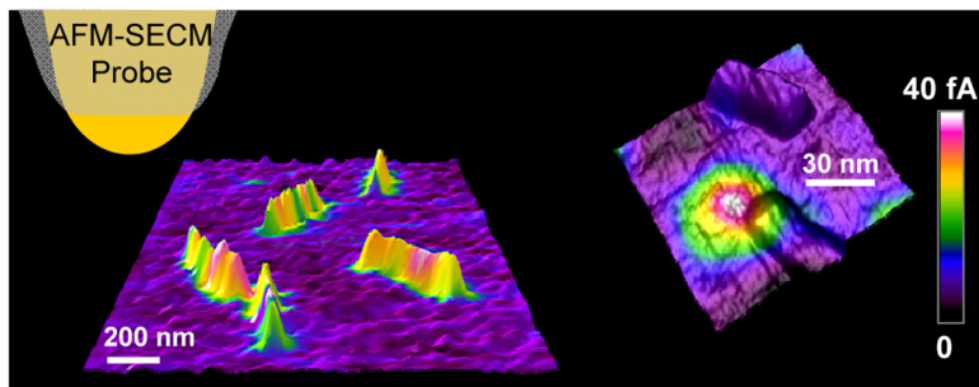


Soutenance de Thèse

En vue d'obtenir le grade de
Docteur de l'Université Paris Diderot
Discipline Chimie - Spécialité : Electrochimie Moléculaire et Biologique

Cécilia TAOFIFENUA

LA MICROSCOPIE ÉLECTROCHIMIQUE À FORCE ATOMIQUE À MÉDIATEUR LIÉ POUR SONDER *IN SITU* L'ORGANISATION SPATIALE DE NANO-OBJETS BIOLOGIQUES FONCTIONNELS : DE LA PARTICULE VIRALE À LA MACROMOLÉCULE INDIVIDUELLE



Thèse présentée et soutenue publiquement
le jeudi 22 octobre 2015 à 14h30, Bât. Lavoisier - 7^e Etage salle 774
15 rue Jean Antoine de Baïf, 75013 Paris

Jury

Directeur de thèse	Dr Christophe Demaille	LEM, Université Paris Diderot / CNRS
Rapporteurs	Pr Guy Denuault Dr Pascal Mailley	Université de Southampton, UK CEA-LETI Grenoble
Examineurs	Dr Thierry Michon Pr Christophe Vieu	BFP, Université Bordeaux 2 / INRA LAAS – CNRS Toulouse

RÉSUMÉ

Ce travail de thèse a été consacré à l'application de la microscopie AFM-SECM à médiateur lié, (Mt/AFM-SECM) à deux domaines apparemment distincts mais ayant en commun la nécessité de développer des approches expérimentales nouvelles permettant des mesures inédites à une échelle nanométrique.

Au premier chapitre, la capacité de la microscopie Mt/AFM-SECM à sonder simultanément les forces locales et la dynamique conformationnelle de macromolécules redox immobilisées a été mise à profit pour la caractérisation d'un système constitué de chaînes poly(éthylène glycol) (PEG) portant une tête redox ferrocène (Fc) et un pied d'ancrage pyrene assemblées sur surface d'HOPG. En utilisant une approche électrochimique multi-échelle, nous avons montré que les chaînes Fc-PEG-Pyrene s'auto-assemblent aisément sur le HOPG pour former une couche extrêmement homogène. Cependant, le caractère adsorbant et fortement hydrophobe des plans graphitiques mène à une structure complexe de la couche qui dépend de la couverture des chaînes PEG en raison de l'interaction entre la tête ferrocène et la surface d'HOPG. Les résultats obtenus ici sont sans nul doute généralisables au cas de chaînes PEG ancrées sur toute surface graphitique (nanotube de carbone, graphène) via un pied pyrène et portant à leur extrémité libre un groupement redox, fluorescent ou liant présentant un certain degré, même faible, d'hydrophobicité.

Le second chapitre de ce travail a été consacré à l'étude par Mt/AFM-SECM d'un système nano-biologique totalement original : des virus de plantes (LMV, PVA) portant des chaînes redox Fc-PEG positionnées à des emplacements prédéfinis le long des particules virales grâce à des anticorps spécifiques. Nous avons démontré que la microscopie Mt/AFM-SECM permettait de localiser les virus immobilisés sur surface d'or, d'imager leur topographie et d'échantillonner ainsi leur disparité topologique, mais aussi d'interroger spécifiquement les fonctions redox qu'ils portent. La distribution statistique de ces fonctions d'un virus à l'autre, mais aussi leur répartition le long des particules virales individuelles, a ainsi pu être étudiée. Ce résultat fait de la Mt/AFM-SECM un outil de caractérisation fonctionnelle unique pour la nanotechnologie virale. Concomitamment nous avons démontré que la microscopie Mt/AFM-SECM à anticorps redox constitue une nouvelle technique d'immuno-imagerie *in situ* capable de localiser *spécifiquement* des protéines exposées à la surface de virus. En réussissant à imager la protéine virale VPg, présente en un seul exemplaire à l'extrémité du virus LMV, nous avons fait la démonstration de la résolution macromoléculaire de cette microscopie combinée, une première pour une microscopie dérivée de la SECM.

PhD Thesis Cécilia Taofifenua

ABSTRACT

This work has been devoted to the application of mediator-tethered (Mt) AFM-SECM microscopy to two different scientific issues sharing a common need for new experimental approaches enabling nano-scale investigations.

In the first chapter the ability of Mt/AFM-SECM to simultaneously probe local forces and conformational dynamics of immobilized redox macromolecules has been used for characterizing the behavior of polyethylene glycol (PEG) chains bearing a redox ferrocene (Fc) head and an anchoring pyrene foot, assembled onto a HOPG surface. We have shown, following a multiscale electrochemical approach, that Fc-PEG-Pyrene chains readily self-assemble onto HOPG to form extremely homogeneous layers. However the strongly hydrophobic adsorbing nature of graphite planes results in a complex coverage-dependent structure of the PEG layer due to the interaction of the ferrocene label and the HOPG surface. The results we obtained are likely to be transposable to the case of PEG chains attached to any HOPG-like surface (carbon nanotube, graphene) via a pyrene ring and end-functionalized by a redox, a fluorescent or a binding probe (e.g. biotin), all typically displaying some degree of hydrophobicity.

In the second chapter of the present work, Mt/AFM-SECM has been used for characterizing an original, genuinely nanometer-sized biological system: plant viruses (LMV, PVA) bearing redox Fc-PEG chains spatially organized on the virus shell through the use of redox labeled antibodies. Acquisition of topography images allowed isolated virus particles to be identified, and structurally characterized, while simultaneous acquisition of current images allowed the redox function of the modified viruses to be probed. As a result, we could reveal the way redox-functionalization was distributed both statistically among the viruses but also spatially over individual viruses. This possibility potentially makes Mt/AFM-SECM a versatile tool in the field of viral nanotechnology.

Concomitantly, we demonstrated that immunoredox Mt/AFM-SECM imaging enables the *in situ* mapping of the distribution of specific proteins on individual virus particles down to the single protein scale. Achieving such a biomolecular resolution is a first for a SECM-based technique.