

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 596

Matière, Molécules, Matériaux

Spécialité : *Physique*

Par

Thomas LE NEEL

Nanoparticules d'or et plantes aquatiques : Interactions fondamentales et propriétés mécaniques

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 17 novembre 2021

Unité de recherche : Institut des Matériaux Jean Rouxel

Rapporteurs avant soutenance :

Michaël Molinari
Alexis Peaucelle

Professeur des Universités, CBMN, Université de Bordeaux
Chargé de recherche INRAe, Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles

Composition du Jury :

Président : Olivier Chauvet
Rapporteurs : Michaël Molinari
Alexis Peaucelle
Examinatrice : Claire Mangeney
Directrice de thèse : Patricia Bertoncini
Co-encadrant de thèse : Maxime Bayle

Professeur des Universités, Institut des Matériaux Jean Rouxel, Nantes
Professeur des Universités, CBMN, Université de Bordeaux
Chargé de recherche INRAe, Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles
Professeur des Universités, LCBPT, Université de Paris, Paris
Maître de conférences HDR, Institut des Matériaux Jean Rouxel, Nantes
Maître de conférences, Institut des Matériaux Jean Rouxel, Nantes

Remerciements

Après trois longues années consacrées à l'étude passionnante des interactions entre nanoparticules et plantes aquatiques, dont l'aboutissement est ce manuscrit, je tiens particulièrement à adresser mes sincères remerciements à de nombreuses personnes, sans qui ce travail n'aurait certainement pas été possible.

Je ne remercierai jamais assez mes encadrants de thèse, Patricia Bertoncini et Maxime Bayle, pour m'avoir proposé ce sujet et pour m'avoir si bien accompagné pendant ces trois ans. J'ai eu la chance de pouvoir réaliser de nombreuses expériences sur des équipements scientifiques de pointe extrêmement variés, à l'interface entre physique, chimie et biologie, et je leur en suis très reconnaissant. En plus de cela, leur présence constante et leur aide pour surmonter les fameuses « périodes plus délicates » de la thèse m'ont été très précieuses. Pour ces différentes raisons, je tenais, Maxime et Patricia, à vous dire un grand merci.

Ensuite, j'ai également une pensée pour Bernard Humbert, Hélène Terrisse, Stéphane Cuenot et Jean-Luc Duvail, pour m'avoir guidé et conseillé, de près ou de loin, tout au long de ma thèse, avec qui les discussions ont toujours été très agréables et instructives, ce qui a enrichi le présent manuscrit. De manière générale, je tiens à remercier l'ensemble des membres de PMN pour leur bonne humeur, et pour m'avoir si bien accueilli au sein de l'équipe.

Je remercie évidemment les membres du jury, qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail avec attention. Merci donc à M. Michaël Molinari et à M. Alexis Peaucelle d'avoir rempli le rôle de rapporteur, sans oublier Mme. Claire Mangeney qui a examiné le travail, et M. Olivier Chauvet qui a accepté de présider le jury. Lors de ma soutenance, j'ai particulièrement apprécié le moment scientifique d'échange et de discussion qui a suivi ma présentation, et je remercie donc l'ensemble du jury d'avoir rendu cela possible. Je remercie également M. Marc Lamy de la Chapelle et M. Wilfried Grange pour avoir officié comme membres de mon comité de suivi de thèse, et pour m'avoir bien conseillé lors de chacun de nos échanges.

Ce travail a été rendu possible grâce à l'aide précieuse de nombreuses personnes. J'aimerais ainsi remercier Jean-Yves Mévellec, pour sa connaissance encyclopédique des spectrométries Raman et infrarouge, Nicolas Stephant, pour m'avoir initié à la microscopie électronique à balayage, Eric Gautron et Nicolas Gautier pour leur aide en microscopie électronique en transmission, et Françoise Lari pour m'avoir si gentiment aidé à maintes reprises en salle de chimie. Merci enfin à Catherine Rochas et Isabelle Berthaud, pour m'avoir aidé sur le plan administratif, et à Guylaine Nicolas, rayon de soleil du laboratoire, dont la présence à l'accueil est indispensable à la bonne ambiance générale qui règne au sein de l'institut.

Une pensée également aux stagiaires, qu'on oublie malheureusement trop souvent alors qu'ils apportent une aide précieuse. Au cours de ma thèse, j'ai eu le plaisir de co-encadrer Pierre-Louis Martin, Adrien Surer, Angel Fortin et Thibault Legal. Ils ont largement fait leur part de travail dans les travaux présentés ici, et ils méritent donc leur part de reconnaissance. Merci à tous !

J'ai eu la chance de pouvoir faire de l'enseignement au cours de ma thèse, et pour cela, je tiens à remercier particulièrement M. Cyril Lupi et M. Dominique Leduc pour m'avoir fait confiance et pour avoir laissé le sort de nombreux étudiants entre mes mains.

Il est maintenant temps pour moi de remercier mes collègues doctorants, et en premier lieu Thibaud Guillemin qui, en qualité de collègue de bureau jamais présent, a été un soutien indéfectible, une source inépuisable d'amusements et de bons moments, et un des meilleurs souvenirs que je garderai de cette période de ma vie. Bon courage pour les quelques semaines qu'il te reste à faire, Thibaud, et merci beaucoup. Toujours chez les doctorants, merci à tous ceux que j'ai eu le plaisir de côtoyer : j'ai passé beaucoup de temps dans le bureau d'Angélique et Yuri, et je vais garder de nombreux souvenirs de légendaires cours de français qui y ont eu lieu. Un grand merci à Louis-Béni et à Michael, avec qui j'ai partagé mon bureau pendant deux ans, et qui ont été d'excellents compagnons d'aventure. Et merci, enfin, à Hélène, Nicolas, Youssef, Danylo et Anthony pour leur bonne humeur, leur dynamisme et leur profonde gentillesse.

Je n'oublierai pas Théo et Aurélie, mes amis du cours de japonais, ainsi que tous les autres, Clément, Nicolas, Arthur, Eva, Carole, Antoine et Jeremy, pour leur soutien, leur optimisme, et leur amitié. Merci, pour conclure, à ma famille, sans qui je ne serai évidemment pas là aujourd'hui ; merci en particulier à mon frère, Arthur, et à mes parents.

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 1 : Etat de l'art.....	5
1.1. Nanoparticules d'or	6
1.1.1. Propriétés plasmoniques des nanoparticules d'or	7
1.1.2. Tailles et formes des nanoparticules d'or.....	10
1.1.3. Choix des nanoparticules d'or	12
1.2. Echantillons biologiques : plante aquatique <i>Egeria Densa</i>	13
1.2.1. Constituants et propriétés de cellules végétales.....	13
1.2.1.1. Structure d'une cellule végétale.....	13
1.2.1.2. Présentation de la plante aquatique <i>Egeria Densa</i>	16
1.2.2. Evolution des propriétés biologiques de plantes en contact avec des nanoparticules d'or fonctionnalisées	18
1.3. Techniques de caractérisation utilisées.....	20
1.3.1. Microscopie à force atomique (AFM).....	20
1.3.2. Microscopie électronique en transmission (MET) et à balayage (MEB).....	24
1.3.3. Spectrométrie de diffusion Raman	29
1.3.4. Spectroscopie d'absorption UV-visible.....	32
1.4. Conclusion.....	33
1.5. Bibliographie	34
Chapitre 2 : Synthèse et fonctionnalisation de nanoparticules d'or	43
2.1. Synthèse des nanoparticules d'or.....	45
2.1.1. Caractérisations optiques et structurales.....	50
2.1.1.1. Structure, taille et forme des nanoparticules synthétisées.....	51
2.1.1.2. Propriétés plasmoniques des nanoparticules synthétisées	57
2.1.2. Impact de la durée de synthèse.....	59
2.2. Fonctionnalisation des nanoparticules d'or.....	61
2.2.1. Présentation des molécules utilisées pour le greffage.....	61
2.2.2. Protocole de fonctionnalisation.....	65
2.2.3. Contrôle de la fonctionnalisation	66
2.2.3.1. D'un agglomérat de particules vers une suspension colloïdale stable.....	66

2.2.3.2.	Caractérisation par S(TEM) et STEM iDPC	67
2.2.3.3.	Détection de la liaison covalente or-soufre par spectrométrie Raman.....	68
2.2.4.	Effet SERS	70
2.3.	Conclusion	74
2.4.	Bibliographie	75

Chapitre 3 : Propriétés mécaniques de la paroi de cellules de feuilles d'*Egeria Densa* en présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées.....79

3.1.	Protocole expérimental.....	80
3.1.1.	Préparation des échantillons	81
3.1.2.	Mesures d'indentation par AFM	87
3.2.	Propriétés mécaniques de la paroi végétale d' <i>Egeria Densa</i> en présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées.....	93
3.2.1.	Détermination des modules de Young effectifs des cellules de feuilles d' <i>Egeria Densa</i> exposées ou non à des nanoparticules aux temps d'exposition de 4 h et 8 h.....	93
3.2.2.	Suivi en temps - étude cinétique	95
3.2.2.1.	Procédure expérimentale des prises de mesure	95
3.2.2.2.	Etude cinétique.....	96
3.2.2.3.	Fluctuations du module élastique effectif E^*	103
3.2.3.	Propriétés mécaniques des cellules après une phase d'exposition à des nanoparticules d'or fonctionnalisées.....	105
3.3.	Conclusion	109
3.4.	Bibliographie	110

Chapitre 4 : Etude des propriétés mécaniques des cellules de feuilles d'*Egeria Densa* en profondeur113

4.1.	Mesures mécaniques hors du régime élastique	114
4.1.1.	Tomographie par AFM	116
4.1.2.	Acquisition et traitement des données.....	117
4.1.3.	Analyse mécanique en profondeur.....	118
4.1.3.1.	Cartographie en z.....	118
4.1.3.2.	Suivi temporel.....	122
4.2.	Signal Raman de cellules végétales.....	123
4.2.1.	Préparation des échantillons biologiques.....	123
4.2.2.	Choix de la longueur d'onde	125

4.2.3.	Déplacement du point focal	127
4.2.4.	Spectre Raman de la paroi végétale	127
4.2.5.	Spectre Raman des chloroplastes	129
4.2.6.	Détermination de l'épaisseur des cellules épithéliales	131
4.2.7.	Evolution des caractéristiques des signaux Raman de la paroi végétale et des chloroplastes en présence des nanoparticules d'or fonctionnalisées	132
4.2.8.	Localisation des nanoparticules d'or au sein des cellules	132
4.3.	Conclusion.....	133
4.4.	Bibliographie	134
Conclusion.....		137

Introduction

Depuis les années 1950, les nanotechnologies se sont imposées dans le monde scientifique comme une véritable révolution, permettant aux chercheurs de réaliser des prouesses technologiques encore inenvisageables il n'y a pas si longtemps. Ces avancées concernent des domaines aussi variés que l'électronique, avec la miniaturisation des transistors, les techniques de microscopie et de spectroscopie, avec l'étude de plus en plus précise des propriétés chimiques et structurales des matériaux, ou encore la nanotoxicologie, qui s'intéresse aux éventuelles conséquences que peuvent avoir les nanomatériaux sur la santé et sur l'environnement. Les nanomatériaux sont définis par la NNI (National Nanotechnology Initiative) comme étant « tous matériaux dont au moins une des trois dimensions est inférieure ou égale à 100 nm ». Pour un objet nanométrique, le nombre d'atomes en surface n'est plus négligeable par rapport au nombre d'atomes composant le volume du matériau, et les propriétés physico-chimiques, électroniques ou encore magnétiques s'en trouvent grandement modifiées. Ainsi, certains nanomatériaux ont été très largement étudiés en raison de leur potentiel pour la Recherche & Développement. Parmi ces matériaux, nous pouvons en citer quelques-uns étudiés au sein de l'équipe Physique des Matériaux et Nanostructures à l'Institut des Matériaux Jean Rouxel (IMN), comme les nanotubes de carbone, les nanopores de silice ou encore les nanoparticules d'or, qui vont tout particulièrement nous intéresser dans ce travail. Ces dernières peuvent en effet être fonctionnalisées avec différentes molécules pour des applications possibles dans le domaine du vivant.

Dans ce domaine, les cellules, les plus petites unités vivantes ayant la capacité de se reproduire de façon autonome, sont à la base de tout être vivant, qu'il soit animal ou végétal. Certains organismes ne contiennent qu'une seule cellule et sont dits unicellulaires, comme les bactéries. D'autres organismes extrêmement complexes, comme les animaux et les végétaux, en contiennent plusieurs centaines de milliards. Or, les cellules sont sensibles aux différentes tensions mécaniques auxquelles elles sont soumises, naturelles ou provoquées, provenant du milieu environnant, et peuvent parfois y réagir. On peut prendre un exemple aussi simple qu'une goutte d'eau tombant sur une feuille lors d'un orage et constituant une contrainte physique appliquée sur les cellules : afin de conserver son intégrité structurelle, la plante va naturellement modifier ses propriétés mécaniques intrinsèques. De même, la présence d'éléments toxiques peut entraîner des dégradations perceptibles de la plante (nécrose, modification du rendement de la photosynthèse, perturbation de la croissance...). La plante n'est toutefois pas démunie de mécanismes de défense, il est ainsi possible qu'elle élimine tout ou une partie des éléments toxiques, active ses mécanismes d'action antioxydant... Ainsi, les propriétés

physiques des cellules végétales, et notamment de leur paroi, leur permettent de faire face à différents types de stimuli, et l'étude de leurs réactions et modifications peut nous permettre d'accéder indirectement à leur état de santé. Cela présente un intérêt tout particulier dans le cas de l'utilisation de nanomatériaux dans des projets à visée thérapeutique, où l'on cherche à profiter du potentiel des nanomatériaux sans pour autant entraîner le moindre dégât sur l'échantillon. L'étude approfondie des interactions entre ces nano-objets et les cellules vivantes est donc de tout premier intérêt, que ce soit pour une utilisation contrôlée, ou pour anticiper de potentiels dangers en thérapie ou concernant d'éventuels risques alimentaires.

Afin d'étudier les nanomatériaux et leurs interactions avec le vivant, les instruments et techniques de caractérisations ont eux aussi évolué. Ainsi, pour l'observation des échantillons de plus en plus petits, les microscopes optiques ont été rejoints par des microscopes électroniques, permettant d'atteindre une bien meilleure résolution spatiale. De même, de nouveaux instruments, tels que les microscopes à champ proche (Microscope à effet tunnel (STM) et Microscope à Force Atomique (AFM)) ont été développés au cours des années 80. Les propriétés optiques des matériaux inhérentes à l'échelle nanométrique sont aujourd'hui également étudiées par spectroscopies vibrationnelles infrarouge et Raman. Ces méthodes permettent de détecter et d'identifier les vibrations moléculaires, parfois amplifiées par divers effets de résonances optiques et plasmoniques liés aux matériaux utilisés.

Ainsi, la compréhension des effets de la présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées sur les propriétés biologiques des plantes est indispensable pour pouvoir améliorer leur efficacité et leur utilisation en lien avec les problématiques actuelles de toxicologie, d'impact sur l'environnement et de *safer by design*. Ce dernier concept consiste en l'optimisation des caractéristiques d'un produit pour en limiter l'impact sur son environnement, et ce sur l'ensemble de son cycle de vie. Dans ce contexte, nous allons présenter une étude des propriétés mécaniques de cellules végétales de la plante aquatique *Egeria Densa* en présence ou non de nanoparticules d'or fonctionnalisées. L'objectif principal de cette thèse est d'approfondir la compréhension des modifications mécaniques que la présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées peut induire au sein d'une plante, afin de permettre à terme des applications mieux contrôlées aux conséquences mieux connues et comprises.

Nous avons choisi pour notre travail trois molécules de fonctionnalisation : l'acide 16-mercaptohexadécanoïque (MHDA), la L-Cystéine et Alexa Fluor 405, une molécule fluorescente. Nous avons greffé ces molécules aux nanoparticules d'or que nous avons au préalable synthétisées par une voie de synthèse verte (en utilisant un macérât de plante et sans ajout de surfactant). Après fonctionnalisation des nanoparticules d'or,

notre démarche est d'étudier les caractéristiques mécaniques des cellules présentes à la surface de la plante *Egeria Densa* en présence d'une concentration massique de nanoparticules d'or fonctionnalisées en introduisant une goutte de suspension de nanoparticules dans le milieu environnant la plante. Les signaux Raman des nanoparticules d'or fonctionnalisées et des cellules végétales ont également été étudiés.

Dans ce manuscrit, nous commencerons par décrire, dans le Chapitre 1, le cadre général d'étude des nanoparticules d'or et de leurs propriétés optiques, des systèmes biologiques et de l'architecture cellulaire, ainsi que les différents instruments de caractérisation que nous avons utilisés lors de l'étude. La méthode de synthèse permettant de produire des nanoparticules d'or anisotropes, ainsi que les analyses structurales et physico-chimiques des particules produites constitueront le cœur du Chapitre 2. Nous présenterons notamment une analyse complète des caractéristiques et propriétés des nanoparticules via une utilisation complémentaire de plusieurs techniques : microscopies électroniques, méthode statistique, spectroscopies d'absorption UV-visible et de diffusion Raman. Par la suite, nous nous concentrerons sur l'analyse des propriétés mécaniques des échantillons biologiques en présence des nanoparticules. Pour cela, nous avons utilisé la spectroscopie de force par microscopie à force atomique en mode cartographie de force. Nous nous intéresserons, dans le Chapitre 3, aux propriétés mécaniques de la paroi végétale des cellules, puis, dans le Chapitre 4, aux mesures réalisées avec des forces appliquées sur les échantillons permettant de sonder les propriétés mécaniques dans un volume plus important. Dans ce dernier chapitre, les mesures par AFM seront complétées par des mesures par spectroscopie de diffusion Raman. Pour finir, nous ferons un bilan des résultats obtenus et des méthodes utilisées, et donnerons des pistes quant aux perspectives possibles du travail.

Chapitre 1

Etat de l'art

1.1.	Nanoparticules d'or.....	6
1.1.1.	Propriétés plasmoniques des nanoparticules d'or	7
1.1.2.	Tailles et formes des nanoparticules d'or	10
1.1.3.	Choix des nanoparticules d'or.....	12
1.2.	Echantillons biologiques : plante aquatique <i>Egeria Densa</i>	13
1.2.1.	Constituants et propriétés de cellules végétales	13
1.2.2.	Evolution des propriétés biologiques de plantes en contact avec des nanoparticules d'or fonctionnalisées.....	18
1.3.	Techniques de caractérisation utilisées	20
1.3.1.	Microscopie à force atomique (AFM)	20
1.3.2.	Microscopie électronique en transmission (MET) et à balayage (MEB)	24
1.3.3.	Spectrométrie de diffusion Raman	29
1.3.4.	Spectroscopie d'absorption UV-visible	32
1.4.	Conclusion	33
1.5.	Bibliographie	34

Dans ce premier chapitre, l'objectif est de donner un cadre général à notre étude afin de contextualiser les expériences que nous avons réalisées et qui seront présentées dans les chapitres suivants. Nous allons nous intéresser aux principaux éléments constituant notre système d'étude à savoir les nanoparticules métalliques et les plantes aquatiques *d'Egeria Densa*. Notre travail traitant des interactions entre ces deux systèmes, nous allons les décrire séparément dans un premier temps. Ce chapitre sera également l'occasion de présenter les principales techniques expérimentales que nous avons utilisées lors des expériences.

Dans un premier temps, nous allons nous focaliser sur les nanoparticules métalliques. Nous aborderons quelques-unes de leurs utilisations passées et actuelles en particulier celles des nanoparticules d'or. En effet, celles-ci présentent de nombreuses propriétés physico-chimiques d'intérêt pour de nombreux champs d'applications, que nous présenterons. Bien évidemment, nous nous attarderons tout particulièrement sur leurs propriétés plasmoniques en partant des différences optiques entre l'or massif et l'or nanométrique.

Dans un deuxième temps, nous nous pencherons sur l'autre constituant de notre système d'étude, à savoir la plante aquatique *Egeria Densa*. Nous présenterons la structure d'une cellule végétale, la plante que nous avons utilisée dans nos travaux, ainsi que les différents types de cellules qui la composent. Puis, nous présenterons différentes études publiées sur les effets biologiques provoqués par les interactions entre des nanoparticules métalliques fonctionnalisées et des cellules végétales. Nous soulignerons ici l'intérêt de ces études, ainsi que leurs limites, pour déboucher sur l'intérêt d'étudier les propriétés mécaniques des cellules.

Enfin, nous terminerons ce chapitre par une présentation des principales techniques expérimentales utilisées lors de l'étude et dont les résultats de mesure seront montrés dans les chapitres suivants : la microscopie à force atomique, la microscopie électronique en transmission, la spectroscopie de diffusion Raman et la spectroscopie d'absorption UV-visible. Nous détaillerons pour chacune de ces techniques leur principe, ainsi que les dispositifs expérimentaux sur lesquels nous avons travaillé.

1.1. Nanoparticules d'or

Les nanoparticules métalliques sont utilisées depuis l'Antiquité par des artisans et artistes, principalement comme colorants dans des céramiques ou des verres. Un des objets les plus remarquables tirant profit des propriétés optiques de ces nanoparticules est la coupe de Lycurgue, premier exemple de nanotechnologie qui remonte au IV^{ème} siècle après J.C. Celle-ci contient des nanoparticules d'or et d'argent intégrées dans le verre. Observée avec une lumière extérieure à la coupe, celle-ci apparaît verte, alors qu'éclairée de l'intérieur, elle apparaît rouge. Cette curiosité provient de la diffusion de la lumière verte par les nanoparticules. En réflexion on observe la couleur diffusée verte, alors qu'en transmission on observe la couleur complémentaire c'est-à-dire le rouge.

Nous pouvons également citer la pourpre de Cassius, développée au XVII^{ème} siècle, qui est une solution d'or colloïdal d'un rouge intense utilisée pour colorer le verre[1], ou encore la rosace de la cathédrale Notre-Dame de Paris[2]. Ces différents objets sont montrés sur la Figure 1.1.

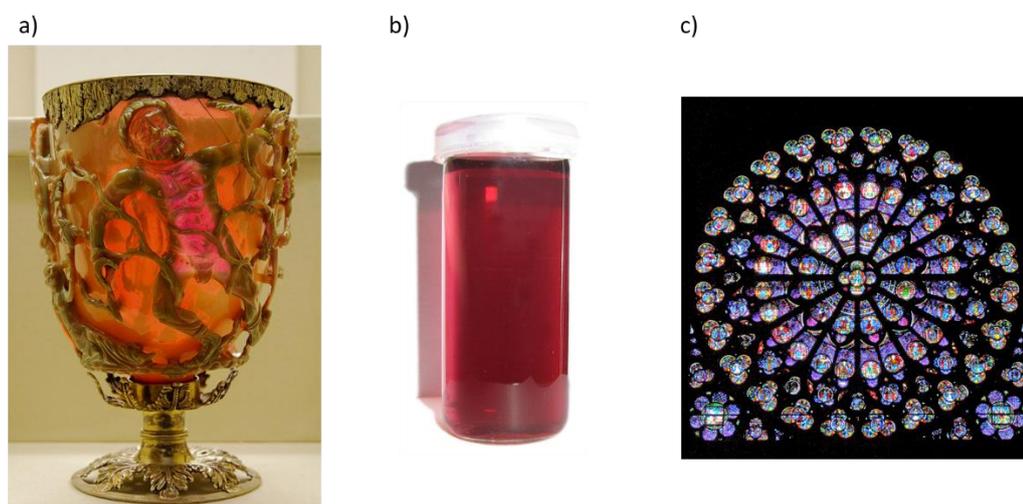


Figure 1.1 : Photographies de a) la Coupe de Lycurgue éclairée par l'intérieur, b) une suspension colloïdale de pourpre de Cassius et c) la Rose sud de Notre-Dame de Paris. Images tirées de [3], [4] et [5] respectivement.

Ainsi, d'une certaine manière, les propriétés des nanoparticules sont connues et utilisées depuis plusieurs siècles. Toutefois, les scientifiques n'ont commencé à véritablement s'intéresser aux différentes propriétés de ces particules, et aux différences entre l'or massif et l'or nanométrique que bien plus tard, dans la seconde moitié du XIX^{ème} siècle, et bien plus récemment avec le développement des techniques expérimentales permettant de les observer. De nos jours, nous disposons d'une grande quantité d'études sur les nanoparticules d'or, ce qui nous permet d'en recenser les principales propriétés.

1.1.1. Propriétés plasmoniques des nanoparticules d'or

Lorsqu'une onde électromagnétique interagit avec une nanoparticule métallique, le nuage électronique de la particule entre en mouvement, et se met à osciller en opposition au champ électrique. Les quanta d'oscillations collectives de ces électrons, qui sont ainsi confinés au voisinage de la nanoparticule, sont appelés plasmons localisés de surface[6], et sont à l'origine des propriétés optiques des nanoparticules. Sur la Figure 1.2, nous voyons ainsi que sous l'effet d'une onde électromagnétique de longueur d'onde bien supérieure à la dimension des particules, les électrons situés dans la bande de conduction, représentés en vert, vont se mettre à osciller collectivement.

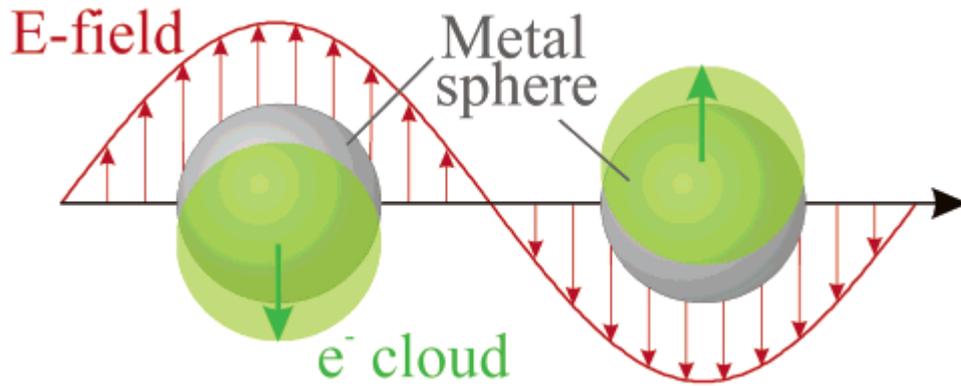


Figure 1.2 : Oscillation du nuage électronique dans le cas d'une sphère. La taille des particules est ici agrandie par souci de visibilité (d'après [7]).

L'intérêt de ce phénomène réside dans les propriétés optiques, et notamment du phénomène de résonance plasmonique, que nous allons à présent détailler.

Quand la fréquence de l'onde incidente est sensiblement égale à la fréquence propre d'oscillation du nuage électronique d'un métal, apparaît un phénomène de résonance, ayant pour conséquence l'exaltation locale du champ électrique : on parle alors de résonance plasmonique.

Lorsqu'on étudie les propriétés optiques d'un matériau, on utilise la fonction diélectrique $\varepsilon(\omega)$, avec ω la pulsation de l'onde, qui a, dans un premier temps, été décrite de façon simple par Paul Drude en 1900[8]. La principale approximation du modèle de Drude est de considérer que les ions, plus gros et lourds que les électrons, sont fixes. Les électrons se déplacent alors en ligne droite jusqu'à leur collision avec un ion. Ces collisions se produisent à une fréquence Γ , aussi appelée taux d'amortissement. Dans ce modèle, la fonction diélectrique d'un métal peut s'écrire sous la forme d'une somme d'une composante réelle ε' et d'une composante imaginaire ε'' :

$$\varepsilon_{Drude}(\omega) = \varepsilon'_{Drude} + i\varepsilon''_{Drude} = \left(1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \Gamma^2}\right) + i \frac{\Gamma \omega_p^2}{\omega(\omega^2 + \Gamma^2)},$$

avec ω_p la fréquence plasma du métal considérée telle que :

$$\omega_p = \sqrt{\frac{ne^2}{\varepsilon_0 m^*}}$$

avec n la densité électronique, e et m^* la charge et la masse effective d'un électron et ε_0 la permittivité du vide.

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 1.3, ce modèle décrit bien les valeurs de $\varepsilon(\omega)$ dans l'infrarouge pour de faibles énergies, mais s'en éloigne sensiblement en arrivant dans le domaine visible. En réalité, la fonction diélectrique inclut des contributions classiques (pouvant être décrites avec le modèle de Drude), mais également des contributions des transitions interbandes, c'est-à-dire le passage d'un électron de la

bande de valence vers un trou de la bande de conduction. L'impact de ces transitions interbandes est non négligeable. En effet, elles sont bien plus énergétiques que les transitions "intrabandes", engendrent une nette augmentation de l'absorption du matériau au-delà d'une valeur seuil dépendante du métal, et peuvent masquer la résonance plasmon. Il est donc important de s'intéresser à des matériaux dont le seuil de transitions interbandes ne recouvre pas cette résonance. C'est pourquoi les matériaux comme l'or et l'argent sont souvent utilisés en plasmonique car ils présentent un seuil de transition interbandes *ad hoc* (par exemple, pour l'or $E_{interbandes}(Au)=2,4$ eV, et pour l'argent $E_{interbandes}(Ag)= 3,9$ eV[9]). Sur la Figure 1.3, sont tracées les parties réelle et imaginaire théoriques de la fonction diélectrique de l'or, calculées avec le modèle de Drude (en pointillés), ainsi que celles issues de valeurs expérimentales tirées de Johnson et Christy[10]. On voit bien qu'aux faibles énergies le modèle de Drude rend bien compte des valeurs expérimentales, mais passée la valeur seuil d'environ 2,4 eV, le modèle s'écarte fortement de l'expérience, en particulier pour la partie imaginaire. Celle-ci étant directement liée à l'absorption, nous voyons nettement l'importance de prendre en compte les contributions des transitions interbandes les plus élevées possibles, afin de ne pas empiéter sur le domaine visible.

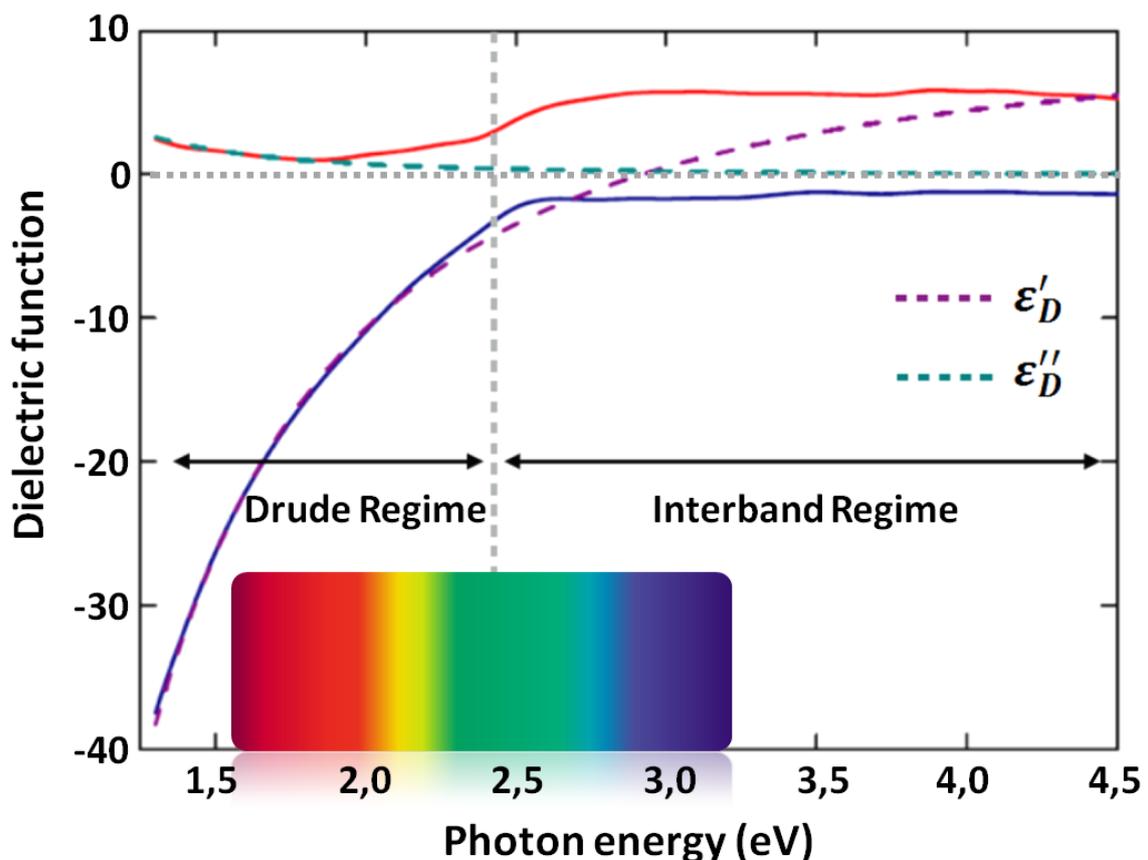


Figure 1.3 : Fonction diélectrique de l'or tracée en fonction de l'énergie d'un photon incident (d'après [11]).

1.1.2. Tailles et formes des nanoparticules d'or

Lorsque l'or n'est plus massif mais sous forme de nanoparticules, on peut montrer que la résonance de plasmon de surface localisée ou LSPR (pour Localized Surface Plasmon Resonance) s'exprime ainsi :

$$\omega_{LSPR} = \frac{\omega_p}{\sqrt{\varepsilon'_{interbande} + 2\varepsilon_m}}$$

avec ε_m la fonction diélectrique du milieu environnant, et $\varepsilon'_{interbande}$ la contribution des transitions interbandes à la fonction diélectrique de la particule. Le choix du matériau est donc bien crucial puisque le type de matériau impacte directement l'importance des transitions interbandes, et donc la position en fréquence de la LSPR.

L'étude rigoureuse de l'interaction entre une onde électromagnétique et une particule de taille non négligeable devant la longueur d'onde est généralement effectuée grâce à la théorie de Mie, développée par Gustav Mie au début du XX^{ème} siècle[12] mais que nous ne détaillerons pas ici. En plus du type de matériau, la taille et la forme des nanoparticules d'or revêtent une importance cruciale, car elles influent directement sur la position de la résonance plasmonique, ainsi que sur l'intensité du phénomène d'exaltation du champ électromagnétique. Un exemple est donné sur la Figure 1.4 : nous pouvons voir des images enregistrées par microscopie électronique à balayage (MEB), des photographies et des spectres d'extinction correspondant à différentes solutions de nanobâtonnets d'or de différents rapports d'aspect (rapport de la longueur sur la largeur du bâtonnet). Nous voyons que la couleur des solutions change, passant du vert pour un rapport d'aspect de 2,4 jusqu'à rouge pour un rapport d'aspect de 5,7. Cette évolution peut être quantifiée grâce aux spectres d'extinction pour lesquels on observe deux pics : l'un est systématiquement placé vers 520 nm, alors que l'autre dépend très nettement de la solution analysée.

Nous pouvons voir que le rapport d'aspect de 2,4 correspond à un maximum d'absorption sur le second pic à 650 nm, alors que le rapport d'aspect de 5,7 correspond lui à un maximum à 980 nm environ. Ainsi, il y a bien une dépendance de la résonance plasmonique à la taille et la forme des particules. La Figure 1.5 présente un schéma tout à fait analogue à celui de la Figure 1.2, mais dans le cas de nanobâtonnets, permettant d'expliquer l'impact du rapport d'aspect. Nous voyons qu'il existe deux contributions plasmoniques dépendantes de l'orientation des nanoparticules d'or par rapport au champ électrique : nous avons donc une résonance plasmonique longitudinale et une résonance plasmonique transversale. Ces deux résonances correspondent aux deux pics visibles pour chacun des échantillons sur la Figure 1.4c. Si nous élargissons à d'autres formes de nanoparticules anisotropes, nous pouvons imaginer sans mal que les positions et formes des pics peuvent grandement varier suivant les dimensions des particules.

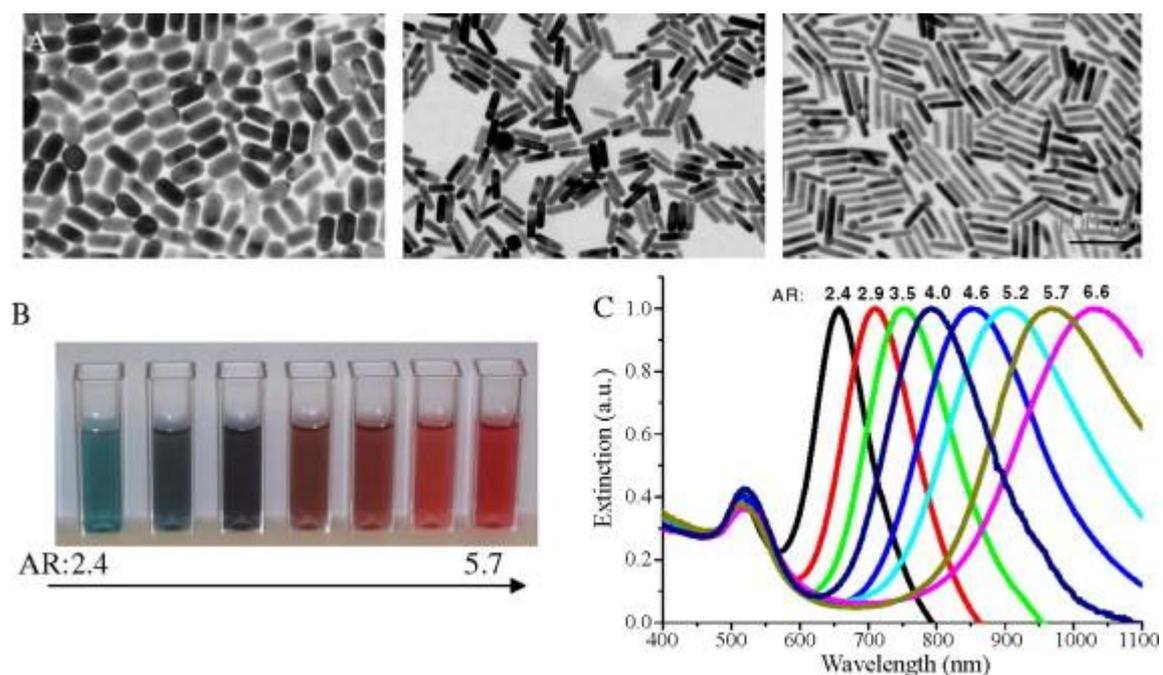


Figure 1.4 : A) Image MEB de nanobâtonnets d'or de différents rapports d'aspect, B) photographies des solutions d'or colloïdal et C) spectres d'extinction correspondant aux différents rapports d'aspect (d'après [13]).

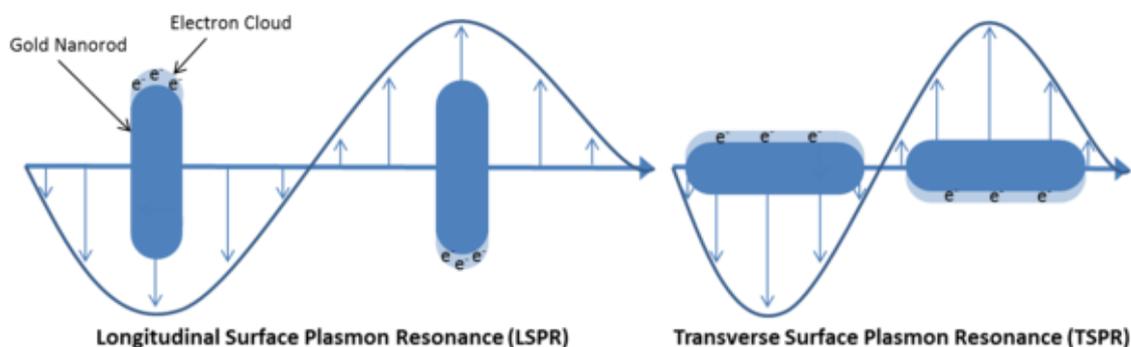


Figure 1.5 : Déplacement du nuage électronique dans le cas de nanobâtonnets, montrant les plasmons longitudinaux et transversaux (d'après [14]).

De manière générale, nous pouvons influencer sur les positions et les intensités des résonances plasmoniques simplement en changeant la taille, la forme, ou tout autre paramètre au cours de la synthèse (molécule utilisée pour la fonctionnalisation ou solvant, par exemple)[15][16][17]. Ce contrôle de la résonance plasmonique présente bien évidemment un intérêt particulier pour un grand nombre d'applications[18][19][20][21].

1.1.3. Choix des nanoparticules d'or

Nous avons vu que le principal intérêt physique des nanoparticules métalliques en vue de nombreuses applications réside dans leurs propriétés optiques et plasmoniques liées à leur constante diélectrique $\varepsilon(\omega)$. Toutefois, si nous considérons le seuil de transition interbandes des principaux métaux nobles, nous trouvons les valeurs présentées dans le Tableau 1.1 :

Elément chimique	Seuil de transition interbandes (eV)
Argent	3,9
Cuivre	2
Or	2,4

Tableau 1.1 : Seuils de transition interbandes pour l'argent, le cuivre et l'or[9][22].

Nous pouvons voir que, d'un point de vue purement optique, le choix de l'or comme objet d'étude n'apparaît pas particulièrement évident, notamment par rapport à l'argent. En effet ce dernier à un seuil de transition interbandes à 3,9 eV soit au-delà de la gamme énergétique du visible (expliquant sa couleur grise), et présente la résonance plasmonique la plus importante. Dès lors, nous devons détailler les autres propriétés de l'or, qui vont justifier son utilisation dans nos travaux au profit des autres éléments métalliques.

Première propriété d'intérêt, l'or est un élément chimiquement stable dans le temps qui présente une remarquable résistance à l'oxydation et à la corrosion[23]. En comparaison, l'argent dispose de propriétés plasmoniques supérieures à l'or, mais il s'oxyde rapidement (notamment en présence de sulfures), le cuivre quant à lui s'oxyde également très facilement.

Autre point d'intérêt, en particulier compte-tenu du sujet d'étude, l'or est biocompatible et ne présente apparemment qu'une faible toxicité quand des nanoparticules sont mises en contact à faibles doses avec des cellules animales ou végétales. En comparaison, l'argent est connu pour ses propriétés biocides, et de nombreuses études ont présenté les risques potentiels lié à son usage dans des applications thérapeutiques[24][25][26][27].

La Figure 1.6 présente différents champs d'application potentiels des nanoparticules d'or associés aux propriétés physico-chimiques détaillées précédemment. Nous pouvons voir que l'or pourrait par exemple être utilisé pour l'administration de médicaments de manière ciblée[28][29][30], en tant que nanoenzyme[31][32], pour du ciblage[33][34], en radiothérapie[35][36][37], en thérapie photothermique[38][39] ou en tant qu'agent pour l'imagerie[40][41]. Ces domaines, certes très divers, ont tout de même pour point commun d'appartenir au domaine de la thérapie, donc en contact direct avec le vivant.

Maintenant que nous avons présenté l'intérêt de travailler sur des nanoparticules d'or, nous allons aborder l'autre acteur principal de notre étude, à savoir les cellules végétales.

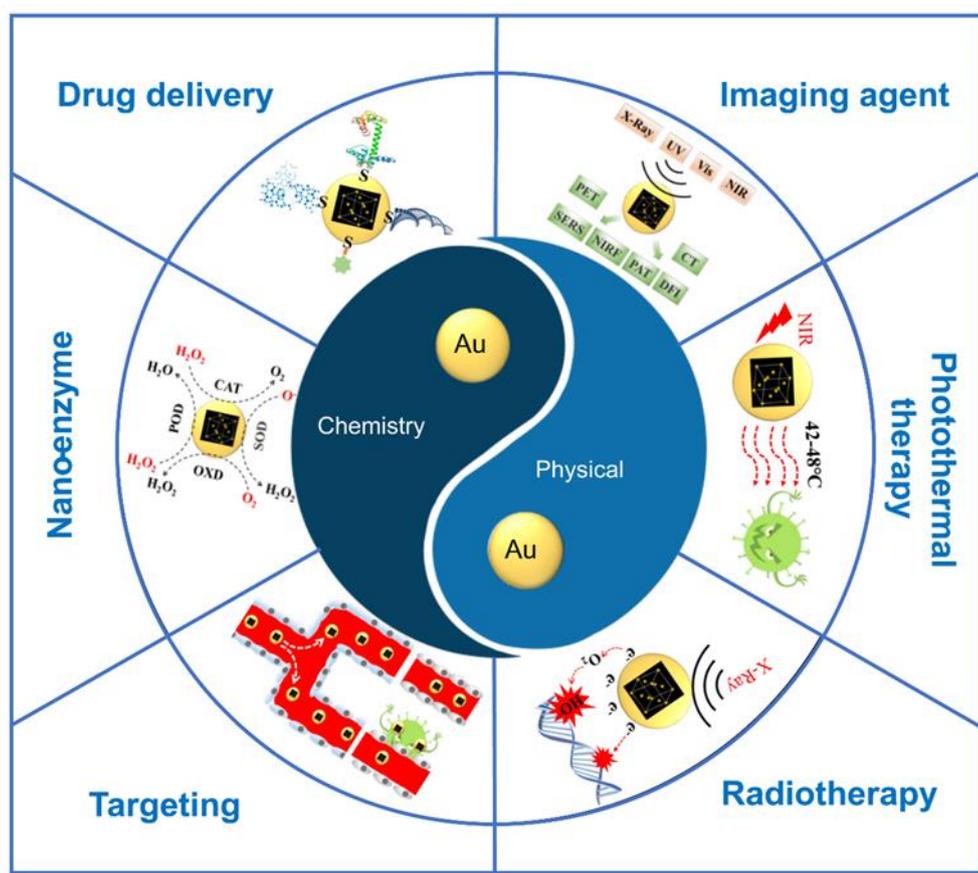


Figure 1.6 : Schéma tiré de [42] montrant différents domaines d'application potentiels de nanoparticules d'or en raison de leurs propriétés physiques et chimiques.

1.2. Echantillons biologiques : plante aquatique *Egeria Densa*

Dans un premier temps, nous allons revenir sur la constitution de ces cellules, leurs particularités, et décrivons la plante aquatique que nous avons utilisée dans nos travaux, *Egeria Densa*.

1.2.1. Constituants et propriétés de cellules végétales

1.2.1.1. Structure d'une cellule végétale

La Figure 1.7 montre la structure interne d'une cellule végétale. Ces cellules possèdent de nombreux composants dans le cytoplasme : par exemple, les chloroplastes

qui contiennent de la chlorophylle, et donnent à la plupart des plantes leur couleur verte caractéristique, ou les mitochondries qui permettent la production d'ATP (Adénosine triphosphate), qui est la source d'énergie du métabolisme et revêtent donc une importance vitale. Le cytoplasme est isolé et protégé par une membrane plasmique constituée principalement de protéines et de lipides. Tout comme les cellules animales, les cellules végétales sont des cellules eucaryotes, c'est-à-dire qu'elles possèdent un noyau interne. Toutefois, les cellules végétales et animales diffèrent sous bien des aspects, comme la présence ou non de chloroplastes. Une différence majeure est la présence, dans la cellule végétale, de la vacuole, organe qui occupe plus de la moitié de l'espace intérieur de la cellule, qui permet notamment de réguler les échanges de molécules au sein de la plante[43].

Les cellules végétales, tout comme les cellules animales, possèdent un noyau. C'est lui qui va permettre la réplication de l'ADN, en plus d'impacter directement sur leur rigidité et l'organisation des organelles au sein de la cellule[44][45].

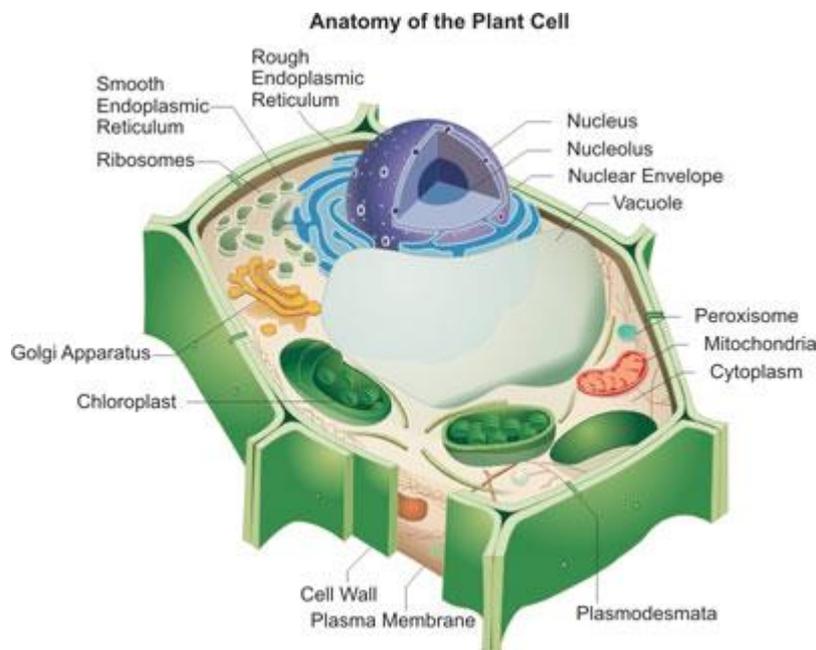


Figure 1.7 : Structure typique d'une cellule végétale (d'après [46]).

Une autre différence majeure est la présence chez la cellule végétale d'une seconde couche de protection, qui vient s'ajouter à la membrane plasmique : la paroi cellulaire. C'est la couche la plus externe de la plante, et celle qui va le plus nous intéresser, puisque c'est celle que nous allons principalement sonder lors des mesures de spectroscopie de force par AFM présentées dans le Chapitre 3. Elle constitue l'interface dynamique entre la cellule et son environnement. Son rôle est de protéger la plante contre d'éventuels agents pathogènes et d'éviter une trop grande expansion de l'intérieur de la cellule lorsque l'eau y pénètre. Les propriétés mécaniques de la paroi sont liées à sa composition biochimique et aux interactions spécifiques entre les biopolymères. Sur la

Figure 1.8, nous présentons un schéma illustrant la structure de la composition de la paroi cellulaire végétale.

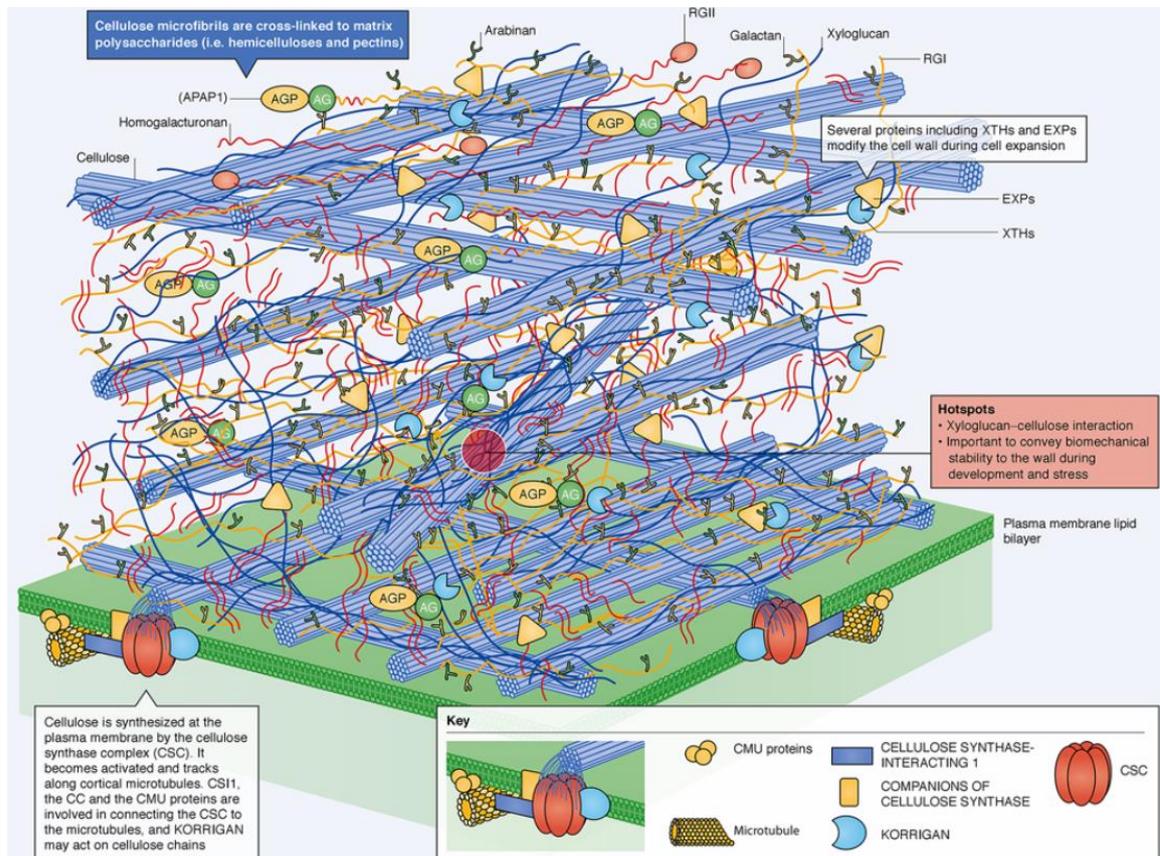


Figure 1.8 : Structure de la paroi cellulaire végétale. Les cylindres bleus correspondent aux microfibrilles de cellulose, les lignes bleues aux filaments de xyloglucane, les lignes rouges à l'homogalacturonane et les lignes jaunes à la rhamnogalacturonane I. La rhamnogalacturonane II est symbolisée par les cercles rouges, et l'arabinane et la galactane par les crochets reliés aux filaments de rhamnogalacturonane I.

La paroi est un composé complexe : des microfibrilles de cellulose sont enchevêtrées dans une matrice de polysaccharides composée de pectines (Homogalacturonan, arabinan, galactan, rhamnogalacturonans I et II et arabinoxylan pectin arabinogalactan protein1 ou APAP1 sur le schéma), d'hémicellulose (xyloglucan sur le schéma) et de protéines. On y trouve également des composés phénoliques comme la lignine. La paroi est donc une structure poreuse. Les formules semi-développées de la cellulose et de la pectine sont montrées sur la Figure 1.9.

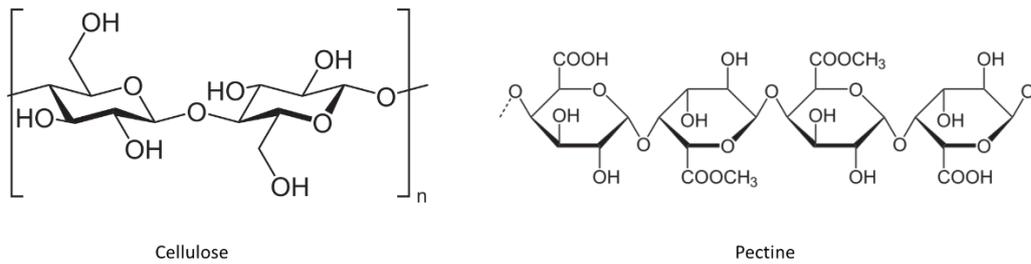


Figure 1.9 : Structures de la cellulose et de la pectine représentées en projection de Haworth (d'après [47] et [48]).

1.2.1.2. Présentation de la plante aquatique *Egeria Densa*

Dans cette étude, la plante utilisée est la plante aquatique *Egeria Densa*, également connue sous le nom d'Elodée dense. Cette plante d'eau douce possède de nombreuses feuilles avec de grandes cellules, de l'ordre de 100 μm de longueur sur 50 μm de largeur et 50 μm d'épaisseur. Les feuilles sont constituées de deux épaisseurs de cellules, ce qui facilite leur observation en microscopie optique et de fluorescence, avec une visualisation facile des chloroplastes et de leur mouvement au sein des cellules. Finalement, bien que mineur, un dernier aspect présente un intérêt notable. *Egeria Densa* est une plante facilement cultivable, qui ne nécessite que peu d'entretien.



Figure 1.10 : Photographie d'un plant d'*Egeria Densa*.

La Figure 1.10 présente une photographie d'un plant d'*Egeria Densa* caractéristique tel que ceux que nous avons utilisés lors des mesures. Les feuilles d'*Egeria Densa* utilisées lors des études sont des feuilles matures d'environ 3 cm de long sur 5 mm de large. Les différentes feuilles sont liées à une tige centrale, absorbant directement l'eau et les sels nutritifs, et amenant une irrigation constante aux cellules des feuilles via le plasmodesme, qui traverse leur paroi cellulaire.

Une feuille d'*Egeria Densa* présente trois types de cellules différentes : les toothcells, les idioblastes et les cellules épithéliales [77]. Ces trois types de cellules sont montrées sur la Figure 1.11 [49].

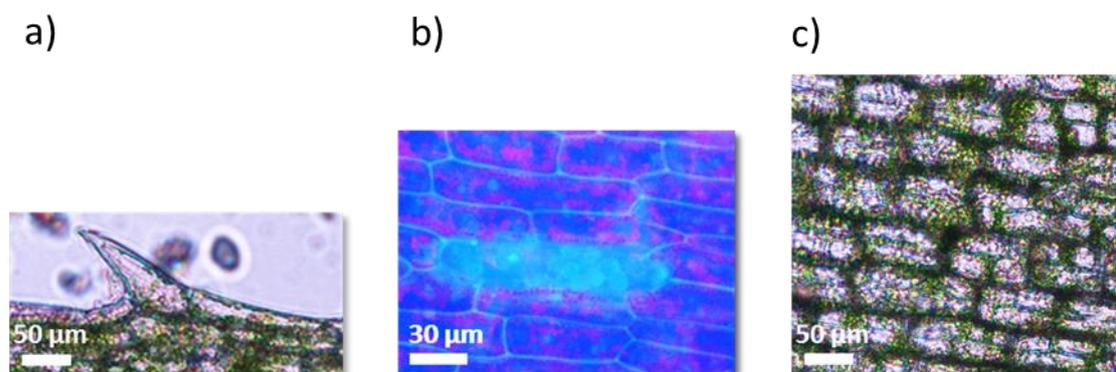


Figure 1.11 : a) Photographie en champ clair d'une toothcell, b) Image en microscopie de fluorescence d'une partie d'une feuille sur laquelle on discerne un idioblaste et c) photographie en champ clair d'une partie d'une feuille montrant plusieurs cellules épithéliales.

Sur la Figure 1.11a, nous voyons une toothcell, très facilement reconnaissable à sa forme pointue. Ces cellules de défense de la plante, situées en bordure de feuille, en faible quantité (environ quatre à cinq par bordure, soit une dizaine par feuille en moyenne), contiennent des chloroplastes, sont relativement grandes comparativement aux autres cellules et présentent une courbure plus importante. La Figure 1.11b montre un idioblaste. Ces cellules, très particulières, ne contiennent aucun chloroplaste, et leur contenu diffère de celui des autres cellules. Celles-ci sont en général considérées comme des cellules dites « spécialisées », aux fonctions bien précises[50]. Pour les observer, il est possible à l'œil nu de les repérer, justement à cause de cette absence de chloroplaste, mais le plus simple est de travailler avec un filtre en microscopie à épifluorescence (filtre UV-2A de Nikon, avec filtre d'excitation à bande passante entre 330 et 380 nm et filtre barrière à 420 nm). En effet, sous irradiation ultraviolette, les idioblastes apparaissent bleus, ce qui permet aisément de les distinguer, comme sur la Figure 1.11b. Enfin, la Figure 1.11c montre plusieurs cellules épithéliales, qui constituent l'immense majorité des cellules d'une feuille. Ces cellules comprennent un grand nombre de chloroplastes (20 en moyenne), sont moins uniformes en taille en comparaison des deux autres types de cellules (leur longueur peut aller d'environ 50 µm, comme sur la Figure 1.11c à une centaine de micromètres selon le côté de la feuille que nous observons[49]) et constituent le corps de l'épiderme de la feuille.

Dans toute la suite de notre travail, nous avons toujours veillé à étudier ces trois types de cellules en proportions équivalentes, afin d'avoir suffisamment de données pour pouvoir étudier d'éventuelles modifications mécaniques sur chaque type de cellule.

1.2.2. Evolution des propriétés biologiques de plantes en contact avec des nanoparticules d'or fonctionnalisées

Le processus d'internalisation est le processus au cours duquel une plante va absorber des éléments extérieurs. Nous nous intéressons ici aux divers procédés d'internalisation de nanoparticules. Ils sont résumés sur le schéma de la Figure 1.12. Le principal est l'endocytose, où les nanoparticules sont ingérées par la membrane au sein d'une vésicule[51]. D'autres nanoparticules peuvent « passer en force », et pénétrer au sein de la cellule en cassant la membrane, entraînant la formation de pores[52]. Certaines nanoparticules vont venir se greffer à des protéines leur permettant alors de pénétrer à l'intérieur de la cellule[53]. Enfin, les nanoparticules ont la possibilité de se déplacer de cellule en cellule via le plasmodesme, canal situé entre les cellules de la plante qui assure, par exemple, la circulation de l'eau dans celle-ci[54]. Toutefois, ce dernier cas est particulier, car il nécessite que les nanoparticules soient déjà présentes dans une cellule, et donc qu'elles aient déjà été internalisées.

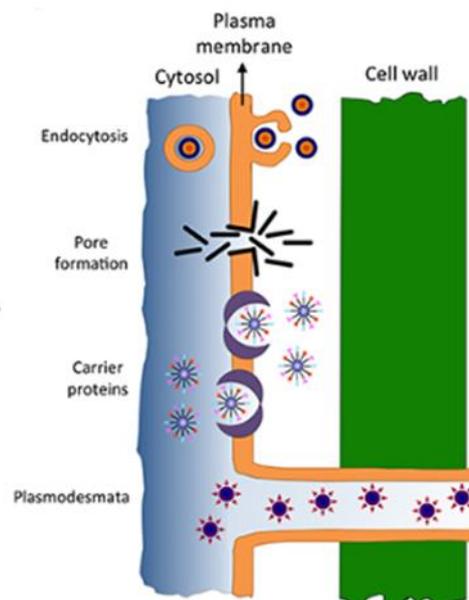


Figure 1.12 : Voies d'internalisation d'espèces extérieures au sein d'une cellule végétale (d'après [55]).

Ainsi, il existe de nombreuses voies possibles permettant aux nanoparticules de pénétrer au sein des cellules. Pour cela, leur taille va évidemment avoir une importance cruciale. L'internalisation de nanoparticules métalliques de tailles allant jusqu'à la centaine de nanomètres a été observée[56]. On parle ici du rayon hydrodynamique des particules fonctionnalisées, afin de prendre en compte la couche de molécules greffées lors de la fonctionnalisation.

Différentes études ont été réalisées sur l'internalisation et ses conséquences sur l'état de santé des plantes et sur les propriétés des nanoparticules[57]. Il a ainsi pu être montré que la taille et la chimie de surface de nanoparticules d'or ou d'argent impactaient leur biodisponibilité[58][59][60]. La présence de nanoparticules d'or permet une hausse de la vitesse de croissance de la plante *Arabidopsis Thaliana*, mais il apparaît également que la taille des racines s'en retrouve diminuée[61]. Ainsi, en fonction de la taille, de la chimie de surface, de l'internalisation ou non des nanoparticules d'or, les conséquences sur les plantes peuvent être radicalement différentes, et aboutir à des dégradations ou à des effets positifs, ce qui justifie de la nécessité d'avoir une bonne compréhension des mécanismes à l'œuvre lors d'interactions entre nanoparticules et plantes[62][63]. Par exemple, il a été montré que la présence de nanoparticules d'or entraînait une diminution de la taille et de la croissance des racines sur des feuilles d'orge[64]. Pour un autre exemple, une nécrose des feuilles a été observée après 14 jours d'exposition de la plante *Nicotiana Xanthi* à des nanoparticules d'or de 3,5 nm[65]. Enfin, le changement de l'activité de photosynthèse d'une plante est un des plus fréquents indicateurs de toxicité induite par la présence de nanoparticules[66]. Un autre aspect très étudié est l'utilisation potentielle des nanoparticules en tant que fongicide ou engrais[67][68][69].

De nombreuses études de toxicité liée à l'exposition des plantes à des nanoparticules d'or existent. De manière générale, ces études ont été effectuées dans le cadre des « omiques » (génomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique) [70][71]. Ces disciplines visent à étudier dans leur ensemble certains types de molécules biologiques, avec pour objectif de pouvoir décrire le phénotype d'un organisme. Pour les champs mentionnés, la génomique étudie donc le génome des organismes, la transcriptomique l'ensemble des molécules d'ARN, la protéomique l'ensemble des protéines et la métabolomique l'ensemble des processus chimiques impliquant des métabolites chez un individu. Or, ces modifications sont perceptibles pour des concentrations en nanoparticules d'or (ou pour tout type de nanoparticules métalliques, d'ailleurs) importantes, de l'ordre de 100 mg.L⁻¹[72][73]. Pour des concentrations plus faibles, de l'ordre de 1 à 100 µg.L⁻¹, on n'observe aucune modification à l'échelle de la plante : en l'absence de dégradation perceptible, on parle alors de concentration non cytotoxique. Malgré tout, certains phénomènes ont tout de même pu être observés, notamment sur les propriétés mécaniques des plantes. En effet, il a été démontré que la présence de nanoparticules d'or pouvait aboutir à une augmentation de la taille des pores de la paroi cellulaires, voire à une attaque de la paroi et à une création de pores[74]. De même, la présence de nanoparticules peut entraîner des modifications de rigidité de la paroi[75], y compris chez des micro-algues[76]. Ainsi, l'importance de travailler sur les propriétés mécaniques de cellules végétales réside dans le fait qu'étant reliées aux fonctions biologiques de la plante, elles constituent un remarquable indicateur de son état de santé, et qu'elles peuvent être révélatrices de pathologies[77][78]. Cela explique l'intérêt croissant de l'étude des propriétés mécaniques de cellules[79][80][81].

Pourtant, peu d'études sur l'impact des nanoparticules sur les propriétés biomécaniques de cellules végétales ont été réalisées. C'est pourquoi nous allons nous intéresser à l'impact de la présence de nanoparticules d'or sur les propriétés mécaniques aux concentrations non cytotoxiques.

1.3. Techniques de caractérisation utilisées

1.3.1. Microscopie à force atomique (AFM)

Le cœur de notre étude a nécessité l'usage de la microscopie à force atomique. Cette méthode de caractérisation a été développée dans les années 1980 par Gerd Binnig, Calvin Quate et Christoph Gerber[82] dans le prolongement de l'invention du microscope à effet tunnel, quelques années auparavant, et elle permet de sonder et d'imager la surface d'un échantillon sur une zone très réduite avec une remarquable résolution latérale, pouvant depuis de longues années être inférieure au nanomètre dans les bonnes conditions expérimentales[83]. Pour cela, les forces d'attraction et de répulsion entre la surface de l'échantillon et une pointe nanométrique sont exploitées. En effet, la pointe, solidaire d'un levier souple, va balayer la surface à analyser, et ces forces d'attraction et de répulsion vont inévitablement entraîner des déflexions du levier. Un faisceau laser est réfléchi sur l'arrière du levier AFM, et sa position est ensuite détectée par une photodiode à quatre quadrants. Dès lors, lorsqu'une déviation du levier a lieu, la position du faisceau laser sur les quadrants de la photodiode change. Le principe de fonctionnement d'un AFM est représenté sur la Figure 1.13.

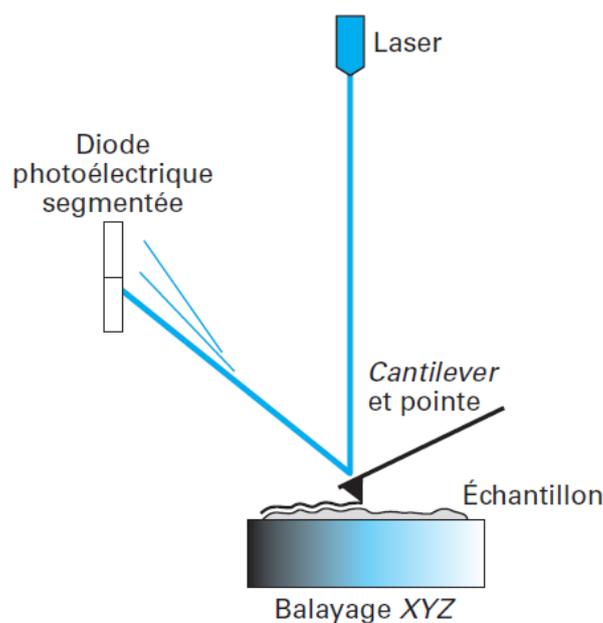


Figure 1.13 : Principe du microscope à force atomique (d'après [84]).

Il existe plusieurs modes de fonctionnement en AFM :

- L'imagerie en mode contact : la pointe fine à l'extrémité du levier balaye la surface à analyser, tout en étant en contact avec celle-ci. Lorsqu'une force est appliquée, une boucle de rétroaction va ajuster la hauteur du levier pour maintenir cette déviation constante pendant que la pointe se déplace sur la surface. De cette manière, le microscope produit bien des images en utilisant une force constante plutôt qu'une hauteur constante. Ce mode est utilisé pour de l'imagerie haute résolution, puisque la pointe est constamment en contact avec l'échantillon.
- L'imagerie en mode dynamique : le levier AFM est excité à une fréquence proche de sa fréquence de résonance, ce qui a pour effet de le faire osciller. Pour des mesures effectuées à l'air et en milieu liquide, l'amplitude des oscillations diminue lorsque la distance entre la pointe AFM et la surface à analyser diminue. C'est ce changement qui est exploité lors de l'imagerie. Ainsi, de manière analogue au mode contact, la boucle de réaction du microscope va permettre de maintenir l'amplitude de ces oscillations constantes, afin d'obtenir une image de la topographie de l'échantillon. Comme la pointe n'est pas toujours en contact avec la surface dans ce mode, il est souvent utilisé pour des mesures sur des échantillons sensibles, par exemple des molécules qui ne sont pas fixées à la surface.
Pour des mesures effectuées dans une enceinte à ultravide, ce sont les variations de la fréquence des oscillations qui servent de signal. Ainsi, les forces en présence entre la pointe et l'échantillon vont modifier la fréquence de vibration du levier. De cette manière, il est possible de procéder à des mesures sans même avoir de contact entre la pointe et la surface de l'échantillon.
- La spectroscopie de force : des informations sur les propriétés mécaniques de l'échantillon comme la rigidité ou l'adhésion sont également disponibles en étudiant les caractéristiques des courbes d'approche-retrait. Dans ce mode, le levier est déplacé verticalement vers la surface de l'échantillon à l'aide d'un scanner piézoélectrique, puis rétracté à nouveau. Pendant le mouvement, les déviations du levier sont enregistrées. Des courbes de force approche (en bleu) et retrait (en rouge) caractéristiques sont tracées sur la Figure 1.14.

En ordonnée se trouve la force appliquée, exprimée en pN, et en abscisse se trouve la position relative de la pointe par rapport à la surface, exprimée en nm. Lors de l'étape **1** de la Figure 1.14, la déflexion du levier ne varie pas, la pointe étant à bonne distance de l'échantillon. Au point **2**, la pointe entre en contact avec la surface de l'échantillon. Entre les points **2** et **3**, la déflexion augmente avec la position du scanner piézo-électrique jusqu'à application de la force maximale au point **3**. Dans cette portion de courbe, les

forces à l'œuvre sont les forces de répulsion, ce qui explique la déflexion positive du levier. Vient ensuite la courbe de retrait. Entre les points **3** et **4**, la déflexion diminue jusqu'à devenir négative. Ceci est dû aux forces d'adhésion pouvant exister entre la pointe et l'échantillon. Au point **4**, la distance seuil à laquelle les forces d'adhésion cessent d'agir est atteinte et le levier revient à sa déflexion initiale nulle.

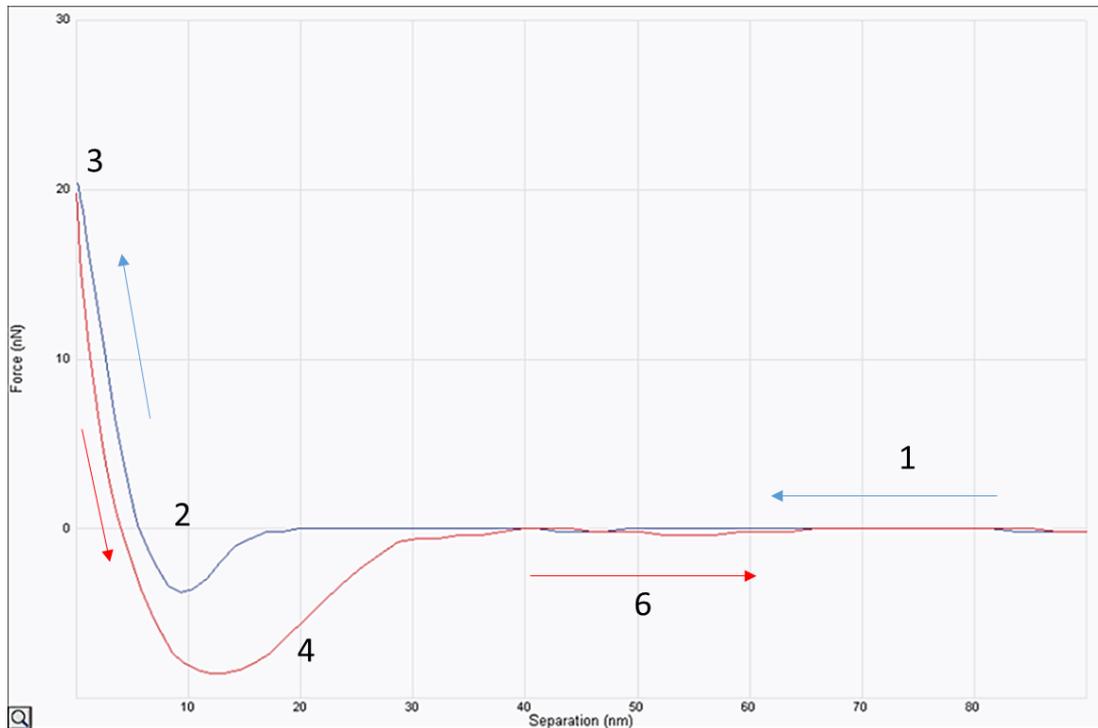


Figure 1.14 : Exemple de courbes d'approche (en bleu) et de retrait (en rouge).

L'analyse de ces courbes de force permet d'avoir accès à de nombreuses informations concernant les propriétés mécaniques de l'échantillon sondé, notamment :

- L'adhésion, qui se manifeste sur la Figure 1.14 par les forces attractives (d'ordonnée négative) sur la courbe de retrait. L'adhésion présente un intérêt tout particulier pour les travaux se concentrant sur les propriétés physico-chimiques des surfaces.
- La déformation, visible par l'hystérésis entre les courbes d'approche et de retrait, qui décrit l'indentation de la pointe AFM dans l'échantillon à une force de contact maximale, par rapport à une force de contact nulle.
- Le calcul de la pente de la courbe d'approche (c'est-à-dire le rapport de la force appliquée sur la déformation mesurée) donne une indication de la rigidité de l'échantillon. Il est possible de calculer un module de Young effectif E^* en utilisant des modèles mécaniques appropriés, comme le modèle de Hertz par exemple.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé le mode dynamique à l'air pour imager les nanoparticules et le mode de spectroscopie de force pour caractériser les propriétés mécaniques des cellules végétales.

Les leviers utilisés en AFM sont en silicium ou nitrure de silicium. Les pointes peuvent être de formes très variées, coniques, sphériques ou encore pyramidales comme montré sur la Figure 1.15, leur extrémité pouvant être très petite ou au contraire large (des pointes sphériques de plusieurs centaines de nanomètres de diamètre) : cela dépend avant tout du type de mesure à réaliser et de la résolution désirée. Les constantes de raideur des leviers sont comprises dans une très large gamme de valeurs pouvant aller de l'ordre de $0,01 \text{ N.m}^{-1}$ à 100 N.m^{-1} si l'on veut faire de la nanoindentation[84]. De manière générale, elles sont inférieures pour des travaux en lien avec les sciences du vivant, car nous cherchons avant tout à ne pas induire de dégradation des échantillons.

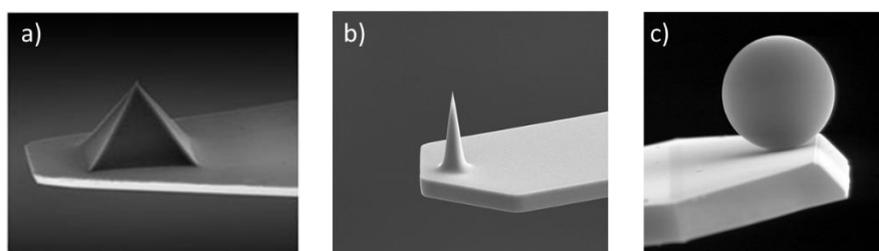


Figure 1.15: Images MEB de différentes formes de pointes AFM : a) pyramidale, b) conique et c) sphérique. D'après [85], [86] et [87] respectivement.

Au laboratoire, nous avons utilisé deux microscopes à force atomique : un Nanowizard II de JPK Instruments ainsi qu'un Multimode 8 Nanoscope V de Bruker.

Le microscope Multimode a été utilisé au cours de la thèse afin de faire de l'imagerie des nanoparticules d'or, en mode Peak Force QNM (pour Quantitative Nanoscale Mechanical characterization). Ce mode particulier consiste en une mise en contact de la pointe avec l'échantillon par intermittence sans le détériorer, éliminant ainsi les forces latérales (nous sommes dans le cas d'un mode contact intermittent). La force entre la pointe et l'échantillon est contrôlée par une boucle de rétroaction continue. Des courbes de force sont générées pour chaque oscillation de la pointe de la zone balayée et sont utilisées simultanément pour calculer le module, par exemple. Nous pouvons ainsi obtenir des cartographies de propriétés mécaniques (rigidité, adhésion, ...) en même temps et avec la même résolution que le profil topographique. Ce mode permet de réaliser des mesures non destructives rapides et précises. Nous avons utilisé des pointes ScanAsyst-Air, de constante de raideur nominale de $0,5 \text{ N.m}^{-1}$ (Bruker).

Toutefois, la vaste majorité de nos travaux a nécessité l'utilisation de l'autre microscope, le JPK Nanowizard II, photographié sur la Figure 1.16. Il est monté sur un microscope optique inversé à épifluorescence. Cette configuration permet d'observer l'échantillon par fluorescence en parallèle des mesures AFM, ce qui en fait un système de

choix pour ce type d'étude[88]. Dans notre cas, nous avons utilisé des objectifs x 10 et x 60, des cubes de filtres à fluorescence de Nikon UV-2A (filtre d'excitation à bande passante entre 330 et 380 nm et filtre barrière à 420 nm), B-2A (filtre d'excitation à bande passante entre 400 et 440 nm et filtre barrière à 515 nm) et DAPI (filtre passe-bande avec excitation entre 360 et 390 nm et bande d'émission entre 420 et 480 nm) et une longueur d'onde de 850 nm pour la diode laser de l'AFM.



Figure 1.16 : Photographie du Nanowizard II monté sur un microscope à épifluorescence.

L'AFM permet de travailler dans des conditions physiologiquement proches des conditions naturelles des échantillons biologiques, et constitue un outil particulièrement adapté pour réaliser des travaux sur les propriétés mécaniques de cellules.

1.3.2. Microscopie électronique en transmission (MET) et à balayage (MEB)

La microscopie électronique en transmission a été utilisée pour caractériser structurellement et morphologiquement les nanoparticules. Le choix de cette technique est motivé par les dimensions très réduites à considérer (de quelques nanomètres à 1 μm pour les plus grandes tailles de nanoparticules).

En effet, le pouvoir de résolution $Rés$ d'un microscope optique, c'est-à-dire la distance minimale séparant deux points discernables est défini par la relation :

$$Rés = \frac{0,61\lambda}{ON}$$

où λ correspond à la longueur d'onde des photons incidents, et ON à l'ouverture numérique de l'objectif utilisé. Par conséquent, même avec un objectif à grande ouverture numérique (comme un objectif à immersion), la résolution d'un microscope optique sera supérieure à la centaine de nanomètres (idéalement : avec un objectif à immersion ayant une ouverture numérique de 1,4 et une lumière bleue à 400 nm, la résolution est de 174 nm), ce qui est insuffisant pour observer des nanoparticules dans des conditions correctes[89].

La microscopie électronique utilise des électrons comme source d'illumination. Le premier prototype de microscope électronique a été développé par Ernst Ruska et Max Knoll dès 1931. L'idée derrière cette invention est de pouvoir améliorer fortement la résolution spatiale, en s'affranchissant de la trop grande longueur d'onde des photons[90]. La longueur d'onde d'un électron étant jusqu'à 100 000 fois plus faible, les atouts de cette technique paraissent dès lors évidents. Sur la Figure 1.17, nous présentons la structure interne du microscope électronique en transmission de l'IMN, avec la colonne au sein de laquelle se forme le faisceau d'électrons, qui passe par une série de diaphragmes et lentilles magnétiques pour être focalisé sur l'échantillon. Après interaction avec l'échantillon, le faisceau transmis passe par les lentilles de projection et l'image se forme sur la caméra.

Lors de la formation des images en champ clair, il y a trois principaux types de contrastes qui permettent de différencier les matériaux observés. Le contraste de diffraction généré par les différentes intensités des faisceaux diffractés par l'échantillon (différentes faces cristallines par exemple, l'orientation joue un rôle important), le contraste de phase, dû aux interférences entre faisceaux incidents et diffractés, et enfin le contraste en Z (Z étant le numéro atomique).

Nous avons utilisé le mode STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy, soit Microscopie Electronique à Balayage en Transmission, ou MEBT en français). Dans ce mode, le faisceau électronique primaire est focalisé sur une zone très réduite de l'échantillon (taille de faisceau de l'ordre de 10^{-10} m) et balaye la zone de l'échantillon à analyser. De nombreux clichés ont été enregistrés en utilisant le mode STEM HAADF (Scanning Transmission Electron Microscope – High Angle Annular Dark Field). Dans ce mode, le faisceau d'électrons focalisé balaye l'échantillon et un détecteur annulaire collecte les électrons diffusés inélastiquement aux grands angles lors de l'interaction du faisceau avec l'échantillon (voir Figure 1.18). Nous pouvons ainsi obtenir de la haute-résolution et un contraste chimique dépendant du numéro atomique Z (les éléments plus lourds diffusant davantage d'électrons aux grands angles). L'intensité expérimentale I_{exp} est alors proportionnelle à l'épaisseur t de l'échantillon et au numéro atomique Z élevé à une puissance comprise entre 1,4 et 2 :

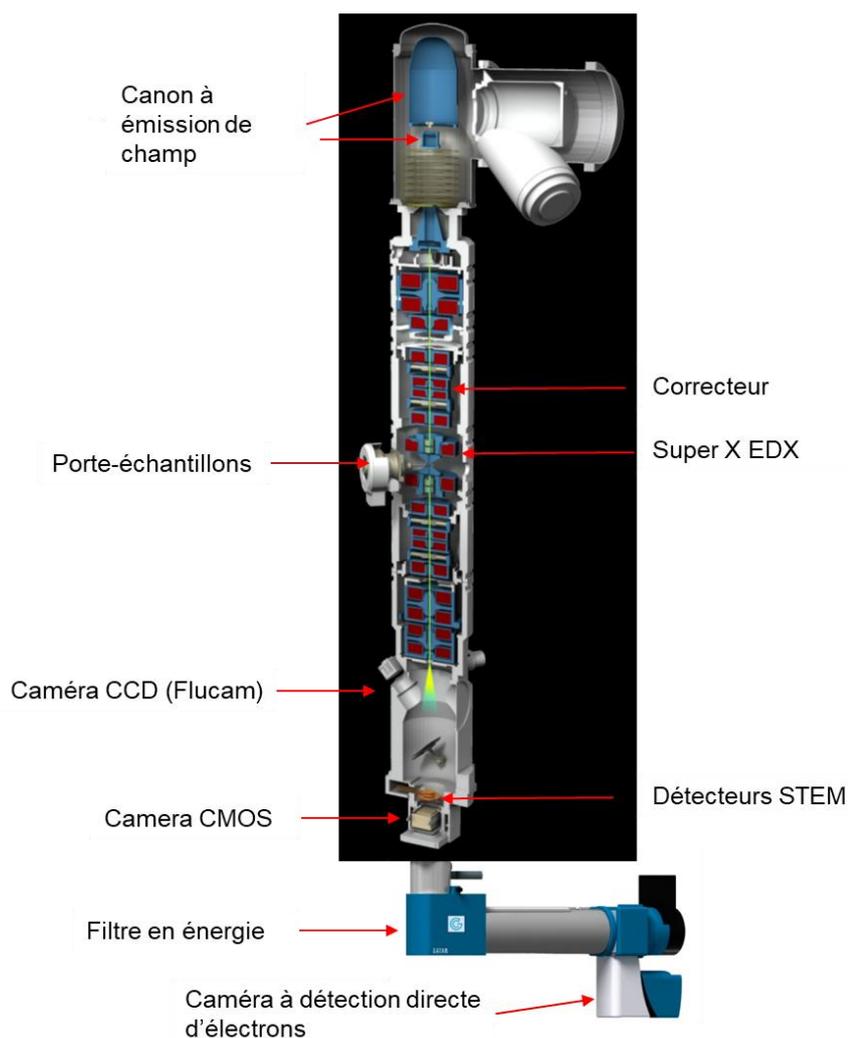


Figure 1.17 : Schéma de la structure interne du microscope électronique en transmission du laboratoire.

L'or ($Z = 79$) un élément lourd, apparaîtra plus clair sur les images qu'un élément plus léger comme le soufre ($Z = 16$).

Pour les observations par microscopie électronique, un volume de $20 \mu\text{L}$ de la suspension à étudier a été déposé sur une grille de cuivre recouverte d'une membrane de carbone à trous (Holey Carbon – Cu, 300 mesh, $50 \mu\text{m}$) jusqu'à séchage complet. Un schéma de grille TEM est présenté sur la Figure 1.19.

Les mesures ont été effectuées par Patricia Bertoncini avec le microscope Nant'Themis (S/TEM THEMIS Z G3 de Thermo Fisher Scientific), en travaillant avec des tensions d'accélération de 300 kV et 80 kV, en mode balayage couplé à un détecteur champ sombre annulaire à grand angle (STEM-HAADF), ou couplé à un détecteur annulaire à quadrants (STEM-iDPC : mode de contraste de phase différentiel intégré) et en mode imagerie en champ clair (TEM).

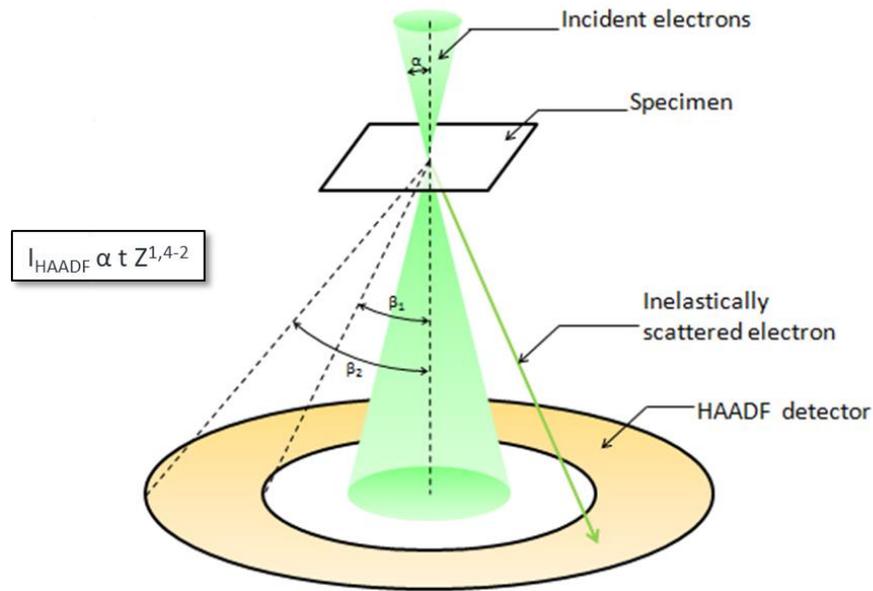


Figure 1.18 : Schéma de principe de la collection diffusée aux grands angles via un détecteur pour l'imagerie en mode STEM HAADF (d'après [91]).

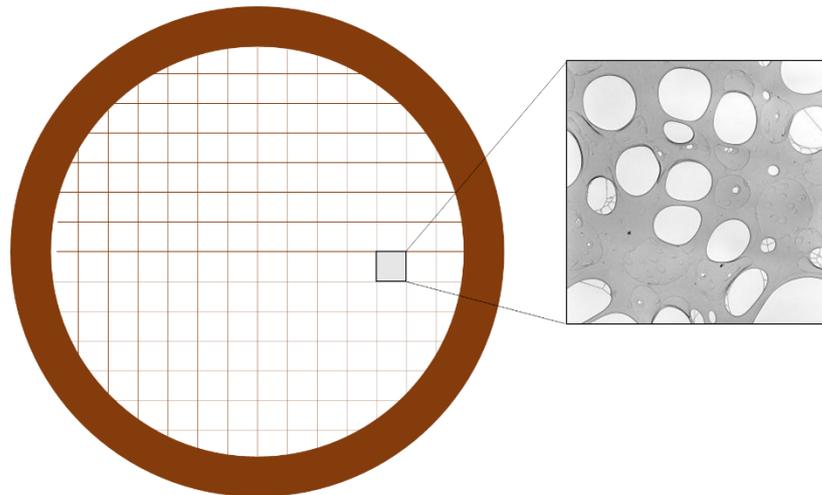


Figure 1.19 : Schéma d'une grille TEM, et image TEM de la membrane de carbone (d'après [92]).

Le mode iDPC STEM exploite la phase de la fonction de transmission du faisceau afin de distinguer à la fois, les éléments légers et lourds. En effet, Yücelen, Lazić et Bosch ont montré qu'il était possible de distinguer des atomes différents (dans leur cas, de l'azote et du gallium) en exploitant le contraste de phase[93]. Dans cette méthode, le contraste obtenu est chimique et dépend, en première approximation, de façon linéaire du numéro atomique Z . Enfin, nous avons également utilisé le mode EFTEM (microscopie électronique en transmission filtrée en énergie), dans lequel la perte d'énergie des électrons diffusés est exploitée pour améliorer le contraste des images.

La photographie du microscope utilisé est montrée sur la Figure 1.20.

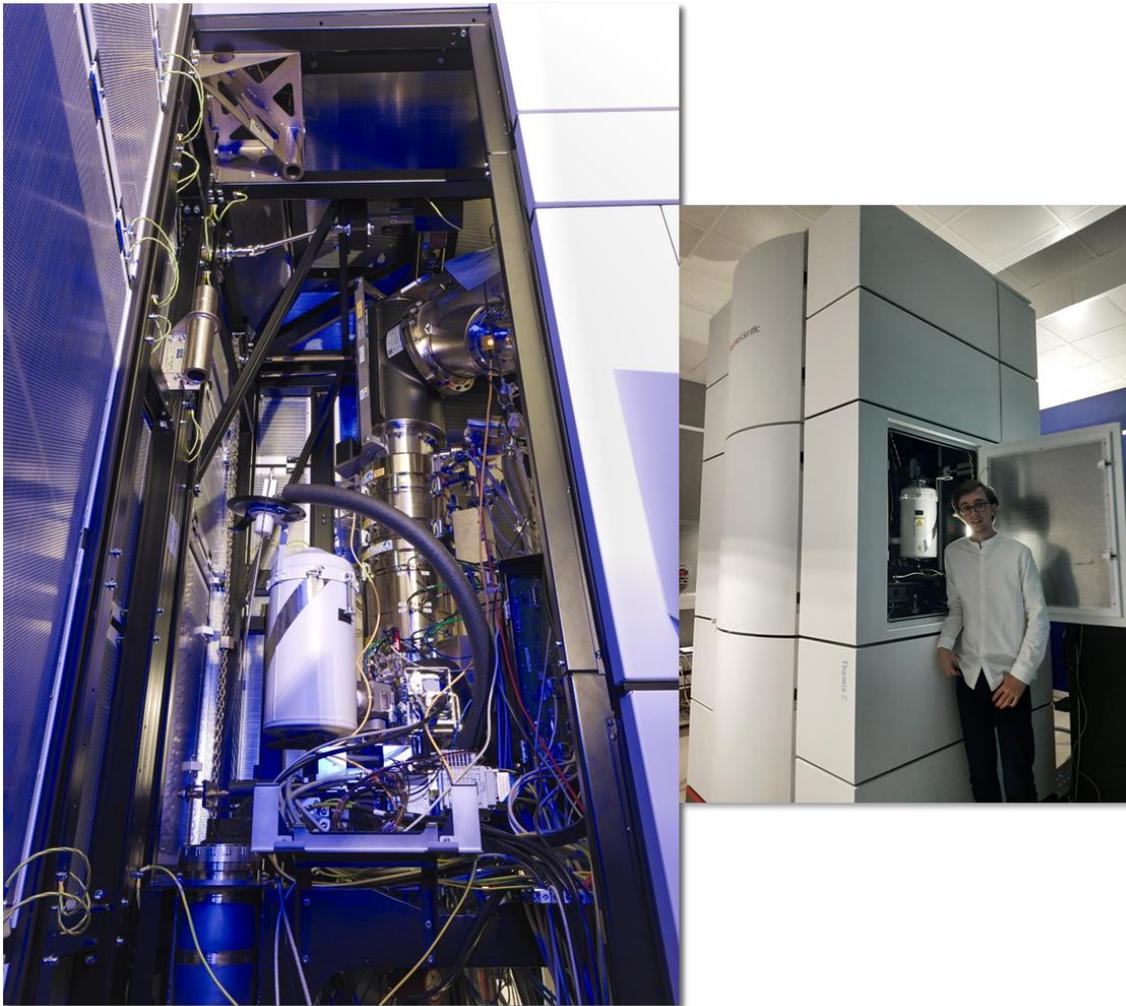


Figure 1.20 : Microscope Themis Z G3 utilisé au cours de la thèse.

A noter que nous avons également observé nos échantillons en Microscopie Electronique à Balayage (ou MEB). Développée dans les années 1930, cette technique de caractérisation consiste comme son nom l'indique à balayer la surface d'un échantillon à l'aide d'un faisceau électronique. Des interactions ont alors lieu, et les électrons réémis sont collectés et analysés. Dans nos travaux, nous avons exploité deux types d'électrons : les électrons secondaires, qui ont été éjectés de l'échantillon par ionisation, et qui vont apporter un contraste topographique, et les électrons rétrodiffusés, diffusés quasi élastiquement à la suite d'interactions avec les noyaux des atomes constituant l'échantillon. Ces derniers vont apporter un contraste chimique, dépendant du numéro atomique, en plus d'un contraste topographique. Au laboratoire, le microscope utilisé a été un JEOL JSM 7600F, dont nous présentons une photographie sur la Figure 1.21.



Figure 1.21 : Microscope électronique à balayage JEOL JSM 7600F de l'IMN.

1.3.3. Spectrométrie de diffusion Raman

La spectrométrie de diffusion Raman est développée depuis la découverte du phénomène de diffusion Raman par le physicien Chandrashekhara Venkata Râman en 1928[94]. Le principe est le suivant : quand un rayonnement électromagnétique interagit avec un échantillon, une partie va être diffusée. La majorité du rayonnement va subir une diffusion élastique, et on parle alors de diffusion Rayleigh[12]. Une autre partie bien plus faible de ce rayonnement incident (pour moins d'un millième des photons diffusés) va être diffusée inélastiquement par le milieu, et on parle de diffusion Raman. Puisque cette diffusion est inélastique, cela implique qu'il y ait un transfert d'énergie entre le rayonnement et l'échantillon, et ceci se produit par la création ou l'annihilation de vibrations des liaisons chimiques au sein du matériau :

- Si les photons diffusés sont moins énergétiques que les photons incidents, il y a création de vibrations, on parle de diffusion Raman Stokes.
- A l'inverse, si les photons diffusés sont plus énergétiques, il y a annihilation d'une vibration et on parle de diffusion Raman anti-Stokes. Ce cas étant statistiquement moins probable à température ambiante, on néglige souvent sa mesure et son étude.

Des exemples de types de vibration sont représentés sur la Figure 1.22. Pour une molécule polyatomique, les modes normaux de vibrations peuvent être une élongation symétrique ou asymétrique (*symmetric* ou *asymmetric stretching*), ou des vibrations de déformations, dites *bending*, qui peuvent être dans le plan ou hors du plan. Les déformations dans le plan peuvent être des cisaillements (*scissoring*) ou des bascules (*rocking*). Enfin, les déformations hors du plan peuvent être des balancements (*wagging*) ou des torsions (*twisting*).

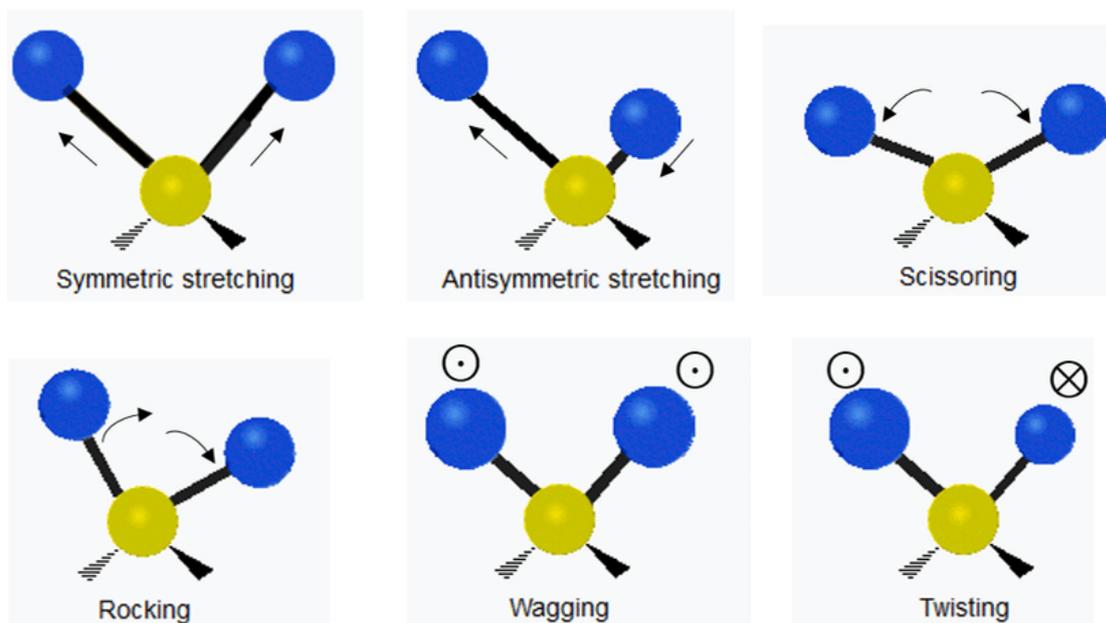


Figure 1.22 : Modes de vibration normaux pour une molécule polyatomique (d'après[95]).

En traçant l'intensité diffusée en fonction de la différence entre le nombre d'onde des photons diffusés et incidents, nous disposons d'indications sur les liaisons chimiques de l'échantillon sondé, puisque les positions des pics correspondent aux nombres d'onde de vibrations de ces liaisons. A savoir que seuls les modes de vibration modifiant la polarisabilité sont visibles en Raman. Cette méthode est en cela complémentaire de la spectrométrie d'absorption infrarouge, et ces deux techniques sont fréquemment utilisées en parallèle, voire simultanément[96].

La spectrométrie Raman a évidemment été maintes fois utilisée pour étudier les propriétés plasmoniques de nanoparticules d'or, notamment en lien avec les sciences du vivant[97][98], ainsi que pour évaluer les propriétés physico-chimiques de plantes[99][100]. Un des intérêts des nanoparticules d'or est la possibilité de les utiliser pour faire de la Spectrométrie Raman Exaltée de Surface (ou SERS, pour Surface-Enhanced Raman Spectroscopy). La principale explication de ce phénomène est d'ordre électromagnétique. En effet, comme présenté précédemment, la résonance plasmonique des nanoparticules augmente considérablement le champ électromagnétique à leur voisinage. Cela permet d'intensifier la diffusion Raman des molécules proches. Le facteur d'exaltation peut être très important, pouvant atteindre 10^{10} [101], et peut permettre de détecter des molécules uniques[102]. Dès lors, le SERS a été utilisé, par exemple en imagerie[103], en contrôle de qualité[104] ou surtout pour le développement de capteurs biologiques[105][106][107].

Le spectromètre Raman utilisé au cours de nos mesures est un spectromètre dispersif inVia de Renishaw, avec six longueurs d'onde d'excitation accessibles : 457, 488

et 514 nm, toutes les trois émises par un laser à argon, 633 nm émise par un laser hélium néon, et 785 nm, avec une source diode laser.

Une photographie du spectromètre est reportée sur la Figure 1.23. Le laser entre en bas à droite et va être focalisé sur l'échantillon par un microscope optique confocal (trajet en vert sur la figure) équipé de différents objectifs (x 5, x 20, x 50 et x 100, ainsi que des longues focales x 50 et x 100). Le rayonnement est ensuite rétrodiffusé (trajet en rouge sur la figure), et un filtre Edge permet de filtrer à la fois la diffusion anti-Stokes et la raie Rayleigh. Un réseau permet enfin de disperser le signal Stokes avant d'être collecté par une caméra CCD refroidie par effet Peltier. Dans notre cas, deux réseaux ont été utilisés : 1200 traits/mm pour les mesures réalisées à 633 nm et 2400 traits/mm pour les mesures réalisées à 514 nm et 785 nm.

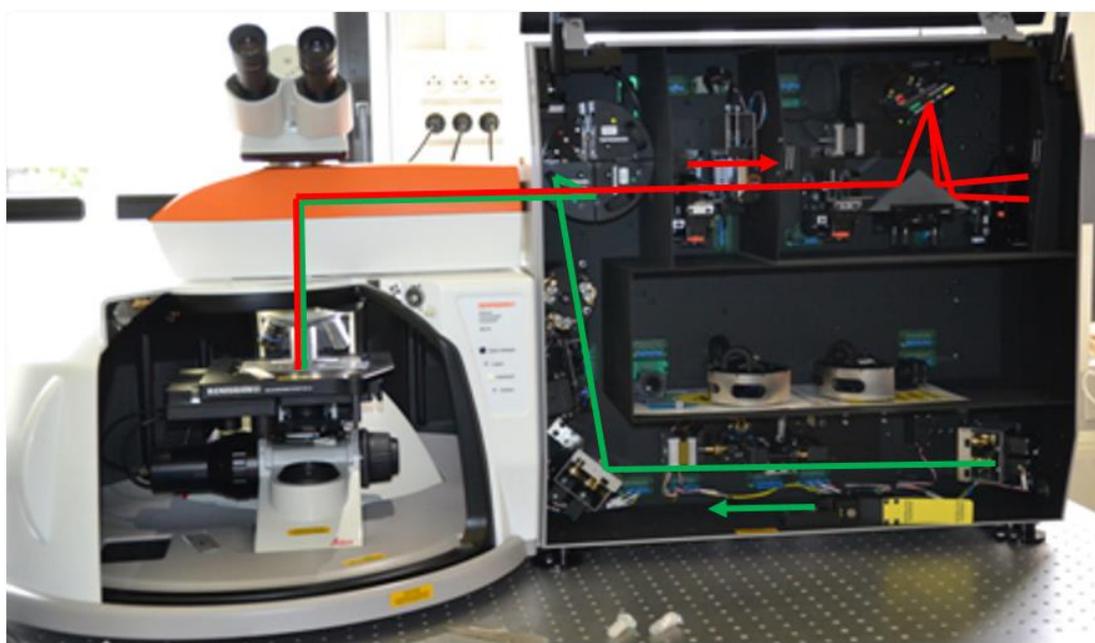


Figure 1.23 : Spectromètre Raman Renishaw inVia utilisé dans cette thèse. L'illumination se fait selon le trajet vert, et la rétrodiffusion après interaction avec l'échantillon selon le trajet rouge.

Sur la Figure 1.24, nous voyons les trois sources d'excitations utilisées : le laser hélium néon est situé sur la gauche, le laser à argon au centre, et le boîtier bleu est la diode laser utilisée pour travailler à 785 nm.

Dans nos mesures, nous avons fréquemment utilisé le mode confocal du microscope optique afin d'améliorer la résolution spatiale de nos mesures. Dans ce mode particulier, un diaphragme est positionné avant le détecteur afin de ne sélectionner que les rayons provenant d'un point précis de l'échantillon. Ainsi les rayons diffusés provenant d'une autre zone, que ce soit en X et Y ou en Z ne sont pas collectés par le détecteur CCD, comme présenté sur la Figure 1.25. Les rayons provenant de la surface de l'échantillon

(en vert) traversent le diaphragme vers le détecteur, alors que les rayons provenant de l'intérieur de l'échantillon sont bloqués par le diaphragme.

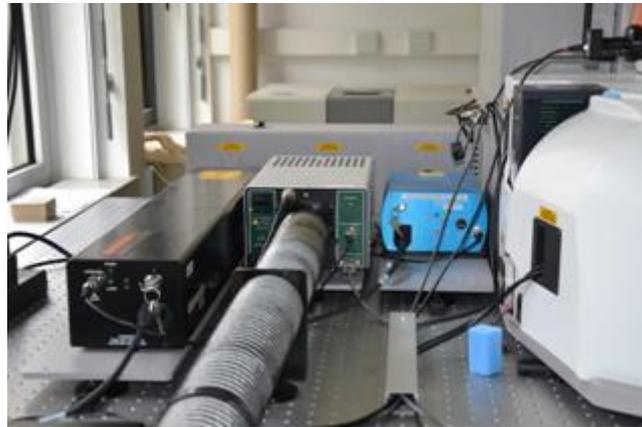


Figure 1.24 : Sources d'excitation du spectromètre Raman.

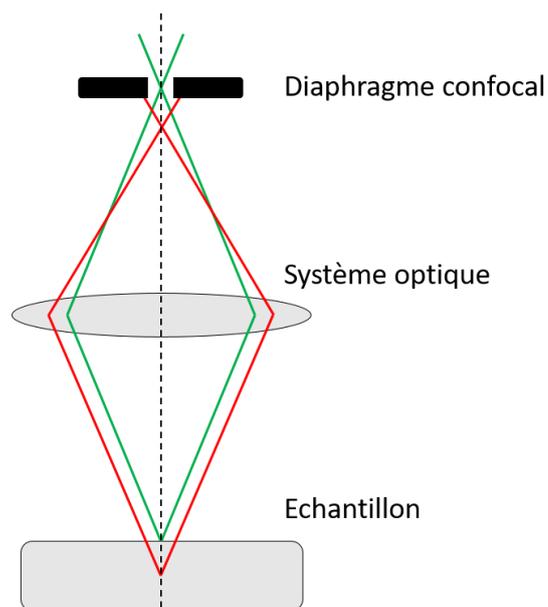


Figure 1.25 : Schéma de principe d'un microscope confocal. Le diaphragme est inséré entre l'objectif et le détecteur afin de sélectionner uniquement les rayons provenant de la zone de l'échantillon que nous souhaitons sonder.

1.3.4. Spectroscopie d'absorption UV-visible

Pour finir, nous avons réalisé des mesures d'absorption UV-visible. Dans cette technique, un faisceau de lumière est envoyé sur l'échantillon à analyser, et une partie de

ce rayonnement va être analysé suite à l'absorption du rayonnement incident par l'échantillon. Cette technique est utilisée pour déterminer les gammes de longueurs d'onde d'absorption des nanoparticules d'or. L'appareil utilisé est un spectromètre Perkin Elmer Lambda 1050, avec un module de détection 3DWB équipé de 3 détecteurs (PMT, InGaAs, PbS) permettant des mesures d'absorption et de transmission dans une gamme de longueurs d'onde allant de 175 nm à 3300 nm. Ici, notre gamme d'excitation allait de 400 nm à 1400 nm.

1.4. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les caractéristiques générales des nanoparticules d'or ainsi que des cellules végétales. Nous avons présenté les propriétés plasmoniques de l'or colloïdal, ainsi que les applications des nanoparticules d'or en lien avec le vivant. L'échantillon biologique étudié, la plante *Egeria Densa*, a été présenté, ainsi que les processus d'internalisation de nanoparticules dans les cellules végétales, tels que décrits dans la littérature.

En effet, l'internalisation des nanoparticules métalliques dans les cellules de plantes peut entraîner des modifications physiologiques importantes. En particulier, il convient de caractériser au mieux les propriétés mécaniques de la paroi végétale en présence des nanoparticules à des concentrations non cytotoxiques.

Les différentes techniques de caractérisation mises en œuvre dans ce travail ont été présentées : la microscopie à force atomique, la microscopie électronique ainsi que les spectroscopies de diffusion Raman et d'absorption optique UV-visible. Leur utilisation va permettre de caractériser précisément les propriétés structurales et chimiques des nanoparticules d'autre part et de caractériser les propriétés mécaniques et physico-chimiques des cellules végétales mises en contact avec les nanoparticules d'or d'autre part.

Les chapitres suivants seront consacrés à la présentation des expériences menées, aux mesures effectuées et aux résultats obtenus. Le Chapitre 2 est dédié à la description de la synthèse et de la fonctionnalisation des nanoparticules d'or ainsi qu'à leurs caractérisations structurale, morphologique et chimique.

1.5. Bibliographie

- [1] L.B. Hunt, The true story of Purple of Cassius: The birth of gold-based glass and enamel colours, *Gold Bull.* 9 (1976) 134–139. <https://doi.org/10.1007/BF03215423>.
- [2] A.J. Haes, D.A. Stuart, S. Nie, R.P. Van Duyne, Using Solution-Phase Nanoparticles, Surface-Confined Nanoparticle Arrays and Single Nanoparticles as Biological Sensing Platforms, *Journal of Fluorescence.* 14 (2004) 355–367. <https://doi.org/10.1023/B:JOFL.0000031817.35049.1f>.
- [3] Site Internet Wikipedia - Coupe de Lycurgue, (2021). https://fr.wikipedia.org/wiki/Coupe_de_Lycurgue (accessed July 7, 2021).
- [4] Site Internet Wikipedia - Pourpre de Cassius, (2020). https://fr.wikipedia.org/wiki/Pourpre_de_Cassius (accessed July 7, 2021).
- [5] Site Internet Wikipedia - Rose sud de Notre-Dame de Paris, (2021). https://fr.wikipedia.org/wiki/Rose_sud_de_Notre-Dame_de_Paris (accessed July 7, 2021).
- [6] C. Caucheteur, Plasmons de surface : principes physiques et applications, *Techniques de l'ingénieur.* (2014) 17.
- [7] K.L. Kelly, E. Coronado, L.L. Zhao, G.C. Schatz, The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment, *J. Phys. Chem. B.* 107 (2003) 668–677. <https://doi.org/10.1021/jp026731y>.
- [8] P. Drude, Zur Elektronentheorie der Metalle, *Ann. Phys.* 306 (1900) 566–613. <https://doi.org/10.1002/andp.19003060312>.
- [9] K. Kolwas, A. Derkachova, Impact of the Interband Transitions in Gold and Silver on the Dynamics of Propagating and Localized Surface Plasmons, *Nanomaterials.* 10 (2020) 1411. <https://doi.org/10.3390/nano10071411>.
- [10] P.B. Johnson, R.W. Christy, Optical Constants of the Noble Metals, *Phys. Rev. B.* 6 (1972) 4370–4379. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.6.4370>.
- [11] Q. Jiang, Realization and optimization of plasmonic structures for directional control of light, (n.d.) 163.
- [12] C.F. Bohren, D.R. Huffman, Absorption and scattering of light by small particles, Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
- [13] X. Huang, M.A. El-Sayed, Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy, *Journal of Advanced Research.* 1 (2010) 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002>.
- [14] Site Internet Nanohybrids - Plasmonics nanoparticles, (n.d.). <https://nanohybrids.net/pages/plasmonics> (accessed July 3, 2021).
- [15] V. Amendola, R. Pilot, M. Frascioni, O.M. Maragò, M.A. Iatì, Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review, *J. Phys.: Condens. Matter.* 29 (2017) 203002. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3>.
- [16] V.A. Ogarev, V.M. Rudoi, O.V. Dement'eva, Gold Nanoparticles: Synthesis, Optical Properties, and Application, *Inorg. Mater. Appl. Res.* 9 (2018) 134–140. <https://doi.org/10.1134/S2075113318010197>.
- [17] S.K. Ghosh, T. Pal, Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications, *Chem. Rev.* 107 (2007) 4797–4862. <https://doi.org/10.1021/cr0680282>.

- [18] L.J.E. Anderson, C.M. Payne, Y.-R. Zhen, P. Nordlander, J.H. Hafner, A Tunable Plasmon Resonance in Gold Nanobelts, *Nano Lett.* 11 (2011) 5034–5037. <https://doi.org/10.1021/nl203085t>.
- [19] S.A. Belhout, F.R. Baptista, S.J. Devereux, A.W. Parker, A.D. Ward, S.J. Quinn, Preparation of polymer gold nanoparticle composites with tunable plasmon coupling and their application as SERS substrates, *Nanoscale.* 11 (2019) 19884–19894. <https://doi.org/10.1039/C9NR05014K>.
- [20] S. Liang, J.-B. Li, M. Li, X. Tang, Tunable Plasmon Resonance and Enhanced Photocatalytic Activity of Au–CdS Core–Shell Nanodogbones, *Plasmonics.* 13 (2018) 181–187. <https://doi.org/10.1007/s11468-017-0498-0>.
- [21] B. Liu, Y. Lu, X. Yang, J. Yao, Tunable Surface Plasmon Resonance Sensor Based on Photonic Crystal Fiber Filled with Gold Nanoshells, *Plasmonics.* 13 (2018) 763–770. <https://doi.org/10.1007/s11468-017-0570-9>.
- [22] J.S. Sekhon, S.S. Verma, Rational Selection of Nanorod Plasmons: Material, Size, and Shape Dependence Mechanism for Optical Sensors, *Plasmonics.* 7 (2012) 453–459. <https://doi.org/10.1007/s11468-012-9328-6>.
- [23] P. Goodman, Current and future uses of gold in electronics, *Gold Bull.* 35 (2002) 21–26. <https://doi.org/10.1007/BF03214833>.
- [24] C. Beer, R. Foldbjerg, Y. Hayashi, D.S. Sutherland, H. Autrup, Toxicity of silver nanoparticles—Nanoparticle or silver ion?, *Toxicology Letters.* 208 (2012) 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.002>.
- [25] P.V. Asharani, Y. Lian Wu, Z. Gong, S. Valiyaveetil, Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models, *Nanotechnology.* 19 (2008) 255102. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/25/255102>.
- [26] E. Navarro, F. Piccapietra, B. Wagner, F. Marconi, R. Kaegi, N. Odzak, L. Sigg, R. Behra, Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 8959–8964. <https://doi.org/10.1021/es801785m>.
- [27] A.M. El Badawy, R.G. Silva, B. Morris, K.G. Scheckel, M.T. Suidan, T.M. Tolaymat, Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 283–287. <https://doi.org/10.1021/es1034188>.
- [28] P. Ghosh, G. Han, M. De, C. Kim, V. Rotello, Gold nanoparticles in delivery applications, *Advanced Drug Delivery Reviews.* 60 (2008) 1307–1315. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.016>.
- [29] S.D. Brown, P. Nativo, J.-A. Smith, D. Stirling, P.R. Edwards, B. Venugopal, D.J. Flint, J.A. Plumb, D. Graham, N.J. Wheate, Gold Nanoparticles for the Improved Anticancer Drug Delivery of the Active Component of Oxaliplatin, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 4678–4684. <https://doi.org/10.1021/ja908117a>.
- [30] G.F. Paciotti, D.G.I. Kingston, L. Tamarkin, Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors, *Drug Dev. Res.* 67 (2006) 47–54. <https://doi.org/10.1002/ddr.20066>.
- [31] J. Lou-Franco, B. Das, C. Elliott, C. Cao, Gold Nanozymes: From Concept to Biomedical Applications, *Nano-Micro Lett.* 13 (2021) 10. <https://doi.org/10.1007/s40820-020-00532-z>.
- [32] Y. Zhang, E. Villarreal, G.G. Li, W. Wang, H. Wang, Plasmonic Nanozymes: Engineered Gold Nanoparticles Exhibit Tunable Plasmon-Enhanced Peroxidase-Mimicking Activity, *J. Phys. Chem. Lett.* 11 (2020) 9321–9328. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.0c02640>.

- [33] Y. Zhao, Y. Tian, Y. Cui, W. Liu, W. Ma, X. Jiang, Small Molecule-Capped Gold Nanoparticles as Potent Antibacterial Agents That Target Gram-Negative Bacteria, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 12349–12356. <https://doi.org/10.1021/ja1028843>.
- [34] R. Kannan, V. Rahing, C. Cutler, R. Pandrapragada, K.K. Katti, V. Kattumuri, J.D. Robertson, S.J. Casteel, S. Jurisson, C. Smith, E. Boote, K.V. Katti, Nanocompatible Chemistry toward Fabrication of Target-Specific Gold Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 11342–11343. <https://doi.org/10.1021/ja063280c>.
- [35] Zhang, Irradiation stability and cytotoxicity of gold nanoparticles for radiotherapy, *IJN.* (2009) 165. <https://doi.org/10.2147/IJN.S6723>.
- [36] W.N. Rahman, N. Bishara, T. Ackerly, C.F. He, P. Jackson, C. Wong, R. Davidson, M. Geso, Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 5 (2009) 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.01.014>.
- [37] N. Ma, F.-G. Wu, X. Zhang, Y.-W. Jiang, H.-R. Jia, H.-Y. Wang, Y.-H. Li, P. Liu, N. Gu, Z. Chen, Shape-Dependent Radiosensitization Effect of Gold Nanostructures in Cancer Radiotherapy: Comparison of Gold Nanoparticles, Nanospikes, and Nanorods, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 9 (2017) 13037–13048. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b01112>.
- [38] L. Jauffred, A. Samadi, H. Klingberg, P.M. Bendix, L.B. Oddershede, Plasmonic Heating of Nanostructures, *Chem. Rev.* 119 (2019) 8087–8130. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00738>.
- [39] J. Choi, J. Yang, E. Jang, J.-S. Suh, Y.-M. Huh, K. Lee, S. Haam, Gold Nanostructures as Photothermal Therapy Agent for Cancer, *ACAMC.* 11 (2011) 953–964. <https://doi.org/10.2174/187152011797927599>.
- [40] N. Su, Y. Dang, G. Liang, G. Liu, Iodine-125-labeled cRGD-gold nanoparticles as tumor-targeted radiosensitizer and imaging agent, *Nanoscale Res Lett.* 10 (2015) 160. <https://doi.org/10.1186/s11671-015-0864-9>.
- [41] D. Kim, S. Park, J.H. Lee, Y.Y. Jeong, S. Jon, Antibiofouling Polymer-Coated Gold Nanoparticles as a Contrast Agent for in Vivo X-ray Computed Tomography Imaging, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 7661–7665. <https://doi.org/10.1021/ja071471p>.
- [42] X. Bai, Y. Wang, Z. Song, Y. Feng, Y. Chen, D. Zhang, L. Feng, The Basic Properties of Gold Nanoparticles and their Applications in Tumor Diagnosis and Treatment, *IJMS.* 21 (2020) 2480. <https://doi.org/10.3390/ijms21072480>.
- [43] R.H. Garrett, C.M. Grisham, *Biochemistry*, 2nd ed., Cengage, 1999.
- [44] C.T. McKee, V.K. Raghunathan, P.F. Nealey, P. Russell, C.J. Murphy, Topographic Modulation of the Orientation and Shape of Cell Nuclei and Their Influence on the Measured Elastic Modulus of Epithelial Cells, *Biophysical Journal.* 101 (2011) 2139–2146. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.09.042>.
- [45] N. Caille, O. Thoumine, Y. Tardy, J.-J. Meister, Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells, *Journal of Biomechanics.* 35 (2002) 177–187. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(01\)00201-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(01)00201-9).
- [46] Site Internet Cusabio Life Sciences - The Collection of Organelle Markers Antibodies in Plant Cells, (n.d.). <https://www.cusabio.com/the-collection-of-organelle-markers-antibodies-in-plant-cells> (accessed July 7, 2021).
- [47] Site Internet Wikipedia - Cellulose, (2021). <https://fr.wikipedia.org/wiki/Cellulose> (accessed July 1, 2021).

- [48] Site Internet Wikipedia - Pectine, (2021). <https://de.wikipedia.org/wiki/Pektine> (accessed July 1, 2021).
- [49] T. Hara, E. Kobayashi, K. Ohtsubo, S. Kumada, M. Kanazawa, T. Abe, R.D. Itoh, M.T. Fujiwara, Organ-Level Analysis of Idioblast Patterning in *Egeria densa* Planch. Leaves, *PLoS ONE*. 10 (2015) e0118965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118965>.
- [50] A.S. Foster, Plant idioblasts: Remarkable examples of cell specialization, *Protoplasma*. 46 (1956) 184–193. <https://doi.org/10.1007/BF01248877>.
- [51] E. Etxeberria, P. Gonzalez, E. Baroja-Fernández, J.P. Romero, Fluid Phase Endocytic Uptake of Artificial Nano-Spheres and Fluorescent Quantum Dots by Sycamore Cultured Cells: Evidence for the Distribution of Solutes to Different Intracellular Compartments, *Plant Signaling & Behavior*. 1 (2006) 196–200. <https://doi.org/10.4161/psb.1.4.3142>.
- [52] M.H. Wong, R.P. Misra, J.P. Giraldo, S.-Y. Kwak, Y. Son, M.P. Landry, J.W. Swan, D. Blankschtein, M.S. Strano, Lipid Exchange Envelope Penetration (LEEP) of Nanoparticles for Plant Engineering: A Universal Localization Mechanism, *Nano Lett*. 16 (2016) 1161–1172. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b04467>.
- [53] A.E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E.M.V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface, *Nature Mater*. 8 (2009) 543–557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>.
- [54] A.G. Roberts, K.J. Oparka, Plasmodesmata and the control of symplastic transport: Plasmodesmata and symplastic transport, *Plant, Cell & Environment*. 26 (2003) 103–124. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.00950.x>.
- [55] A. Pérez-de-Luque, Interaction of Nanomaterials with Plants: What Do We Need for Real Applications in Agriculture?, *Front. Environ. Sci*. 5 (2017). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00012>.
- [56] M. Wu, H. Guo, L. Liu, Y. Liu, L. Xie, Size-dependent cellular uptake and localization profiles of silver nanoparticles, *IJN*. Volume 14 (2019) 4247–4259. <https://doi.org/10.2147/IJN.S201107>.
- [57] F. Schwab, G. Zhai, M. Kern, A. Turner, J.L. Schnoor, M.R. Wiesner, Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants – Critical review, *Nanotoxicology*. 10 (2016) 257–278. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1048326>.
- [58] J.D. Judy, J.M. Unrine, W. Rao, S. Wirick, P.M. Bertsch, Bioavailability of Gold Nanomaterials to Plants: Importance of Particle Size and Surface Coating, *Environ. Sci. Technol*. 46 (2012) 8467–8474. <https://doi.org/10.1021/es3019397>.
- [59] S.K. Mwilu, A.M. El Badawy, K. Bradham, C. Nelson, D. Thomas, K.G. Scheckel, T. Tolaymat, L. Ma, K.R. Rogers, Changes in silver nanoparticles exposed to human synthetic stomach fluid: Effects of particle size and surface chemistry, *Science of The Total Environment*. 447 (2013) 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.036>.
- [60] Z.-J. Zhu, H. Wang, B. Yan, H. Zheng, Y. Jiang, O.R. Miranda, V.M. Rotello, B. Xing, R.W. Vachet, Effect of Surface Charge on the Uptake and Distribution of Gold Nanoparticles in Four Plant Species, *Environ. Sci. Technol*. 46 (2012) 12391–12398. <https://doi.org/10.1021/es301977w>.

- [61] V. Kumar, P. Guleria, V. Kumar, S.K. Yadav, Gold nanoparticle exposure induces growth and yield enhancement in *Arabidopsis thaliana*, *Science of The Total Environment*. 461–462 (2013) 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.018>.
- [62] W. Cui, J. Li, Y. Zhang, H. Rong, W. Lu, L. Jiang, Effects of aggregation and the surface properties of gold nanoparticles on cytotoxicity and cell growth, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 8 (2012) 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.005>.
- [63] J. Yang, W. Cao, Y. Rui, Interactions between nanoparticles and plants: phytotoxicity and defense mechanisms, *Journal of Plant Interactions*. 12 (2017) 158–169. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1310944>.
- [64] N.S. Feichtmeier, P. Walther, K. Leopold, Uptake, effects, and regeneration of barley plants exposed to gold nanoparticles, *Environ Sci Pollut Res.* (n.d.) 10.
- [65] T. Sabo-Attwood, J.M. Unrine, J.W. Stone, C.J. Murphy, S. Ghoshroy, D. Blom, P.M. Bertsch, L.A. Newman, Uptake, distribution and toxicity of gold nanoparticles in tobacco (*Nicotiana xanthi*) seedlings, *Nanotoxicology*. 6 (2012) 353–360. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.579631>.
- [66] M. Sendra, J. Blasco, C.V.M. Araújo, Is the cell wall of marine phytoplankton a protective barrier or a nanoparticle interaction site? Toxicological responses of *Chlorella autotrophica* and *Dunaliella salina* to Ag and CeO₂ nanoparticles, *Ecological Indicators*. 95 (2018) 1053–1067. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.08.050>.
- [67] S.C. Capaldi Arruda, A.L. Diniz Silva, R. Moretto Galazzi, R. Antunes Azevedo, M.A. Zezzi Arruda, Nanoparticles applied to plant science: A review, *Talanta*. 131 (2015) 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.050>.
- [68] M.C. DeRosa, C. Monreal, M. Schnitzer, R. Walsh, Y. Sultan, Nanotechnology in fertilizers, *Nature Nanotech*. 5 (2010) 91–91. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.2>.
- [69] H. Kang, Y.-G. Hwang, T.-G. Lee, C.-R. Jin, C.H. Cho, H.-Y. Jeong, D.-O. Kim, Use of Gold Nanoparticle Fertilizer Enhances the Ginsenoside Contents and Anti-Inflammatory Effects of Red Ginseng, *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26 (2016) 1668–1674. <https://doi.org/10.4014/jmb.1604.04034>.
- [70] F. Chen, Z. Xiao, L. Yue, J. Wang, Y. Feng, X. Zhu, Z. Wang, B. Xing, Algae response to engineered nanoparticles: current understanding, mechanisms and implications, *Environ. Sci.: Nano*. 6 (2019) 1026–1042. <https://doi.org/10.1039/C8EN01368C>.
- [71] P. Biswas, C.-Y. Wu, Nanoparticles and the Environment, *Journal of the Air & Waste Management Association*. 55 (2005) 708–746. <https://doi.org/10.1080/10473289.2005.10464656>.
- [72] R. Ruotolo, E. Maestri, L. Pagano, M. Marmiroli, J.C. White, N. Marmiroli, Plant Response to Metal-Containing Engineered Nanomaterials: An Omics-Based Perspective, *Environ. Sci. Technol*. 52 (2018) 2451–2467. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04121>.
- [73] M. Khoshnamvand, S. Ashtiani, J. Liu, Acute toxicity of gold nanoparticles synthesized from macroalga *Saccharina japonica* towards *Daphnia magna*, *Environ Sci Pollut Res*. 27 (2020) 22120–22126. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08770-9>.

- [74] E. Navarro, A. Baun, R. Behra, N.B. Hartmann, J. Filser, A.-J. Miao, A. Quigg, P.H. Santschi, L. Sigg, Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi, *Ecotoxicology*. 17 (2008) 372–386. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0>.
- [75] X. Ma, J. Yan, Plant uptake and accumulation of engineered metallic nanoparticles from lab to field conditions, *Current Opinion in Environmental Science & Health*. 6 (2018) 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.07.008>.
- [76] F. Chen, Z. Xiao, L. Yue, J. Wang, Y. Feng, X. Zhu, Z. Wang, B. Xing, Algae response to engineered nanoparticles: current understanding, mechanisms and implications, *Environ. Sci.: Nano*. 6 (2019) 1026–1042. <https://doi.org/10.1039/C8EN01368C>.
- [77] S. Kasas, G. Longo, G. Dietler, Mechanical properties of biological specimens explored by atomic force microscopy, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 46 (2013) 133001. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/46/13/133001>.
- [78] H. Oliveri, J. Traas, C. Godin, O. Ali, Regulation of plant cell wall stiffness by mechanical stress: a mesoscale physical model, *J. Math. Biol.* 78 (2019) 625–653. <https://doi.org/10.1007/s00285-018-1286-y>.
- [79] D.U. Shah, T.P. Reynolds, M.H. Ramage, The strength of plants: theory and experimental methods to measure the mechanical properties of stems, *Journal of Experimental Botany*. 68 (2017) 4497–4516. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx245>.
- [80] A. Peaucelle, S.A. Braybrook, L. Le Guillou, E. Bron, C. Kuhlemeier, H. Höfte, Pectin-Induced Changes in Cell Wall Mechanics Underlie Organ Initiation in Arabidopsis, *Current Biology*. 21 (2011) 1720–1726. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.08.057>.
- [81] E. Lesniewska, M. Adrian, A. Klinguer, A. Pugin, Cell wall modification in grapevine cells in response to UV stress investigated by atomic force microscopy, *Ultramicroscopy*. 100 (2004) 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2003.11.004>.
- [82] G. Binnig, C.F. Quate, Ch. Gerber, Atomic Force Microscope, *Phys. Rev. Lett.* 56 (1986) 930–933. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>.
- [83] O. Marti, B. Drake, P.K. Hansma, Atomic force microscopy of liquid-covered surfaces: Atomic resolution images, *Applied Physics Letters*. 51 (1987) 484–486. <https://doi.org/10.1063/1.98374>.
- [84] J.-C. Rivoal, C. Frétygny, *Microscopie à force atomique (AFM)*, (2005) 23.
- [85] Site Internet Nanoandmore - Pyramidal probe, (n.d.). <https://www.nanoandmore.fr/sonde-AFM-PNP-TR-Au> (accessed July 2, 2021).
- [86] Site Internet Team Nanotec - Conical probe, (n.d.). <https://www.team-nanotec.de/index.cfm?contentid=10&shopAction=listProducts&shopCatID=76¤tPage=1> (accessed July 2, 2021).
- [87] Site Internet University College Dublin, Nanoscale function group - Colloidal probe measurements, (en). <https://www.nanofunction.org/colloid-probe-measurements> (accessed July 2, 2021).
- [88] O. Chaudhuri, S.H. Parekh, W.A. Lam, D.A. Fletcher, Combined atomic force microscopy and side-view optical imaging for mechanical studies of cells, *Nat Methods*. 6 (2009) 383–387. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1320>.
- [89] M. Born, E. Wolf, *Principles of optics*, 6th edition, Cambridge University Press, 1980.
- [90] E. Ruska, The development of the electron microscope and of electron microscopy, *Bioscience Reports*. 7 (1987) 23.

- [91] HAADF-STEM introduction: JEOL.co.jp, (2020).
https://www.jeol.co.jp/en/words/emterms/search_result.html?keyword=HAADF-STEM (accessed February 23, 2021).
- [92] Site Internet Agar Scientific - Support films : holey carbons, (n.d.).
<https://www.agarscientific.com/tem/support-films-hole-carbon> (accessed July 7, 2021).
- [93] E. Yücelen, I. Lazić, E.G.T. Bosch, Phase contrast scanning transmission electron microscopy imaging of light and heavy atoms at the limit of contrast and resolution, *Sci Rep.* 8 (2018) 2676. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20377-2>.
- [94] C.V. Raman, A new radiation, *Indiant J. Phys.* 2 (1928) 387–398.
- [95] A. Giustiniani, Linking Adhesive Properties and Pore Organisation of Silicone Emulsions Obtained by Reactive Blending, (n.d.) 259.
- [96] K. Hashimoto, V.R. Badarla, A. Kawai, T. Ideguchi, Complementary vibrational spectroscopy, *Nat Commun.* 10 (2019) 4411. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12442-9>.
- [97] A.S. Thakor, R. Paulmurugan, P. Kempen, C. Zavaleta, R. Sinclair, T.F. Massoud, S.S. Gambhir, Oxidative Stress Mediates the Effects of Raman-Active Gold Nanoparticles in Human Cells, *Small.* 7 (2011) 126–136.
<https://doi.org/10.1002/sml.201001466>.
- [98] X. Ma, Q. Qu, Y. Zhao, Z. Luo, Y. Zhao, K.W. Ng, Y. Zhao, Graphene oxide wrapped gold nanoparticles for intracellular Raman imaging and drug delivery, *J. Mater. Chem. B.* 1 (2013) 6495. <https://doi.org/10.1039/c3tb21385d>.
- [99] N. Gierlinger, T. Keplinger, M. Harrington, Imaging of plant cell walls by confocal Raman microscopy, *Nat Protoc.* 7 (2012) 1694–1708.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2012.092>.
- [100] M. Lutz, J. Breton, Chlorophyll associations in the chloroplast: Resonance Raman spectroscopy, *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 53 (1973) 413–418.
- [101] E.C. Le Ru, E. Blackie, M. Meyer, P.G. Etchegoin, Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study, *J. Phys. Chem. C.* 111 (2007) 13794–13803. <https://doi.org/10.1021/jp0687908>.
- [102] E.J. Blackie, E.C. Le Ru, P.G. Etchegoin, Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Nonresonant Molecules, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 14466–14472. <https://doi.org/10.1021/ja905319w>.
- [103] J. Ando, K. Fujita, N.I. Smith, S. Kawata, Dynamic SERS Imaging of Cellular Transport Pathways with Endocytosed Gold Nanoparticles, *Nano Lett.* 11 (2011) 5344–5348. <https://doi.org/10.1021/nl202877r>.
- [104] Z. Lin, L. He, Recent advance in SERS techniques for food safety and quality analysis: a brief review, *Current Opinion in Food Science.* 28 (2019) 82–87.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.10.001>.
- [105] G.P. Szekeres, J. Kneipp, SERS Probing of Proteins in Gold Nanoparticle Agglomerates, *Front. Chem.* 7 (2019) 30.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00030>.
- [106] R. Zhu, H. Feng, Q. Li, L. Su, Q. Fu, J. Li, J. Song, H. Yang, Asymmetric Core–Shell Gold Nanoparticles and Controllable Assemblies for SERS Ratiometric Detection of MicroRNA, *Angew. Chem.* 133 (2021) 12668–12676.
<https://doi.org/10.1002/ange.202102893>.

- [107] Y. Xu, F.Y.H. Kutsanedzie, M. Hassan, J. Zhu, W. Ahmad, H. Li, Q. Chen, Mesoporous silica supported orderly-spaced gold nanoparticles SERS-based sensor for pesticides detection in food, *Food Chemistry*. 315 (2020) 126300. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126300>.

Chapitre 2

Synthèse et fonctionnalisation de nanoparticules d'or

2.1.	Synthèse des nanoparticules d'or	45
2.1.1.	Caractérisations optiques et structurales	50
2.1.1.1.	Structure, taille et forme des nanoparticules synthétisées.....	51
2.1.1.2.	Propriétés plasmoniques des nanoparticules synthétisées.....	57
2.1.2.	Impact de la durée de synthèse	59
2.2.	Fonctionnalisation des nanoparticules d'or	61
2.2.1.	Présentation des molécules utilisées pour le greffage	61
2.2.2.	Protocole de fonctionnalisation.....	65
2.2.3.	Contrôle de la fonctionnalisation.....	66
2.2.3.1.	D'un agglomérat de particules vers une suspension colloïdale stable	66
2.2.3.2.	Caractérisation par S(TEM) et STEM iDPC	67
2.2.3.3.	Détection de la liaison covalente or-soufre par spectrométrie Raman.....	68
2.2.4.	Effet SERS	70
2.3.	Conclusion.....	74
2.4.	Bibliographie	75

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent à l'interface entre physico-chimie des matériaux et sciences du vivant. Par conséquent, l'aspect biocompatibilité a été au premier plan des réflexions au cours des travaux. Le choix d'utiliser des nanoparticules d'or a été motivé par leur cytotoxicité plus faible en comparaison avec d'autres métaux comme le nickel et le cuivre et leur stabilité vis-à-vis de l'oxydation[1]. Les nanoparticules d'argent présentant pourtant une réponse optique plus importante ont ainsi été écartées, d'autant plus qu'elles présentant également des propriétés biocides importantes.

Nous pouvons trouver dans la littérature de nombreuses méthodes de synthèse de nanoparticules d'or anisotropes. Un point commun à la grande majorité de ces méthodes est l'utilisation au cours de la synthèse de surfactant, comme le CTAB, le bromure de cétyltriméthylammonium $[(C_{16}H_{33})N(CH_3)_3]Br$. Ce surfactant permet de contrôler l'évolution du rapport d'aspect des nanoparticules au cours de la réaction, en particulier pour la synthèse de nano-bâtonnets, aux propriétés optiques plus intéressantes que les simples nano-sphères [2][3][4]. Dans un contexte d'applications en imagerie intracellulaire, cela pose un problème de toxicité. En effet, l'impact nocif du CTAB sur des cellules, qu'elles soient animales ou végétales, a pu être démontré. Par exemple, le poisson-zèbre (*Brachydanio Rerio*) a présenté des dégradations physiques et des anomalies de développement comme une diminution de la longueur du corps ou une déformation de la queue, et ce pour une exposition inférieure à $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ durant quatre jours à des nanobâtonnets d'or avec du CTAB (concentration létale moyenne de $110,2 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$)[5], alors que la puce d'eau (*Daphnia Magna*) a présenté un taux de mortalité de 13 % pour une concentration de seulement $5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ après deux jours d'exposition, alors qu'aucun animal n'était mort sans exposition[6]. De même, il a été montré qu'après 72 h d'exposition d'échantillons de la plante *Pseudokirchneriella Subcapitata* à du CTAB à une concentration de seulement $4,11 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, 50% des échantillons étaient morts[7]. En cas de nécessité absolue d'avoir des nanoparticules d'or anisotropes, en particulier des nanobâtonnets, il est certes possible de nettoyer les échantillons une fois la synthèse achevée, et d'enlever une quantité non négligeable de surfactant. Cependant, comme nous le verrons dans la suite, il est extrêmement ardu de nettoyer totalement les nanoparticules, et à ce titre, il y aura toujours des résidus de surfactant présents en suspension avec les particules, quelle que soit la qualité et la rigueur du nettoyage réalisé. Et par la suite, nous sommes en droit de penser que ces résidus auront un impact potentiellement non négligeable sur les cellules végétales étudiées. Ainsi, afin d'éviter toute dégradation liée à la présence de surfactant, nous avons fait le choix de ne pas en utiliser, et d'appliquer une méthode de synthèse « verte », impliquant un agent réducteur végétal. En effet, de nombreux travaux récents ont révélé la capacité d'un grand nombre d'extraits de plantes à agir comme agents réducteurs pour la synthèse de nanoparticules métalliques[8][9][10][11][12].

Dans ce chapitre, nous détaillerons donc la manière dont nous avons synthétisé, nettoyé et fonctionnalisé nos nanoparticules d'or. Nous commencerons par une description détaillée de la procédure de synthèse, ainsi que des mécanismes cinétiques et thermodynamiques impactant le résultat de la synthèse. Ensuite, nous présenterons la

procédure de nettoyage. Nous en profiterons pour présenter les mesures réalisées avec les différentes méthodes de caractérisation optiques et structurales, ainsi que la répartition statistique des types de nanoparticules produites aux différentes concentrations. Les différentes fonctionnalisations réalisées seront ensuite détaillées. Enfin, les propriétés optiques des nanoparticules seront finement étudiées afin de déterminer quelles seront les applications envisageables.

2.1. Synthèse des nanoparticules d'or

Comme nous venons de le décrire, nous avons fait le choix d'une méthode de synthèse n'impliquant aucun surfactant. Nous nous sommes basés sur des travaux de Chandran *et al.* publiés en 2014[13]. Dans cette étude, les auteurs présentent une synthèse de plaquettes (appelées « platelets » dans la littérature) en forme de triangles et d'hexagones d'or et d'argent en utilisant un macérât de feuilles d'*Aloe Vera* comme agent réducteur. Cette méthode de synthèse ne nécessite que peu de réactifs : du sel d'or en poudre (l'acide tétrachloroaurique à 99 % de pureté, de formule HAuCl_4), une feuille d'*Aloe Vera* ainsi que de l'eau ultrapure.

Le protocole de synthèse est le suivant : dans un premier temps, il s'agit de préparer l'agent réducteur, en l'occurrence le macérât d'*Aloe Vera*. Nous rinçons donc la feuille d'*Aloe Vera* à l'eau distillée, nous la séchons, puis nous la coupons en petits morceaux d'une taille d'environ 5 cm^3 , que nous laissons macérer dans un volume défini d'eau distillée à température ambiante, durant au moins une heure, le temps que la sève s'écoule. Ensuite, nous filtrons le macérât et le portons à ébullition durant dix minutes, ce qui permet de stopper l'activité des enzymes présentes. En parallèle, nous dissolvons le sel d'or dans de l'eau ultrapure afin d'obtenir une solution aqueuse d' HAuCl_4 à 12 mM. Nous appelons C_i la concentration du macérât d'*Aloe Vera* obtenue dans 600 mL d'eau, et C'_i le macérât d'*Aloe Vera* obtenu après macération dans 1,5 L. Pour terminer, nous ajoutons à la solution aqueuse de sel d'or le macérât, ainsi que de l'eau ultrapure, sous agitation magnétique (350 tour /minute), à température ambiante.

Dans notre travail, plusieurs synthèses de nanoparticules ont été effectuées en faisant varier la concentration en macérât d'*Aloe Vera*. Deux séries de synthèses ont été effectuées en partant des macérâts obtenus, de concentrations C_i et C'_i . Cependant, il est à noter que la quantité d'*Aloe Vera* introduite ne peut être précisément contrôlée lors de la synthèse du fait de la variabilité des différentes feuilles. Aussi, pour comparer les concentrations entre les différentes séries de synthèse, nous nous sommes basés sur les mesures d'absorption optique. Cette méthode nous a permis d'obtenir une évaluation approximative suffisante pour comparer les différentes séries entre elles. Nous appelons C_0 la plus faible concentration en agents réducteurs.

Dans un premier temps, nous avons mesuré l'absorption du macérât de concentration C'_i . Puis nous avons comparé le spectre avec celui de différents macérâts obtenus par dilutions successives de C_i . La comparaison de ces spectres nous a permis de

conclure qu'il faut diluer 9,2 fois ce dernier pour obtenir un spectre d'absorption identique à celui obtenu pour une concentration de C'_i . Les deux spectres sont reportés sur la Figure 2.1.

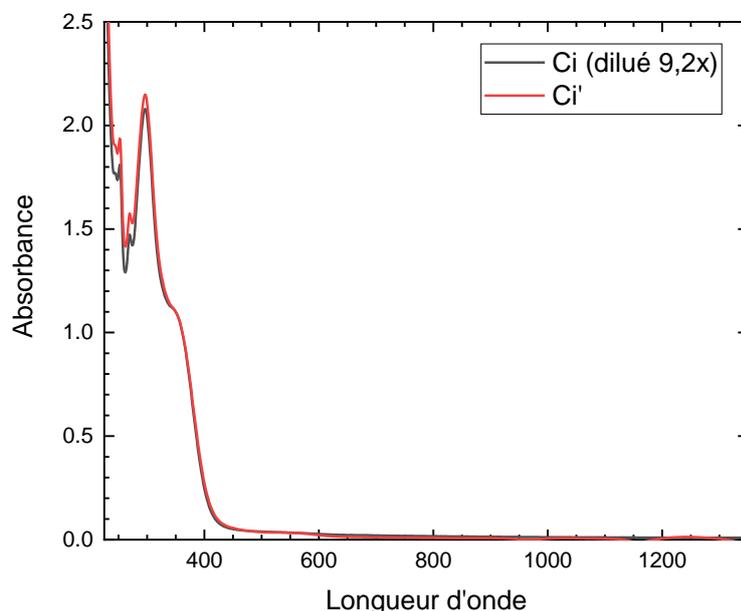


Figure 2.1 : Spectres d'absorption du macérât d'Aloe Vera aux concentrations C_i dilué 9,2 fois, et C'_i .

Compte tenu de l'incertitude inhérente à la méthode de synthèse, nous avons choisi de considérer un facteur 10 entre les deux concentrations tel que $C_i = 10C'_i$. Le Tableau 2.1 ci-après résume les proportions des différentes solutions utilisées pour les synthèses :

Concentration	H ₂ O (12 mM)	Macérât d'Aloe Vera dilué	Eau ultrapure
		de concentration C'_i	
C_0	0,5 mL	0,5 mL	9,0 mL
$2 C_0$	0,5 mL	1,0 mL	8,5 mL
$4 C_0$	0,5 mL	2,0 mL	7,5 mL
$8 C_0$	0,5 mL	4,0 mL	5,5 mL
$16 C_0$	0,5 mL	8,0 mL	1,5 mL
		de concentration C_i	
$20 C_0$	0,5 mL	1,0 mL	8,5 mL
$40 C_0$	0,5 mL	2,0 mL	7,5 mL
$80 C_0$	0,5 mL	4,0 mL	5,5 mL
$160 C_0$	0,5 mL	8,0 mL	1,5 mL
$320 C_0$	0,5 mL	16 mL	0 mL

Tableau 2.1 : Récapitulatif des proportions utilisées pour les synthèses.

Dès que les différentes solutions sont mélangées, nous observons un changement de couleur, basculant de la couleur ambrée du macérât d'*Aloe Vera* à une teinte rose vif en quelques secondes, avant de tendre rapidement vers un marron de plus en plus foncé. A titre d'exemple, la Figure 2.2 montre une photographie des différents piluliers, nommés de 0 à 5, contenant différentes solutions de synthèse, au même instant. Le tube 0 est un échantillon témoin sans macérât d'*Aloe Vera*, et les flacons 1, 2, 3, 4 et 5 sont des synthèses réalisées aux concentrations C_0 , $2 C_0$, $4 C_0$, $8 C_0$ et $16 C_0$ respectivement. Nous voyons ainsi distinctement que plus la concentration en agents réducteurs est importante, plus la solution tend vers une teinte sombre.

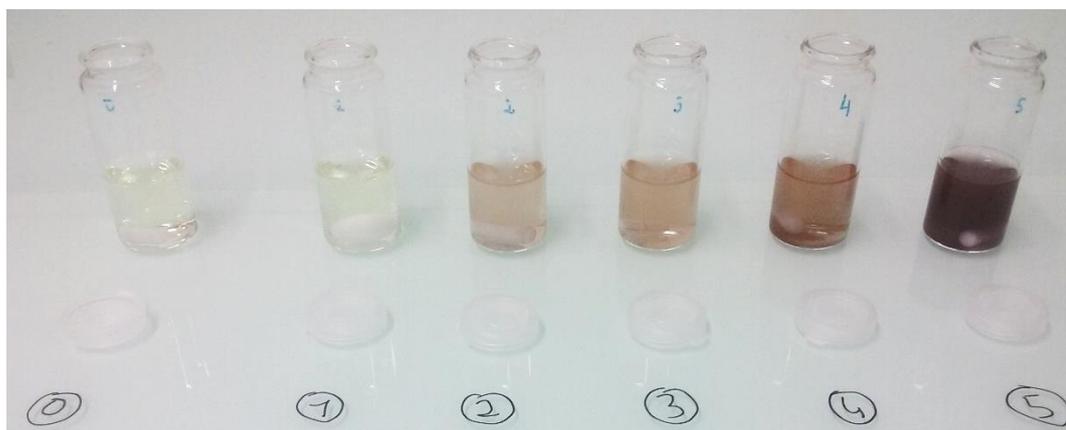


Figure 2.2 : Solutions de nanoparticules d'or synthétisées.

Une fois les particules synthétisées, il est primordial de retirer l'excédent d'agents réducteurs des suspensions. La Figure 2.1 montrait les spectres d'absorption du macérât d'*Aloe Vera* et nous montrons à présent sur la Figure 2.3 les spectres d'absorption d'une suspension de nanoparticules après une synthèse réalisée avec une concentration en agents réducteurs de $16 C_0$ avant et après cinq cycles de nettoyage. Les molécules organiques présentes dans le macérât sont responsables des bandes d'absorption aux longueurs d'onde inférieures à 400 nm sur les deux spectres. A noter que nous pouvons aussi voir sur ce spectre la bande d'absorption des nanoparticules d'or qui a un maximum à la longueur d'onde de 561 nm.

Pour diminuer de façon drastique le nombre de molécules du macérât, les échantillons ont été soumis à des cycles de centrifugations - re-dilutions. Lors d'un cycle, la suspension contenant les nanoparticules est centrifugée pendant 15 min à 21100 g, les nanoparticules sédimentent alors au fond du tube tandis que les molécules organiques restent en partie dans le surnageant. A l'aide d'une pipette, le surnageant est prélevé, tout en laissant les particules dans le tube. Ensuite, les nanoparticules sont à nouveau mises en suspension après remplissage du tube de centrifugation par de l'eau ultrapure et un passage bref dans un bain à ultrasons pour le cycle suivant. Nous pouvons constater à l'œil nu l'impact du nettoyage. En effet, si un échantillon observé immédiatement après la synthèse est plutôt trouble, un échantillon propre, quant à lui, est translucide. Nous

pouvons observer sur la Figure 2.4 une photographie de deux échantillons aux concentrations $40 C_0$ et $80 C_0$ avant et après nettoyage, montrant l'aspect translucide des solutions propres ainsi que la différence de teinte due aux tailles et formes des nanoparticules synthétisées pour chacune de ces concentrations en macérât d'*Aloe Vera*.

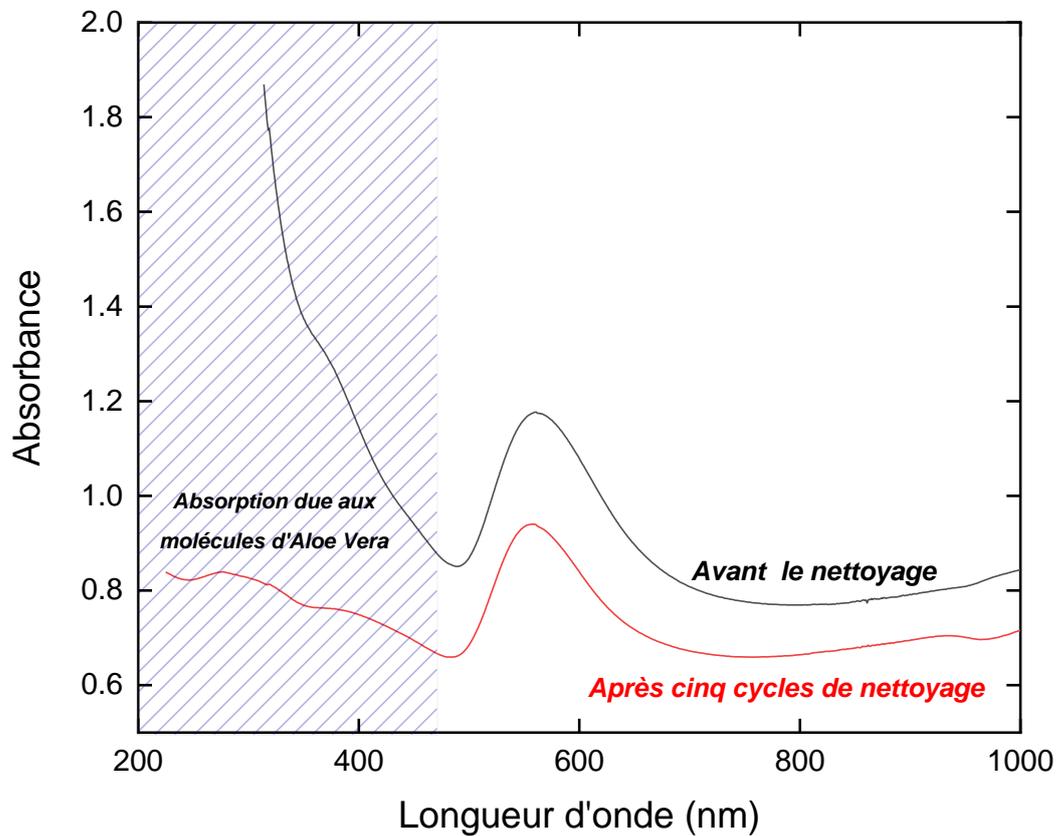


Figure 2.3 : Spectres d'absorption d'un échantillon de nanoparticules d'or synthétisées avec une concentration de $16 C_0$ avant et après cinq cycles de nettoyage.

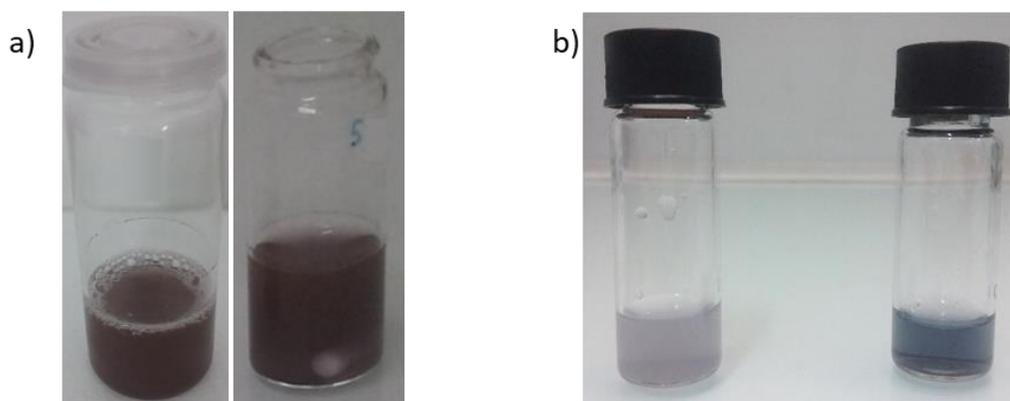


Figure 2.4 : Echantillons de nanoparticules d'or a) avant et b) après nettoyage (le flacon de gauche correspond à une concentration de $40 C_0$ et celui de droite à une concentration de $80 C_0$).

La Figure 2.5 montre les spectres d'absorption obtenus après chaque cycle de nettoyage d'un même échantillon de nanoparticules d'or à une concentration de $320 C_0$. La contribution des molécules organiques du macérât, regroupées aux longueurs d'onde inférieures à 400 nm diminue en fonction du nombre de cycles. De façon générale, un minimum de 5 cycles est nécessaire pour diminuer leur intensité de l'ordre de 50 % (voir la Figure 2.3).

Nous avons procédé à huit cycles de nettoyage, afin d'obtenir des échantillons propres. Dans chacun de ces cycles, un volume initial de 50 mL est mis à centrifuger puis le surnageant est retiré, il reste alors dans le tube 500 μ L de suspension contenant les nanoparticules d'or. Cette suspension est ensuite re-diluée dans 50 mL d'eau ultrapure. Ainsi, à chaque cycle, nous avons un facteur de dilution de 100. Comme nous réalisons cette opération huit fois, notre facteur total de dilution sera de 100^8 , soit 1×10^{16} . Dès lors, nous voyons que, même s'il reste inévitablement des molécules organiques du macérât initial dans les solutions de nanoparticules d'or après nettoyage, les cycles de centrifugation - re-dilution permettent d'en enlever une quantité très importante.

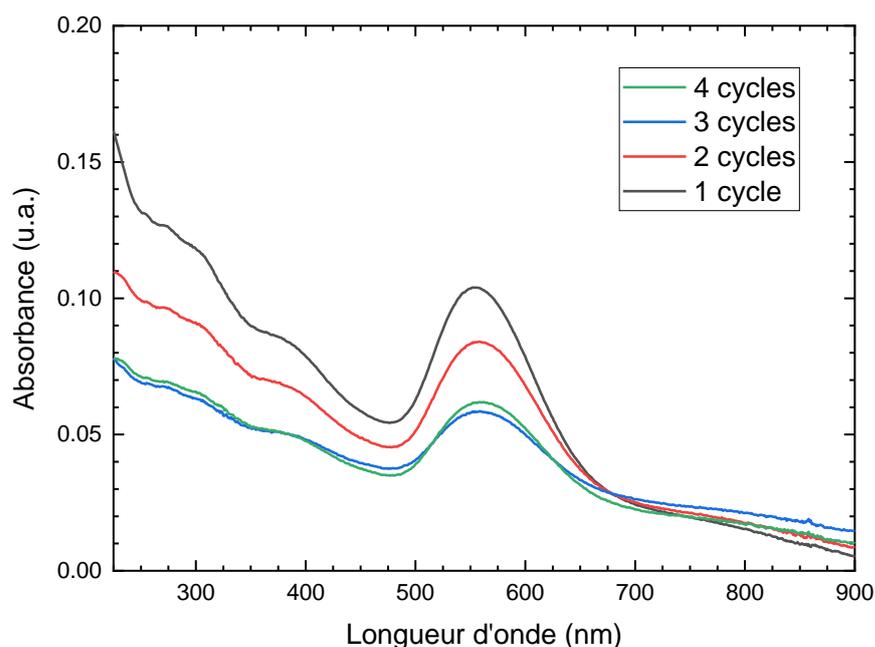


Figure 2.5 : Spectres d'absorption montrant l'impact des premiers cycles de nettoyage.

Dans certains cas, comme sur la Figure 2.5, l'intensité du pic d'absorption des nanoparticules d'or diminue légèrement. En effet, cette méthode de nettoyage, bien que particulièrement efficace, peut conduire à retirer des nanoparticules d'or à chaque cycle (celles qui ne se sont pas suffisamment déposées au fond du tube, et qui sont donc aspirées à la pipette avec le surnageant). Notons que la perte en nanoparticules d'or est faible, et que les avantages de cette méthode compensent largement ce petit défaut. Par

conséquent, toutes les suspensions de nanoparticules ont été soumises à 8 cycles de nettoyage, afin d'assurer l'obtention d'échantillons propres.

Il est difficile, voire impossible de se débarrasser en totalité des molécules organiques restantes du macérât d'*Aloe Vera*. Dès lors, il est évident que cette difficulté est tout aussi présente lorsqu'il s'agit de retirer des molécules de surfactant lors de l'utilisation des méthodes de synthèse nécessitant des surfactants toxiques comme le CTAB.

2.1.1. Caractérisations optiques et structurales

Une fois les particules synthétisées et nettoyées, et avant de les fonctionnaliser pour étudier leur impact sur les cellules végétales, il faut les caractériser précisément. Pour rappel, le choix de la méthode de synthèse s'était porté sur l'*Aloe Vera* comme agent réducteur en raison de la présence attendue de plaquettes en forme de nanotriangles. En effet, les nanotriangles (comme toutes les nanoparticules anisotropes de métaux nobles) présentent des propriétés optiques remarquables, donnant lieu à bon nombre d'applications[14]. Il convient dès lors de déterminer la structure, la taille et la forme des nanoparticules synthétisées, ainsi que leurs propriétés optiques.

Comme nous l'avons vu précédemment, les nanoparticules d'or que nous synthétisons se présentent sous la forme de suspensions colloïdales de différentes couleurs allant du bleu-gris pour une concentration de 80 C_0 au rouge orangé pour une concentration de 16 C_0 , comme cela est visible sur la Figure 2.6, qui montre une photographie de piluliers contenant les suspensions de nanoparticules d'or obtenues avec des concentrations de 16, 40 et 80 C_0 . La coloration des suspensions est directement corrélée aux propriétés plasmoniques de l'or, et donc à la taille et la forme des nanoparticules. Pour rappel, quand la dimension des particules est inférieure ou égale à la longueur d'onde d'excitation, ce qui est le cas dans cette étude, nous obtenons un plasmon de surface localisé, ce qui aboutit à deux conséquences expérimentales : une exaltation très intense et très localisé du champ électromagnétique à proximité des nanoparticules, et un pic d'absorption optique qui se trouve à la fréquence de résonance plasmonique[15].



Figure 2.6 : Suspensions de nanoparticules d'or synthétisées à différentes concentrations.

2.1.1.1. Structure, taille et forme des nanoparticules synthétisées

Afin de déterminer la structure, les dimensions et les formes des nanoparticules d'or, nous avons utilisé les techniques de microscopies électroniques à balayage et en transmission.

En microscopie électronique à balayage, 30 μL de solution ont été placés sur un substrat de silicium collé avec de la laque d'argent sur un plot MEB. La Figure 2.7 montre des nanoparticules d'or (concentration C_0). On peut notamment voir une bipyramide (encerclée en rouge), ainsi qu'un « multipod », c'est-à-dire un assemblage de plusieurs nanostructures (encerclé en blanc).

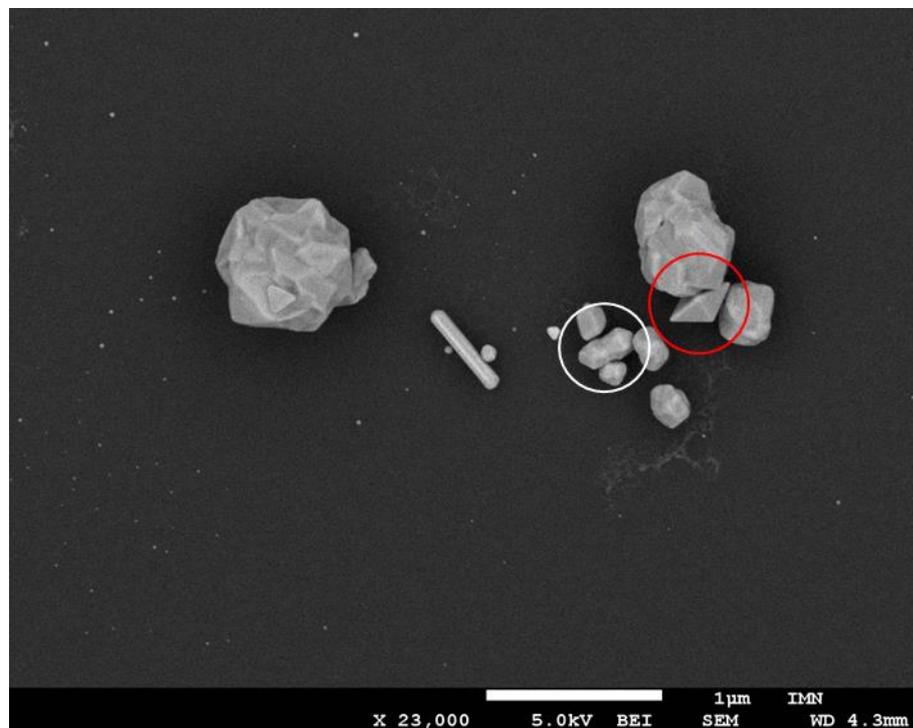


Figure 2.7 : Image MEB (électrons rétrodiffusés) de nanoparticules d'or (concentration C_0).

Pour les observations par microscopie électronique en transmission, 20 μL de la suspension à étudier ont été déposés sur une grille de cuivre recouverte d'une membrane de carbone à trous (Holey Carbon – Cu, 300 mesh, 50 μm) jusqu'à séchage complet.

Ces observations ont été réalisées de façon systématique sur les échantillons pour les différentes concentrations, afin d'avoir une vision la plus complète et la plus représentative possible de la distribution et de la diversité de tailles et de formes des nanoparticules au sein des différentes suspensions.

La Figure 2.8a montre des clichés obtenus en STEM-HAADF à 80 kV d'un échantillon préparé à partir d'une suspension obtenue avec une concentration en agents réducteurs de $40 C_0$. La Figure 2.8b et la Figure 2.8c montrent des micrographies en champ clair (TEM) à 300 kV de deux échantillons préparés à partir des suspensions obtenues avec des concentrations en agents réducteurs de b) $20 C_0$ et c) $80 C_0$. Toutes les particules sont cristallisées, comme nous avons pu le voir en mode diffraction.

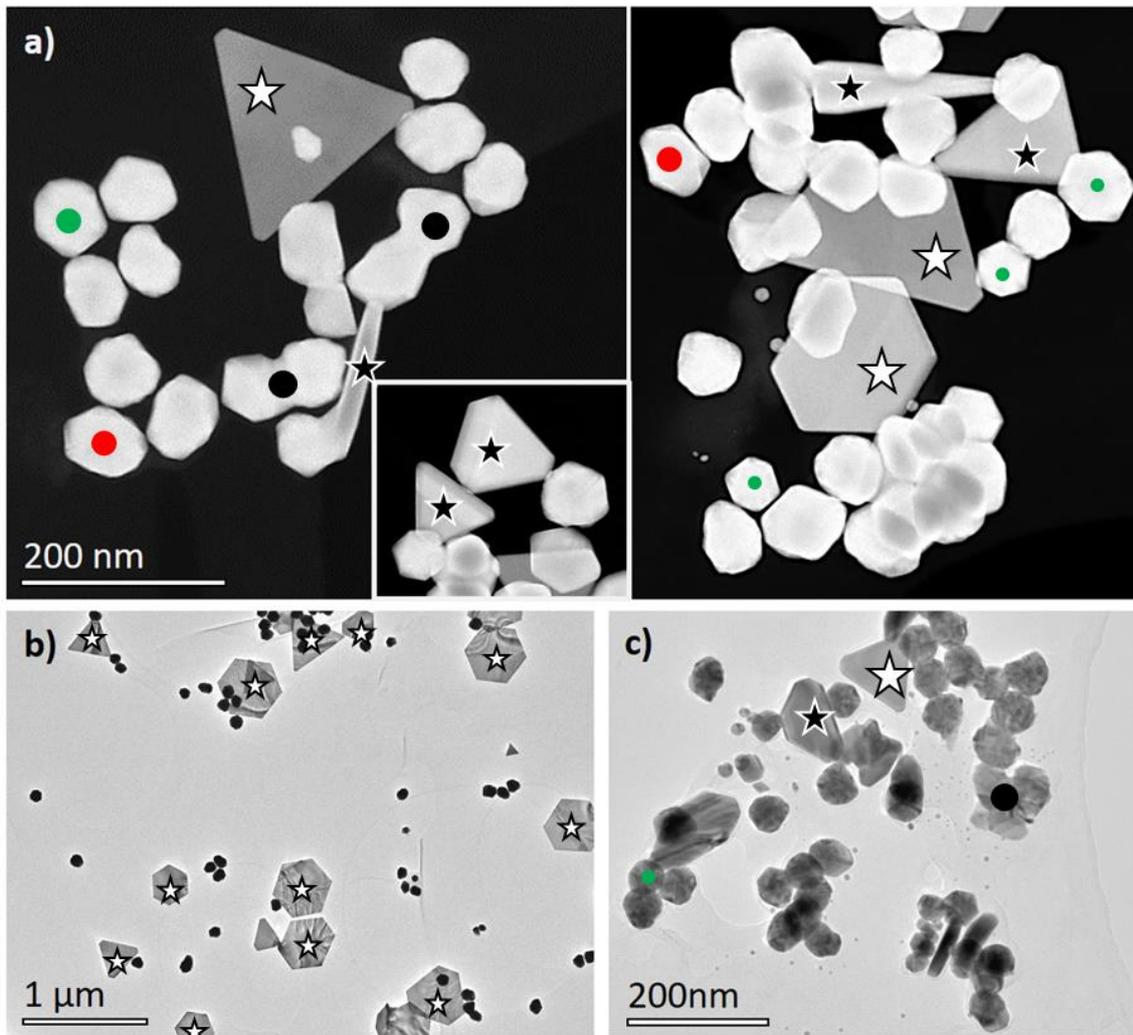


Figure 2.8 : Clichés obtenus en a) STEM-HAADF à 80 kV d'un échantillon préparé à partir d'une suspension obtenue avec une concentration en agents réducteurs de $40 C_0$ (angle de convergence de 20,4 mrad et longueur de caméra de 115 mm), et b) et c) en TEM de deux échantillons préparés à partir des suspensions obtenues avec des concentrations en agents réducteurs de b) $20 C_0$ et c) $80 C_0$. Les plaquettes sont identifiées par les étoiles blanches, les tétraèdres monocristallins par des étoiles noires, les icosaédres par des points verts, les décaédres par des points rouges et les cristaux formés par l'assemblage de plusieurs nanoparticules par des points noirs.

Sur les différents clichés, et comme attendu[16], nous pouvons observer des plaquettes de forme triangulaire ou hexagonale, indiquées par des étoiles blanches et présentant des défauts d'empilement. Leurs dimensions latérales dépendent fortement de la concentration en agents réducteurs utilisée lors de la synthèse, tandis que leur épaisseur reste inchangée et est de l'ordre de $(12,0 \pm 0,2)$ nm (moyenne obtenue par AFM, comme nous le verrons par la suite). Des tétraèdres monocristallins sont aussi visibles : ils sont représentés sur la Figure 2.8 par des étoiles noires.

Beaucoup de nanoparticules comportent des macles, comme les décaèdres et les icosaèdres (respectivement indiqués par des points verts et rouges). Leurs dimensions dépendent également de la concentration. Nous avons aussi observé des bipyramides, comme nous pouvons le voir sur les images MEB (indiquée par un cercle rouge sur la Figure 2.7). Enfin, les « multipods » mentionnés dans la littérature et que nous appellerons polycristaux, constitués de l'assemblage de plusieurs nanoparticules, sont également observables. Ces derniers sont indiqués par des points noirs sur la Figure 2.8. Il est à noter que toutes ces formes sont habituelles pour des nanoparticules métalliques, et peuvent être trouvées dans la nature[17].

Nous avons observé des facettes $\{111\}$ dans le cas de tétraèdres, d'icosaèdres, de décaèdres et des plaquettes, et nous avons observé des facettes $\{100\}$ pour les bipyramides. L'analyse détaillée des nombreux clichés en STEM et TEM nous a permis d'une part d'obtenir des mesures statistiques sur les dimensions des nanoparticules, et d'autre part sur la répartition des formes structurales synthétisées aux différentes concentrations.

Les dimensions moyennes des différentes nanoparticules synthétisées ont été mesurées comme montré sur la Figure 2.9. Dans le cas des plaquettes, nous avons mesuré la longueur d'une arête (l'arête la plus longue dans le cas de plaquettes tronquées). La même méthode a été utilisée pour mesurer les tétraèdres. En revanche, pour les décaèdres, les icosaèdres et les bipyramides droites, nous avons utilisé deux sommets opposés pour nos mesures.

Les dimensions moyennes des nanoparticules ainsi que l'écart quadratique moyen sont montrés sur la Figure 2.10, en fonction de la concentration en agents réducteurs lors de la synthèse. Pour les plaquettes, les longueurs des côtés sont de l'ordre du micromètre pour C_0 (valeur moyenne de (786 ± 122) nm pour les plaquettes triangulaires et de (1010 ± 180) nm pour les plaquettes hexagonales), alors qu'à $40 C_0$, la longueur moyenne est de (157 ± 30) nm et (110 ± 17) nm respectivement ; cette tendance se poursuit et à $320 C_0$, les côtés des plaquettes triangulaires et hexagonales ont une taille de $(38,9 \pm 5,3)$ nm et $(46,3 \pm 7,1)$ nm respectivement.

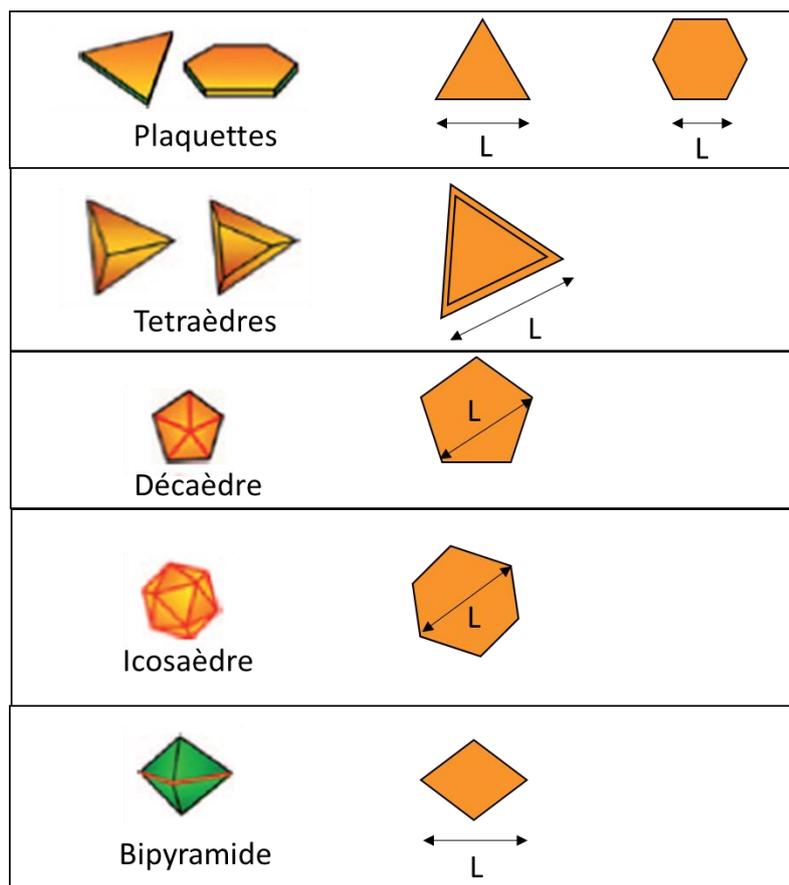


Figure 2.9 : Schémas récapitulant la manière dont les dimensions des nanoparticules d'or ont été évaluées. Les dessins de gauche proviennent de [16].

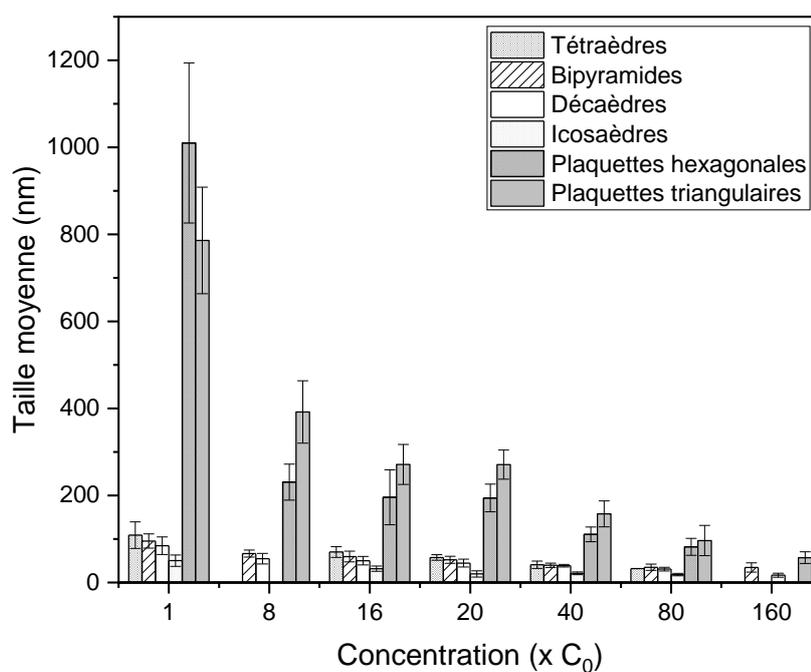


Figure 2.10 : Tailles moyennes des différentes formes de particules observées en fonction de la concentration en agent réducteur.

De manière générale, la première information ressortant de la Figure 2.10 est que la taille des particules diminue quand la concentration en agent réducteur augmente. Ceci est dû à l'augmentation du nombre de points de nucléation aux fortes concentrations : les particules vont former des particules plus petites, mais bien plus nombreuses. Quand la concentration en agent réducteur augmente, nous obtenons ainsi une densité plus importante, et une taille moyenne de particules plus petite. Toutefois, si cette baisse est particulièrement marquée sur les plaquettes, elle l'est moins pour les autres particules cristallines. Les icosaèdres et les décaèdres passent respectivement de (50 ± 13) nm et (85 ± 20) nm à C_0 à (20 ± 7) nm et (45 ± 9) nm à $20 C_0$ et à (18 ± 3) nm et (31 ± 4) nm à $80 C_0$. Les bipyramides passent de (95 ± 16) nm à C_0 à (52 ± 8) nm à $20 C_0$ et à (32 ± 7) nm à $80 C_0$. Enfin, les tétraèdres passent de (109 ± 30) nm à C_0 à (59 ± 16) nm à $20 C_0$ et à (40 ± 9) nm à $80 C_0$.

Afin d'évaluer l'épaisseur des plaquettes, nous avons réalisé des mesures par AFM en mode *peak force*. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 2.11, nous avons effectivement observé une remarquable régularité de l'épaisseur des plaquettes qui vaut 12 nm avec un écart-type de 0,2 nm, qu'ils soient triangulaires ou hexagonaux.

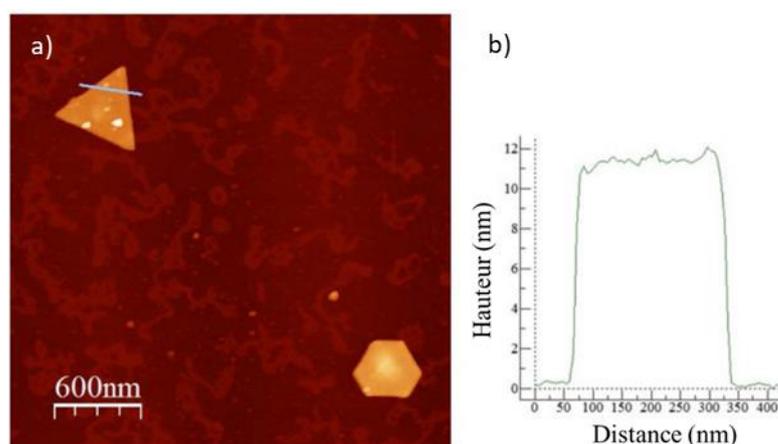


Figure 2.11 : Image de hauteur par AFM (mode *peak force*) de nanoparticules d'or déposées sur mica et synthétisées à une concentration C_0 , et b) Profil de hauteur associé à la plaquette triangulaire de la Figure 2.11a), montrant sa planéité.

Les proportions en nombre des différents types de nanoparticules ne sont pas identiques en fonction de la concentration en agents réducteurs présents lors de la synthèse. Considérons-les une à une. Nous pouvons voir sur la Figure 2.12, que le nombre de plaquettes a tendance à diminuer quand la concentration en agents réducteurs augmente. En effet, les plaquettes triangulaires représentent 24 % des particules synthétisées à C_0 , mais seulement 6 % des particules à $40 C_0$ et moins de 1 % à $320 C_0$. De même, les plaquettes hexagonales représentent 12 % des particules à C_0 , mais seulement 4 % à $40 C_0$ et également moins de 1 % à $320 C_0$. Les icosaèdres, quant à eux, sont présents en quantités négligeables pour les faibles concentrations (0,22 % à C_0 , proche de 0 % à $8 C_0$ et 0,97 % à $16 C_0$), mais représentent près de 20 % des particules à $40 C_0$, avant de voir de nouveau leur quantité diminuer à de plus hautes concentrations (4,33 % à $320 C_0$).

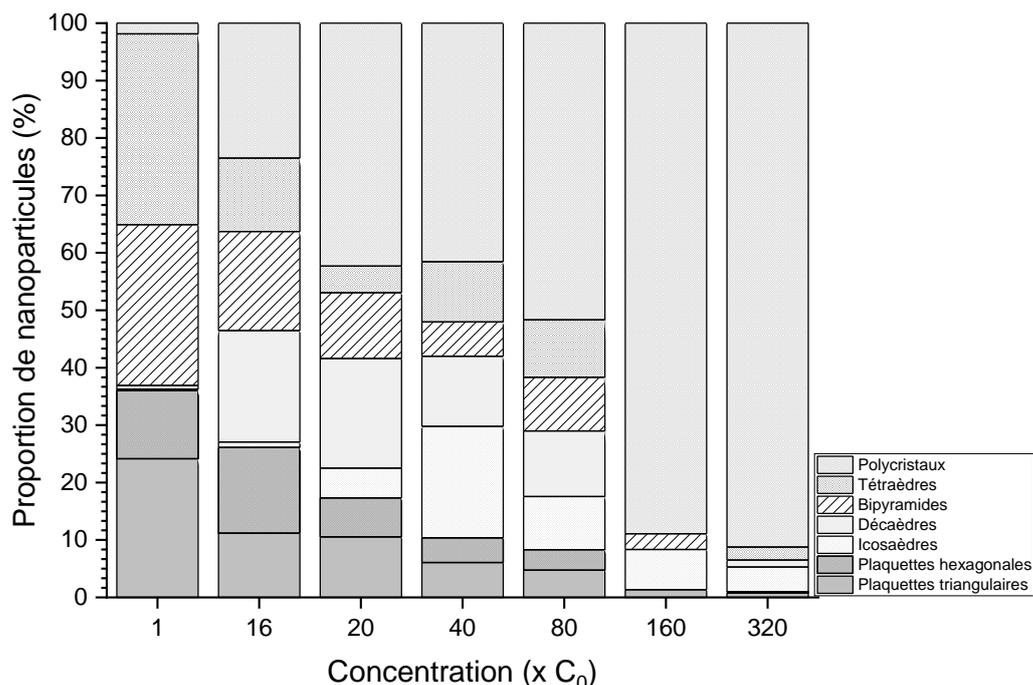


Figure 2.12 : Proportions des différentes formes de nanoparticules observées en fonction de la concentration en agent réducteur.

Les décaèdres sont également très peu présents à C_0 (0,69 %) et $8 C_0$ (2,37 %), mais représentent 20 % des particules synthétisées pour des concentrations de 16 et $20 C_0$. Leur proportion diminue ensuite à 40 et $80 C_0$ (environ 12 %), avant de tendre vers 0 pour de plus grandes concentrations. Les bipyramides suivent une tendance assez similaire à celle des plaquettes : elles représentent 28 % des particules à C_0 , avant de se raréfier à 11 % des particules à $16 C_0$, 8 % à $20 C_0$, 4 % à $80 C_0$ puis disparaissent aux plus hautes concentrations. Il en est de même pour les tétraèdres, ils représentent 33 % des particules à C_0 , 10 % à $40 C_0$ et 2 % à $320 C_0$. Enfin, nous avons pris en compte les polycristaux synthétisés, formés généralement par l'assemblage de deux à trois cristaux des formes précédentes. Leur proportion en nombre augmente avec la concentration en agent réducteur : il est de 2 % à C_0 de 40 % à 20 et $40 C_0$, et de 88 % à $160 C_0$ et 91 % à $320 C_0$. Les polycristaux sont majoritaires dès que la concentration est au-dessus de $80 C_0$.

Il y a différents aspects à prendre en compte lors de l'analyse de ces données. L'un des plus intéressants est l'importance des contributions thermodynamiques et cinétiques au cours de la synthèse. En effet, si nous devons ignorer totalement les contributions cinétiques au profit des contributions thermodynamiques, toutes les nanoparticules devraient avoir une forme de Wulff, c'est-à-dire la forme d'équilibre calculée pour un cristal d'un volume donné : la nécessité d'avoir une énergie de surface la plus faible possible amène à une orientation préférentielle de certains plans cristallins. Dans le cas de l'or, cela signifie que nous ne devrions observer que des octaèdres tronqués, puisque l'or est un système cubique à faces centrées[18]. Or, nous constatons que les bipyramides représentent certes 20 % de l'ensemble des particules synthétisées à C_0 , mais qu'elles

tombent à moins de 10 % à 20 C_0 et continuent de diminuer par la suite, alors que certaines autres particules comme les icosaèdres sont en plus grand nombre. Il faut donc tenir compte de la taille de nos particules. Il a été calculé que les structures présentant plusieurs macles (comme les décaèdres ou les icosaèdres, dans notre cas) sont moins susceptibles de se former d'un point de vue thermodynamique[16]. Plus précisément, Ferrando *et al.* ont montré que les icosaèdres sont stables aux petites tailles (≤ 40 nm)[19], les décaèdres aux tailles moyennes (≤ 200 nm) et les bipyramides aux grandes tailles (≥ 200 nm) [20]. Comme la taille moyenne de nos nanoparticules diminue avec l'augmentation de la concentration, nous pouvons voir que nous avons produit plus d'icosaèdres à 40 C_0 et 80 C_0 alors que les décaèdres l'ont été davantage à 16 C_0 et 20 C_0 , et enfin, les bipyramides l'ont été principalement à de plus petites concentrations. Ainsi, nos résultats montrent un grand accord avec les simulations de Ferrando mentionnées ci-dessus. Il faut enfin noter que pour les concentrations au-dessus de 80 C_0 , la concentration en agent réducteur est si importante que peu de grains parviennent à se transformer en nanostructures, ce qui explique que la proportion d'icosaèdres ne continue pas à augmenter à des concentrations vraiment élevées.

2.1.1.2. Propriétés plasmoniques des nanoparticules synthétisées

Les spectres d'absorption de différentes suspensions de nanoparticules d'or en fonction de la concentration en agents réducteurs présents lors de la synthèse sont présentés sur la Figure 2.14. Les spectres ont été décalés verticalement pour une meilleure visibilité.

Pour toutes les concentrations en agents réducteurs initialement présents lors de la synthèse, il existe une bande d'absorption située à (561 ± 5) nm. Pour la concentration en agents réducteurs de 320 C_0 , seule cette bande d'absorption est visible. Son maximum est bien situé à 561 nm et sa largeur à mi-hauteur est de 105 nm. Pour les concentrations en agents réducteurs entre C_0 et 80 C_0 en revanche, deux bandes d'absorption sont nettement visibles. Ces deux bandes d'absorption correspondent aux plasmons longitudinal et transversal des plaquettes triangulaires et hexagonales. La bande d'absorption située dans l'infrarouge, dont le maximum est situé vers 1300 nm pour C_0 et à 870 nm pour 80 C_0 correspond à la contribution du plasmon longitudinal des plaquettes. Nous pouvons noter ici que les positions de cette bande d'absorption en fonction de la concentration en agents réducteurs sont cohérentes avec les observations de la littérature sur des plaquettes d'or[21]. Pour ce qui est des autres contributions, nous pouvons observer sur les spectres que la forme des bandes d'absorption situées autour de 561 nm change en fonction de la concentration en agents réducteurs. Ceci est dû aux différentes contributions des nanocristaux synthétisés. Ainsi, pour une concentration C_0 , le pic observé correspond aux contributions des bipyramides et des tétraèdres principalement, ceux-ci constituant une part importante des particules synthétisées[22]. A 20 C_0 , puis à 40 C_0 , les contributions des décaèdres couplées aux variations de taille des nanocristaux de formes différentes également présents entraînent un élargissement du

pic d'absorption. Enfin, à $80 C_0$, les polycristaux devenant majoritaires, et il devient plus difficile de percevoir les différentes contributions (phénomène évidemment encore plus marqué pour une concentration de $320 C_0$).

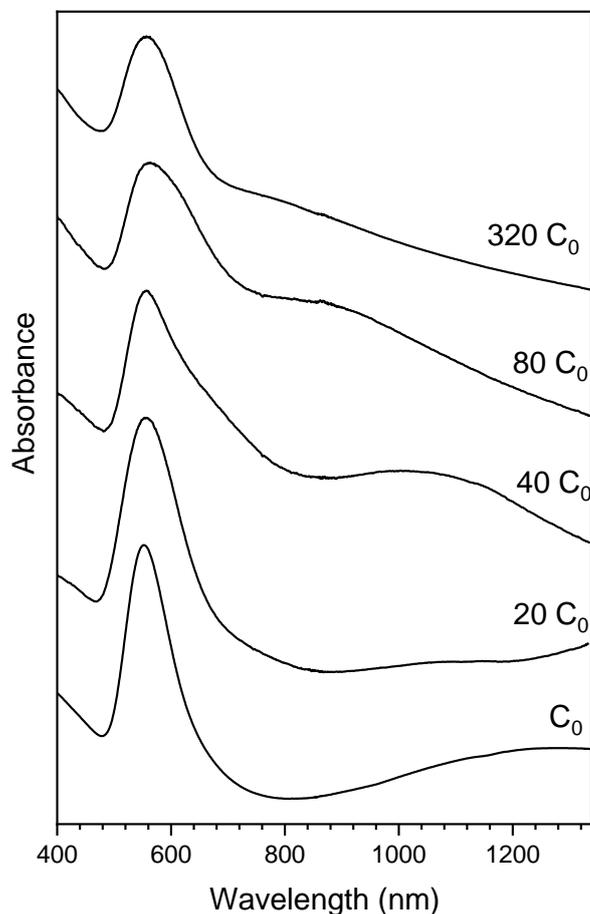


Figure 2.13 : Spectres d'absorption des suspensions colloïdales obtenues avec des concentrations en agents réducteurs de C_0 , $20 C_0$, $40 C_0$, $80 C_0$ et $320 C_0$.

L'évolution des maxima d'absorption en fonction de la concentration du macérat d'*Aloe Vera* est tracée sur la Figure 2.14. Les carrés noirs correspondent aux valeurs mesurées en spectroscopie d'absorption UV-visible pour la bande du plasmon transverse, alors que les cercles blancs correspondent au plasmon longitudinal. Les traits pleins et en pointillés correspondent aux courbes de tendance respectives. Nous observons tout d'abord que la position en longueur d'onde du plasmon transverse n'évolue pas, et que son pic caractéristique est toujours observé vers 560 nm, ce qui implique une très faible évolution des dimensions hors du plan des plaquettes, ce qui est en accord avec les observations réalisées par TEM et AFM.

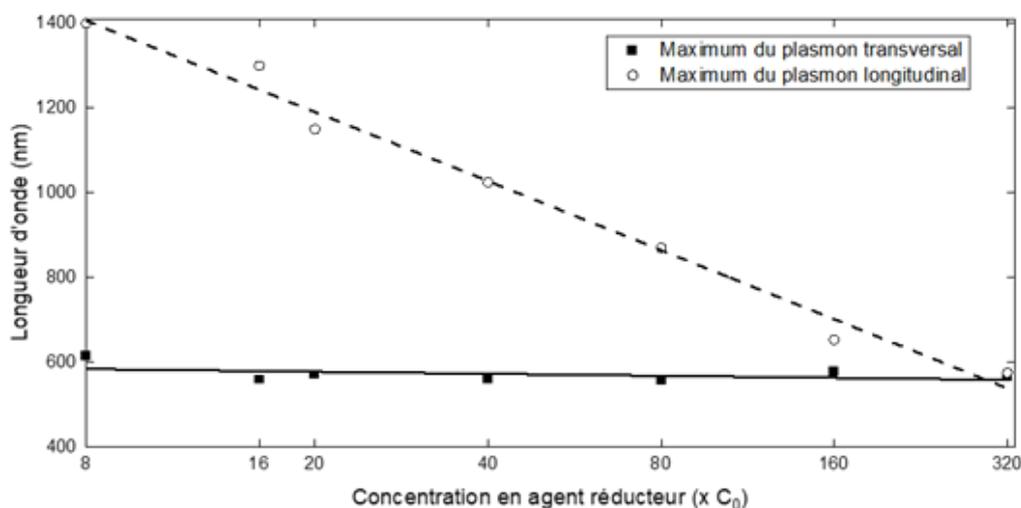


Figure 2.14 : Evolution de la longueur d'onde des maxima d'absorption des nanoparticules d'or en fonction de la concentration en agents réducteurs.

De plus, les autres structures cristallines sont majoritairement plus épaisses (il faut aller vers de très fortes concentrations pour obtenir en majorité des épaisseurs plus petites, de quelques nanomètres), et ne présentent pas de variation d'épaisseur aussi importante que les plaquettes. D'où la faible évolution du signal d'absorption optique de la bande correspondant au plasmon transverse. En revanche, si nous nous intéressons au plasmon longitudinal (qui correspond aux dimensions dans le plan, donc directement relié aux tailles observées en microscopie électronique, en particulier des plaquettes), nous pouvons logiquement constater une très forte dépendance de sa fréquence en fonction de la concentration en agent réducteur.

2.1.2. Impact de la durée de synthèse

La durée de croissance des particules, au cours de la synthèse, est un paramètre auquel nous nous sommes également intéressés. En effet, la cinétique de réaction étant un paramètre critique pour la formation des nanoparticules d'or, nous pouvons supposer qu'un arrêt rapide de la synthèse permet de diminuer la taille moyenne des particules produites, facilitant par la suite leur internalisation.

Pour étudier l'impact de ce paramètre, nous avons, pour différentes concentrations, arrêté la synthèse au bout de 30 min, 1 h et 2 h, et comparé les dimensions des particules avec celles obtenues après une synthèse complète (c'est-à-dire une durée de 24 h).

La Figure 2.15a montre plusieurs particules observées par MEB après une synthèse stoppée au bout d'une heure, la concentration en agents réducteurs étant de C_0 . Nous y remarquons notamment une plaquette de forme triangulaire, indiquée par une étoile blanche sur l'image, ainsi qu'un décaèdre indiqué par un point rouge, pour reprendre les

codes de la Figure 2.8. Leurs tailles sont effectivement plus petites que celles obtenues pour une synthèse complète : la longueur d'arête pour la plaquette est de 40 nm environ au lieu de 785 nm pour une synthèse terminée et de 43 nm au lieu de 85 nm dans le cas du décaèdre. La Figure 2.15b montre la position du maximum de la bande d'absorption, correspondant au pic plasmon, mesurée par spectroscopie d'absorption UV-visible pour des échantillons synthétisés avec une concentration en agents réducteurs de $80 C_0$ (nous ne montrons pas les données d'absorption à C_0 en raison de la difficulté d'obtenir un signal, en raison de la très faible densité de nanoparticules d'or présente dans la suspension). La bande d'absorption du plasmon transversal pour une synthèse complète est toujours observée à 564 nm tandis qu'il se décale vers les plus basses longueurs d'onde pour des temps de synthèse plus faibles. Ainsi, pour une synthèse stoppée au bout de deux heures, ce pic est situé à 558 nm, contre 545 nm après 1 h et seulement 533 nm après 30 min. Plus le temps de synthèse est faible, plus la taille des nanoparticules est donc petite.

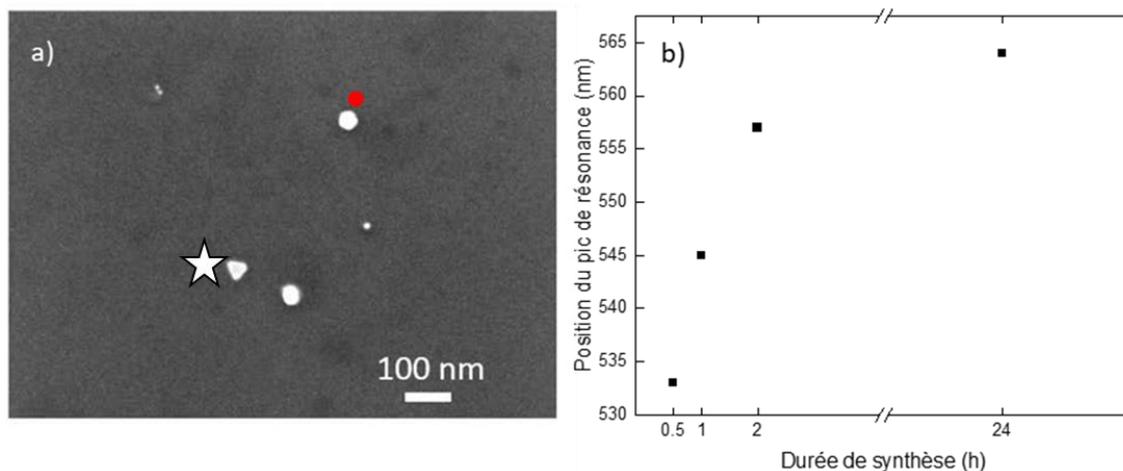


Figure 2.15 : a) Image MEB (électrons secondaires) de particules d'or synthétisées, avec un arrêt de la synthèse au bout d'une heure (concentration C_0). Nous y observons une plaquette identifiée par une étoile blanche et un décaèdre identifié par un point rouge. b) Evolution de la position de la bande d'absorption correspondant au plasmon longitudinal avec la durée de synthèse (concentration $80 C_0$).

Nous aurions donc pu envisager de jouer davantage sur la cinétique de réaction afin d'obtenir de plus petites particules. Toutefois, un problème s'est rapidement posé, lié non pas à la taille mais à la forme. Pour de courtes durées de synthèse, de nombreuses particules n'ont pas le temps nécessaire de terminer leur croissance, et demeurent à l'état de germes maintenus ensemble. Sur la Figure 2.15a, nous avons certes vu des nanoparticules, mais rappelons qu'à cette concentration, nous n'avons que très peu de points de germination, entraînant une très faible densité de particules et par conséquent une très grande taille moyenne de particules. Même avec une synthèse stoppée prématurément, les atomes d'or se rassemblent sur les quelques points de nucléation

disponibles, ce qui explique la formation de quelques structures aux faibles concentrations. Dans la suite des travaux, nous nous sommes principalement intéressés aux concentrations plus élevées (40 C₀ et 80 C₀), car ce sont les concentrations offrant le meilleur compromis entre une taille moyenne faible des particules et une grande diversité de formes bien définies. Le choix a donc été fait de ne pas poursuivre cette étude, au profit du contrôle de la taille moyenne via la concentration du macérât d'*Aloe Vera*.

2.2. Fonctionnalisation des nanoparticules d'or

Si nous voulions étudier l'impact des nanoparticules juste après leur synthèse sur des cellules végétales, en mettant en contact les particules avec la plante sans étape intermédiaire, nous nous retrouverions très rapidement confrontés à un problème majeur : l'agglomération des nanoparticules. L'objectif de cette étape est donc d'obtenir une suspension colloïdale stable en greffant des molécules de charges électriques différentes sur les nanoparticules. Les molécules organiques choisies possèdent à une extrémité un groupement sulfure -SH qui va pouvoir former une liaison covalente Au-S.

Un autre aspect qu'il est important de souligner est que nous n'avons pas utilisé de molécules réagissant spécifiquement avec les constituants de la paroi de la cellule végétale. Ainsi, si les processus de fonctionnalisation et d'internalisation s'avèrent réussis, il sera d'autant plus aisé de remplacer les molécules choisies par d'autres réagissant avec la paroi et présentant un intérêt pour une application donnée.

2.2.1. Présentation des molécules utilisées pour le greffage

Dans cette étude, la fonctionnalisation a été effectuée avec trois molécules différentes. Tout d'abord, nous avons utilisé de l'acide 16-mercaptohexadécanoïque (MHDA, de formule HS(CH₂)₁₅CO₂H). La présence de la fonction acide carboxylique -COOH va induire une répulsion électrostatique entre les nanoparticules fonctionnalisées limitant leur agrégation, et permettre l'obtention d'une suspension colloïdale stable. A pH neutre et lors des expériences, les molécules sont donc chargées négativement.

La deuxième fonctionnalisation réalisée a été effectuée avec la L-Cystéine (C₃H₇NO₂S), un acide aminé présent naturellement dans un certain nombre de protéines. Celle-ci est une molécule nettement plus courte que le MHDA ayant des charges positives et négatives localisées.

La troisième espèce chimique que nous avons utilisée a été la molécule fluorescente Alexa Fluor 405, de formule C₄₆H₆₉N₅O₁₅S₃. Cette molécule fluoresce dans le bleu, présente un maximum d'excitation à 401 nm et un maximum d'émission à 421 nm[23]. Celle-ci est greffée sur la L-Cystéine via son groupement chimique NHS-ester, entraînant une charge globale négative, et nous pourrons ainsi utiliser ses propriétés de

fluorescence en microscopie optique de fluorescence. La Figure 2.16 ci-dessous présente les structures semi-développées des trois molécules. Le groupement NHS-ester d'Alexa Fluor 405 est entouré de pointillés.

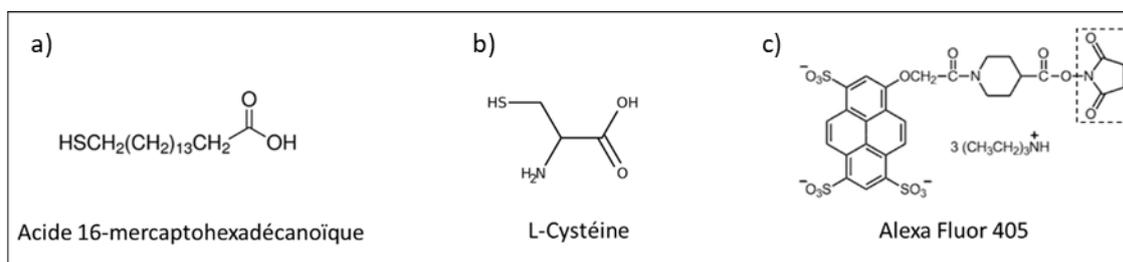


Figure 2.16 : Structures semi-développées des trois molécules utilisées pour fonctionnaliser les nanoparticules d'or : a) Acide 16-mercaptohexadécanoïque (MHDA), B) L-Cystéine et C) Alexa Fluor 405 (le carré en pointillés entoure la fonction NHS-ester, exploitée lors de la réaction avec la L-Cystéine).

Les trois molécules ont été observées par spectrométrie Raman. Dans ces manipulations, 20 μL de solution aqueuse de MHDA et de L-Cystéine (à une concentration de 10 mM) ont été déposés sur un substrat de silicium. La concentration choisie est la même que celle intervenant dans la fonctionnalisation. Dans le cas de la molécule Alexa Fluor 405, 5 μL de solution d'Alexa Fluor dans du DMF (N,N-diméthylformamide, de formule $\text{HCO} - \text{N}(\text{CH}_3)_2$) avec un rapport de 1 mg d'Alexa Fluor pour 500 μL de DMF ont été déposés sur le même substrat. Quant aux mesures, elles ont été réalisées à une longueur d'onde de 514 nm, avec une accumulation de 10 s pour une puissance sur échantillon de 1,5 mW, et une gamme de mesure allant de 100 à 4000 cm^{-1} .

Les spectres Raman du MHDA, de la L-Cystéine et d'Alexa Fluor 405 sont ainsi montrés sur la Figure 2.17, la Figure 2.18 et la Figure 2.19 respectivement. Les spectres ont été indexés, ce qui nous a permis de plus facilement identifier les pics lors de l'étape de fonctionnalisation, que nous présenterons peu après.

La molécule de MHDA étant principalement constituée d'une chaîne carbonée, nous observons majoritairement sur la Figure 2.17 des liaisons typiquement associées aux carbones (contribution de la liaison C-S à 738 cm^{-1} , C-C à 1116 cm^{-1} , CH_2 entre 2800 et 3000 cm^{-1}).

En comparaison, la molécule de L-Cystéine présente un spectre Raman extrêmement dense, avec beaucoup de contributions des différentes liaisons la constituant (certaines communes avec le MHDA, dont les CH_2 autour de 2900 cm^{-1}). Nous pouvons noter sur la Figure 2.18 les contributions des liaisons NH_3 à 370, 988, 1347, 1527 et 1605 cm^{-1} , ainsi que de la liaison S-S à 513 cm^{-1} . Cette dernière ne devrait théoriquement pas être visible, la molécule de L-Cystéine ne comportant qu'un seul atome de soufre. Toutefois, il est tout à fait probable que de nombreux ponts disulfures se forment lors du dépôt de la goutte, amenant ce pic au spectre Raman.

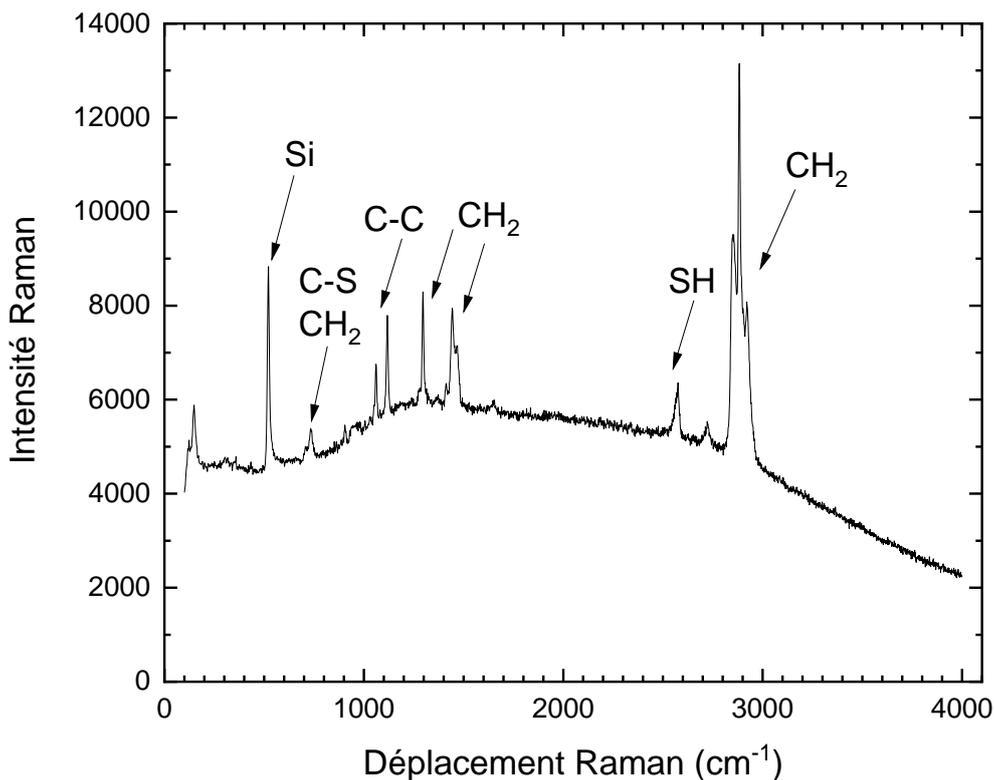


Figure 2.17 : Spectre Raman du MHDA en solution aqueuse.

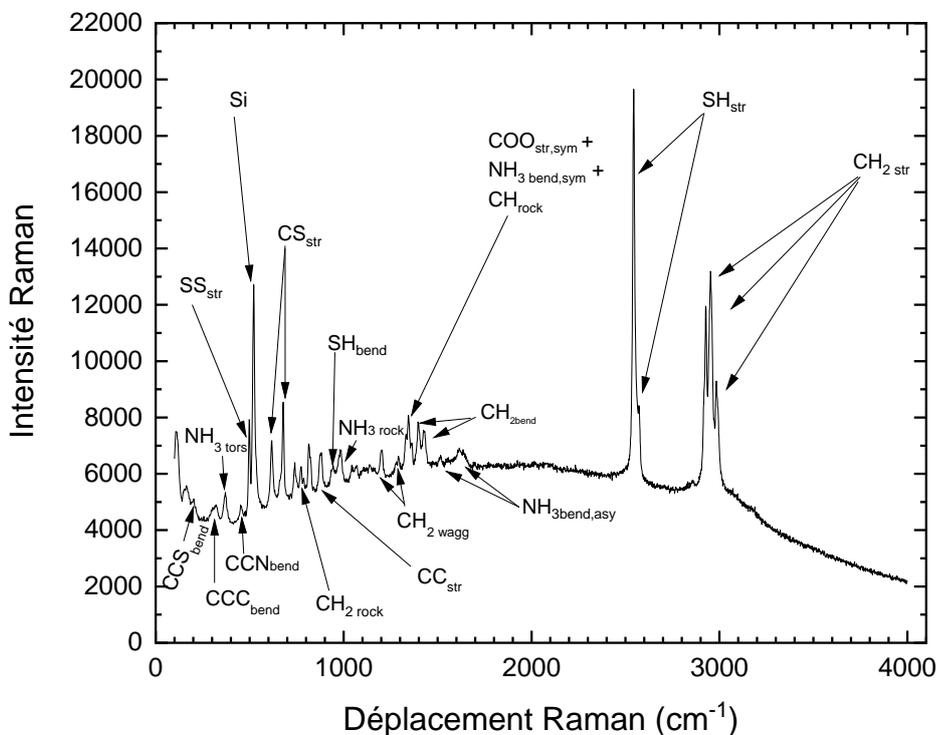


Figure 2.18 : Spectre Raman de la L-Cystéine en solution aqueuse. Les indices str, rock, bend, tors et wagg correspondent aux vibrations d'élongation, de bascule, de déformation, de torsion et de balancement respectivement. Les indices sym et asym, quant à eux, correspondent aux vibrations symétriques et antisymétriques respectivement.

Sur ces deux figures, nous pouvons également voir la présence d'un pic caractéristique de la liaison S-H à 2544 cm^{-1} . Ce pic est intéressant à garder en mémoire, car une fois la fonctionnalisation achevée, le soufre sera normalement lié à l'or des nanoparticules, et ce pic ne devrait idéalement plus être visible.

Le pic de la liaison SH est absent du spectre de la molécule Alexa Fluor 405, comme nous pouvons le remarquer sur la Figure 2.19. C'est attendu, car la molécule ne comporte pas cette liaison. En effet, c'est via sa fonction NHS-ester qu'elle va se greffer sur les molécules de L-Cystéine. Le fait de ne pas voir ce pic n'est donc pas une surprise. D'ailleurs, par rapport à la Figure 2.18, nous n'observons logiquement aucune contribution associée au soufre, comme les pics associés aux modes d'élongation des liaisons C-S entre 800 et 1000 cm^{-1} .

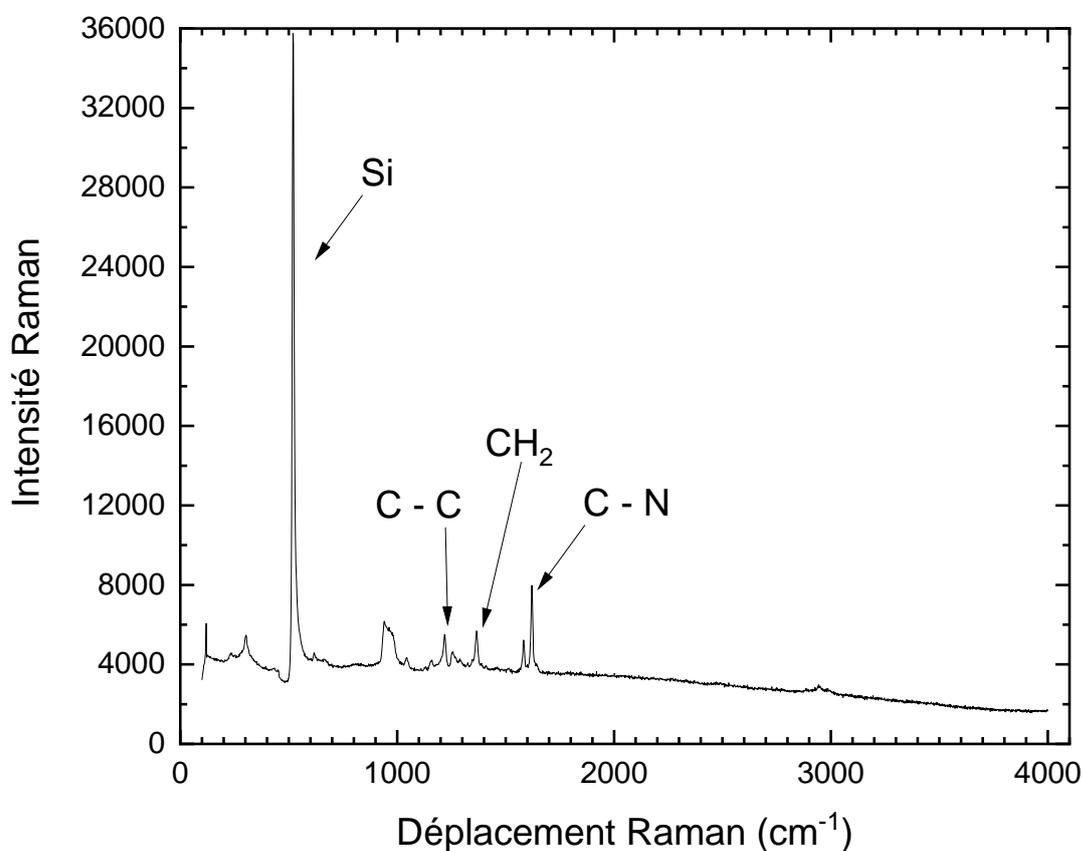


Figure 2.19 : Spectre Raman d'Alexa Fluor 405 en solution dans du DMF.

Après leur caractérisation en Raman, ces trois molécules ont donc été greffées sur nos nanoparticules d'or via un protocole de fonctionnalisation que nous allons à présent détailler.

2.2.2. Protocole de fonctionnalisation

Nous allons détailler le protocole de fonctionnalisation dans le cas d'un greffage covalent de l'acide 16-mercaptohexadécanoïque. Ce protocole ne varie pas pour un greffage de la L-Cystéine (les concentrations utilisées ont été les mêmes).

Préalablement, il est nécessaire de rompre les ponts disulfures potentiellement formés entre les molécules de MHDA pour permettre l'établissement de liaisons or-soufre, tout en limitant la présence de dioxygène. Du dithiothréitol, ou DTT ($C_4H_{10}O_2S_2$), a été utilisé pour rompre les liaisons S-S[24].

Dans un premier temps, tous les réactifs qui seront utilisés, à savoir la suspension de nanoparticules d'or, le dithiothréitol ainsi que le MHDA sont placés dans un dessiccateur sous vide primaire pour être dégazés et réduire au maximum la présence d'oxygène. Une solution aqueuse de MHDA et DTT est préparée. Les proportions sont ajustées pour que les concentrations soient de 10 mM pour le MHDA et 100 mM pour le DTT dans un volume total d'1 mL de solution. Ce mélange a été mis à dégazer durant 3 h.

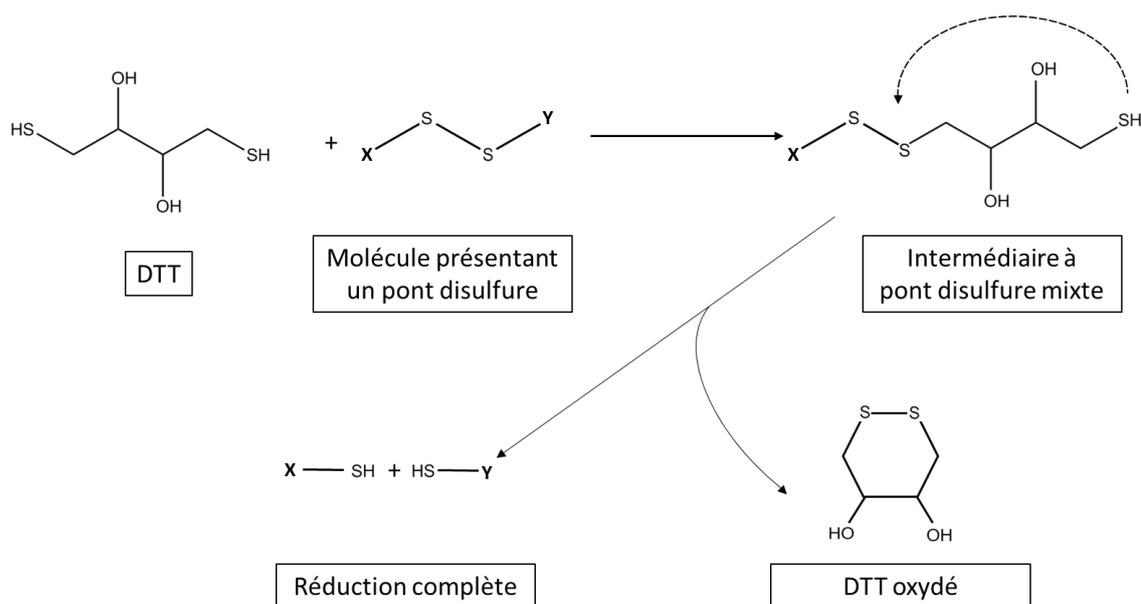


Figure 2.20 : Schéma explicatif des réactions à l'œuvre dans le mélange MHDA / DTT (d'après[24]).

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 2.20, en présence de liaison S - S, le DTT vient réagir avec la molécule contenant ce pont disulfure, et va s'oxyder, entraînant la formation d'une part d'une molécule de DTT oxydée, et d'autre part de deux molécules présentant un groupement - SH à une de leur extrémité, ce qui va permettre au greffage ultérieur de se dérouler correctement. 200 μ L du mélange précédent sont pipetés, ajoutés à 1 mL de la suspension de nanoparticules d'or choisie et l'ensemble est soumis à des ultrasons en utilisant une sonde cup-horn (20 % de puissance pendant 30 s). La réaction

peut se poursuivre pendant 30 min sous agitation douce au bain à ultrasons, avant que les échantillons ne soient placés sur un support rotatif pendant une nuit entière, à une vitesse de rotation de 30 tour/minute.

Dans le cas d'une fonctionnalisation avec la molécule Alexa Fluor 405, celle-ci est dans un premier temps dissoute dans du DMF, avec un rapport de 1 mg d'Alexa Fluor pour 500 μL de DMF. 50 μL d'Alexa Fluor sont ajoutés à un échantillon de nanoparticules d'or fonctionnalisées à la L-Cystéine. La réaction se poursuit alors pendant 30 min. C'est l'ester succinimidylique (ou NHS-ester) d'Alexa Fluor qui se conjugue avec l'amine primaire (groupement NH_2) de la L-Cystéine, permettant le greffage.

2.2.3. Contrôle de la fonctionnalisation

2.2.3.1. D'un agglomérat de particules vers une suspension colloïdale stable

Il est indispensable de s'assurer du bon déroulement de la fonctionnalisation. Un premier test consiste à observer à l'œil nu les échantillons. Ainsi, les particules fonctionnalisées doivent former une suspension colloïdale stable tandis que celles non greffées se déposent au fond du tube. Ceci est illustré sur la Figure 2.21. Le pilulier de droite contient une suspension de nanoparticules d'or non fonctionnalisées qui vient d'être soumise à des ultrasons pour les disperser et le pilulier de gauche contient une suspension de nanoparticules fonctionnalisées avec de l'acide mercaptohexadécanoïque. Après soixante heures, les particules fonctionnalisées demeurent en suspension dans le pilulier de gauche, tandis que les particules non greffées se sont en immense majorité déposées dans le fond du pilulier de droite. Cette première observation permet déjà d'affirmer que la chimie de surface des nanoparticules a été modifiée lors du protocole de fonctionnalisation.

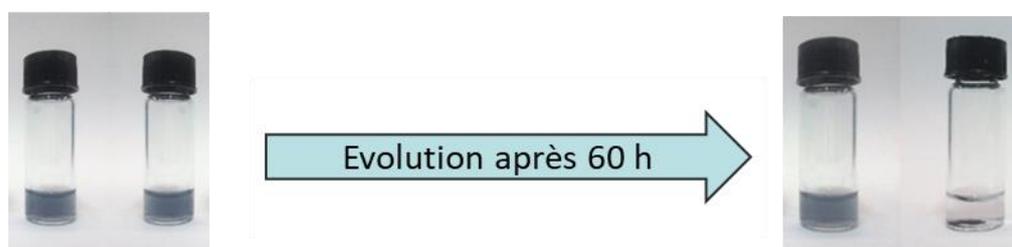


Figure 2.21 : Evolution dans le temps de deux suspensions de nanoparticules d'or à 80 C_0 fonctionnalisées avec du MHDA (tube de gauche) et 80 C_0 non fonctionnalisées (tube de droite) immédiatement après agitation aux ultrasons et 60 h plus tard.

L'étape suivante a consisté à retirer l'excès des molécules organiques utilisées pour la fonctionnalisation des suspensions. A cause de la répulsion électrostatique des

nanoparticules d'or en suspension, la centrifugation est légèrement moins efficace, et plus de cycles de nettoyage sont nécessaires pour arriver au même niveau de propreté de l'échantillon. Récemment, le nettoyage des nanoparticules a même été effectué avec des filtres Vivaspin, avec un seuil de masse moléculaire de 5 kDa. Avec des cycles de 20 min à 8000 g, le nettoyage est encore plus performant, et c'est donc cette procédure qui a été utilisée pour purifier les échantillons de nanoparticules d'or fonctionnalisées.

2.2.3.2. Caractérisation par S(TEM) et STEM iDPC

Les nanoparticules fonctionnalisées ont ensuite été caractérisées par microscopie électronique en transmission en utilisant les modes d'imagerie en champ clair TEM, le mode balayage couplé à un détecteur champ sombre annulaire à grand angle (STEM-HAADF) et en mode de contraste de phase différentiel intégré (iDPC : integrated Differential Phase Contrast).

Comme présenté dans la Figure 2.22, nous avons pu observer la couche de fonctionnalisation sur les nanoparticules quelle que soit la molécule greffée. La plupart de nos observations ont été réalisées à une concentration de $40 C_0$ car elle permet, comme expliqué précédemment, d'avoir une grande diversité de formes bien définies des nanoparticules synthétisées tout en permettant une grande quantité de nanoparticules observables. Sur les clichés de la Figure 2.22a et b, trois nanoparticules d'or sont clairement visibles (en clair sur le cliché de STEM-HAADF en raison du numéro atomique Z de l'or et présentant des contrastes de diffraction en STEM-i-DPC). Elles sont entourées d'une zone constituée d'éléments plus légers que l'or. Cette zone correspond aux molécules greffées composées d'atomes légers comme l'hydrogène, le carbone, l'azote, l'oxygène... Les clichés en STEM-iDPC de la Figure 2.22c et d permettent également de distinguer des nanoparticules entourées d'une couche homogène. Sur le cliché TEM de la Figure 2.22e, les nanoparticules d'or apparaissent en noir et gris foncé, tandis que les molécules organiques apparaissent en plus clair. L'épaisseur moyenne de la couche de fonctionnalisation dans le cas de l'acide 16-mercaptohexadécanoïque est de 8 nm, dans le cas de la L-Cystéine de 4 nm et dans le cas de la fonctionnalisation avec Alexa Fluor 405 entre 4 et 11 nm. Les molécules d'Alexa Fluor ne recouvrent donc pas entièrement les nanoparticules.

Ainsi, grâce aux observations par STEM-HAADF et STEM-iDPC, nous avons pu mettre en évidence la présence d'une couche organique enrobant les nanoparticules. Ceci est vrai quelle que soit la concentration en agent réducteur, quelle que soit la taille et la forme des nanoparticules. Toutefois, il est encore nécessaire de s'assurer du greffage covalent des molécules organiques sur les nanoparticules d'or en détectant la présence de la liaison or-soufre qui a dû s'y être créée.

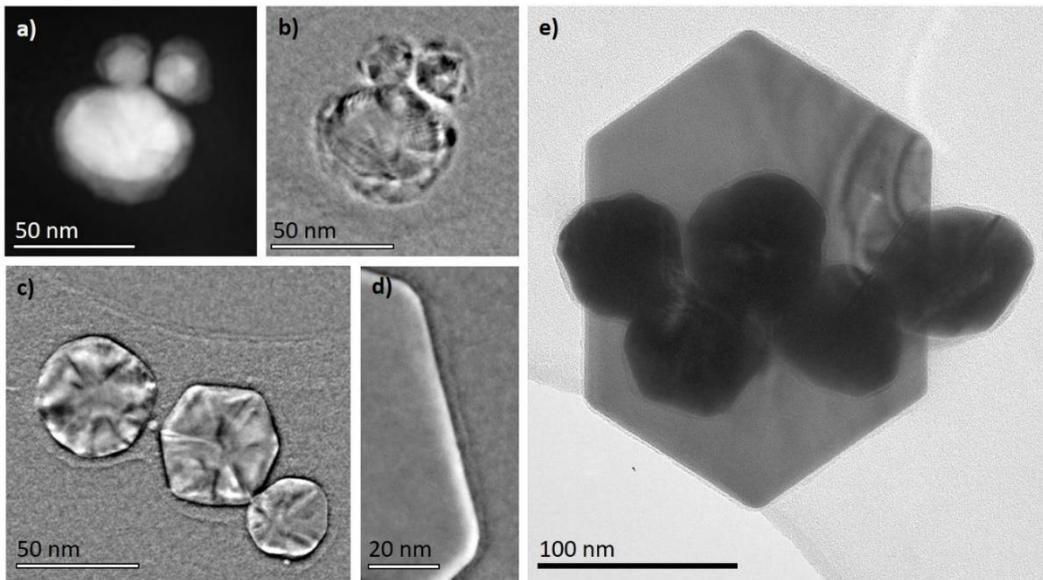


Figure 2.22 : Clichés de nanoparticules d'or fonctionnalisées à 40 C_0 par de la L-Cystéine et de l'Alexa-Fluor 405 en a) STEM-HAADF et b) STEM-iDPC. Clichés de nanoparticules d'or fonctionnalisées à 40 C_0 par de la L-Cystéine c) et d) par MHDA en STEM-iDPC (tension d'accélération de 300 kV, angle de convergence de 12,5 mrad et longueur de caméra de 360 mm). e) Micrographie TEM de nanoparticules fonctionnalisées par MHDA (tension d'accélération de 300 kV).

2.2.3.3. Détection de la liaison covalente or-soufre par spectrométrie Raman

Dans le but de s'assurer du greffage covalent des molécules, des mesures par spectrométrie de diffusion Raman ont été réalisées. Les spectres de la Figure 2.23 ont été obtenus avec un spectromètre dispersif InVia de Renishaw avec une longueur d'onde d'excitation de 514 nm, une puissance sur échantillon de 50 μ W sous objectif x 50. Par la suite, les lignes de base des spectres ont été soustraites via l'outil de traitement du logiciel WiRe (soustraction polynomiale).

Un spectre caractéristique obtenu sur un échantillon de particules d'or fonctionnalisées avec chacune des trois molécules chimiques utilisées est montré sur la Figure 2.23. Plusieurs pics, indexés sur la figure, peuvent être attribués aux différents modes de vibration des molécules greffées par comparaison avec les spectres des molécules montrés sur la Figure 2.17, la Figure 2.18 et la Figure 2.19. Concernant les nanoparticules fonctionnalisées avec de la L-cystéine et avec de la L-Cystéine – Alexa Fluor, le pic correspondant au mode de vibration de la liaison S-H, situé à 2560 cm^{-1} , a disparu et un nouveau pic positionné autour de 250 cm^{-1} apparaît. Ce pic est attribué à la liaison covalente Au-S[25]. Dans le cas des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec le MHDA, un nouveau pic est présent à 226 cm^{-1} tandis que celui situé à 2560 cm^{-1} est toujours présent. Celui à 226 cm^{-1} peut être relié à la présence de liaisons Au-S. Nous pouvons donc en conclure que des molécules de MHDA et de L-Cystéine sont liées de manière covalente aux nanoparticules d'or. Un léger décalage du pic correspondant à la

liaison Au-S est mesuré entre les deux types de fonctionnalisation. Ceci s'explique par le fait que la constante de raideur de la liaison peut varier, entraînant une variation de fréquence de vibration de la liaison Au-S, le MHDA et la L-Cystéine étant deux molécules très différentes. De manière générale, la liaison Au-S est attendue dans la gamme située entre 220 cm^{-1} et 250 cm^{-1} [25]. Ces résultats sont donc en accord avec la littérature.

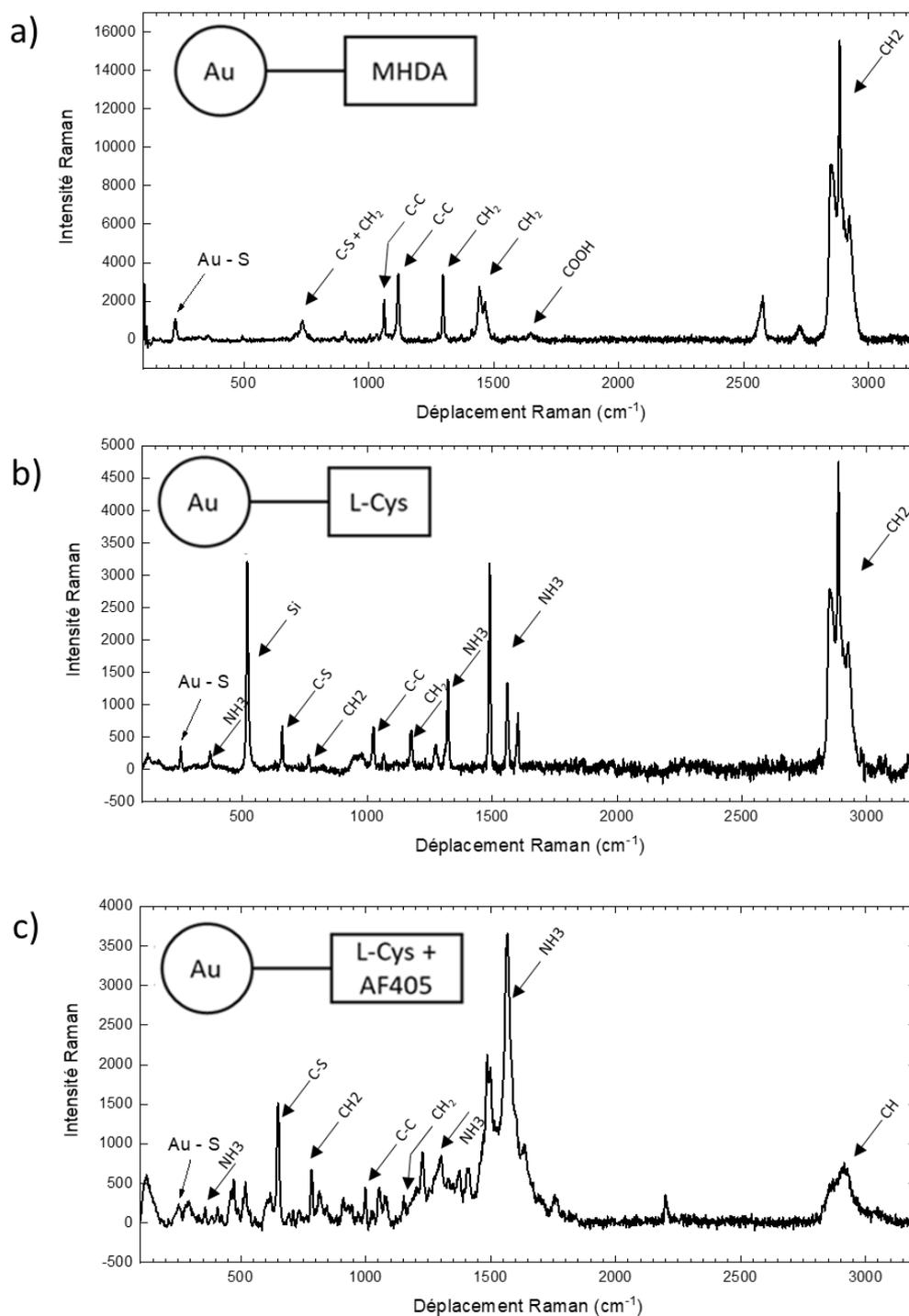


Figure 2.23 : Spectres Raman réalisés sur des nanoparticules d'or fonctionnalisées en solution aqueuse (40 C₀). Les spectres ont été réalisés avec une fonctionnalisation a) au MHDA, b) à la L-Cystéine et c) à la L-Cystéine et Alexa Fluor 405. Mesures réalisées à une excitation de 514 nm (après soustraction polynomiale de la ligne de base via l'outil intégré au logiciel WiRe).

Pour l'échantillon de nanoparticules fonctionnalisées par des molécules de MHDA, comme le pic correspondant aux liaisons S-H est encore visible, il reste des molécules de MHDA qui ne sont pas greffées sur les nanoparticules. Il semblerait que les cycles de centrifugation – re-dilution n'ont pas été suffisants pour retirer suffisamment l'excédent de molécules.

Nous avons ainsi la preuve que nos particules ont bien été fonctionnalisées. Toutefois, avant de passer à l'étude des interactions avec des cellules biologiques, nous allons évaluer la capacité des nanoparticules d'or fonctionnalisées à présenter une exaltation de surface du champ électromagnétique. Cette propriété est tout à fait remarquable et d'un intérêt applicatif certain.

2.2.4. Effet SERS

L'exaltation de surface du champ électromagnétique peut être mis en évidence par des expériences de spectrométrie Raman. La présence d'un effet SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy) a donc été étudiée. Comme nous l'avons expliqué dans le Chapitre 1, l'effet SERS est une exaltation très forte et localisée de la diffusion Raman de molécules due à la présence d'un substrat ou de nanoparticules à fortes propriétés plasmoniques, comme l'or nanométrique.

Nous avons choisi d'étudier pour cette expérience des nanoparticules synthétisées avec une concentration en agent réducteur de $16 C_0$. En effet, à de plus faibles concentrations en agents réducteurs, le nombre de nanoparticules est plus faible tout en présentant des dimensions plus larges. Il est connu que des particules plus grosses ont tendance à induire une plus grande intensité SERS, à cause de leurs plus forte propension à présenter des aspérités de surface, entraînant une forme locale peu régulière et favorisant ainsi des exaltation de surface[26].

Pour les mesures par spectroscopie de diffusion Raman, 10 μ L de suspension contenant des nanoparticules d'or fonctionnalisées sont déposées sur un substrat de silicium. Une fois l'échantillon asséché, un volume de 10 μ L d'une solution de bipyridine 2-2' ($NC_6H_4 - C_6H_4N$), notée 22BY, de concentration égale à 10^{-4} M, préparée le jour même, y est déposé. Le signal Raman d'un cristal de bipyridine 2-2' est visible sur la Figure 2.24, et est en adéquation avec les spectres présentés dans les travaux de Brolo *et al* [27].

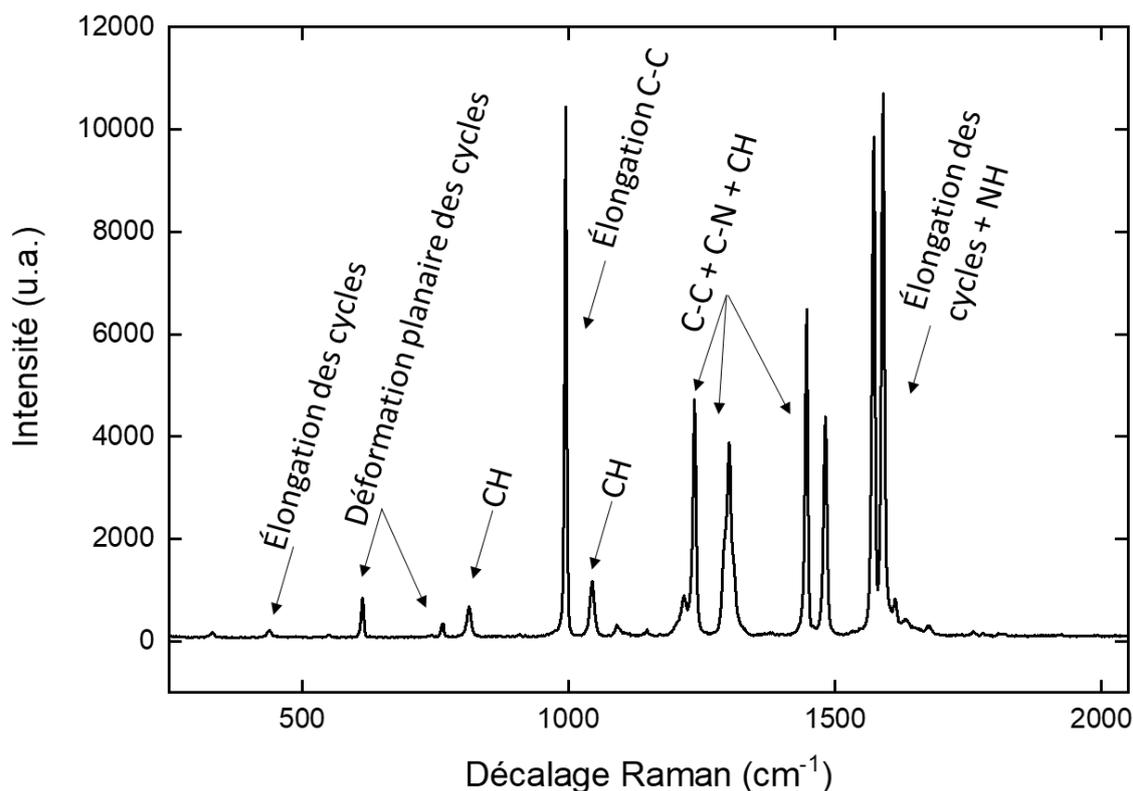


Figure 2.24 : Spectre Raman d'un cristal de 22BY observé en Raman : la mesure a été effectuée avec une longueur d'onde d'excitation de 633 nm, et une acquisition d'une seconde avec une puissance sur échantillon de 500 μ W.

Les spectres Raman obtenus sur les nanoparticules fonctionnalisées sont montrés sur la Figure 2.25. Ils sont tous enregistrés avec une longueur d'onde d'excitation de 633 nm, pour limiter au maximum les effets de photoluminescence et d'échauffement (fréquents lors de l'exaltation du champ local), par 20 accumulations d'une seconde et avec une puissance sur l'échantillon de 50 μ W en utilisant un objectif de x 50. Le spectre d'une solution asséchée de bipyridine et de concentration 10^{-4} M sur silicium est montré Figure 2.25a, celui des nanoparticules d'or non fonctionnalisées en présence de la bipyridine Figure 2.25b et ceux des nanoparticules fonctionnalisées par des molécules de MHDA, de la L-Cystéine, et de la L-Cystéine – Alexa Fluor en présence de bipyridine sur la Figure 2.25c. Le signal caractéristique de la 22BY est présent sur tous les spectres des nanoparticules, démontrant un effet SERS bien présent. En particulier, nous remarquons les pics qui émergent à 1489 cm^{-1} , pics attribués aux modes d'étirement des deux cycles de pyridine (en particulier leurs liaisons C - C et C - N)[27].

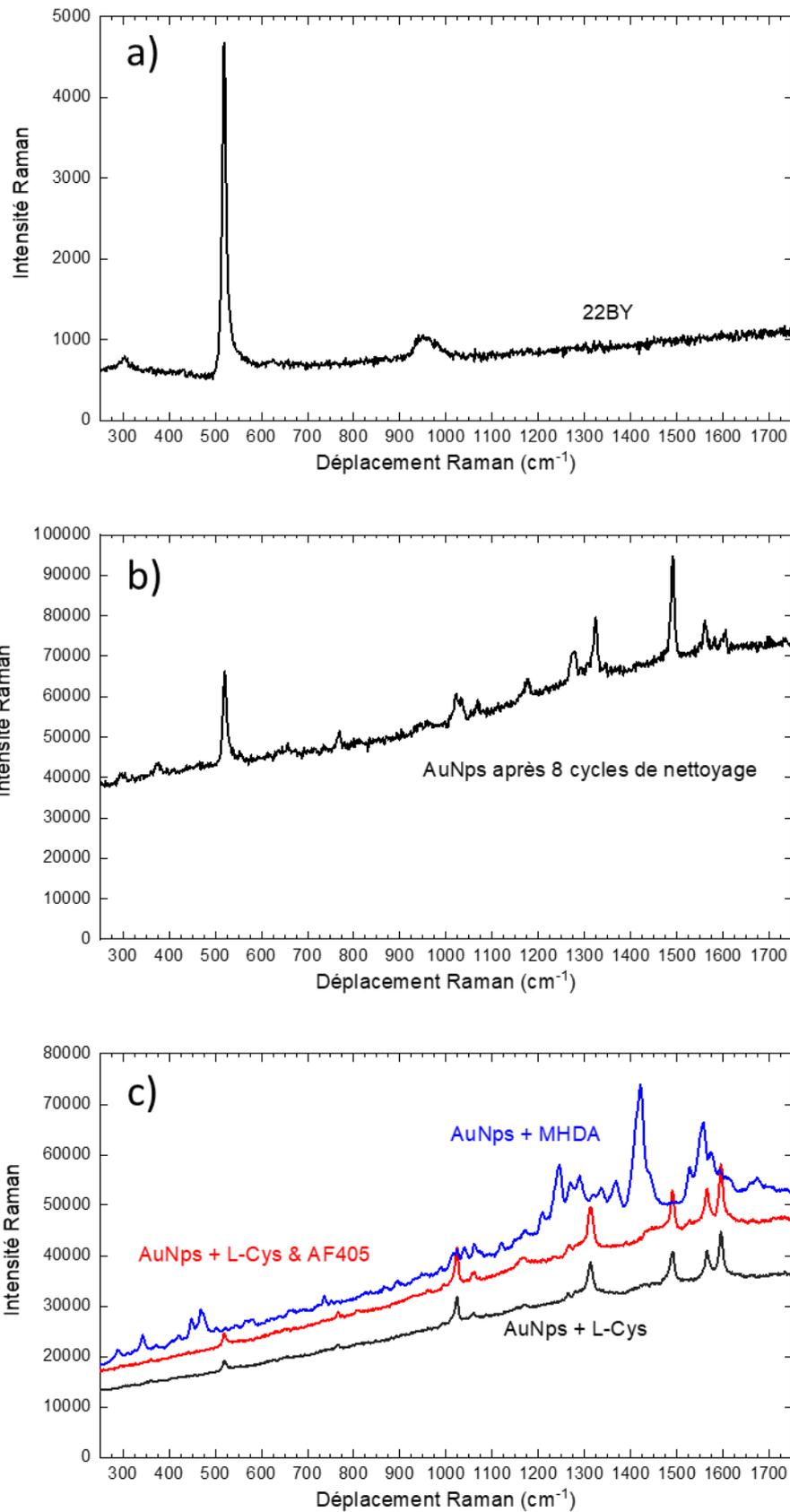


Figure 2.25 : Spectres Raman a) de bipyridine 2-2' déposée sur SiO_2/Si , b) de nanoparticules non fonctionnalisées, et c) de nanoparticules fonctionnalisées avec du MHDA, de la L-Cystéine et de la L-Cystéine et Alexa Fluor 405.

Cela nous apporte deux informations importantes. Premièrement, les particules présentent les propriétés plasmoniques attendues pour des nanoparticules d'or, et deuxièmement, cela confirme leur propreté. En effet, si nous avons eu un nettoyage insuffisant des nanoparticules, nous n'aurions pas pu observer une telle exaltation SERS, comme cela a été le cas pour certaines mesures (voir la Figure 2.26, où les pics sont nettement moins visibles et où l'exaltation est environ soixante fois plus faible que sur l'échantillon propre de la Figure 2.25b, dans les mêmes conditions expérimentales).

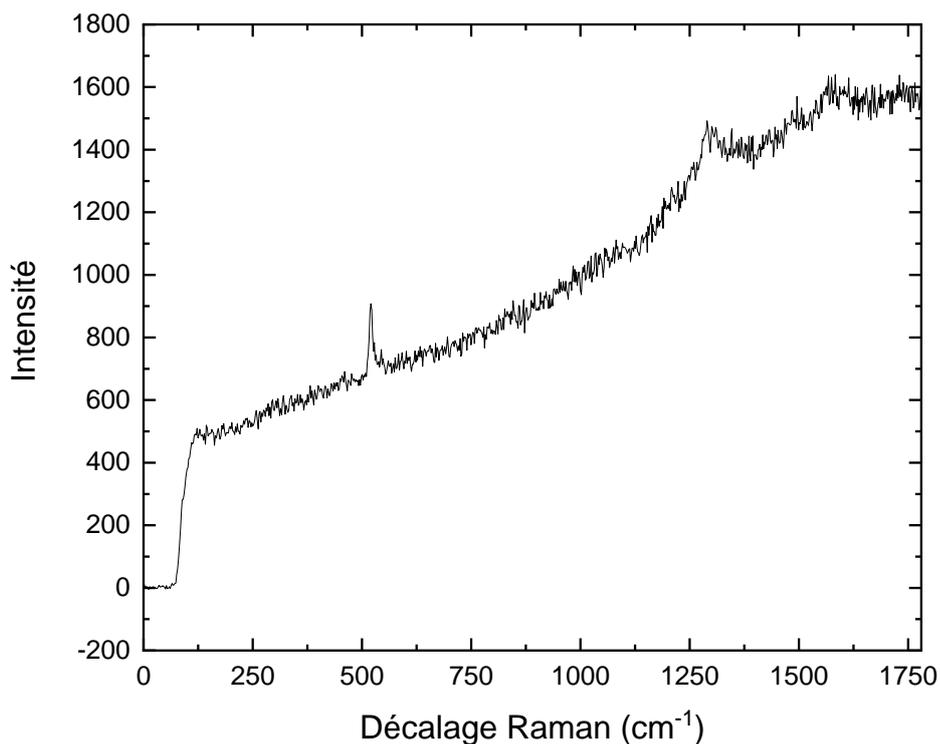


Figure 2.26 : Spectre Raman de l'effet observé sur un échantillon de nanoparticules d'or non nettoyées et non fonctionnalisées mises en contact avec une solution aqueuse de 22BY à 10^{-4} M.

Cet effet SERS a également été observé pour une concentration de 10^{-6} M, montrant un impact non négligeable à des concentrations en bipyridine très faibles, comme on peut le voir sur la Figure 2.27. Nous y voyons en effet les mêmes pics caractéristiques, notamment celui à 1489 cm^{-1} , avec une intensité beaucoup moins importante (2500 coups pour le pic à 1489 cm^{-1} contre 95000 coups pour une concentration en bipyridine de 10^{-4} M), ce qui est attendu compte tenu de la concentration.

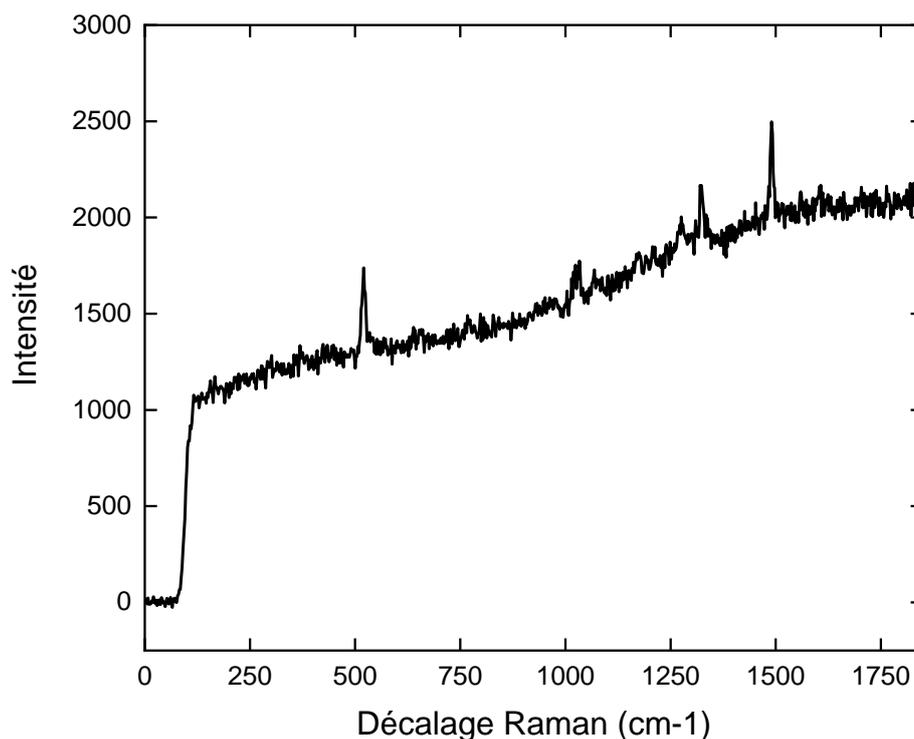


Figure 2.27 : Spectre Raman de nanoparticules d'or non fonctionnalisées en contact avec une solution aqueuse de bipyridine 2-2' à une concentration de 10^{-6} M.

2.3. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons détaillé la procédure de synthèse des nanoparticules d'or anisotropes utilisant un macérât d'origine végétal. Cette méthode de synthèse rapide, simple et peu coûteuse permet la formation d'un mélange de nanoparticules cristallisées de dimensions et de formes variées dépendant de la concentration en agents réducteurs lors de leur synthèse. Les observations réalisées par microscopie électronique en transmission, notamment en utilisant les nouvelles techniques récemment développées comme le STEM-iDPC, ont montré que nous avons un bon contrôle sur les dimensions moyennes des particules, ainsi qu'une grande diversité de formes présentes. L'analyse statistique réalisée à partir des observations en microscopie, couplée à l'analyse des spectres d'absorption UV-visible, nous a permis de connaître les dimensions et proportions de chaque type de structure, à chaque concentration, et de relier ces informations aux propriétés optiques mesurées par absorption UV-visible. Les nanoparticules d'or ont par la suite été fonctionnalisées avec trois molécules : de l'acide 16-mercaptohexadécanoïque, de la L-Cystéine, et de la L-Cystéine – Alexa Fluor 405. Le greffage covalent des molécules à la surface des nanoparticules a été montré par des mesures par spectrométrie de diffusion Raman et la couche organique autour des nanoparticules a été observée par microscopie électronique en transmission à balayage

en modes STEM-HAADF et STEM-iPDC. Enfin, les nanoparticules synthétisées ont montré de bonnes propriétés optiques comme l'ont prouvées les mesures SERS réalisées sur les nanoparticules nues et fonctionnalisées. Cet effet SERS pourrait ouvrir la porte à de nombreuses applications, les nanoparticules d'or étant déjà utilisées dans le domaine biomédical[28][29][30], ou en vue d'utilisation comme nanocapteurs, thématique sur laquelle de nombreux travaux sont en cours de développement[31][32].

La suite du travail consiste en la mise en contact des nanoparticules fonctionnalisées avec la plante aquatique *Egeria Densa*, et en l'étude et au suivi des propriétés, principalement mécaniques, des feuilles de la plante.

2.4. Bibliographie

- [1] A.B.G. Lansdown, GOLD: human exposure and update on toxic risks, *Critical Reviews in Toxicology*. 48 (2018) 596–614. <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1513991>.
- [2] A. Gole, C.J. Murphy, Seed-Mediated Synthesis of Gold Nanorods: Role of the Size and Nature of the Seed, *Chem. Mater.* 16 (2004) 3633–3640. <https://doi.org/10.1021/cm0492336>.
- [3] L. Scarabelli, A. Sánchez-Iglesias, J. Pérez-Juste, L.M. Liz-Marzán, A “Tips and Tricks” Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods, *J. Phys. Chem. Lett.* 6 (2015) 4270–4279. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.5b02123>.
- [4] X. Huang, M.A. El-Sayed, Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy, *Journal of Advanced Research*. 1 (2010) 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002>.
- [5] B. Mesquita, I. Lopes, S. Silva, M.J. Bessa, M. Starykevich, J. Carneiro, T.L.P. Galvão, M.G.S. Ferreira, J. Tedim, J.P. Teixeira, S. Fraga, Gold nanorods induce early embryonic developmental delay and lethality in zebrafish (*Danio rerio*), *Null*. 80 (2017) 672–687. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1331597>.
- [6] J.S. Bozich, S.E. Lohse, M.D. Torelli, C.J. Murphy, R.J. Hamers, R.D. Klaper, Surface chemistry, charge and ligand type impact the toxicity of gold nanoparticles to *Daphnia magna*, *Environ. Sci.: Nano*. 1 (2014) 260–270. <https://doi.org/10.1039/C4EN00006D>.
- [7] Novo Nordisk Pharmaatech A/S, Cetyltrimethylammonium bromide; SDS No FR-FR/14.0, (2019). https://novonordiskpharmatech.com/wp-content/uploads/2016/04/FeF-Cetyl-Trimethyl-Ammonium-Bromide-CTAB-USPNF_FR_SDS_11_5_2019.pdf (accessed March 23, 2021).
- [8] J.Y. Song, H.-K. Jang, B.S. Kim, Biological synthesis of gold nanoparticles using *Magnolia kobus* and *Diopyros kaki* leaf extracts, *Process Biochemistry*. 44 (2009) 1133–1138. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.06.005>.
- [9] S.P. Dubey, M. Lahtinen, M. Sillanpää, Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles, *Process Biochemistry*. 45 (2010) 1065–1071. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.03.024>.

- [10] D. MubarakAli, N. Thajuddin, K. Jeganathan, M. Gunasekaran, Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 85 (2011) 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.03.009>.
- [11] T. Elavazhagan, T. Elavazhagan, Memecylon edule leaf extract mediated green synthesis of silver and gold nanoparticles, *IJN*. (2011) 1265. <https://doi.org/10.2147/IJN.S18347>.
- [12] C. Jayaseelan, R. Ramkumar, A.A. Rahuman, P. Perumal, Green synthesis of gold nanoparticles using seed aqueous extract of *Abelmoschus esculentus* and its antifungal activity, *Industrial Crops and Products*. 45 (2013) 423–429. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.019>.
- [13] S.P. Chandran, M. Chaudhary, R. Pasricha, A. Ahmad, M. Sastry, Synthesis of Gold Nanotriangles and Silver Nanoparticles Using Aloe vera Plant Extract, *Biotechnol. Prog.* 22 (2006) 577–583. <https://doi.org/10.1021/bp0501423>.
- [14] N. Félidj, J. Grand, G. Laurent, J. Aubard, G. Lévi, A. Hohenau, N. Galler, F.R. Aussenegg, J.R. Krenn, Multipolar surface plasmon peaks on gold nanotriangles, *The Journal of Chemical Physics*. 128 (2008) 094702. <https://doi.org/10.1063/1.2839273>.
- [15] K.L. Kelly, E. Coronado, L.L. Zhao, G.C. Schatz, The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment, *J. Phys. Chem. B*. 107 (2003) 668–677. <https://doi.org/10.1021/jp026731y>.
- [16] Y. Xia, Y. Xiong, B. Lim, S.E. Skrabalak, Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics?, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 60–103. <https://doi.org/10.1002/anie.200802248>.
- [17] R.M. Hough, R.R.P. Noble, M. Reich, Natural gold nanoparticles, *Ore Geology Reviews*. 42 (2011) 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2011.07.003>.
- [18] Y. Xia, X. Xia, H.-C. Peng, Shape-Controlled Synthesis of Colloidal Metal Nanocrystals: Thermodynamic versus Kinetic Products, *J. Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 7947–7966. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b04641>.
- [19] F. Baletto, C. Mottet, R. Ferrando, Microscopic mechanisms of the growth of metastable silver icosahedra, *Phys. Rev. B*. 63 (2001) 155408. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.63.155408>.
- [20] F. Baletto, R. Ferrando, A. Fortunelli, F. Montalenti, C. Mottet, Crossover among structural motifs in transition and noble-metal clusters, *The Journal of Chemical Physics*. 116 (2002) 3856–3863. <https://doi.org/10.1063/1.1448484>.
- [21] B. Ankamwar, M. Gharge, U.K. Sur, Photocatalytic and Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Activity of Biosynthesized Anisotropic Gold Nanoparticles, *Adv Sci Engng Med.* 7 (2015) 717–721. <https://doi.org/10.1166/asem.2015.1748>.
- [22] R.S. Panikkanvalappil, S.S. Theruvakkattil, A.K. Samal, P. Thalappil, *ChemInform Abstract: Anisotropic Nanomaterials: Structure, Growth, Assembly, and Functions*, *ChemInform*. 42 (2011) no-no. <https://doi.org/10.1002/chin.201124208>.
- [23] Site Internet ThermoFischer Scientific - Alexa Fluor 405., (n.d.). <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/alex-fluor-405.html> (accessed July 12, 2021).
- [24] G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Elsevier Science, 2013. <https://books.google.fr/books?id=6aO-207lhdc>.

- [25] R. Holze, The adsorption of thiophenol on gold – a spectroelectrochemical study, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 21364–21372. <https://doi.org/10.1039/C5CP00884K>.
- [26] S.C. Boca, C. Farcau, S. Astilean, The study of Raman enhancement efficiency as function of nanoparticle size and shape, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms.* 267 (2009) 406–410. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2008.10.020>.
- [27] A.G. Brolo, Z. Jiang, D.E. Irish, The orientation of 2,2'-bipyridine adsorbed at a SERS-active Au(111) electrode surface, *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 547 (2003) 163–172. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(03\)00215-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(03)00215-8).
- [28] F. Lussier, T. Brulé, M. Vishwakarma, T. Das, J.P. Spatz, J.-F. Masson, Dynamic-SERS Optophysiology: A Nanosensor for Monitoring Cell Secretion Events, *Nano Lett.* 16 (2016) 3866–3871. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b01371>.
- [29] K. Kneipp, A.S. Haka, H. Kneipp, K. Badizadegan, N. Yoshizawa, C. Boone, K.E. Shafer-Peltier, J.T. Motz, R.R. Dasari, M.S. Feld, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in Single Living Cells Using Gold Nanoparticles, *Appl Spectrosc.* 56 (2002) 150–154. <https://doi.org/10.1366/0003702021954557>.
- [30] E.S. Shibu, N. Varkentina, L. Cognet, B. Lounis, Small Gold Nanorods with Tunable Absorption for Photothermal Microscopy in Cells, *Adv. Sci.* 4 (2017) 1600280. <https://doi.org/10.1002/advs.201600280>.
- [31] J. Kneipp, H. Kneipp, M. McLaughlin, D. Brown, K. Kneipp, In Vivo Molecular Probing of Cellular Compartments with Gold Nanoparticles and Nanoaggregates, *Nano Lett.* 6 (2006) 2225–2231. <https://doi.org/10.1021/nl061517x>.
- [32] A. Shamsaie, M. Jonczyk, J. Sturgis, J. Paul Robinson, J. Irudayaraj, Intracellularly grown gold nanoparticles as potential surface-enhanced Raman scattering probes, *J. Biomed. Opt.* 12 (2007) 020502. <https://doi.org/10.1117/1.2717549>.

Chapitre 3

Propriétés mécaniques de la paroi de cellules de feuilles d'*Egeria Densa* en présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées

3.1.	Protocole expérimental.....	80
3.1.1.	Préparation des échantillons	81
3.1.2.	Mesures d'indentation par AFM	87
3.2.	Propriétés mécaniques de la paroi végétale d' <i>Egeria Densa</i> en présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées.....	93
3.2.1.	Détermination des modules de Young effectifs des cellules de feuilles d' <i>Egeria Densa</i> exposées ou non à des nanoparticules aux temps d'exposition de 4 h et 8 h.....	93
3.2.2.	Suivi en temps - étude cinétique	95
3.2.2.1.	Procédure expérimentale des prises de mesure	95
3.2.2.2.	Etude cinétique.....	96
3.2.2.3.	Fluctuations du module élastique effectif E^*	103
3.2.3.	Propriétés mécaniques des cellules après une phase d'exposition à des nanoparticules d'or fonctionnalisées.....	105
3.3.	Conclusion.....	109
3.4.	Bibliographie	110

Au Chapitre 2, le protocole de synthèse et de fonctionnalisation des nanoparticules d'or anisotropes a été détaillé. Nous avons ainsi abouti à différentes suspensions de nanoparticules d'or propres et optiquement actives. L'étape suivante consiste à étudier l'évolution des propriétés mécaniques des cellules végétales en présence de nanoparticules d'or à des concentrations suffisamment faibles pour qu'elles soient non cytotoxiques. En effet, l'exposition de cellules végétales à des nanoparticules d'or à fortes concentrations peut entraîner des dégâts sur la croissance et le développement des plantes[1]. Peu de travaux ont été menés sur les changements mécaniques induits par la présence de nanoparticules sur des cellules végétales, même si plusieurs études de toxicité de nanoparticules ont été réalisées[2][3][4][5][6], en particulier dans les champs dits des « omiques ». Cet ensemble de champs d'étude regroupe divers domaines comme la génomique qui s'intéresse au fonctionnement d'un organisme à l'échelle du génome, la métabolomique qui concerne un ensemble de métabolites primaires et secondaires... Pourtant, l'élasticité des cellules végétales constitue un remarquable indicateur de son état de forme[7]. Dans ce travail, nous avons choisi de réaliser des mesures d'indentation mécanique par AFM en enregistrant des courbes approche-retrait en mode cartographie de force sur la paroi de cellules de feuilles matures de la plante aquatique *Egeria Densa* exposées à des nanoparticules, puis après exposition [8].

Dans ce chapitre, nous allons dans un premier temps détailler la préparation des échantillons et décrire la procédure d'acquisition et de traitement des courbes de forces. Ensuite, nous présenterons les mesures d'indentation, l'évaluation de la valeur du module élastique dynamique E^* de la paroi des cellules en fonction du temps d'exposition aux nanoparticules fonctionnalisées, du type de fonctionnalisation, du type de cellules et de la concentration massique des nanoparticules présentes dans le milieu. Nous discuterons des résultats en justifiant le choix du modèle physique utilisé lors de la détermination de E^* . Enfin, nous présenterons les résultats des mesures d'indentation en fonction du temps écoulé après avoir retiré les nanoparticules du milieu aqueux environnant la plante.

3.1. Protocole expérimental

Dans cette partie, nous allons détailler le protocole de préparation des échantillons avant de décrire la procédure de mesure par AFM.

Deux types d'expériences ont été réalisés. D'une part, des mesures d'indentation par AFM ont été effectuées sur des échantillons de plantes d'*Egeria Densa* préalablement mis en présence d'une concentration massique donnée de nanoparticules d'or pendant une durée définie. D'autre part, des expériences de suivi des modifications de l'élasticité en fonction du temps écoulé depuis l'introduction des nanoparticules dans le milieu ont été réalisées, le démarrage de ces expériences se faisant alors avec un échantillon non exposé.

3.1.1. Préparation des échantillons

Préparation des échantillons biologiques pour les mesures d'indentation par AFM

Lors des expériences, deux aspects sont critiques quant à la préparation de l'échantillon : il faut nécessairement que la plante soit vivante et que la zone de la plante étudiée soit immobilisée pour pouvoir mener à bien les mesures par AFM. Les mesures se font dans de l'eau distillée[9].

Nous avons travaillé sur des échantillons constitués de plusieurs feuilles reliées à la tige de la plante. La présence de celle-ci permet une irrigation prolongée des feuilles, et donc une durée d'expérience plus longue. En effet, des essais réalisés sur des feuilles séparées de leur tige ont montré que la durée de mesure s'en trouvait sensiblement modifiée ; nous observons au bout de 5 h l'apparition d'une adhésion entre la pointe AFM et les cellules et une perte totale de fluorescence de l'échantillon, qui témoignent d'une forte dégradation des échantillons ; nous parlons donc de durée de vie moyenne dans le Tableau 3.1. Pour des feuilles encore reliées à la tige, les mesures ont pu être menées pendant plus de 12 h sans aucun signe optique de dégradation (voir Tableau 3.1).

Echantillons utilisés	Durée de vie moyenne observée
Feuilles entières séparées de la tige	5 h
Feuilles entières reliées à la tige	> 12 h

Tableau 3.1 : Durée de vie de la plante selon la méthode de préparation de l'échantillon.

Pour garantir une parfaite stabilité de l'échantillon pendant les observations, nous avons immobilisé la plante grâce à un gel d'agarose. L'agarose, de formule $C_{12}H_{18}O_9$, dont la structure est présentée sur la Figure 3.1, est un polymère soluble dans l'eau s'il est chauffé. Nous avons utilisé de l'agarose à bas point de fusion (température de gélification comprise en 26°C et 30°C et température de fusion du gel inférieure ou égale à 65°C).

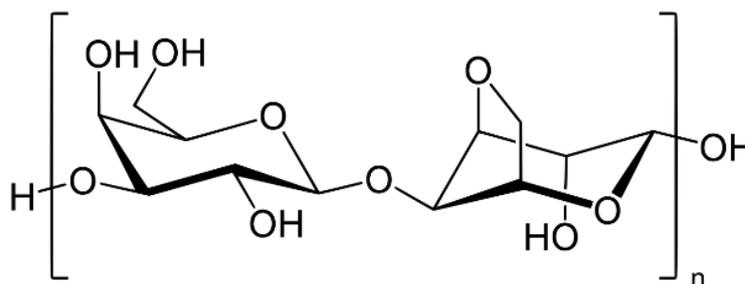


Figure 3.1 : Structure chimique de l'agarose.

Nous avons réalisé des gels d'agarose à 1 %, correspondant à une dissolution de 1 g d'agarose dans 100 mL d'eau distillée. Pour cela, 800 μL de la solution liquide obtenue après dissolution de la poudre d'agarose ont été déposés au fond d'une boîte de Pétri. Un fois le gel pris, une partie de la surface du gel (celle qui est au centre de la boîte), est scarifiée avec une lame de rasoir. Un morceau de tige avec plusieurs feuilles du plant d'*Egeria Densa* sélectionnée pour l'expérience est inséré dans la zone scarifiée du gel, une goutte de solution d'agarose encore liquide mais proche de la température de solidification est déposée au niveau de la tige, puis d'autres gouttes sous les feuilles en-dessous du gel déjà solidifié. Un pinceau est ensuite utilisé pour appuyer délicatement sur les feuilles. Nous attendons que les gouttes se solidifient et ajoutons ensuite 3 mL d'eau distillée dans la boîte de Pétri. Le gel permet d'éviter l'assèchement de l'échantillon végétal et sert aussi à le maintenir immobile pour la suite de l'expérience. L'hydratation de l'échantillon est assurée en continu, d'une part grâce au gel d'agarose et d'autre part grâce à l'eau ajoutée dans la boîte de Pétri qui immerge alors complètement l'échantillon. La Figure 3.2 montre la photographie d'un échantillon prêt à être analysé par AFM.

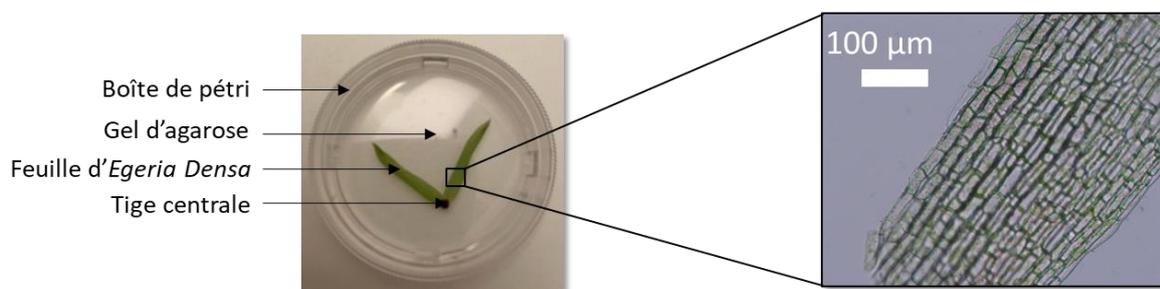


Figure 3.2 : Echantillon d'*Egeria Densa* immobilisé sur gel d'agarose avant les mesures AFM (à gauche) et photographie par microscopie optique d'une partie d'une feuille d'*Egeria Densa* (à droite).

Cette étape est délicate et cruciale : si le gel est mal réparti, si son épaisseur n'est pas constante, si la feuille n'est pas parfaitement maintenue par le gel ou si du gel recouvre les feuilles, les mesures par AFM ne pourront avoir lieu ou seront inexploitables.

Masses des nanoparticules d'or fonctionnalisées mises en présence de la plante pour les mesures d'indentation

Nous avons décidé de centrer les études sur des échantillons obtenus avec une concentration initiale en agents réducteurs de 40 C_0 et 80 C_0 . Ce choix a été fait, tout comme dans le Chapitre 2, en raison de la très grande diversité de formes des particules observées ainsi qu'à leurs dimensions. Des particules de petite taille sont plus à même d'être internalisées au sein des cellules. Dans le cas d'*Egeria Densa*, il a été reporté que des nanoparticules d'or de 18 nm étaient parfaitement internalisées[10][11]. Or, à 40 C_0

et 80 C₀, les tailles moyennes des structures synthétisées (notamment les icosaèdres) sont de cet ordre. De plus, nous avons pu voir par microscopie électronique que des particules bien plus petites étaient également synthétisées ; il n’y a donc a priori aucun obstacle à l’internalisation des nanoparticules d’or par les plants d’*Egeria Densa*. Les formes, tailles et proportions des nanoparticules sont rappelées dans le Tableau 3.2 pour les deux concentrations.

Forme de particules	40 C ₀		80 C ₀	
	Dimension caractéristique	Proportion en nombre	Dimension caractéristique	Proportion en nombre
Icosaèdres	~ 20 nm	~ 30 %	~ 18 nm	~ 20 %
Bi-pyramides Décaèdres Tétraèdres	~ 40 nm	~ 20 %	~ 32 nm	~ 20 %
Plaquettes	Epaisseur : 12 nm Longueur d’un côté : ~ 110 nm à ~ 160 nm	~ 10 %	Epaisseur : 12 nm Longueur d’un côté : ~ 80 nm à ~ 100 nm	~ 10%
Polycristaux		~ 40 %		~ 50 %

Tableau 3.2 : Rappel des dimensions caractéristiques et des proportions des nanoparticules d’or synthétisées aux concentrations 40 C₀ et 80 C₀.

Avant de procéder à la mise en contact des nanoparticules avec les échantillons biologiques, il est nécessaire d’évaluer la concentration massique des nanoparticules dans les suspensions précédemment obtenues afin de choisir au mieux la quantité de nanoparticules à mettre en contact avec les plantes. Pour ce faire, nous avons évalué la concentration massique en or lors de chaque étape de la synthèse et de la fonctionnalisation des nanoparticules.

Voici le récapitulatif des différentes étapes de synthèse et de fonctionnalisation en faisant apparaître le calcul des concentrations massiques (l’hypothèse retenue est de ne considérer aucune perte de masse d’or, ni lors de la synthèse, ni au cours du nettoyage, ce qui revient à surestimer les concentrations massiques) :

1. Etape de synthèse :

- La concentration massique de départ en or est de $(4,74 \pm 0,01) \text{ mg.mL}^{-1}$ (préparation de la solution avec le sel d’or).

- 0,5 mL de cette solution de sel d'or ont été prélevés pour être mélangés avec le macérat pour un volume final de solution de 10 mL (**dilution d'un facteur 20**). Nous obtenons donc $4,74/20 = 0,237 \text{ mg.mL}^{-1}$, soit $237 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$.
2. Première étape de nettoyage :
- Le volume de départ est de 9 mL (1 mL a été conservé pour contrôle) et le volume à l'arrivée est de 3 mL (**reconcentration d'un facteur 3**). Nous obtenons donc une concentration de $237*3=711 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$.
3. Etape de fonctionnalisation :
- 100 μL de la suspension de nanoparticules nettoyées ont été prélevés et ajoutés à 900 μL de la solution de fonctionnalisation (le mélange $\text{H}_2\text{O} + \text{DTT} + \text{MHDA/L-Cys/AF405}$) (**dilution d'un facteur 10**). Nous obtenons donc une concentration de $711/10=71,1 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$.
4. Deuxième étape de nettoyage :
- Enfin, lors du nettoyage, nous sommes passés d'un volume de 500 μL à un volume de 1 mL (**dilution d'un facteur 2**). Nous obtenons donc une concentration de $71,1/2 = \underline{35,55 \pm 2 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}}$.

Pour procéder à la mise en contact des nanoparticules d'or avec l'échantillon végétal, différents volumes de solution aqueuse de nanoparticules d'or fonctionnalisées sont ajoutés directement dans le tube rempli d'eau distillée contenant la plante, ou dans l'eau contenue dans la boîte de Pétri en veillant à ne pas dépasser la concentration massique de $100 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$, pour rester si possible dans des conditions non cytotoxiques. En effet, même si dans le cas d'*Egeria Densa*, une exposition à $250 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ d'or n'induit apparemment aucune toxicité[12], les études montrent que des concentrations massiques de nanoparticules d'or aussi faibles que $(263 \pm 157) \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ dépassaient le seuil de cytotoxicité pour des cellules de feuilles de peuplier, dans le cas de [13]. C'est pourquoi nous avons pris la décision de ne pas dépasser la valeur seuil de $100 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$.

Ainsi, pour les expériences durant lesquelles les temps d'exposition aux nanoparticules d'or fonctionnalisées sont supérieurs à 4 h et fixés, la procédure suivie consiste à ajouter 125 μL de la suspension de nanoparticules dans le tube contenant 50 mL d'eau et un plant d'*Egeria Densa* (**dilution d'un facteur 400**). La concentration massique est alors de $88,88 \text{ ng.mL}^{-1}$, soit $88,88 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$.

Pour les expériences de suivi en temps, afin de travailler avec la même concentration, deux étapes successives de dilution ont été nécessaires :

- Une première dilution est réalisée en injectant 200 μL de la suspension de nanoparticules d'or fonctionnalisées dans 530 μL d'eau ultrapure (**dilution d'un facteur 2,66**)

- 20 μL de cette suspension sont injectés dans les 3 mL d'eau, présents dans la boîte de Pétri avec la plante (**dilution d'un facteur 150**) ; la dilution finale est alors équivalente (**dilution totale d'un facteur 400**) et la concentration massique vaut 88,88 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Par la suite, nous avons dilué la suspension finale 5, 10 et 20 fois ; les concentrations massiques d'exposition sont alors respectivement de 17,78 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 8,89 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et 4,44 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Observation par microscopie optique et de fluorescence en cours d'expérience

Un des objectifs principaux de ce travail était d'effectuer les mesures pour des concentrations massiques de nanoparticules qui n'entraînent pas de modification des paramètres physiologiques observables dans les conditions des expériences. Ainsi, des changements de l'aspect visuel des plants, du nombre de feuilles d'un même plant, ou de la fluorescence intrinsèque ne devaient pas être perceptibles lors de l'observation des échantillons à l'œil et par microscopie optique et de fluorescence.

En effet, en procédant à des tests lors de la mise en contact de nanoparticules avec les plantes pour des concentrations importantes, des modifications significatives sont observées. Ainsi, pour une concentration en nanoparticules de 35,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, comme montré sur la Figure 3.3, au bout de 20 h, les feuilles de la plante B, exposée aux nanoparticules d'or, sont passées du vert au jaune, témoignant d'une perte de la chlorophylle, contrairement à l'échantillon de référence, noté A, qui n'a pas subi d'évolution notable visuellement.

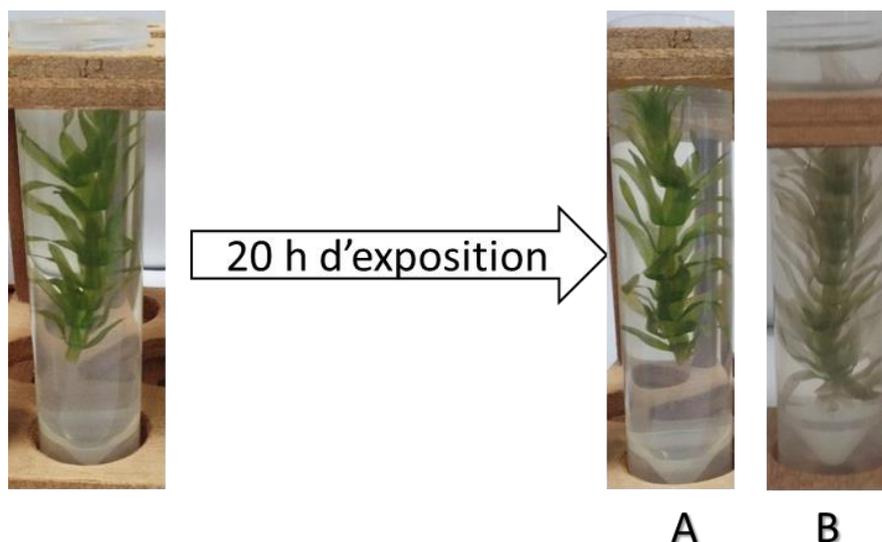


Figure 3.3 : Evolution de l'apparence d'un plant d'Egeria Densa après 20 h d'exposition à des nanoparticules d'or fonctionnalisées au MHDA pour une concentration de 35,55 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

De même, comme nous le constatons sur la Figure 3.4, nous avons également pu observer par microscopie de fluorescence une perte de pigmentation des chloroplastes sur des surfaces importantes de la feuille, ce qui témoigne également d'une dégradation de l'échantillon. Nous pouvons voir sur la Figure 3.4b la fluorescence rouge provenant des chloroplastes, mais sur toute la zone centrale, qui apparaît noire, nous constatons les dégâts entraînés par la présence des nanoparticules d'or, en particulier lorsque nous la comparons aux références des Figure 3.4c) et d).

Dès lors, pour toutes les expériences et durant l'intégralité de leur durée, l'aspect visuel de la plante et des feuilles, la fluorescence des chloroplastes, ainsi que leur mouvement à l'intérieur des cellules ont été observés. Ainsi, par exemple, si dès le début de l'expérience les chloroplastes ne montraient aucun déplacement, un autre échantillon était systématiquement préparé.

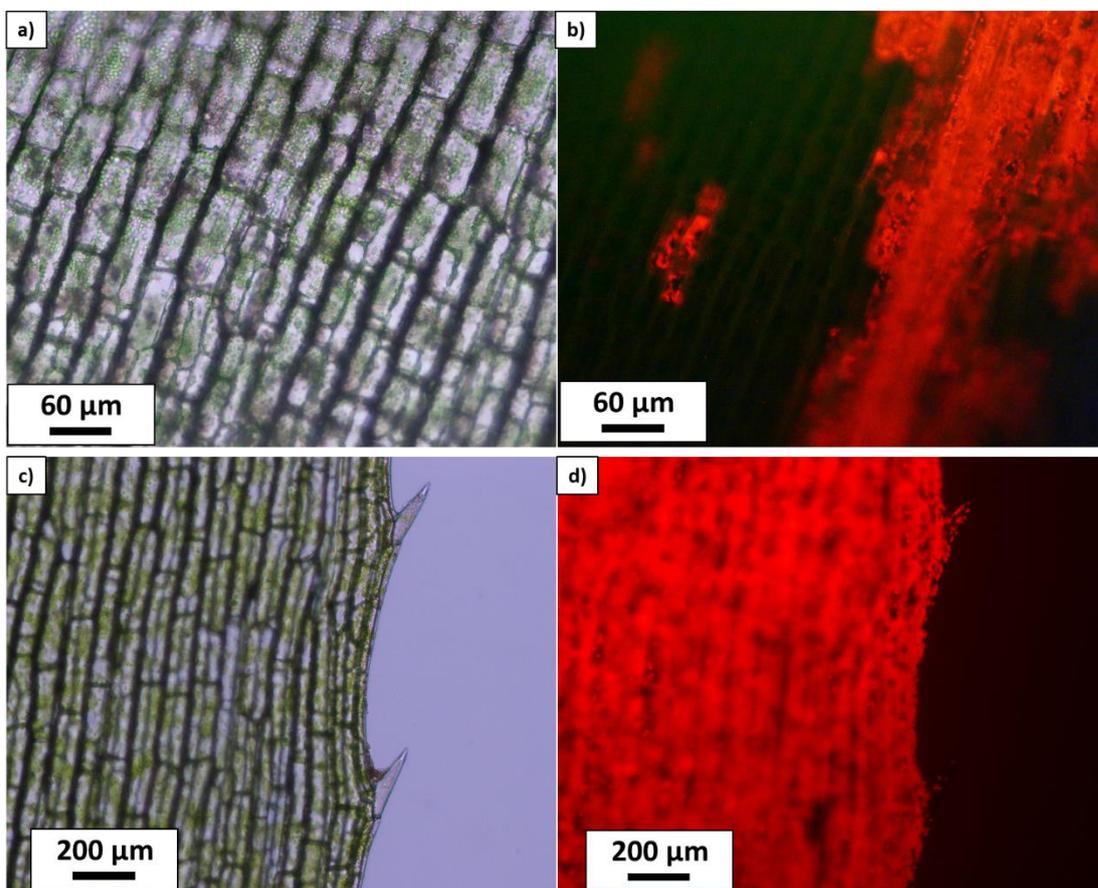


Figure 3.4 : Images de microscopie optique d'une feuille d'*Egeria Densa* exposée à des nanoparticules d'or fonctionnalisées, montrant la dégradation de ses propriétés de fluorescence par rapport à une feuille non exposée. Les images a) et b) correspondent à l'échantillon exposé, et les images c) et d) à l'échantillon non exposé. Chaque échantillon est imagé sans filtre et avec un filtre B-2A laissant apparaître les chloroplastes en rouge, et mettant en évidence leur fluorescence.

3.1.2. Mesures d'indentation par AFM

Mise en place et calibration

Le microscope à force atomique que nous avons utilisé est un Nanowizard II de JPK Instruments, équipé du module CellHesion, qui permet d'effectuer des mesures de spectroscopie de force longue distance grâce à un scanner piézo-électrique spécifique permettant un déplacement de 100 μm . La diode laser a une longueur d'onde de 850 nm. Pour rappel, le microscope est monté sur un microscope optique inversé à épifluorescence.

Les leviers que nous avons utilisés possèdent une pointe dont l'extrémité est terminée par une sphère en carbone haute-densité, d'un rayon de 50 nm (plus précisément les pointes Biospheres de Nanotools). Ces pointes sont solidaires de leviers de silicium de constante de raideur nominale 200 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ et de fréquence de résonance nominale 13 kHz, dont les dimensions sont présentées sur la Figure 3.5. Le revêtement supérieur du levier est recouvert d'une fine couche d'or pour optimiser la réflexion du faisceau laser.

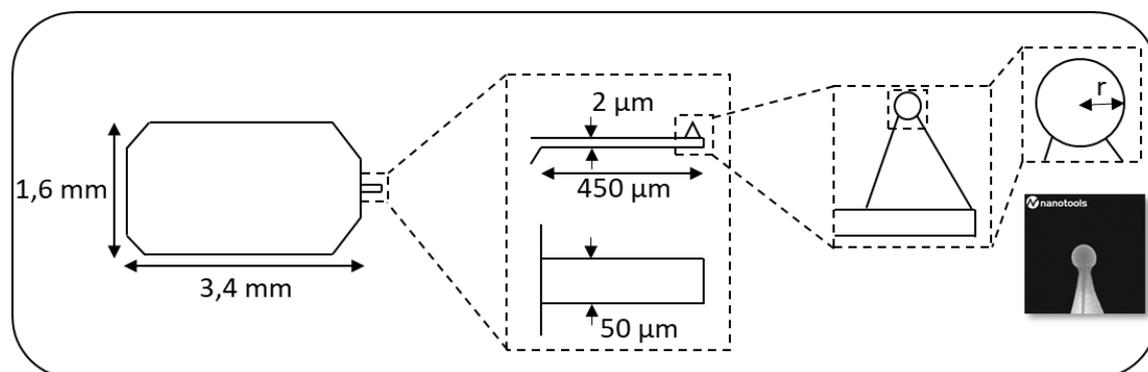


Figure 3.5 : Dimensions du levier et des pointes utilisés lors des mesures AFM. Les dimensions du levier ne varient pas, et le rayon de la pointe est de 50 nm. En insert, image de microscopie électronique à balayage d'une pointe de rayon 50 nm (reproduit et adapté d'après [14]).

La particularité de ces leviers est qu'ils sont pré-calibrés : le rayon r de la sphère, la fréquence de résonance f et la constante de raideur k du levier sont connus avec précision. Les valeurs de r et f ont été mesurées respectivement par microscopie électronique à balayage et par vibrométrie Doppler laser et celle de k a été calculée par la méthode de Sader[15].

Ces informations sont nécessaires pour appliquer la procédure standardisée pour les mesures nano-mécaniques par microscopie à force atomique (SNAP pour Standardized Nanomechanical Atomic Force Microscopy for Measuring Soft and Biological

Samples)[16]. Cette procédure permet une détermination plus fiable et plus précise du module élastique des échantillons mous, notamment des échantillons biologiques, et de s'affranchir des variations de mesures liées à l'instrument lui-même, au laboratoire et à l'opérateur.

Voici la procédure expérimentale détaillée :

- Le levier AFM est mis en place et le faisceau laser est positionné pour être réfléchi par le dos du levier ; la position du miroir est réglée pour que le faisceau arrive ensuite sur la photodiode avec le maximum d'intensité.
- Plusieurs courbes de force approche-retrait (signal de déflexion en fonction du déplacement du scanner piézoélectrique) sont enregistrées sur un substrat de verre propre ; cela permet de faire une première évaluation de la sensibilité de la photodiode, que nous appelons *Sensibilité mesurée*.
- Une analyse du bruit thermique est réalisée et une constante de raideur intermédiaire $k_{intermédiaire}$ est calculée ; cela est réalisé en utilisant le programme d'acquisition standard du microscope,
- La sensibilité de la photodiode est ensuite corrigée de telle sorte que la constante de raideur soit égale à celle mesurée par vibrométrie k_{connue} en utilisant la relation :

$$Sensibilité\ corrigée = Sensibilité\ mesurée * \sqrt{\frac{k_{intermédiaire}}{k_{connue}}}$$

- A ce stade, la déflexion verticale du levier est exprimée en pN, résultant du calcul :

$$\begin{aligned} & \text{signal de déflexion sur la photodiode (en V)} \times \text{sensibilité corrigée de la photodiode (en } \frac{nm}{V} \text{)} \\ & \times k_{connue} \left(\text{en } \frac{pN}{nm} \right) = \text{déflexion verticale (en pN)}. \end{aligned}$$

Courbes de force approche-retrait

Grâce aux observations par microscopie optique et/ou de fluorescence, le levier AFM est positionné au-dessus du centre de la cellule à étudier (cellules épithéliales, idioblastes et tooth cells), et nous procédons alors aux mesures. Celles-ci ont été réalisées avec un déplacement du piézo-élément de 20 μm , une vitesse de 4,0 $\mu\text{m.s}^{-1}$, une fréquence de 820 Hz et les courbes de force sont enregistrées pour une déflexion de 300 pN.

Les courbes sont ensuite traitées avec le logiciel JPK Data Processing suivant la procédure décrite ci-après :

- La ligne de base est corrigée pour que la zone sans contact et en l'absence de forces corresponde bien à une force nulle.

- Il faut s'assurer que la courbe de force présente bien la déflexion verticale du levier en fonction de la distance entre la pointe et l'échantillon, et non pas simplement de la position du levier suivant l'axe z.
- La position du point de contact (0 ; 0) est fixée. Cette étape détermine la zone où la pointe entre en contact avec l'échantillon.
- La pente de la partie de la courbe correspondant à la zone d'indentation est calculée (voir les courbes présentées sur la Figure 3.6).

La Figure 3.6 montre un exemple de courbes de force approche-retrait après traitement enregistrées en un point d'une cellule épithéliale non exposée à des nanoparticules.

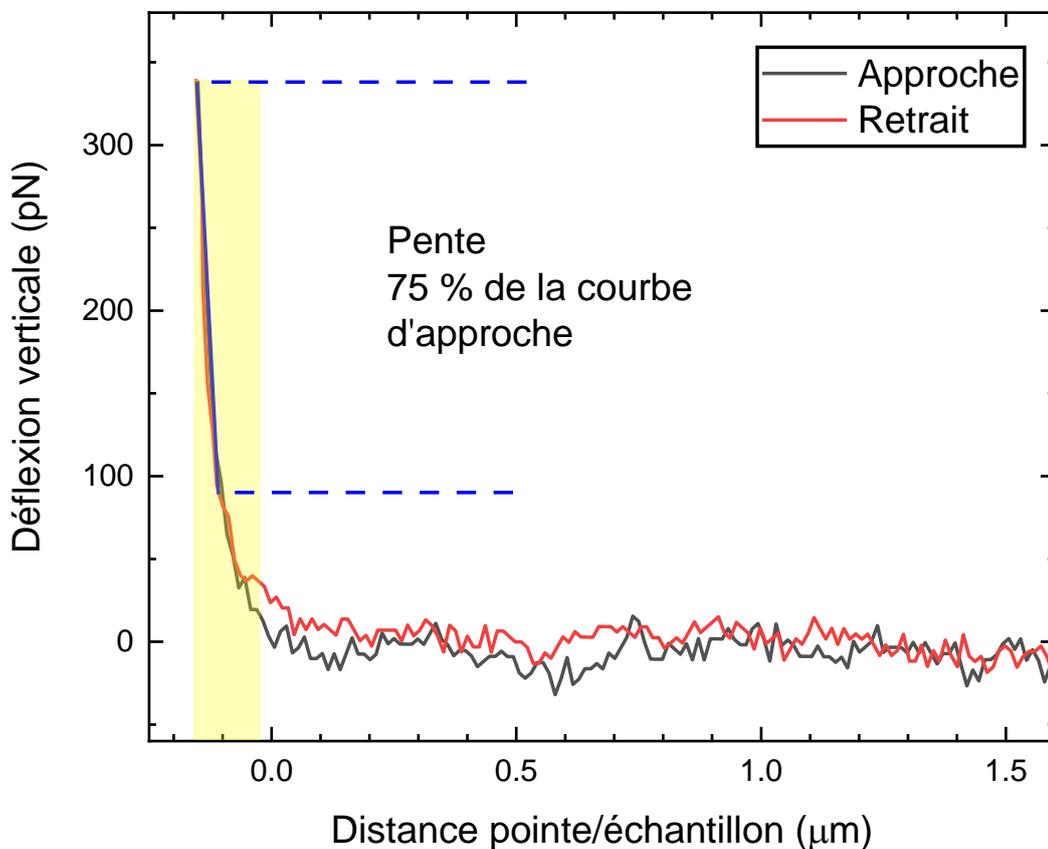


Figure 3.6 : Exemples de courbes de force obtenues par AFM. Les segments d'approche et de retrait ont été tracés en noir et en rouge respectivement.

La courbe de retrait ne présente pas d'adhésion, comme c'est le cas dans la très grande majorité des courbes de force obtenues dans ce travail (la proportion des courbes présentant de l'adhésion a été évaluée à moins de 1 %). Les pentes des parties de courbes correspondant à l'indentation sont identiques pour les courbes d'approche et de retrait.

Dans la suite, seules les courbes d'approche seront montrées et les valeurs de pente données auront été mesurées sur ces mêmes courbes. La pente est directement reliée à la rigidité de la zone du matériau sondé. Un histogramme des pentes mesurées est présenté sur la Figure 3.7. Nous y voyons une relative uniformité des pentes mesurées (la valeur moyenne est de $1,66 \text{ nN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ pour un écart moyen de $0,12 \text{ nN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$). L'étude des pentes et leur analyse nous permet d'avoir une mesure indirecte de la rigidité de l'échantillon.

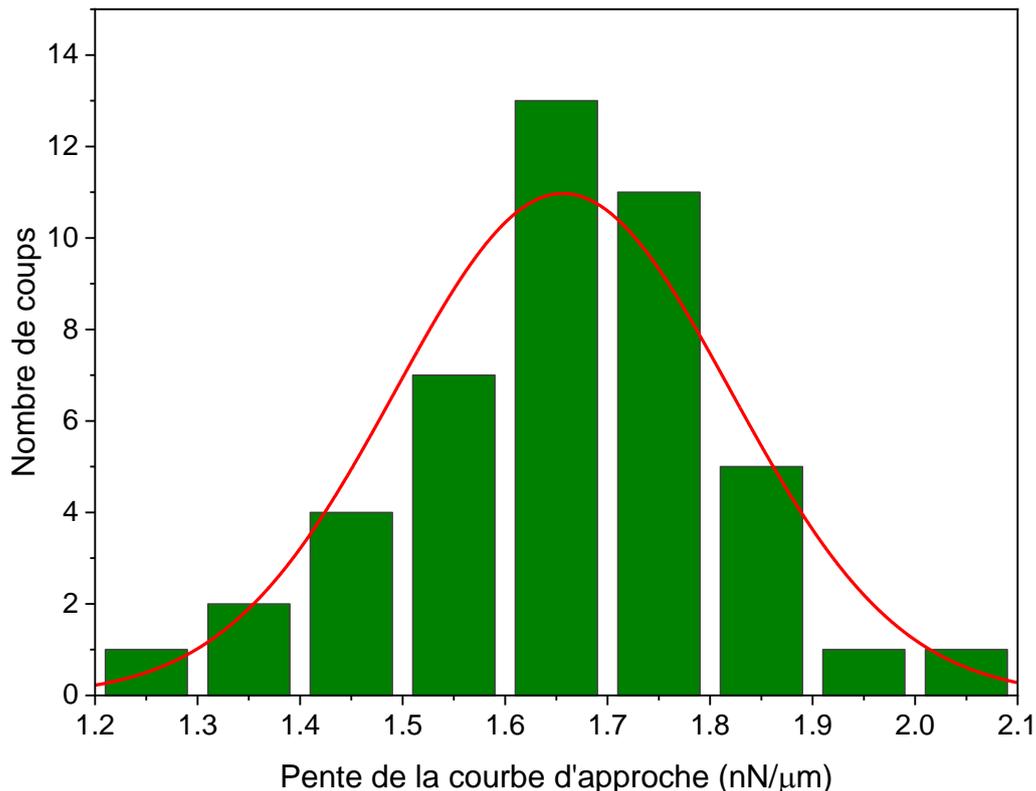


Figure 3.7 : Histogramme montrant les valeurs de pentes mesurées sur une cellule épithéliale non exposée à des nanoparticules d'or (total de 45 courbes collectées sur une zone de $10 \times 10 \mu\text{m}$).

Détermination du module élastique E^* - Choix du modèle d'analyse

La Figure 3.8 montre des courbes d'approche caractéristiques collectées après quatre temps d'exposition à des nanoparticules d'or fonctionnalisées : 0 s, 10 min, 4 h et 8 h. Les positions en z ont été recalées afin que l'indentation maximale corresponde toujours à une abscisse nulle. Nous voyons que l'indentation pour la référence est d'environ 30 nm, mais qu'elle est de 120 nm pour l'échantillon exposé aux nanoparticules durant 10 min. Dans la continuité, les échantillons exposés 4 h et 8 h présentent une indentation de 160 nm et 220 nm respectivement.

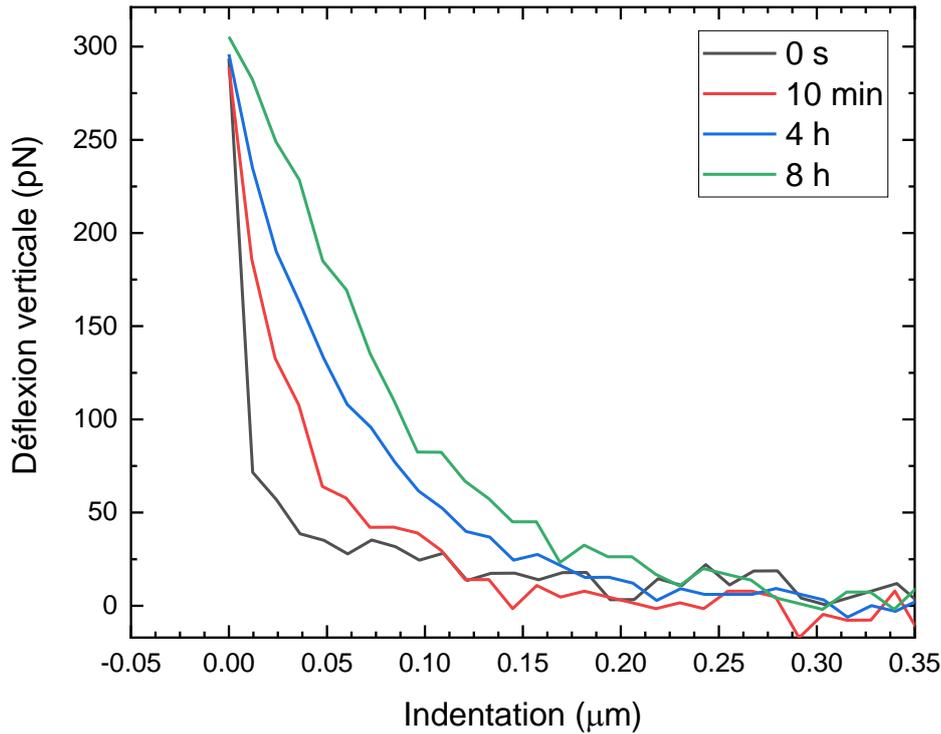


Figure 3.8 : Courbes d'approche enregistrées pour différentes durées d'exposition aux nanoparticules d'or.

Cela nous donne déjà une indication sur le modèle à utiliser, sachant que lors des expériences menées, nous n'avons pas observé d'adhésion entre la pointe et l'échantillon. En effet, dans la littérature, le modèle le plus souvent utilisé pour l'étude de propriétés mécaniques de cellules est le modèle de Hertz, en particulier dans le cas d'une pointe sphérique. La formule de ce modèle permet de relier la force appliquée F à l'indentation δ_0 :

$$F = \frac{4}{3} * \frac{E}{1 - \mu^2} * \sqrt{R * \delta_0^3},$$

où E est le module élastique (ou module de Young), μ le coefficient de Poisson (déformation de l'échantillon suivant la normale à la force appliquée sur cet échantillon, établi à 0,5 ici[17]), et R le rayon de courbure de la pointe.

Le module de Young réduit est défini par la loi de Hooke exprimant le rapport entre la tension appliquée sur le corps et la déformation que le corps en question subit[18]: $E = \frac{F}{\varepsilon}$, avec F la tension appliquée et ε la déformation ; ce module s'exprime en Pa. Sa valeur est typiquement de l'ordre de 10 kPa sans adhésion pour des cellules végétales sondées par AFM avec une pointe sphérique de rayon 10 nm, une vitesse d'approche de 20 $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ et un traitement avec le modèle de Hertz[19][20]. Une représentation schématique de la mesure du module de Young est présentée sur la Figure 3.9, dans le cas d'une force d'élongation appliquée verticalement notée F . Nous avons donc

l'allongement relatif qui s'exprime comme $\varepsilon = \frac{L-L_0}{L_0}$ et le module de Young réduit qui s'écrit $E = \frac{F}{\varepsilon}$.

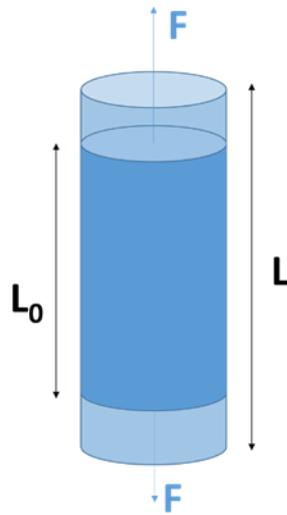


Figure 3.9 : Représentation du module de Young.

Le modèle de Hertz implique nécessairement que l'on se situe dans le régime élastique, et que l'échantillon sondé soit homogène ainsi que d'une épaisseur considérée comme infinie (c'est-à-dire très grande devant le déplacement de la pointe). Il est dit en général que le modèle peut s'appliquer pour une indentation inférieure ou égale à 10 % de l'épaisseur de l'échantillon [21], ce qui est notre cas vis-à-vis de l'épaisseur de la paroi végétale d'*Egeria Densa*. De plus, le modèle de Hertz est le modèle de référence quand on souhaite extraire les valeurs d'élasticité ou de rigidité de courbes de force lors de mesures AFM[22][23][24][25]. Ainsi, les valeurs du module de Young de différents matériaux que l'on peut lire dans la littérature sont à peu près systématiquement issues de données traitées à l'aide du modèle de Hertz. Dans ce contexte, nous avons donc pris la décision d'utiliser ce modèle lors de la phase de traitement de nos données.

L'autre information que nous pouvons tirer de la Figure 3.8 est la signification physique des différentes pentes observées. Nous voyons que la pente diminue quand la durée d'exposition augmente, et que l'indentation est de plus en plus grande également. Cela signifie que, pour une durée d'exposition plus longue que 8 h, nous indenterons un volume trop important pour pouvoir raisonnablement utiliser le modèle de Hertz (ces cas seront traités dans le Chapitre 4 de ce manuscrit). Il nous faudra alors raisonner en terme de pente, comme nous l'avons fait pour l'histogramme de la Figure 3.7 (dont les valeurs après traitement par le modèle de Hertz correspondent à une moyenne de $(14,16 \pm 1,04)$ kPa. Enfin, la Figure 3.8 nous montre également que, si l'indentation augmente en fonction du temps à force égale, c'est parce que la rigidité de la cellule diminue, ce que nous allons à présent détailler.

3.2. Propriétés mécaniques de la paroi végétale d'*Egeria Densa* en présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées

Afin d'étudier les propriétés mécaniques des cellules des feuilles, nous avons commencé par effectuer, au cours des nombreuses expériences réalisées, une mesure de référence sur un échantillon non exposé, permettant un contrôle rapide de l'état général de celui-ci, et qui nous autorisera à comparer les résultats obtenus lors des mesures sur des feuilles d'*Egeria Densa* exposées à l'or. L'ensemble des mesures AFM présentées dans ce manuscrit constitue un total de $N = 2577$ cartographies pour près que 40 000 courbes de forces approche-retrait. Enfin, sauf indication contraire, tous les résultats présentés dans ce chapitre ont été obtenus avec des nanoparticules d'or synthétisées à la concentration de $40 C_0$.

3.2.1. Détermination des modules de Young effectifs des cellules de feuilles d'*Egeria Densa* exposées ou non à des nanoparticules aux temps d'exposition de 4 h et 8 h

Des cartographies de force de 8×8 pixels, soit 64 courbes approche-retrait, ont été enregistrées dans les deux heures ayant suivi le rinçage, avec une force maximale appliquée de 300 pN. Les courbes ont été analysées pour en extraire le module de Young effectif E^* . La Figure 3.10, la Figure 3.11 et la Figure 3.12 montrent l'évolution des valeurs moyennes des modules de Young effectifs déterminées pour des cellules épithéliales, des tooth cells et des idioblastes respectivement en fonction du temps d'exposition aux nanoparticules d'or pour les trois fonctionnalisations. La concentration des nanoparticules d'or est de $40 C_0$, et la concentration en exposition est de $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$. Ces valeurs ont été obtenues en faisant une moyenne des différentes valeurs obtenues lors des mesures par AFM, et les barres d'incertitudes correspondent à l'écart-moyen mesuré sur l'ensemble des modules de Young effectifs mesurés. Les valeurs du module de Young effectif déduites des mesures sur les échantillons d'*Egeria Densa* de référence (à $t = 0$ s) correspondent aux valeurs trouvées dans la littérature (de l'ordre de la dizaine de kPa[19]). Pour les cellules épithéliales, le module de Young effectif est de $(14,26 \pm 4,47)$ kPa à $t = 0$ s et de $(0,946 \pm 0,138)$ kPa, $(1,05 \pm 0,31)$ kPa et $(1,12 \pm 0,23)$ kPa pour une fonctionnalisation au MHDA, à la L-Cystéine et à la L-Cystéine + Alexa Fluor 405 respectivement à $t = 4$ h. A noter ici que des expériences dans des conditions similaires ont été réalisées sur des échantillons synthétisés à la concentration de $80 C_0$, et ont donné des résultats analogues (passage de $(13,54 \pm 3,45)$ kPa à $(0,894 \pm 0,227)$ kPa après 4 h d'exposition à des nanoparticules d'or fonctionnalisées au MHDA).

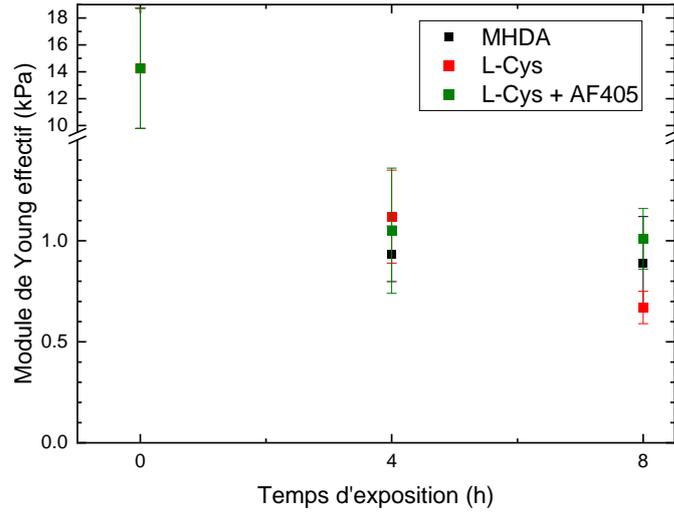


Figure 3.10 : Modules élastiques d'échantillons exposés à des nanoparticules d'or fonctionnalisées après divers temps d'exposition pour les cellules épithéliales (moyenne sur 9 feuilles et 27 cellules).

Lorsque les feuilles sont exposées aux nanoparticules d'or pendant une durée de 4 h et 8 h, le module de Young effectif moyen des cellules épithéliales et des tooth cells diminue donc nettement en comparaison de celui des mêmes types de cellules sur les échantillons de référence. Ceci est valable quelle que soit la fonctionnalisation des nanoparticules.

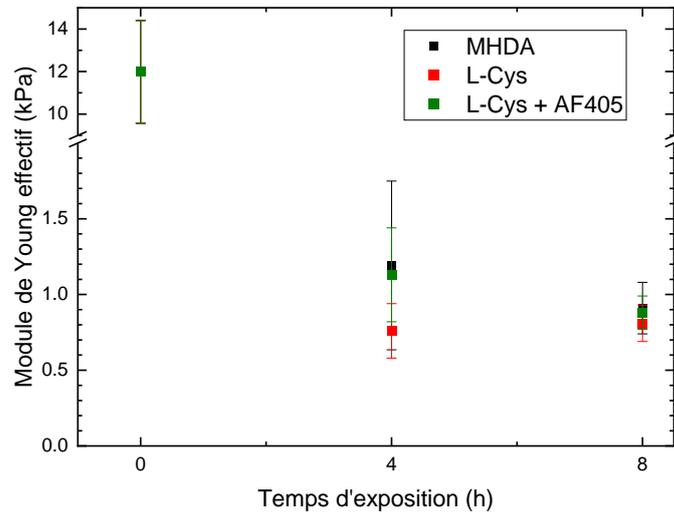


Figure 3.11 : Modules élastiques d'échantillons exposés à des nanoparticules d'or fonctionnalisées après divers temps d'exposition pour les tooth cells (moyenne sur 9 feuilles et 27 cellules).

En ce qui concerne les idioblastes, nous constatons sur la Figure 3.12 une évolution différente du module de Young effectif : la rigidité de ces cellules ne semble pas ou peu impactée par la présence des nanoparticules d'or fonctionnalisées. Là où les autres cellules subissent une baisse d'un facteur quasiment égal à 10 de leur module de Young effectif, les idioblastes, en moyenne, ne subissent pas d'évolution majeure, quelle que soit la fonctionnalisation utilisée. Peut-être est-ce dû à leur composition différente : les idioblastes ne contiennent pas de chloroplastes contrairement aux tooth cells et aux cellules épithéliales. Leur fonction est aussi très différente : ce sont des cellules de défense, comme présenté dans le Chapitre 1.

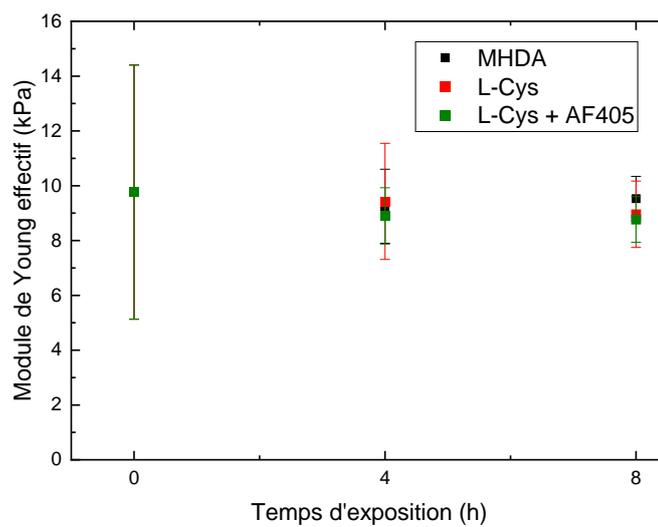


Figure 3.12 : Modules élastiques d'échantillons exposés à des nanoparticules d'or fonctionnalisées après divers temps d'exposition pour les idioblastes (moyenne sur 9 feuilles et 27 cellules).

Des mesures à des temps plus longs (une semaine) montrent que le module de Young effectif E^* ne varie quasiment plus après 8 h d'exposition. A noter que ceci n'est pas dû à une limite de détection de l'instrument.

Afin d'étudier plus en détail l'évolution de la rigidité des cellules durant les premières heures d'exposition, et donc de travailler sur la cinétique, nous avons réalisé des mesures de suivi en temps des propriétés mécaniques des cellules par AFM lors de l'exposition aux nanoparticules. Ces mesures de suivi ont été réalisées sur tous les types de cellules présents à la surface des feuilles d'*Egeria Densa*.

3.2.2. Suivi en temps - étude cinétique

3.2.2.1. Procédure expérimentale des prises de mesure

Pour mener à bien cette étude, la préparation de l'échantillon, ainsi que l'immersion du levier et la phase de calibration ont été effectuées avec des feuilles non

exposées à des nanoparticules d'or. Nous avons ensuite ajouté un volume adéquat de la suspension de nanoparticules d'or directement dans le volume de 3 mL d'eau contenu dans la boîte de Pétri. Ensuite, à des intervalles très courts (toutes les minutes pendant les 10 premières minutes, puis toutes les 5 minutes jusqu'à une durée de 4 heures, puis enfin tous les quarts d'heure jusqu'à la fin de l'expérience), nous avons collecté des cartographies de force. En raison de ces intervalles de temps courts (une minute), nous avons dû ajuster la quantité de mesures enregistrées pour une cartographie ; par conséquent, les cartographies ont une taille de 2 x 2 pixels pour les dix premières minutes, et de 4 x 4 pixels par la suite. Par la suite, les valeurs mesurées ont été moyennées cellule par cellule afin de bâtir une étude statistique.

La Figure 3.13 présente l'évolution des valeurs du module de Young effectif calculé à l'aide du modèle de Hertz pour des échantillons de référence (non exposés aux particules d'or fonctionnalisées). Le module de Young évolue peu, fluctuant entre $(10,39 \pm 1,12)$ kPa et $(17,32 \pm 2,91)$ kPa pour les cellules épithéliales, $(12,32 \pm 0,710)$ kPa et $(16,06 \pm 0,683)$ kPa pour les tooth cells, et $(13,75 \pm 0,624)$ kPa et $(16,10 \pm 0,811)$ kPa pour les idioblastes.

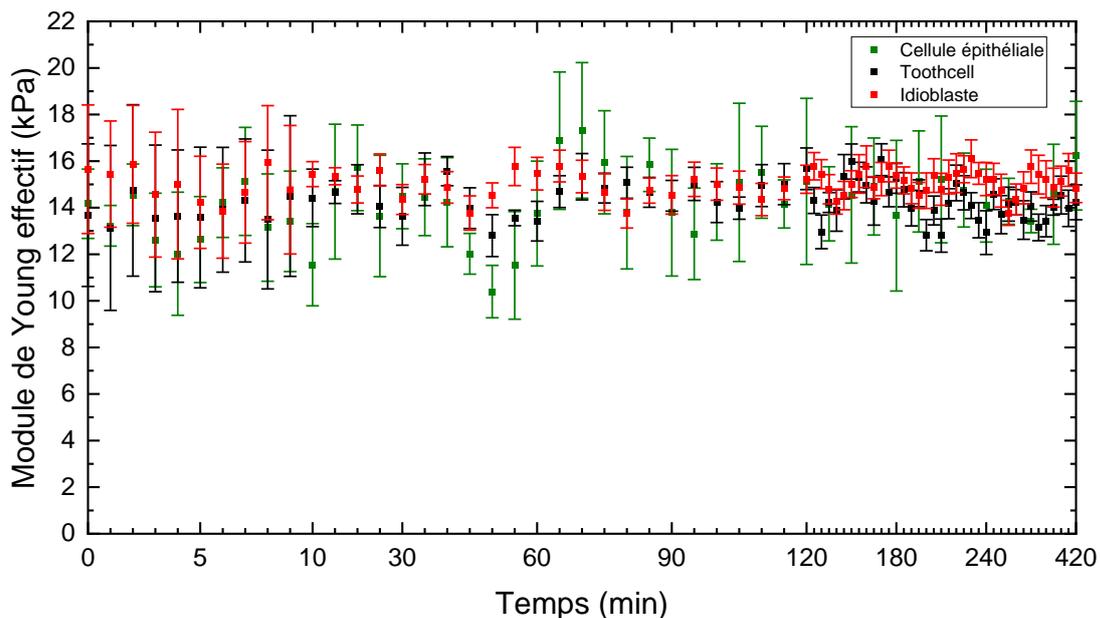


Figure 3.13 : Evolution du module de Young en fonction du temps pour un échantillon de référence, non exposé à des nanoparticules d'or selon le type de cellules.

3.2.2.2. Etude cinétique

Le premier résultat dont nous allons discuter est présenté sur la Figure 3.14. Nous pouvons y voir les valeurs des modules de Young déterminées en fonction du temps sur une cellule épithéliale exposée à $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$ de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec

la L-Cystéine (points noirs). Les valeurs des modules de Young pour une cellule épithéliale non exposée est rajoutée à titre de comparaison (points verts). Nous constatons une diminution progressive du module de Young effectif sur la première heure d'exposition, avant que celui-ci n'atteigne un plateau.

Encore une fois, le même type de mesures réalisé sur des nanoparticules synthétisées à $80 C_0$ a donné des résultats très similaires, la diminution étant du même ordre et la cinétique équivalente aux mêmes concentrations ($(12,29 \pm 0,381)$ kPa à $t = 0$ s et baisse jusqu'à $(0,981 \pm 0,148)$ kPa à $t = 70$ min pour l'échantillon $40 C_0$ fonctionnalisé à la L-Cystéine avec une concentration d'exposition de $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$, et $(13,01 \pm 0,178)$ kPa à $t = 0$ s pour une baisse jusqu'à $(0,876 \pm 0,117)$ kPa à $t = 60$ min pour l'échantillon $80 C_0$ avec les mêmes conditions expérimentales.

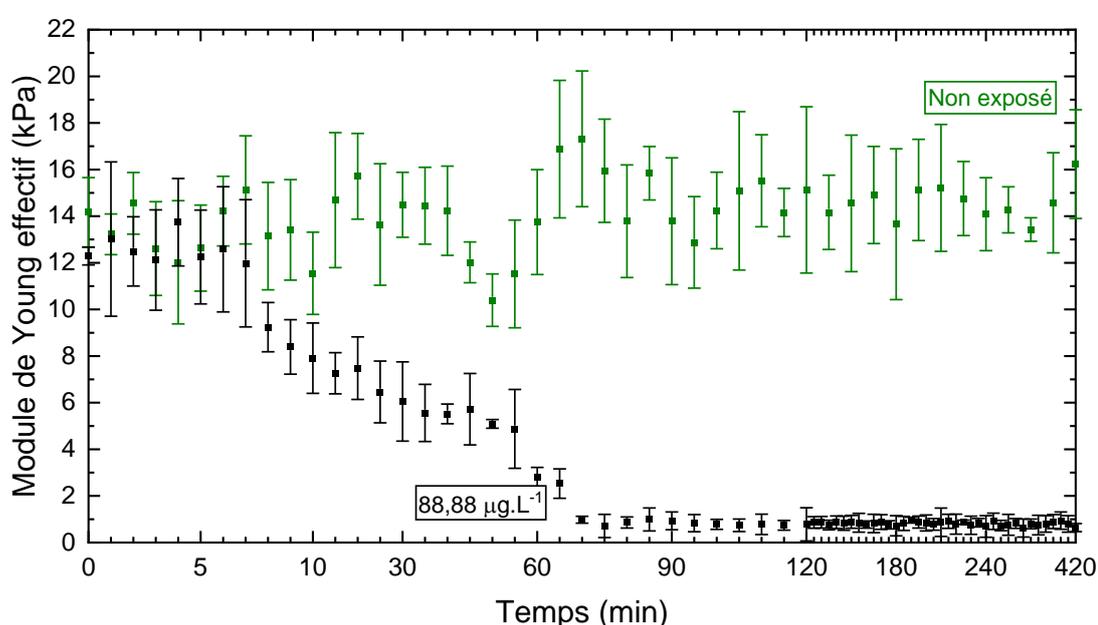


Figure 3.14 : Evolution du module de Young en fonction du temps pour un échantillon de référence (points verts) et un échantillon exposé à des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de la L-Cystéine avec une concentration d'exposition de $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$ (points noirs) lors d'une expérience de suivi en temps par AFM.

Afin d'approfondir ce premier résultat, nous avons de nouveau fait varier tous les paramètres (concentration d'exposition, type de cellule, type de fonctionnalisation, ...), en étudiant dans chaque cas l'évolution de la rigidité en fonction du temps.

Commençons par le type de fonctionnalisation des nanoparticules d'or. Sur la Figure 3.15, nous voyons l'évolution du module élastique effectif en fonction du temps selon la molécule utilisée pour la fonctionnalisation, à concentration d'exposition égale ($88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$). Il ressort de cette figure que les nanoparticules fonctionnalisées avec le

MHDA, la L-Cystéine et l'ensemble L-Cystéine – Alexa Fluor 405 provoquent toutes un assouplissement de la paroi cellulaire.

Tout d'abord, pour les nanoparticules d'or fonctionnalisées au MHDA, le module élastique effectif est stable ($E^* = (14,96 \pm 1,26)$ kPa en moyenne) durant les 20 premières minutes d'exposition, puis diminue lentement pour atteindre un plateau ($E^* = (2,78 \pm 0,414)$ kPa) au bout de 135 min. La diminution est donc d'un facteur 5. Ensuite, pour une fonctionnalisation à la L-Cystéine, le module élastique effectif est stable ($E^* = (12,56 \pm 0,416)$ kPa) durant les 7 premières minutes d'exposition, puis diminue pour atteindre un plateau ($E^* = 0,818 \pm 0,0669$ kPa) au bout de 70 min. La diminution est donc d'un facteur 15. Enfin, pour L-Cys + Alexa Fluor 405, le module élastique effectif est stable ($E^* = (13,44 \pm 1,02)$ kPa) durant les 6 premières minutes d'exposition, puis diminue pour atteindre un plateau ($E^* = (1,32 \pm 0,601)$ kPa) au bout de 80 minutes. La diminution est donc d'un facteur 10.

A noter que sur la Figure 3.15, les zones situées entre 150 et 180 min ne contenant aucune donnée s'expliquent par le fait que les mesures ne sont pas automatiques mais nécessitent une présence près de l'appareil. Aussi, il nous a été difficile de réaliser ces mesures de façon continue.

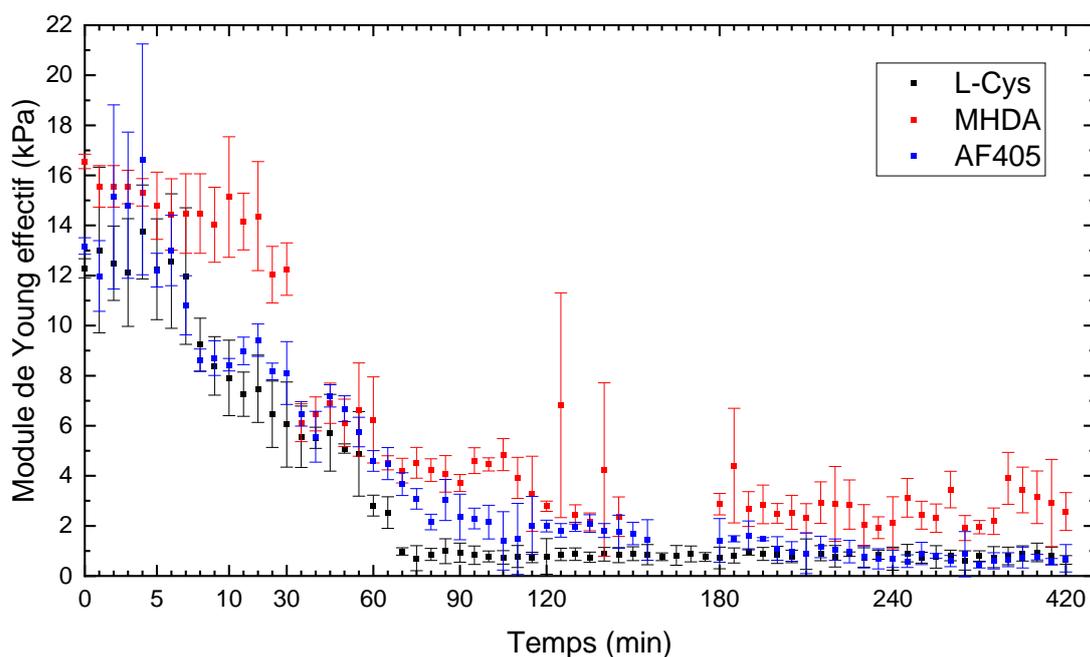


Figure 3.15 : Evolution du module de Young en fonction du temps pour un échantillon d'Egeria Densa exposé à des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec chacune des trois molécules testées au cours d'une expérience de suivi par AFM. Concentration massique en nanoparticules d'or fonctionnalisées de $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Ainsi, le type de fonctionnalisation a une incidence sur la cinétique de diminution du module élastique effectif, tandis que le facteur de diminution reste quant à lui proche pour les trois molécules utilisées.

Pour expliquer cela, nous pouvons nous intéresser aux charges des différentes molécules utilisées lors de la fonctionnalisation. Le MHDA est chargé négativement, alors que la L-Cystéine est chargée positivement, et quant à la fonctionnalisation L-Cystéine et Alexa Fluor 405, elle est également chargée positivement, mais la charge totale est inférieure à celle de la L-Cystéine. Ainsi, l'internalisation dans les plantes, dont la paroi est négativement chargée, est plus favorable aux nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de la L-Cystéine, ce que l'on semble bien retrouver[26]. De plus, nous pouvons avoir des phénomènes d'agrégation des suspensions de nanoparticules d'or qui sont dépendantes de leur fonctionnalisation. Ces phénomènes d'agrégation, plus visibles pour une fonctionnalisation au MHDA, peuvent également expliquer les différentes cinétiques observées.

Par la suite, nous avons réalisé le même type de suivi sur les différents types de cellule d'*Egeria Densa*, les cellules épithéliales, les idioblastes et les tooth cells. Les résultats sont reportés sur la Figure 3.16. Nous voyons que la rigidité des tooth cells évolue de manière analogue à celle des cellules épithéliales. Ce n'est pas surprenant, car en termes de composition cellulaire, les tooth cells et les cellules épithéliales sont extrêmement proches, comme expliqué dans le Chapitre 1. En revanche, nous retrouvons le résultat précédent (Figure 3.12) concernant le comportement des idioblastes. En effet, les modules élastiques effectifs passent d'une valeur initiale de $(15,55 \pm 1,80)$ kPa à $t = 0$ min à une valeur finale de $(10,86 \pm 1,90)$ kPa à $t = 420$ min, soit une diminution de seulement 30,16 % ; nous sommes donc bien loin de la diminution de 94,7 % observée pour les deux autres types de cellules.

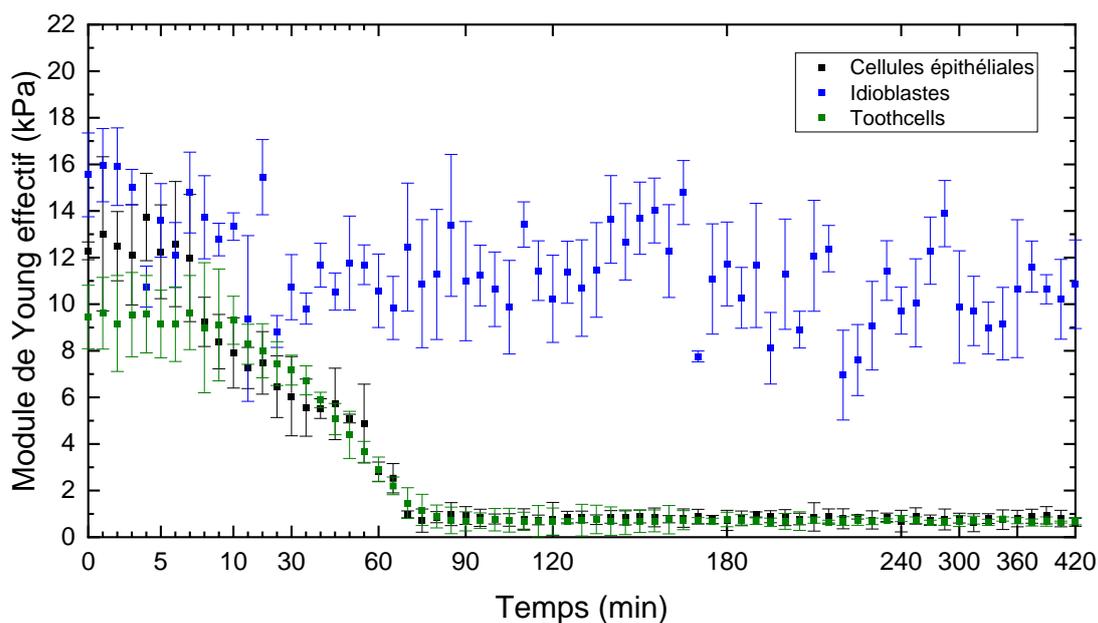


Figure 3.16 : Evolution du module de Young effectif en fonction du temps pour chacun des trois types de cellules. Les échantillons ont été exposés à une concentration de $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$ en nanoparticules d'or fonctionnalisées à la L-Cystéine.

Enfin, le dernier paramètre que nous avons fait varier, et qui s'est avéré être celui ayant l'impact le plus net est la concentration massique de nanoparticules d'or à laquelle ont été exposés nos échantillons d'*Egeria Densa*. En effet, si nous savons qu'une concentration trop importante aboutit à des dégradations visibles de la plante, la question est alors de savoir comment sont modifiées les propriétés mécaniques des cellules exposées à des concentrations de nanoparticules d'or très faibles ? Les évolutions du module élastique effectif en fonction du temps d'exposition aux nanoparticules sont donc montrées sur la Figure 3.17 pour différentes concentrations massiques en nanoparticules fonctionnalisées par la L-Cystéine.

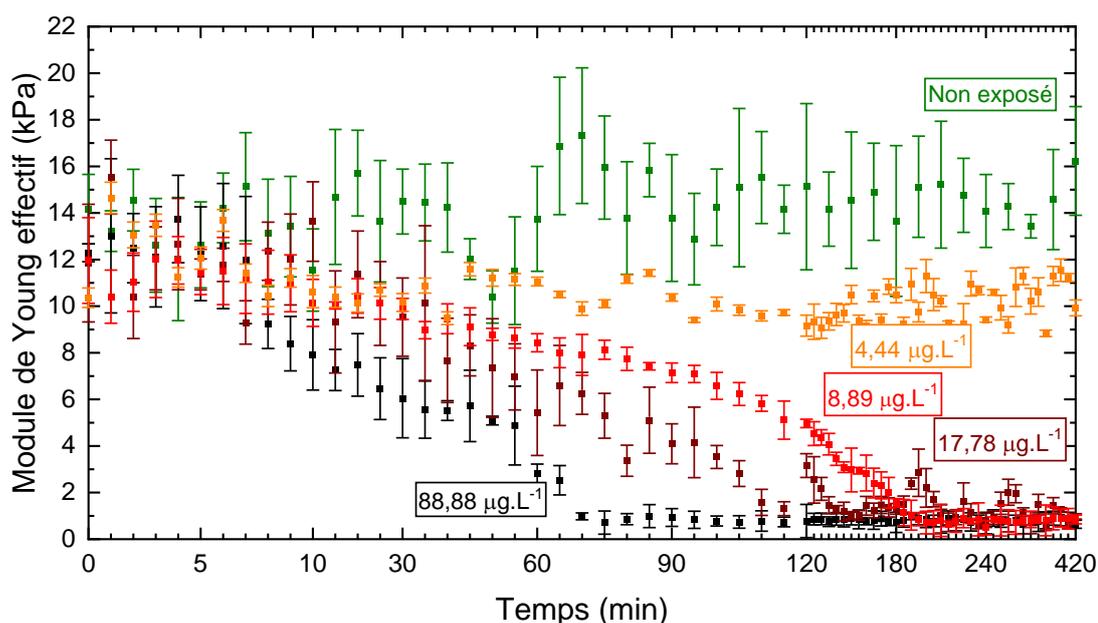


Figure 3.17 : Impact de la concentration d'exposition en nanoparticules d'or fonctionnalisées à la L-Cystéine sur la cinétique de l'assouplissement observé sur des cellules épithéliales.

Nous pouvons voir sur la Figure 3.17 que la cinétique de l'assouplissement que subit la paroi cellulaire est directement dépendante de la concentration massique de nanoparticules à laquelle les échantillons sont exposés. En effet, nous observons que le palier bas est atteint au bout de $t = 75$ min pour une concentration de $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$ (symboles noirs), de $t = 115$ min pour une dose de $17,78 \mu\text{g.L}^{-1}$ (symboles marrons) et au bout de $t = 200$ min pour une concentration de $8,89 \mu\text{g.L}^{-1}$ (symboles rouges) soit, en première approximation, au bout de respectivement une, deux, et trois heures. Pour une concentration de $4,44 \mu\text{g.L}^{-1}$ (symboles oranges), nous observons une très faible diminution de la rigidité, qui passe ainsi de $(10,36 \pm 0,416)$ kPa à $t = 0$ s à $(9,92 \pm 0,341)$ kPa à $t = 420$ minutes. Dans le cas des autres fonctionnalisations, nous n'avons pas observé de différences, l'impact de la concentration d'exposition (sans la concentration de $17,78 \mu\text{g.L}^{-1}$, qui n'a été testée que pour la fonctionnalisation à la L-Cystéine) sur la cinétique de l'assouplissement étant le même. Dans la littérature, aucun signe de toxicité n'est observé pour des concentrations de l'ordre de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$, comme mentionné précédemment. Ainsi, pour des concentrations plus faibles, nous pouvons être convaincus que nous sommes bien à des concentrations non cytotoxiques.

Des mesures similaires de suivi en temps ont été réalisées sur des cellules épithéliales d'*Egeria Densa* dans le cas des molécules seules, afin de confirmer que l'assouplissement est bien dû à la présence des nanoparticules d'or, et non pas uniquement à celle des molécules. Pour cela, un volume de $20 \mu\text{L}$ de chaque solution de fonctionnalisation a été ajouté dans les 3 mL dans lesquels sont effectuées les mesures. Les résultats, présentés sur la Figure 3.18, montrent qu'un léger assouplissement est

observé, mais dont l'ampleur est bien moins importante que ce qui est visible avec l'or sur la Figure 3.15. En effet, une feuille exposée au MHDA seul subit une diminution de $(13,45 \pm 3,01)$ kPa à $t = 0$ s jusqu'à $(10,44 \pm 0,633)$ kPa à $t = 420$ min. De même, les mesures sur L-Cystéine seule montrent une diminution de $(13,74 \pm 3,11)$ kPa à $t = 0$ s jusqu'à $(6,32 \pm 0,717)$ kPa à $t = 420$ min et le mélange L-Cystéine et Alexa Fluor 405 subit quant à lui une baisse de $(14,23 \pm 3,21)$ kPa à $t = 0$ s jusqu'à $(9,14 \pm 0,774)$ kPa à $t = 420$ min. Il est également utile de préciser que, sur une durée d'une heure (ce qui correspond à la durée au bout de laquelle le palier est atteint pour les mesures réalisées avec particules), les valeurs ne diminuent presque pas : la baisse la plus importante, due à la L-Cystéine, est d'environ 10 % (passage d'environ 10 kPa à 9 kPa). Nous sommes donc très loin de la diminution d'un facteur 10 observée avec les particules. Enfin, nous pouvons aussi constater qu'au bout de 7 h, le palier n'est toujours pas atteint. Toutefois, l'ordre d'assouplissement observé, avec un impact plus important de la L-Cystéine par rapport aux autres molécules, est le même que celui présenté sur la Figure 3.15, ce qui confirme l'importance de la charge des molécules utilisées pour la fonctionnalisation. Nous voyons donc que la diminution du module de Young d'un ordre de grandeur est bien due à la présence de particules et pas simplement à celle des molécules, d'autant que la concentration en molécules est ici plus importante que lors des expériences avec les nanoparticules d'or fonctionnalisées.

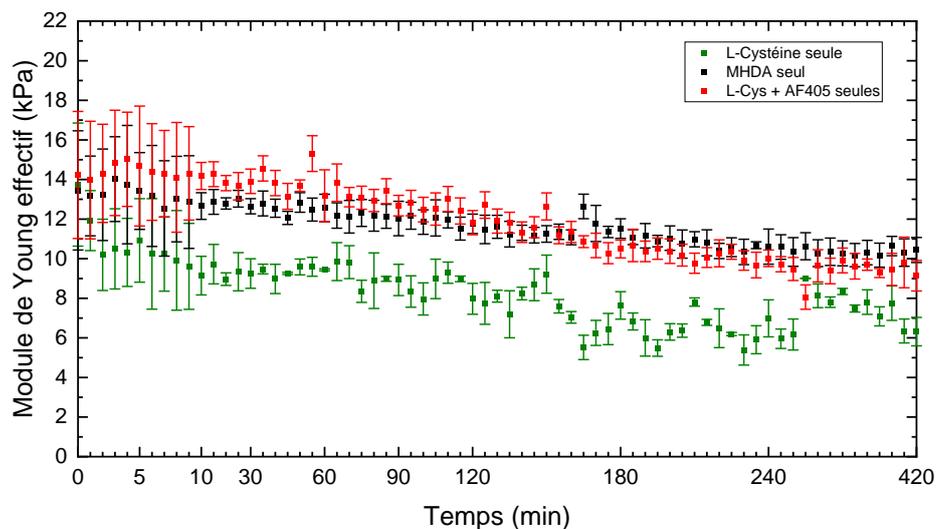


Figure 3.18 : Impact de la présence de molécules de fonctionnalisation sur le module de Young de cellules épithéliales d'*Egeria Densa*.

En conclusion de ce paragraphe, nous observons un impact très net de la présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées sur les propriétés mécaniques de la surface des cellules de la plante *Egeria Densa*.

- Pour les cellules épithéliales et les tooth cells :
 - Nous observons un net assouplissement de la paroi végétale (dans les expériences décrites, l'indentation est inférieure à 250 nm, ceci indique que nous sondons uniquement la paroi végétale des cellules). Au vu des dimensions des nanoparticules (de l'ordre de 20-30 nm pour les

concentrations utilisées, avec une majorité d'icosaèdres, donc des petites structures), les particules peuvent tout à fait avoir été internalisées, et provoquer directement ou indirectement cet assouplissement.

- Le module élastique effectif E^* diminue d'un facteur 10 au bout d'un certain temps d'exposition dépendant de la concentration massique des nanoparticules mises en contact, de leur type de fonctionnalisation.
- La concentration de $4,44 \mu\text{g.L}^{-1}$ est suffisamment faible pour ne pas induire de changement important du comportement mécanique de la surface de la paroi des cellules.

- Pour les idioblastes :

- Aucune modification importante de E^* n'a été observée au cours des expériences menées.

L'assouplissement de la paroi végétale pourrait avoir plusieurs origines. D'une part, d'un point de vue physique, nous pouvons envisager un élargissement des pores et/ou un changement d'épaisseur de la paroi. D'autre part, des liaisons chimiques pourraient être rompues suite à la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (noté ROS en anglais pour Reactive Oxygen Species)[27][28].

3.2.2.3. Fluctuations du module élastique effectif E^*

Nous pouvons remarquer sur les graphes présentés sur les figures allant de la Figure 3.13 à la Figure 3.17 que la valeur du module élastique effectif de la paroi des différentes cellules des feuilles fluctue au cours du temps, que les feuilles soient ou non exposées à des nanoparticules fonctionnalisées. Pour une meilleure visibilité de cet effet, une partie des données des Figure 3.14 et Figure 3.17 est à nouveau présentée sur la Figure 3.19. Nous pouvons y voir les valeurs de E^* (Figure 3.19a) ainsi que l'histogramme des amplitudes calculées (Figure 3.19b) pour une cellule épithéliale non exposée à des nanoparticules. De manière analogue, la Figure 3.19 (c et e) montre les valeurs de E^* pour une cellule épithéliale exposée à une concentration massique de nanoparticules de $88.88 \mu\text{g.L}^{-1}$ et de $4,44 \mu\text{g.L}^{-1}$ respectivement. Les histogrammes des amplitudes correspondant à chacun des deux cas sont eux montrés sur la Figure 3.19 (d et f). Les amplitudes A sont calculées à partir de la formule suivante :

$$A = \frac{E_{max}^* - E_{min}^*}{2},$$
 avec E_{max}^* la valeur mesurée maximale de E^* et E_{min}^* la valeur mesurée minimale de E^* sur une période.

Sur la Figure 3.19 (a, c et e), nous pouvons clairement observer des oscillations de E^* autour d'une valeur moyenne. En analysant précisément les mesures, nous avons pu

déterminer que les oscillations de E^* étaient périodiques avec une période moyenne T_m de $(28,5 \pm 5,8)$ minutes.

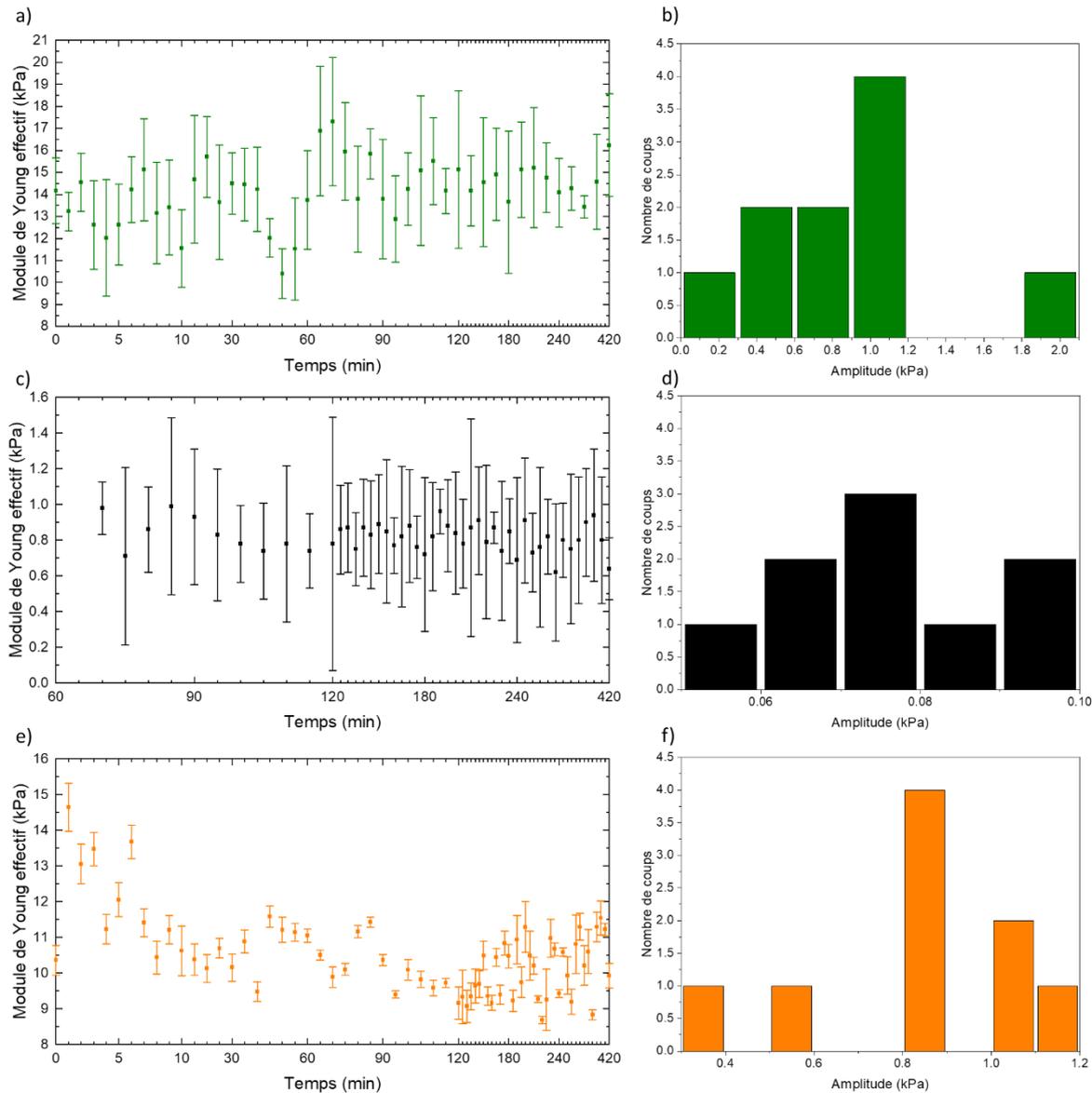


Figure 3.19 : Valeurs de E^* en fonction du temps pour une cellule épithéliale a) non exposée à des nanoparticules, b) et c) exposée respectivement à une concentration massique de $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$ et de $4,44 \mu\text{g.L}^{-1}$. Les histogrammes montrant les amplitudes des oscillations de E^* correspondant aux données de a), c) et e) sont reportés en b), d) et f) respectivement.

Les amplitudes moyennes A_m calculées à partir des données de la Figure 3.19 sont présentées dans le Tableau 3.3, ainsi que le pourcentage de variation du module élastique effectif, donné par la relation $\% = \frac{A_m}{E_m^*} \times 100$.

Conditions	Amplitude moyenne A_m (en kPa)	Pourcentage de fluctuations moyen
Cellules non exposées (vert)	(0,894 ± 0,336) kPa	(6,10 ± 2,22) %
Cellules exposées à 88,88 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de nanoparticules fonctionnalisées avec de la L-Cystéine (noir)	(0,073 ± 0,009) kPa	(8,68 ± 0,97) %
Cellules exposées à 4,44 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de nanoparticules fonctionnalisées avec de la L-Cystéine (orange)	(0,818 ± 0,170) kPa	(8,05 ± 1,66) %

Tableau 3.3 : Récapitulatif des amplitudes et des pourcentages de fluctuations moyens pour des cellules non exposées et exposées à des nanoparticules d'or fonctionnalisées à la L-Cystéine (concentrations d'exposition de 88,88 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et 4,44 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

Nous constatons que le pourcentage de variation de E^* est constamment situé entre 6 % et 9 %. Les oscillations de E^* au cours du temps sont observables sur l'ensemble des mesures et quelles que soient les conditions expérimentales. A l'heure actuelle, nous n'en connaissons pas l'origine, mais, nous pouvons affirmer qu'elles ne sont pas dues à la présence des particules d'or puisqu'elles sont également observées pour les échantillons non exposés.

3.2.3. Propriétés mécaniques des cellules après une phase d'exposition à des nanoparticules d'or fonctionnalisées

Après avoir étudié les modifications mécaniques que subit *Egeria Densa* lors d'une exposition à des nanoparticules, nous nous sommes intéressés à ce qu'il se passait lorsque la plante n'est plus exposée aux nanoparticules, pour savoir si la diminution du module élastique effectif est permanente. Afin de répondre à ces questions, nous avons réalisé une première série d'expériences supplémentaires dans lesquelles :

- D'une part, nous avons effectué des mesures d'indentation de suivi en temps comme précédemment décrit.
- D'autre part, en parallèle, dans un tube de centrifugation contenant une branche du même plant d'*Egeria Densa* plongé dans de l'eau distillée, nous avons ajouté la même solution de nanoparticules d'or que celle utilisée dans l'expérience se déroulant en simultané. De cette manière, les deux échantillons, celui sondé en AFM et celui dans le tube sont exposés à la même dose des mêmes nanoparticules d'or fonctionnalisées pendant exactement la même durée. Quand l'expérience de suivi est arrivée à son

terme, le second échantillon est sorti du tube et est plongé à plusieurs reprises dans un autre tube contenant uniquement de l'eau distillée. Nous préparons de la manière la plus efficace possible un échantillon avec la plante qui a été rincée, et nous poursuivons par des mesures d'indentation de suivi temporel par AFM avec ce nouvel échantillon.

Cette procédure permet de travailler avec le même plant et avec la même concentration de nanoparticules d'or. Ainsi, les mesures sur les deux échantillons sont corrélées. Certes, les mesures ne sont pas réalisées sur la même cellule, et le temps de préparer le second échantillon et d'immerger de nouveau la pointe, quelques points de mesure sont inévitablement perdus. La Figure 3.20 présente les évolutions du module de Young de cellules épithéliales en fonction du temps et pour deux concentrations massiques en nanoparticules fonctionnalisées avec de la L-Cystéine ($88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$ et $8,89 \mu\text{g.L}^{-1}$), obtenues avec la procédure expérimentale décrite ci-dessus.

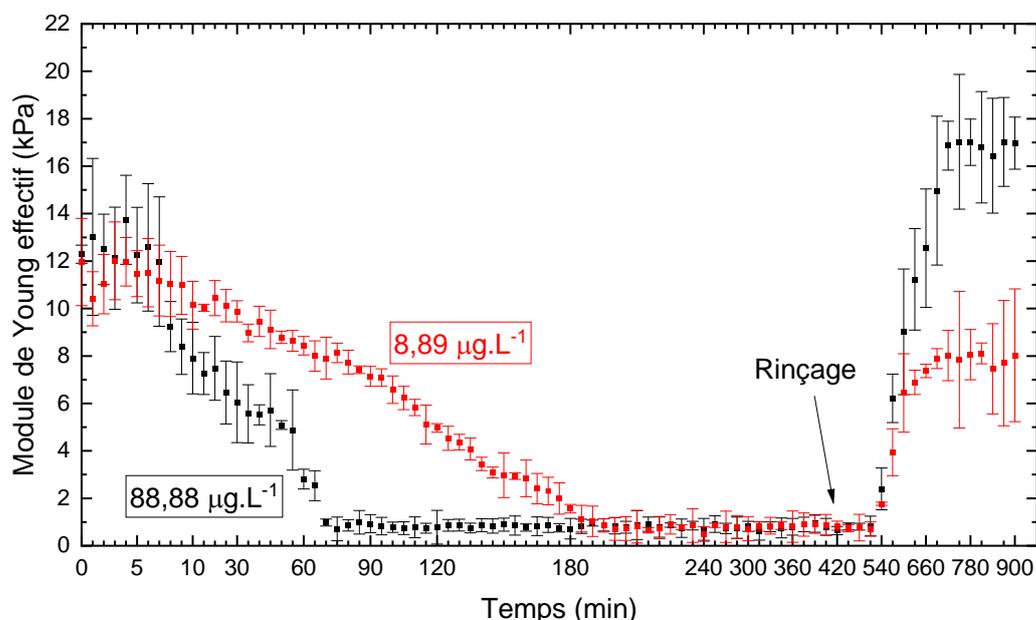


Figure 3.20 : Evolution du module de Young effectif de cellules épithéliales de feuilles d'Egeria Densa exposées à des nanoparticules d'or fonctionnalisées à la L-Cystéine avant et après l'étape de rinçage lors de deux expériences couplées de suivi en temps par AFM. L'instant correspondant à l'étape de rinçage est indiqué par une flèche noire ($t = 420$ minutes). Cet instant correspond également au changement d'échantillon.

Nous observons une diminution du module de Young effectif lors de l'exposition aux nanoparticules sur une durée qui dépend de la concentration massique en nanoparticules, conformément aux observations déjà faites précédemment. Le module de Young effectif se stabilise autour de la valeur de $0,8 \text{ kPa}$ pour les deux concentrations massiques. Une fois le changement de solution effectuée (étape de rinçage) et au bout de 2 h environ, le module de Young commence à ré-augmenter (abscisse $t = 540$ min) pour

se stabiliser à une valeur stable 2 heures après ($t = 660 \text{ min}$). De plus, nous pouvons constater que l'augmentation de E^* s'effectue avec la même cinétique pour les deux concentrations massiques. En fin d'expérience ($t = 900 \text{ min}$), le module de Young effectif de l'échantillon exposé à une dose de $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$ atteint une valeur de $(16,97 \pm 1,10) \text{ kPa}$ (correspondant à 138 % de sa valeur initiale) et celui exposé à une dose de $8,89 \mu\text{g.L}^{-1}$ une valeur de $(8,03 \pm 2,80)$ (correspondant à 67 % de sa valeur initiale).

Pour s'assurer que l'augmentation du module de Young effectif observée soit bien due au rinçage en lui-même, et pas au changement de cellule sondée, nous avons mis en place une nouvelle procédure et réalisé une expérience d'indentation sur une seule et même cellule épithéliale, exposée d'abord à des nanoparticules, puis après rinçage. Pour cela, nous avons creusé des entailles sur les bords des boîtes de Pétri. Ces entailles ont permis d'insérer deux petits tuyaux en son sein. A l'extrémité de ces tuyaux, nous avons fixé deux embouts de pipette. Ces embouts ont servi à ajouter et à pomper de l'eau distillée. De cette manière, l'eau peut être ajoutée et retirée de la boîte de Pétri sans avoir besoin de sortir le levier de l'eau et sans changer de cellule analysée. Le dispositif expérimental est présenté sur la Figure 3.21.

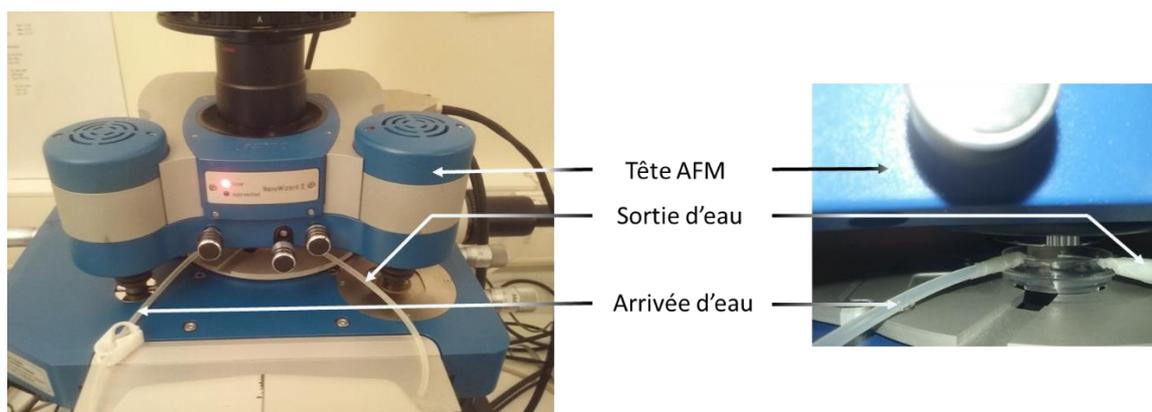


Figure 3.21 : Photographie du dispositif expérimental utilisé pour le suivi de l'impact de la présence de nanoparticules d'or et de l'impact du rinçage sur une unique cellule.

Au démarrage de l'expérience, les nanoparticules d'or fonctionnalisées sont insérées dans le milieu et les mesures d'indentation par AFM sont réalisées durant les 180 premières minutes, puis une grande quantité d'eau contenue dans la boîte de Pétri est aspirée tout en veillant à ce que la pointe reste immergée et que l'échantillon reste hydraté. Un volume d'eau équivalent sans nanoparticules est alors introduit dans la boîte de Pétri. Cette étape est répétée ensuite quatre fois. A l'issue de ces étapes de rinçage, nous pouvons procéder aux mesures d'indentation sur la cellule maintenant non exposée à des nanoparticules.

Les résultats d'une expérience sur une cellule épithéliale sont montrés sur la Figure 3.22. La concentration massique de nanoparticules d'or fonctionnalisées à la L-Cystéine utilisée lors de l'expérience, $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$, a été choisie pour permettre la réalisation de

celle-ci. En effet, sa durée totale a été de 9 heures et demie, et il nous fallait choisir une concentration permettant d'atteindre un palier le plus rapidement possible.

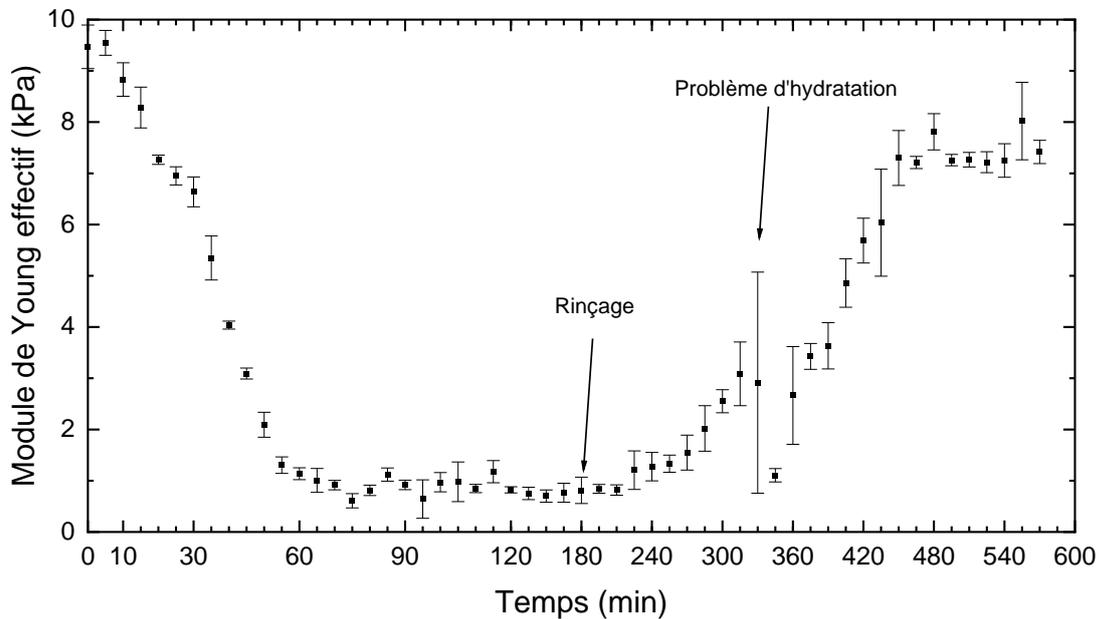


Figure 3.22 : Evolution du module de Young effectif moyen en fonction du temps lors de l'expérience de suivi de l'impact du rinçage sur une unique cellule épithéliale par AFM.

L'évolution des valeurs de E^* au cours du temps est la même que lors des expériences précédentes. Ainsi, le module élastique, d'une valeur initiale de $(9,47 \pm 0,42)$ kPa à $t = 0$ min diminue au cours de la première heure d'exposition aux nanoparticules avant d'atteindre la valeur de $(1,14 \pm 0,12)$ kPa à $t = 60$ min, soit une diminution d'un facteur supérieur à 8. Notons que la cinétique de diminution de E^* est conforme aux expériences précédentes. Les valeurs de E^* restent alors stable tant que l'échantillon est exposé aux nanoparticules (jusqu'à $t = 180$ min). Nous avons procédé au rinçage après 3 h d'exposition aux nanoparticules. Durant la première demi-heure post-rinçage, nous n'avons pas observé d'évolution significative de E^* , les valeurs variant entre $(0,813 \pm 0,258)$ kPa et $(0,842 \pm 0,085)$ kPa sur l'intervalle temporel allant de $t = 180$ min à $t = 210$ min. En revanche, à partir de cet instant, E^* augmente de manière régulière jusqu'à atteindre une valeur de $(7,30 \pm 0,54)$ kPa déterminée pour $t = 450$ min. Par la suite, le module de Young effectif se stabilise entre les valeurs $(7,21 \pm 0,12)$ kPa et $(8,02 \pm 0,76)$ kPa.

A noter que nous observons une chute assez brutale du module de Young effectif entre $t = 315$ min et $t = 360$ min. Cette chute a été provoquée par une diminution de l'eau dans la boîte de Pétri et perturbant l'hydratation de l'échantillon. Ceci a été réglé par un ajout d'eau dans la boîte de Pétri.

Cette expérience confirme donc les résultats des expériences précédentes : lorsque la plante n'est plus exposée aux nanoparticules, les cellules retrouvent peu à peu leur élasticité initiale.

3.3. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons caractérisé les propriétés mécaniques de la paroi végétale constituant les cellules à la surface des feuilles de la plante *Egeria Densa* lorsque des nanoparticules d'or fonctionnalisées sont présentes dans le milieu aquatique. La spectroscopie de force par AFM et l'observation en microscopie optique ont été combinées pour permettre d'enregistrer des courbes de force approche-retrait sur les parois de cellules épithéliales, de tooth cells et d'idioblastes. Nous avons utilisé un levier avec une pointe dont l'extrémité est terminée par une sphère de rayon connu et avons appliqué la procédure standardisée pour les mesures nano-mécaniques en vue de déterminer de manière fiable et précise le module élastique effectif E^* des parois, tout en utilisant le modèle de Hertz.

Nous avons exposé les feuilles à des nanoparticules d'or, de structure et de forme connues, fonctionnalisées avec de l'acide 16-mercaptohexadécanoïque (ou MHDA), de la L-Cystéine et de la L-Cystéine couplée à la molécule Alexa Fluor 405. Les concentrations massiques dans le milieu aqueux ont toutes été inférieures à $100 \mu\text{g.L}^{-1}$. Des mesures ont été réalisées à différents temps d'exposition par prélèvement de l'échantillon biologique à l'instant désiré. Nous avons ainsi montré que l'exposition aux nanoparticules d'or fonctionnalisées entraînait une diminution de la rigidité de la paroi des cellules épithéliales et des tooth cells, pour tous les paramètres que nous avons fait varier. Pour des concentrations massiques en nanoparticules entre $8,89$ et $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$, les valeurs de E^* sont divisées par 10 dans les trois heures qui suivent le début de l'exposition. En revanche, en ce qui concerne les idioblastes, il n'y a pas de modification notable de la rigidité de la paroi. Des mesures de suivi en temps réel ont permis de suivre la diminution du module élastique effectif E^* dans chacun des cas plus précisément. La vitesse à laquelle cette diminution a lieu dépend à la fois de la fonctionnalisation des nanoparticules d'or et de leur concentration massique dans le milieu. Ainsi, E^* diminue plus rapidement dans le cas des nanoparticules fonctionnalisées avec la L-cystéine. La diminution de E^* est enfin plus rapide lorsque la concentration en nanoparticules est plus importante. En effet, sa valeur basse est atteinte au bout d'une heure pour une concentration de $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$, alors qu'elle n'est atteinte qu'au bout d'un temps trois fois plus long (3 heures) pour une concentration dix fois plus faible. Enfin, pour une concentration massique de $4,44 \mu\text{g.L}^{-1}$, E^* diminue très faiblement : il passe de $10,36 \text{ kPa}$ à $9,92 \text{ kPa}$ au bout de 7 heures d'exposition. Lorsque les nanoparticules sont retirées du milieu environnant les plantes, E^* commence à augmenter au bout de 2 heures suivant le renouvellement de l'eau, quelle que soit la concentration massique en nanoparticules, avant de se stabiliser 2 heures après à une valeur proche de celle sans exposition aux nanoparticules. Ceci a également

été confirmé grâce à une expérience sur une seule et même cellule épithéliale d'une même feuille.

Parallèlement à ces mesures, nous avons observé que la rigidité de la paroi végétale des différentes feuilles fluctue périodiquement au cours du temps, qu'elles soient exposées ou non à des nanoparticules d'or fonctionnalisées. Ainsi, la période des oscillations de E^* est de l'ordre de 25 à 30 minutes, et les valeurs de E^* varient de 6 % à 9 %.

Pour finir, après avoir montré qu'une diminution de la rigidité des parois des cellules épithéliales et des tooth cells a lieu en présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées, nous allons dans le Chapitre 4 nous intéresser aux propriétés mécaniques à une profondeur plus importante que celle sondée jusque-là. Pour cela, des courbes de force seront enregistrées en appliquant des forces plus importantes sur les échantillons (de l'ordre de 1 nN), ce qui nous a conduit à développer localement la technique de tomographie par AFM[29].

3.4. Bibliographie

- [1] J. Yang, W. Cao, Y. Rui, Interactions between nanoparticles and plants: phytotoxicity and defense mechanisms, *Journal of Plant Interactions*. 12 (2017) 158–169. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1310944>.
- [2] I. Moreno-Garrido, Toxicity of silver and gold nanoparticles on marine microalgae, (n.d.) 52.
- [3] M.A. Maurer-Jones, I.L. Gunsolus, C.J. Murphy, C.L. Haynes, Toxicity of Engineered Nanoparticles in the Environment, *Anal. Chem.* 85 (2013) 3036–3049. <https://doi.org/10.1021/ac303636s>.
- [4] R.C. Monica, R. Cremonini, Nanoparticles and higher plants, *Caryologia*. 62 (2009) 161–165. <https://doi.org/10.1080/00087114.2004.10589681>.
- [5] R.K. Selvakesavan, G. Franklin, Nanoparticles Affect the Expression Stability of Housekeeping Genes in Plant Cells, *NSA*. Volume 13 (2020) 77–88. <https://doi.org/10.2147/NSA.S265641>.
- [6] S.A. Zaidi MGH, Impact of Gold Nanoparticles on Physiological and Biochemical Characteristics of Brassica juncea, *J Plant Biochem Physiol*. 02 (2014). <https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000133>.
- [7] H. Vogler, D. Felekis, B.J. Nelson, U. Grossniklaus, Measuring the Mechanical Properties of Plant Cell Walls, (2015) 16.
- [8] H.K. Webb, V.K. Truong, J. Hasan, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Physico-mechanical characterisation of cells using atomic force microscopy — Current research and methodologies, *Journal of Microbiological Methods*. 86 (2011) 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.05.021>.
- [9] A.M. Baro, R.G. Reifengerger, *Atomic Force Microscopy in liquid: Biological applications*, Wiley-VCH, 2012.

- [10] C. Carnovale, G. Bryant, R. Shukla, V. Bansal, Size, shape and surface chemistry of nano-gold dictate its cellular interactions, uptake and toxicity, *Progress in Materials Science*. 83 (2016) 152–190. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2016.04.003>.
- [11] M. Enea, M. Peixoto de Almeida, P. Eaton, D. Dias da Silva, E. Pereira, M.E. Soares, M. de L. Bastos, H. Carmo, A multiparametric study of gold nanoparticles cytotoxicity, internalization and permeability using an *in vitro* model of blood–brain barrier. Influence of size, shape and capping agent, *Nanotoxicology*. 13 (2019) 990–1004. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1621398>.
- [12] J.B. Glenn, S.A. White, S.J. Klaine, Interactions of gold nanoparticles with freshwater aquatic macrophytes are size and species dependent: Interactions of AuNPs with freshwater aquatic plants, *Environmental Toxicology and Chemistry*. 31 (2012) 194–201. <https://doi.org/10.1002/etc.728>.
- [13] G. Zhai, K.S. Walters, D.W. Peate, P.J.J. Alvarez, J.L. Schnoor, Transport of Gold Nanoparticles through Plasmodesmata and Precipitation of Gold Ions in Woody Poplar, *Environ. Sci. Technol. Lett.* 1 (2014) 146–151. <https://doi.org/10.1021/ez400202b>.
- [14] Site Internet Nanotools - Biosphere Au reflex, (2021). <https://www.nanotools.com/products/green-line/nanoindentation/biosphere.html> (accessed August 23, 2021).
- [15] J.E. Sader, I. Larson, P. Mulvaney, L.R. White, Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers, *Review of Scientific Instruments*. 66 (1995) 3789–3798. <https://doi.org/10.1063/1.1145439>.
- [16] H. Schillers, C. Rianna, J. Schäpe, T. Luque, H. Doschke, M. Wälte, J.J. Uriarte, N. Campillo, G.P.A. Michanetzis, J. Bobrowska, A. Dumitru, E.T. Herruzo, S. Bovio, P. Parot, M. Galluzzi, A. Podestà, L. Puricelli, S. Scheuring, Y. Missirlis, R. Garcia, M. Odorico, J.-M. Teulon, F. Lafont, M. Lekka, F. Rico, A. Rigato, J.-L. Pellequer, H. Oberleithner, D. Navajas, M. Radmacher, Standardized Nanomechanical Atomic Force Microscopy Procedure (SNAP) for Measuring Soft and Biological Samples, *Scientific Reports*. 7 (2017) 5117. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05383-0>.
- [17] K.D. Costa, Single-Cell Elastography: Probing for Disease with the Atomic Force Microscope, *Disease Markers*. 19 (2004) 139–154. <https://doi.org/10.1155/2004/482680>.
- [18] C. Kittel, *Introduction to solid state physics*, 8. ed., [repr.], Wiley, Hoboken, NJ, 20.
- [19] JPK Instruments, Nanowizard AFM handbook, version 2.2a, (2012). <https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/jpk/manuf-manuals/handbook-2.2a.pdf> (accessed May 3, 2021).
- [20] A. Zdunek, A. Kurenda, Determination of the Elastic Properties of Tomato Fruit Cells with an Atomic Force Microscope, *Sensors*. 13 (2013) 12175–12191. <https://doi.org/10.3390/s130912175>.
- [21] H. Hertz, On the contact of elastic solids, *J. Reine Angew. Math.* 92 (1881) 156–171.
- [22] Q.S. Li, G.Y.H. Lee, C.N. Ong, C.T. Lim, AFM indentation study of breast cancer cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 374 (2008) 609–613. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.078>.
- [23] S. Sen, S. Subramanian, D.E. Discher, Indentation and Adhesive Probing of a Cell Membrane with AFM: Theoretical Model and Experiments, *Biophysical Journal*. 89 (2005) 3203–3213. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.063826>.

- [24] S.-V. Kontomaris, The Hertz Model in AFM Nanoindentation Experiments: Applications in Biological Samples and Biomaterials, *MNS*. 10 (2018) 11–22. <https://doi.org/10.2174/1876402910666180426114700>.
- [25] E.C. Faria, N. Ma, E. Gazi, P. Gardner, M. Brown, N.W. Clarke, R.D. Snook, Measurement of elastic properties of prostate cancer cells using AFM, *Analyst*. 133 (2008) 1498. <https://doi.org/10.1039/b803355b>.
- [26] F. Schwab, G. Zhai, M. Kern, A. Turner, J.L. Schnoor, M.R. Wiesner, Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants – Critical review, *Nanotoxicology*. 10 (2016) 257–278. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1048326>.
- [27] F. Chen, Z. Xiao, L. Yue, J. Wang, Y. Feng, X. Zhu, Z. Wang, B. Xing, Algae response to engineered nanoparticles: current understanding, mechanisms and implications, *Environ. Sci.: Nano*. 6 (2019) 1026–1042. <https://doi.org/10.1039/C8EN01368C>.
- [28] N. Mallick, F.H. Mohn, Reactive oxygen species: response of algal cells, *Journal of Plant Physiology*. 157 (2000) 183–193. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80189-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80189-3).
- [29] C. Roduit, S. Sekatski, G. Dietler, S. Catsicas, F. Lafont, S. Kasas, Stiffness Tomography by Atomic Force Microscopy, *Biophysical Journal*. 97 (2009) 674–677. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.05.010>.

Chapitre 4

Etude des propriétés mécaniques des cellules des feuilles d'*Egeria Densa* en profondeur

4.1.	Mesures mécaniques hors du régime élastique	114
4.1.2.	Tomographie par AFM	116
4.1.2.	Acquisition et traitement des données.....	117
4.1.3.	Analyse mécanique en profondeur.....	118
4.1.3.1.	Cartographie en z.....	118
4.1.3.2.	Suivi temporel.....	122
4.2.	Signal Raman de cellules végétales.....	123
4.2.1.	Préparation des échantillons biologiques.....	123
4.2.2.	Choix de la longueur d'onde	125
4.2.3.	Déplacement du point focal.....	127
4.2.4.	Spectre Raman de la paroi végétale	127
4.2.5.	Spectre Raman des chloroplastes	129
4.2.6.	Détermination de l'épaisseur des cellules épithéliales.....	131
4.2.7.	Evolution des caractéristiques des signaux Raman de la paroi végétale et des chloroplastes en présence des nanoparticules d'or fonctionnalisées	132
4.2.8.	Localisation des nanoparticules d'or au sein des cellules.....	132
4.3.	Conclusion.....	133
4.4.	Bibliographie	134

Dans le Chapitre 3, les mesures par AFM ont permis de mettre en évidence une nette évolution de la rigidité au niveau de la paroi cellulaire en présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées. Plus particulièrement, la rigidité de la paroi des cellules épithéliales et des tooth cells, présentes à la surface des feuilles d'*Egeria Densa*, diminue d'un facteur 10 environ après une heure d'exposition à des nanoparticules fonctionnalisées avec de la L-Cystéine à une concentration de 88,88 $\mu\text{g.L}^{-1}$. De plus, nous avons observé que la rigidité de la paroi des cellules augmentait de nouveau après une étape de rinçage, pour retrouver une valeur proche de celle qu'elle avait initialement. Toutefois, ces différentes mesures se sont concentrées uniquement sur une épaisseur relativement réduite en raison de la faible force appliquée de 0,3 nN. L'épaisseur indentée avoisine au maximum les 200 nm lorsque l'échantillon a été exposé aux nanoparticules d'or fonctionnalisées pendant 8 h. Seule une partie de la paroi végétale des cellules a donc été sondée.

Lorsque les temps d'exposition sont plus grands, de l'ordre d'une journée ou d'une semaine, ou lorsqu'une force plus importante est appliquée sur la surface de l'échantillon (1 nN dans notre cas), le volume indenté par la pointe va naturellement être lui aussi plus important. Cette augmentation du volume sondé entraîne davantage de précautions à prendre lors de l'analyse des courbes par rapport à ce qui a été présenté dans le Chapitre 3.

Nous allons présenter, dans une première partie de ce chapitre, les mesures par AFM effectuées hors du régime élastique, en présentant, d'une part, la méthode utilisée, appelée tomographie par AFM dans la littérature[1], et, d'autre part, les résultats des mesures effectuées sur des cellules épithéliales exposées ou non à des nanoparticules. Puis, dans une seconde partie du chapitre, nous présenterons les mesures Raman réalisées en focalisant le faisceau sur la paroi végétale et à l'intérieur même des cellules épithéliales.

4.1. Mesures mécaniques hors du régime élastique

La principale différence des mesures présentées dans ce chapitre par rapport aux mesures réalisées auparavant réside dans le changement de régime et, par extension, de la méthode d'analyse. Ici, nous ne nous situons plus dans le régime élastique, et cela va impacter le traitement des données et leur analyse ; en effet, le modèle de Hertz ne s'applique plus, d'une part parce qu'il n'y a clairement pas de relation linéaire entre la contrainte appliquée et la déformation dans le domaine d'indentation[2], et, d'autre part, parce que le volume indenté est supérieur aux 10 % du volume total[3].

Reprenons les courbes de forces collectées sur une cellule épithéliale sans exposition et après 10 min d'exposition à des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de la L-Cystéine, déjà présentées dans le Chapitre 3 (sur la Figure 3.8). Elles sont visibles sur la Figure 4.1. Nous y avons ajouté des courbes enregistrées après une journée et une semaine d'exposition aux mêmes nanoparticules et avec la même concentration massique d'exposition de 88,88 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Nous constatons sans difficulté que l'indentation augmente

drastiquement : environ $1 \mu\text{m}$ pour une journée d'exposition et $4 \mu\text{m}$ pour une semaine d'exposition.

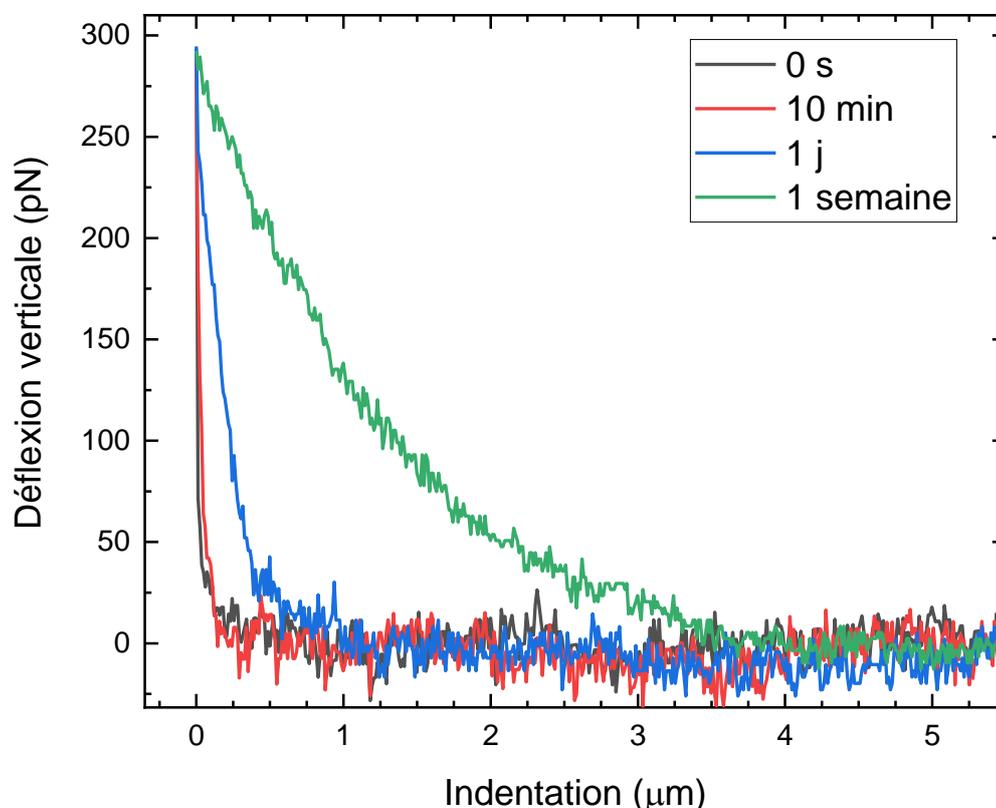


Figure 4.1 : Evolution de l'allure des courbes de forces pour différentes durées d'exposition aux nanoparticules d'or fonctionnalisées à la L-Cystéine et pour une concentration d'exposition de $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Il est parfaitement clair et bien visible sur la courbe à une semaine d'exposition (courbe verte) qu'il n'y a pas de relation linéaire entre la force appliquée et la profondeur d'indentation. De plus, l'épaisseur sondée est supérieure aux 10 % de l'épaisseur de la paroi. La Figure 4.2 montre des images en champ clair obtenues par microscopie électronique en transmission avec le mode d'imagerie filtrée en énergie. Elles ont été enregistrées sur des coupes d'un échantillon enrobé de feuilles d'*Egeria Densa* (la préparation des échantillons, la coupe et l'observation ont été réalisées par Patricia Bertocini). La paroi cellulaire y est visible, et l'intérieur de la cellule a été indiquée par une flèche. L'épaisseur de la paroi cellulaire varie entre 700 nm et 950 nm, ce qui est en accord avec la littérature[4].

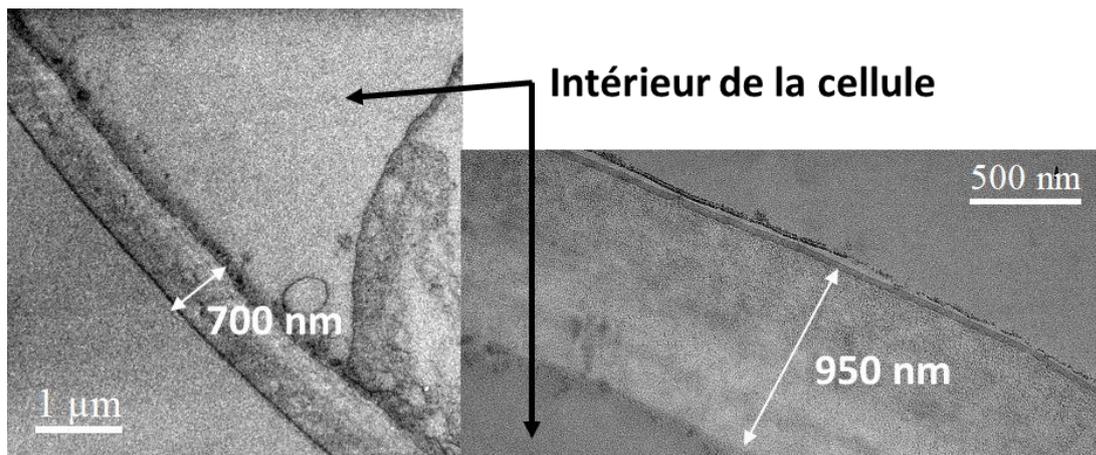


Figure 4.2 : Images en champ clair filtrée en énergie par microscopie électronique en transmission de la paroi de cellules d'*Egeria Densa*.

L'épaisseur sondée par spectroscopie de force AFM est donc bien supérieure à celle de la paroi végétale.

4.1.2. Tomographie par AFM

La tomographie par AFM, développée en 2009 par Roduit et al.[1] pour pouvoir distinguer des structures de différentes rigidités présentes dans le volume d'un échantillon plus massif, est un mode particulier et parfaitement adapté à notre situation. Cette technique a notamment été utilisée avec succès pour bâtir un profil mécanique des feuilles de la plante *Arabidopsis Thaliana*[5], ainsi que pour l'étude de signature nanomécanique de cellules humaines cancéreuses[6], ou encore pour l'étude de cartilages articulaires[7], et présente la particularité d'utiliser l'AFM en vue de réaliser des mesures non destructives en volume[8][9][10][11]. Nous allons commencer par en présenter le principe de mesure et les précautions à prendre pour une exploitation correcte des données obtenues.

La tomographie par AFM permet d'accéder aux propriétés mécaniques d'un échantillon aux différentes profondeurs sondées par la pointe AFM lors de l'indentation. Ce mode d'imagerie est basé sur l'analyse segmentée des courbes de force enregistrées. Ainsi, la pente de chaque segment de courbe est calculée. Illustrons cela par un exemple. Une courbe de force est montrée sur la Figure 4.3. La partie de la courbe correspondant à l'indentation peut être divisée en trois segments. Dans ce cas, il est possible d'associer au segment ①, correspondant aux 95 premiers nanomètres indentés, la valeur de sa pente, et aux segments ② et ③, correspondant à des longueurs de 145 nm et 110 nm respectivement, deux autres valeurs de pente. La même procédure est ensuite appliquée à chaque courbe de force enregistrée dans la cartographie en (X, Y).

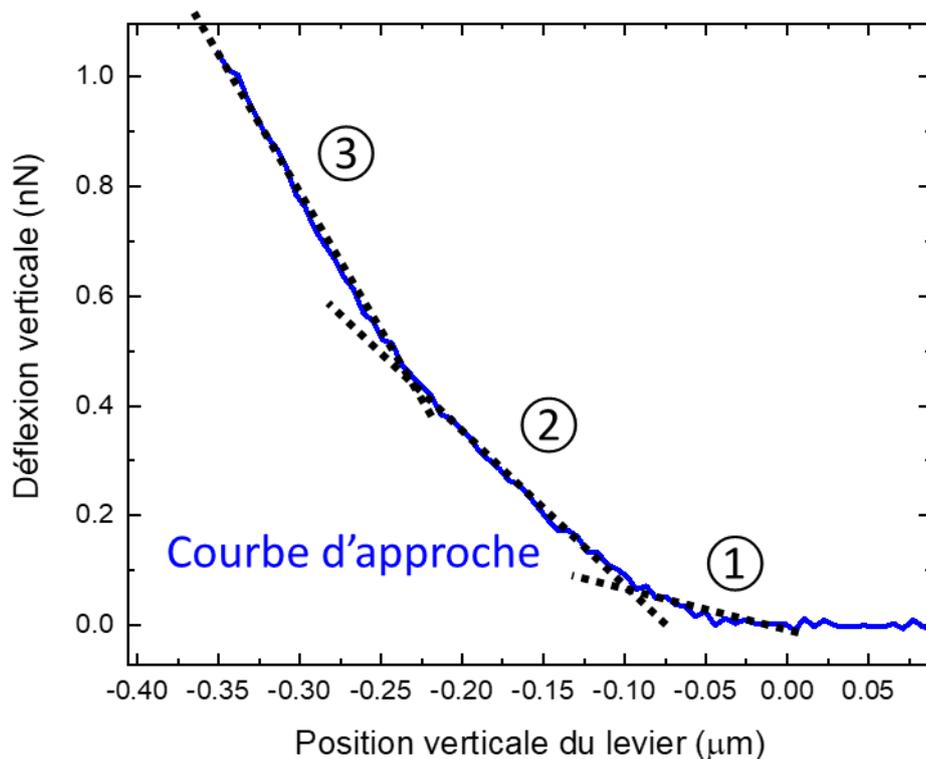


Figure 4.3 : Segmentation d'une courbe d'approche d'*Egeria Densa* non exposée aux nanoparticules d'or pour une force appliquée de 1 nN.

Les valeurs de pente sont alors insérées dans une matrice à trois dimensions représentant la zone sondée de l'échantillon. Cette matrice peut être représentée comme un volume pour mettre en évidence les propriétés mécaniques de la surface et de l'intérieur de l'échantillon.

4.1.2. Acquisition et traitement des données

Nous avons préparé nos échantillons suivant exactement le même protocole que celui présenté dans le Chapitre 3. Afin d'obtenir une vue tridimensionnelle des propriétés mécaniques d'*Egeria Densa*, nous avons réalisé des cartographies de force sur une zone de 10 μm X 10 μm d'une cellule épithéliale. Les déplacements latéraux du levier vont ainsi permettre de sonder l'échantillon en X et Y, et la force appliquée va permettre de définir la profondeur suivant Z. Les courbes de force sont ensuite analysées avec une segmentation en trois parties : la longueur des segments est systématiquement ajustée en fonction de l'indentation et de la résolution des courbes de force. Les valeurs des pentes des segments des différentes courbes sont ensuite insérées dans une matrice à trois dimensions. Sa représentation en volume est montré sur la Figure 4.4. Une couleur est attribuée à chaque valeur de pente calculée. Ainsi, à une seule courbe de force correspondent trois cubes colorés positionnés verticalement (présentés à gauche de la Figure 4.4). Pour construire le volume total, il suffit de procéder de la même manière pour

chaque courbe de force en (X, Y) (ce qui est montré sur la partie droite de la Figure 4.4). Dans la suite du chapitre, les couches correspondant aux trois segments ont été nommées couches ①, ②, ③, 1 étant associée à la couche la plus superficielle et 3 à la couche la plus profonde de l'échantillon, en référence à la notation de la Figure 4.3.

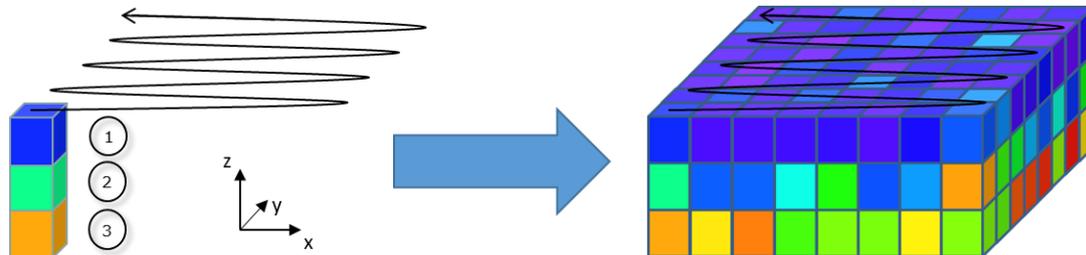


Figure 4.4 : Principe de la tomographie par AFM appliquée à la cartographie de force.

4.1.3. Analyse mécanique en profondeur

De manière analogue à ce que nous avons présenté dans le Chapitre 3, nous avons procédé à deux types de mesures distinctes. D'une part, nous avons exposé les plants d'*Egeria Densa* à des solutions aqueuses de nanoparticules d'or fonctionnalisées pendant une durée donnée, avant de préparer les échantillons pour les mesures par AFM. Les mesures sont ensuite effectuées dans les 2 h qui suivent l'arrêt de l'exposition. Les cartographies ont été réalisées sur des zones de $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ avec une résolution de 8×8 pixels. D'autre part, nous avons procédé à des suivis en temps, afin d'étudier l'évolution temporelle de la rigidité d'une cellule épithéliale de feuille d'*Egeria Densa*. Dans ce cas, comme lors du Chapitre 3, nous avons réalisé des cartographies de 2×2 pixels lors des 10 premières minutes, puis des mesures de 4×4 pixels. Ces expériences, complémentaires de celles du Chapitre 3, nous ont permis d'analyser la rigidité de la paroi cellulaire de façon plus complète, plutôt que de nous concentrer sur un volume restreint à la surface de la feuille.

4.1.3.1. Cartographie en z

Dans un premier temps, nous allons comparer les résultats de tomographie par AFM obtenus sur des échantillons d'*Egeria Densa* avant et après exposition à des nanoparticules d'or fonctionnalisées. Les mesures présentées ont été réalisées, comme dans le Chapitre 3, pour des nanoparticules d'or synthétisées à la concentration de $40 C_0$. Toutefois, quelques expériences ont été réalisées avec des nanoparticules d'or à la concentration de $80 C_0$, pour des résultats similaires. La Figure 4.5 présente le profil mécanique d'une cellule épithéliale d'*Egeria Densa* sans exposition aux nanoparticules d'or, pour une force d'application de 1 nN ; cette figure, ainsi que la Figure 4.6, la Figure

4.7 et la Figure 4.8 correspondent à la moyenne de 6 cartographies réalisées sur 6 cellules différentes provenant de deux échantillons différents (3 et 3), avec des segments ①, ② et ③ de longueurs respectives 100 nm, 150 nm et 100 nm. Chaque point des 64 points de la cartographie est ainsi une moyenne de six résultats. Nous voyons sur cette figure que la rigidité de l'échantillon augmente avec la profondeur ; la couche ①, en surface, présente une pente moyenne de $1,22 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$, la couche ② une pente moyenne de $2,15 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ et la pente ③, la plus profonde, une pente moyenne de $4,81 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$. Cette observation est attendue parce que la surface est toujours sondée, nous avons donc une accumulation des informations dans le volume de l'échantillon. Toutefois, ce dernier aspect ne nous empêche pas d'effectuer des comparaisons entre les différents échantillons.

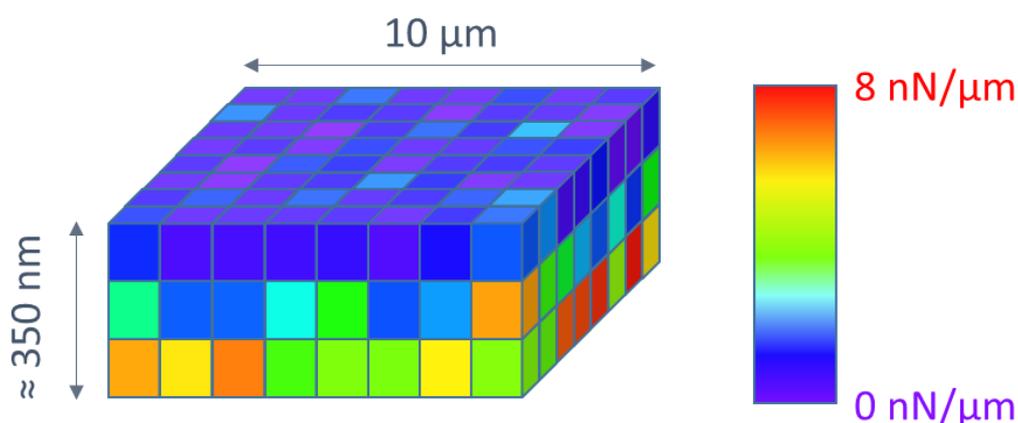


Figure 4.5 : Profil mécanique d'une cellule épithéliale d'*Egeria Densa* n'ayant pas été exposée à des nanoparticules d'or fonctionnalisées établi par tomographie par AFM.

Sur la Figure 4.6, nous voyons donc le même type de profil mécanique réalisé avec les mêmes paramètres de mesure, mais sur un échantillon ayant été exposé à des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du MHDA pendant 4 h (à une concentration d'exposition de $88,88 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), avec les trois segments de longueur 200 nm. Si nous repensons aux observations du Chapitre 3, au bout de 4 h, le palier de rigidité est normalement atteint. Les pentes moyennes des couches ①, ② et ③ sont respectivement $0,88 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$, $1,91 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ et $3,73 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$. Ainsi, les valeurs des pentes des différentes couches ont diminué de 38 %, 32 % et 39 %. Nous constatons aussi que les valeurs obtenues sont plus faibles que celles de la référence, et ce quelle que soit la couche considérée.

Nous voyons également que l'épaisseur sondée est plus importante : la pointe pénètre dans l'échantillon sur une profondeur de 600 nm au lieu des 350 nm de l'échantillon témoin. Tout cela confirme que les effets observés en surface de la paroi se ressentent également en profondeur de l'échantillon.

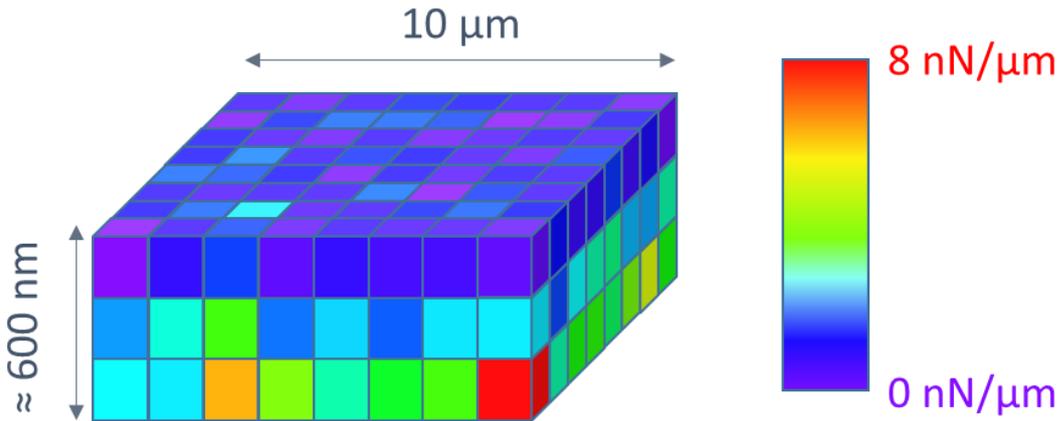


Figure 4.6 : Profil mécanique d'une cellule épithéliale d'Egeria Densa ayant été exposée à des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du MHDA (concentration d'exposition de $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$) pendant 4 h, établi par tomographie par AFM.

La Figure 4.7 présente les résultats obtenus sur des cellules épithéliales exposées à des nanoparticules fonctionnalisées avec de la L-Cystéine, dans les mêmes conditions, avec des segments ①, ② et ③ de longueurs respectives 200 nm, 350 nm et 250 nm. Nous observons rapidement que les valeurs de pentes sont plus faibles que précédemment, et tout particulièrement en profondeur. En effet, si nous n'observons que peu de variations à la surface de la cellule de la plante par rapport à la Figure 4.6, les couches plus en profondeur sont davantage impactées. Nous obtenons ainsi des pentes moyennes de $0,47 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$, $1,38 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ et $2,56 \text{ nN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ pour les couches ①, ② et ③ respectivement. Ce phénomène d'assouplissement, déjà observé dans le Chapitre 3, peut s'expliquer par le fait que, contrairement au MHDA, la L-Cystéine est chargée positivement, ce qui va favoriser son interaction avec la paroi des cellules chargées négativement[12][13][14].

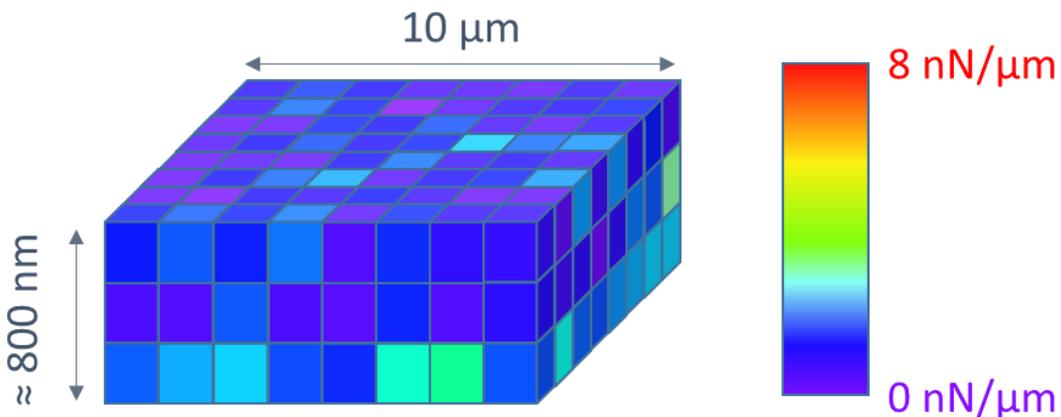


Figure 4.7 : Profil mécanique d'une cellule épithéliale d'Egeria Densa ayant été exposée à des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de la L-Cystéine (concentration d'exposition de $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$) pendant 4 h, établi par tomographie par AFM.

La Figure 4.8 tend à donner du crédit à cette hypothèse. En effet, nous y présentons le troisième et dernier profil mécanique, cette fois pour des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de la L-Cystéine à laquelle a été liée de l'Alexa Fluor 405, encore une fois dans les mêmes conditions avec des segments ①, ② et ③ de longueurs respectives 150 nm, 350 nm et 300 nm. Il ressort que l'assouplissement mécanique est perceptible en profondeur, ce qui était déjà le cas pour les deux fonctionnalisations précédentes, et que son intensité est intermédiaire entre les fonctionnalisations au MHDA et à la L-Cystéine. Les pentes des couches ①, ② et ③ sont en effet respectivement de $0,63 \text{ nN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$, $1,60 \text{ nN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ et $3,19 \text{ nN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$. Ainsi, nous retrouvons l'importance première de la charge électrique des nanoparticules. Concernant la charge, nous pouvons faire remarquer que les nanoparticules d'or fonctionnalisées avec l'ensemble L-Cystéine et Alexa Fluor 405 sont positivement chargées, mais qu'elles présentent moins de charges positives qu'une fonctionnalisation à la L-Cystéine seule.

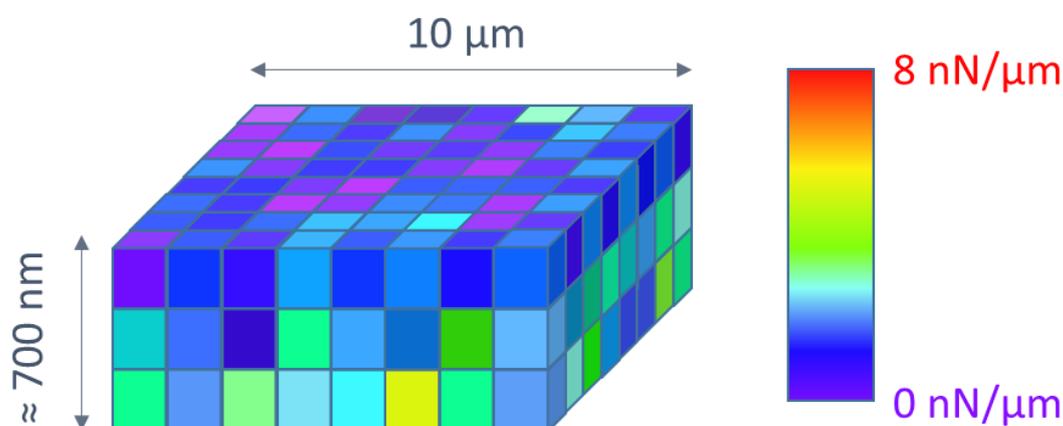


Figure 4.8 : Profil mécanique d'une cellule épithéliale d'Egeria Densa ayant été exposée à des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de la L-Cystéine couplée à Alexa Fluor 405 (concentration d'exposition de $88,88 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) pendant 4 h, établi par tomographie par AFM.

Le récapitulatif des pentes calculées par tomographie AFM est présenté dans le Tableau 4.1.

Fonctionnalisation	Rigidités des couches (en $\text{nN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$)		
	①	②	③
Sans fonctionnalisation	1,22	2,15	4,81
MHDA	0,88	1,91	3,73
L-Cystéine	0,47	1,38	2,56
L-Cystéine + Alexa Fluor	0,63	1,60	3,19

Tableau 4.1 : Récapitulatif des pentes mesurées par tomographie AFM.

La diminution de la rigidité, que nous avons observée en surface des parois cellulaires dans le Chapitre 3, est observée sur la totalité de leur épaisseur. Nous n'avons donc pas simplement observé un effet de surface, mais bel et bien un effet de volume au sein des échantillons.

4.1.3.2. Suivi temporel

Nous nous sommes ensuite intéressés à la cinétique de l'assouplissement observé. Pour cela, nous avons procédé de manière analogue à la procédure détaillée dans le Chapitre 3.

Sur la Figure 4.9, nous présentons l'évolution de la pente mesurée (donc de la rigidité) pour chacun des trois segments de la courbe d'approche (correspondant aux trois couches des profils mécaniques), dans le cas de d'une exposition de la plante à des nanoparticules d'or fonctionnalisées à la L-Cystéine, avec une concentration d'exposition de $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$. Les trois couches, numérotées ①, ② et ③, correspondent toujours à la couche la plus en surface, la couche centrale et la couche la plus interne de la paroi cellulaire. Les pentes calculées des différentes couches diminuent au cours de temps avant d'atteindre un palier autour de 60 minutes après le début de l'exposition. Pour la couche ①, nous retrouvons d'ailleurs ici les durées évaluées dans le Chapitre 3. Nous pouvons voir encore une fois que l'assouplissement est bel et bien réparti sur l'ensemble du volume sondé, mais également que la cinétique ne semble pas extrêmement dépendante de la profondeur d'indentation. Nous observons également que la rigidité atteint un palier au cours de l'assouplissement au bout de 30 min. Il est possible que nous observions là-encore les variations périodiques de la rigidité que nous avons mises en évidence dans le Chapitre 3, comme présentées dans la partie 3.2.2.3.

La paroi cellulaire subit donc une diminution de sa rigidité dans la totalité de son épaisseur. Nous profitons pour rappeler ici que les mesures ont été réalisées à des concentrations attendues comme non cytotoxiques. Il est donc important maintenant d'étudier l'évolution chimique de la paroi des cellules soumises à la présence de nanoparticules d'or.

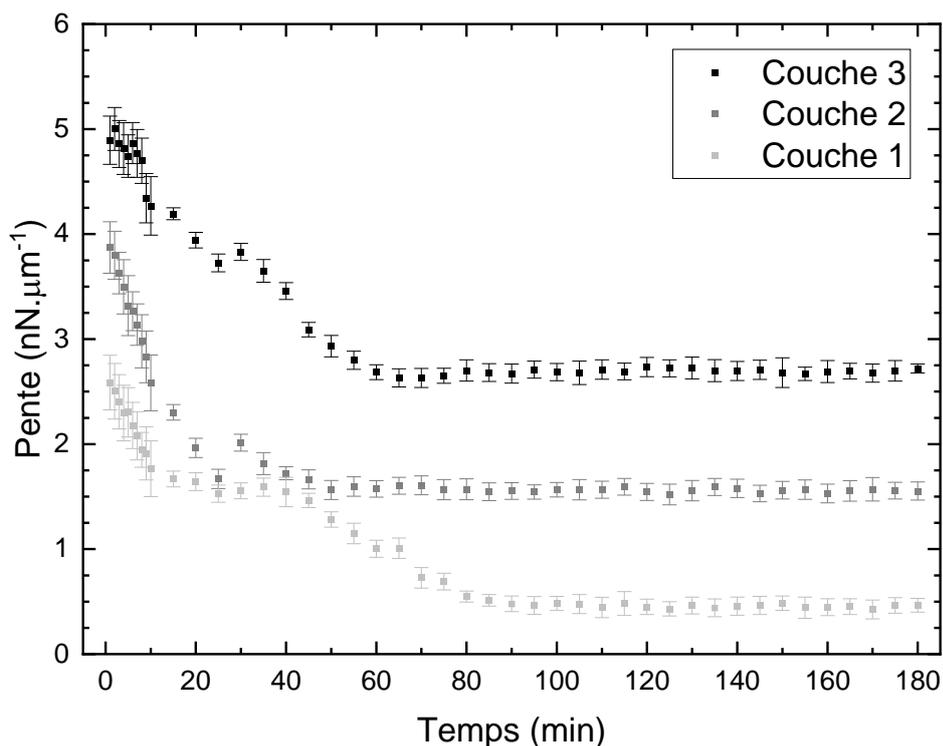


Figure 4.9 : Cinétique de l'assouplissement pour chacune des trois couches issues de la segmentation, dans le cas de cellules épithéliales d'*Egeria Densa* exposées à des nanoparticules d'or fonctionnalisées à la L-Cystéine (concentration d'exposition de $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$).

4.2. Signal Raman de cellules végétales

En complément des mesures d'indentation par AFM et pour avoir accès à des informations sur la composition chimique de la paroi végétale à une échelle micrométrique, nous avons démarré une étude par spectroscopie de diffusion Raman. Cette technique permet en effet d'obtenir des informations sur les plantes et leurs structures électroniques. Cette technique a donc logiquement été utilisée pour l'identification et la caractérisation de nombreuses espèces chimiques présentes dans des cellules végétales[15][16][17]. Dans ce paragraphe, nous présentons la procédure de préparation des échantillons biologiques, les conditions de mesure et d'enregistrement des données ainsi que le spectre caractéristique de la paroi végétale et des chloroplastes.

4.2.1. Préparation des échantillons biologiques

La préparation des échantillons, permettant à la fois de maintenir la plante hydratée en continu et de l'observer par microscopie optique, est la suivante :

- 800 μL d'une solution à 1 % de gel d'agarose sont déposés dans une boîte de Pétri, suivant la procédure décrite dans la partie 3.1.1, en prenant garde de ne pas en déposer au centre de la boîte où un morceau de silicium d'environ 1 cm^2 est placé.
- Une fois le gel solidifié, quelques microlitres de la solution d'agarose sont alors déposés sur le substrat de silicium, qui y formera une couche de gel de faible épaisseur après quelques instants.
- L'échantillon biologique est délicatement déposé sur la fine couche de gel au-dessus du substrat de silicium.
- Enfin, de l'eau est ajoutée pour hydrater l'échantillon et une lamelle de verre est positionnée au-dessus, conformément au schéma de la Figure 4.10.

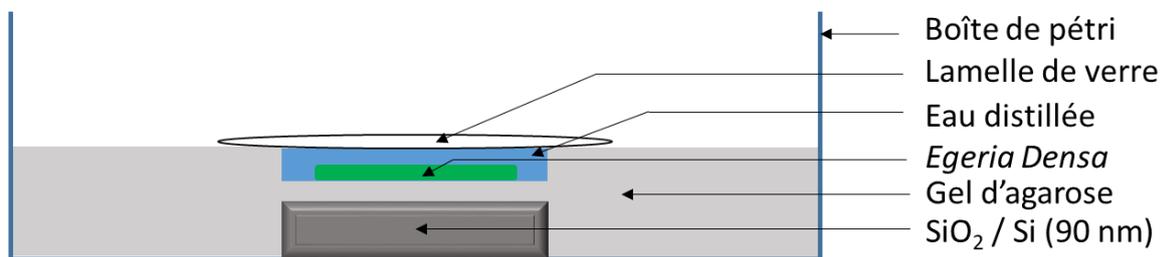


Figure 4.10 : Vue en coupe de l'échantillon d'*Egeria Densa* préparé pour effectuer les mesures par spectrométrie de diffusion Raman.

L'ajout du silicium présente plusieurs avantages : son fort pouvoir réfléchissant dans la gamme visible permet d'augmenter la quantité de lumière au niveau de l'échantillon, et donc d'en améliorer l'observation au microscope optique[18] et la bande de vibration caractéristique du silicium, à $520,6\text{ cm}^{-1}$, visible sur les spectres Raman peut servir de référence interne.

De cette manière, nous avons pu réaliser des mesures sur des échantillons facilement observables, ce qui nous a permis de positionner le faisceau plus facilement sur les zones à analyser.

Nous pouvons voir sur la Figure 4.11 un bord de feuille, avec une tooth cell. Nous pouvons effectivement constater que les cellules sont facilement discernables, mais nous pouvons également voir les chloroplastes ainsi que les parois entre les cellules. De cette manière, nous pouvons nous repérer dans le plan rapidement afin de sonder un endroit précis.

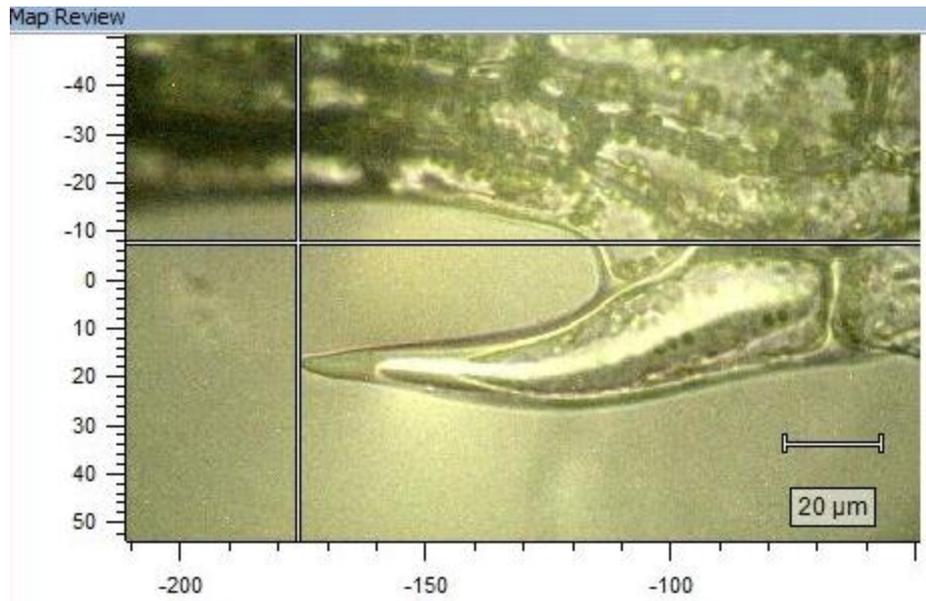


Figure 4.11 : Capture d'écran d'une tooth cell observée en microscopie optique sur le spectromètre Raman.

4.2.2. Choix de la longueur d'onde

Le choix de la longueur d'onde d'excitation Raman est un point essentiel qui doit prendre en compte de nombreux paramètres en fonction du type de mesure souhaité. Dans notre cas, nous en avons pris en compte quatre principaux :

- Tout d'abord l'efficacité de la diffusion Raman est proportionnelle à la puissance quatrième de la fréquence d'excitation. Ainsi, il vaut mieux choisir de faibles longueurs d'onde pour optimiser le rapport signal sur bruit des spectres obtenus.
- Ensuite, comme déjà mentionné dans le Chapitre 1, la résolution spatiale que l'on peut atteindre est proportionnelle à la longueur d'onde. Un faisceau laser ayant une faible longueur d'onde illuminera donc une zone plus réduite, augmentant ainsi la précision de localisation.
- Un autre point, plus spécifique à notre étude, est la réponse plasmonique des nanoparticules d'or. Si nous choisissons une longueur d'onde pour laquelle la réponse plasmonique est la plus forte, l'exaltation locale du champ électrique risque de provoquer une élévation de température qui entraînerait inévitablement une dégradation partielle, voire totale, des cellules végétales.
- Enfin, une des principales contraintes avec les échantillons biologiques est leur fluorescence intrinsèque qui peut masquer complètement le signal Raman. En effet, contrairement à la diffusion Raman qui est un processus à deux photons, l'émission de fluorescence est un processus à un photon, statistiquement beaucoup plus

probable, donc d'intensité bien plus importante. Afin de l'éviter, on préfère ainsi très souvent travailler à des longueurs d'onde assez grandes (proches de l'infrarouge) pour empêcher l'absorption des photons et l'émission résultante. On peut également travailler à faible longueur d'onde pour au contraire provoquer cette absorption, en faisant en sorte que l'émission soit hors de la gamme de nombre d'onde analysée.

Sur la Figure 4.12, nous voyons les spectres d'absorption des substances présentes dans les feuilles vertes (à gauche) et les spectres de fluorescence correspondant (à droite)[19].

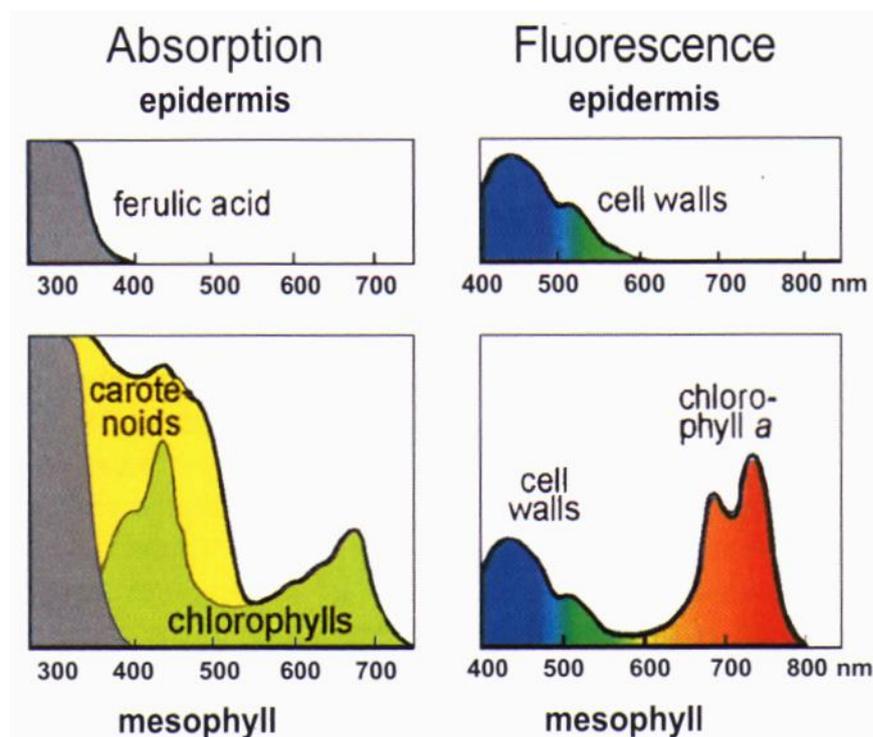


Figure 4.12 : Spectre d'absorption des substances présentes dans les feuilles vertes (à gauche) et spectre d'émission de fluorescence correspondant (à droite). Sur les spectres de fluorescence, la bande à 440 nm, avec un épaulement à 520 nm, est principalement due à l'acide férulique situé dans les parois cellulaires. La double bande, avec des maxima à 690 nm et 740 nm, est due majoritairement à la chlorophylle a. La longueur d'onde d'excitation doit être inférieure à 400 nm pour observer toutes les bandes. Cette figure est extraite de [19].

La zone où il y a le moins de fluorescence, et où le signal Raman sera donc le plus élevé, se situe aux longueurs d'onde comprises entre 500 nm et 650 nm. Dans cette gamme, deux longueurs d'onde d'excitation sont disponibles sur l'instrument : 514 nm et 633 nm. En effectuant des mesures sur une feuille d'*Egeria Densa* avec ces deux longueurs d'excitation, il est apparu que la fluorescence était plus importante pour la longueur d'onde de 633 nm. Nous avons donc choisi de travailler avec une longueur d'onde de 514 nm.

4.2.3. Déplacement du point focal

La position de l'échantillon par rapport au point focal de l'objectif du microscope optique est un paramètre crucial lors des mesures Raman (voir la Figure 4.13). En effet, comme nous l'avons expliqué dans le Chapitre 1, le rayonnement incident est focalisé en un point de l'échantillon, et la lumière diffusée inélastiquement et collectée par le détecteur rend compte des liaisons chimiques présentes autour de ce même point. De plus, l'utilisation du mode confocal du microscope réduit de façon significative le volume sondé. Dès lors, une variation suivant l'axe z de la position de l'échantillon par rapport à ce point permet de disposer d'informations chimiques à différentes profondeurs.

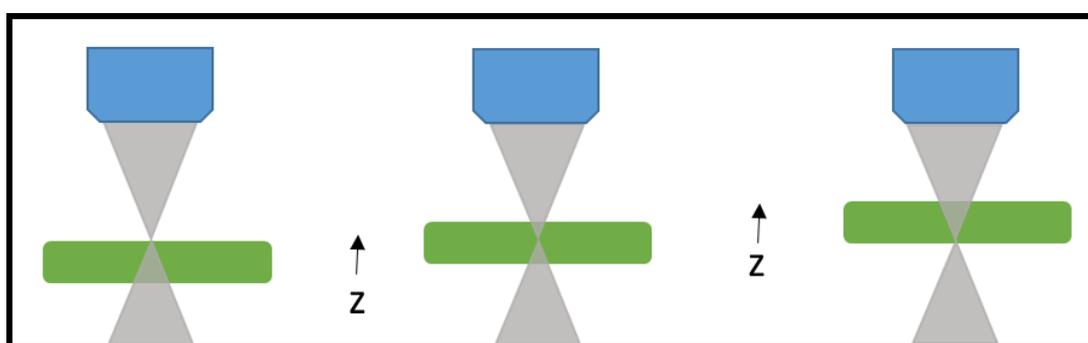


Figure 4.13 : Schéma montrant le décalage du point focal de l'objectif obtenu en variant la position verticale de l'échantillon, permettant de sonder en spectrométrie Raman différentes profondeurs de la plante *Egeria Densa*.

4.2.4. Spectre Raman de la paroi végétale

Nous avons enregistré plusieurs spectres Raman en nous focalisant optiquement sur la paroi végétale de différentes cellules épithéliales et en veillant à ne pas induire des modifications de l'échantillon durant la mesure (notamment une augmentation de fluorescence en cours d'acquisition). Un spectre caractéristique brut est montré sur la Figure 4.14.

Pour améliorer le rapport signal sur bruit, nous avons ensuite sommé 16 spectres. Le spectre résultant est montré sur la Figure 4.15. La ligne de base y a été soustraite. Nous y discernons les raies caractéristiques de trois composants majeurs de la paroi végétale, à savoir la pectine, la cellulose et la lignine, ainsi qu'une des raies du β -carotène, à 1520 cm^{-1} , qui est un pigment présent dans les chloroplastes. Ainsi, nous pouvons voir sur la Figure 4.15 repérés par un astérisque gris les pics issus des modes de vibrations de la cellulose à 1034 cm^{-1} et à 1095 cm^{-1} (élongations des C-O-C), ainsi qu'à 1151 cm^{-1} , 1334 cm^{-1} et 1378 cm^{-1} (déformations des HCC, HCO et HOC). De même, nous avons repéré par des astérisques rouges les pics attribués aux modes de vibrations de la pectine à 834 cm^{-1} (déformations des C-O-H des cycles), à 854 cm^{-1} (les déformations de la chaîne

principale O-C-O-C-C) et enfin à 896 cm^{-1} (déformations des CCH et des COH) [15][16][20][21][22].

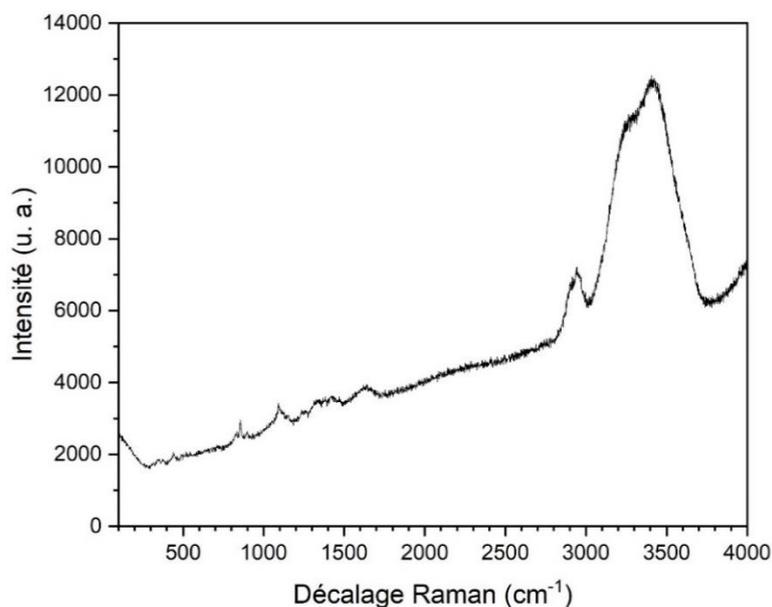


Figure 4.14 : Spectre Raman brut d'une paroi cellulaire d'Egeria Densa non exposée à des nanoparticules d'or.

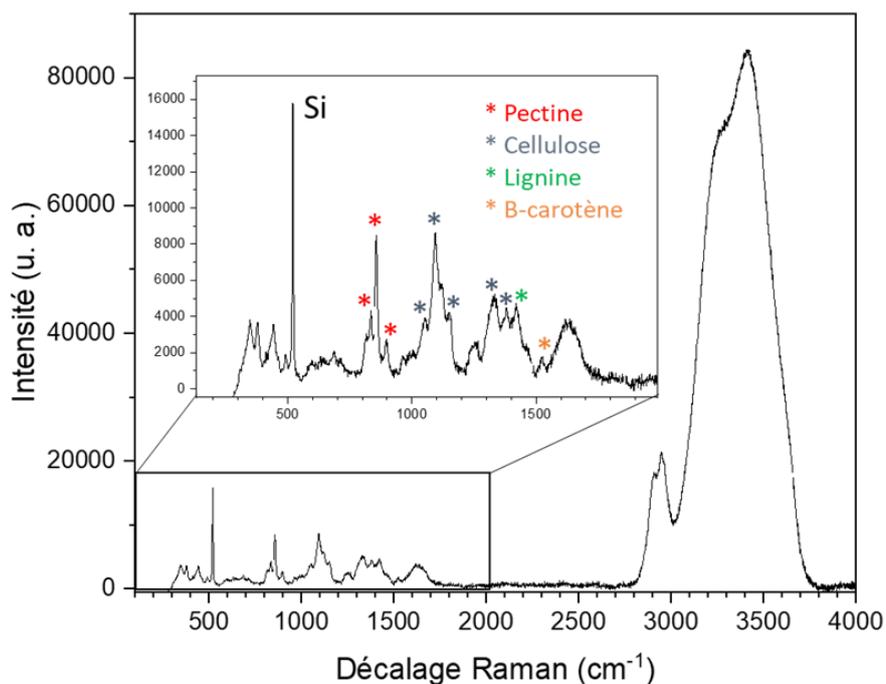


Figure 4.15 : Spectre Raman somme d'une cellule épithéliale d'Egeria Densa sans exposition à des nanoparticules d'or. En insert, agrandissement du spectre dans la gamme allant de 100 cm^{-1} à 2000 cm^{-1} , avec des astérisques indiquant les modes de de la pectine (en rouge), de la cellulose (en gris), du β -carotène (en orange) et de la lignine (en vert). La puissance sur échantillon est de 15 mW par spectre. Ces mesures ont été réalisées avec une longueur d'onde d'excitation de 514 nm . Le pic de la raie du silicium à $520,6\text{ cm}^{-1}$ est indiqué par la référence Si.

Un exemple de spectre obtenu est reporté sur la Figure 4.18. Ce spectre affiché correspond à une somme de 16 spectres de 2 s pris à une excitation de 514 nm avec une puissance sur échantillon de 75 μ W.

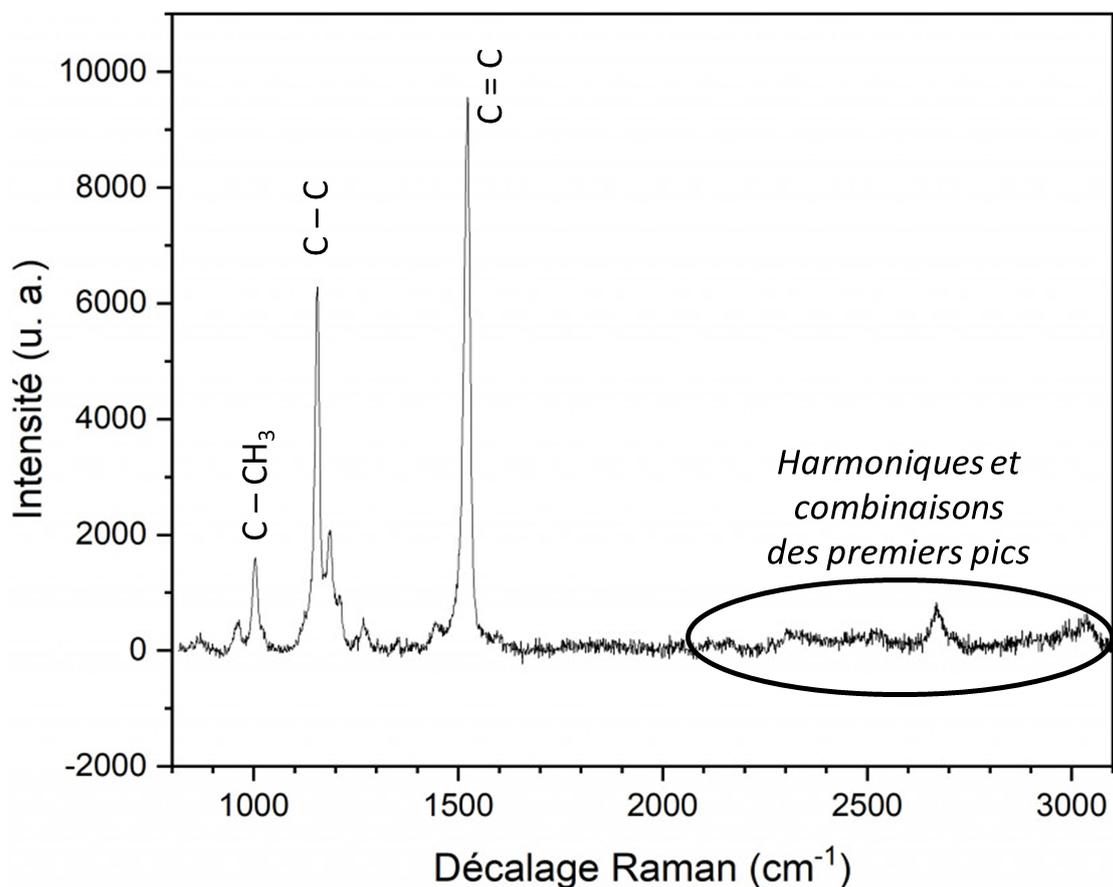


Figure 4.18 : Spectre résultant de la somme de 16 spectres enregistrés chacun sur un chloroplaste différent d'une cellule d'*Egeria Densa*, présentant les caractéristiques des caroténoïdes présents dans les chloroplastes.

On note en particulier les trois pics Raman principaux, situés à 1002 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} et 1520 cm^{-1} , qui peuvent être attribués aux modes d'élongation C-CH₃, C-C et C=C du β -carotène respectivement[24]. On note également à plus hauts nombres d'onde des bandes de vibrations correspondant à des harmoniques et des combinaisons de ces modes fondamentaux, ainsi qu'aux élongations C-H. Le pic issu de combinaisons le plus marqué est sur la Figure 4.18 le pic qui est situé à 2670 cm^{-1} , formé par une combinaison des pics situés à 1150 cm^{-1} et 1520 cm^{-1} (une addition donne bien $1150 + 1520 = 2670\text{ cm}^{-1}$). La forte intensité de ce pic est attendue, car les deux pics le constituant sont également les plus intenses des pics principaux. Pour ce qui est des harmoniques, nous pouvons prendre l'exemple du pic localisé à 2300 cm^{-1} , qui est une harmonique du pic des liaisons C-C situé à 1150 cm^{-1} (même principe, un simple calcul donne bien $2 * 1150 = 2300\text{ cm}^{-1}$). Il faut noter qu'il s'agit de Raman résonant ce qui

explique l'intensité très importante des bandes observées, ainsi que la présence aussi nette sur le spectre des pics issus de combinaisons et d'harmoniques. Notons que la chlorophylle, bien que pigment majoritaire dans les chloroplastes, n'est pas visible. C'est toujours le cas lorsque les molécules de chlorophylles sont bien localisées dans les photosystèmes.

4.2.6. Détermination de l'épaisseur des cellules épithéliales

En mode confocal, en déplaçant de façon régulière l'échantillon et en enregistrant systématiquement le signal Raman, nous avons pu estimer l'épaisseur d'une cellule épithéliale en détectant l'apparition et la disparition du signal Raman des chloroplastes, comme présenté sur la Figure 4.19. Les mesures ont été réalisées à 514 nm avec une accumulation d'une seconde pour une puissance sur échantillon de 0,15 mW. Pour sept des dix courbes présentées, nous pouvons clairement observer des pics caractéristiques des caroténoïdes, témoignant de la présence des chloroplastes. En revanche, pour des hauteurs de 0 μm , 30 μm et 90 μm , nous ne distinguons que très peu, voire pas du tout ces pics. Cela indique que le faisceau est alors focalisé au niveau de la paroi végétale, qui ne contient pas de chloroplastes. Nous avons donc évalué l'épaisseur des deux couches de cellules sondées à environ 60 μm et 30 μm (90 - 30 = 60 μm et 30 - 0 = 30 μm), ce qui est proche des valeurs observées en microscopie optique et trouvées dans la littérature[25].

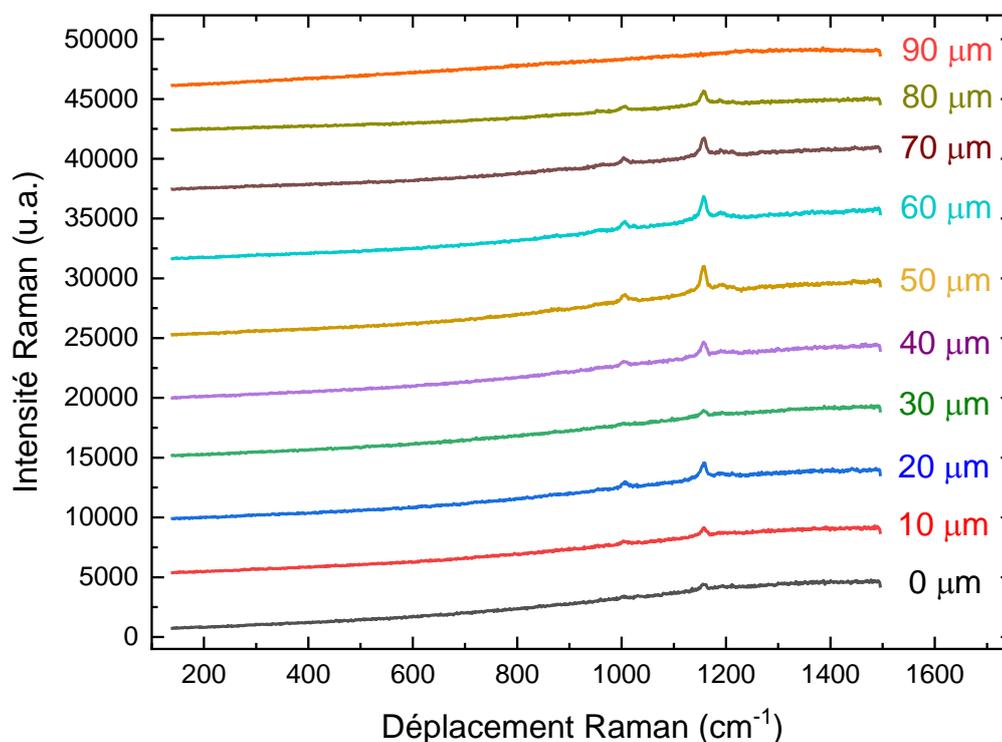


Figure 4.19 : Spectres Raman enregistrés en balayant en profondeur une feuille d'Egeria Densa.

4.2.7. Evolution des caractéristiques des signaux Raman de la paroi végétale et des chloroplastes en présence des nanoparticules d'or fonctionnalisées

Nous avons commencé, lors du stage de Master 1 de Thibault Legal (avril – juillet 2021) des mesures par spectroscopie de diffusion Raman de la paroi végétale et des chloroplastes de cellules épithéliales et de toothcells, en l'absence et en présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées à différents temps d'exposition. Systématiquement, le signal a été enregistré sur plusieurs cellules d'une même feuille d'*Egeria Densa* et plusieurs zones d'une même cellule. Grâce à une première série de mesures, nous avons observé des variations d'intensité des différentes raies Raman présentes sur les différents spectres en fonction des temps d'exposition aux nanoparticules, mais également en fonction des zones sondées. Il existe aussi des variations d'intensité du signal Raman pour des cellules non exposées à des nanoparticules. Aussi, une analyse poussée des données, qui est actuellement en cours, est nécessaire pour être en mesure de conclure sur cet aspect.

4.2.8. Localisation des nanoparticules d'or au sein des cellules

Nous sommes parvenus à mettre en évidence la présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées au sein des cellules d'*Egeria Densa* par des mesures de spectrométrie Raman.

La Figure 4.20 montre un spectre Raman de l'intérieur d'une cellule épithéliale d'*Egeria Densa* dans laquelle nous avons détecté la présence de la liaison or-soufre. Ce spectre a été collecté avec une mesure de 10 s effectuée à une longueur d'onde d'excitation de 514 nm et une puissance sur échantillon de 0,75 mW. La plante avait au préalable été exposée à des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de la L-Cystéine pendant une journée. Nous pouvons voir sur le spectre le signal issu des liaisons C-H, aux alentours de 3000 cm^{-1} , et les pics caractéristiques des caroténoïdes à des décalages Raman d'environ 1000, 1150 et 1520 cm^{-1} (indiqués par des astérisques). Nous pouvons également y voir à 226 cm^{-1} le pic de la liaison or – soufre, déjà présenté dans le Chapitre 2.

Ainsi, l'observation de la liaison or-soufre montrée sur le spectre précédent nous permet de confirmer que nous observons des nanoparticules présentes au sein même des cellules, et non à l'extérieur, le faisceau laser étant focalisé à l'intérieur de l'échantillon.

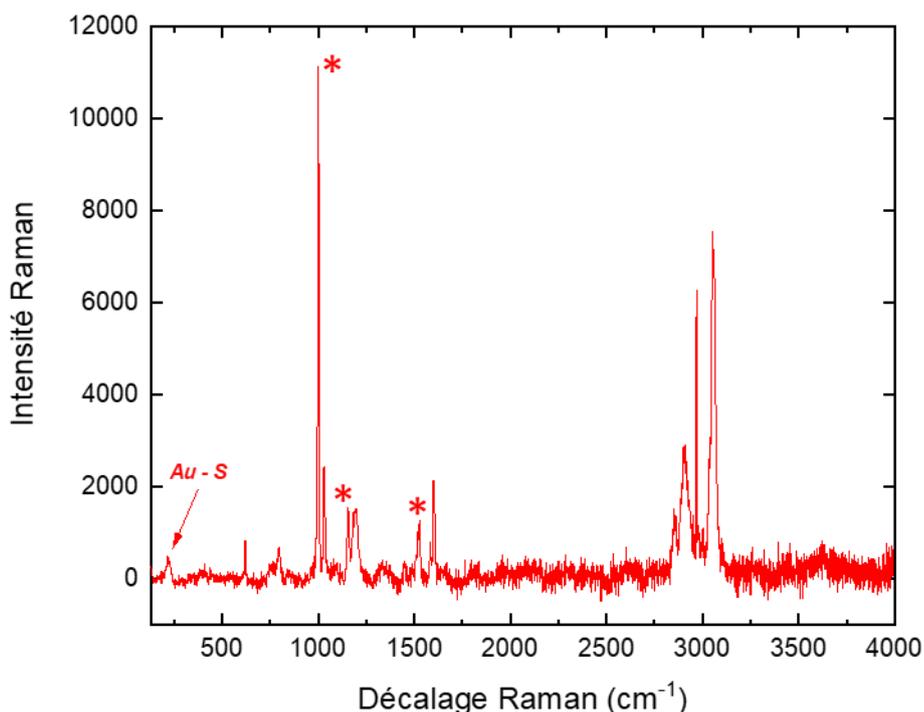


Figure 4.20 : Spectre Raman de l'intérieur d'une cellule épithéliale d'*Egeria Densa*, montrant la liaison or - soufre des nanoparticules d'or fonctionnalisées ainsi que le signal des caroténoïdes provenant des chloroplastes.

4.3. Conclusion

Dans ce chapitre, en utilisant le mode tomographie par AFM, nous avons montré que les modifications de la rigidité de la paroi végétale, lorsque la plante *Egeria Densa* est exposée à des nanoparticules, sont effectives dans toute son épaisseur. La paroi végétale devient de plus en plus souple en présence des nanoparticules d'or fonctionnalisées, avant d'atteindre un seuil au bout de plusieurs dizaines de minutes.

De plus, nous avons mis en évidence la présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées à l'intérieur des cellules végétales, grâce à la présence du pic caractéristique de la liaison Au-S sur différents spectres Raman enregistrés lorsque le faisceau était focalisé à l'intérieur des cellules des feuilles.

Ainsi, les nanoparticules d'or fonctionnalisées interagissent avec la paroi des cellules végétales et arrivent à pénétrer dans les cellules. Les dimensions des nanoparticules d'or fonctionnalisées sont supérieures à 20 nm (cf. la Figure 2.10 et le Tableau 3.2 du Chapitre 2 et du Chapitre 3 pour les dimensions avant fonctionnalisation). Il est attendu que ces dimensions sont supérieures aux tailles des pores naturellement présents dans la paroi des végétaux[26][27][28]. Cela nous amène à considérer que les nanoparticules d'or fonctionnalisées ont induit des modifications de l'architecture et de

la porosité de la paroi, et, par voie de conséquence, des modifications de sa composition chimique. Afin d'approfondir cela, nous avons démarré la caractérisation des échantillons par spectroscopie de diffusion Raman, après avoir déterminé les meilleures conditions expérimentales pour la prise de mesure. Une première série de mesures a été prise et est en cours d'analyse. Il conviendra bien sûr de compléter avantageusement ces données par de nouvelles mesures.

Afin d'aller plus loin, il sera intéressant, et des expériences ont été enclenchées à ce sujet, d'appliquer une force plus importante sur les cellules afin de presser davantage la totalité de la paroi, voire de passer outre. Pour cela, nous avons changé de pointe AFM pour prendre des pointes colloïdales de rayon plus important de 150 nm.

4.4. Bibliographie

- [1] C. Roduit, S. Sekatski, G. Dietler, S. Catsicas, F. Lafont, S. Kasas, Stiffness Tomography by Atomic Force Microscopy, *Biophysical Journal*. 97 (2009) 674–677. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.05.010>.
- [2] S.P. Timoshenko, J.N. Goodier, *Theory of elasticity*, 3rd ed., McGraw Hill, 1951.
- [3] G. Persch, Ch. Born, B. Utesch, Nano-hardness investigations of thin films by an atomic force microscope, *Microelectronic Engineering*. 24 (1994) 113–121. [https://doi.org/10.1016/0167-9317\(94\)90061-2](https://doi.org/10.1016/0167-9317(94)90061-2).
- [4] N. Rascio, P. Mariani, E. Tommasini, M. Bodner, W. Larcher, Photosynthetic strategies in leaves and stems of *Egeria densa*, *Planta*. 185 (1991). <https://doi.org/10.1007/BF00201047>.
- [5] K. Radotić, C. Roduit, J. Simonović, P. Hornitschek, C. Fankhauser, D. Mutavdžić, G. Steinbach, G. Dietler, S. Kasas, Atomic Force Microscopy Stiffness Tomography on Living *Arabidopsis thaliana* Cells Reveals the Mechanical Properties of Surface and Deep Cell-Wall Layers during Growth, *Biophysical Journal*. 103 (2012) 386–394. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.06.046>.
- [6] M. Plodinec, M. Loparic, C.A. Monnier, E.C. Obermann, R. Zanetti-Dallenbach, P. Oertle, J.T. Hyotyla, U. Aebi, M. Bentires-Alj, R.Y.H. Lim, C.-A. Schoenenberger, The nanomechanical signature of breast cancer, *Nature Nanotech*. 7 (2012) 757–765. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.167>.
- [7] M. Loparic, D. Wirz, A.U. Daniels, R. Raiteri, M.R. VanLandingham, G. Guex, I. Martin, U. Aebi, M. Stolz, Micro- and Nanomechanical Analysis of Articular Cartilage by Indentation-Type Atomic Force Microscopy: Validation with a Gel-Microfiber Composite, *Biophysical Journal*. 98 (2010) 2731–2740. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.02.013>.
- [8] I.I. Argatov, AFM-based indentation stiffness tomography—An asymptotic model, *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*. 70 (2014) 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.jmps.2014.06.001>.
- [9] C. Roduit, G. Longo, I. Benmessaoud, A. Volterra, B. Saha, G. Dietler, S. Kasas, Stiffness tomography exploration of living and fixed macrophages: MACROPHAGES MECHANICAL PROPERTIES, *J. Mol. Recognit*. 25 (2012) 241–246. <https://doi.org/10.1002/jmr.2184>.

- [10] S. Janel, M. Popoff, N. Barois, E. Werkmeister, S. Divoux, F. Perez, F. Lafont, Stiffness tomography of eukaryotic intracellular compartments by atomic force microscopy, *Nanoscale*. 11 (2019) 10320–10328. <https://doi.org/10.1039/C8NR08955H>.
- [11] M.F. Schulte, S. Bochenek, M. Brugnoli, A. Scotti, A. Mourran, W. Richtering, Stiffness Tomography of Ultra-Soft Nanogels by Atomic Force Microscopy, *Angew. Chem.* 133 (2021) 2310–2317. <https://doi.org/10.1002/ange.202011615>.
- [12] A. Raz, M. Perouansky, *Central nervous system physiology: neurophysiology, Pharmacology and Physiology for Anesthesia*. (2019) 145–173.
- [13] L.B. Poole, The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry, *Free Radical Biology and Medicine*. 80 (2015) 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.013>.
- [14] D. Kim, D. Kang, Molecular Recognition and Specific Interactions for Biosensing Applications, *Sensors*. 8 (2008) 6605–6641. <https://doi.org/10.3390/s8106605>.
- [15] M. Szymańska-Chargot, M. Chylińska, P.M. Pieczywek, P. Rösch, M. Schmitt, J. Popp, A. Zdunek, Raman imaging of changes in the polysaccharides distribution in the cell wall during apple fruit development and senescence, *Planta*. 243 (2016) 935–945. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2456-4>.
- [16] N. Gierlinger, T. Keplinger, M. Harrington, Imaging of plant cell walls by confocal Raman microscopy, *Nat Protoc*. 7 (2012) 1694–1708. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.092>.
- [17] H. Schulz, M. Baranska, Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*. 43 (2007) 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2006.06.001>.
- [18] P. Blake, E.W. Hill, A.H. Castro Neto, K.S. Novoselov, D. Jiang, R. Yang, T.J. Booth, A.K. Geim, Making graphene visible, *Appl. Phys. Lett.* 91 (2007) 063124. <https://doi.org/10.1063/1.2768624>.
- [19] C. Buschmann, G. Langsdorf, H.K. Lichtenthaler, Imaging of the blue, green, and red fluorescence emission of plants: An overview, *Photosynthetica*. 38 (2000) 483–491.
- [20] D. Borowska-Wykret, M. Dulski, Raman spectroscopy in nonwoody plants, in: *Plant Cell Morphogenesis: Methods and Protocols*, Springer Nature, Springer, 2019: pp. 83–107.
- [21] J.H. Wiley, R.H. Atalla, Band assignments in the raman spectra of celluloses, *Carbohydrate Research*. 160 (1987) 113–129. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(87\)80306-3](https://doi.org/10.1016/0008-6215(87)80306-3).
- [22] A. Synytsya, Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins, *Carbohydrate Polymers*. 54 (2003) 97–106. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00158-9).
- [23] F. Adar, Carotenoids—Their Resonance Raman Spectra and How They Can Be Helpful in Characterizing a Number of Biological Systems, *Spectroscopy*. 32 (2017) 12–20.
- [24] J. Jehlička, H.G.M. Edwards, K. Osterrothová, J. Novotná, L. Nedbalová, J. Kopecký, I. Němec, A. Oren, Potential and limits of Raman spectroscopy for carotenoid detection in microorganisms: implications for astrobiology, *Phil. Trans. R. Soc. A*. 372 (2014) 20140199. <https://doi.org/10.1098/rsta.2014.0199>.
- [25] T. Hara, E. Kobayashi, K. Ohtsubo, S. Kumada, M. Kanazawa, T. Abe, R.D. Itoh, M.T. Fujiwara, Organ-Level Analysis of Idioblast Patterning in *Egeria densa* Planch.

- Leaves, PLoS ONE. 10 (2015) e0118965.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118965>.
- [26] N. Carpita, D. Sabularse, D. Montezinos, D.P. Delmer, Determination of the Pore Size of Cell Walls of Living Plant Cells, *Science*. 205 (1979) 1144–1147.
<https://doi.org/10.1126/science.205.4411.1144>.
- [27] Y. Jiang, M. Lawrence, M.P. Ansell, A. Hussain, Cell wall microstructure, pore size distribution and absolute density of hemp shiv, *R. Soc. Open Sci.* 5 (2018) 171945.
<https://doi.org/10.1098/rsos.171945>.
- [28] S. Asli, P.M. Neumann, Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport, *Plant, Cell & Environment*. 32 (2009) 577–584.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01952.x>.

Conclusion

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans le contexte général des études dédiées à la compréhension des interactions entre nanoparticules et végétaux. L'objectif est d'approfondir les connaissances des propriétés biophysiques et mécaniques de cellules végétales de feuilles mises en contact avec des nanoparticules d'or. Nous avons choisi de travailler avec des nanoparticules d'or fonctionnalisées en raison de leur utilisation potentielle dans diverses applications, en tant que traceurs, biocapteurs, ...

Dans un premier temps, nous avons synthétisé des nanoparticules d'or de dimensions et formes variées, à l'aide d'un macérât obtenu à partir d'une feuille d'*Aloe Vera* et utilisé comme agent réducteur, et l'acide tétrachloroaurique (HAuCl_4) comme précurseur d'or. Cela permet de ne jamais utiliser de surfactant au cours du processus de synthèse. La suspension de nanoparticules a ensuite été nettoyée par plusieurs cycles de centrifugation - dilution. Il s'en est suivi une étude approfondie de leurs propriétés structurales et optiques par microscopie électronique, spectrométrie Raman et spectroscopie d'absorption UV-visible. Ces différentes techniques ont permis de montrer que les nanoparticules d'or sont anisotropes, cristallisées et qu'elles présentent une grande diversité de formes : plaquettes, tétraèdres, décaèdres, icosaèdres, bipyramides et polycristaux. Les dimensions moyennes des nanoparticules sont ajustables *via* la quantité d'agents réducteurs ajoutés pour démarrer la synthèse. Ainsi, plus la concentration en agent réducteur est importante, plus les nanoparticules sont petites. De plus, nous avons pu réaliser une étude statistique à partir des micrographies obtenues par microscopie électronique en transmission. Celle-ci a permis de mettre en évidence que les facteurs cinétiques et thermodynamiques entraînent la formation de nanoparticules de caractéristiques différentes (monocristaux, cristaux comportant une macule, et les différentes structures que sont les plaquettes, tétraèdres, décaèdres, icosaèdres ou bipyramides), et d'évaluer leurs proportions en nombre selon la concentration en agent réducteur choisie lors de la synthèse. Les nanoparticules ont ensuite été fonctionnalisées avec de l'acide 16-mercaptohexadécanoïque, de la L-Cystéine ou encore de la L-Cystéine à laquelle a été couplée de l'Alexa Fluor 405. Le succès de cette étape a été validé par une étude croisée par spectroscopie de diffusion Raman et par microscopie électronique en transmission à balayage, dans les modes HAADF et i-DPC. Le greffage covalent de ces molécules a été prouvé par la détection du pic Raman correspondant aux liaisons or-soufre. Les micrographies STEM montrent une couche organique entourant les nanoparticules d'or.

Dans un deuxième temps, les interactions entre les nanoparticules d'or fonctionnalisées et les cellules végétales constituant les feuilles de la plante aquatique *Egeria Densa* ont été étudiées par microscopie à force atomique en milieu liquide et par spectrométrie de diffusion Raman. Considérons tout d'abord les résultats des mesures de spectroscopie de force par AFM. Nous nous sommes concentrés sur les propriétés mécaniques de la paroi cellulaire des trois types de cellules présentes sur les feuilles

d'Egeria Densa : les cellules épithéliales, les tooth cells et les idioblastes, après plusieurs périodes d'exposition à des nanoparticules en faible concentration massique (moins de $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$). Les mesures montrent une diminution de la rigidité de la paroi des cellules épithéliales et des tooth cells exposées à des nanoparticules pour toutes les concentrations massiques (entre $4,44$ et $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$) et pour les trois types de fonctionnalisation. En revanche, aucune modification de la rigidité de la paroi cellulaire des idioblastes n'a été observée. Pour les mesures effectuées avec une faible force appliquée (de $0,3 \text{ nN}$), nous avons montré que la valeur du module élastique effectif E^* , évaluée en utilisant le modèle de Hertz, est divisée par 10 au bout d'un certain temps d'exposition dépendant de la concentration massique des nanoparticules mises en contact (entre $8,89$ et $88,88 \mu\text{g.L}^{-1}$) et de leur type de fonctionnalisation. Pour la concentration égale à $4,44 \mu\text{g.L}^{-1}$, le comportement mécanique de la surface de la paroi des cellules est très faiblement impacté par la présence des nanoparticules, même pendant un temps long (au moins 7 heures). Un suivi en temps a permis de montrer que la dose d'exposition en nanoparticules fonctionnalisées avait un impact important sur la rigidité de la paroi cellulaire. En effet, après environ 10 minutes d'exposition, la rigidité commence à baisser avant d'atteindre un palier, la durée au bout de laquelle ce palier est atteint dépendant directement de la dose d'exposition. De plus, en procédant à une expérience de rinçage, nous avons pu montrer qu'une cellule de feuille ayant préalablement perdu de sa rigidité au niveau de sa paroi lors d'une exposition aux nanoparticules d'or peut retrouver sa rigidité initiale au bout de 4 heures si les nanoparticules sont retirées du milieu environnant. Des mesures en mode tomographie par AFM ont permis de sonder la paroi cellulaire végétale dans son ensemble. Ce mode particulier consiste à appliquer une force plus importante sur les cellules des feuilles (force appliquée de 1 nN par rapport à $0,3 \text{ nN}$) et à analyser les courbes de force de manière segmentée pour établir un profil mécanique. Nous avons ainsi pu montrer que les modifications de la rigidité de la paroi cellulaire végétale, lorsque la plante *Egeria Densa* est exposée à des nanoparticules, sont effectives dans toute son épaisseur. La paroi végétale devient de plus en plus souple en présence des nanoparticules d'or fonctionnalisées, avant d'atteindre un seuil s'échelonnant d'une à trois heures selon la concentration massique des nanoparticules présentes. Un autre résultat important est la mise en évidence de la présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées à l'intérieur des cellules végétales, grâce à la présence du pic caractéristique de la liaison Au-S sur différents spectres Raman enregistrés lorsque le faisceau était focalisé à l'intérieur des cellules des feuilles. Il est donc clair que les nanoparticules d'or fonctionnalisées interagissent avec la paroi des cellules végétales et arrivent à pénétrer à l'intérieur des cellules. L'assouplissement de la paroi végétale pourrait avoir plusieurs origines. D'une part, d'un point de vue physique, nous pouvons envisager un élargissement des pores naturellement présents dans la paroi, modifiant ainsi son architecture. D'autre part, des liaisons chimiques ont pu être rompues suite à la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène.

La principale poursuite de travaux à mener est bien évidemment la compréhension totale du phénomène à l'origine des variations de la rigidité des cellules d'*Egeria Densa*.

Comme mentionné, l'un des effets bien documentés des interactions entre des nanoparticules et des plantes est le stress oxydant avec une surabondance des espèces réactives de l'oxygène (ROS), en particulier dans le cas des plantes aquatiques[2]. Dans le but de tester cette hypothèse, nous avons récemment débuté la synthèse de nano-sondes pour la détection des radicaux $\text{ROO}\cdot$, $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$ et $^1\text{O}_2$ [3] en fonctionnalisant des nanoparticules d'or avec du para-aminothiophénol (PATP). Par la suite, l'idée est de mettre en contact les nano-sondes avec les cellules d'*Egeria Densa*, l'éventuelle présence de ROS entraînant alors la formation de doubles-liaisons N=N entre les molécules de PATP, que nous pourrions détecter par spectroscopie de diffusion Raman. Cela nous permettrait donc de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'un assouplissement dû à la production de ROS par la plante.

Une fois ces éléments rigoureusement étudiés et la phénoménologie mieux comprise, cela ouvrirait la voie à davantage d'applications exploitant au mieux l'extraordinaire potentiel des nanoparticules métalliques, tout en garantissant une utilisation saine et viable pour les échantillons biologiques, que ce soit via une production de particules sans surfactant, ou une bonne connaissance des dégâts engendrés sur la plante par les nanoparticules utilisées.

Bibliographie

- [1] H. Kang, Y.-G. Hwang, T.-G. Lee, C.-R. Jin, C.H. Cho, H.-Y. Jeong, D.-O. Kim, Use of Gold Nanoparticle Fertilizer Enhances the Ginsenoside Contents and Anti-Inflammatory Effects of Red Ginseng, *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26 (2016) 1668–1674. <https://doi.org/10.4014/jmb.1604.04034>.
- [2] M. Rezayian, V. Niknam, H. Ebrahimzadeh, Oxidative damage and antioxidative system in algae, *Toxicology Reports*. 6 (2019) 1309–1313. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.10.001>.
- [3] K. Cui, C. Fan, G. Chen, Y. Qiu, M. Li, M. Lin, J.-B. Wan, C. Cai, Z. Xiao, *para*-Aminothiophenol Radical Reaction-Functionalized Gold Nanoprobe for One-to-All Detection of Five Reactive Oxygen Species In Vivo, *Anal. Chem.* 90 (2018) 12137–12144. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03116>.

Titre : Nanoparticules d'or et plantes aquatiques : interactions fondamentales et propriétés mécaniques

Mots clés : Nanoparticules d'or fonctionnalisées, Cartographie de force, Spectroscopie de diffusion Raman, Tomographie par AFM, Mesures mécaniques, MET

Résumé : Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans le cadre de l'usage de plus en plus répandu de nanoparticules (NPs) d'or dans des secteurs émergents tels que les biotechnologies, en raison de leurs propriétés optiques remarquables. Pour ces applications, les NPs sont mises en contact avec diverses espèces vivantes, comme les végétaux, et encore trop peu d'informations sont disponibles sur leur impact sur les propriétés mécaniques des plantes vivantes à des concentrations non cytotoxiques. Nous avons synthétisé par voie verte, sans surfactant, des NPs d'or avant de les fonctionnaliser. Leurs propriétés structurales et morphologiques ont été déterminées par des observations et mesures par microscopie électronique en transmission et spectrométrie de diffusion Raman.

Les modifications mécaniques des cellules des feuilles de la plante *Egeria Densa* en présence de ces NPs d'or fonctionnalisées ont ensuite été étudiées par spectroscopie de force par AFM sur des cellules présentes sur l'épiderme de feuilles matures d'*Egeria Densa* immergées dans une solution aqueuse contenant des NPs d'or fonctionnalisées. Des cartographies de force ont révélé une diminution de la rigidité de la paroi cellulaire quelle que soit la fonctionnalisation des NPs, diminution qui peut atteindre un ordre de grandeur avec une forte concentration en NPs et un temps d'exposition important. Après exposition aux NPs, la rigidité de la paroi cellulaire revient quasiment à sa valeur initiale après 4 heures. Ces résultats montrent ainsi que les modifications de la rigidité des parois sont bien dues à la présence des NPs.

Title: Gold nanoparticles and aquatic plants: fundamental interactions and mechanical properties

Keywords: Functionalized gold nanoparticles, force mapping, Raman, AFM tomography, mechanical measurements, TEM

Abstract : Gold nanoparticles are frequently used in emerging fields such as biotechnologies due to their remarkable optical properties. For such applications, these particles are brought in contact with various living samples, such as plant cells. However, little information is available about their impact on the mechanical properties of living plants at sub-cytotoxic levels.

Gold nanoparticles were synthesized without surfactant, before being functionalized. Their structural and morphological properties were determined by observations and measurements by transmission electron microscopy and Raman spectroscopy.

The mechanical modifications of *Egeria Densa* plant leaf cells in the presence of these functionalized gold NPs were then studied by AFM force spectroscopy. Measurements were carried out on cells present on the epidermis of mature *Egeria Densa* leaves immersed in an aqueous solution containing functionalized gold NPs. Force mapping revealed a decrease in cell wall stiffness regardless of NPs functionalization, a decrease that can reach an order of magnitude with high NPs concentration and high exposure time. After exposure to nanoparticles, the rigidity of the cell wall returns almost to its initial value after 4 hours. These results thus show that the modifications of the rigidity of the walls are indeed due to the presence of nanoparticles.