les mécanismes d'internalisation. Le transport des plasmides utilisés a préalablement été étudié par microscopie électronique et a indiqué le passage des complexes ADN-liposomes à travers la membrane cellulaire par endocytose, internalisation dans les endosomes, et libération dans le cytosol. Il semble que la membrane du compartiment endosomal ait été déstabilisée, permettant la libération de l'ADN des complexes et ensuite l'entrée de l'ADN dans le cytosol. L'étape de déstabilisation de la membrane endosomale est donc une étape importante⁷¹.

Caractérisation des liposomes et des complexes lipide/ADN

La formation des complexes lipide/ADN est assurée par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques entre les charges négatives des acides nucléiques (groupements phosphate) et les charges positives des lipides cationiques (tête polaire). Le ratio lipide/ADN est un paramètre important qui influence la géométrie des complexes, ainsi que leur charge globale. Ces deux paramètres (charge et taille du complexe) modifient beaucoup les propriétés de transfection des différents complexes. Le rendement de complexation de l'ADN est mesuré par électrophorèse (retard sur gel) et permet de déterminer le rapport pour lequel la totalité de l'ADN ajouté est complexée. Les liposomes, ainsi que les complexes sont caractérisés par diverses techniques physiques telles que la diffusion de la lumière et la microscopie électronique.

D'un point de vue structural, les complexes ont des géométries très hétérogènes et résultent de l'agrégation de plusieurs vésicules par l'intermédiaire de l'ADN. La taille et la structure des complexes préparés ont été explorées par microscopie électronique. Pour un ratio lipide/ADN de 1,5 correspondant à la neutralité, on obtient de gros agrégats (de l'ordre de 400x800 nm) dans lesquels on peut discerner les liposomes. Le marquage à l'or est utilisé pour détecter les plasmides dans ces structures. Comme attendu, les plasmides sont dans les zones de bordures des sous-structures (correspondant aux liposomes) que l'on peut distinguer dans les agrégats.

En plus de la structure des lipides et de la charge des complexes, l'effet de la lyophilisation et de cycles de gel/dégel sur les complexes formés a aussi été évalué. En effet, ce traitement préalable influence la quantité d'ADN fixé, ainsi que la géométrie des complexes, ces derniers étant de gros agrégats à peu près sphériques avec des diamètres compris entre 1 et 2 μm .

Efficacité de la transfection :

Dans un premier temps, l'efficacité de la transfection a été mesurée *in vitro* en vectorisant un plasmide galactosidase et en mesurant la luminescence produite par les cellules après 24h. L'efficacité mesurée pour les liposomes lyophilisés ou ayant subi des cycles de gel/dégel est bien supérieure à celle des complexes n'ayant pas subi ce traitement (Figure 23). Elle est comparable à celle mesurée pour des vecteurs commerciaux (Transfast de Promega et DMRIE-C de Invitrogen)⁷².

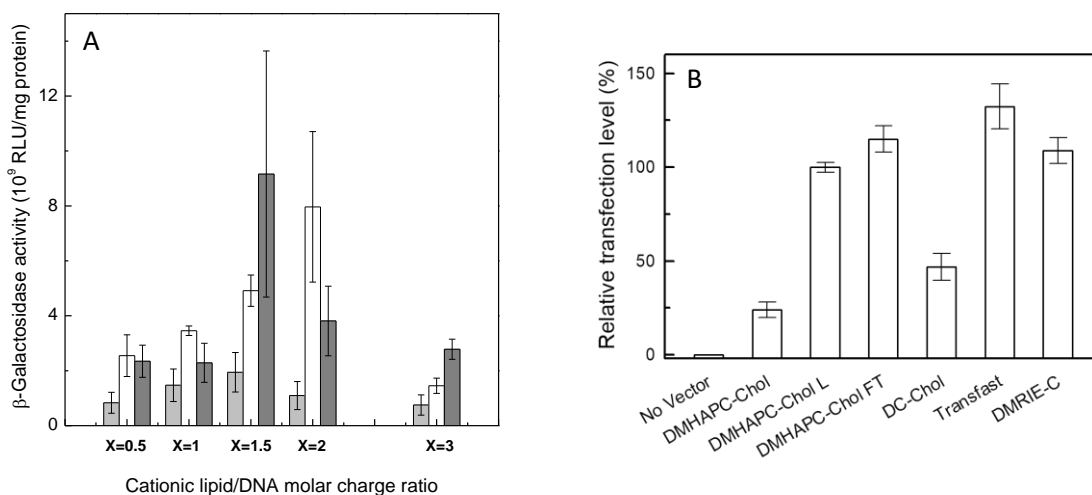


Figure 23 : Niveau de transfection dans les cellules B16-F10 du plasmide de la galactosidase vectorisé par des liposomes cationiques. Dans chaque cas 0,5 μg d'ADN plasmidique pCMV-gal contenant le gène de la galactosidase a été complexé avec le liposome et chaque résultat représente la moyenne \pm l'écart type de trois expériences⁷². A gauche, le liposome utilisé est le DMHAPC-Chol/DOPE et l'activité est donnée pour le complexe non traité (gris clair), lyophilisé et réhydraté (blanc) ou congelé et décongelé (gris foncé). A droite, les labels L et FT indiquent respectivement une lyophilisation ou un cycle gel/dégel.

Dans un deuxième temps, l'efficacité de la transfection a été testée *in vivo* dans des tumeurs B16 induites par injection sous cutanée chez la souris NUDE, avec un ratio molaire lipide /ADN de 0.5.

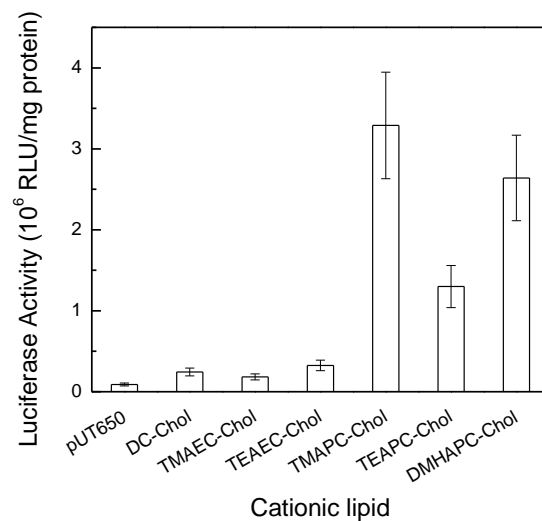


Figure 24 : Niveau de transfection après administration intratumorale dans des tumeurs B16-F10 par des liposomes préparés à partir de DMHAPC-Chol/DOPE et d'autres lipides de la même série dérivés du cholestérol. Toutes les formulations ont été préparées avec du DOPE en proportion équimolaire. Quinze microgrammes de plasmides pUT650 ont été complexés avec des liposomes cationiques lipide/DOPE (1/1) à des rapports de charge molaire lipide/ADN $X = 0,5$ dans de l'eau (75 μ l final) et injectés directement dans les tumeurs de mélanome. Les tumeurs ont été retirées 24 heures après l'injection et l'activité de la luciférase a été évaluée. Les barres d'erreur correspondent à la moyenne \pm écart type de six tumeurs⁷².

Alors que DC-Chol et les 2 autres lipides courts (TMAEC-Chol et TEAEC-Chol) donnent de faibles niveaux de transfection *in vivo*, TEAPC-Chol, TMAPC-Chol et DMHAPC-Chol, avec l'espaceur 3C, multiplient respectivement par 10, 30 et 25 le niveau de transfection par rapport au contrôle (Figure 24). La longueur de l'espaceur influence l'hydratation de la tête polaire, en lien avec la présence de plasmide aux interfaces entre liposomes. Le meilleur résultat est obtenu avec TMAPC-Chol qui a la tête polaire la plus hydrophobe (groupement triéthyle), ce qui peut favoriser la destabilisation de la membrane endosomale. L'hydrophilicité particulière de DMHAPC-Chol n'améliore pas la transfection.

Les étapes de congélation préalables améliorent clairement la transfection. L'organisation de la DOPE suite aux différents traitements (et aux différents états d'hydratation) a été investiguée par RMN ³¹P, et a montré l'existence du DOPE en phase hexagonale inversée, organisation favorable à la destabilisation de la membrane endosomale et donc à la libération de l'ADN dans le cytosol. La lyophilisation et la congélation-décongélation des complexes ADN/liposomes sans utiliser de cryoprotecteurs ont considérablement amélioré leur capacité à délivrer de l'ADN dans les cellules. Cette mise en forme est très avantageuse pour leur conservation et leur utilisation.

2 - Système polymère/peptide pour l'immobilisation de vésicules lipidiques

L'immobilisation sur des supports solides de biomolécules telles que des protéines et des lipides présente de nombreuses applications telles que : séparation, diagnostic, thérapies, régénération de tissus ou mise en œuvre de réacteurs biologiques ⁷³. Ces combinaisons « hybrides » de matériaux synthétiques et naturels apportent des fonctionnalités inédites à ces matériaux complexes.

Il existe déjà de nombreux systèmes fonctionnels dans la littérature. La plupart nécessitent au préalable une modification chimique des lipides ou du support solide, conduisent à une immobilisation peu stable ou sont longs à mettre en œuvre. Au cours de ce travail, nous avons donc cherché à mettre au point des supports solides présentant les caractéristiques suivantes :

- immobilisation rapide et simple des liposomes
- conservation de l'imperméabilité des liposomes. Leur intégrité ne doit pas être perturbée lors de l'interaction avec le support solide, afin que l'on puisse immobiliser des liposomes « intacts » (avec un volume encapsulé à l'intérieur), voire des cellules
- stabilité de l'immobilisation pour pouvoir résister à l'élution par de grandes quantités de tampon (applications chromatographiques), à des étapes de centrifugation et à la pression
- insolubilité dans des solvants des lipides tels que l'éthanol, afin que l'on puisse laver et réutiliser le système pour immobiliser de nouveaux liposomes
- polyvalence du système, pour permettre l'immobilisation de plusieurs types de lipides
- biocompatibilité du support, et non dénaturation des protéines (applications en enzymologie).

Au cours de ce travail, nous avons fait le choix de développer des systèmes ayant pour point commun d'impliquer une ancre peptidique entre le support et les vésicules lipidiques. Nous utiliserons deux types de peptides faisant intervenir des interactions différentes entre les lipides et le peptide. Ces peptides seront couplés de façon covalente à des supports polymères de nature différente.

Des vésicules lipidiques constituées de palmitoyloléoylphosphocholine (POPC) et de palmitoyloléoylphosphoglycérol (POPG) seront immobilisées sur les supports développés. Ces deux phospholipides se retrouvent en grande quantité dans les membranes cellulaires animales et bactériennes et joueront le rôle de cellules modèles. La charge de la membrane sera modulée en variant la proportion de POPC (globalement neutre) et de POPG (chargé négativement).

2.1 Développement d'un système polymère-polypeptide amphiphile

Lors de ce projet, nous avons choisi d'utiliser un peptide amphiphile pour jouer le rôle d'ancre entre le support solide et la vésicule lipidique.

L'interaction entre le support et la vésicule implique des interactions électrostatiques et hydrophobes. La première étape dans ce travail a consisté à mettre au point un peptide amphiphile le plus simple possible, capable d'interagir spontanément et fortement avec les vésicules, sans perturber leur perméabilité. Afin que le peptide perturbe le moins possible les membranes et que l'insertion soit la plus stable possible, nous avons choisi la séquence d'acide aminés afin d'avoir un peptide hélicoïdal et transmembranaire. Nous nous sommes inspirés de peptides existant déjà dans la nature et possédant ces caractéristiques ⁷⁴. Nous avons choisi une séquence primaire amphiphile,

et nous avons ainsi conçu quatre peptides avec des modifications systématiques de la séquence (Figure 25).

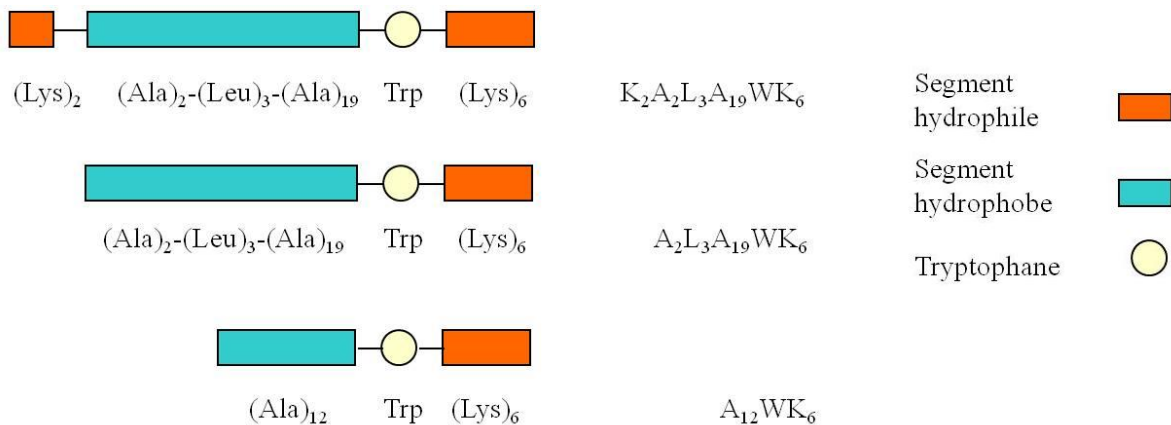


Figure 25 : Représentation schématique des structures primaires de trois des quatre peptides synthétisés

Les peptides choisis possèdent tous un segment hydrophile constitué par des lysines (Lys, K) et un segment hydrophobe constitué par des alanines (Ala, A). La longueur du segment hydrophobe a été choisie en fonction de l'épaisseur hydrophobe d'une bicouche lipidique classique (26 Angstrom pour une bicouche à base de POPC ⁷⁵), en supposant que le segment hydrophobe adopte une conformation en hélice α . Un peptide plus court sera aussi synthétisé: A₁₂WK₆. Son segment hydrophobe a une longueur à peu près équivalente à l'épaisseur hydrophobe d'une couche de lipide. Pour K₆WA₁₉L₃A₂K₂ et K₂A₂L₃A₁₉WK₆, le segment hydrophobe est terminé à chaque extrémité par un segment hydrophile, dans le but de stabiliser l'insertion au cas où le peptide s'insérerait dans la bicouche perpendiculairement au plan de la membrane. Ces deux peptides possèdent la même séquence d'acides aminés avec inversion des extrémités COOH et NH₂, afin de déterminer l'influence du sens du peptide sur son immobilisation sur un support solide. Les structures secondaires, ainsi que l'affinité pour des vésicules lipidiques des quatre peptides synthétisés sont déterminées. Leur influence sur la perméabilité des membranes est aussi estimée. Le peptide présentant les propriétés les plus appropriées comme ancre de vésicules est ainsi identifié.

Les méthodes utilisées pour la caractérisation des peptides sont :

- La fluorescence intrinsèque du tryptophane (Trp, W), pour suivre la liaison du peptide avec les vésicules lipidiques : lors du passage du milieu aqueux polaire au milieu hydrophobe des chaînes acyles des lipides, on observe un changement du maximum d'émission du tryptophane qui nous permettra d'établir les isothermes d'adsorption peptide/lipide
- L'encapsulation à haute concentration d'un composé fluorescent, la calcéïne, pour caractériser l'intégrité des liposomes lors de l'interaction avec le peptide
- Le dichroïsme circulaire pour caractériser la conformation des peptides en présence et en absence de liposomes

Les principaux résultats que nous avons obtenus peuvent être résumés de la manière suivante :

- Nous avons montré que la présence d'un segment hydrophobe de 24 acides aminés (AA) augmente l'affinité du peptide pour les lipides zwitterioniques,

- En utilisant la technique de dichroïsme circulaire, nous avons montré que les peptides longs sont à 50% sous forme d'hélice, alors que les courts ne le sont qu'à 25%,
- L'interaction du peptide avec la tête polaire du lipide étant essentiellement de nature électrostatique, la présence de résidus lysine est indispensable pour favoriser l'interaction,
- La présence de résidus chargés aux 2 extrémités du peptide empêche l'insertion spontanée du peptide dans la bicouche lipidique
- La direction du peptide n'a pas d'influence sur l'interaction
- Aucun des peptides synthétisés ne perturbe la perméabilité des membranes lipidiques testées, jusqu'à un ratio d'incubation lipide/peptide de 0,5 (mol/mol).

Finalement, ce travail nous a permis d'identifier le peptide $A_2L_3A_{19}WK_6$ comme étant capable d'interagir spontanément et fortement avec des vésicules lipidiques sans perturber leur perméabilité. Ce peptide a donc été synthétisé en phase solide sur une résine de synthèse peptidique classique, à base de polystyrène (PS) réticulé par du divinylbenzène. Le système polymère/peptide obtenu est alors directement utilisé pour immobiliser des vésicules lipidiques⁷⁶.

L'affinité du système pour des vésicules ainsi que l'influence de l'immobilisation sur leur perméabilité sont déterminées en utilisant les techniques précédemment décrites.

Ce système polymère/peptide amphiphile/vésicules lipidiques permet d'immobiliser des lipides jusqu'à 200 $\mu\text{mol/g}$ résine sèche, tout en maintenant l'intégrité des vésicules. Nous l'avons utilisé pour immobiliser l'enzyme membranaire γ -glutamyl transpeptidase. L'activité de l'enzyme est mesurée par le relargage de p-nitroaniline. Après 8 cycles, 50% de l'activité de l'enzyme est maintenue, soulignant la forte immobilisation de l'enzyme dans sa forme active. Le système polymère-peptide peut être facilement régénéré et réutilisé par un simple lavage à l'éthanol. Le support fonctionnalisé, à base d'une résine polystyrène, est suffisamment stable pour subir plusieurs cycles d'activité⁷⁷.

2.2 Synthèse d'un polymère réticulé thermosensible

Nous avons choisi comme matrice polymère le poly-[N-isopropylacrylamide] (PNIPAM). En effet, le principal domaine d'application du PNIPAM est celui du vivant et de la recherche biomédicale : les chercheurs ont rapidement réalisé l'intérêt que représentait sa transition réversible, à une température proche de celle du corps humain. De plus, ce polymère a une structure chimique intéressante car il possède à la fois des groupements hydrophiles amides et des groupements hydrophobes isopropyliques. Les principales applications concernent la mise au point de tests immunologiques (notamment la précipitation et la séparation), l'administration de médicaments (*drug delivery*), la réparation tissulaire et le développement de biosenseurs⁷⁸. Toutes ces applications nécessitent une bonne connaissance de la transition subie par le polymère ainsi que la conjugaison avec toutes sortes de biomolécules, telles que des protéines.

La partie protéique, jouant le rôle d'ancre, sera un homopolypeptide constitué d'un acide aminé chargé positivement, la Lysine. Les interactions liposome-polymère, pour le recouvrement et l'immobilisation des vésicules lipidiques font l'objet de nombreuses études⁷⁹. Elles ont notamment montré que l'enrobage des liposomes par la polylysine (PLL) les stabilise lors de l'adsorption des vésicules sur des surfaces chargées.

Cependant, la complexation entre un polyélectrolyte et une particule colloïdale chargée de signe opposé reste complexe et dépend de nombreux paramètres, dont la densité de charge du polyion et de la surface de la particule, la force ionique et la flexibilité du squelette du polyélectrolyte. Pour ce projet, nous avons donc choisi d'utiliser un polyélectrolyte linéaire, flexible et chargé positivement, la polylysine (PLL), pour immobiliser des liposomes chargés négativement (15%) sans perturber leur perméabilité.

Détermination et compréhension de la température de transition du polyN isopropylacrylamide

Les polymères linéaires et réticulés à base de N-isopropylacrylamide (NIPAAm) présentent des propriétés thermiques inhabituelles. En effet, les solutions aqueuses de poly-[N isopropylacrylamide] (PNIPAAm) subissent une séparation de phase et les hydrogels apparentés une transition de gonflement/rétraction lorsqu'ils sont chauffés au-dessus de la température critique inférieure de la solution (Lower Critical Solution Temperature, LCST) - Figure 26.

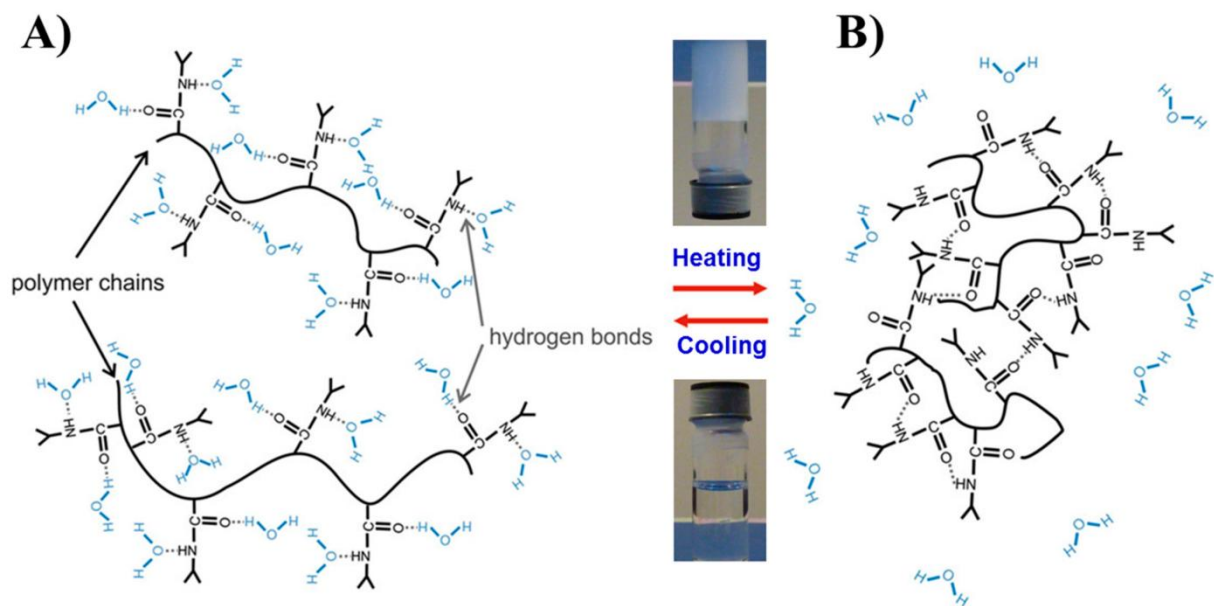


Figure 26 : Représentations de (A) le PNIPAAm en solution aqueuse au-dessous de T_c (32 °C) et (B) le PNIPAAm déshydraté et rétracté au-dessus de T_c (32 °C). Adapté de la Référence ⁸⁰.

Lors de ce projet, un copolymère linéaire composé de NIPAAm/acryloxysuccinimide (PNIPAS) (98/2 mol/mol) et deux hydrogels avec des hydrophilicités différentes ont été préparés. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a été utilisée pour déterminer la température de la transition et améliorer notre compréhension des changements d'organisation des macromolécules qui l'accompagnent. La méthode de spectroscopie FTIR décrite ici a également permis de déterminer avec précision la température de transition pour les polymères linéaires et réticulés.

Deux marqueurs spectroscopiques sont suivis pour comprendre la transition et en mesurer la température :

- Le déplacement des bandes de vibrations associées aux modes d'étirement antisymétriques et symétriques de la liaison CH (ν_{CH}) est une sonde efficace pour suivre les changements d'organisation des chaînes alkyles avec la température car ces modes sont sensibles aux changements d'environnement et de conformation. Dans le cas du PNIPAS, ces bandes associées à la fois aux groupes latéraux et au squelette du polymère subissent un déplacement de leurs

maxima. Le déplacement abrupt vers des fréquences plus basses est principalement interprété comme une augmentation de l'ordre conformationnel pendant la transition.

- Les bandes de vibration amides I et II, associées aux groupes amides du PNIPAS, sont aussi sensibles à la précipitation se produisant à la LCST. Comme la bande amide I semble avoir été plus affectée par la transition et parce qu'elle implique principalement l'étirement du carbonyle, qui est sensible à la liaison hydrogène, nous avons concentré notre attention sur cette bande. Tous les spectres enregistrés à différentes températures ont été simulés avec trois composantes dont les fréquences, les largeurs et les formes de bande étaient libres de varier. Ces trois composantes sont associées aux groupements carbonyles fortement impliqués dans une liaison hydrogène (1629 cm^{-1} , attribuée aux interactions intermoléculaires entre les chaînes de polymère et les molécules d'eau), aux liaisons hydrogène intramoléculaires plus faibles (1655 cm^{-1}) ainsi qu'aux carbonyles libres (1678 cm^{-1}).

Nous avons effectué un suivi spectroscopique en fonction de la température. En dessous de la LCST, la plupart des groupes carbonyles (environ 90 %) sont impliqués dans des liaisons hydrogène avec l'eau. Au dessus de la LCST, environ 20 % des liaisons hydrogène entre le polymère et les molécules d'eau sont remplacées par des liaisons intrapolymères.

Avec cette méthode, nous avons pu montrer que le PNIPAS existe sous forme de pelotes flexibles et désordonnées dans un environnement aqueux au-dessous de la LCST et s'organise sous forme d'agrégats ordonnés au-dessus de la LCST, avec la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires et une réorganisation du squelette polymérique.

De plus, cette méthode spectroscopique permet de déterminer avec précision la température de transition, dans le cas de polymères en solution mais aussi pour des hydrogels, ce qui remplace avantageusement les méthodes existantes.

Copolymérisation et réticulation

Dans une première étape, nous avons copolymérisé le NIPAAm avec des ratios différents de N acryloxysuccinimide (NAS), la fonction succinimide permettant par la suite l'accrochage du peptide polylysine qui servira à immobiliser les vésicules lipidiques dans l'hydrogel (Figure 27).

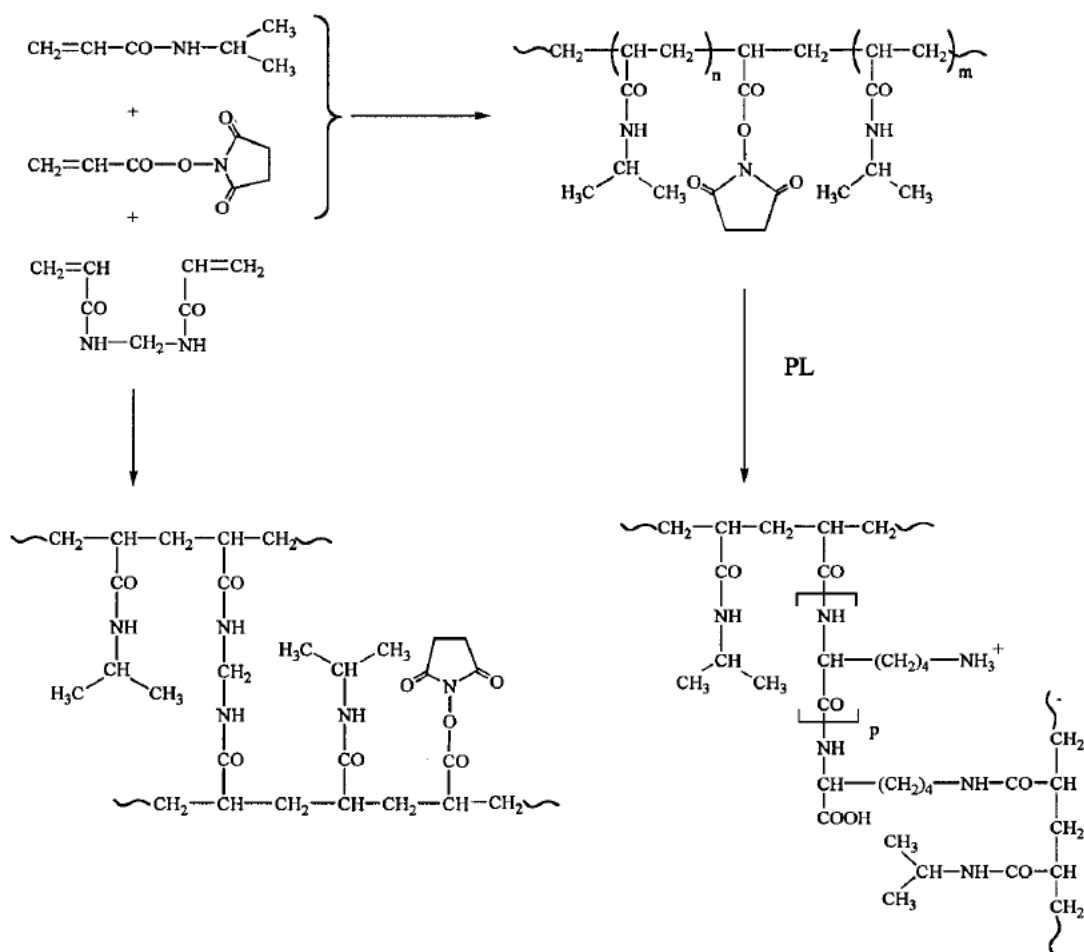


Figure 27 : Synthèse du copolymère linéaire (PNIPAS) et des hydrogels réticulés par de la polylysine⁸¹.

Le pourcentage de NAS présent est déterminé, ainsi que la masse molaire des copolymères, la polydispersité et la température de transition associée.

Copolymère	NAS (%mol)	Rendement (%)	Mn (g/mol)	Mw/Mn	LCST (°C)
PNIPAS4	4	81	12000	3.2	33.5
PNIPAS6	6	73	32000	2.5	34.1

Tableau 5 : caractéristiques des copolymères préparés

Dans une deuxième étape, les polymères obtenus ont été réticulés par 2 familles de polylysine présentant 2 longueurs différentes (DP=19, PLs; DP=288, PLI) avec des ratios différents de N-acryloylsuccinimide (NAS), c'est-à-dire plus ou moins de points d'ancrage (Figure 27).

Les différents hydrogels synthétisés sont caractérisés quant à la quantité de polylysine (PL) accrochée de façon covalente, le taux de gonflement (Swelling ratio, SR), l'interaction avec les vésicules lipidiques (quantité de lipides immobilisés) et leur intégrité via l'extinction (quenching, Q) de la sulforhodamine (SRB).

Comme attendu, le gonflement est plus important pour les gels contenant le plus de PL. Le gel permettant d'immobiliser la plus grande quantité de lipides est l'hydrogel réticulé avec les longues chaînes de polylysine. Il permet d'immobiliser 1000 ± 100 mmol/ g_{gel sec} de liposomes POPC/POPG (85/15). Les vésicules lipidiques sont de plus immobilisées avec une bonne intégrité (93%). Les

interactions sont majoritairement de nature électrostatique et impliquent l'immobilisation de vésicules lipidiques chargées négativement (à 15%). Grâce à la méthode spectroscopique mise au point, la LCST au sein du polymère réticulé (de l'hydrogel) a pu être déterminée.

Application de relargage contrôlé en fonction de la température :

L'hydrogel a été préalablement chargé en liposomes encapsulant une solution concentrée de fluorophore et utilisé pour remplir une colonne d'élution thermostatée. Sous élution à température ambiante, le système est stable (pas de libération du fluorophore). Après augmentation de la température à 50°C (au dessus de la LCST de l'hydrogel), on observe un relargage du composé encapsulé dans les vésicules, sans relargage de lipides. Suite à l'augmentation de la température, le gel se contracte et perturbe les vésicules lipidiques immobilisées, qui libèrent leur contenu.

L'hydrogel préparé peut donc être utilisé pour des applications de relargage contrôlé en fonction de la température.

Bibliographie

- (1) Bunsell, A. R. *Handbook of Tensile Properties of Textile and Technical Fibres - 1st Edition*, Woodhead Publishing limited.; 2009.
- (2) Gosline, J. M.; Guerette, P. A.; Ortlepp, C. S.; Savage, K. N. The Mechanical Design of Spider Silks: From Fibroin Sequence to Mechanical Function. *J. Exp. Biol.* **1999**, *202* (23), 3295–3303. <https://doi.org/10.1242/jeb.202.23.3295>.
- (3) Gosline, J.; Lillie, M.; Carrington, E.; Guerette, P.; Ortlepp, C.; Savage, K. Elastic Proteins: Biological Roles and Mechanical Properties. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2002**, *357* (1418), 121–132. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.1022>.
- (4) Gordon, J. E. *The Science of Structures and Materials*; Scientific American Book, 1988.
- (5) Paquin, R.; Colomban, P. Nanomechanics of Single Keratin Fibres: A Raman Study of the α -Helix \rightarrow β -Sheet Transition and the Effect of Water. *J. Raman Spectrosc.* **2007**, *38* (5), 504–514. <https://doi.org/10.1002/jrs.1672>.
- (6) Pérez-Rigueiro, J.; Viney, C.; Llorca, J.; Elices, M. Mechanical Properties of Single-Brin Silkworm Silk. *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *75* (10), 1270–1277. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(20000307\)75:10<1270::AID-APP8>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(20000307)75:10<1270::AID-APP8>3.0.CO;2-C).
- (7) Zhao, H.-P.; Feng, X.-Q.; Shi, H.-J. Variability in Mechanical Properties of Bombyx Mori Silk. *Mater. Sci. Eng. C* **2007**, *27* (4), 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.06.031>.
- (8) Kawahara, Y.; Shioya, M.; Takaku, A. Mechanical Properties of Silk Fibers Treated with Methacrylamide. *J. Appl. Polym. Sci.* **1996**, *61* (8), 1359–1364. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19960822\)61:8<1359::AID-APP17>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19960822)61:8<1359::AID-APP17>3.0.CO;2-U).
- (9) Asrar, J.; Hill, J. Biosynthetic Processes for Linear Polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, *83*, 457–483. <https://doi.org/10.1002/app.2253>.
- (10) Sirichaisit, J.; Brookes, V. L.; Young, R. J.; Vollrath, F. Analysis of Structure/Property Relationships in Silkworm (*Bombyx Mori*) and Spider Dragline (*Nephila Edulis*) Silks Using Raman Spectroscopy. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (2), 387–394. <https://doi.org/10.1021/bm0256956>.

- (11) Vollrath, F.; Madsen, B.; Shao, Z. The Effect of Spinning Conditions on the Mechanics of a Spider's Dragline Silk. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2001**, *268* (1483), 2339–2346. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1590>.
- (12) Madsen, B.; Shao, Z. Z.; Vollrath, F. Variability in the Mechanical Properties of Spider Silks on Three Levels: Interspecific, Intraspecific and Intraindividual. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *24* (2–3), 301–306. [https://doi.org/10.1016/s0141-8130\(98\)00094-4](https://doi.org/10.1016/s0141-8130(98)00094-4).
- (13) Lawrence, B. A.; Vierra, C. A.; Moore, A. M. F. Molecular and Mechanical Properties of Major Ampullate Silk of the Black Widow Spider, *Latrodectus Hesperus*. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (3), 689–695. <https://doi.org/10.1021/bm0342640>.
- (14) Madsen, B.; Vollrath, F. Mechanics and Morphology of Silk Drawn from Anesthetized Spiders. *Naturwissenschaften* **2000**, *87* (3), 148–153. <https://doi.org/10.1007/s001140050694>.
- (15) Swanson, B. O.; Blackledge, T. A.; Beltrán, J.; Hayashi, C. Y. Variation in the Material Properties of Spider Dragline Silk across Species. *Appl. Phys. A* **2006**, *82* (2), 213–218. <https://doi.org/10.1007/s00339-005-3427-6>.
- (16) Jin, H.-J.; Kaplan, D. L. Mechanism of Silk Processing in Insects and Spiders. *Nature* **2003**, *424* (6952), 1057–1061. <https://doi.org/10.1038/nature01809>.
- (17) Domènech, J; Tinti, A; Torreggiani, A. Biopolymer Research Trends. In *Biopolymer Research Trends*; Nova Science Publishers, Inc., 2007.
- (18) Pelton, J. T.; McLean, L. R. Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure. *Anal. Biochem.* **2000**, *277* (2), 167–176. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4320>.
- (19) Tatulian, S. A. Structural Characterization of Membrane Proteins and Peptides by FTIR and ATR-FTIR Spectroscopy. In *Lipid-Protein Interactions: Methods and Protocols*; Kleinschmidt, J. H., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2013; pp 177–218. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-275-9_9.
- (20) Colomban, P.; Herrera-Ramirez, J.-M.; Paquin, R.; Marcellan, A.; Bunsell, A. R. Micro-Raman Study of the Fatigue and Fracture Behaviour of Single PA66 Fibres. Comparison with Single PET and PP Fibres. *Eng. Fract. Mech.* **2006**, *73*, 2463–2475.
- (21) Colomban, P.; Dinh, M.; Tournié, A.; Jauzein, V. Origin of the Variability of the Mechanical Properties of Silk Fibres: 3. Order and Macromolecule Orientation in Bombyx Mori Bave, Hand-Stretched Strings and Nephila Madagascarensis Spider Fibres. *J. Raman Spectrosc.* **2012**, *43*, 1042–1048. <https://doi.org/10.1002/jrs.3122>.
- (22) Novak, A. Hydrogen Bonding in Solids Correlation of Spectroscopic and Crystallographic Data. In *Large Molecules; Structure and Bonding*; Springer: Berlin, Heidelberg, 1974; pp 177–216. <https://doi.org/10.1007/BFb0116438>.
- (23) Gruger, A.; Novak, A.; Régis, A.; Colomban, Ph. Infrared and Raman Study of Polyaniline Part II: Influence of Ortho Substituents on Hydrogen Bonding and UV/Vis—near-IR Electron Charge Transfer. *J. Mol. Struct.* **1994**, *328*, 153–167. [https://doi.org/10.1016/0022-2860\(94\)08368-1](https://doi.org/10.1016/0022-2860(94)08368-1).
- (24) Saravanan, D. Spider Silk - Structure, Properties and Spinning. *JTATM* **2006**, *5* (1), 1–20.
- (25) Tanaka, K.; Kajiyama, N.; Ishikura, K.; Waga, S.; Kikuchi, A.; Ohtomo, K.; Takagi, T.; Mizuno, S. Determination of the Site of Disulfide Linkage between Heavy and Light Chains of Silk Fibroin Produced by Bombyx Mori. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1432* (1), 92–103. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(99\)00088-6](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(99)00088-6).
- (26) Shimura, K. Chemical Composition and Biosynthesis of Silk Proteins. *Experientia* **1983**, *39* (5), 455–461. <https://doi.org/10.1007/BF01965160>.

- (27) Takei, F.; Kikuchi, Y.; Kikuchi, A.; Mizuno, S.; Shimura, K. Further Evidence for Importance of the Subunit Combination of Silk Fibroin in Its Efficient Secretion from the Posterior Silk Gland Cells. *J. Cell Biol.* **1987**, *105* (1), 175–180. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.1.175>.
- (28) Inoue, S.; Tanaka, K.; Arisaka, F.; Kimura, S.; Ohtomo, K.; Mizuno, S. Silk Fibroin of Bombyx Mori Is Secreted, Assembling a High Molecular Mass Elementary Unit Consisting of H-Chain, L-Chain, and P25, with a 6:6:1 Molar Ratio. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (51), 40517–40528. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006897200>.
- (29) Rousseau, M.-E.; Beaulieu, L.; Lefèvre, T.; Paradis, J.; Asakura, T.; Pézolet, M. Characterization by Raman Microspectroscopy of the Strain-Induced Conformational Transition in Fibroin Fibers from the Silkworm *Samia Cynthia Ricini*. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (9), 2512–2521. <https://doi.org/10.1021/bm060280w>.
- (30) Hu, X.; Kaplan, D.; Cebe, P. Dynamic Protein–Water Relationships during β -Sheet Formation. *Macromolecules* **2008**, *41* (11), 3939–3948. <https://doi.org/10.1021/ma071551d>.
- (31) Wojcieszak, M.; Gouadec, G.; Percot, A.; Colomban, P. Micromechanics of Fresh and 30-Year-Old *Nephila Inaurata Madagascariensis* Dragline Silk. *J. Mater. Sci.* **2017**, *52* (19), 11759–11773. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1320-2>.
- (32) Halary, J.-L.; Lauprêtre, F.; Monnerie, L. *Mécanique des matériaux polymères*; Echelles (Paris); Belin, 2008.
- (33) Sirichaisit, J.; Young, R. J.; Vollrath, F. Molecular Deformation in Spider Dragline Silk Subjected to Stress. *Polymer* **2000**, *41* (3), 1223–1227. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00293-1](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00293-1).
- (34) Marcellan, A. Microstructures, micromécanismes et comportement à rupture de fibres PA 66. phdthesis, École Nationale Supérieure des Mines de Paris, 2003. <https://pastel.archives-ouvertes.fr/tel-00353844> (accessed 2023-01-13).
- (35) Herrera Ramirez, J. M.; Colomban, P.; Bunsell, A. Micro-Raman Study of the Fatigue Fracture and Tensile Behaviour of Polyamide (PA 66) Fibres. *J. Raman Spectrosc.* **2004**, *35* (12), 1063–1072. <https://doi.org/10.1002/jrs.1255>.
- (36) Colomban, P.; Dinh, H. M.; Bunsell, A.; Mauchamp, B. Origin of the Variability of the Mechanical Properties of Silk Fibres: 1 - The Relationship between Disorder, Hydration and Stress/Strain Behaviour. *J. Raman Spectrosc.* **2012**, *43* (3), 425–432. <https://doi.org/10.1002/jrs.3044>.
- (37) Colomban, P.; Moukit, S.; Dinh, M.; Hassine, M.; Riand, J.; Mauchamp, B. Micro et Nanomécanique Des Fibres Naturelles (Animales). *Rev. Compos. Matér. Avancés* **2008**, *18* (2), 163–168. <https://doi.org/10.3166/rcma.18.163-168>.
- (38) Lefèvre, T.; Paquet-Mercier, F.; Lesage, S.; Rousseau, M.-E.; Bédard, S.; Pézolet, M. Study by Raman Spectromicroscopy of the Effect of Tensile Deformation on the Molecular Structure of Bombyx Mori Silk. *Vib. Spectrosc.* **2009**, *51* (1), 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2008.11.012>.
- (39) Prevorsek, D. C.; Harget, P. J.; Sharma, R. K.; Reimschuessel, A. C. Nylon 6 Fibers: Changes in Structure between Moderate and High Draw Ratios. *J. Macromol. Sci. Part B* **1973**, *8* (1–2), 127–156. <https://doi.org/10.1080/00222347308245797>.
- (40) McWhinnie, M. A. Gastrolith Growth and Calcium Shifts in the Freshwater Crayfish, *Orconectes Virilis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **1962**, *7* (1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(62\)90021-X](https://doi.org/10.1016/0010-406X(62)90021-X).
- (41) Travis, D. F. The Deposition of Skeletal Structures in the Crustacea. i. the Histology of the Gastrolith Skeletal Tissue Complex and the Gastrolith in the Crayfish, *Orconectes (Cambarus) Virilis* Hagen—Decapoda. *Biol. Bull.* **1960**, *118* (1), 137–149. <https://doi.org/10.2307/1539064>.

- (42) Travis, D. F. Structural Features of Mineralization from Tissue to Macromolecular Levels of Organization in the Decapod Crustacea. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1963**, *109* (1), 177-245.
- (43) Ueno, M. Calcium Transport in Crayfish Gastrolith Disc: Morphology of Gastrolith Disc and Ultrahistochemical Demonstration of Calcium. *J. Exp. Zool.* **1980**, *213* (2), 161–171. <https://doi.org/10.1002/jez.1402130202>.
- (44) Willig, A.; Keller, R. Molting Hormone Content, Cuticle Growth and Gastrolith Growth in the Molt Cycle of the Crayfish *Orconectes Limosus*. *J. Comp. Physiol.* **1973**, *86* (4), 377–388.
- (45) Le Gros Clark, W. E. *The Tissues of the Body*, 5th ed.; Oxford, Clarendon Press, 1965.
- (46) Addadi, L.; Raz, S.; Weiner, S. Taking Advantage of Disorder: Amorphous Calcium Carbonate and Its Roles in Biomineralization. *Adv. Mater.* **2003**, *15* (12), 959–970. <https://doi.org/10.1002/adma.200300381>.
- (47) Frizzell, D. L.; Exline, H. Crustacean Gastroliths from the Claiborne Eocene of Texas. *Micropaleontology* **1958**, *4* (3), 273–280. <https://doi.org/10.2307/1484286>.
- (48) Luquet, G.; Salomé, M.; Ziegler, A.; Paris, C.; Percot, A.; Dauphin, Y. High-Resolution Structural and Elemental Analyses of Calcium Storage Structures Synthesized by the Noble Crayfish *Astacus Astacus*. *J. Struct. Biol.* **2016**, *196* (2), 206–222. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.09.001>.
- (49) Thormann, E.; Mizuno, H.; Jansson, K.; Hedin, N.; Fernández, M. S.; Arias, J. L.; Rutland, M. W.; Pai, R. K.; Bergström, L. Embedded Proteins and Sacrificial Bonds Provide the Strong Adhesive Properties of Gastroliths. *Nanoscale* **2012**, *4* (13), 3910–3916. <https://doi.org/10.1039/C2NR30536D>.
- (50) Huber, J.; Fabritius, H.-O.; Griesshaber, E.; Ziegler, A. Function-Related Adaptations of Ultrastructure, Mineral Phase Distribution and Mechanical Properties in the Incisive Cuticle of Mandibles of *Porcellio Scaber* Latreille, 1804. *J. Struct. Biol.* **2014**, *188* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.09.002>.
- (51) Yang, H.; Yan, N. Transformation of Seafood Wastes into Chemicals and Materials. In *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*; Meyers, R. A., Ed.; Springer: New York, NY, 2018; pp 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2493-6_1012-1.
- (52) Percot, A.; Viton, C.; Domard, A. Optimization of Chitin Extraction from Shrimp Shells. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (1), 12–18. <https://doi.org/10.1021/bm025602k>.
- (53) Percot, A.; crepet, A.; Lucas, J. M.; Viton, C.; Domard, A. Optimization of Chitin Extraction and Characterization; *Advances in Chitine Science*; K.M. Vårum, A. Domard, O. Smidsrød, Norwegian University of Science and Technology: Trondheim, Norway, 2003; pp 89–92.
- (54) Percot, A.; Viton, C.; Domard, A. Characterization of Shrimp Shell Deproteinization. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (5), 1380–1385. <https://doi.org/10.1021/bm034115h>.
- (55) Ongpipattanakul, B.; Francoeur, M. L.; Potts, R. O. Polymorphism in Stratum Corneum Lipids. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1994**, *1190* (1), 115–122. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90040-X](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90040-X).
- (56) Bouwstra, J. A.; Thewalt, J.; Gooris, G. S.; Kitson, N. A Model Membrane Approach to the Epidermal Permeability Barrier: An X-Ray Diffraction Study. *Biochemistry* **1997**, *36* (25), 7717–7725. <https://doi.org/10.1021/bi9628127>.
- (57) Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Downing, D. T. Lipid Organization in Pig Stratum Corneum. *J. Lipid Res.* **1995**, *36* (4), 685–695. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)40054-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)40054-9).

- (58) Pilgram, G. S.; Engelsma-van Pelt, A. M.; Bouwstra, J. A.; Koerten, H. K. Electron Diffraction Provides New Information on Human Stratum Corneum Lipid Organization Studied in Relation to Depth and Temperature. *J. Invest. Dermatol.* **1999**, *113* (3), 403–409. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00706.x>.
- (59) Badhe, Y.; Schmitt, T.; Gupta, R.; Rai, B.; Neubert, R. H. H. Investigating the Nanostructure of the Stratum Corneum Lipid Matrix: A Combined Neutron Diffraction & Molecular Dynamics Simulations Approach. *ChemRxiv* 36. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2022-73wjn>.
- (60) Percot, A.; Lafleur, M. Direct Observation of Domains in Model Stratum Corneum Lipid Mixtures by Raman Microspectroscopy. *Biophys. J.* **2001**, *81* (4), 2144–2153.
- (61) Mendelsohn, R.; Koch, C. C. Deuterated Phospholipids as Raman Spectroscopic Probes of Membrane Structure. Phase Diagrams for the Dipalmitoyl Phosphatidylcholine (and Its D62 Derivative)-Dipalmitoyl Phosphatidylethanolamine System. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *598* (2), 260–271. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(80\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(80)90004-8).
- (62) Kouaouci, R.; Silviu, J. R.; Graham, I.; Pézolet, M. Calcium-Induced Lateral Phase Separations in Phosphatidylcholine-Phosphatidic Acid Mixtures. A Raman Spectroscopic Study. *Biochemistry* **1985**, *24* (25), 7132–7140. <https://doi.org/10.1021/bi00346a017>.
- (63) Wegener, M.; Neubert, R.; Rettig, W.; Wartewig, S. Structure of Stratum Corneum Lipids Characterized by FT-Raman Spectroscopy and DSC. I. Ceramides. *Int. J. Pharm.* **1996**, *128*, 203–213. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)04309-8](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)04309-8).
- (64) Lawson, E. E.; Anigbogu, A. N.; Williams, A. C.; Barry, B. W.; Edwards, H. G. Thermally Induced Molecular Disorder in Human Stratum Corneum Lipids Compared with a Model Phospholipid System; FT-Raman Spectroscopy. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **1998**, *54A* (3), 543–558. [https://doi.org/10.1016/s1386-1425\(97\)00268-0](https://doi.org/10.1016/s1386-1425(97)00268-0).
- (65) McCarthy, P. K.; Huang, C. H.; Levin, I. W. Raman Spectroscopic Study of Polycrystalline Mono- and Polyunsaturated 1-Eicosanoyl-d(39)-2-Eicosenoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholines: Bilayer Lipid Clustering and Acyl Chain Order and Disorder Characteristics. *Biopolymers* **2000**, *57* (1), 2–10. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(2000\)57:1<2::AID-BIP2>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(2000)57:1<2::AID-BIP2>3.0.CO;2-G).
- (66) Pedroso de Lima, M. C.; Simões, S.; Pires, P.; Faneca, H.; Düzgüneş, N. Cationic Lipid–DNA Complexes in Gene Delivery: From Biophysics to Biological Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *47* (2), 277–294. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00110-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00110-7).
- (67) Cao, A.; Briane, D.; Coudert, R.; Vassy, J.; Lievre, N.; Olsman, E.; Tamboise, E.; Salzman, J. L.; Rigaut, J. P.; Taillandier, E. Delivery and Pathway in MCF7 Cells of DNA Vectorized by Cationic Liposomes Derived from Cholesterol. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2000**, *10* (5), 369–380. <https://doi.org/10.1089/oli.1.2000.10.369>.
- (68) Reynier, P.; Briane, D.; Cao, A.; Lievre, N.; Naejus, R.; Bissieres, P.; Salzman, J. L.; Taillandier, E. In Vitro and in Vivo Transfection of Melanoma Cells B16-F10 Mediated by Cholesterol-Based Cationic Liposomes. *J. Drug Target.* **2002**, *10* (7), 557–566. <https://doi.org/10.1080/1061186021000038049>.
- (69) Zhigaltsev, I. V.; Maurer, N.; Wong, K. F.; Cullis, P. R. Triggered Release of Doxorubicin Following Mixing of Cationic and Anionic Liposomes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2002**, *1565* (1), 129–135. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00543-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00543-6).
- (70) Zelphati, O.; Szoka, F. C. Mechanism of Oligonucleotide Release from Cationic Liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93* (21), 11493–11498. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11493>.
- (71) Briane, D.; Lesage, D.; Cao, A.; Coudert, R.; Lievre, N.; Salzman, J. L.; Taillandier, E. Cellular Pathway of Plasmids Vectorized by Cholesterol-Based Cationic Liposomes. *J. Histochem. Cytochem.* **2002**, *50* (7), 983–991. <https://doi.org/10.1177/002215540205000712>.

- (72) Percot, A.; Briane, D.; Coudert, R.; Reynier, P.; Bouchemal, N.; Lièvre, N.; Hantz, E.; Salzmann, J. L.; Cao, A. A Hydroxyethylated Cholesterol-Based Cationic Lipid for DNA Delivery: Effect of Conditioning. *Int. J. Pharm.* **2004**, *278* (1), 143–163. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.03.003>.
- (73) Frey, S. J.; Hoffman, A. S.; Hubbell, J. A.; Kane, R. S. 1.4.4 - Surface-Immobilized Biomolecules. In *Biomaterials Science (Fourth Edition)*; Wagner, W. R., Sakiyama-Elbert, S. E., Zhang, G., Yaszemski, M. J., Eds.; Academic Press, 2020; pp 539–551. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816137-1.00036-2>.
- (74) Dempsey, C. E. The Actions of Melittin on Membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* **1990**, *1031* (2), 143–161. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(90\)90006-X](https://doi.org/10.1016/0304-4157(90)90006-X).
- (75) Nezil, F. A.; Bloom, M. Combined Influence of Cholesterol and Synthetic Amphiphilic Peptides upon Bilayer Thickness in Model Membranes. *Biophys. J.* **1992**, *61* (5), 1176–1183. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81926-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81926-4).
- (76) Percot, A.; Zhu, X. X.; Lafleur, M. Design and Characterization of Anchoring Amphiphilic Peptides and Their Interactions with Lipid Vesicles. *Biopolymers* **1999**, *50* (6), 647–655. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(199911\)50:6<647::AID-BIP9>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(199911)50:6<647::AID-BIP9>3.0.CO;2-T).
- (77) Percot, A.; Zhu, X. X.; Lafleur, M. Immobilization of Lipid Vesicles on Polymer Support via an Amphiphilic Peptidic Anchor: Application to a Membrane Enzyme. *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11* (5), 674–678. <https://doi.org/10.1021/bc9901806>.
- (78) Lanzalaco, S.; Armelin, E. Poly(N-Isopropylacrylamide) and Copolymers: A Review on Recent Progresses in Biomedical Applications. *Gels* **2017**, *3* (4), 36. <https://doi.org/10.3390/gels3040036>.
- (79) Volodkin, D.; Ball, V.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Mohwald, H. Complexation of Phosphocholine Liposomes with Polylysine. Stabilization by Surface Coverage versus Aggregation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2007**, *1768* (2), 280–290. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.09.015>.
- (80) Zhang, G.; Wu, C. The Water/Methanol Complexation Induced Reentrant Coil-to-Globule-to-Coil Transition of Individual Homopolymer Chains in Extremely Dilute Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (7), 1376–1380. <https://doi.org/10.1021/ja003889s>.
- (81) Percot, A.; Zhu, X. X.; Lafleur, M. A Simple FTIR Spectroscopic Method for the Determination of the Lower Critical Solution Temperature of N-Isopropylacrylamide Copolymers and Related Hydrogels. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2000**, *38* (7), 907–915. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0488\(20000401\)38:7<907::AID-POLB1>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0488(20000401)38:7<907::AID-POLB1>3.0.CO;2-5).

PARTIE C – PROJETS EN COURS

PARTIE C – PROJETS EN COURS	63
1 - Généralités : spectrométrie Raman exaltée de surface.....	66
2 - Détection de traces de molécules organiques par SERS	72
2.1 Origines de la vie : chimie prébiotique et détection de traces d'acides nucléiques	72
2.1.1 Caractérisation vibrationnelle de météorites	73
2.1.2 Le monde ARN ; étude d'un ribozyme auto-catalytique	78
2.2 Objets du patrimoine et détection de colorants	80
2.2.1 Présentation de quelques familles d'objets	81
2.2.2 Familles de colorants attendues	82
2.2.3 Supports concernés : fibres naturelles, coton, soie et kératine.....	84
2.2.4 Procédures de détection	88
2.3 Systèmes hybrides appliqués à la dépollution	91
Bibliographie.....	95

Introduction

Les travaux de recherche à venir sont dans la continuité des projets mis en place au cours de ces dernières années et concernent l'utilisation de la spectroscopie Raman et plus particulièrement la spectrométrie Raman exaltée de surface (SERS). Trois axes majeurs se dégagent pour poursuivre la compréhension des phénomènes associés au SERS et l'application de cette technique à la détection de molécules d'intérêt présentes à l'état de trace :

- a) Application du SERS dans le cadre de la chimie prébiotique et de la détection de traces d'acides nucléiques

Depuis 2017, dans le cadre d'un projet financé par le CNES autour de la mission japonaise Tanpopo, j'optimise les analyses en spectroscopie Raman et SERS pour la détection de traces d'acides nucléiques. L'objectif de ce projet est de mettre au point une méthode d'analyse performante pour la détection des briques élémentaires d'acides nucléiques, d'abord sur des échantillons modèles puis sur des échantillons en retour de mission. Ces travaux se font en collaboration avec l'Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité (ISYEB) et l'Institut d'Astrophysique Spatiale (IAS). L'analyse par SERS de l'adénine est aussi mise à profit pour améliorer notre compréhension des phénomènes physico-chimiques associés au SERS.

- b) Application du SERS dans le domaine des objets du patrimoine et la détection de traces de colorants

L'application du SERS aux matériaux du patrimoine est une thématique historique du laboratoire. Je présenterai les résultats obtenus dans le cadre de deux projets majeurs :

- la caractérisation de piquants de porc-épic, poils et/ou rachis de plumes teints des Collections Royales d'Amérique du Nord (projet Croyan)
- la caractérisation d'échantillons de fibres archéologiques de la civilisation Paracas (en collaboration avec une archéologue, A. Bachir-Bacha (EHESS))

Ces travaux impliquent une connaissance fine des objets et l'optimisation de la détection SERS des matières colorantes dans des contextes particuliers (mise en forme des colloïdes métalliques, prélèvement ou non) ;

- c) Application du SERS dans le cadre de la détection de polluants – Systèmes complexes appliqués à la dépollution

Des hydrogels à base de soie piégeant des colloïdes métalliques seront utilisés dans le domaine très appliqué de la dépollution. En lien avec mes activités précédentes, des objets complexes, constitués de fibroïne (la protéine majoritaire dans la soie) et de nanoparticules métalliques, sont préparés afin d'optimiser le piégeage et la concentration des polluants ainsi que leur détection via les nano particules métalliques encapsulées. Ce projet, sur lequel un chercheur postdoctoral a commencé à travailler en Juin 2022, est effectué en collaboration avec E. Guénin (TIMR, UTC).

Dans une première partie, le principe de la spectroscopie SERS sera présenté, puis les 3 projets seront développés à travers quelques résultats.

1 - Généralités : spectrométrie Raman exaltée de surface

Lorsque la matière est irradiée par une source lumineuse monochromatique, on observe une raie de diffusion intense correspondant à la radiation excitatrice (ν_0 , raie Rayleigh) et des raies de diffusion de faible amplitude, à des fréquences supérieures ($\nu_0+\nu$, raies anti-Stokes) ou inférieures ($\nu_0-\nu$, raies Stokes, ν correspondant à une fréquence particulière de vibration des molécules). L'intensité des raies est généralement très faible par rapport à l'intensité de la lumière incidente et proportionnelle à ν^4 , à l'intensité de la radiation excitatrice et à la variation de la polarisabilité au cours de la transition vibrationnelle considérée. Dans la plupart des cas, les spectres de vibration résultant de l'effet Raman sont peu intenses. Pour augmenter l'intensité du signal, on peut utiliser des lasers à forte énergie et puissance, mais de nombreux inconvénients en découlent : chauffage, voire transformation de l'échantillon, émission de fluorescence...

Des stratégies alternatives sont mises au point pour augmenter l'intensité de la diffusion Raman, telle que « l'exaltation de surface de la diffusion Raman » (ou « Surface Enhanced Raman Spectroscopy » ; SERS). L'effet SERS apparaît lorsque les molécules interagissent avec la surface d'un substrat nanostructuré de métal noble (or ou argent, le plus souvent). L'intensité du signal Raman de « l'adsorbat » peut être amplifiée d'un facteur 10^7 - 10^8 , à concentration équivalente, allant jusqu'à permettre des études sur molécule unique^{1,2}. Ce principe d'exaltation du signal Raman est largement mis à profit dans différents domaines : l'électrochimie, la catalyse, la biologie, la médecine, les matériaux du patrimoine...

Les premières observations d'un spectre Raman exalté de surface sont dues à Fleischmann en 1974 lors de l'analyse de la pyridine en présence d'une électrode d'argent³. Le phénomène a aussi été observé par Jeanmaire et Van Duyne et par Albrecht et Creighton en 1977, ces derniers suggérant un effet Raman résonant impliquant l'excitation du plasmon^{4,5}. Par la suite, Moskovits a établi un lien entre les intensités des spectres SERS et l'intensité des champs électromagnétiques renforcés provenant des plasmons de surface localisés (PSL) dans les métaux nanostructurés⁶. De plus, il est observé que le facteur d'exaltation varie en fonction de la nature du substrat mais aussi de la longueur d'onde utilisée. Deux effets collaboratifs participant au processus d'exaltation sont alors mis en évidence : l'un est électromagnétique (exaltation du champ électromagnétique local et du champ rayonné), l'autre chimique (modification du tenseur de polarisabilité de l'analyte). Le premier est indépendant de la molécule analysée, alors que le deuxième dépend fortement de sa structure chimique et de son interaction avec le substrat métallique.

L'exaltation électromagnétique est reconnue comme la contribution dominante dans la majorité des cas. Donc, expliquer l'exaltation SERS requiert surtout de comprendre la modification du champ local et de la capacité du dipôle à rayonner.

Exaltation du champ local

Le principe sera détaillé dans le cas de l'utilisation de nanoparticules (NPs) métalliques comme substrat SERS. Une NP est définie par l'IUPAC comme étant une particule de forme quelconque dont les dimensions sont comprises entre 1 et 100 nm. Deux effets contribuent à l'exaltation locale du champ électromagnétique : l'effet de pointe (ou d'antenne) et la résonance plasmonique.

Le premier est relié à la forme, et plus particulièrement à la courbure des nano-objets. Sous l'action du champ électrique excitateur, les charges électriques à la surface se déplacent et vont s'accumuler préférentiellement aux zones de fortes courbures de l'objet.

La seconde contribution à l'exaltation électromagnétique est due à la réponse optique des nanoparticules métalliques. Dans le cas de solutions colloïdales de taille nanométrique, lorsqu'un champ électromagnétique incident tel qu'un laser interagit avec les électrons de conduction d'une NP, l'énergie absorbée va induire une oscillation collective des électrons à l'interface métal/diélectrique, appelée plasmon de surface localisé (PSL). Pour des nanoparticules sphériques, la théorie de Mie permet d'obtenir une solution analytique des équations de Maxwell pour la dispersion du rayonnement électromagnétique. Pour une nanoparticule métallique sphérique, de petite taille par rapport à la longueur d'onde excitatrice, il est en effet possible de considérer que la particule est soumise à un champ électrique constant. Les calculs montrent alors que le champ électrique induit est maximal à la fréquence de résonance plasmon du métal. Si les NP sont excitées à une longueur d'onde proche de la condition de résonance, il se crée localement un champ électromagnétique intense, dont l'amplitude décroît de façon exponentielle (Figure 1).

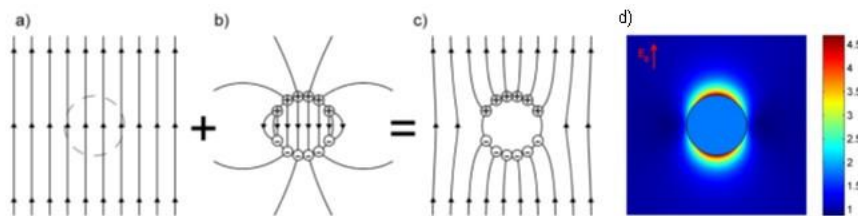


Figure 1 : Représentation schématique du : a) champ électrique externe, b) champ produit par les charges induites à la surface de la particule et c) champ total résultant. d) Vue en coupe de l'amplitude du champ autour et dans une NP d'or de 10 nm de diamètre à sa fréquence de résonance, calculée par l'approximation dipolaire. La plus grande partie de l'amplification se fait dans le champ proche de la surface de la NP, dans la direction du champ électrique externe (flèche rouge)⁷

Dans le cas du SERS, le champ local (E_{Loc}) sur la surface métallique peut être beaucoup plus intense que le champ incident (E_{Inc}). Cette augmentation peut être particulièrement spectaculaire à certains endroits précis (localisés) de la surface. On peut calculer un facteur d'amplification de l'intensité du champ local en fonction de la fréquence Laser (ω_L) de la façon suivante :

$$M_{Loc}(\omega_L) \sim \frac{|E_{Loc}(\omega_L)|^2}{|E_{Inc}|^2}$$

Ce facteur d'amplification de l'intensité du champ local est associé à l'excitation du dipôle Raman. Pour une molécule absorbante, il caractérise également l'augmentation de la section transversale d'absorption. L'amplification de ce champ est observée à proximité de la surface d'un objet métallique. Elle est couplée à la résonance plasmonique, comme le montre la réponse résonante en fonction de la longueur d'onde (Figure 2).

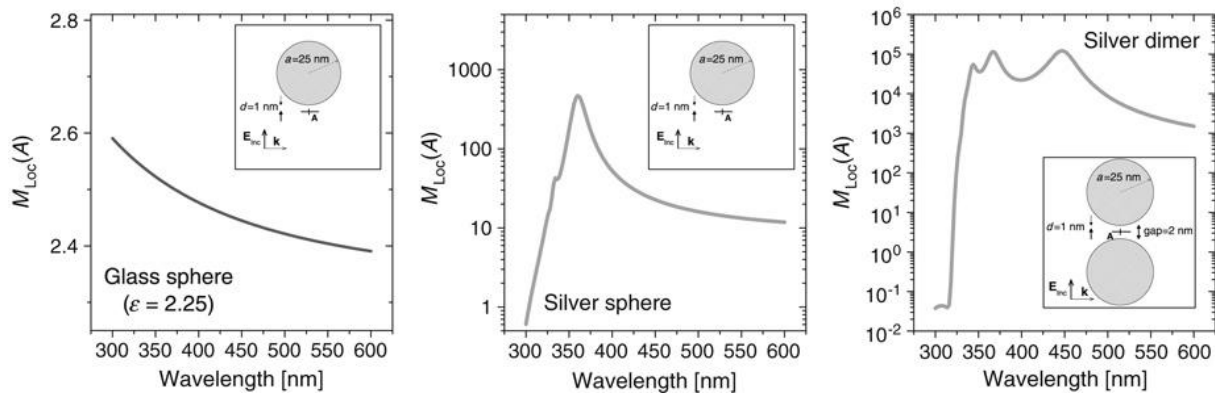


Figure 2 : Exemples de modulation de l'intensité du champ local, caractérisée ici par la dépendance du facteur d'amplification du champ local (M_{Loc}) en fonction de la longueur d'onde. Ceci est calculé pour une molécule dans l'air à une distance $d = 1$ nm de la surface (au point A), en utilisant la théorie de Mie. Les cas d'un verre diélectrique de 50 nm de diamètre ou de sphères métalliques en argent sont illustrés, ainsi que celui d'une molécule située dans l'espace entre deux sphères d'argent très proches (un dimère). Dans le cas d'une sphère de verre, on observe un léger renforcement du champ, qui dépend à peine de la longueur d'onde. Pour une sphère d'argent, M_{Loc} (A) varie largement avec la longueur d'onde, montrant une exaltation associée à la résonance plasmonique de surface localisée. De tels effets sont encore plus marqués dans le cas d'une molécule située entre deux sphères d'argent séparées par une distance de 2 nm. Ce dernier cas modélise ce que l'on appelle un point chaud en SERS.⁷

Pour atteindre de fortes exaltations on peut donc coupler deux ou plusieurs nanostructures entre elles. En effet, lorsque la distance entre deux NPs est inférieure à quelques dizaines de nanomètres, il y a possibilité de recouvrement de leurs champs proches. Dans le cas où le champ électrique incident est polarisé selon l'axe entre les NPs, il se crée alors entre elles un "point chaud" (Figure 2 et Figure 3).

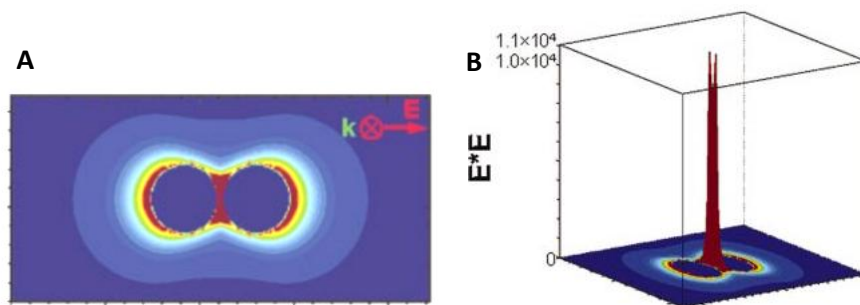


Figure 3 : Amplification du champ électrique entre deux nanosphères d'argent de 36 nm, distantes de 2 nm, pour une excitation à 520 nm. Le champ incident à la longueur d'onde correspondant à la résonance plasmonique de surface localisée est polarisé selon l'axe inter-particules. Les zones rouges représentent des zones où l'amplitude du champ électrique est importante et les zones bleues des zones où le champ électrique est peu intense (A), Représentation 3D, l'axe perpendiculaire au plan sélectionné représente l'augmentation du champ E au sein du dimère (B).

On voit que l'effet SERS n'est pleinement « efficace » que pour des dispositions des particules et substrats nanométriques particulières. C'est pourquoi l'utilisation du SERS dans des applications de routine a été si tardive. La préparation de « bons agrégats » de NPs est restée en quelque sorte un art et la technique, bien que vieille de près de 50 ans, se développe tardivement avec les travaux sur le contrôle des NPs et la mise au point de substrats solides nanostructurés.

L'or, l'argent et le cuivre apparaissent comme les métaux les plus efficaces avec une excitation dans le visible et seront utilisés comme substrats SERS dans les projets qui suivent.

Exaltation du rayonnement diffusé

L'exaltation décrite précédemment est intrinsèque aux NP considérées. Un deuxième phénomène est lié à l'amplification du rayonnement diffusé. L'environnement affecte en effet le dipôle d'émission. En SERS, le dipôle Raman ne rayonne pas dans l'espace libre, mais tout proche de la surface d'un métal. On peut alors observer une modification de la distribution spatiale de l'émission (comme dans le cas d'un dipôle émettant près d'un plan parfaitement réfléchissant). D'autre part, il y a une modification de la puissance totale émise par le dipôle (P_{Rad}) par rapport à celle émise dans l'espace libre (P_0). On peut définir un facteur d'amplification de la radiation à la fréquence Raman ω_R tel que $M_{\text{Rad}}=P_{\text{Rad}}/P_0$. Cette amplification dépend de plusieurs facteurs, dont la géométrie et les propriétés optiques du substrat, la position, l'orientation et la fréquence d'émission du dipôle (ω_R).

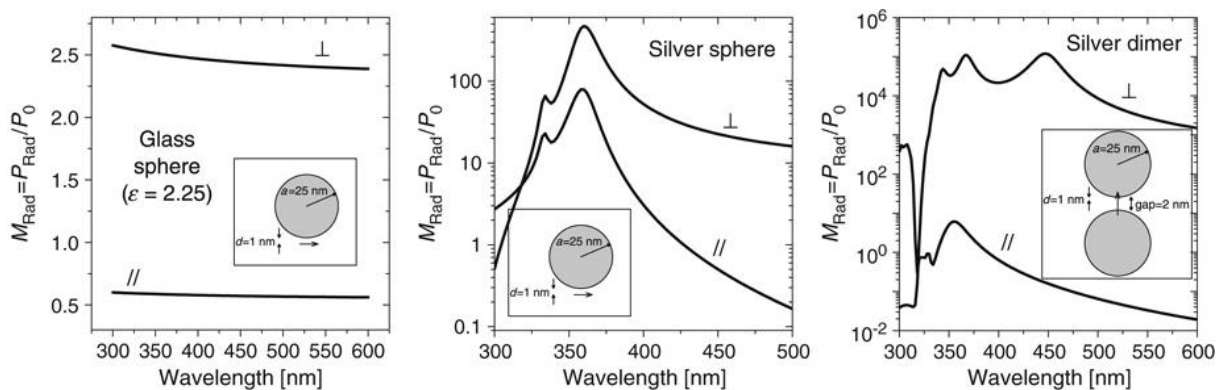


Figure 4 : Exemples de la modification de l'émission dans l'air d'un dipôle (symbolisé par une flèche noire) situé à une distance $d=1$ nm d'une sphère : (a) en verre, (b) en argent, et (c) dans le gap entre deux particules d'argent. Exaltation de l'émission, $M_{\text{Rad}}=P_{\text{Rad}}/P_0$, pour un dipôle perpendiculaire (\perp) ou parallèle (\parallel) à la surface.

La Figure 4 montre que la puissance totale émise par le dipôle est fortement exaltée en présence de métal. La puissance émise peut être augmentée ou diminuée selon l'orientation du dipôle par rapport à la surface. Elle est dépendante de la longueur d'onde excitatrice et couplée à la résonance des plasmons localisés de surface. Comme mentionné précédemment, l'exaltation augmente de plusieurs ordres de grandeur dans la jonction située entre deux nano-objets.

D'un point de vue global, on parle en SERS d'une approximation en E^4 . Si on ne considère que l'amplification du champ local (excitation) et l'amplification de la radiation (re-émission), on peut exprimer simplement l'amplification électromagnétique pour une molécule (Single Molecule Enhancement Factor) par l'équation suivante :

$$\text{SMEF} \cong M_{\text{Loc}}(\omega_L) M_{\text{Rad}}(\omega_R)$$

avec M_{Rad} dans la direction de détection du signal SERS.

Les approximations $M_{Loc}(\omega_L) \cong M_{Rad}^d(\omega_R)$ et $\omega_L \cong \omega_R$ conduisent alors à :

$$SMEF(\omega_L, \omega_R) \cong M_{Loc}(\omega_L)M_{Loc}(\omega_R) \sim \frac{|E_{Loc}(\omega_L)|^2 |E_{Loc}(\omega_R)|^2}{|E_{Inc}|^2 |E_{Inc}|^2} \sim \frac{|E_{Loc}(\omega_L)|^4}{|E_{Inc}|^4}$$

En général, cette approximation est suffisante pour obtenir le bon ordre de grandeur du facteur d'amplification pour une molécule, mais elle cache tous les phénomènes physiques complexes qui sous-tendent le SERS.

L'amplification chimique

Ce phénomène fait l'objet de nombreux débats. On appellera par la suite « amplification chimique » toute modification du tenseur de polarisabilité Raman suite à l'interaction de la molécule d'intérêt avec la surface du métal.

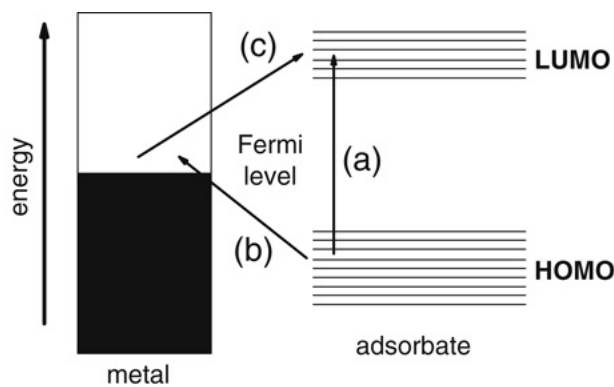


Figure 5 : Représentation schématique d'un mécanisme de transfert de charge avec une "contribution résonante" (inspiré de la Réf.⁸). 3 cas possibles : L'énergie laser peut être directement en résonance avec une transition électronique de la molécule (a), ou couplage indirect (transfert de charge) via le métal ((b) + (c)).

On distinguera 3 cas principaux :

- Le cas où la molécule ne se lie pas de façon covalente au métal. Le métal ne fait alors qu'entraîner une perturbation de la structure électronique de l'analyte (léger changement dans sa distribution électronique). Ceci peut entraîner un changement de polarisabilité et un changement du signal Raman associé aux groupements chimiques concernés.
- Le cas impliquant la formation d'un « complexe » entre le métal et l'analyte, soit par liaison covalente, soit par liaison indirecte via un électrolyte (typiquement, le Chlore). Ceci peut entraîner un changement notable de la polarisabilité intrinsèque de la molécule. En effet les « nouvelles » transitions permises par la superposition des orbitales moléculaires permettent une modification de la polarisabilité.
- Le cas dans lequel le transfert de charge entre l'analyte et le métal est photo-induit, c'est-à-dire lorsque l'écart entre le niveau de Fermi (E_f) du métal et les niveaux HOMO ou LUMO de l'analyte correspond à l'énergie du laser incident. Ce mécanisme a été mis en évidence dans des cellules électrochimiques permettant de modifier la différence d'énergie entre l'analyte adsorbé et le métal par le biais d'un potentiel externe. L'intensité SERS maximale est alors observée à différents potentiels en fonction du laser incident. Ces expériences confirment un mécanisme de transfert de charge entre l'analyte et le métal (Figure 5).

Bilan des contributions électromagnétique et chimique

Les deux effets s'ajoutent, et permettent une amplification du signal Raman jusqu'à un facteur 10^9 ⁷. Cela en fait une technique de choix pour l'analyse de molécules présentes à l'état de trace dans un milieu liquide ou solide. Cependant, la mise en œuvre de la spectrométrie SERS est délicate car la sensibilité de la mesure dépend de nombreux paramètres :

- l'interaction colloïde/analyte (charges des NPs, nature du ligand, pH, sels, cinétique...)
- l'orientation de l'analyte sur le métal (disponibilité de l'analyte, concentration de l'analyte, état de surface du substrat...)
- le choix du laser (amplification du champ électrique, exaltation de certains modes de vibration)
- la présence de points chauds, la sédimentation du colloïde

Ceci entraîne une reproductibilité limitée de l'analyse, directement corrélée aux conditions de mesures. L'analyse qualitative est complexe (spectres différents selon l'orientation de l'analyte sur le colloïde, résonance de certains modes en fonction du laser incident ...) et l'analyse quantitative liée à la présence de points chauds, à la stabilité du colloïde, aux interactions avec les NPs, aux NPs disponibles (saturation des sites)...

Ces verrous scientifiques sont à l'origine des projets proposés dans ce manuscrit et se déclinent selon 2 axes principaux. Le premier vise en priorité la compréhension de l'efficacité du SERS (analyse du signal SERS en fonction des conditions de mesures expérimentales et utilisation de calculs théoriques pour appuyer le raisonnement, application au cas particulier de l'adénine). Le second axe se focalise sur le développement de systèmes d'exaltation de plus en plus efficaces, ainsi que le développement de méthodes d'analyse spécifiques, appliquées à la détection et à la caractérisation d'espèces organiques présentes à l'état de trace, en phase solide et/ou liquide.

2 - Détection de traces de molécules organiques par SERS

L'analyse SERS présente l'avantage d'être non destructive, très sensible et de fournir une signature spectrale caractéristique. Les projets présentés ci-dessous permettent d'en faire progresser la connaissance, tant fondamentale qu'appliquée, dans le cadre de la chimie prébiotique, des objets du patrimoine ou du développement d'un capteur de pollution.

2.1 Origines de la vie : chimie prébiotique et détection de traces d'acides nucléiques

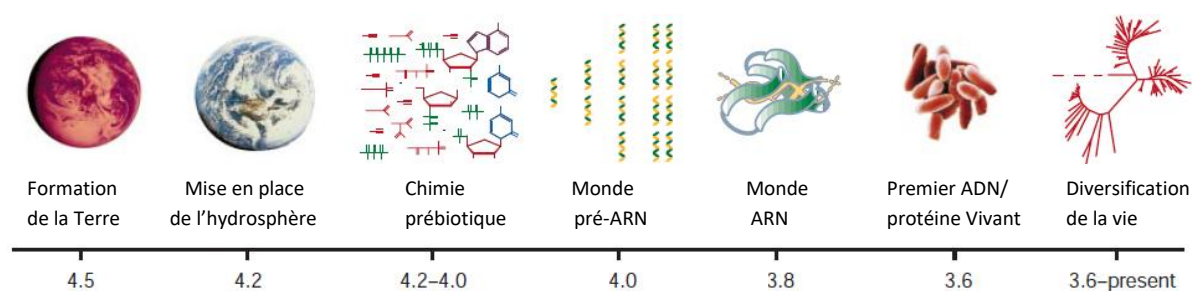


Figure 6 : Chronologie des événements relatifs à l'histoire de la vie sur Terre, avec des dates approximatives en milliards d'années avant le présent ⁹.

Les travaux présentés ci-dessous s'inscrivent dans un questionnement général quant aux origines de la vie et sont effectués en collaboration avec M.C. Maurel, du Muséum National d'Histoire Naturelle. Il existe différentes hypothèses sur les origines de la vie : celle d'A. Oparin (1924) selon laquelle des molécules formées dans l'atmosphère de la Terre primitive se seraient déposées au fond des océans et auraient constitué une « soupe prébiotique » ; d'autres impliquant le rôle de surfaces minérales stabilisant de petites molécules et favorisant leur polymérisation ; ou encore la théorie de l'impact météoritique. Quelle que soit l'hypothèse envisagée, différents champs de recherche sont explorés simultanément par la communauté scientifique pour améliorer notre compréhension :

- l'origine des premières « briques du vivant » : Ce champ de recherche implique notamment l'analyse des objets « primitifs » du système solaire (dont font partie les astéroïdes et les comètes) afin d'y détecter des molécules organiques, ainsi que l'étude des environnements extrêmes, par exemple le fond des océans (à proximité de volcans sous-marins, autour des geysers ou des sources hydrothermales). Une autre voie d'exploration quant à la synthèse de ces « briques » concerne les composés atmosphériques qui, sous l'effet de rayonnements très énergétiques, entraînent la formation de molécules complexes.
- la polymérisation à partir de la « soupe prébiotique » ou dans des matrices minérales (favorisant les organisations moléculaires) : Ce champ de recherche implique notamment la synthèse de molécules complexes à partir de petites molécules, dans des conditions simples.
- la post-polymérisation : Ce champ de recherche étudie la capacité des molécules à se multiplier (et notamment à transmettre une information génétique, dans l'hypothèse d'un monde ARN).

2.1.1 Caractérisation vibrationnelle de météorites

Comme expliqué précédemment, l'étude des objets dits « primitifs » du système solaire peut permettre d'en apprendre davantage sur les origines de la vie, *via* la détermination des composés organiques présents dans ces poussières terrestres et extraterrestres qui orbitent autour de la Terre. La mission Tanpopo est la première mission spatiale japonaise consacrée à l'astrobiologie. Pour le piégeage de particules extraterrestres ou terrestres (rejetées dans l'espace), cette mission utilise des blocs d'aérogel de silice hydrophobe de très faible masse volumique ($0,01 \text{ g/cm}^3$) en guise de panneaux de capture. Ces panneaux sont exposés à l'extérieur du module expérimental japonais Kibo de la station spatiale internationale (ISS).

Depuis 2017, dans le cadre d'un projet financé par le CNES, en collaboration avec les membres de la mission japonaise Tanpopo, nous cherchons à développer les analyses en spectroscopie Raman et SERS pour la détection de traces d'acides nucléiques, d'acides aminés et de toute autre molécule organique. L'objectif de ce projet est de mettre au point une méthode d'analyse performante pour la détection de la matière organique tout en étant non destructive (contrairement aux méthodes les plus utilisées, telle que la chromatographie). Les méthodes de caractérisation proposées sont mises au point sur des échantillons modèles puis sur des échantillons météoritiques réels. Si les résultats obtenus sont satisfaisants, la séquence d'analyse sera appliquée à des échantillons en retour de mission.

Des purines et des bases azotées rares ont été identifiées dans des météorites. Dans un premier temps, l'objectif est donc de détecter et de caractériser ces familles de molécules piégées dans des poussières extraterrestres et dans la matrice de l'aérogel utilisé dans la mission Tanpopo. Nous commencerons par l'optimisation de la procédure de détection de l'adénine.

a- L'adénine comme référence

L'adénine est un facteur pré-biotique d'intérêt qui a déjà été décelé dans la météorite de Murchison. De plus, elle possède un groupement imidazole qui lui confère des propriétés catalytiques importantes (Figure 7) ¹⁰. Dans un premier temps, l'adénine a été caractérisée par SERS, en solution aqueuse. Ces travaux font suite aux travaux de M.H. Baron (avec qui j'ai travaillé lors de mon arrivée au laboratoire ¹¹) et sont effectués en collaboration avec E.L. Zins, de l'équipe de chimie théorique du Monaris. Dans les conditions d'analyse utilisées au laboratoire, une signature SERS de l'adénine différente de celle observée dans la littérature a été obtenue à très faible concentration.

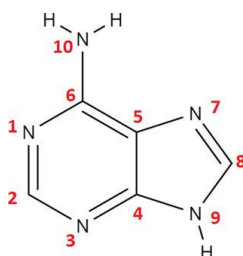


Figure 7 : Structure chimique de l'adénine

La mise en place d'une méthodologie SERS pour détecter des traces de molécules organiques est un procédé très sensible aux espèces présentes dans le milieu car la réponse est le fruit d'interactions électrostatiques complexes, en lien avec la stabilité des nanoparticules métalliques impliquées.

Pour cette étude, le colloïde d'argent dit de Creighton⁵ est utilisé. Il est obtenu par réduction du nitrate d'argent en présence de borohydrure de sodium. Une suspension colloïdale composée de NPs d'argent entourées de ligands inorganiques courts et chargés négativement (borohydrure ou une de ses formes oxydées) est alors obtenue. Le complexe NP/analyte est très sensible à la présence de sel, qui se révèle être un facteur amplificateur important. L'hypothèse la plus probable est que la présence d'ions Cl⁻ adsorbés sur le colloïde d'argent oriente la molécule sur la surface, ce qui augmente la charge électronique de C₆N (Figure 7) et l'affinité de l'azote pour l'argent. Dans ces conditions de mesures, l'adénine est détectable jusqu'à une concentration de 10⁻⁹M.

Le SERS apparaît donc comme une méthode de détection adaptée à l'analyse de traces d'adénine. De plus, une signature spectrale de l'analyte est obtenue. Nous nous proposons de développer le procédé pour la mise au point de la détection d'adénine dans des poussières minérales.

Afin de quantifier et interpréter les différentes signatures obtenues en fonction des concentrations d'adénine et des différents substrats d'incubation, nous avons eu recours à la chimiométrie et plus précisément à l'analyse en composantes indépendantes (ACI). Ceci nous a permis de mettre en évidence 2 signatures spectrales pour l'adénine, dont la combinaison permet de retrouver toutes les signatures SERS obtenues, quelles que soient les concentrations d'adénine et de sel ou le temps d'incubation (Figure 8).

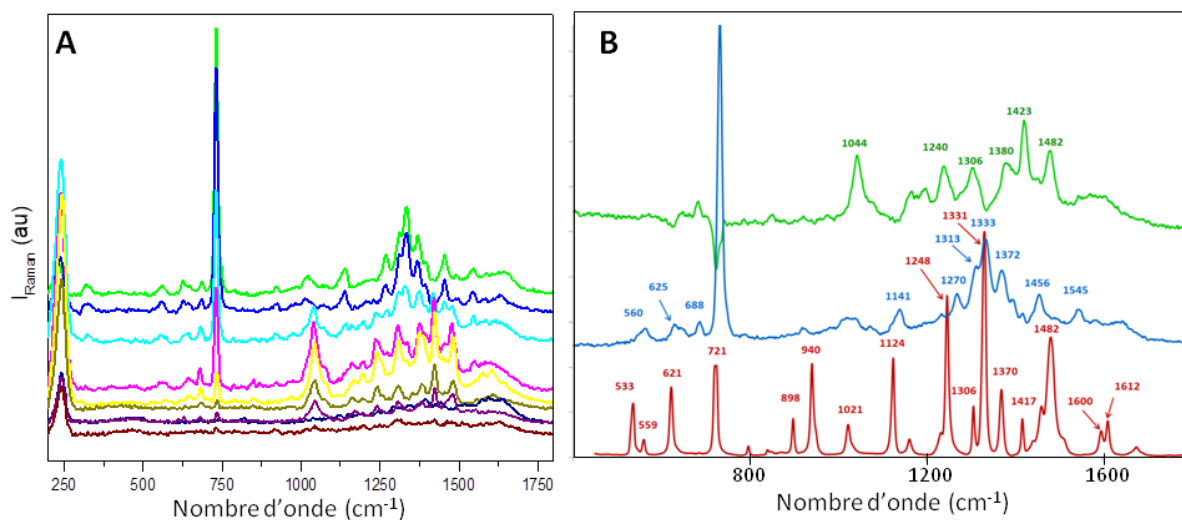


Figure 8 : spectres SERS de l'adénine en solution aqueuse à des concentrations variant de 5 10⁻⁴ à 10⁻⁹M, en présence de MgCl₂ (A). En (B), les spectres IC2 (vert) et IC3 (bleu) issus de l'ACI des spectres présentés sur la Figure A et le spectre Raman de l'adénine en poudre (rouge).

L'interprétation de l'effet SERS en lien avec la formation de points chauds créant des champs électromagnétiques locaux fait l'objet de nombreuses recherches ces dernières années. Cependant, l'interprétation précise de la nature des bandes observées en SERS reste ambiguë. L'évolution des spectres en fonction des conditions expérimentales (pour un analyte, un colloïde et une longueur d'onde d'excitation donnés) reste difficile à prévoir et à expliquer. On sait cependant que ces variations sont causées par des effets électromagnétiques ainsi que par des interactions chimiques, qui sont elles-mêmes à l'origine de l'exaltation du signal Raman. Les composantes indépendantes IC2 et IC3 extraites des spectres SERS mettent en évidence des bandes présentes sur le spectre Raman de l'adénine pure (poudre) (Figure 8). Cette comparaison suggère que les bandes observées dans chacun des signaux IC2 et IC3 pourraient correspondre au renforcement de différents modes

vibrationnels, avec des décalages possibles et des changements d'intensité qui pourraient être dus aux interactions chimiques de l'adénine avec son environnement (associées à un changement de polarisabilité).

Il apparaît que le signal IC3 est comparable au spectre Raman de l'adénine dans l'eau et découle directement du spectre Raman de l'adénine sous forme de poudre. Par contre, le spectre IC2 présente un profil très différent.

Il a été proposé dans la littérature que l'obtention de différents spectres SERS pourrait être due à des différences dans l'orientation de l'adénine adsorbée à la surface des nanoparticules. Étant donné que le motif IC3 est dominé par des bandes attribuées à la respiration et à l'étirement du cycle (732 et 1333 cm^{-1}), l'hypothèse a été émise que dans ces conditions l'adsorption se faisait via N_1 et N_{10} ; le cycle étant parallèle à la surface du colloïde, alors que dans le cas de IC2, l'interaction se ferait via N_7/N_{10} , perpendiculairement à la surface. Cela fait encore débat dans la littérature et l'objet de nombreuses publications¹².

Alternativement, lors de ce travail, nous avons modélisé l'effet du champ électromagnétique sur le spectre vibrationnel de la molécule d'adénine. Un champ électrique parallèle au moment dipolaire de la molécule est appliqué à différentes intensités et les résultats obtenus permettent d'expliquer certains changements observés sur le spectre SERS IC2. Ce sont des travaux exploratoires qui seront poursuivis en analysant le signal SERS de l'adénine piégée dans une matrice minérale, ainsi que celui obtenu pour des analogues d'adénine.

b- Application de la détection SERS dans le cadre de la mission Tanpopo

Comme mentionné précédemment, des traces d'adénine (et plus généralement de purines) ont déjà été détectées dans des météorites (notamment dans Orgueil et Murchison) par chromatographie sur couche mince et par chromatographies en phase gazeuse et liquide couplées à la spectrométrie de masse^{13,14}. Toutes ces méthodes nécessitent une extraction précédée d'une hydrolyse acide par HF/HCl et des quantités non-négligeables de matière. La concentration maximale d'adénine mesurée dans la météorite Murchison est de 267 ppb mais les concentrations sont plus généralement inférieures à 10 ppb^{15,16}. L'inconvénient majeur de ces techniques est leur caractère destructif. Nous chercherons à mettre au point une méthode d'analyse permettant, sans destruction de l'échantillon, de détecter des biomolécules d'intérêt (nous commencerons par l'adénine) et d'obtenir leur spectre vibrationnel.

L'aérogel de silice synthétisé et exposé sur l'ISS par l'équipe japonaise dans le cadre de la mission Tanpopo est optimisé pour le piégeage de molécules organiques volatiles mais aussi de poussières minérales.

Dans un premier temps, de l'adénine a été piégée en phase gaz dans l'aérogel. Après dépôt de colloïde d'argent, elle a pu être détectée par SERS¹⁷. Cette méthode de détection est donc applicable à la détection de composés organiques piégés dans l'aérogel de silice.

Dans un deuxième temps, des poussières modèles ont été préparées au laboratoire. Trois minéraux silicatés ont été choisis comme matrice: la silice (SiO_2), la serpentinite ($(\text{Mg,Fe,Ni})_3\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$) et la montmorillonite ($(\text{Na,Ca})_{0,3}(\text{Al,Mg})_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2, n\text{H}_2\text{O}$). Ces minéraux ont été choisis car les phyllosilicates et les silicates anhydres riches en magnésium et/ou en fer dominent la composition des poussières extraterrestres sur lesquelles nous nous appuyerons dans la suite de cette étude, à savoir les chondrites carbonées. Ces minéraux ont été incubés en présence de solutions aqueuses contenant de l'adénine. Après incubation, centrifugation et récupération du culot, étapes suivies

d'une phase d'évaporation, les échantillons sont compactés à l'aide d'une presse (2×30s à 5T). Pour se rapprocher des échantillons de retour de mission, certaines de ces poussières modèles ont été chauffées pour simuler l'échauffement généré lors de leur pénétration dans l'aérogel, à quelques km/s.

Des échantillons de serpentinite dopés en adénine sont aussi transmis à l'équipe japonaise afin d'être projetés dans l'aérogel (via un pistolet à gaz léger) et d'obtenir ainsi des échantillons les plus proches possible des échantillons réels.

Les analogues de poussières sont ensuite analysés par spectroscopie FTIR en imagerie par réflexion, en collaboration avec D. Baklouti de l'IAS. Cette première analyse permet de caractériser la matrice minérale de l'échantillon. Dans tous les cas, l'homogénéité de l'échantillon a pu être confirmée, aucun effet de chauffage n'a pu être observé et aucune signature organique n'a été détectée. Les échantillons ont ensuite été analysés par spectroscopie Raman (à différentes longueurs d'onde) et, là encore, l'homogénéité de la phase minérale et l'absence de signature de matière organique ont pu être constatées.

L'ajout de quelques microlitres de colloïde d'argent (additionné de sel) a permis de détecter et de cartographier la présence d'adénine sur ces échantillons solides. Seule la concentration d'adénine utilisée pour l'incubation est connue mais si l'on considère que toute l'adénine présente dans la solution est piégée dans la matrice minérale, on peut estimer que la concentration limite de détection de l'adénine dans ces conditions est de l'ordre de 50 ppm.

Cette séquence analytique est actuellement appliquée à la caractérisation de la météorite Paris (météorite carbonée découverte à Paris en 2001).

c- Caractérisation de la météorite Paris

De la même manière que pour les analogues de poussières, nous avons réalisé des cartographies FTIR en réflexion de $704 \times 704 \mu\text{m}^2$. La Figure 9 montre une photo du morceau de la météorite Paris au microscope. Un traitement de données par « clustering » a permis de regrouper les spectres FTIR obtenus en différentes familles, selon leur degré de ressemblance. On peut ainsi voir que la zone étudiée est dominée par le signal de la matrice, composée de phyllosilicates mélangés à de l'olivine en quantité variable (en bleu foncé et bleu clair sur la Figure 9). Les chondres visibles sur la photo sont bien discernables sur la cartographie et on peut voir qu'ils sont composés soit d'olivine (en rouge, rose clair et foncé et violet) avec quatre signatures différentes, soit de pyroxène (en vert). On observe également quelques carbonates dans les zones de matrice, mélangés à de faibles quantités de sulfates (en orange et jaune). Cette cartographie IR nous permet donc de mettre en évidence la complexité d'une chondrite carbonée, qui a une composition minérale très hétérogène. Toutefois, l'analyse IR permet difficilement de conclure sur la présence de matière organique au sein de cette météorite.

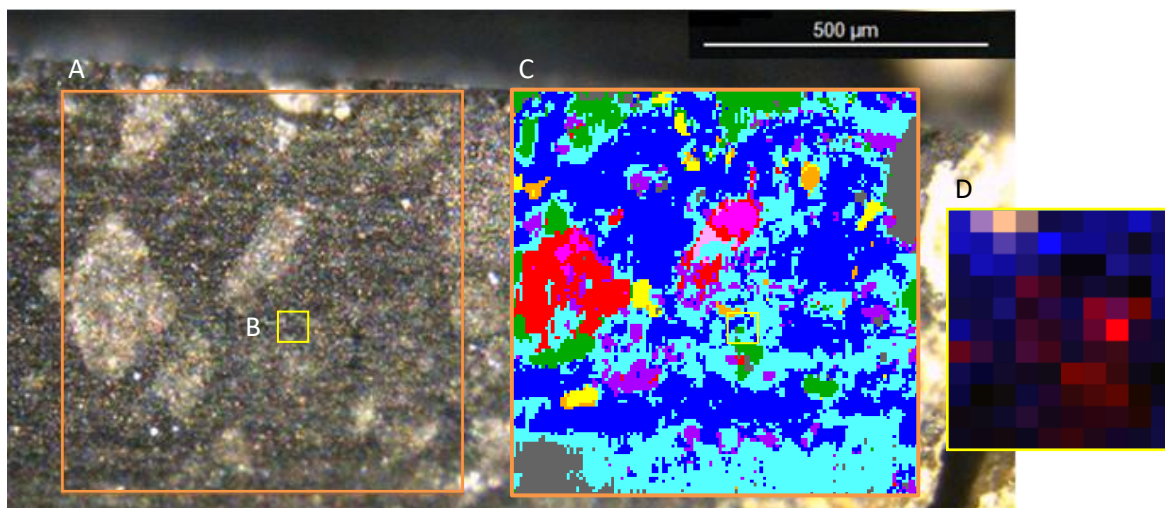


Figure 9- Image au microscope montrant le morceau de météorite Paris étudié. A) Zone où la cartographie IR a été réalisée. B) Zone où la cartographie Raman a été réalisée. C) Carte chimique de $704 \times 704 \mu\text{m}^2$ obtenue suite à l'analyse IR et présentant la répartition des phases minérales (Bleu : phyllosilicate avec plus ou moins d'olivine, orange : phyllosilicate avec des carbonates et plus ou moins de sulfates, rouge : olivine (chondre), vert : pyroxène (chondre)). D) Carte chimique de $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ obtenue suite à l'analyse Raman, présentant la répartition des phases minérales et organiques (pas 5 de μm , $P=180 \mu\text{W}$, code couleur : Figure 10).

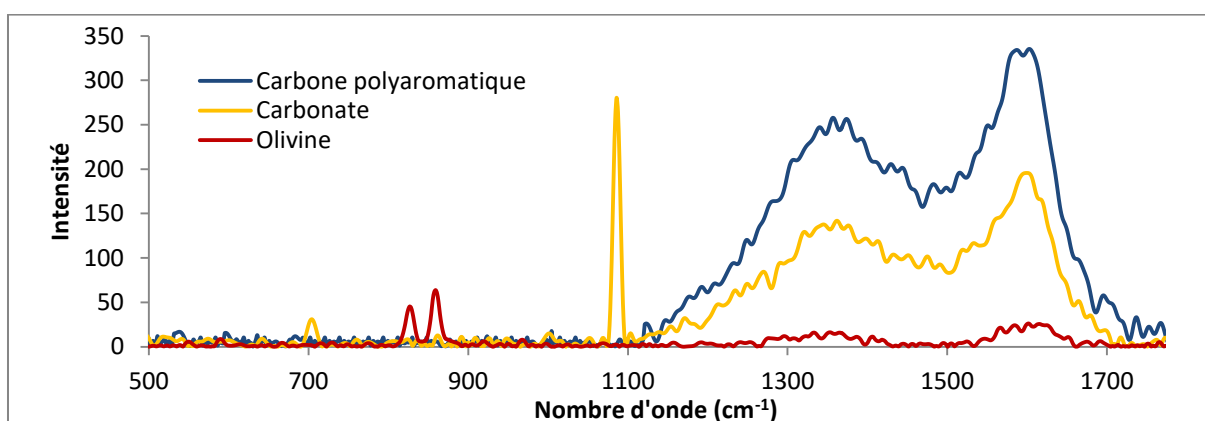


Figure 10 : spectres Raman caractéristiques des différentes phases analysées sur la météorite Paris.

Sur une cartographie Raman on distingue trois signatures (Figure 9D et Figure 10) : l'olivine, le carbonate de calcium et deux bandes intenses à 1362 et 1589 cm^{-1} , appelées les bandes « D » et « G » (ou respectivement sp^3 et sp^2). Dans la littérature, ces bandes sont attribuées à la présence de matière carbonée polyaromatique désordonnée. Ces bandes sont présentes sur toute la surface de l'échantillon et pourraient correspondre à la signature de la matière organique macromoléculaire réticulée souvent détectée dans les météorites (ou à sa dégradation). L'analyse plus fine de ces bandes sera effectuée afin de localiser cette matière et son degré d'ordre/désordre, en lien avec la répartition des phases minérales. La spectroscopie Raman est peu utilisée dans la littérature pour caractériser ces familles d'échantillons, notamment les phases minérales. Des analyses systématiques, avec différentes longueur d'onde excitatrices permettraient d'obtenir des informations sur la matrice minérale, mais peut être aussi, en Raman résonnant, sur les molécules organiques présentes (sans broyage préalable de l'échantillon).

Après une caractérisation plus poussée de cet échantillon en spectroscopie Raman, nous utiliserons le SERS pour détecter les traces de molécules organiques éventuellement présentes.

L'utilisation du SERS présente un intérêt certain dans le domaine de l'astrobiologie, en laboratoire (en retour de mission) mais aussi dans le cadre de futures missions d'exploration. Perseverance, le rover qui a atterri sur Mars en Février 2021 est équipé de 2 spectromètres Raman et cette technique de caractérisation fait maintenant partie des équipements prévus pour analyser *in situ* les échantillons prélevés. La spectroscopie Raman, puissante pour caractériser les phases minérales n'est pas assez sensible pour déterminer la présence de biomarqueurs et il existe un besoin pour des méthodes de détection plus sensibles. La limitation est liée au colloïde et à sa stabilité dans le temps, mais une optimisation du système dans ce sens permettrait son utilisation dans des environnements extrêmes. D'autres équipes dans le monde poursuivent des développements dans ce sens ¹⁸⁻²⁰.

2.1.2 Le monde ARN ; étude d'un ribozyme auto-catalytique

Dans les années 80, deux chercheurs américains découvrent simultanément les ribozymes, ARNs capables de jouer le rôle de catalyseurs²¹. L'ARN pouvant stocker de l'information (en utilisant un code génétique similaire à celui de l'ADN) et possédant la capacité de s'auto-répliquer (via son activité catalytique), il est possible qu'un « monde ARN » ait précédé le monde actuel (dans lequel les activités catalytiques sont majoritairement assurées par les protéines).

Beaucoup d'arguments théoriques et expérimentaux tendent à confirmer l'hypothèse d'un monde d'ARN. Dans cette hypothèse, les ARN seraient à l'origine du vivant mais auraient été remplacés au cours de l'évolution par l'ADN, molécule plus robuste comme dépositaire de l'information génétique (Figure 6).

Le ribozyme en épingle à cheveux a été découvert sur le brin négatif de l'ARN satellite du virus des tâches annulaires du tabac. Il a également été trouvé sur les brins négatifs des satellites du virus de la mosaïque de l'arabette et du virus des tâches de la chicorée ²¹. Ce ribozyme peut catalyser à la fois les réactions de clivage et de ligation, et semble donc responsable à la fois de la coupure des multimères linéaires et de la circularisation des monomères résultants au cours du cycle de réplication virale *in vivo*.

Notre objectif dans la présente étude a consisté à mettre au point une méthodologie permettant la caractérisation d'un ribozyme sauvage en épingle à cheveux (HRW85) et de ses fragments (HRW70 et 15), et le suivi de sa cinétique d'auto-catalyse en solution (Figure 11). Il est à noter qu'après coupure, 5 résidus adényls qui étaient appariés, donc impliqués dans des interactions intramoléculaires, sont libérés.

Comme montré précédemment, l'intensité SERS est sensible à la concentration des résidus adényls adsorbés sur le colloïde métallique, et permet de détecter des concentrations aussi faibles que 10^{-9} M. De plus, la spectroscopie SERS permet de sonder la disponibilité des résidus adényls car la réponse SERS implique une interaction de l'analyte avec la surface métallique. Cette propriété peut être exploitée pour suivre l'appariement et le désappariement de brins ADN. En effet, lorsqu'il y a appariement, les résidus adényls, impliqués dans des interactions intramoléculaires ne sont pas disponibles pour interagir avec la surface métallique, ce qui entraîne une absence de signal SERS. Au contraire, lors du désappariement, les résidus adényls, libres d'interaction, peuvent s'adsorber sur la surface métallique et donner une réponse SERS ²². La cytosine (C), la guanine (G) et l'uracile (U) ont des signaux SERS peu intenses, par rapport à l'adénine, aussi le spectre obtenu reflètera majoritairement la disponibilité des résidus adényls. L'étude par SERS de l'auto catalyse du ribozyme

en épingle à cheveux nécessite de suivre le taux de formation des produits de la coupure en fonction du temps.

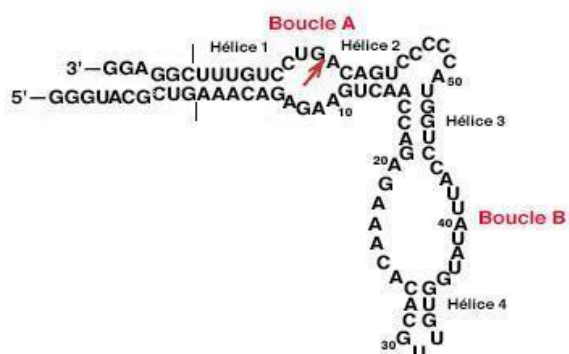


Figure 11 : Structure secondaire de l'ARN du ribozyme HRW85

Dans un premier temps, nous étudierons donc la réponse SERS des 2 fragments libérés après coupure, ainsi que celle du ribozyme complet. Le colloïde d'argent dit de Creighton⁵ est utilisé en présence de $MgCl_2$. La Figure 12 présente les courbes de calibration obtenues pour les 3 partenaires.

Dans la gamme de concentration concernée, Le signal mesuré provient essentiellement de HRW70, celui des autres fragments est négligeable. Cette méthodologie a donc été utilisée pour suivre la réaction d'autocatalyse in situ. La comparaison a pu être effectuée avec la méthode habituelle de suivi de catalyse, l'électrophorèse sur gel (Figure 13).

L'étude cinétique de la réaction en présence de 10 mM $MgCl_2$ a montré qu'un maximum d'environ 20% d'autoclivage est atteint en fin de réaction (après 400 min), quelle que soit la méthode d'analyse utilisée, SERS ou électrophorèse (voir Figure 13). La structure de HRW85 contient une longue hélice, constituée de neuf paires de bases (hélice 1, Figure 11), ceci pourrait entraver la libération du petit brin à la fin de la réaction et favoriser la réaction de ligature, expliquant le faible niveau d'autoclivage obtenu.

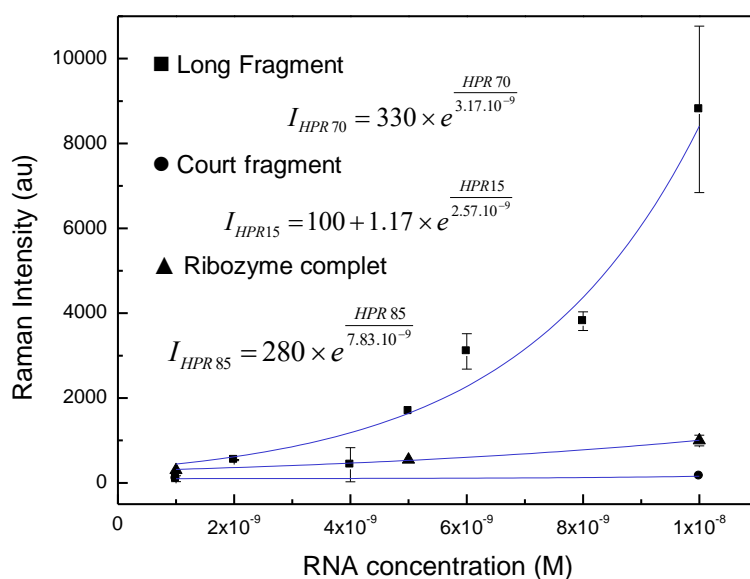


Figure 12 : Variation de l'intensité SERS de la bande associée à l'adénine pour HRW70, HRW15 et HRW85 (colloïde de Creighton, pH 7,5, 1 mM $MgCl_2$) en fonction de la concentration²³.

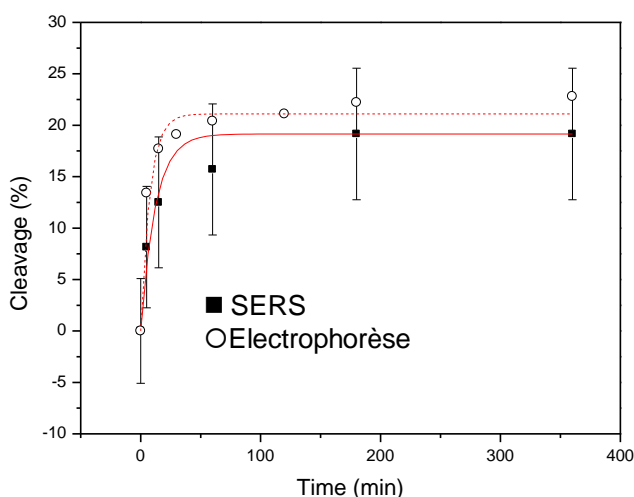


Figure 13 : Cinétique de la réaction d'autoclivage mesurée par électrophorèse et par SERS. La réaction de clivage a été réalisée à 20°C avec 1 μ M HRW (50 mM tris HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂)²³.

Les constantes de vitesse de clivage observées (k_{obs}) sont du même ordre pour les 2 techniques de mesure utilisées : $0,09 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$ avec le SERS et $0,10 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$ avec l'électrophorèse. Un avantage majeur de la méthode SERS est la faible quantité de produit nécessaire à l'analyse. Pour l'analyse par électrophorèse, $7,5 \times 10^{-11}$ mol d'ARN sont utilisés alors que pour les expériences SERS, 5×10^{-13} mol d'ARN sont suffisantes (c'est-à-dire cent fois moins). Cela constitue un grand avantage si l'on considère que des ARN non marqués sont utilisés dans de telles expériences. De plus, l'analyse par spectroscopie Raman est très rapide, et peut être effectuée au fur et à mesure de la cinétique, chaque mesure ne durant que 120 s. Cette méthode n'est pas destructive et le même échantillon peut être réutilisé pour d'autres applications.

2.2 Objets du patrimoine et détection de colorants

Parce qu'elle est non destructive, l'analyse Raman fait partie des techniques de caractérisation privilégiées dans le domaine des matériaux du patrimoine. Dans le cas des substances colorantes, en général présentes en faible quantité, la détection requiert souvent une exaltation du signal. Nous présenterons les résultats obtenus par SERS sur deux corpus d'échantillons :

- les Collections Royales d'Amérique du Nord (projet CROYAN)
- des échantillons de fibres archéologiques de la civilisation Paracas (en collaboration avec A. Bachir-Bacha (EHESS))

Dans ces 2 corpus, l'identification des colorants doit permettre de mieux caractériser les objets et de différencier les sources de teintures locales de celles issues des échanges. Pour la caractérisation des colorants, les techniques séparatives couplées à la spectrométrie de masse sont les techniques de référence car elles offrent, à l'aide de protocoles spécifiques, des réponses précises sur la composition moléculaire. À ce jour, les rares études existant pour l'analyse des colorants de piquants de porc-épic sur des objets amérindiens ont ainsi été menées par des techniques de chromatographie en phase liquide^{24,25} mais celles-ci nécessitent un prélèvement destructif de l'échantillon, inenvisageable sur un large corpus.

Les échantillons étant particulièrement précieux, notre projet est développé parallèlement selon 2 stratégies, la préparation d'éprouvettes modèles, et l'analyse d'échantillons réels la moins invasive possible.

2.2.1 Présentation de quelques familles d'objets

Le musée du quai Branly - Jacques Chirac (mqB-JC) dispose de 234 pièces provenant des territoires actuels du Canada et des États-Unis, collectées entre 1650 et 1850 et intégrées aux collections royales puis nationales françaises. Il s'agit d'un corpus exceptionnel pour la connaissance des peuples des Plaines et des Grands Lacs et de leur relation avec leurs interlocuteurs européens. En raison de ses spécificités matérielles et de son ancienneté, ce corpus requiert un suivi régulier en conservation-restauration pour être mis à disposition du public. Ce projet global de recherche croise l'étude historique des collections, l'analyse matérielle des collections, les interventions de conservation-restauration et la collaboration avec les spécialistes amérindiens. Dans le cadre du projet Croyan, 124 objets présentent des piquants de porc-épic, poils et/ou rachis de plumes teints, c'est-à-dire qu'ils sont constitués d'une matrice support protéique, et que la teinture a été probablement effectuée en présence d'un mordant. Quelques objets sont présentés

Figure 14, où les piquants, poils ou plume sont utilisés comme « perles » colorées pour la décoration.



Figure 14 : Exemples d'objets provenant des collections Royales (Projet Croyan)

En ce qui concerne les artefacts issus de la civilisation Paracas, les échantillons textiles concernés proviennent de fouilles archéologiques effectuées au sein du complexe d'Animas Altas/Animas Bajas localisé au Pérou dans la vallée d'Ica. Daté de 600 av. J.-C. à 100 ap. J.-C., ce site est considéré comme l'établissement majeur de la culture Paracas. Les échantillons fournis sont au nombre de 78. Ce sont des fragments de textile ou des fils à base de fibres animales (laine de camélidé) ou végétales (coton) teintes (Figure 15).



Figure 15 : Photographies sous microscope à faible grossissement illustrant les états de conservation et de coloration de quelques échantillons représentatifs des fouilles archéologiques effectuées au sein du complexe archéologique d'Animas Altas/Animas Bajas (Pérou).

2.2.2 Familles de colorants attendues

Bien que les contextes historiques et géographiques soient différents, les teintures naturelles utilisées sur tous les objets que nous étudions sont à base de plantes, de mollusques et d'insectes, et regroupent des familles chimiques similaires (Tableau1).

Dans tous les cas, les compositions chimiques des colorants extraits des différentes plantes restent très similaires, ce qui rend impossible l'utilisation du SERS ou de toute autre technique analytique pour déterminer avec précision la famille ou l'espèce des plantes tinctoriales utilisées. Par exemple, pour ce qui est de l'indigo, il est présent dans de nombreuses plantes de la famille des Fabacées (*Indigofera tinctoria*), mais aussi dans la familles des Polygonacées (*Persicaria tinctoria*), des Apocynacées (*Wrightia religiosa* ou laurier des teinturiers), et des orchidacées (*Calanthes veratrifolia*)²⁶. Lors de ce projet, nous chercherons donc dans un premier temps à détecter les familles chimiques des molécules colorantes utilisées.

Pour les teintures des éprouvettes modèles, des teintures naturelles (commerciales ou non), ainsi que la molécule colorante pure ont été utilisées.

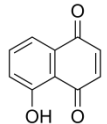
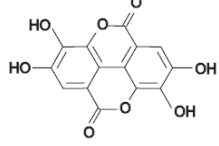
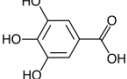
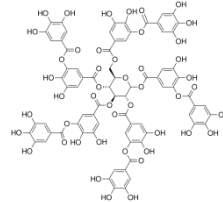
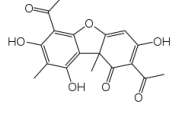
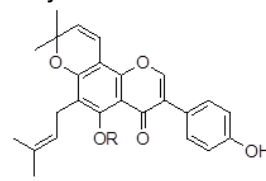
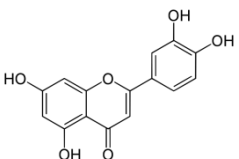
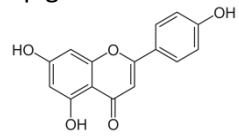
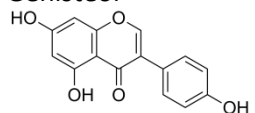
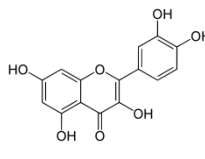
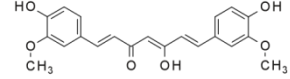
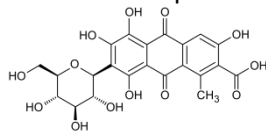
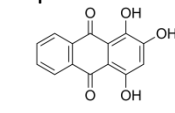
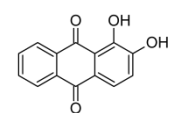
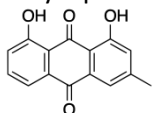
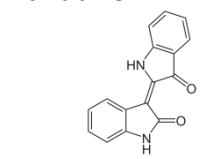
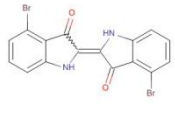
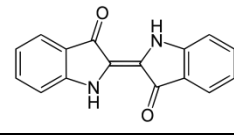
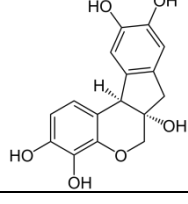
Naphto-quinones	Brun	Juglone 			
Tanins / Lichen	Brun	Acide ellagique 	Acide gallique 	Acide tannique 	Acide usnique 
Flavonoïdes	Jaune / orange	Osajol 	Lutéoline 	Apigénine  Génistéol 	Quercétine 
Curcumines	Orangé	Curcumine I 			
Antraquinones	Rouge	Acide carminique 	Purpurine 	Alizarine 	Chrysophanol 
Indigoïdes	Violet / rose	Indirubine 	Dibromo indigotine 		
Indigoïdes	Bleu	Indigotine 			
Neoflavonoïdes	Noir, Bleu, Violet	Hématoxyline 			

Tableau 1 : Tableau présentant les familles de colorants organiques d'origine naturelle les plus fréquemment utilisées

2.2.3 Supports concernés : fibres naturelles, coton, soie et kératine

Afin de mieux comprendre les matériaux complexes analysés, ainsi que les signatures spectrales obtenues, il est important de connaître les matrices en interaction avec les colorants utilisés, ainsi que les procédés de teinture.

Fibres d'origine végétale : le coton qui provient des fibres entourant les graines du cotonnier (gossypium)

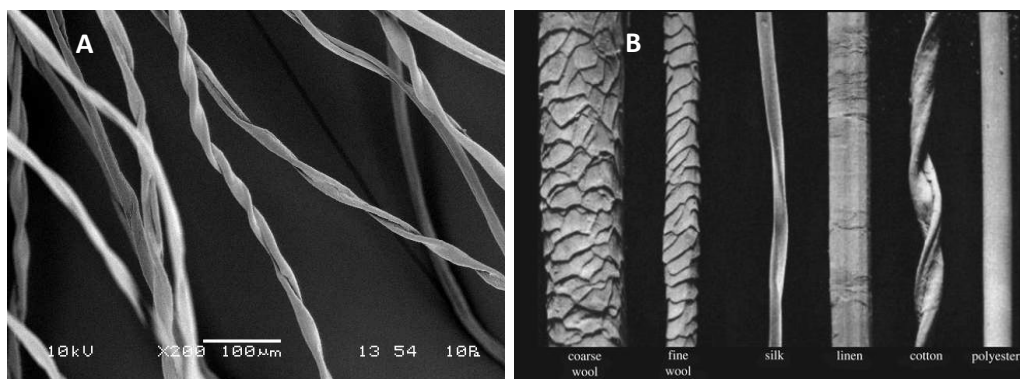


Figure 16 : Fibres de coton (A, x200) et autres fibres (B) observées au MEB ²⁷⁻²⁹

La fibre de coton, constituée à 99% de cellulose, possède une paroi primaire fine et extensible, doublée d'une paroi secondaire plus épaisse qui assure les propriétés textiles et mécaniques. La paroi primaire est constituée de fibrilles de cellulose, chacune d'environ 20 nm d'épaisseur. La paroi secondaire constitue l'essentiel de la fibre et se compose de trois couches de fibrilles de cellulose, qui s'enroulent le long de l'axe de la fibre (Figure 17). Dans ces couches, l'angle de spirale des fibrilles varie d'environ 20°, près de la paroi primaire, à environ 45° dans la 3^e couche. Contrairement aux fibrilles de la paroi primaire, qui ont une direction constante, les fibrilles dans les couches secondaires présentent une inversion de torsion. C'est cette spirale des fibrilles le long de l'axe des fibres qui donne aux fibres de coton leur élasticité et favorise les techniques de filature. Lors de la phase de croissance, les fibres de coton se développent sous une forme tubulaire, avec un canal descendant en leur centre, appelé lumen. C'est par cette lumière que la sève apporte les nutriments nécessaires à la croissance de la plante (les sucres, les protéines et les minéraux). A maturité, la sève se dessèche, laissant des résidus principalement de protéines et de minéraux, et le diamètre de la lumière diminue. Les fibres s'effondrent d'une forme circulaire en coupe transversale à une forme de haricot avec un centre creux. Les fibres deviennent plus plates et torsadées sur leur longueur (voir Figure 16). A l'extérieur, on retrouve une couche externe cireuse appelée cuticule, qui sert de revêtement protecteur. Il est nécessaire d'éliminer cette couche cireuse à l'aide de détergents avant de teindre le coton, sinon les colorants ne peuvent pas diffuser dans les fibres. La fibre de coton est donc une fibre creuse, légère, avec une paroi hydrophile et résistante.

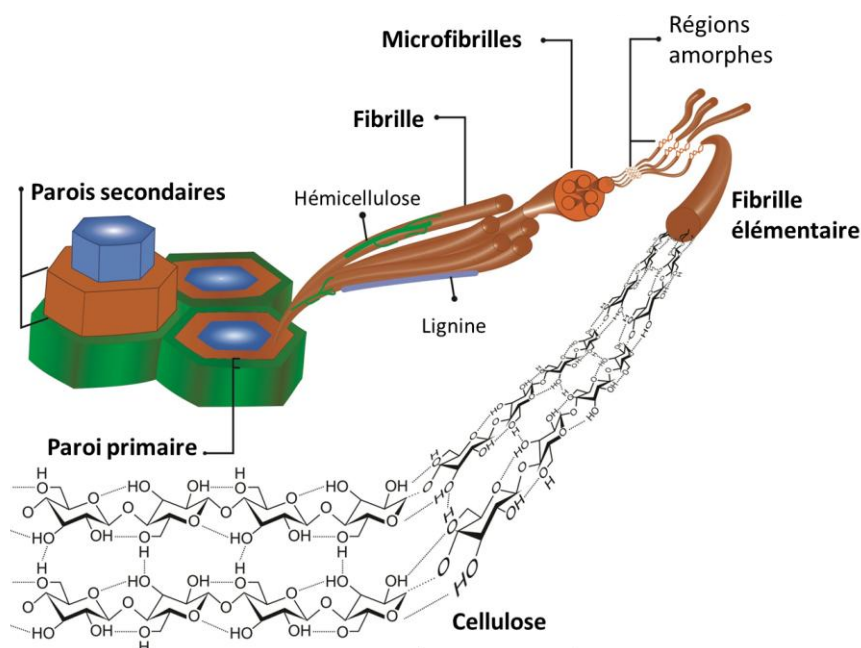


Figure 17 : Fibre végétale représentée aux échelles méso et microscopiques³⁰

La fibre de soie

Comme vu précédemment, la soie utilisée dans l'industrie textile est synthétisée par le *Bombyx mori*. La « bave » ou fil de soie du ver est une bi-fibre de fibroïne entourée d'une gaine de séricine, une protéine plus hydrophile. Le diamètre des fibres obtenues varie entre 10 et 30 μm en fonction de l'animal, de sa procédure de filage et de la vitesse à laquelle il est réalisé.

La fibroïne est une protéine fibreuse dont la structure primaire est constituée à 75% d'acides aminés hydrophobes, la glycine et l'alanine. La fréquence du motif de base GAGAGS conduit à une organisation particulière des protéines au sein de la fibre. Cette organisation à l'échelle moléculaire est à l'origine des propriétés physico-chimiques de la fibre textile obtenue.

Dans un premier temps, pour dévider le cocon, on le plonge dans l'eau bouillante afin de ramollir la séricine. Une fois l'extrémité du fil détaché, le cocon se déroule et libère les fibres de fibroïne (avec des traces de séricine). Comme le fil de soie est trop fin pour être utilisé tel quel, on regroupe les brins de 6 à 10 cocons dès le dévidage. La séricine restant suite au dévidage permet la cohésion du fil après séchage, en collant les brins. Dans un second temps, le fil subit l'étape du moulinage, qui consiste à lui donner une torsion. La soie brute (grège) étant raide, rêche, mate, et blanc cassé, le décreusage permet de développer les propriétés recherchées : souplesse, douceur, brillance et blancheur. Dans certains ouvrages, on souligne aussi le rôle de la séricine lors de la teinture.

La laine

La laine est souvent issue de la toison du mouton. Le poil est sécrété par un follicule pileux, auquel sont associées une glande sudoripare (qui sécrète le suint) et une glande sébacée (qui produit une substance grasse qui protège le poil). Les fibres de laine sont cylindriques et leur couleur varie du blanc au noir selon la proportion du pigment mélanine qu'elles contiennent. Ces fibres sont majoritairement constituées de kératine α , une protéine fibreuse. Cette kératine est produite par les kératinocytes épidermiques. Les cellules se remplissent au fur et à mesure de filaments de kératine, qui subsistent après la mort cellulaire. La kératine comporte un motif de répétition à base d'acides

aminés hydrophiles et hydrophobes. La chaîne se replie régulièrement en hélice (Figure 18A). Elle contient un pourcentage important de cystéines (11 à 12%), ce qui permet la formation de ponts disulfure qui stabilisent les hélices et assurent une résistance à l'étirement. La présence de ces ponts disulfure est à l'origine des propriétés de réactivité chimique de la kératine mais aussi des propriétés mécaniques macroscopiques. La laine est une fibre solide qui résiste bien à la traction mais dont les propriétés restent inférieures à celles de la soie. Le cortex ou cœur de la fibre constitue 85% de la fibre de laine et est responsable des propriétés mécanique. Chaque cellule du cortex est constituée de microfibrilles de kératine orientées le long de l'axe de la fibre.

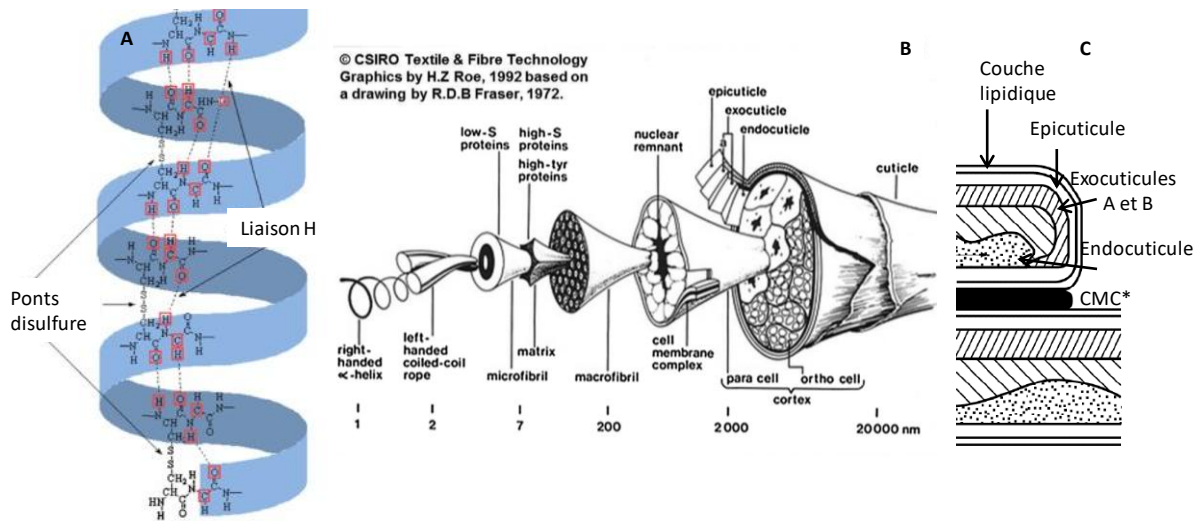


Figure 18 : Schéma d'une fibre de laine aux échelles micro et nanométriques (B), avec la protéine de kératine en hélice alpha (A) et la structure interne de deux écailles superposées (C)³¹⁻³³

La structure de la cuticule (qui représente à peu près 10% de la fibre) est responsable des propriétés de surface de la laine. Elle est constituée de cellules ou écailles (environ 30 x 20 x 0,5 µm) présentant trois couches : l'épicuticule, l'exocuticule et l'endocuticule (voir Figure 18B). L'épicuticule est identifiée comme une fine membrane de surface, contenant principalement des chaînes de kératine couvertes d'une couche grasse. Elle constitue la membrane résistante et souple qui entoure toutes les cellules cuticulaires et corticales. L'exocuticule fait à peu près 0,3 µm d'épaisseur et représente environ 60% de chaque cellule cuticulaire. Les kératinocytes qui la constituent sont particulièrement riches en kératine et rigidifient les écailles. Les kératinocytes qui constituent l'endocuticule sont moins riches en cystine, moins denses. Le domaine est plus souple. C'est un point faible mécaniquement, responsable de l'usure.

De façon générale, la laine est hydrophile et peut absorber 30% de son poids en vapeur d'eau sans paraître mouillée. Ce caractère hydrophile lui donne une bonne affinité tinctoriale. Avant utilisation, les fibres de laine sont soumises à un lavage qui permettra de les dégraisser, par immersion dans l'eau chaude (40°C) avec du carbonate de potasse, du savon ou des solvants organiques. En effet, dans la laine brute, les impuretés (suint, gras...) peuvent représenter entre 30 et 70% en poids.

Les pics de porc-épic

Les piquants de porc-épic ont une structure similaire à celle de la laine et sont majoritairement composés d'α-kératine rigide. Des études de diffraction des rayons X ont montré qu'ils ont une structure hautement cristalline, la couche externe (cuticule) étant moins ordonnée par rapport à la

couche interne. Bien qu'il existe de nombreuses études sur les propriétés des fibres de laine, notamment en ce qui concerne leur absorption des colorants et des ions métalliques, il n'existe qu'un nombre très limité d'études sur les piquants de porc-épic et leurs propriétés tinctoriales. Contrairement au cas des fibres de laine dans lesquelles le colorant est distribué uniformément, seule la fine couche cuticulaire des piquants interagit avec le bain de teinture. Comme dans les fibres de laine, cette couche externe est légèrement plus riche en soufre et son épaisseur peut varier de 30 à 100 μm selon la taille des piquants.

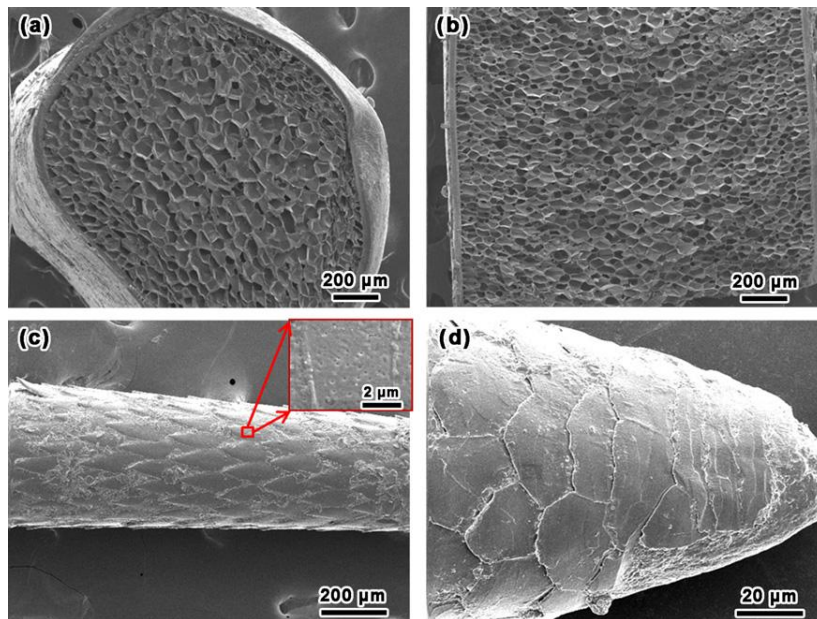


Figure 19 : Images MEB de la structure d'un pic de porc épic *Erethizon*: (a) coupe transversale ; (b) section transversale longitudinale; (c et d) surface extérieure du cortex avec les pores en encart (c) ³⁴.

Procédés de teinture

Souvent effectuée en phase aqueuse, la coloration peut présenter 3 étapes : adsorption du colorant à la surface de la fibre, diffusion à l'intérieur de la fibre et fixation du colorant.

Les paramètres importants concernent donc l'interaction avec la surface des fibres, c'est-à-dire la charge de surface (les fibres protéiques sont supposées chargées positivement à bas pH alors que le coton est rapidement chargé négativement), la porosité, l'hydrophilicité, la présence d'une cuticule protectrice, la cristallinité de la fibre...

Les 3 principaux modes de teintures utilisés depuis l'Antiquité sont :

1- La teinture directe

Certaines molécules colorantes présentent « une affinité » suffisante envers les fibres textiles, animales ou végétales, pour les teindre par simple immersion dans un bain. Les températures de bain peuvent varier selon la nature des fibres et des colorants. Ce processus s'utilise principalement dans les cas où les molécules des colorants possèdent des groupes polaires favorablement disposés par rapport à ceux des fibres à teindre. Il peut alors se former des liaisons ioniques entre les colorants et les fibres. Cela se rencontre plus souvent pour les fibres animales.

2- La teinture avec mordantage

Dans la plupart des cas, les colorants n'ont que peu d'affinité avec les fibres et nécessitent un mordant, qui sert d'intermédiaire ou de lien entre le colorant et la fibre. Cette technique de mordantage consiste à déposer le mordant, souvent un sel métallique, au sein des fibres. Le mordant se fixe sur la fibre et se combine avec le colorant pour donner un composé insoluble. Les teinturiers ont très tôt essayé puis adopté l'usage de diverses substances minérales (cristaux, efflorescences, croûtes salines, oxydes métalliques...) ou organiques (urine, excréments, sang, graisses animales ou végétales) pour améliorer la teinture.

3- Cas particulier des colorants de « cuves »

On appelle « cuves » les procédés de teinture à l'indigo et à la pourpre de mollusque. Le procédé a pour but de rendre ces pigments solubles, afin qu'ils puissent imprégner les fibres textiles. Cela implique un processus de réduction en milieu alcalin. A la sortie du bain de teinture, les formes solubles se transforment de nouveau en indigo ou en pourpre à la surface et à l'intérieur des fibres, sous l'action de l'oxygène de l'air.

Dans tous les cas, la molécule colorante est en interaction avec les groupements chimiques des fibres, soit directement par des liaisons électrostatiques ou covalentes (-OH, -NH₂ et -SH), soit via un métal (Figure 20).

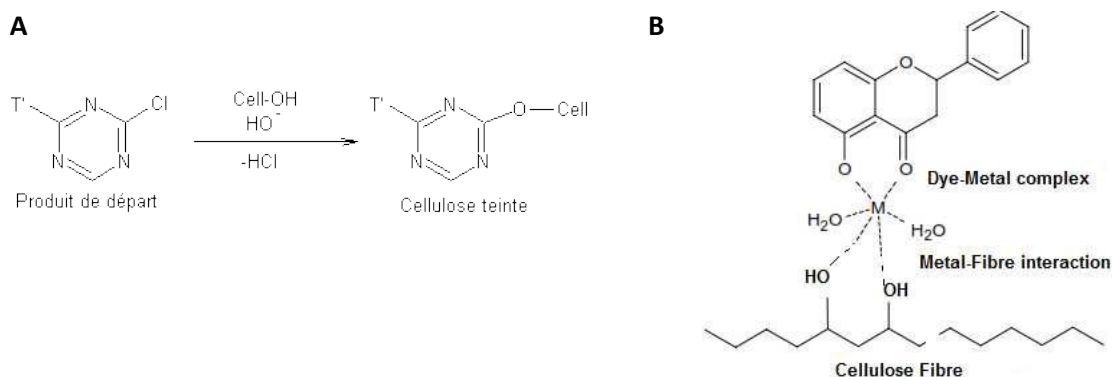


Figure 20 : Représentation schématique de l'interaction covalente entre un colorant présentant le groupement triazine chloré et la cellulose (A) ³⁵ et d'une teinture impliquant un mordant métallique et la cellulose ³⁶ (B)

L'analyse sans préparation particulière des fibres implique une détection des colorants fixés (plus ou moins solidement) en surface, avec détection ou non de la matrice fibreuse et du « fixatif ».

2.2.4 Procédures de détection

Comme expliqué précédemment, la spectroscopie Raman est une technique non destructive, sans contact, qui permet d'obtenir une signature moléculaire vibrationnelle. Elle est très utile pour la détection et la caractérisation de colorants car des phénomènes de résonance interviennent et permettent d'obtenir une signature spectrale (identification) et un abaissement de la limite de détection jusqu'à l'état de traces. Le SERS implique l'interaction à courte distance des colloïdes métalliques avec les molécules colorantes, pour observer une amplification du signal Raman. Cette technique donne déjà de bons résultats pour l'analyse des colorants organiques naturels ³⁷ et

synthétiques³⁸ et permet de contourner les méthodes destructives classiquement utilisées comme la GC-MS.

Le projet consiste à développer une méthodologie SERS adaptée aux 2 contextes patrimoniaux exposés afin d'optimiser l'analyse non destructive de colorants organiques adsorbés sur un substrat solide.

De nombreux verrous scientifiques subsistent et les stratégies analytiques doivent être adaptées à des objets complexes. De plus, les échantillons sont précieux et uniques. La préparation d'éprouvettes en laboratoire est une étape préalable pour tester et optimiser les protocoles analytiques et améliorer notre compréhension de la détection. En effet, la détection des colorants jaunes (type flavonoïdes) et de colorants liés par des interactions fortes à la matrice reste difficile. De plus, le choix du colloïde et de sa mise en forme est critique, notamment pour des échantillons solides. La détection de mordant est aussi un challenge et permettrait d'améliorer notre connaissance des usages et des technologies associées.



Figure 21 : préparation d'éprouvettes à base de Laine, Soie, Coton teints à la Cochenille, Garance, Genêt à 10% et à l'Indigo (bain de 120 min)

Les premières éprouvettes textiles sont préparées à partir de 4 colorants (le genêt, la garance, la cochenille et l'indigo) sur des fibres cellulosiques (coton) ou protéiques (laine et soie). Les fibres sont mordancées à l'alun (sauf pour les teintures à l'indigo) pour permettre aux colorants de mieux accrocher (Figure 21). Le même type d'éprouvettes est préparé en utilisant des pics de porc-épic.

Dans le contexte patrimonial, l'analyse par SERS implique généralement d'utiliser des nanoparticules métalliques en suspensions colloïdales, qui peuvent être commerciales ou préparées en laboratoire. A ce jour, les nanoparticules d'argent obtenues par la méthode de Lee-Meisel³⁹ restent les plus fréquemment utilisées, en raison de leur efficacité, de leur stabilité et de leur facilité de préparation. Cette méthode simple consiste à réduire dans l'eau du nitrate d'argent, en présence de citrate de

trisodium. Les nanoparticules obtenues sont entourées de ligands 2-oxomalonate. La suspension est d'un gris laiteux opaque caractéristique d'une suspension poly dispersée, avec des nanoparticules de formes diverses, de taille comprise entre 3 et 80 nm et présentant une large bande d'absorption du plasmon de surface, centrée vers 430 nm.

Dans la plupart des cas, une goutte de quelques microlitres de colloïde est déposée sur l'échantillon à analyser. Différentes longueurs d'onde excitatrices sont utilisées selon l'échantillon analysé (458, 514, 633, 785 nm).

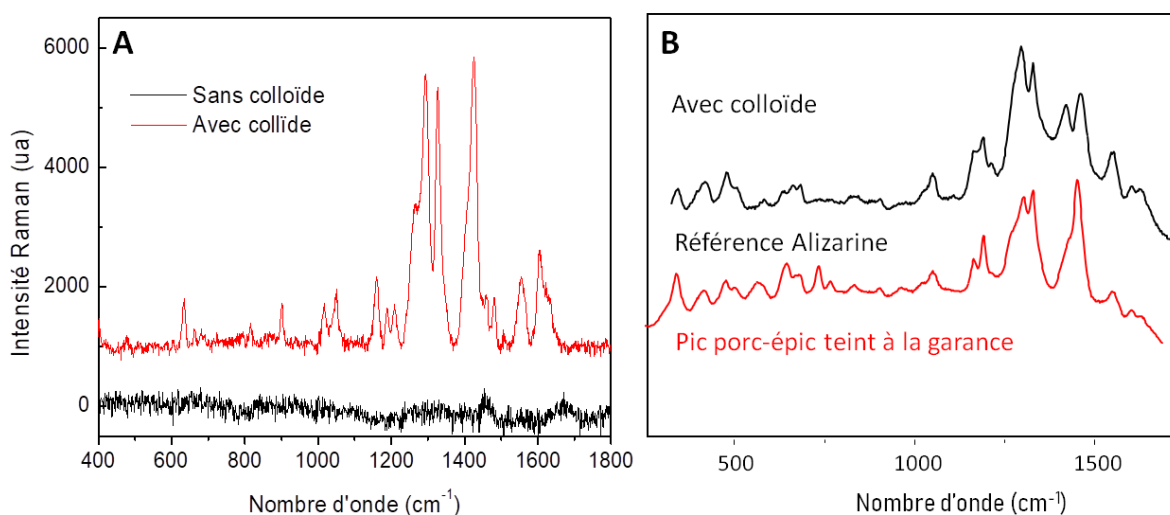


Figure 22 : Analyse Raman (633 nm) d'un échantillon de laine teinte avec 10% de garance, en absence et en présence de colloïde d'argent (A) et sur une éprouvette de pic de porc-épic teinte en présence de colloïde (B). L'alizarine est le colorant présent dans la garance.

Sur la laine et les pics de porc épic, le Raman seul ne permet pas de détecter le colorant. On constate toutefois que l'ajout de colloïde sur l'échantillon à analyser permet d'exalter le spectre du colorant (l'alizarine dans le cas de la Figure 22).

A ce jour, 3 stagiaires ont participé aux travaux portant plus précisément sur la caractérisation de fibres teintées : Léa Voisin (2020, stage M2 de « l'Ecole supérieure d'Art d'Avignon »), Elisa Fagundes (2021, stage de « Licence Professionnelle Chimie-Formulation », Sorbonne Université) et Clémence Laminette (2021, stage du « Master Chimie et Sciences des Matériaux », Université d'Évry val d'Essonne). En parallèle, la caractérisation des Collections Royales d'Amérique du Nord est effectuée dans le cadre du projet Croyan, en collaboration avec une équipe de recherche du Musée du Quai Branly, notamment avec Céline Daher (Chargée d'analyse des collections).

Le travail se poursuit afin d'améliorer la détection des différentes molécules colorantes (notamment les flavonoïdes, qui restent un challenge encore aujourd'hui), ainsi que des mordants. Les procédures d'analyse sont à adapter aux échantillons. Les stratégies en cours visent la mise au point de nouveaux colloïdes (voir la partie D), l'encapsulation dans des hydrogels pour limiter la pollution des échantillons ainsi que la concentration des colloïdes, le tout sans dégradation des propriétés plasmoniques.

2.3 Systèmes hybrides appliqués à la dépollution

L'objectif de ce travail est d'élaborer de nouveaux matériaux hybrides en incorporant des nanoparticules (NPs) métalliques dans une matrice protéique de fibroïne (issue de la soie). Depuis peu, des matériaux hybrides comportant des NPs métalliques et des biopolymères (collagène, fibroïne, polysaccharides...) voient le jour, le but étant d'explorer leurs nouvelles propriétés mécaniques, magnétiques ou optiques. Les caractéristiques de la soie, telles que sa biocompatibilité, sa résistance mécanique, ses propriétés optiques, ainsi que la possibilité d'en obtenir de grandes quantités via la production des vers à soie (sans être une ressource alimentaire) en font une matrice de choix.

Des matrices polymériques à base de fibroïne piégeant des colloïdes métalliques seront donc préparées afin d'être utilisées dans le domaine très appliqué de la dépollution. Ces « filtres » protéiques seront optimisés pour le piégeage et la concentration des polluants ainsi que pour leur détection via les nano particules métalliques. Ce projet est effectué en collaboration avec E Guénin (TIMR, UTC) et est soutenu par un chercheur postdoctoral qui nous a rejoints en Juin 2022. Ce projet fait suite aux travaux de thèse de C. Belda Marin ^{40,41}.

Il existe différentes méthodologies efficaces pour la dépollution de l'eau, telles que la précipitation, la floculation, l'échange d'ions, la filtration, et l'adsorption. Cependant ces méthodes restent peu efficaces pour éliminer des polluants présents à faible concentration. C'est pourquoi, dans ce projet, nous nous sommes intéressés à l'adsorption de polluants dans des matrices de fibroïne, couplée à leur détection par SERS. Une matrice idéale doit présenter des capacités d'adsorption élevées, être biodégradable, facile à régénérer et recyclable. En effet, le charbon actif qui est le matériau adsorbant le plus utilisé doit être éliminé une fois chargé en polluant, ce qui pose de nouveaux problèmes de pollution. Cette préoccupation concernant la régénération des adsorbants fait l'objet de nombreuses recherches et implique de nouvelles stratégies d'élimination des polluants (la plupart du temps thermique ou par oxydo-réduction) ⁴². La fibroïne ayant déjà montré sa capacité à absorber des colorants aromatiques anioniques ⁴³ et des métaux lourds ⁴⁴ a été choisie comme matrice polymérique pour la mise au point de ce dispositif.

Ces hydrogels de soie dopés en NPs seront donc utilisés pour piéger, concentrer, détecter et dégrader les polluants, ce qui permet d'envisager une procédure de traitement de l'eau en continu. Les NPs métalliques incorporées joueront le double rôle de détection et de dégradation du polluant *in situ*.

Hydrogels de soie

De la même façon que l'on fabrique des fibres de rayonne à partir de la cellulose, il est possible de préparer de nouveaux matériaux avec la soie comme matière première. Pour préparer de la fibroïne régénérée, il faut partir des cocons de soie, c'est-à-dire de la bave constituée des 2 fibres de fibroïnes entourées de séricine (voir partie B). La fibre préalablement décreusée dans une solution savonneuse (Na_2CO_3) portée à ébullition est solubilisée en milieu ionique concentré (typiquement le LiBr 9M) et « désalée » par dialyse. A partir de la solution aqueuse de fibroïne obtenue, il est possible de fabriquer différents types d'objets selon les applications visées (Figure 23).

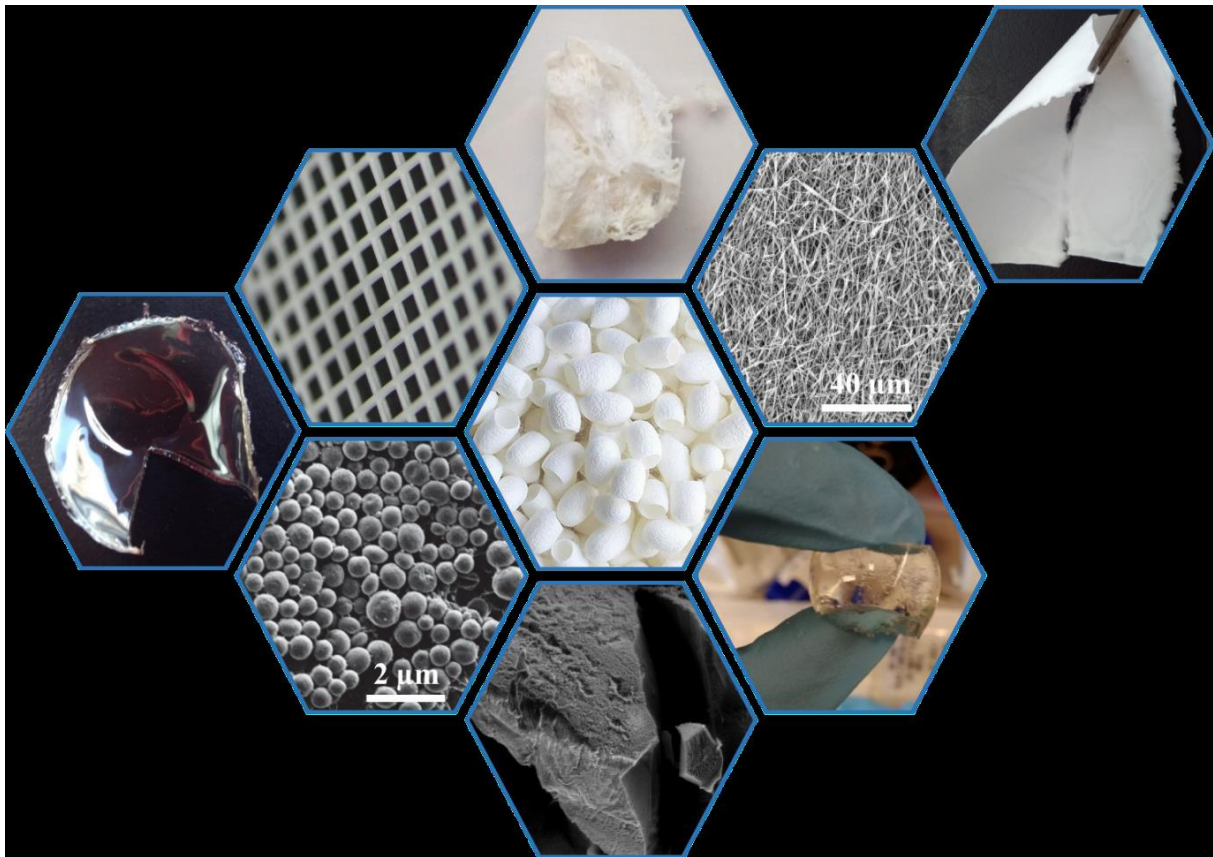


Figure 23 : Présentation d'objets de différentes morphologies pouvant être obtenus à partir d'une solution de fibroïne ⁴⁵.

Les hydrogels sont particulièrement pertinents dans un contexte de dépollution. En effet, ils présentent des propriétés mécaniques intéressantes, une capacité à gonfler dans l'eau ainsi que des possibilités de fonctionnalisation. La formation d'hydrogels de soie consiste en un réarrangement des molécules de fibroïne pour former une structure manipulable. De nombreux protocoles ont été décrits dans la littérature pour contrôler leur formation et ajuster leurs caractéristiques. Les principales procédures comprennent la gélification induite par des moyens physiques et chimiques. Les protocoles de gélification physique impliquent la sonication de la solution (en présence de sel), l'application d'un courant électrique ou la diminution du pH ^{46,47}. Cependant, pour fabriquer un hydrogel plus résistant, la gélification chimique *via* de nouvelles liaisons covalentes est plus adaptée. Les protocoles de gélification par réticulation chimique incluent la plupart du temps l'utilisation d'enzymes telles que les oxydases, les phosphatases, les transglutaminases ou les peroxydases ⁴⁸. La réticulation enzymatique présente de nombreux avantages. Elle est notamment très spécifique, ce qui permet un bon contrôle du produit de la réaction. Dans ce projet, nous utiliserons la peroxydase de raifort (HRP). L'utilisation de cette enzyme pour réticuler des peptides, des polysaccharides et des polymères a été largement décrite dans la littérature ⁴⁹⁻⁵¹.

Les aérogels présentent également un intérêt pour les applications de dépollution et de détection visées, notamment pour la dépollution de l'air. Les aérogels sont des matériaux poreux de très faible densité qui résultent du remplacement du composant liquide d'un hydrogel par un gaz. Les aérogels de soie sont généralement produits par lyophilisation d'une solution de fibroïne ou d'un hydrogel et présentent un échafaudage poreux en 3D. La taille et la distribution des pores peuvent être ajustées

en contrôlant la procédure de congélation précédant la lyophilisation, notamment la croissance des cristaux de glace ⁵².

Le bleu de méthylène (BM) est un colorant cationique très utilisé par l'industrie et souvent utilisé comme colorant modèle pour de nombreuses applications de dépollution. Dans un premier temps, les capacités d'adsorption des hydrogels de soie préparés ont donc été évaluées en mesurant l'adsorption de MB en milieu aqueux. L'interaction entre le bleu de méthylène et le réseau de fibroïne est majoritairement électrostatique ⁴⁰.

Les capacités maximum d'adsorption du MB par la soie ont été évaluées et comparées à d'autres matrices (Tableau 2).

Substrats	Capacité maximale d'adsorption du BM (mg/g)	Références
Hydrogel de soie	26	40
Hydrogel polyacrylamide/dextrane sulfate	19	53
Montmorillonite/chitosane	530	54
Charbon actif	270	55

Tableau 2 : Exemples de substrat utilisés pour le piégeage du bleu de méthylène (BM)

Les hydrogels de soie préparés sont efficaces pour le piégeage du colorant modèle MB. De plus, l'hydrogel peut être régénéré et réutilisé par simple immersion dans une solution acide. Ces capacités d'adsorption seront mises à profit pour la pré-concentration de polluants présents à l'état de traces, en vue de leur analyse et de leur élimination.

Préparation de matériaux hybrides soie / NPs

Dans ce projet, nous souhaitons exploiter les propriétés de la matrice de fibroïne pour le piégeage et la concentration des polluants, ainsi que la double capacité des NPs à détecter et dégrader le polluant. En effet, les NPs, qui présentent un rapport surface/volume élevé, sont utilisées comme catalyseur, notamment pour la dégradation des colorants ⁵⁶⁻⁵⁸.

En vue des applications visées, différentes caractéristiques sont nécessaires. Les NPs choisies doivent être faciles à préparer, faiblement toxiques, elles doivent se répartir de façon homogène dans la matrice protéique, présenter des propriétés plasmoniques et, idéalement, catalytiques. Des propriétés antibactériennes sont aussi pertinentes pour des applications en phase aqueuse.

Les NPs choisies seront à base d'argent et d'or, ces métaux présentant la plupart des propriétés requises. Pour ce qui est des synthèses, les plus simples impliquent un sel métallique, un agent réducteur, un solvant et un agent stabilisateur (pour éviter l'agrégation des NPs). Les agents réducteurs et stabilisateurs jouent un rôle clé dans le contrôle de la taille et de la forme des NPs obtenues, ainsi que sur leur chimie de surface. Ils ont donc un effet important sur les propriétés finales, notamment la dispersion dans la matrice. Différentes méthodes et une variété de molécules ont été utilisées comme agents réducteurs pour la synthèse de NPs métalliques en phase aqueuse. En vue d'une post-fonctionnalisation par chimie « Click », le choix a été fait de mettre au point des NPs avec des insaturations en bout de chaîne. Une synthèse a donc été développée par l'équipe d'E. Guénin, en utilisant une réaction one-pot, impliquant la réduction du sel d'or (HAuCl₄), par l'ascorbate de sodium, en présence de l'acide (1-hydroxy-1-phosphonohept-6-ynyl) phosphonique (HMBP-C≡CH) comme agent stabilisant ^{41,59}. Cette méthode permet la synthèse de NPs décorées de

phosphonate directement dans l'eau avec un ligand biocompatible, sans procédure d'échange de ligands. L'acide (1-hydroxy-1-phosphonohept-6-ynyl) phosphonique (HMBP-C≡CH) a été choisi comme agent stabilisant en raison de la possibilité d'utiliser la chimie click simple pour fonctionnaliser les NPs par la suite (Figure 24).

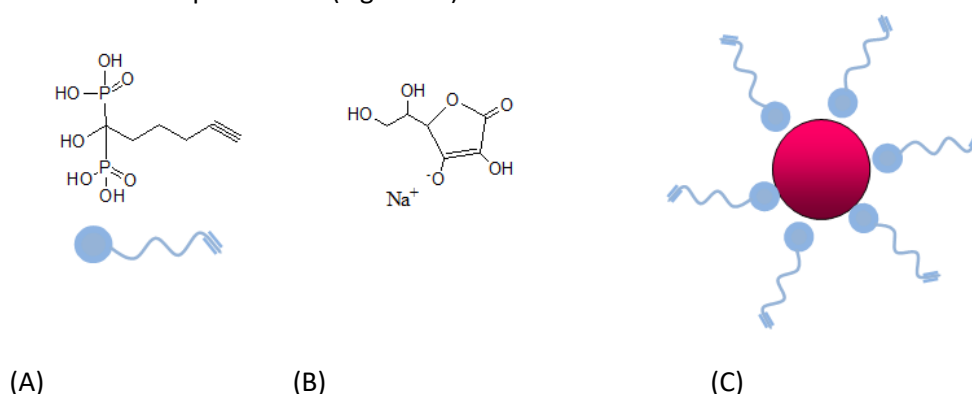


Figure 24 : Structures chimiques de HMBP-C≡CH (A) et de l'ascorbate de sodium (B), et schéma des NPs obtenues (C)

Les NPs d'Or obtenues par cette voie de synthèse sont sphériques, avec une distribution de taille étroite (diamètre moyen de $4,66 \pm 1,24$ nm). Les NPs d'argent (Ag NPs) synthétisées en utilisant une méthodologie similaire sont également sphériques (diamètre moyen de $23,3 \pm 5,4$ nm)⁴¹. Les NPs d'or et d'argent synthétisées dans ces conditions présentent un potentiel zêta négatif à pH 7 (environ -45mV pour les 2 familles de NPs). Ceci permet d'éviter l'agrégation des NPs et peut être à l'origine d'interactions électrostatiques avec le milieu environnant. Parallèlement, des colloïdes d'argent de Lee Meisel avec des ligands 2-oxomalonate, déjà reconnus pour leur efficacité en SERS sont aussi piégés dans les hydrogels³⁹.

Dans un premier temps, les NPs les plus efficaces pour la détection de BM en solution aqueuse sont identifiées. Ces NPs sont alors incorporées dans l'hydrogel pour les applications de détection visées. Les différentes NPs sont directement mélangées aux solutions de fibroïne avant l'étape de réticulation^{41,51}. Des hydrogels fibroïne/NPs sont alors obtenus. A l'œil, on constate que les NPs d'or et d'argent sont bien dispersées dans l'hydrogel. L'absence d'agrégation dans ces conditions est confirmée par spectroscopie UV-Visible (Figure 25).



Figure 25 : Hydrogels de soie chargés avec différentes NPs

Cette méthodologie a permis la production de divers hydrogels contenant jusqu'à 20 % en poids de NPs. Aucun changement de morphologie de l'hydrogel n'a été observé et la conformation de la fibroïne n'est pas affectée. Les NPs sont dispersées de façon homogène dans la matrice organique. Seul le gonflement de l'hydrogel est modifié par la présence des NPs, et diminue de moitié dans certains cas. Le biocomposite est stable et aucun relargage de NPs n'a été observé après 6 semaines dans de l'eau déminéralisée.

Les biocomposites préparés sont actuellement testés et optimisés en vue d'une concentration et d'une détection du polluant modèle BM par spectrométrie Raman exaltée (SERS), en utilisant les capacités plasmoniques des NPs piégées. Dans une deuxième étape, la dégradation du polluant sera envisagée pour une réutilisation en continu de ces filtres.

Bibliographie

- (1) Nie, S.; Emory, S. R. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science* **1997**, *275* (5303), 1102–1106. <https://doi.org/10.1126/science.275.5303.1102>.
- (2) Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G.; Meyer, M. Enhancement Factor Distribution around a Single Surface-Enhanced Raman Scattering Hot Spot and Its Relation to Single Molecule Detection. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125* (20), 204701. <https://doi.org/10.1063/1.2390694>.
- (3) Fleischmann, M.; Hendra, P. J.; McQuillan, A. J. Raman Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *26* (2), 163–166. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(74\)85388-1](https://doi.org/10.1016/0009-2614(74)85388-1).
- (4) Jeanmaire, D. L.; Van Duyne, R. P. Surface Raman Spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, Aromatic, and Aliphatic Amines Adsorbed on the Anodized Silver Electrode. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1977**, *84* (1), 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(77\)80224-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(77)80224-6).
- (5) Albrecht, M. G.; Creighton, J. A. Anomalously Intense Raman Spectra of Pyridine at a Silver Electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (15), 5215–5217. <https://doi.org/10.1021/ja00457a071>.
- (6) Moskovits, M. Surface Roughness and the Enhanced Intensity of Raman Scattering by Molecules Adsorbed on Metals. *J. Chem. Phys.* **1978**, *69* (9), 4159–4161. <https://doi.org/10.1063/1.437095>.
- (7) Le Ru, E.; Etchegoin, P. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy - 1st Edition*; Elsevier, 2008.
- (8) Campion, A.; Kambhampati, P. Surface-Enhanced Raman Scattering. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27* (4), 241–250. <https://doi.org/10.1039/A827241Z>.
- (9) Joyce, G. F. The Antiquity of RNA-Based Evolution. *Nature* **2002**, *418* (6894), 214–221. <https://doi.org/10.1038/418214a>.
- (10) Vergne, J.; Dumas, L.; Décout, J.-L.; Maurel, M.-C. Possible Prebiotic Catalysts Formed from Adenine and Aldehyde. *Planet. Space Sci.* **2000**, *48* (11), 1139–1142. [https://doi.org/10.1016/S0032-0633\(00\)00087-8](https://doi.org/10.1016/S0032-0633(00)00087-8).

- (11) Grajcar, L.; Baron, M.-H. A SERS Probe of Adenyl Residues Available for Intermolecular Interactions. Part I—Adenyl ‘Fingerprint.’ *J. Raman Spectrosc.* **2001**, *32* (11), 912–918. <https://doi.org/10.1002/jrs.760>.
- (12) Harroun, S. G. The Controversial Orientation of Adenine on Gold and Silver. *Chemphyschem Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.* **2018**, *19* (9), 1003–1015. <https://doi.org/10.1002/cphc.201701223>.
- (13) Hayatsu, R. Orgueil Meteorite: Organic Nitrogen Contents. *Science* **1964**, *146* (3649), 1291–1293. <https://doi.org/10.1126/science.146.3649.1291>.
- (14) Stoks, P. G.; Schwartz, A. W. Uracil in Carbonaceous Meteorites. *Nature* **1979**, *282*, 709–710. <https://doi.org/10.1038/282709a0>.
- (15) Shapiro, R. The Prebiotic Role of Adenine: A Critical Analysis. *Orig. Life Evol. Biosphere J. Int. Soc. Study Orig. Life* **1995**, *25* (1–3), 83–98. <https://doi.org/10.1007/BF01581575>.
- (16) Glavin, D. P.; Alexander, C. M. O.; Aponte, J. C.; Dworkin, J. P.; Elsila, J. E.; Yabuta, H. The Origin and Evolution of Organic Matter in Carbonaceous Chondrites and Links to Their Parent Bodies. In *Primitive Meteorites and Asteroids*; Elsevier, 2018; pp 205–271. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813325-5.00003-3>.
- (17) Percot, A.; Zins, E.-L.; Al Araj, A.; Ngo, A.-T.; Vergne, J.; Tabata, M.; Yamagishi, A.; Maurel, M.-C. Detection of Biological Bricks in Space. The Case of Adenine in Silica Aerogel. *Life Basel Switz.* **2019**, *9* (4), 82. <https://doi.org/10.3390/life9040082>.
- (18) Lafuente, B.; Navarro, R.; Sansano, A.; Rull, F. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for Identifying Traces of Adenine in Different Mineral and Rock Samples. **2012**, 904.
- (19) Caporali, S.; Moggi-Cecchi, V.; Muniz-Miranda, M.; Pagliai, M.; Pratesi, G.; Schettino, V. SERS Investigation of Possible Extraterrestrial Life Traces: Experimental Adsorption of Adenine on a Martian Meteorite. *Meteorit. Planet. Sci.* **2012**, *47* (5), 853–860. <https://doi.org/10.1111/j.1945-5100.2012.01361.x>.
- (20) Veneranda, M.; Sanz-Arranz, A.; Prieto Garcia, C.; Manrique, J. A.; Prieto Ballesteros, O.; Charro, E.; Lopez, J. M.; Gonzalez, M. A.; Rull, F.; Lopez-Reyes, G. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for Astrobiology Research: Defining the Optimal Approach for Future Planetary Exploration Missions; 2022; p 1019.
- (21) Tanner, N. K. Ribozymes: The Characteristics and Properties of Catalytic RNAs. *FEMS Microbiol. Rev.* **1999**, *23* (3), 257–275. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00399.x>.
- (22) Grajcar, L.; Huteau, V.; Huynh-Dinh, T.; Baron, M.-H. A SERS Probe for Adenyl Residues Available for Intermolecular Interactions. Part II—Reactive Adenyl Sites in Highly Diluted DNA. *J. Raman Spectrosc.* **2001**, *32* (12), 1037–1045. <https://doi.org/10.1002/jrs.796>.
- (23) Percot, A.; Lecomte, S.; Vergne, J.; Maurel, M.-C. Hairpin Ribozyme Catalysis: A Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Study. *Biopolymers* **2009**, *91* (5), 384–390. <https://doi.org/10.1002/bip.21143>.
- (24) Troalen, L. G. Historic Dye Analysis: Method Development and New Applications in Cultural Heritage, 2013.
- (25) Cole, C.; Heald, S. The History and Analysis of Pre-Aniline Native American Quillwork Dyes. *Text. Soc. Am. Symp. Proc.* **2010**.
- (26) Cardon, D.; Chatenet, G. D. *Guide des teintures naturelles: plantes, lichens, champignons, mollusques et insectes*; Delachaux et Niestlé, 1990.

- (27) Salaün, L.; Cotto, K. Y. La recherche scientifique au service des collections muséographiques du Port-musée de Douarnenez. *Ann. Bretagne Pays L'Ouest Anjou Maine Poitou-Charente Touraine* **2020**, No. 127, 159–166. <https://doi.org/10.4000/abpo.6323>.
- (28) Hyde, N.; Wolinsky, C. Fabric of History: Wool. *National Geographic Magazine*. 1988, pp 556–557.
- (29) Sanders, D.; Grunden, A.; Dunn, R. R. A Review of Clothing Microbiology: The History of Clothing and the Role of Microbes in Textiles. *Biol. Lett.* **2021**, *17* (1), 20200700. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2020.0700>.
- (30) Nguyen, D. C. Caractérisation de l'interface Fibre/Matrice. Application Aux Composites Polypropylène/Chanvre, Université de Technologie de Troyes, 2016.
- (31) Mather, R. R.; Wardman, R. H. *The Chemistry of Textile Fibres*; 2015.
- (32) kim, N. K.; Bhattacharyya, D.; Lin, R. Effects of Wool Fibres, Ammonium Polyphosphate and Polymer Viscosity on the Flammability and Mechanical Performance of PP/Wool Composites. *Polym. Degrad. Stab.* **2015**, *119*, 167–177. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2015.05.015>.
- (33) Baron, M.-H. Les Dessous de La Laine. *Déshabillez-Moi* **2008**, *42*, 19–30.
- (34) Yang, W.; Chao, C.; McKittrick, J. Axial Compression of a Hollow Cylinder Filled with Foam: A Study of Porcupine Quills. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 5297–5304. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.09.004>.
- (35) Baron, J. *Les Teintures*. <https://tice.ac-montpellier.fr/ABCDORGA/Famille3/TEINTURES.htm>.
- (36) Kechi, A.; Chavan, R. B.; Moeckel, R. Ethiopian Dye Plants As a Source of Natural Dyes for Cotton Dyeing. *Univers. J. Environ. Res. Technol.* **2013**, *3* (4), 501–510.
- (37) Pozzi, F.; Leona, M. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in Art and Archaeology. *J. Raman Spectrosc.* **2016**, *47* (1), 67–77. <https://doi.org/10.1002/jrs.4827>.
- (38) Sessa, C.; Steuer, C.; Quintero Balbas, D.; Sciutto, G.; Prati, S.; Stege, H. Analytical Studies on Commercial Artists' Colour Charts from Das Deutsche Farbenbuch (1925)—Identification of Synthetic and Natural Organic Colourants by Raman Microscopy, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Metal Underlayer ATR-FTIR Spectroscopy. *Herit. Sci.* **2022**, *10* (1), 109. <https://doi.org/10.1186/s40494-022-00740-3>.
- (39) Lee, P. C.; Meisel, D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86* (17), 3391–3395. <https://doi.org/10.1021/j100214a025>.
- (40) Belda Marín, C. Silk Bionanocomposites : Design, Characterization and Potential Applications. These de doctorat, Compiègne, 2020. <https://www.theses.fr/2020COMP2570> (accessed 2023-01-09).
- (41) Belda Marín, C.; Egles, C.; Humblot, V.; Lalatonne, Y.; Motte, L.; Landoulsi, J.; Guénin, E. Gold, Silver, and Iron Oxide Nanoparticle Incorporation into Silk Hydrogels for Biomedical Applications: Elaboration, Structure, and Properties. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2021**, *7* (6), 2358–2371. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00441>.
- (42) Ania, C. O.; Menéndez, J. A.; Parra, J. B.; Pis, J. J. Microwave-Induced Regeneration of Activated Carbons Polluted with Phenol. A Comparison with Conventional Thermal Regeneration. *Carbon* **2004**, *42* (7), 1383–1387. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2004.01.010>.
- (43) Aziz, S.; Sabzi, M.; Fattahi, A.; Arkan, E. Electrospun Silk Fibroin/PAN Double-Layer Nanofibrous Membranes Containing Polyaniline/TiO₂ Nanoparticles for Anionic Dye Removal. *J. Polym. Res.* **2017**, *24* (9), 140. <https://doi.org/10.1007/s10965-017-1298-0>.

- (44) Reizabal, A.; Costa, C. M.; Saiz, P. G.; Gonzalez, B.; Pérez-Álvarez, L.; Fernández de Luis, R.; Garcia, A.; Vilas-Vilela, J. L.; Lanceros-Méndez, S. Processing Strategies to Obtain Highly Porous Silk Fibroin Structures with Tailored Microstructure and Molecular Characteristics and Their Applicability in Water Remediation. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *403*, 123675. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123675>.
- (45) Belda Marín, C.; Fitzpatrick, V.; Kaplan, D. L.; Landoulsi, J.; Guénin, E.; Egles, C. Silk Polymers and Nanoparticles: A Powerful Combination for the Design of Versatile Biomaterials. *Front. Chem.* **2020**, *8*.
- (46) Rockwood, D. N.; Preda, R. C.; Yücel, T.; Wang, X.; Lovett, M. L.; Kaplan, D. L. Materials Fabrication from Bombyx Mori Silk Fibroin. *Nat. Protoc.* **2011**, *6* (10), 10.1038/nprot.2011.379. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.379>.
- (47) Fernández-García, L.; Marí-Buyé, N.; Barrios, J. A.; Madurga, R.; Elices, M.; Pérez-Rigueiro, J.; Ramos, M.; Guinea, G. V.; González-Nieto, D. Safety and Tolerability of Silk Fibroin Hydrogels Implanted into the Mouse Brain. *Acta Biomater.* **2016**, *45*, 262–275. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.09.003>.
- (48) Nezhad-Mokhtari, P.; Ghorbani, M.; Roshangar, L.; Soleimani Rad, J. Chemical Gelling of Hydrogels-Based Biological Macromolecules for Tissue Engineering: Photo- and Enzymatic-Crosslinking Methods. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *139*, 760–772. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.047>.
- (49) Khanmohammadi, M.; Dastjerdi, M. B.; Ai, A.; Ahmadi, A.; Godarzi, A.; Rahimi, A.; Ai, J. Horseradish Peroxidase-Catalyzed Hydrogelation for Biomedical Applications. *Biomater. Sci.* **2018**, *6* (6), 1286–1298. <https://doi.org/10.1039/c8bm00056e>.
- (50) Hoang Thi, T. T.; Lee, Y.; Phuong, L.; Park, K. Engineered Horseradish Peroxidase-Catalyzed Hydrogels with High Tissue Adhesiveness for Biomedical Applications. *J. Ind. Eng. Chem.* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.05.026>.
- (51) Partlow, B. P.; Hanna, C. W.; Rnjak-Kovacina, J.; Moreau, J. E.; Applegate, M. B.; Burke, K. A.; Marelli, B.; Mitropoulos, A. N.; Omenetto, F. G.; Kaplan, D. L. Highly Tunable Elastomeric Silk Biomaterials. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24* (29), 4615–4624. <https://doi.org/10.1002/adfm.201400526>.
- (52) Grenier, J.; Duval, H.; Barou, F.; Lv, P.; David, B.; Letourneur, D. Mechanisms of Pore Formation in Hydrogel Scaffolds Textured by Freeze-Drying. *Acta Biomater.* **2019**, *94*, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.070>.
- (53) Perju, M. M.; Dinu, M. V.; Dragan, E. S. Sorption of Methylene Blue onto Ionic Composite Hydrogels Based on Polyacrylamide and Dextran Sulfate: Kinetics, Isotherms, and Thermodynamics. *Sep. Sci. Technol.* **2012**, *47* (9), 1322–1333. <https://doi.org/10.1080/01496395.2012.672515>.
- (54) Kang, S.; Zhao, Y.; Wang, W.; Zhang, T.; Chen, T.; Yi, H.; Rao, F.; Song, S. Removal of Methylene Blue from Water with Montmorillonite Nanosheets/Chitosan Hydrogels as Adsorbent. *Appl. Surf. Sci.* **2018**, *448*, 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.04.037>.
- (55) Li, Y.; Du, Q.; Liu, T.; Peng, X.; Wang, J.; Sun, J.; Wang, Y.; Wu, S.; Wang, Z.; Xia, Y.; Xia, L. Comparative Study of Methylene Blue Dye Adsorption onto Activated Carbon, Graphene Oxide, and Carbon Nanotubes. *Chem. Eng. Res. Des.* **2013**, *91* (2), 361–368. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2012.07.007>.
- (56) Vanaja, M.; Paulkumar, K.; Baburaja, M.; Rajeshkumar, S.; Gnanajobitha, G.; Malarkodi, C.; Sivakavinesan, M.; Annadurai, G. Degradation of Methylene Blue Using Biologically Synthesized

Silver Nanoparticles. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2014**, *2014*, 742346. <https://doi.org/10.1155/2014/742346>.

- (57) Begum, R.; Najeeb, J.; Sattar, A.; Naseem, K.; Irfan, A.; Al-Sehemi, A. G.; Farooqi, Z. H. Chemical Reduction of Methylene Blue in the Presence of Nanocatalysts: A Critical Review. *Rev. Chem. Eng.* **2020**, *36* (6), 749–770. <https://doi.org/10.1515/revce-2018-0047>.
- (58) Luo, J.; Zhang, N.; Lai, J.; Liu, R.; Liu, X. Tannic Acid Functionalized Graphene Hydrogel for Entrapping Gold Nanoparticles with High Catalytic Performance toward Dye Reduction. *J. Hazard. Mater.* **2015**, *300*, 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.07.079>.
- (59) Afaure, R.; Buendia, R.; Motte, L.; Hardouin, J.; Lalatonne, Y.; Guénin, E. Versatile “Click” Synthesis of 1-Hydroxy-1,1-Methylenebisphosphonic Acids with Thioalkoxy Substituents for the Preparation of Stable Gold Nanoparticles. *New J Chem* **2017**, *41* (20), 12153–12158. <https://doi.org/10.1039/C7NJ02773G>.

PARTIE D – PERSPECTIVES

PARTIE D – PERSPECTIVES.....	100
1- Caractérisation des interactions substrats / analytes	102
1.1 Caractérisation des agrégats plasmoniques.....	102
1.2 Analyse des points chauds par super résolution.....	104
1.3 Orientation de l’analyte	105
2- Optimisation et développement de substrats SERS	106
Bibliographie.....	109

Introduction

Cette dernière partie présente les projets que je souhaite mener à bien dans le futur et concerne deux thématiques.

- La première est centrée sur une caractérisation spectroscopique par imagerie de super résolution des agrégats colloïdaux et de leurs interactions avec l'adénine. Ce travail se fera en collaboration avec A. Girard, maître de conférences au laboratoire MONARIS.
- La seconde porte sur le développement de nouveaux matériaux plasmoniques efficaces dans une large gamme du spectre électromagnétique. Ce travail se fera principalement en collaboration avec G. Simon, maître de conférences au laboratoire MONARIS.

1- Caractérisation des interactions substrats / analytes

1.1 Caractérisation des agrégats plasmoniques

Comme vu précédemment, l'exaltation du signal Raman provient de deux effets ; l'un qualifié de chimique, l'autre qualifié d'électromagnétique. Il est admis que la morphologie du substrat métallique utilisé influe fortement sur l'effet électromagnétique. Dans ce projet, nous chercherons à quantifier les agrégats actifs, puis à les caractériser, par microscopie électronique pour ce qui est de leur géométrie, et par mesure de leur plasmon de surface. Idéalement, nous chercherons à corréliser ces informations avec le facteur d'exaltation du signal SERS. A terme, cela pourrait permettre d'améliorer notre compréhension de l'amplification et d'optimiser les substrats, en triant les agrégats, notamment les colloïdes d'argent utilisés dans nos travaux précédents (colloïdes de Lee Meisel et de Creighton), très efficaces mais aussi très hétérogènes.

Comme mentionné, ce projet se fera en collaboration avec A. Girard (MCF au laboratoire MONARIS), en utilisant un appareil récemment développé par le laboratoire, dont le setup expérimental permet de travailler simultanément en luminescence et en Raman, avec une très bonne résolution spatiale et avec une détection EMCCD (electron multiplying CCD) très sensible. Un schéma de l'appareillage est présenté Figure 1.

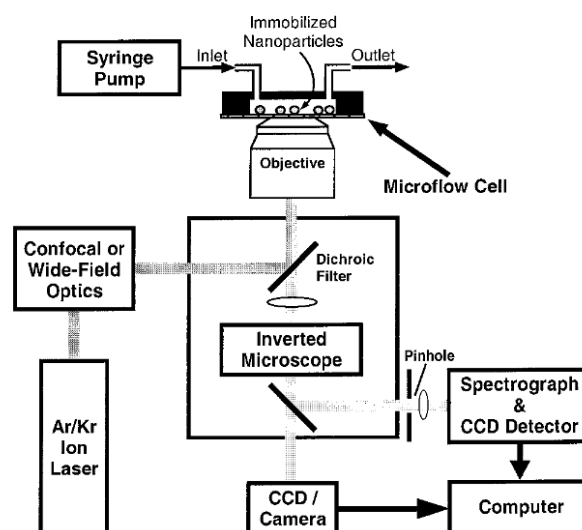


Figure 1 : Schéma de l'instrument permettant simultanément imagerie optique et spectroscopie pour l'observation en continu de nanoparticules immobilisées sous flux¹.

Pour la préparation de l'échantillon, opération critique, les nanoparticules seront déposées à partir d'une solution liquide colloïdale sur un substrat ITO (Indium Tin Oxide). Cela permettra ensuite de réaliser une analyse corrélative microscopie optique - SEM-FEG (Scanning Electron Microscopy - Field Emission Gun), avec localisation des agrégats, en vue de relier leur morphologie avec leurs propriétés SERS. En parallèle des mesures en microscopie électronique, la résonance du plasmon de surface de ces nanoparticules métalliques sera étudiée par des mesures de diffusion en champ sombre². Un des problèmes majeurs est le faible signal attendu pour ces objets isolés par rapport au signal du fond (*background*), ce qui peut être contourné grâce à l'utilisation d'une source blanche supercontinuum et d'un détecteur EMCCD très sensible.

Un microscope en configuration champ sombre (*dark-field*) sera utilisé, afin d'observer uniquement la diffusion des nano objets, sans contribution de l'absorption. Cela nécessite une excitation avec un grand angle incident via un objectif à grande ouverture numérique (NA), tandis que la lumière diffusée sera collectée aux petits angles, avec une lentille ayant une NA suffisamment petite pour ne pas capter la lumière réfléchiée par le substrat (Figure 2)¹.

Pour enregistrer en parallèle un spectre d'extinction individuel des différents agrégats, les nanoparticules seront isolées en fermant la fente d'entrée du spectromètre, et en centrant la fente sur l'agrégat d'intérêt. La lumière diffusée par chaque agrégat sera alors résolue et enregistrée sur un spectromètre équipé d'un détecteur EMCCD, en utilisant un 'beam splitter', et un réseau de diffraction (Figure2). L'ajustement de la fréquence d'excitations sur le maximum du Plasmon de Surface Localisé (PSL) de chaque agrégat sélectionné permettra une amplification locale du champ électrique et donc du signal SERS mesuré.

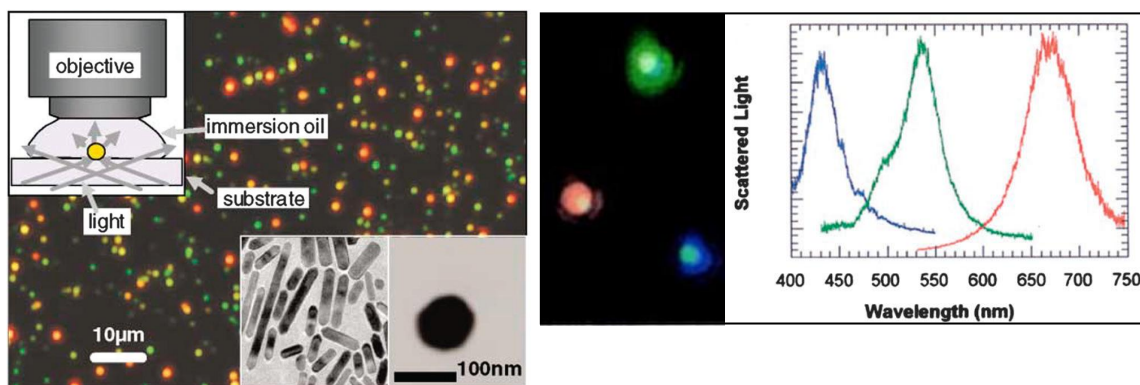


Figure 2 : (gauche) Image de nano batonnets d'or (rouge) et de nanosphères (60nm – vertes) collectée en configuration « dark field ». En insert, les images en TEM des nano objets correspondants. (droite) Image de diffusion en configuration « dark field » de nanoparticules d'argent en configuration « dark field » et les spectres associés².

Les spectres individuels des plasmons de surface pourront donc être mis en lien avec l'image SEM-FEG obtenues pour les mêmes agrégats. Le PSL pourra être corrélé à la géométrie des particules.

1.2 Analyse des points chauds par super résolution

Afin d'analyser plus précisément les agrégats et la présence ou non de points chauds, le même dispositif expérimental sera utilisé en ajoutant un analyte en solution aux agrégats préalablement déposés.

En pratique, avec ce dispositif, nous travaillerons dans une goutte de solution, en présence d'adénine et nous chercherons à accéder à la localisation des points chauds par microscopie SERS de super résolution. Un des challenges est la taille des « points chauds » au sein des agrégats de NP d'argent, qui est inférieure à la limite de diffraction optique, ce qui rend leur localisation impossible en optique traditionnelle. Cependant, l'utilisation d'algorithmes de super-résolution basés sur un ajustement gaussien du signal d'émission des molécules, permet de remonter à une cartographie indiquant la position relative de l'émetteur avec une précision de l'ordre de quelques dizaines de nm. En effet, K.A. Willet décrit dans une revue intitulée « Super-resolution imaging of SERS hot spots » les principes de base de l'imagerie à super-résolution des points chauds SERS en utilisant des molécules uniques pour sonder le champ électromagnétique local³. Comme expliqué précédemment, les calculs théoriques indiquent que les jonctions entre les nanoparticules adjacentes dans des structures agrégées produisent le plus grand champ électromagnétique, ce qui a conduit à une exaltation SERS préférentielle. Cela entraîne une amplification du signal Raman permettant d'aller jusqu'à la détection de molécules individuelles, qui est rendue plus accessible en imagerie qu'en spectrométrie puisque tout le signal SERS issu d'une molécule unique est intégré sur une zone de quelques pixels.

Cette méthodologie a été appliquée par Willets *et al.* à la détection de rhodamine 6G adsorbée sur des agrégats de colloïde d'argent⁴. Les agrégats d'argent et les molécules analysées sont luminescents. Le signal SERS intermittent, lié au passage d'une molécule dans le champ proche se superpose à la luminescence des agrégats d'argent et donne lieu à un saut d'intensité qui peut être séparé par analyse d'intensité grâce à la stabilité de la luminescence plasmonique. Pour améliorer la résolution spatiale, il sera indispensable d'utiliser un algorithme de super résolution qui permet d'obtenir une précision de la localisation de l'émetteur de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres. Des programmes libres de droits tels que Thunderstorm (basé sur l'utilisation du logiciel libre imageJ) permettent une analyse statistique automatisée et sont déjà disponibles.

Sur la Figure 3, on peut ainsi distinguer, à titre d'exemple, l'émission des nanoparticules et la contribution SERS, et relier ces cartographies aux images obtenues en microscopie électronique.

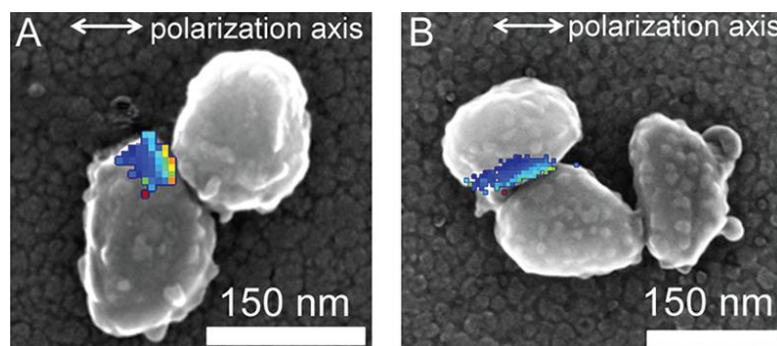


Figure 3 : Carte d'intensité spatiale SERS et image SEM correspondante pour une nanostructure (A) à simple jonction et (B) à double jonction. Les cartes d'intensité spatiale sont qualitativement superposées aux images SEM en fonction de la géométrie des nanoparticules⁴.

La luminescence nous permet donc de détecter l'analyte et les points chauds. Les nanoparticules présentant des points chauds et une activité SERS intense peuvent être isolées en fermant la fente d'entrée du spectromètre, et en centrant l'analyse sur la zone d'intérêt. Un spectre Raman peut alors être enregistré. On pourrait donc accéder au spectre SERS obtenu pour l'adénine, sur les différents points chauds identifiés.

1.3 Orientation de l'analyte

La détermination expérimentale de l'orientation spatiale des espèces, ou plus précisément des dipôles d'absorption / émission des molécules, a toujours été un sujet d'intérêt en biologie ou pour des applications photophysiques. Plusieurs techniques ont été développées en imagerie de fluorescence. Une des techniques implique la défocalisation de l'image, et l'utilisation d'un microscope à fluorescence conventionnel, équipé d'un Laser permettant une illumination en champ large sur un imageur CCD.

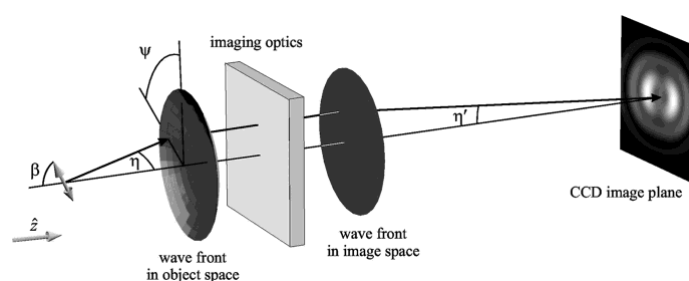


Figure 4 : Dispositif pour l'acquisition d'images défocalisées⁵. La molécule fluorescente (dipôle électrique oscillant) émet une lumière qui est collectée par une optique d'imagerie et imagée sur un CCD. Avec un léger mouvement de l'optique vers la molécule, l'image peut être défocalisée et conduire à des diagrammes d'émission qui contiennent l'information sur l'orientation de la molécule dans les 3 dimensions.

Un tel dispositif expérimental est compatible avec celui décrit précédemment ; il consiste en un microscope inversé (objectif à immersion, NA = 1.5) et une caméra EMCCD très sensible. L'illumination en champ large peut être effectuée avec un des Lasers disponibles au laboratoire (532, 638 ou 785 nm). La fluorescence peut être collectée par le même objectif, avec un filtre additionnel pour éliminer le background. L'adénine sera alors incubée en présence des nanoparticules préalablement déposées à très faible concentration. Les images de luminescence en excitation champ large, focalisée et défocalisée, seront obtenues en bougeant l'objectif (ou l'échantillon, via un transducteur piézoélectrique).

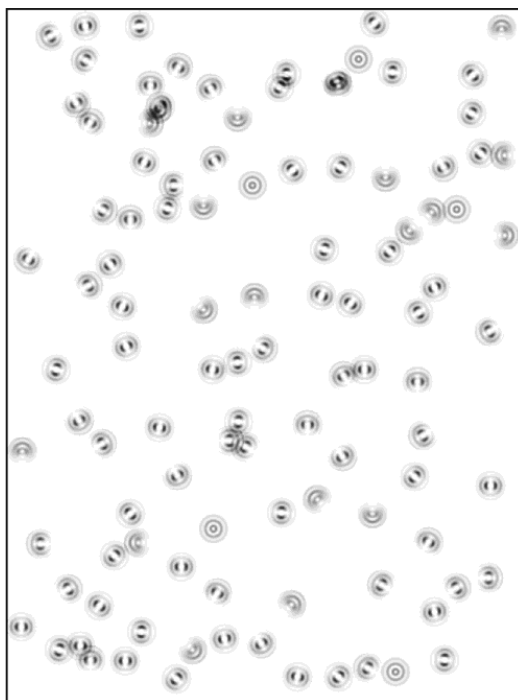


Figure 5 : Image défocalisée de molécules de colorant cyanine incorporées dans une matrice de PVA (alcool polyvinylique) sur du verre. La défocalisation est obtenue en déplaçant l'objectif de 1 μm vers l'échantillon. L'image préalablement nettoyée présente toutes les molécules identifiées et leur diagramme d'émission⁵.

Sur la Figure 5, on peut voir les diagrammes d'émission d'une centaine de molécules après défocalisation. Le diagramme d'émission des molécules isolées présentant un dipôle avec un axe parallèle à l'interface air/polymère est très sensible à la défocalisation. A partir des diagrammes d'émission mesurés et calculés, on pourra estimer l'orientation de l'analyte.

Ce dispositif, combiné au calcul des diagrammes d'émission orientation-dépendants, sera utilisé pour accéder à l'orientation de molécules d'adénine isolées adsorbées sur un substrat plasmonique. Il sera intéressant de voir l'effet de l'exaltation plasmonique sur l'image obtenue. Comme expliqué précédemment, cette image reflètera préférentiellement la contribution des molécules se situant sur les points chauds.

2- Optimisation et développement de substrats SERS

Outre les synthèses « classiques » de colloïdes utilisées dans les projets précédents, de nombreuses études concernent la mise au point de nanoparticules d'or ou d'argent présentant des formes, des tailles et des revêtements maîtrisés, afin d'optimiser les propriétés plasmoniques. Les nanoparticules en solution sont faciles à utiliser et souvent très efficaces. Cependant leur application, notamment dans le domaine de l'industrie, est limitée du fait du manque de reproductibilité (agrégation variable en fonction du temps écoulé depuis leur préparation). En effet l'optimisation des substrats SERS impose non seulement l'optimisation de l'exaltation du signal Raman mais aussi sa reproductibilité. Une certaine régularité des « points chauds » permet d'améliorer ce défaut.

D'autres voies de synthèses chimiques et physiques sont donc explorées par de nombreux groupes afin de préparer des substrats SERS déposés sous forme de nano-grilles et présentant un ordre à plus

longue distance, parfaitement reproductible. Différentes techniques ont été optimisées pour la fabrication de ces substrats : la lithographie sous faisceau d'électrons ou d'ions, d'autres types de lithographie (scanning probe, laser interference, nanosphere, nanoimprint...), le dépôt par voie chimique de film métallique d'argent sur des nanosphères⁶ ou des nano trous, des dépôts métalliques par évaporation thermique suivie de recuits⁷, l'évaporation sous faisceau d'électrons...

Dans ce projet, nous nous intéresserons au développement et à l'optimisation de substrats SERS efficaces. Nous nous focaliserons sur le développement de substrats plasmoniques utilisables dans les différentes régions du spectre électromagnétique (de l'UV à l'IR). En particulier, nous chercherons à étendre le domaine de détection au-delà du spectre visible, en utilisant différentes longueurs d'onde excitatrices:

- vers l'infrarouge pour s'adapter aux matériaux fortement fluorescents et fragiles, ce qui est recherché pour des analyses dans les contextes de la biologie et du patrimoine culturel,

- vers l'UV pour amplifier l'intensité du signal (dépendance théorique de l'intensité de la lumière diffusée en $1/\lambda^4$) et s'éloigner des phénomènes de luminescence. De plus, l'utilisation de longueurs d'ondes dans ce domaine permettra d'exploiter la résonance intrinsèque d'un grand nombre de chromophores (entraînant une amplification supplémentaire, due à la proximité des bandes d'absorption de l'analyte) et une augmentation de la résolution spatiale. L'excitation dans l'UV est rarement utilisée car elle demande un appareillage particulier et peut entraîner une photo-dégradation de l'échantillon. Cependant les avantages mentionnés ci-dessus et l'équipement d'un des spectromètres du laboratoire d'un dispositif permettant une excitation à 364 nm permettent d'envisager le développement du SERS à cette longueur d'onde. L'amplification du signal pourra être mise à profit pour la détection de molécules d'intérêt biologique de type acides nucléiques et acides aminés. Les spectromètres Raman associés aux missions spatiales présentent en effet souvent une longueur d'onde excitatrice dans l'UV ou proche UV.

Substrats commerciaux

Depuis quelques années, des substrats commerciaux sont disponibles sur le marché. Nous nous intéresserons à leur caractérisation, leur efficacité et leur interaction avec nos analytes, notamment l'adénine et les colorants naturels. Ces substrats présentent plusieurs géométries, des arrangements plus ou moins réguliers dans l'espace et sont à base de métaux purs ou bimétalliques. Les substrats commerciaux Klarite[®] commercialisés par Renishaw Diagnostic sont des substrats constitués de nano-puits dont les parois sont recouvertes d'un film mince d'or ou d'argent. D'autres tels que les substrats de Hamamatsu Photonics sont constitués de nano pointes couvertes d'or présentant un arrangement régulier ou irrégulier⁸. Ces substrats seront testés dans différentes régions du spectre électromagnétique.

Mise au point de nouveaux substrats SERS

Pour les applications impliquant une excitation à 1064 nm, des substrats plasmoniques SERS à base de NPs de sulfure de cuivre, d'or ou d'argent avec des tailles et des géométries contrôlées seront synthétisés au laboratoire MONARIS en collaboration avec les équipes d'A. Courty (Pr au laboratoire MONARIS) et C. Salzemann (MCF au laboratoire MONARIS) (Figure 6).

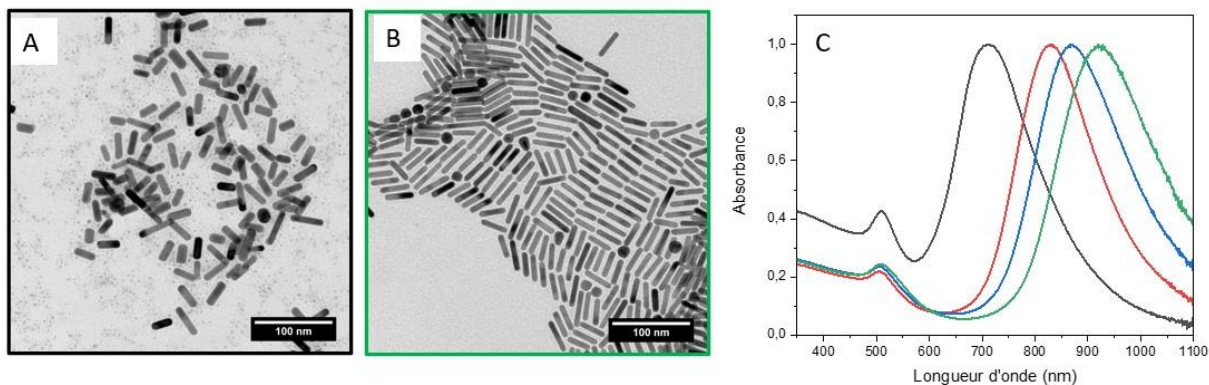


Figure 6 : Images TEM de nano-batonnets à base d'or synthétisés au laboratoire MONARIS avec différents ratios Longueur/diamètre (A et B) et spectres d'absorption associés (noir (A) et vert (B)) (Thèse en cours de Nada Khalfaoui Hassani).

D'autre part, de nouveaux substrats nano structurés sous forme de couche mince rugueuse seront déposés par évaporation par cellule d'effusion basse température, en collaboration avec A. Naitabdi (MCF au laboratoire LCP-MR). Les premiers supports seront à base d'or et d'argent. Dans un deuxième temps, des dépôts à base de rhodium et de ruthénium, plus inhabituels, seront effectués. Ces substrats métalliques joueront le double rôle de catalyseur et de senseur pour la détection (avec une augmentation de l'intensité Raman dans l'UV). Des applications *in operando* permettant le suivi de réactions catalytiques seront développées. Par la suite, des supports moins coûteux à base d'aluminium sont envisagés, par évaporation et recuit⁷.

Bibliographie

- (1) Doering, W. E.; Nie, S. Single-Molecule and Single-Nanoparticle SERS: Examining the Roles of Surface Active Sites and Chemical Enhancement. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106* (2), 311–317. <https://doi.org/10.1021/jp011730b>.
- (2) Olson, J.; Dominguez-Medina, S.; Hoggard, A.; Wang, L.-Y.; Chang, W.-S.; Link, S. Optical Characterization of Single Plasmonic Nanoparticles. *Chemical Society Reviews* **2015**, *44* (1), 40–57. <https://doi.org/10.1039/C4CS00131A>.
- (3) Willets, K. A. Super-Resolution Imaging of SERS Hot Spots. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (11), 3854–3864. <https://doi.org/10.1039/C3CS60334B>.
- (4) Willets, K. A.; Stranahan, S. M.; Weber, M. L. Shedding Light on Surface-Enhanced Raman Scattering Hot Spots through Single-Molecule Super-Resolution Imaging. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3* (10), 1286–1294. <https://doi.org/10.1021/jz300110x>.
- (5) Patra, D.; Gregor, I.; Enderlein, J. Image Analysis of Defocused Single-Molecule Images for Three-Dimensional Molecule Orientation Studies. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108* (33), 6836–6841. <https://doi.org/10.1021/jp048188m>.
- (6) Cardinal, M. F.; Ende, E. V.; Hackler, R. A.; McAnally, M. O.; Stair, P. C.; Schatz, G. C.; Duynes, R. P. V. Expanding Applications of SERS through Versatile Nanomaterials Engineering. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (13), 3886–3903. <https://doi.org/10.1039/C7CS00207F>.
- (7) Su, D.; Jiang, S.; Yu, M.; Zhang, G.; Liu, H.; Li, M.-Y. Facile Fabrication of the Configuration Controllable Self-Assembled Al Nanostructures as UV SERS Substrates. *Nanoscale* **2018**, *10*. <https://doi.org/10.1039/C8NR08555B>.
- (8) Azziz, A.; Safar, W.; Xiang, Y.; Edely, M.; Lamy de la Chapelle, M. Sensing Performances of Commercial SERS Substrates. *Journal of Molecular Structure* **2022**, *1248*, 131519. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131519>.