

**Soutenance de thèse de Khalil CHENIT, 5 October 2018**

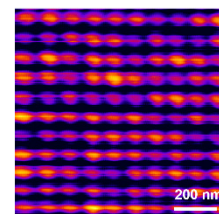
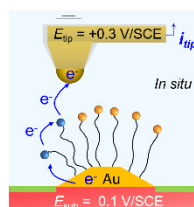
**pour le titre de docteur de l'Université Sorbonne Paris Cité**

*Spécialité Electrochimie Moléculaire - Nanosciences*

**« Combiner nanopuces et microscopie électrochimique à force atomique à médiateur lié  
Mt/AFM-SECM pour l'adressage de biomacromolécules individuelles »**

**Résumé**

L'objectif de ce travail est le développement d'une plateforme expérimentale dédiée à l'adressage électrochimique *séquentiel* de centaines de biomacromolécules individualisées, par la combinaison de la microscopie électrochimique à force atomique à médiateur lié (Mt/AFM-SECM) et de l'emploi de substrats nanostructurés. Ces substrats (nanopuces), développés de manière originale à l'IEMN (Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanoélectronique) de Lille, sont constitués de nanoparticules d'or (nanoplots) d'une taille de ~15 nm disposés suivant un réseau carré au pas de 100 à 200 nm. Ils sont conçus pour permettre l'ancrage de quelques copies, voire de copies uniques, de biomacromolécules à marqueur redox. Sont présentés les résultats obtenus avec : (i) un système moléculaire modèle constitué de chaînes polyéthylène glycol PEG disulfure à tête ferrocene (Fc), (ii) un système immunologique constitué de complexes antigène-anticorps à marqueur Fc-PEG, immobilisés tour à tour sur les nanoplots d'or. Nous montrons que la microscopie Mt/AFM-SECM permet de localiser plusieurs centaines de nanoplots en une seule image tout en réalisant simultanément l'adressage électrochimique des macromolécules redox qui y sont immobilisées. Ainsi la lecture de la nanopuce par Mt/AFM-SECM permettait-elle un gain considérable en sensibilité (en nombre de molécules détectées) et en vitesse de lecture comparée à la lecture de micropuces par microscopie électrochimique classique. L'analyse du système à chaînes Fc-PEG disulfure immobilisées sur nanoplots d'or a également permis l'étude statistique la plus complète à ce jour, en terme de taille de la population sondée, de la réactivité électrochimique de nanoparticules fonctionnalisées.



Pour le système antigène-anticorps, nous rapportons la mise au point d'un protocole de protection de la nanopuce contre l'adsorption non-spécifique des protéines qui permet de guider la formation des immunocomplexes sélectivement à la surface des nanoplots. Nous démontrons par imagerie Mt/AFM-

SECM, couplée à la voltammétrie cyclique, que ce protocole, et la proximité en taille des nanoplots et des anticorps (IgG), permettent l'immobilisation contrôlée d'une seule (ou de quelques) molécule(s) d'IgG par nanoplot. Ainsi avons-nous conçu la première plateforme à nanobiopuce à anticorps individuels et à lecture électrochimique.

*Mots-clés* : Electrochimie, Nanoparticules, Nanopuce à anticorps, Anticorps redox, Fc-PEG, Microscopie électrochimique à force atomique à médiateur lié, Mt/AFM-SECM

#### Commission d'examen :

<b>Directeur de thèse :</b>	<b>Christophe Demaille</b>	LEM, Université Paris Diderot / CNRS
<b>Rapporteurs :</b>	<b>Sabine Szunerits</b>	IEMN, Université de Lille / CNRS
	<b>Pascal Mailley</b>	CEA - LETI Grenoble
<b>Examineurs:</b>	<b>Laurent Bouffier</b>	ISM, Université de Bordeaux / CNRS
	<b>Nicolas Clément</b>	LIMMS, Université de Tokyo / CNRS
<b>Co-directeur</b>	<b>Arnaud Chovin</b>	LEM, IUT Université Paris Diderot / CNRS

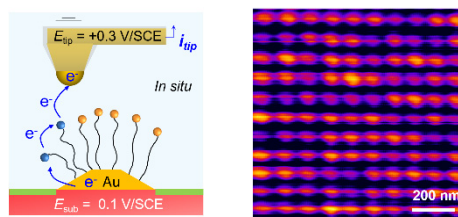
-----

PhD Defense : Khalil CHENNIT, October 5<sup>th</sup> 2018

### « Combining Nanochips and Mediator-tethered Electrochemical Atomic Force Microscopy Mt/AFM-SECM for Addressing Individual Biomacromolecules »

#### Abstract

The objective of this work was the development of an experimental platform dedicated to the sequential electrochemical addressing of hundreds of *individualized* biomacromolecules, by the combination of mediator-tethered electrochemical atomic force microscopy (Mt/AFM-SECM) and the use of nanostructured substrates. These substrates (nanochips), developed in an original work at IEMN (Institute of Electronics of Microelectronics and Nanoelectronics) of Lille, consist of gold nanoparticles (nanodots) with a size of  $\sim 15$  nm arranged in a 100 to 200 nm pitch square lattice. They are designed to enable anchoring of a few copies, or even single copies, of redox-labelled biomacromolecules. Two experimental systems are considered: (i) a model molecular system consisting of polyethylene glycol PEG disulfide chains with ferrocene head (Fc), (ii) an immunological system consisting of Fc-PEG labeled antigen-antibody complexes immobilized on gold nanodots. We show that Mt / AFM-SECM



microscopy can locate several hundred nanoparticles in a single image while simultaneously enabling the electrochemical addressing of the redox macromolecules they bear. Thus the reading of the nanochips by Mt / AFM-SECM allows a considerable gain in sensitivity (in terms of number of molecules detected) and in reading speed compared to the reading of microchips by regular electrochemical microscopy. The analysis of the Fc-PEG disulfide chain system allowed the most comprehensive statistical study to date, in terms of the size of the population surveyed, of the electrochemical reactivity of functionalized nanoparticles.

For the antigen-antibody system, we report the development of a protection protocol for the surface of the nanochips against the non-specific adsorption of proteins, which enables guiding the formation of immunocomplexes selectively on the nanodots. We demonstrate by Mt / AFM-SECM imaging, coupled with cyclic voltammetry, that this protocol, and the proximity in size of nanodots and antibodies (IgG), allow the controlled immobilization of one (or few) IgG molecule(s) per nanodot. We therefore succeeded in designing the first single molecule nanochip-based platform with electrochemical reading.

*Mots-clés* : Electrochemistry, Nanoparticles, Antibody Nanochip, Redox Antibody, Fc-PEG, Mediator Tethered Atomic Force Electrochemical Microscopy, Mt/AFM-SECM

#### **Composition of the jury :**

<b><i>Supervisor:</i></b>	<b>Christophe Demaille</b>	LEM, Université Paris Diderot / CNRS
<b><i>Reviewers :</i></b>	<b>Sabine Szunerits</b>	IEMN, Université de Lille / CNRS
	<b>Pascal Mailley</b>	CEA - LETI Grenoble
<b><i>Examiners:</i></b>	<b>Laurent Bouffier</b>	ISM, Université de Bordeaux / CNRS
	<b>Nicolas Clément</b>	LIMMS, Université de Tokyo / CNRS
<b><i>Co-supervisor</i></b>	<b>Arnaud Chovin</b>	LEM, IUT Université Paris Diderot / CNRS