UNIVERSITÉ DE LORRAINE | BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES

AVERTISSEMENT
DROIT D'AUTEUR

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document. Toute contrefaçon, plagiat ou reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
34 COURS LÉOPOLD — CS 25233
54052 NANCY CEDEX
TÉL : 03 54 50 54 00
CONTACT@UNIV-LORRAINE.FR
WWW.UNIV-LORRAINE.FR

École Doctorale SIMPPE

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : Génie des Procédés et des Produits et des Molécules

par **Sephora LAHOUARI**

Sous la direction de Pr. Ariane BOUDIER et Dr. Jérémie GOUYON

Nanoparticules d'or modifiées par la Concanavaline A : synthèse et étude physico-chimique pour une détection bactérienne efficiente

Le 26 septembre 2025

Membres du jury :

Directrice de thèse :	**Mme Ariane BOUDIER**	**Pr. LRGP, Université de Lorraine, Nancy.**
Co-directeur de thèse :	**M. Jérémie GOUYON**	**MCF. LCPME, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy.**
Président et rapporteur :	**M. Stéphane ROUX**	**Pr. Laboratoire Chrono-environnement, Université Marie et Louis Pasteur, Besançon.**
Rapporteur :	**Mme Fanny D'ORLYÉ**	**MCF. i-CLeHS, Université Paris Sciences & Lettres, Paris.**

Remerciements

Ces travaux de thèse n'auraient pu voir le jour sans Ariane Boudier et Jérémie Gouyon, respectivement directrice et co-directeur de cette thèse. Je vous remercie de m'avoir fait confiance en me proposant ce projet à la fin de mon stage de Master 2. Merci pour votre disponibilité, votre écoute, vos conseils (scientifiques ou non !), votre patience et vos encouragements.

J'exprime mes remerciements à Mme Fanny d'Orlyé, Maîtresse de Conférences à l'Université Paris Sciences & Lettres et à M. Stéphane Roux, Professeur à l'Université Marie et Louis Pasteur pour avoir accepté de rapporter cette thèse ainsi que pour la discussion très enrichissante sur mes travaux lors de la soutenance.

Merci également à Anne Varenne, Professeure à l'i-CLeHS (UMR 8060) et Céline Frochot, Directrice de Recherche au Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (UMR 7274 LRGP) pour avoir fait partie de mon Comité de Suivi Individuel durant ce doctorat et pour les retours scientifiques annuels sur mes travaux.

J'exprime mes remerciements à Grégory Francius, Directeur de Recherche, et Fabienne Quilès, Directrice de Recherche, tous deux du Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement (UMR 7564 LCPME). Merci de votre gentillesse, de m'avoir accueillie et formée à la microscopie à force atomique, l'épifluorescence et la spectroscopie infrarouge.

Merci également à Fabien Picaud, Maître de Conférences à l'Université Marie et Louis Pasteur, Directeur adjoint du laboratoire Soins Intégrés, Nanomédecine, IA & Ingénierie pour la Santé (UMR 4662 SINERGIES) pour avoir participé à ce projet en effectuant les simulations de dynamique moléculaire, merci pour l'enthousiasme sur ce projet et de la collaboration pour notre publication.

Je tiens également à remercier Claire Mangeney, Professeure, et Yun Luo, Chargée de Recherche, toutes deux du Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques (UMR 8601 LCBPT) pour leur implication dans ce projet pour les expérimentations en Raman et SERS.

Je tiens également à remercier Marie-Odile Simonnot, directrice du LRGP de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Un grand merci également à Céline Frochot, Directrice de Recherche et Xavier Framboisier, Ingénieur de Recherche, tous deux responsables de l'axe BioProMo, duquel je fais partie, pour votre accueil.

Cette thèse s'est d'abord initiée au sein du laboratoire Cibles Thérapeutiques, Formulation et Expertise Préclinique du Médicament (UR 3452 CITHEFOR), pour cela, je tiens à remercier l'entièreté du laboratoire pour leur accueil, en particulier Caroline Gaucher et Anne Sapin-Minet, respectivement Directrice et Directrice Adjointe.

Je tiens à remercier particulièrement Alexandra Kleinclauss, Isabelle Fries, Thomas Chaigneau et Arnaud Pallotta, pour tous les moments que j'ai partagés avec vous. Que ce soit les cémantix, les cafés plus ou moins réussis, les croissants (ou pains au raisins) et tous les mots d'encouragements, votre présence n'a été que positive durant cette expérience. Un merci tout particulier à Arnaud, collègue devenu voisin puis mon initiateur à la course à pied. Merci pour les repas et gâteaux, pour les discussions surtout non scientifiques et pour l'accompagnement à

Lyon pour le semi, tout cela a grandement participé à mon évasion (même si juste un instant) de la thèse.

Un remerciement tout particulier aux Dr. Boukoufi Othenin-Girard et Dr. Delaitre (😉). Merci à Célia, d'abord pour l'encadrement durant mon M2 qui a précédé cette thèse. Merci à vous deux d'avoir été présentes et de m'avoir ouvert la voie, merci également pour les fous rires, les larmes et les mots réconfortants et d'encouragements après votre départ. Que le meilleur reste à venir pour vous.

Merci à toutes les personnes du LRGP. Particulièrement les membres de notre équipe, merci à Igor Clarot, pour les corrections et l'aide sur les appareillages et les problèmes à résoudre. Un grand merci également à Benjamin Creusot, notamment pour l'aide sur l'ICP. Merci à Selma Dhifaoui pour sa présence et sa bonne humeur. Merci à Philippe Arnoux d'avoir toujours été disponible pour les formations sur les appareillages, pour les réponses aux diverses questions que j'avais et pour ta sagesse et ta bonne humeur contagieuse. Merci à Céline Frochot, pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ton sourire contagieux.

Un paragraphe de remerciements et de reconnaissance envers les doctorants et jeunes chercheurs du LRGP, plus particulièrement à ceux composant le Bureau des Jeunes Chercheurs dont j'ai fait partie pendant plus d'un an. Merci à tous pour votre bonne humeur, les moments conviviaux, les repas du midis, les afterworks, les sorties, les vendredis midis à la Pépinière et j'en passe. Je vous souhaite à tous bon courage pour la suite. Merci à Alex, Alvina, Amine, Andrés Piña, Andrés Camaño, Apolline, Audrey, Benjamin (les deux !), Boris, Chloé, Darrick, Elise, Fabiola, Juan David, Julien, Kévin, Lilian, Luis, Madi (ma star), Mathilde, Miguel, Romain, Ruddybel Ryma, Théolène, Tessa, Timothée, Ugo et Yann. Morgane et Laure, un merci tout particulier pour avoir été mes colocs de bureau, pour les soirées, les sorties et les moments de détente, votre folie ne sera jamais oubliée. Un merci spécial et qui ne sera jamais suffisant à Adrien, merci d'avoir été la deuxième moitié de notre duo (un peu fou), merci pour le soutien et pour tout le reste que je n'aurais ni les mots, ni le temps de citer.

Merci à mes ami·e·s d'avoir toujours été présents, d'avoir formé ma deuxième famille et d'avoir toujours cru en moi-même quand je n'y arrivais plus. Merci pour tous les moments et pour votre présence dans ma vie qui est l'une des choses que je garde au plus près de mon cœur.

Manon, ma grande sœur d'une autre mère, merci d'être la personne que tu es, merci d'avoir toujours cru en moi, d'avoir toujours été présente, quand ça allait et quand ça n'allait pas, je ne te remercierais jamais assez.

Merci à Lia, *mia cara*, mon autre grande sœur d'une autre mère. Merci pour tout l'amour sororal, pour tous les fous rires et tout le soutien moral que tu m'apportes comme une force inébranlable.

Mélissa, merci d'être autant la voie de la raison que de la folie, merci de tous les mots encourageants, de toutes les sorties et j'en passe qui font partie de moments que je ne pourrais jamais oublier.

Merci à Rebecca et Antoine, pour les sorties, les concerts, les appels, votre soutien ne sera jamais assez remercié.

Merci à Aya, Awa, Coralie, Jade, Lila et Sasha. Peu de mots me viennent pour traduire l'impact de votre présence dans ma vie.

A Sacha pour avoir été présent depuis le début, merci d'avoir enduré mes larmes et d'avoir toujours su trouver les mots.

A Lucien, pour avoir toujours pris de mes nouvelles malgré la distance. Merci pour tout tes encouragements.

A Saphir pour avoir rendu la salle le moment le plus anticipé de la journée.

A Kai pour la présence et le soutien.

Je tiens également à remercier l'entièreté de ma famille, mon petit frère Hilel et ma petite sœur Lilia, je vous souhaite bon courage pour vos études respectives. A mes tantes, oncles, cousins et cousines, merci pour tous vos messages et votre soutien.

Une pensée émue pour mes grands-parents, qui ne sont plus là. J'espère que vous êtes fiers de moi de là où vous vous trouvez.

Finalement, je tiens à remercier mes parents. Je sais que vous avez énormément sacrifié pour nous offrir une vie confortable, en particulier pour mon cursus universitaire. Cette période n'a pas été facile, ni pour moi ni pour vous, mais je sais que je n'aurais pas pu en voir le bout sans votre aide. Un milliard de mercis ne seront jamais suffisants. J'espère que ce travail est à la hauteur de tous ces sacrifices et qu'il vous rendra fiers.



إِنَّ مَعَ ٱلْعُسْرِ يُسْرًا

With hardship comes ease

Valorisation scientifique

Publications

- « Concanavalin A adsorption on gold nanoparticles: Influence of citrate ions on nanoparticle-protein interactions » **Sephora Lahouari**, Jérémie Gouyon, Grégory Francius, Fabien Picaud, Roberta Albino dos Reis, Amedea B. Seabra, Igor Clarot, Ariane Boudier, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 723, 2025. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2025.137370.

- « Adsorption or covalent binding of a lectin to a nanoparticle and their immobilization for biosensing: Is it a compromise between simplicity and performance? » **Sephora Lahouari**, Jérémie Gouyon, Igor Clarot, Ariane Boudier, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 681, 2025. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2025.125831.

- « Alternative Taylor dispersion analysis methodology for studying lectin-corona on gold nanoparticles for carbohydrates sensing » **Sephora Lahouari**, Ariane Boudier, Igor Clarot, Jérémie Gouyon, *Analytical Chemistry*. Volume 97, 2025. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5c02129

Publications hors du domaine de cette thèse

- « Activity and reusability of immobilized gold nanoparticles for the catalysis of both oxidation and reduction reactions » Célia Boukoufi, Ariane Boudier, **Sephora Lahouari**, Jean Vigneron, Igor Clarot, *Results in Chemistry*, Volume 5, 2023, https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.100979.

- « Eco-friendly synthesis and biomedical potential of zinc oxide nanoparticles using *Mentha piperita* aqueous extract: comparative analysis with chemically synthesized and commercial nanoparticles. » Roberta A. dos Reis, Leonardo L. da Silva, Joana C. Pieretti, Benjamin Creusot, **Sephora Lahouari**, Gregory Francius, Ricardo A. G. da Silva, Igor Clarot, Ariane Boudier, Amedea B. Seabra, *Bioprocess and Biosystems Engineering,* 2025. https://doi-org.bases-doc.univ-lorraine.fr/10.1007/s00449-025-03178-6.

Communications

Orales

- Groupement de Recherche Or-nano, 13ème conférence annuelle, du 29 au 31 mai 2024 : « Dynamics of molecular interactions between gold nanoparticles and Concanavalin A »
- Journée de l'école doctorale BioSE, 21 novembre 2023 présentation flash-talk : « Dynamics of molecular interactions between gold nanoparticles and Concanavalin A », **Prix du meilleur flash-talk**.

Affichées

- SFNano Annual Meeting, du 4 au 6 décembre 2023 : « Dynamics of molecular interactions between gold nanoparticles and Concanavalin A »
- Journée de l'école doctorale SIMMPÉ, 19 juin 2024 : « Dynamics of molecular interactions between gold nanoparticles and Concanavalin and Concanavalin A », **Prix du meilleur poster.**

Missions

- Mission de 1 mois (3 au 30 octobre 2023) au Brésil dans le cadre du projet de recherche « Nanoparticules à base de sélénium et d'oxyde de zinc et leur association avec des donneurs d'oxyde nitrique pour des applications biomédicales (OBAMA) » Ph-C983/23. Accueil dans le laboratoire BioNano&Metals de l'Université Fédérale de l'ABC (UFABC) de Santo André.

Tâches accomplies :

- Synthèse et caractérisation de nanoparticules d'oxyde de zinc
- Culture de cellules PC3 (adénocarcinome prostatique) et FN1 (fibroblaste sain)
- Etude de la cytotoxicité des nanoparticules d'oxyde de zinc sur PC3 et FN1
- Participation à une colloque présentant les recherches menées à l'UFABC

Table des matières

Introduction générale 1

Chapitre I 5

1. Etat de l'art 5

1.1. Lectines 5

1.1.1. Historique, définition et classification 5

1.2. Propriétés et domaines d'utilisation 10

1.2.1. Applications antifongiques 10

1.2.2. Applications antivirales 11

1.2.3. Applications antibactériennes 12

1.2.3.1. Structure bactérienne 12

1.2.3.2. Applications antibactériennes des lectines 15

1.3. La Concanavaline A 17

1.3.1. Structure et propriétés 17

1.3.2. Interaction avec les bactéries 21

1.4. Identification de la présence de bactéries 22

1.4.1. Test de culture 22

1.4.2. Tests moléculaires 24

1.5. Les nanoparticules d'or 26

1.5.1. Synthèse 27

1.5.2. Caractérisation 29

1.5.3. Fonctionnalisation de surface 33

1.6. Revue 36

1.7. Objectif de travail 103

1.8. Références 105

Chapitre 2 119

2. Recouvrement dynamique des nanoparticules d'or par la Concanavaline A 119

2.1. Article 1 : *Concanavalin A adsorption on gold nanoparticles: Influence of citrate ions on nanoparticle-protein interactions* 121

2.2. Étude de l'interaction du complexe nanoparticule d'or – Concanavaline A 161

2.2.1. Nanoparticules d'or et fonctionnalisation par la Concanavaline A : synthèse et caractérisation 161

2.2.1.1. Synthèse des nanoparticules d'or 161

2.2.1.2. Méthodes d'obtention des AuNP fonctionnalisées par la ConA 162

2.2.1.2.1. Matériel et méthodes 162

2.2.1.2.2. AuNP fonctionnalisées par la ConA : Etude dans un milieu constitué par du PBS 162

2.2.1.2.3. AuNP fonctionnalisées par la Concanavaline A : Etude dans un milieu constitué d'une solution de citrate de sodium 166

2.2.1.3. Etude de la stabilité des ratios AuNP/ConA. 167

2.2.2. Anisotropie de fluorescence 172

2.2.3. Etude de la conformation de la Concanavaline A par spectroscopie infrarouge 174

2.2.4. AuNP fonctionnalisées par la ConA : Modification chimique avec le 2-iminothiolane 178
2.3. Conclusion 180
2.4. Références 181
Chapitre 3 185
3. Étude par analyse par dispersion de Taylor de de l'interaction de la Concanavaline A avec des nanoparticules d'or et détection de sucres et LPS 185
3.1. L'analyse par dispersion de Taylor 186
3.1.1. Introduction à la TDA et fondement théorique 186
3.1.2. Hypothèse de travail 192
3.1.2.1. Démonstration mathématique du mode dual-erf 195
3.1.2.2. Application 197
3.2. Article 2 : Alternative Taylor dispersion analysis methodology for studying lectin-corona on gold nanoparticles for carbohydrates sensing 199
3.3. Conclusion 240
3.4. Références 241
Chapitre 4 244
4. Interaction des nanoparticules d'or modifiées par la ConA avec *Pseudomonas fluorescens* : une preuve de concept expérimentale 245
4.1. Contexte et hypothèse de travail 246
4.2. Matériel et méthodes 248
4.2.1. Culture bactérienne 248

4.2.2. Préparation des échantillons 248
4.2.2.1. Préparation des lames 248
4.2.2.2. Dépôt des échantillons 249
4.2.3. AFM 253
4.2.4. Epifluorescence 253
4.2.5. Spectroscopie d'Emission Optique à Plasma à Couplage Inductif (ICP-OES) 253
4.2.5.1. Préparation et minéralisation des échantillons 253
4.2.5.2. ICP-OES 254
4.2.6. Spectroscopie Raman-SERS 254
4.3. Résultats et discussion 256
4.3.1. Caractérisation des bactéries par AFM et épifluorescence 256
4.3.2. Étude de l'interaction des AuNP, de la ConA et d'[AuNP-ConA] par AFM .. 257
4.3.3. Détermination de la localisation de l'EPS de P. fluorescens par épifluorescence 261
4.3.4. Quantification d'or par ICP-OES 264
4.3.5. Études en spectroscopies Raman et SERS de l'interaction entre AuNP et ConA 268
4.4. Discussion et perspectives du chapitre 4 273
4.5. Conclusion 277
4.6. Références 278
Conclusion et perspectives 283
Résumé 287

Table des illustrations

Chapitre I

Figure 1. Classification des lectines de plantes, d'après [38]. Les merolectines possèdent un site de reconnaissance, les hololectines en possèdent au moins deux, les chimerolectines possèdent au moins un site de reconnaissance ainsi qu'un domaine protéique ayant 9

Figure 2. Schéma représentatif de la lyse d'un hyphe de champignon entraîné par la liaison d'une lectine à la surface de la paroi. 11

Figure 3. Représentation schématique a) de la fusion cellulaire du virus du VIH via la liaison des glycoprotéines aux récepteurs CD4 et b) de la liaison des lectines aux glycoprotéines empêchant la fusion cellulaire du virus du VIH 12

Figure 4. a) Représentation d'un acide téichoïque b) représentation d'un acide lipotéichoïque et c) Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram positif 13

Figure 5. Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram négatif. 13

Figure 6. Représentation schématique de l'organisation d'un LPS. Les sphères jaunes contenant « P » représentent des groupes phosphates. Chaque hexagone représente un sucre. 14

Figure 7. Représentation schématique de la formation d'un biofilm. 15

Figure 8. Représentation schématique du mode d'action antibactérien d'une lectine. 16

Figure 9. Structure de la Concanavaline A et séquence en acides aminés. D'après l'entrée 1VLN de Protein Data Bank. 18

Figure 10. Biosynthèse de la ConA par permutation circulaire. A) représente l'échange des chaînes A et B de la pro-conA, les blocs gris sont clivés durant la maturation. B) représente le clivage de la liaison peptidique et la formation d'une nouvelle via transpeptidation. Inspiré de [83]. 19

Figure 11. Site de liaison aux sucres et site de coordination aux métaux de la Concanavaline A. La sphère violette représente l'ion Mn2+, la sphère verte représente l'ion Ca2+. Les structures surlignées en vert représentent les acides aminés composant le site de liaison aux sucres de la lectine. Image obtenue via l'entrée 1VLN de Protein Data Bank. 20

Figure 12. Schéma représentatif du protocole de détermination de la concentration en bactérie par la technique de culture. UFC : Unités Formant Colonies. 23

Figure 13. Principe des voies de synthèse top-down et bottom-up. 27

Figure 14. Paramètres notoires de caractérisation d'une AuNP. 29

Figure 15. Représentation du principe de résonance de plasmon localisé dans des AuNP. 31

Chapitre II

Figure 1. Représentation schématique de la synthèse d'AuNP stabilisées par le citrate de sodium. 162

Figure 2. Spectres UV-Visible d'AuNP et d'[AuNP-ConA] 2:1 préparés dans du PBS montrant un déplacement bathochrome ainsi qu'un élargissement du LSPR.. 163

Figure 3. Résultats des DH obtenus en DLS pour [AuNP-ConA] 2:1 préparé dans du PBS sur une durée de 5 jours..... 164

Figure 4. Colonne de SEC après injection des AuNP. On observe un halo rouge correspondant aux AuNP. 165

Figure 5. Spectres UV-visible des différentes fractions de SEC collectées après élution d'[AuNP-ConA]. 166

Figure 6. Spectres UV-Visible d'AuNP et [AuNP-ConA] 2:1 préparé dans du citrate de sodium 1.53 mM. 167

Figure 7. Résultats des DH obtenus pour différents ratios d'[AuNP-ConA] préparés dans du citrate de sodium sur une durée de 5 jours. Résultats exprimés en moyenne et écarts-types sur 3 échantillons indépendants..... 168

Figure 8. Résultats de DLS pour [AuNP-ConA] 1:1 préparé dans du citrate de sodium 1.53 mM sur une durée de 5 jours. 169
Figure 9. Spectres UV-visible d'[AuNP-ConA] 1 :1 préparé dans du citrate de sodium 1.53 mM sur une durée de 5 jours avec l'évolution de la valeur de λ_{max}. Les écarts-types sont calculés sur 3 échantillons individuels. 170
Figure 10. Résultats d'anisotropie de fluorescence pour [AuNP-ConA] 1:1, [AuNP-HSA] 1:1 et les échantillons témoins respectifs. La longueur d'onde d'excitation est de 280 nm les fentes sont fixées à 2 nm. 173
Figure 11. Représentation schématique du principe de la méthode IRRAS a) comparé à la méthode ATR b). 175
Figure 12. Spectres infrarouge d'[AuNP-ConA] 1 :1, [AuNP-HSA] 1 :1 et les témoins respectifs obtenus en IRRAS avec les différentes régions Amide représentées. 176
Figure 13. Représentation schématique du principe de modification chimique de la ConA par le 2-IT pour créer une liaison covalente avec l'AuNP. 179

Chapitre III

Figure 1. Représentation schématique de la TDA en mode pulsé/frontal et des Taylorgrammes obtenus 186
Figure 2. Représentation schématique de la TDA à deux fenêtres de détection. 191
Figure 3. Représentation schématique a) d'un Taylorgramme en mode dual-erf, la partie bleue représente le moment où l'échantillon est poussé par le solvant dans le capillaire. b) du profil du capillaire en mode dual-erf. 193
Figure 4. Représentation de l'obtention des Taylorgrammes i et j obtenus aux deux limites de la prise d'échantillon dans le capillaire. 194
Figure 5. a) représentation graphique de l'évolution de C^{-} en fonction de t_inj et b) méthode de détermination de C^{-}. 197

Figure 6. Taylorgramme d'AuNPs en mode pulsé. Paramètres : Capillaire en silice fondue, longueur du capillaire = 40 cm, Ldet = 30 cm, i.d = 75 µm, tinj = 5 s, pression = 0.4 psi, 514 nm. 198

Chapitre IV

Figure 1. Représentation schématique de la fluorescence de SYBR Green II et ConA-Alexa observée en épifluorescence. EPS : exopolysaccharides. 247

Figure 2. a) Spectres UV-Visible des AuNP, [AuNP-ConA] et [AuNP-ConA] à différentes concentrations en PBS et b) Evolution de la valeur de λ_{max}. 250

Figure 3. Représentation schématique du protocole de développement des lames employées en AFM et épifluorescence. L'étape 3) illustre uniquement la condition d'étude des AuNP mais s'effectue également avec la ConA et [AuNP-ConA]. PDA : Polydopamine. 252

Figure 4. Représentation schématique de l'obtention des surnageants et culots bactériens avec les différentes conditions à évaluer. 254

Figure 5. Caractérisation morphologique de P. fluorescens a) et b) en AFM et c) en épifluorescence. Les flèches blanches désignent les flagelles de la bactérie. 256

Figure 6. Clichés 2D d'AFM représentant P. fluorescens à 2 h et 4 h dans les différentes conditions. 258

Figure 7. Clichés 3D d'AFM représentant P. fluorescens à 2 h et 4 h dans les différentes conditions. 259

Figure 8. Représentation schématique des différentes structures observées en AFM. 261

Figure 9. Clichés d'épifluorescence de P. fluorescens à 2 h et 4 h dans les différentes conditions ainsi que les témoins associés. 262

Figure 10. Résultats de quantification d'or en ICP-OES dans deux conditions de P. fluorescens (2 h et 4 h) dans différentes conditions. LOQ : limite de quantification. 265

Figure 11. a) Photographie au microscope de la poudre de ConA, b) spectre Raman non-corrigé et c) spectre Raman corrigé de la poudre de ConA. 269
Figure 12. a) Photographie au microscope d'une goutte d'AuNP séchée, b) spectre Raman non-corrigé et c) spectre Raman corrigé des AuNP. 270
Figure 13. a) Photographie au microscope d'une goutte des [AuNP-ConA] séchée, b) spectre Raman non-corrigé et c) spectre Raman corrigé d'[AuNP-ConA] 271
Figure 14. Spectres Raman de la poudre de ConA, AuNP et [AuNP-ConA] superposés..... 272
Figure 15. Structure dimérique de la lectine HPA avec sa séquence en acides aminés. Provenant de l'entrée 2CE6 de ProteinDataBank. Les sphères représentent des molécules d'H2O..... 274

Table des tableaux

Chapitre I

Tableau 1. Récapitulatif des lectines les plus recensées dans la littérature ainsi que leur spécificité de reconnaissance. 6

Tableau 2. Comparaison des conditions des méthodes de synthèse de Turkevich et Brust et la taille des AuNP associées. 28

Chapitre II

Tableau 1. Récapitulatif des ratios molaires de ConA pour AuNP testés. 162

Chapitre IV

Tableau 1. Résultats de la quantité d'or retrouvée en ICP-OES pour chaque fraction et condition. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type de 3 échantillons 266

Liste des abréviations

[AuNP-ConA] : Nanoparticules d'or modifiées par la Concanavaline A
[AuNP-HPA] : Nanoparticules d'or modifiées par Helix Pomatia
[AuNP-HSA] : Nanoparticules d'or modifiées par l'Albumine de Sérum Humain
2-IT : 2- Iminothiolane
AAL : *Aleuria aurantia* Lectin
ABL : *Agaricus bisporus* Lectin
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AFM : Microscopie à Force Atomique
AgNP : Nanoparticules d'Argent
AH : Actinohivin
ARN : Acide RiboNucléique
ATR : Réfléxion Totale Atténuée
AuNP : Nanoparticules d'Or
BGN : Bactérie à Gram Négatif
BGP : Bactérie à Gram Positif
BmoLL : *Bauhinia monandra Lectin*
BPL : *Bauhinia purpurea* Lectin
BSA : Albumine de Sérum Bovin
ConA : Concanavaline A
Cramoll : *Cratyllia mollis* Lectin
CV-N : Cyanovirin-N
D : Coefficient de diffusion
DAD : Détecteur à barrette de diodes
Dc : Diamètre de cœur
Dh : Diamètre hydrodynamique
DHLA : Acide Diydroipoïque
DLS : Diffusion Dynamique de la Lumière
DM : Dynamique Moléculaire
DO : Densité Optique
DSL : *Datura stramonium* Lectin
ECL : *Erythrina cristagalli* Lectin
EDC : 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EHL : *Eranthis hyemalis* Lectin
EPS : Exopolysaccharides
FTIR : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
GNA : *Galanthus nivalis* Agglutinin
GRFT : Griffithsin
GS II : *Griffonia simplicifolia* Lectini
GSH : Glutathion réduit
HPA : *Helix pomatia* Agglutinin
HSA : Albumine de Sérum Humain
ICP-OES : Spectroscopie d'Emission Optique à Plasma à Couplage Inductif
IRRAS : Spectroscopie Infrarouge de Réfléxion Absorption
LAMP : Amplification Isotherme Médiée par les Boucles
LB : Luria-Bertani
LCA : *Lens culinaris* Agglutinin
LEL : *Lycopersicon esculentum* Lectin
LFA : Test à Flux Latéral
LOD : Limite de Détection
LPS : Lipopolysaccharide
LSPR : Résonance de Plasmon de Surface Localisée
LTA : *Lotus tetragonolobus* lectin
LVA : *Leucojum vernum* Agglutinin
MAA II : *Maackia amurensis* Lectin
MBL : Mannan-binding Lectin
MGL : Macrophage Galactose-like Lectin
NASBA : Amplification Basée sur la Séquence d'Acide Nucléique
NGS : Séquençage de Nouvelle Génération
NHS : N-hydrosuccinimide
NP : Nanoparticule
OniL : *Oreochromis niloticus* Lectin
PBS : Tampon Phosphate Salin
PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase
PDA : Polydopamine
Pe : Nombre de Péclet
PEG : Polyéthylène Glycol
PgTeL : *Punica granatum sarcotesta* Lectin
PHA : Phytohemagglutinin Lectin
PNA : Peanut Agglutinin
PWM : Pokeweed Mitogen Lectin
QD : Quantum Dot
RCA : *Ricinus communis* Agglutinin
SBA : Soybean Agglutinin
SEC : Chromatographie d'Exclusion Stérique
SERS : Diffusion Raman Exaltée de Surface
SiNP : Nanoparticules de Silice
SNA : *Sambucus nigra* Agglutinin
SPR : Résonance de Plasmon de Surface
SteLL : *Schinus terebinthifolia* Lectin
TDA : Analyse par Dispersion de Taylor
TEL : *Talisia esculenta*
TEM : Microscopie Electronique à Transmission

TiO2 NP : Nanoparticules d'Oxyde de Titane
TOAB : Bromure de tétraoctylammonium
UEA1 : *Ulex europaeus* agglutinin-1 Lectin
UFC : Unité Formant Colonie
UV : Ultraviolet
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
WFL : *Wisteria floribunda* Lectin
WGA : Wheat Germ Agglutinin
WGS : Séquençage de Génome Complet
ZnO NP : Nanoparticules d'Oxyde de Zinc

Introduction générale

Introduction générale

L'étude des nanoparticules (NP), particules dont les trois dimensions sont comprises entre 1 et 100 nm, connaît un essor depuis plusieurs décennies. Plus particulièrement, les nanoparticules d'or (AuNP) sont employées pour leurs propriétés optiques mais également pour la facilité de modification de leur surface. En effet, il existe un grand nombre de méthodes permettant d'ajouter des molécules d'intérêt, acides aminés ou protéines à leur surface afin de leur conférer de nouvelles propriétés. Parmi les protéines d'intérêt, ce travail se concentrera sur les lectines, isolées à partir de différents organismes dont les plantes et qui peuvent reconnaître différents sucres. En ajoutant des lectines à la surface d'AuNP, il est possible de créer une sonde pouvant reconnaître des sucres tout en profitant des propriétés intrinsèques notamment optiques des AuNP. Cela peut amener à la création d'un système de détection des sucres. Cette sonde peut être mise à profit pour la détection d'espèces bactériennes. En effet, les bactéries possèdent des structures comportant des motifs sucrés au niveau de leur paroi externe qui varient en fonction de la souche bactérienne considérée. Par conséquent, il sera alors possible de proposer une méthode alternative de détection bactérienne, efficiente, c'est-à-dire : rapide, spécifique et sensible grâce à la combinaison des propriétés des AuNP et de la / des lectine(s). En utilisant différents types de lectines reconnaissant de manière spécifique les sucres en fonction de la souche bactérienne, nous pouvons imaginer un laboratoire-sur-puce utilisable en *point-of-care.* Ce projet de thèse présente un premier travail sur le développement et la caractérisation d'AuNP modifiées par la lectine Concanavaline A (ConA) ainsi que leur interaction avec une bactérie.

Ce manuscrit est composé de quatre chapitres. Le chapitre I établit l'état de l'art, il présente les lectines, leurs propriétés et applications et y décrit plus particulièrement la Con A, la lectine majoritairement employée durant ce travail de thèse. Ce chapitre présente également les méthodes actuelles de détection bactérienne, reposant sur les méthodes de culture et les méthodes moléculaires. Par la suite, les AuNP seront discutées : leur synthèse, caractérisation et propriétés seront décrites ainsi que les différentes méthodes de modification de surface. Finalement, cet état de l'art se conclut par une revue de la littérature portant sur le développement et la caractérisation de nanomatériaux fonctionnalisés par des lectines pour la formation de capteurs pouvant être utilisés pour le ciblage de cellules cancéreuses, la détection de pathogènes ou encore la vectorisation de molécules thérapeutiques (**Article 1** : **Sephora Lahouari**, Jérémie Gouyon, Igor Clarot, Ariane Boudier, Adsorption or covalent binding of a lectin to a nanoparticle and their immobilization for biosensing: Is it a compromise between simplicity and performance? *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 681, 2025).

Le chapitre II présente la modification d'AuNP par la ConA. Il établit grâce à plusieurs méthodes sa caractérisation physico-chimique et le mode de liaison en jeu entre les deux composés. Ces expérimentations ont été confrontées à des simulations de dynamique moléculaire (DM) permettant de lier la théorie à la pratique. Ce chapitre comporte un article expérimental (**article 2**) associé à ces résultats (**Article 2** : **Sephora Lahouari**, Jérémie Gouyon, Grégory Francius, Fabien Picaud, Roberta Albino dos Reis, Amedea B. Seabra, Igor Clarot, Ariane Boudier, Concanavalin A adsorption on gold nanoparticles: Influence of citrate ions on nanoparticle-protein interactions, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 723, 2025). Le chapitre comporte également des résultats complémentaires à ceux présentés dans l'article.

Le chapitre III est consacré à une nouvelle méthode mathématique pour le traitement de données de l'Analyse de Dispersion de Taylor. Ce chapitre établit le contexte d'utilisation de cette méthode et la théorie qui lui est associée. Le chapitre III emploie cette méthode de manière à proposer une alternative à la caractérisation de taille des AuNP modifiées par la ConA. Dans ce chapitre nous étudions également la variation de taille de ce complexe en présence de différents sucres et de structures bactériennes, les lipopolysaccharides (LPS), étant censés ou non être reconnus par la ConA. Ce chapitre se termine par un article accepté dans le jounal *Analytical Chemistry* (**Article 3** : **Sephora Lahouari**, Jérémie Gouyon, Igor Clarot, Ariane Boudier, Alternative Taylor dispersion analysis methodology for studying lectin-corona on gold nanoparticles for carbohydrates sensing).

Le chapitre IV comporte une étude des AuNP modifiées par la ConA en lien direct avec une bactérie, *Pseudomonas fluorescens*. Ce chapitre n'est, actuellement, pas valorisé par une publication car des expérimentations complémentaires sont toujours en cours. Néanmoins, ce chapitre présente des résultats en épifluorescence et en Microscopie à Force Atomique (AFM) permettant d'observer la localisation des AuNP, de la ConA et des AuNP modifiées par la ConA lorsque ceux-ci sont dans un milieu contenant une bactérie caractérisé par une paroi pouvant être reconnues par la ConA. Le chapitre IV comporte également des expérimentations en spectroscopies Raman et diffusion Raman exaltée de surface (SERS) sur l'interaction des AuNP et de la ConA et seront complétées avec des spectres comportant les bactéries incubées avec les différentes conditions.

Finalement, le manuscrit se termine par une discussion générale répondant aux objectifs et hypothèses posés pendant ce doctorat. Cette partie comporte une conclusion des travaux menés durant ce projet et propose des perspectives d'ouverture permettant d'apporter des réponses aux questions soulevées durant ce travail.

Chapitre I

État de l'art

Chapitre I

1. Etat de l'art

1.1. Lectines

1.1.1. Historique, définition et classification

La recherche concernant les lectines a débuté il y a plus d'un siècle. En 1888, les travaux de thèse de Stillmark ont décrit une protéine toxique provenant des graines du ricin commun (***Ricinus communis***) [1]. Cette protéine, alors qualifiée de « ricin », a démontré une activité d'hémagglutination, *i.e.* qu'elle peut agréger les globules rouges. Ce n'est que plus tard, après l'établissement des critères de classification des lectines, que cette protéine a été définie comme la première lectine décrite. En 1919, l'étude de Sumner a décrit le processus de purification et de cristallisation de la Concanavaline A (ConA), extraite des graines du pois sabre blanc (***Canavalia ensiformis***) [2], qui deviendra une des lectines les plus étudiées à ce jour. Ce n'est que quelques années après la découverte de la première lectine qu'une étude met en lumière que l'activité d'hémagglutination est dépendante du groupe sanguin et qu'il n'y a pas de spécificité pour les antigènes M, N ou Rh [3]. Plus tard, une autre découverte s'ajoute à la précédente, montrant que l'ajout de sucres spécifiques à chaque type de globule rouge peut bloquer l'agglutination par la lectine [4]. C'est cette étude qui a permis de comprendre le mécanisme d'agglutination des lectines *via* la reconnaissance des sucres à la surface des cellules. Finalement, en 1954, Boyd et Shapleigh proposent le terme « lectine » de manière à remplacer le terme « hémagglutinines » jusque-là utilisé. Le mot lectine provient du Latin ***lego/legere***, signifiant « choisir » ou « sélectionner » [5]. Plusieurs définitions des lectines ont été successivement proposées. La première énoncée par Goldstein en 1980 les définissaient comme des protéines se liant aux sucres, d'origine non immunitaire, et qui agglutinent les cellules et/ou précipitent les glycoconjugués [6]. Cette définition a ensuite été étendue en y ajoutant la notion de reconnaissance spécifique, de liaison réversible aux sucres et la non altération de la structure des ligands reconnus [7]. La définition la plus généralement acceptée a été décrite en 1995, indiquant que les lectines peuvent être décrites comme toute protéine possédant au moins un site non-catalytique et qui se lie de manière réversible à un mono ou oligosaccharide spécifique [8]. Compte tenu de la présence des lectines aussi bien dans les plantes que chez les animaux ou les champignons, de la diversité structurale et des différents motifs reconnus, la classification des lectines peut être assez délicate. Le tableau 1 recense

certaines des lectines les plus citées ainsi que leur provenance et les sucres de reconnaissance associés.

Il reste important de noter que la première lectine du règne animal a été décrite en 1968 et est connue comme le récepteur d'Ashwell-Morell. Il s'agit d'un récepteur hépatique pour les glycoprotéines portant des chaînes glyquées ne contenant pas d'acide sialique [9], [10].

Tableau 1. Récapitulatif des lectines les plus recensées dans la littérature ainsi que leur spécificité de reconnaissance.

Provenance	Lectine et abréviation	Source	Spécificité aux sucres	Références
Plantes	Aleuria aurantia Lectin (AAL)	*Aleuria aurantia*	Fucose	[11]
	Bauhinia monandra Lectin (BmoLL)	*Bauhinia monandra*	Galactose	[12]
	Bauhinia purpurea Lectin (BPL)	*Bauhinia purpurea*	Galactose LacNAc	[11]
	Cratylia mollis Lectin (Cramoll)	*Cratylia mollis*	Mannose Glucose	[13]
	Concanavaline A (ConA)	*Canavalia ensiformis*	Mannose Glucose	[14]
	Datura stramonium Lectin (DSL)	*Datura stramonium*	Oligomères de GlcNAc	[15]
	Erythrina cristagalli Lectin (ECL)	*Erythrina cristagalli*	Galactose	[16]
	Eranthis Hyemalis Lectin (EHL)	*Eranthis hyemalis*	GalNAc	[17]
	Galanthus nivalis Agglutinin (GNA)	*Galanthus nivalis*	Mannose	[18]
	Griffonia simplicifolia Lectin (GS II)	*Griffonia simplicifolia*	GlcNAc	[19]
	Jacalin	*Artocarpus integrifolia*	Galα(1,6)/Galβ(1, 3)GalNAc	[20]

Lens Culinaris Agglutinin (LCA)	*Lens culinaris*	Mannose Glucose	[21]
Lycopersicon esculentum Lectin (LEL)	*Lycopersicon esculetum*	GlcNAc polyLacNAc Chitine	[11]
Lotus tetragonolobus lectin (LTA)	*Lotus tetragonolobus*	Fucose	[22]
Leucojum vernum Agglutinin (LVA)	*Leucojum vernum*	Mannose	[23]
Maackia amurensis Lectin (MAA II)	*Maackia amurensis*	Acide sialique	[11]
Punica granatum sarcotesta Lectin (PgTeL)	*Punica granatum*	Chitine	[24]
Phytohemagglutinin Lectin (PHA)	*Phaseous vulgaris*	GlcNAc Mannose	[25]
Peanut Agglutinin (PNA)	*Arachis hypogaea*	Galβ(1→3)GalNAc	[26]
Pokeweed Mitogen Lectin (PWM)	*Phytolacca americana*	di-N-acétylchitobiose	[15]
Ricinus Communis Agglutinin (RCA)	*Ricinus communis*	Résidus Beta-d-galactosyl	[27]
Soybean Agglutinin (SBA)	*Glycine max*	GalNAc	[28]
Sambucus nigra Agglutinin (SNA)	*Sambucus nigra*	Neu5Ac(α2-6)Gal/GalNAc	[29]
Schinus terebinthifolia Lectin (SteLL)	*Schinus terebinthifolia*	Chitine	[30]
Ulex europaeus agglutinin-1 Lectin (UEA1)	*Ulex europaeus*	Fucose	[31]
Wisteria floribunda Lectin	*Wisteria floribunda*	GalNAc Galactose	[15]

	(WFL) Wheat Germ Agglutinin (WGA)	*Triticum vulgaris*	GlcNAc Chitine	[32]
Animales	Lectine de type C	Œuf de poule	Mannose Fucose GlcNAc	[33]
	Lectine de type C DC-SIGN	Lectine de surface des cellules dendritiques myéloïdes	Mannose Antigènes de Lewis	[15]
	Mannan-binding Lectin (MBL)		Mannose GlcNAc ManNAc Fucose Glucose	[34]
	Macrophage Galactose-like Lectin (MGL)	Macrophages et cellules dendritiques	GalNAc	[35]
	Oreochromis niloticus Lectin (OniL)	*Oreochromis niloticus*	Mannose	[36]
Champignons	Agaricus bisporus Lectin (ABL)	*Agaricus bisporus*	Galβ1-3GalNAcα GlcNAc	[37]

Galα(1,6)/Galβ(1,3)GalNAc : Galactose β(1-3- [Galactose α(1-6)] N-acétylgalactosamine, Galβ(1→3)GalNAc : N-acétyllactosamine, GalNAc : N-acetylgalactosamine, GlcNAc : N-acetylglucosamine, ManNac : N-acetylmannosamine, Neu5Ac(α2-6)Gal/GalNAc : acide α2-6-sialyl-galactose, polyLacNAc : poly-N-acétyllactosamine

Les lectines peuvent également être classifiées selon leurs sites de reconnaissance, structure et affinité envers les différents motifs sucrés. La classification des lectines de plantes selon ces critères est représentée dans la Figure 1 ci-dessous. Les lectines animales et de champignons possèdent leur propre classification mais ne sont pas décrites ici puisque cette thèse se focalise essentiellement sur une lectine issue du règne végétal.

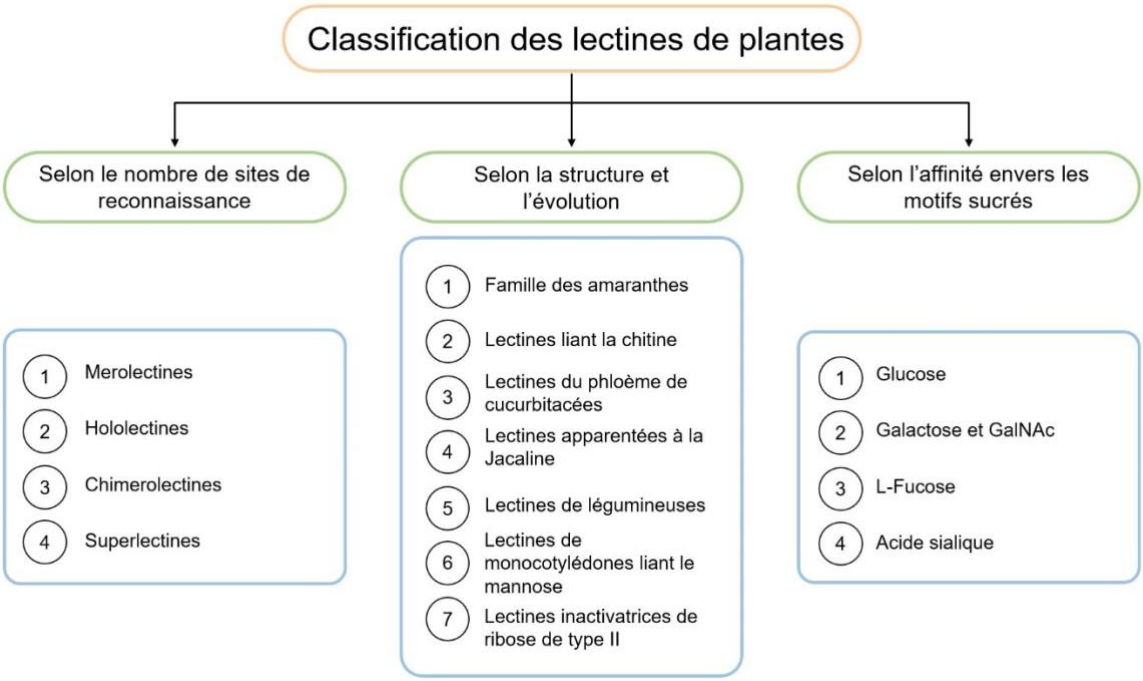


Figure 1. Classification des lectines de plantes, d'après [38]. Les merolectines possèdent un site de reconnaissance, les hololectines en possèdent au moins deux, les chimerolectines possèdent au moins un site de reconnaissance ainsi qu'un domaine protéique ayant

1.2. Propriétés et domaines d'utilisation

La capacité des lectines à reconnaître les sucres est le mécanisme clé contribuant aux propriétés attribuées à celles-ci. Les lectines se lient aux sucres principalement *via* des liaisons hydrogènes [38], [39], des liaisons van der Waals [40] et par des forces hydrophobes [41].

Comme mentionné plus haut, les lectines ont été découvertes et décrites pour la première fois grâce à leurs propriétés d'hémagglutination. Cependant, il ne s'agit pas de la seule activité attribuée à cette famille de protéines. Bien que la première lectine ait été décrite en 1888, c'est en 1976 qu'une étude attribue pour la première fois un rôle physiologique à l'une d'elle. Dans cette étude, de la farine de niébé est artificiellement assemblée sous forme de graines auxquelles différentes concentrations de lectine issue du pois noir (*Phaseolus vulgaris*) PHA-L (Phaseolus vulgaris Lectin) sont ajoutées. Cette farine a été utilisée pour nourrir des larves de Bruches du Niébé (***Callosobruchus maculatus***). Les résultats de l'étude ont montré que le taux de survie de ces larves était plus élevé pour les conditions de farine contenant le moins de lectine, concluant que cette lectine possède un rôle insecticide bénéfique pour la plante hôte [42]. Aujourd'hui, de nombreuses études recensent les activités antifongiques [43], [44], [45], antibactériennes [46], [47] et antivirales [48], [49] des lectines, notamment grâce à leur capacité à se lier aux sucres.

1.2.1. Applications antifongiques

En 1999, une étude se focalise sur l'activité antifongique de la WGA envers deux espèces fongiques pathogènes : *Fusarium graminearum* et *Fusarium oxysporum* [50]. La fonction protectrice de la lectine contre l'invasion par la décomposition des germes y est décrite. De plus, les résultats supportent les hypothèses selon lesquelles l'action antifongique des lectines passe par la modification morphologique des champignons. Les propriétés antifongiques sont dues à la formation d'une liaison entre la WGA et la surface des champignons *via* la chitine. Cette action engendre la lyse de l'apex des hyphes, un gonflement et la vacuolisation des composants cellulaires (une représentation schématique est présentée en Figure 2). Plus tard, l'utilisation de la lectine *Talisia esculenta* (TEL) montre également une activité antifongique en inhibant la croissance de *Microsporum canis via* la liaison de la TEL grâce à sa spécificité envers la chitine et le D-mannose sur la paroi de la conidie, un spore permettant la multiplication asexuée des champignons [51].

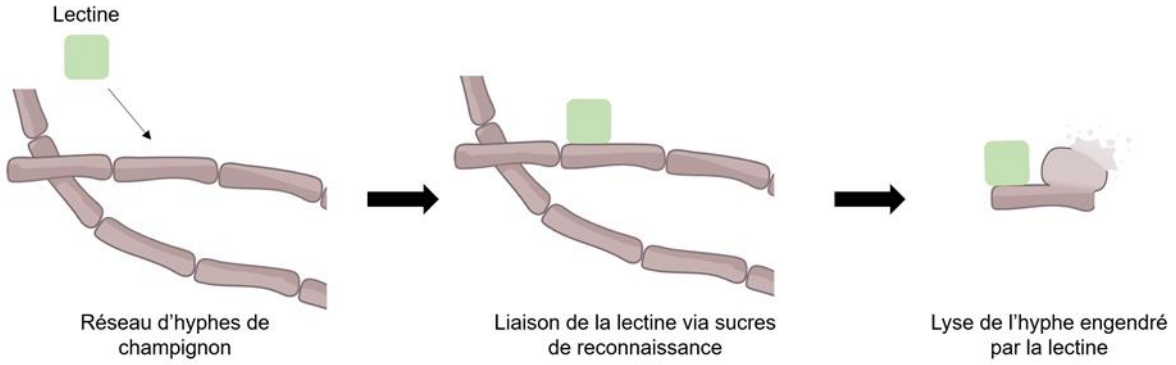


Figure 2. Schéma représentatif de la lyse d'un hyphe de champignon entraîné par la liaison d'une lectine à la surface de la paroi.

1.2.2. Applications antivirales

Les lectines possèdent également des propriétés antivirales découlant de leur capacité à se lier aux sucres. Les lectines sont particulièrement attractives dans la recherche contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [52], [53], [54] puisqu'elles peuvent inhiber l'entrée du VIH dans les cellules. En effet, l'entrée du virus dans les cellules est médiée par la liaison des glycoprotéines, de l'enveloppe virale aux récepteurs cellulaires. Cette entrée est donc inhibée *via* la liaison aux sucres présents sur l'enveloppe du VIH. La glycoprotéine gp120 se lie au récepteur CD4 et à un corécepteur (CCR5 ou CXR4) et la glycoprotéine gp41 médie la fusion du virus à la cellule. Ces deux glycoprotéines étant fortement glycosylées, l'utilisation de lectines permet à celles-ci de se lier et de former des interactions multivalentes avec les glycoprotéines. Par conséquent, en bloquant les glycoprotéines responsables de l'entrée du VIH dans les cellules, les lectines empêchent la propagation du virus. Le mécanisme d'action décrit ci-dessus est représenté de manière schématique en Figure 3. Des lectines déjà décrites comme possédant cette activité sont la Cyanovirin-N (CV-N), la Griffithsin (GRFT), l'Actinohivin (AH), la lectine de la banane (*Musa Acuminata*) et la lectine du perce-neige (*Galanthus nivalis*, GNA) entre autres [55].

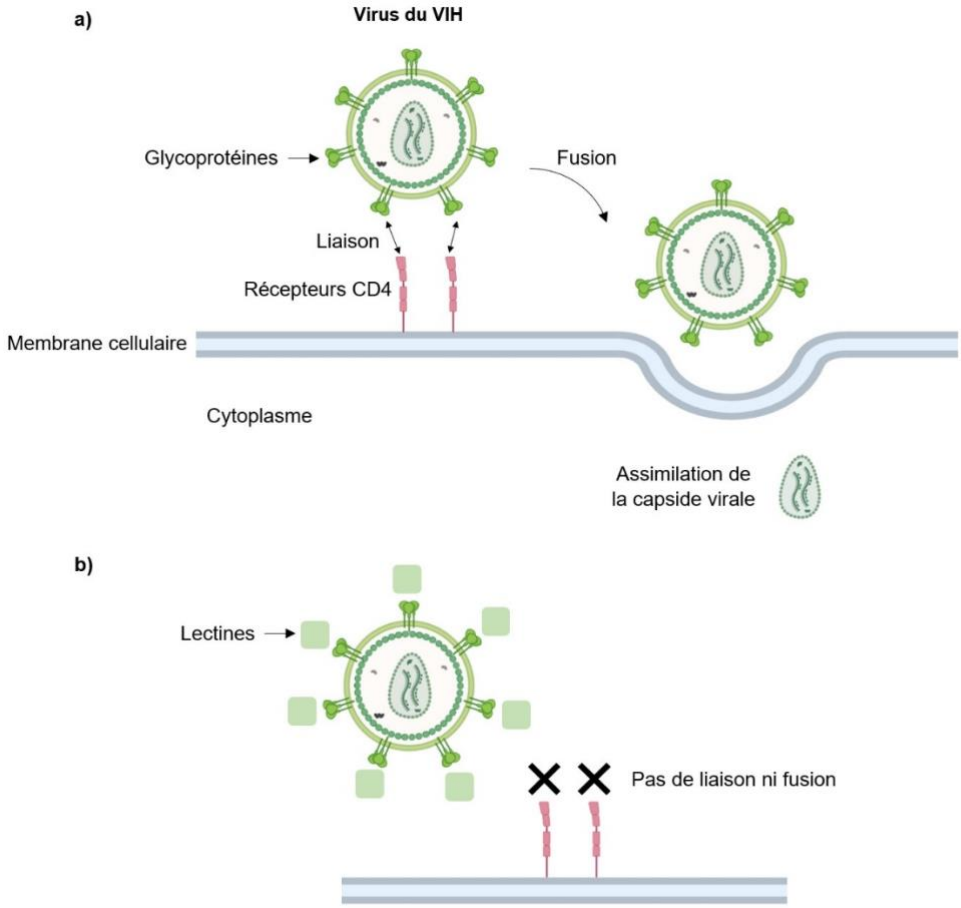


Figure 3. Représentation schématique a) de la fusion cellulaire du virus du VIH via la liaison des glycoprotéines aux récepteurs CD4 et b) de la liaison des lectines aux glycoprotéines empêchant la fusion cellulaire du virus du VIH

1.2.3. Applications antibactériennes

Les lectines possédant des actions antibactériennes, une partie exposant la description de la structure de bactéries est présentée ci-dessous.

1.2.3.1. Structure bactérienne

Les bactéries à Gram positif (BGP) et bactéries à Gram négatif (BGN) se distinguent principalement par la composition et l'organisation de leur paroi cellulaire, malgré le partage de caractéristiques communes telles que la présence de membrane plasmique et un matériel génétique non compartimenté. Les BGP possèdent une paroi épaisse composée de plusieurs couches de peptidoglycane, souvent associées à des acides téichoïques et lipotéichoïques, qui leur confère une rigidité et participent à la virulence des bactéries [56], [57] (Figure 8). Cette structure leur confère une certaine sensibilité aux antibiotiques ciblant la synthèse du peptidoglycane, comme les β-lactamines [57].

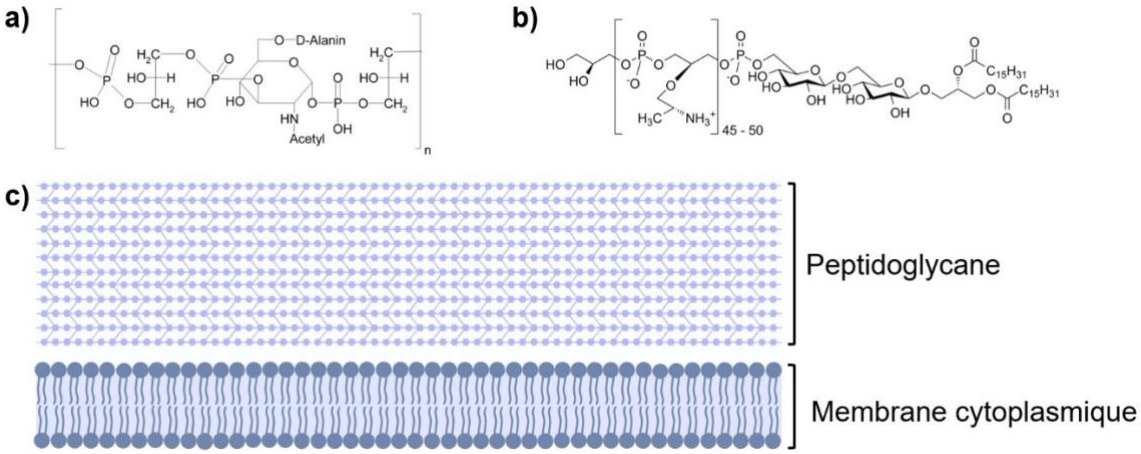


Figure 4. a) Représentation d'un acide téichoïque b) représentation d'un acide lipotéichoïque et c) Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram positif

A l'inverse, les BGN présentent une paroi plus fine en peptidoglycane, localisée dans l'espace périplasmique entre la membrane plasmique interne et une membrane externe additionnelle [58] (Figure 9). Cette dernière est riche en LPS et joue un rôle clé dans la résistance aux agents chimiques et dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte, notamment lors de la libération d'endotoxines en cas de lyse bactérienne [58].

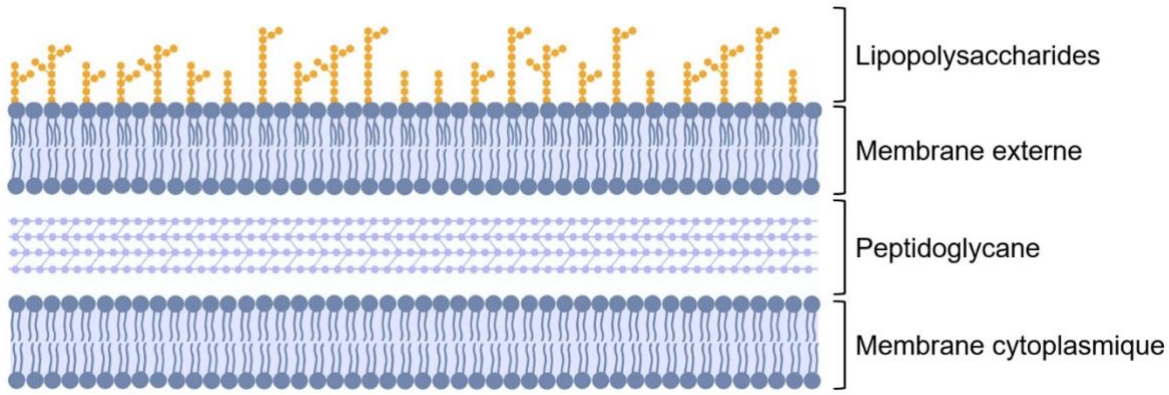


Figure 5. Représentation schématique de la paroi des bactéries à Gram négatif.

Les LPS sont des structures glycolipidiques ancrées à la membrane externe des BGN et sont l'élément responsable de la réponse immunitaire de l'hôte lors d'une infection. Le LPS est attaché à la membrane externe bactérienne via une structure appelée le lipide A, partie la plus bioactive du LPS [59]. La chaîne du LPS est composée de deux parties : le noyau interne qui est directement relié au lipide A et le noyau externe (Figure 10). Ces deux parties sont composées de répétitions de différents saccharides avec comme distinction entre ces deux

régions, le fait que les sucres composant le noyau interne sont peu usuels et beaucoup plus conservés (*i.e* les mêmes sucres sont retrouvés avec très peu de variation) que ceux constituants le noyau externe [60]. À la partie apicale du LPS se trouve une région très variable dénommée l'antigène O. Il est constitué d'une répétition de sucres et varie fortement d'une espèce à une autre, lui conférant une identité antigénique spécifique. Le LPS peut également modifier sa composition pour échapper à la reconnaissance du système immunitaire de l'hôte [61].

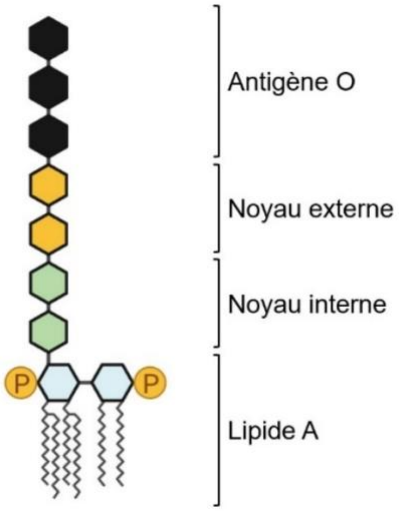


Figure 6. Représentation schématique de l'organisation d'un LPS. Les sphères jaunes contenant « P » représentent des groupes phosphates. Chaque hexagone représente un sucre.

Les bactéries sont capables de s'organiser en communautés structurées appelées biofilms. La formation d'un biofilm commence par l'adhésion réversible de cellules bactériennes à une surface, suivie d'un ancrage irréversible facilité par la production d'exopolysaccharides (EPS) et d'autres composants de la matrice extracellulaire [62]. Cette matrice, composée principalement de polysaccharides, de protéines, d'acide désoxyribonucléique (ADN) extracellulaire et d'ions [63] confère au biofilm une très bonne résistance aux agents antimicrobiens et aux conditions environnementales défavorables. Les bactéries communiquent entre elles à travers des signaux chimiques, un phénomène connu sous le nom de quorum sensing, qui régule l'expression coordonnée de gènes impliqués dans la virulence, la résistance et la dispersion cellulaire [64].

Les biofilms et leur formation sont par conséquent la source de défis majeurs en santé humaine. Ils sont responsables d'environ 60% des infections nosocomiales, notamment sur les dispositifs médicaux tels que cathéters, prothèses et valves cardiaques [65]. Les bactéries comme Staphylococcus aureus et Pseudomonas aeruginosa forment des biofilms robustes qui

favorisent la persistance de l'infection et la résistance aux traitements conventionnels, en partie grâce à la diffusion limitée des antibiotiques à travers la matrice et à la présence de cellules persistantes, peu sensibles aux agents bactéricides [66]. De plus, la structure du biofilm facilite le transfert horizontal de gènes de résistance, accélérant ainsi l'émergence de souches multirésistantes [67].

Les biofilms possèdent un rôle environnemental ambivalent. D'une part, ils participent à des processus écologiques bénéfiques, tels que la dépollution des eaux usées [68] ou la bioremédiation des sols contaminés par des métaux lourds [69]. D'autre part, ils peuvent causer des problèmes majeurs, notamment au sein des réseaux d'eau potable où la colonisation par des bactéries pathogènes comme *Legionella pneumophila* conduit à des épidémies de légionellose [70]. Les biofilms présents sur les surfaces végétales ou dans les sols agricoles peuvent également favoriser la transmission de phytopathogènes (organisme capable d'infecter les végétaux) et la dissémination de gènes d'antibiorésistance, surtout dans des contextes d'utilisation intensive d'engrais organiques ou de traitements phytosanitaires [71]. Le mécanisme de la formation d'un biofilm est représenté en Figure 1.

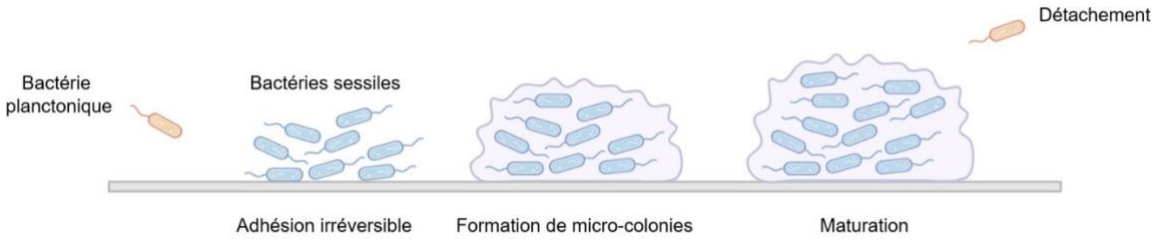


Figure 7. Représentation schématique de la formation d'un biofilm.

1.2.3.2. Applications antibactériennes des lectines

En plus des applications citées ci-dessus, les lectines sont aussi étudiées et connues comme d'excellents agents antibactériens [72]. Comme dit précédemment, la liaison aux sucres est l'élément déclencheur de la réponse antibactérienne. Les lectines peuvent se lier aux différentes structures bactériennes telles que les LPS [73], le peptidoglycane [74] et les acides téichoïques [75]. En se liant à la paroi bactérienne, la lectine engendre différents phénomènes tels que l'inhibition de la migration bactérienne, l'inhibition de la croissance bactérienne et du biofilm bactérien en inhibant l'adhésion de la bactérie sur d'autres bactéries ou sur des surfaces [76] (Figure 4). Ces activités antibactériennes ont majoritairement été décrites pour les lectines provenant des plantes, la grande majorité de celles-ci étant étudiées pour leur activité contre des espèces bactériennes posant des problèmes sanitaires et de santé publique (*E. coli, S. aureus*…).

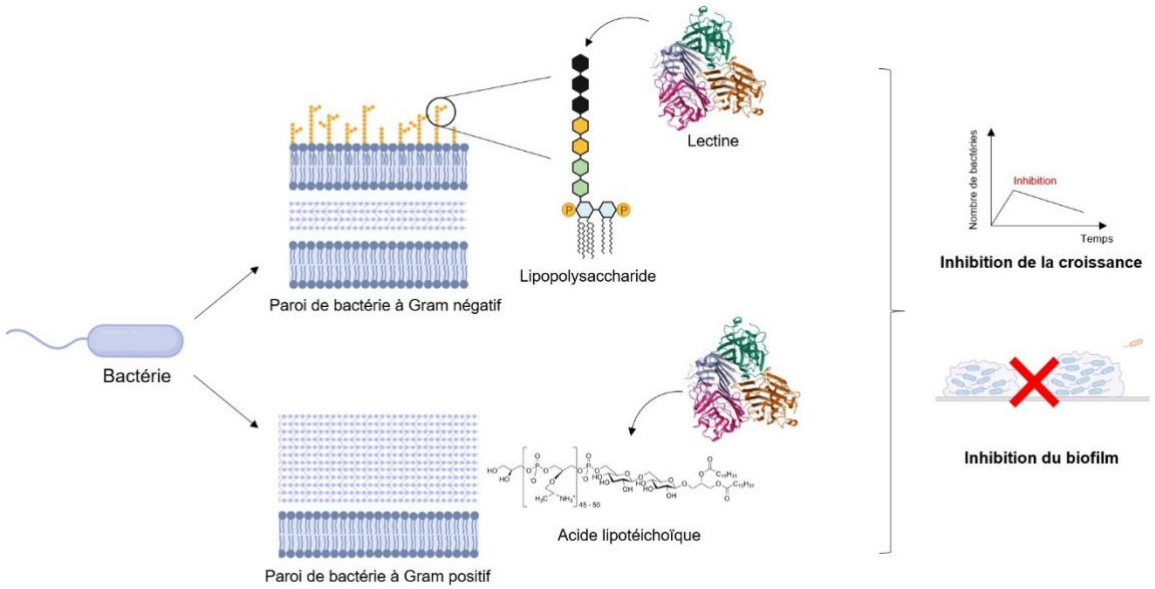


Figure 8. Représentation schématique du mode d'action antibactérien d'une lectine.

1.3. La Concanavaline A

Comme mentionné précédemment, la ConA a été isolée du pois sabre blanc et nommée pour la première fois dans les travaux de Sumner [2]. A l'heure actuelle, plus de 31 000 références contenant « Concanavalin A » sont recensés dans PubMed. Les résultats montrent une grande diversité d'application de cette lectine, allant de la vectorisation de substances actives à la détection, l'étude de réponses immunitaires, l'étude de son interaction avec différentes molécules ou particules et bien d'autres.

1.3.1. Structure et propriétés

La ConA est une métalloprotéine possédant des acides aminés liés par liaison de coordination à des ions Mn^{2+} et Ca^{2+} [77]. Cette liaison s'effectue sur les résidus Glu8, Asp10, Asp19 et His24 pour Mn^{2+} et sur les résidus Asp10, Asp19 et Asn14 pour le Ca^{2+}. De plus, ces deux ions sont également liés à deux molécules d'eau [77]. La ConA possède une reconnaissance spécifique envers les résidus mannose et glucose [78] avec un site de liaison par monomère. La ConA est présente sous forme de dimères lorsqu'elle est dans une solution où le pH est inférieur à 5.6, entre pH 5.8 et 7.0, elle se retrouve sous forme d'homotétramère. Au-dessus de pH 7.0, certains agrégats sont formés [79]. Elle est composée de 4 monomères identiques de 237 acides aminés et faisant 28 kDa chacun [80]. Le point isoélectrique de la ConA se situe à pH 7.1 [81].

La structure de la ConA est représentée dans la Figure 9 ci-dessous, provenant de l'entrée 1NLS de Protein Data Bank, issue des travaux de Deacon *et al* [82].



Séquence

ADTIVAVELDTYPNFIDGPSYPHIGLDIKSVRSKKTKAWMNQNGKVGTATHLYNSVDKRLKSAWSYPNADSATVS
VDLDNLVPLWRVGLSASTGLYKTNTTLSWSFTSKLKSNSTHETNALHFMNQFSKDKDLTLQGDATTFGDGNLLTR
VSSNGSGPQSSVGRALFYAPVHWESSAVAVSFEATFTLTLIKPSDHPADGIAFFLSNIDSSIPSSTGRLLGLFPDAN

Figure 9. Structure de la Concanavaline A et séquence en acides aminés. D'après l'entrée 1VLN de Protein Data Bank.

La biosynthèse de la ConA a été décrite en 1985. Elle est premièrement synthétisée comme un précurseur glycoprotéique inactif appelé pre-pro-ConA. Un clivage co-traductionnel s'effectue à l'extrémité N-terminale de la séquence signal. Le glycane N-lié inhibe l'activité de liaison aux sucres de la pre-pro-ConA dans le réticulum endoplasmique et joue potentiellement un rôle dans le transport de la pro-ConA en dehors de celui-ci. Après cela, une étape de déglycosylation est nécessaire pour que la pro-ConA acquiert l'activité de liaison aux sucres. Après un clivage peptidique, une nouvelle liaison peptidique est formée entre les sites N- et C-terminaux *via* une transpeptidation durant laquelle 9 acides aminés sont éliminés. Durant le clivage peptidique, 3 réactions de clivage sont observées, deux se produisant avant la transpeptidation, la dernière après [83]. La ConA est donc obtenue à la suite de ces événements modifiant l'ordre des acides aminés. Le réarrangement des acides aminés modifiant la position des deux extrémités N- et C-terminales est appelé permutation circulaire, il a été décrit chez les eucaryotes pour la première fois en 1985 avec la ConA [84]. Le schéma de la biosynthèse de la ConA est représenté en Figure 10 ci-dessous.

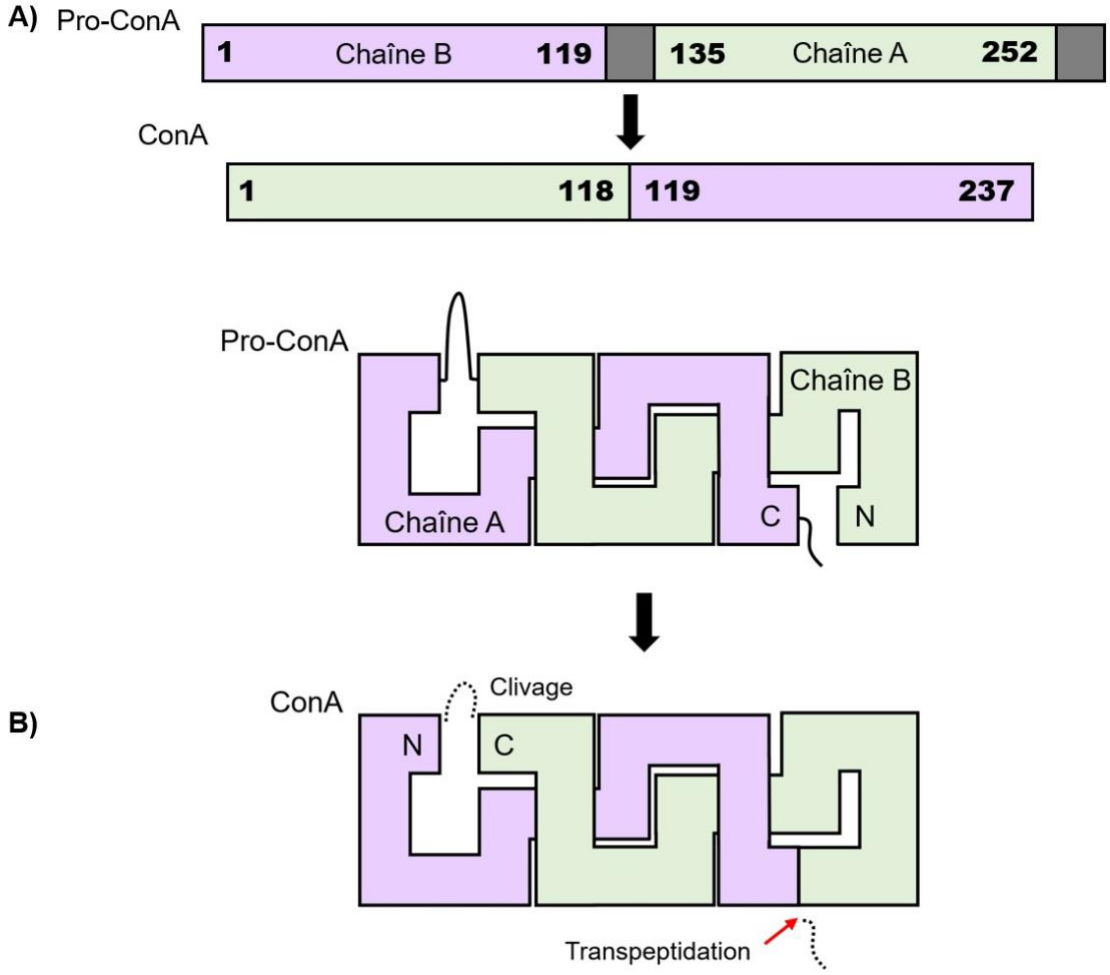


Figure 10. Biosynthèse de la ConA par permutation circulaire. A) représente l'échange des chaînes A et B de la pro-conA, les blocs gris sont clivés durant la maturation. B) représente le clivage de la liaison peptidique et la formation d'une nouvelle via transpeptidation. Inspiré de [83].

La distance entre le site de coordination aux ions Ca^{2+} et Mn^{2+} et le site de liaison aux sucres de la ConA étant séparés de seulement 20 Å [77], l'impact sur la structure protéique et de son activité en présence ou absence de ces ions a été le sujet de nombreuses études. Pour ce faire, la DM a été mise en œuvre et a permis de déterminer que la démétallisation de la ConA n'engendre pas de modification au niveau du cœur de la protéine et que ce dernier reste rigide. Cependant, la structure des régions en boucles sont affectées par l'absence des ions métalliques [81]. Pour aller plus loin, l'étude a également simulé la ConA en présence et en absence de ces ions en ajoutant, ou non, un trimannoside. Il a été déduit que l'absence des ions métalliques induit une déviation d'environ 17 Å des positions des atomes et que la liaison envers le sucre est impactée, un phénomène non observé lorsque le Mn^{2+} et le Ca^{2+} sont présents. Il est généralement accepté dans la littérature scientifique que ces deux ions sont requis dans le milieu

de manière à assurer une activité de liaison aux sucres optimales de la ConA. Néanmoins, ces ions n'interviennent pas directement dans le processus de liaison entre la ConA et les sucres mais surtout dans la stabilisation du domaine de reconnaissance [77], [81].

Il est globalement accepté que la ConA possède une plus forte affinité pour le mannose que pour le glucose, avec des études thermodynamiques concluant dans ce sens, montrant une affinité pour le mannose plus importante de 20.5 ± 15.1 $kJ.mol^{-1}$ que pour le glucose [81], [85]. Cette liaison s'effectue principalement *via* des liaisons hydrogènes [86] et van der Waals [87]. L'empilement des anneaux aromatiques a également été décrit comme un facteur améliorant l'énergie de liaison [40].

La poche de liaison de chaque monomère est composée de 8 acides aminés : Tyr12, Pro13, Asn14, Thr15, Asp16, Leu99, Asp208 et Arg228. Le site de liaison ainsi que le site contenant les ions métalliques de la ConA sont représentés dans la Figure 11.

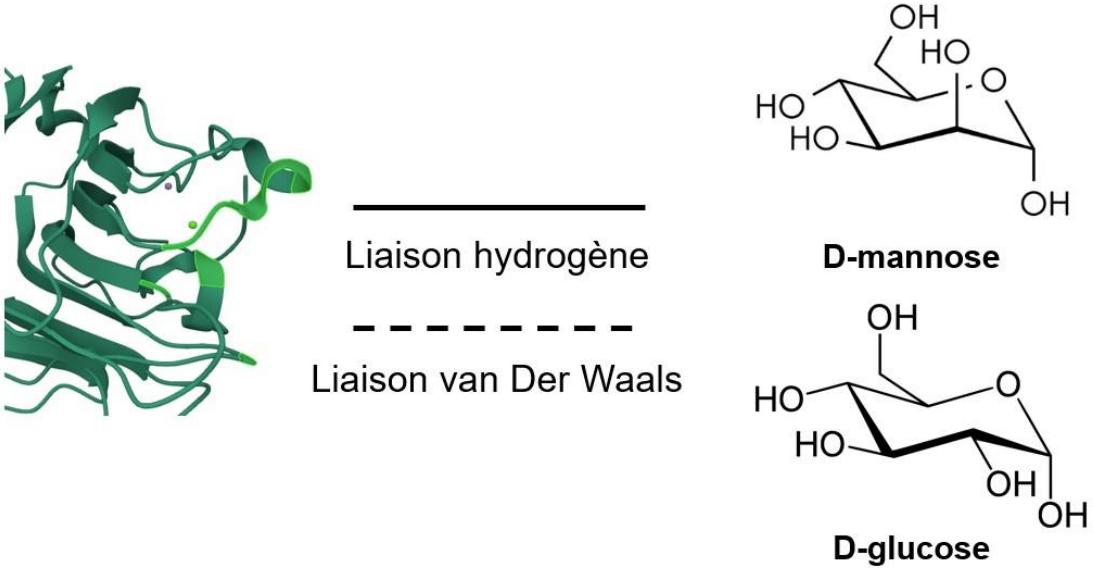


Figure 11. Site de liaison aux sucres et site de coordination aux métaux de la Concanavaline A. La sphère violette représente l'ion Mn2+, la sphère verte représente l'ion Ca2+. Les structures surlignées en vert représentent les acides aminés composant le site de liaison aux sucres de la lectine. Image obtenue via l'entrée 1VLN de Protein Data Bank.

1.3.2. Interaction avec les bactéries

La Concanavaline A est une des lectines des plantes les plus étudiées à ce jour, notamment pour des actions antibactériennes. En 1936, Sumner et Howell décrivent son action agglutinante envers deux genres de bactéries : *Actinomycès* et *Mycobacterium* [88]. C'est dans les années 1970 qu'une série d'études se focalisant sur la ConA et diverses bactéries émerge. D'abord en étudiant son interaction avec les acides téichoïques et les parois de plusieurs souches bactériennes [89]. En 1972, une étude propose d'utiliser la ConA en tant que sonde pour étudier les caractéristiques structurales des parois bactériennes *via* la méthode de double diffusion en gel et des analyses de turbidimétrie [90]. Plus tard cette même année, une équipe utilise la ConA pour bloquer l'adsorption de bactériophages à la surface de deux souches bactériennes (*S. aureus et B. subtilis*) et mettent en avant que la ConA se lie uniquement aux acides téichoïques possédant l'anomère α du résidu glycosyl et non à l'anomère β [91].

Aujourd'hui, la ConA est considérablement employée pour la détection et le ciblage de bactéries. Elle trouve des applications dans le traitement par thérapie photodynamique par exemple, pour détecter des BGN *via* leur LPS et en étant couplée au Rose Bengal pour permettre la destruction des cellules bactériennes après excitation par de la lumière blanche [92]. De plus, la ConA représente une alternative adéquate aux anticorps, permettant une manipulation plus accessible et réduisant les coûts puisque la ConA peut être directement purifiée dans le laboratoire depuis son fruit d'origine ou alors être achetée à un coût moindre que des anticorps spécifiques. En termes de performances de détection bactérienne, les limites de détection (LOD pour *limit of detection* en Anglais) peuvent atteindre d'excellentes performances de l'ordre de 10^1 CFU.mL^{-1} ou moins [93]. Ceci est extrêmement prometteur pour le développement de nouvelles plateformes de détections bactériennes pouvant être plus rapides, spécifiques et sensibles que les techniques actuelles.

1.4. Identification de la présence de bactéries

Une étude a effectué une rétrospective sur l'antibiorésistance allant de 1990 à 2021 et permettant de faire des estimations jusqu'en 2050. Les conclusions montrent qu'en 2021, plus d'1,4 millions de décès dus strictement à une infection bactérienne ont été recensés, avec presque 5 millions de décès liés à la résistance aux antibiotiques dans le monde. Cette même étude prédit qu'en 2050, l'antibiorésistance sera responsable de 8 millions de décès si la tendance actuelle se prolonge [94]. La prévention et la détection aux stades précoces de bactéries restent les premières lignes d'attaque contre l'antibiorésistance. C'est pour cela que la détection bactérienne est plus qu'importante dans ce contexte. Dans cette partie, les méthodes classiques de détections seront abordées.

1.4.1. Test de culture

La détection et l'identification des bactéries reposent sur un ensemble de méthodes pouvant être complémentaires, allant des techniques de culture classiques aux approches moléculaires plus récentes. Chaque méthode possède ses avantages, ses limites et ses indications spécifiques, selon le contexte clinique, environnemental ou industriel.

La détection initiale des bactéries peut s'appuyer sur des méthodes traditionnelles de culture, qui restent la norme pour l'analyse microbiologique [95]. Les techniques de culture consistent à ensemencer un échantillon sur un milieu nutritif, sélectif ou différentiel, permettant la croissance des micro-organismes (Figure 12). Ces milieux, généralement à base de gélose, sont adaptés selon la nature du prélèvement et les objectifs de l'étude, qu'il s'agisse d'identification, de dénombrement ou d'antibiogramme. Après incubation à une température favorable, souvent autour de 35 °C et dans des conditions atmosphériques contrôlées (aérobie, anaérobie ou microaérophilie), les colonies bactériennes apparaissent et peuvent être isolées pour des analyses complémentaires. Les milieux sélectifs contiennent des inhibiteurs permettant de favoriser la croissance de certains groupes bactériens au détriment d'autres [96], tandis que les milieux différentiels utilisent des indicateurs colorés pour distinguer les espèces selon leur métabolisme [97]. De manière générale, les méthodes de culture pour la détection bactérienne permettent d'obtenir des LOD de l'ordre d'une à une dizaine d'Unités Formant Colonies.mL^{-1} (UFC), la limite minimale étant 1 UFC.mL^{-1} dans le cas du comptage de colonies puisque si une seule bactérie est présente dans le milieu, elle peut former une colonie sur plaque. Différents facteurs peuvent affecter les LOD obtenues comme le volume d'échantillon disponible puisque plus le volume d'échantillon disponible est élevé, plus la sensibilité sera accrue [98]. Les étapes

d'enrichissement sont capables de diminuer les LOD en permettant aux bactéries de se multiplier avant l'ensemencement [99]. Finalement, les effets matriciels jouent un rôle dans les LOD obtenues selon la présence d'autres organismes ou encore d'éléments inhibiteurs ou compétitifs dans le milieu initial (urines, fèces, sang…) [100]. Malgré leur robustesse, les méthodes de culture présentent l'inconvénient d'être relativement lentes, avec des délais pouvant aller de quelques heures à plusieurs jours, voire semaines pour certains pathogènes à croissance lente, comme les mycobactéries [101]. De plus, des résultats faux-positifs peuvent survenir pour chaque méthode et orienter vers un traitement non-adapté en plus d'engendrer une perte de temps et de moyens humains et financiers.

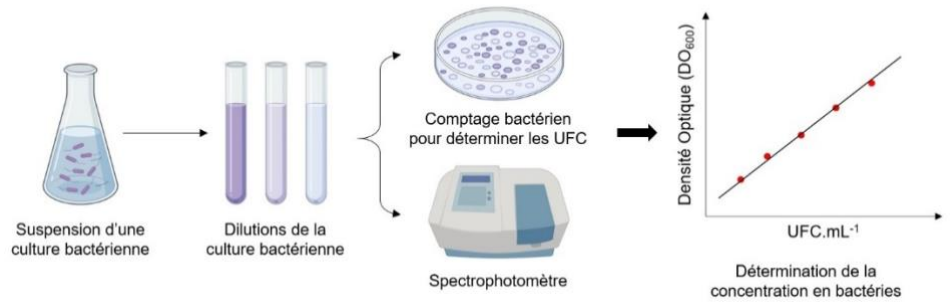


Figure 12. Schéma représentatif du protocole de détermination de la concentration en bactérie par la technique de culture. UFC : Unités Formant Colonies.

1.4.2. Tests moléculaires

Les méthodes moléculaires occupent une place croissante dans le diagnostic et la surveillance des infections bactériennes. Une multitude de méthodes existent, principalement basées sur l'amplification d'acides nucléiques comme LAMP (amplification isotherme médiée par les boucles), NASBA (amplification basée sur la séquence d'acide nucléique) ou la PCR (réaction en chaîne par polymérase). Des méthodes basées sur le séquençage sont également utilisées comme le WGS (séquençage de génome complet) ou sa méthode similaire NGS (séquençage de nouvelle génération) plus rapide et plus facile d'utilisation en contexte clinique [102].
De manière générale, la PCR est la méthode moléculaire la plus utilisée parmi celles existantes [103]. La PCR permet d'amplifier des séquences d'ADN spécifiques, offrant une détection rapide, sensible et spécifique des bactéries. Elle est particulièrement avantageuse pour la détection de bactéries difficiles à cultiver [104], [105]. La PCR peut être ciblée, en utilisant des amorces spécifiques pour un pathogène donné [106], ou à large spectre, en amplifiant des régions conservées comme le gène de l'acide ribonucléique (ARN) ribosomique 16S, gène présent dans toutes les bactéries [107]. Le séquençage du gène 16S, associé à la PCR, permet une identification précise, notamment pour les bactéries peu ou mal décrites ou paradoxales sur le plan phénotypique [108]. L'avantage majeur des techniques moléculaires réside dans leur rapidité et leur capacité à détecter des bactéries viables mais non cultivables, ou encore à identifier des agents pathogènes dans des situations d'antibiothérapie probabiliste où la culture peut être négative [108]. En termes de LOD, ces méthodes sont de manière générale plus performantes que les méthodes de culture [109], [110], [111], même si dans certains cas, la complexité matricielle rend les tests de culture plus pertinents. Une étude a permis de détecter *E. coli* et *S. aureus* (résistante à la méticilline) avec une LOD de 1.2 $UFC.mL^{-1}$ grâce à la méthode LAMP à partir d'1 mL de sang et en réduisant le temps de détection de 20 h à 2.5 h [112]. De plus, certaines PCR peuvent détecter des bactéries n'étant pas viables et nécessitent tout de même un test de culture complémentaire pour confirmer la viabilité bactérienne [113]. Des Viability-PCR ont été développées pour contourner ce problème en utilisant des colorants photoréactifs et ne pouvant pénétrer que les bactéries non viables (*S. enterica* [114]). De cette manière, après entrée dans la bactérie, la molécule se lie à l'ADN de manière covalente sous l'action de la lumière, ce qui modifie la séquence d'acide nucléique et rend ces bactéries non-amplifiables par PCR [114]. Cette méthode, bien que performante, peut nécessiter des étapes d'optimisation afin d'obtenir les meilleurs résultats, ce qui rallonge le temps de diagnostic. De

plus, dans le cas où la molécule photoréactive ne s'intercale pas ou de mauvaise manière avec l'ADN, la méthode peut surestimer le nombre de bactéries viables.

Plus récemment, des méthodes d'immunodétection bactérienne ont vu le jour et ont été associées à des méthodes microfluidiques ou encore implémentées dans des biocapteurs [115]. Ces méthodes sont très prometteuses et possèdent l'avantage d'être facilement portatives et peuvent être miniaturisées pour effectuer des diagnostics rapides directement à l'endroit souhaité. Un point redondant de ces méthodes de biocapteurs est l'utilisation de nanoparticules en tant qu'élément amplificateur de signal, celles-ci sont très largement étudiées depuis les dernières décennies et sont extrêmement prometteuses pour l'aide à la détection bactérienne.

1.5. Les nanoparticules d'or

Le travail de cette thèse porte sur l'utilisation de nanoparticules (NP) inorganiques et métalliques, plus précisément les nanoparticules d'or (AuNP). Les nanoparticules sont régies par une norme ISO (ISO/TS 80004-2:2015, 4.4) indiquant qu'une NP est un nano-objet qui se doit de posséder toutes ses dimensions à l'échelle nanométrique (de 1 à 100 nm) [116]. D'un point de vue scientifique, les nanoparticules d'or sont définies comme des objets possédant des propriétés différentes à l'échelle nanométrique par rapport à l'échelle métrique de l'or. Des NP organiques existent sous forme de NP polymériques, micelles ou liposomes, elles seront abordées au travers de la revue de la littérature présentée dans la partie 1.6.

Les NP inorganiques sont une catégorie de NP très diverses composées d'éléments métalliques, d'oxydes métalliques et sels métalliques. On y retrouve principalement les NP d'argent (AgNP), de silice (SiNP), de zinc (ZnO NP), de titane (TiO2 NP) ou encore les quantum dots (QD), éléments semiconducteurs majoritairement formés par des éléments comme le Cd, In ou Pb [117]. Parmi ces NP inorganiques, les AuNP permettent un vaste champ d'utilisation grâce aux propriétés, notamment optiques, qu'elles possèdent dû à l'échelle nanométrique de l'or. On retrouve en particulier des applications dans des domaines allant de l'imagerie [118], la chimiothérapie [119] à la détection [120]. Diverses études montrent l'emploi des AuNP pour développer des tests à flux latéraux (*lateral flow assay*, LFA) et sont décrites dans la littérature pour la détection de bactéries telles qu'*E. coli* [121], *S. enterica* et *S. aureus* [122], de virus [123] ou encore de gluten [124].

Cette partie abordera les méthodes de synthèse et de caractérisation des AuNP, en décrivant leurs propriétés optiques et les différentes chimies de surface possibles.

1.5.1. Synthèse

Il existe différentes manières de synthétiser les AuNP. De manière générale, on recense deux voies de synthèse : la voie dite top-down et à l'inverse, la voie dite bottom-up (Figure 13).

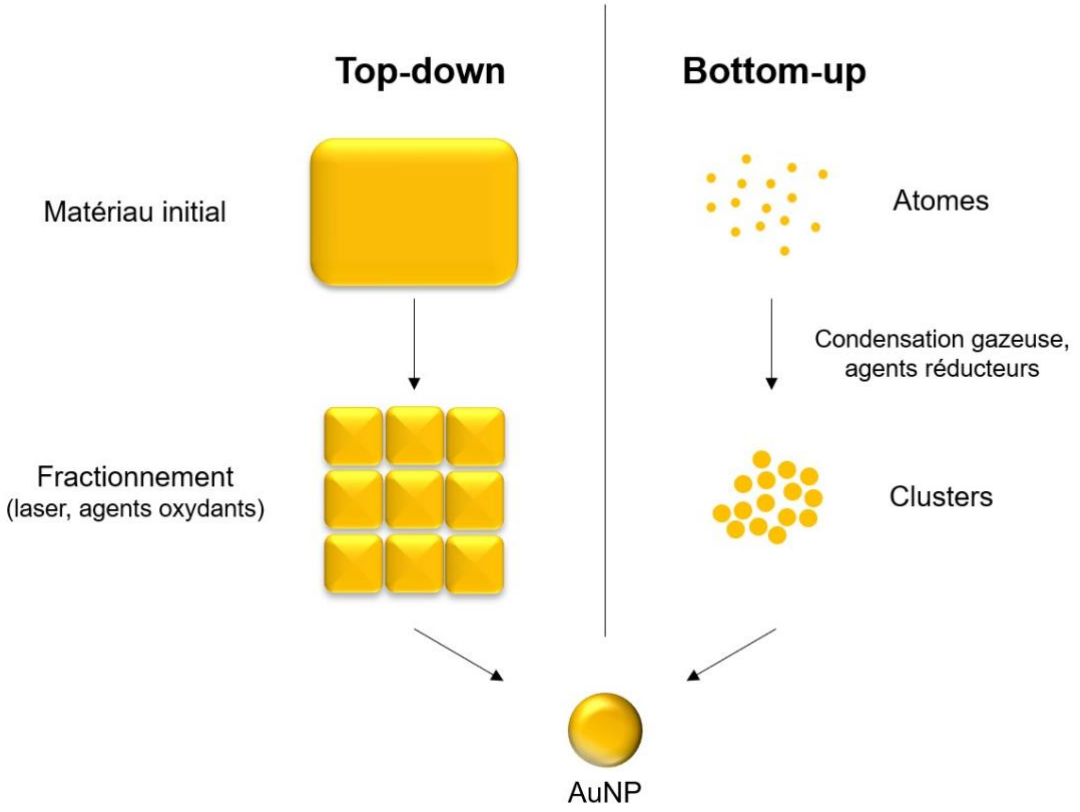


Figure 13. Principe des voies de synthèse top-down et bottom-up.

La voie top-down consiste en la réduction de la taille d'un matériau ou précurseur d'or, jusqu'à l'obtention de sa forme nanométrique. Ceci peut s'effectuer de manière mécanique *via* l'ablation laser, sous contrôle des paramètres atmosphériques et de lumière [125] précis. Par exemple, la présence de gaz peut limiter l'expansion du panache [126], *i.e* limiter la propagation de la matière éjectée après irradiation par le laser. Par ailleurs, l'oxydation de certains métaux est également à prendre en compte lors du développement du protocole. D'autres méthodes permettent de synthétiser des AuNP par voie top-down comme le sputtering (pulvérisation en anglais) d'or dans du polyéthylène glycol (PEG) pour stabiliser les AuNP [127].

La voie bottom-up quant à elle démarre avec des ions Au3+ qui sont réduits en atomes d'or. Comme les atomes ne sont pas chargés, ils peuvent s'assembler en nanoparticules. Une des méthodes les plus connues fonctionnant sur ce principe est la synthèse de Turkevich [128]. Cette synthèse d'AuNP repose sur la réduction d'un sel d'or, ici l'acide chloroaurique ($HAuCl_4$)

en présence de citrate de sodium qui a un rôle d'agent réducteur et stabilisant. Ce protocole est effectué en solution aqueuse et chauffée jusqu'à ébullition. Aujourd'hui, diverses variations de ce protocole existent, il a été montré que la réduction d'acide chloroaurique peut s'effectuer par l'irradiation UV (ultraviolet) *via* une réaction de photo-réduction du précurseur d'or dans l'eau [129]. Une autre étude montre la synthèse d'AuNP non protégées *via* excitation à 350 nm de benzoïne (irgacure-2959) permettant de passer de l'état Au (III) à Au (0). Les AuNP sont stabilisées par des liaisons électrostatiques aux anions résiduels présents en solution tels que les ions chlorure et les traces d'acide carboxylique [130]. Une autre méthode très répandue de la voie bottom-up est la synthèse de Brust. Celle-ci diffère principalement par la phase organique utilisée pour la synthèse, par l'utilisation de borohydrure de sodium ($NaBH_4$) en tant qu'agent réducteur, l'utilisation de bromure tétraoctylammonium (TOAB) ou thiols comme agents stabilisants et de transfert [131] et la non nécessité de chauffage. Cette méthode peut également avoir lieu dans des phases aqueuses lorsque les thiols sont hydrophiles. Le tableau 2 synthétise les différents protocoles et les AuNP associées.

Tableau 2. Comparaison des conditions des méthodes de synthèse de Turkevich et Brust et la taille des AuNP associées.

Protocole	**Milieu**	**Réducteur**	**Stabilisateur**	**Température de réaction**	**Taille des AuNP**
Turkevich	Aqueux	Citrate de sodium	Citrate de sodium	100 °C	20 nm
Brust	Organique / Aqueux	$NaBH_4$	TOAB	Température ambiante	1-3 nm

1.5.2. Caractérisation

Après synthèse des AuNP vient l'étape de caractérisation. Plusieurs techniques sont utilisées pour déterminer leur taille, concentration, morphologie, charge de surface etc. Dans le cas des AuNP, deux paramètres de tailles peuvent être caractérisés. Le premier correspond au diamètre de cœur (D_C), *i.e* le diamètre du cœur métallique de la NP. Le deuxième correspond au diamètre hydrodynamique (D_H), ce D_H prend en compte le D_C ainsi que la couche de solvatation contenant les ligands présents à la surface du cœur métallique. Le D_C peut être obtenu par des méthodes comme la microscopie électronique à transmission (TEM), qui utilise un faisceau d'électrons qui, en interagissant avec la matière permet l'obtention d'un faisceau sortant qui possède une distribution d'intensité variable. Après optimisation du contraste, une image de TEM est obtenue. L'AFM peut également être utilisée, elle repose sur l'utilisation d'un levier sur lequel une pointe, de quelques nanomètres généralement, est présente à l'extrémité. La pointe scanne ensuite l'échantillon souhaité point par point et grâce à l'enregistrement de la déviation du levier par le système piézoélectrique, une image de topographie est obtenue. Le D_H, quant à lui, est classiquement obtenu par la diffusion dynamique de la lumière (DLS) qui se repose sur la diffusion de Rayleigh. La Figure 14 illustre certains paramètres de caractérisation d'une AuNP.

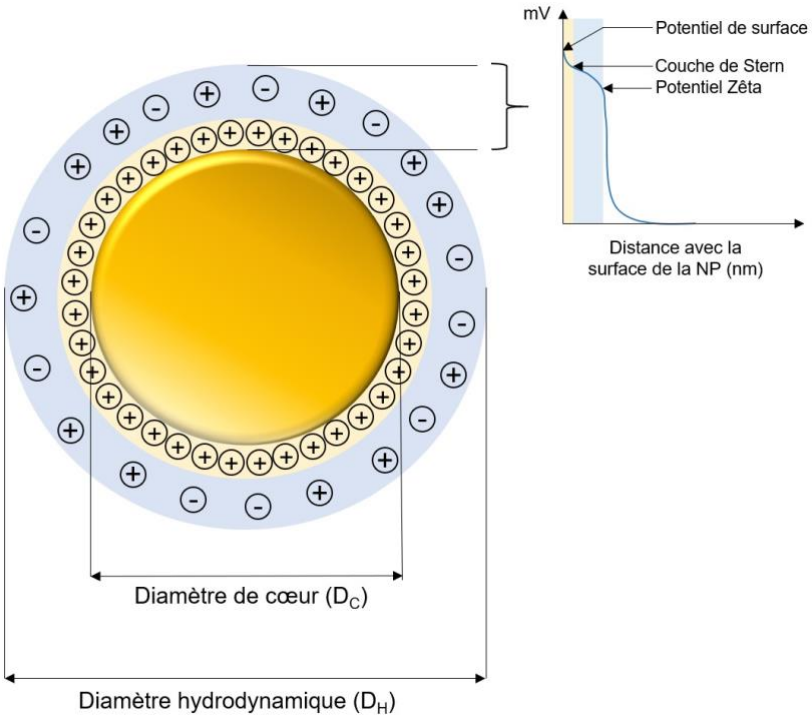


Figure 14. Paramètres notoires de caractérisation d'une AuNP.

Les particules en solution sont soumises au mouvement Brownien, ce mouvement entraîne la diffusion de la lumière laser à différentes intensités. Ces variations d'intensités lumineuses permettent de déterminer la vitesse du mouvement Brownien et par la suite la taille des AuNP en appliquant la relation de Stokes-Einstein (Equation 1).

$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

Avec k, la constante de Boltzmann ($1.380\ 649.10^{-23}$ $J.K^{-1}$), T la température (K), η la viscosité (Pa.s) et D le coefficient de diffusion ($m^2.s^{-1}$). Cette équation ne peut être utilisée que pour les particules sphériques, n'étant pas fluorescentes, n'interagissant pas avec le laser de la DLS et faisant partie d'un système colloïdal assez transparent pour que le laser le traverse, tout en étant assez concentré pour que la méthode fonctionne.

L'analyse de dispersion de Taylor (TDA) est une autre méthode disponible afin d'obtenir le D_H de particules à partir de D. En injectant une suspension dans un capillaire selon un flux laminaire, il est possible d'observer l'élargissement d'un pic spécifique à cette suspension. Après ajustement mathématique, il est ensuite possible d'obtenir D puis le D_H. Le Chapitre III comporte tous les éléments contextuels et théoriques relatifs à cette méthode.

Si les NP sont chargées, le potentiel zêta (ζ) de surface permet d'obtenir la valeur de la charge présente au niveau de la couche diffuse de la double couche électrique. En effet, une particule chargée impacte la concentration ionique au niveau interfacial, ce qui engendre la présence d'une double couche électrique autour de la NP. Cette double couche est composée de contre ions de charge opposée à la NP formant la couche de Stern au voisinage direct de la NP. Une deuxième couche appelée la couche diffuse est présente et est composée d'un film du milieu de dispersion contenant des ions libres. Ces ions sont gouvernés par la force électrostatique de la NP chargée. Lorsqu'une NP est en mouvement dans une suspension, une couche du solvant reste aux abords de la particule et une autre se déforme au cours du mouvement, la limite entre ces deux couches est appelée le plan de cisaillement et sa valeur de potentiel électrique correspond au ζ . Sa valeur est obtenue grâce à la diffusion électrophorétique de la lumière. Cette méthode est basée sur l'électrophorèse et la diffusion dynamique de la lumière. Ici, un champ électrique est exercé, permettant de calculer la mobilité électrophorétique de particules chargées dans leur milieu *via* l'équation de Henry (Equation 2) :

$$U_e = \frac{2\varepsilon\zeta F(Ka)}{3\eta} \quad (2)$$

Avec U_e, la mobilité électrophorétique ($m^2/(V.s)$), ε, la permittivité diélectrique (F/m), ζ le potentiel zêta (V), F(Ka) la fonction de Henry et η la viscosité du milieu (Pa.s).

Lorsque des AuNP possèdent une taille de l'ordre de la dizaine de nanomètres, la couleur de la suspension est rouge pourpre, bien différente de la couleur jaune du matériau brut de l'or. Cette différence de couleur est directement liée à l'une des propriétés les plus importantes des AuNP appelée la résonance de plasmon. Dans le cas des AuNP possédant une taille inférieure à la longueur d'onde de la lumière et étant plus petites que la profondeur de pénétration du champ, les électrons sont polarisés, ce qui crée des charges de surface qui s'accumulent alternativement aux extrémités opposées de la particule (Figure 15). Ces caractéristiques font que cette résonance de plasmon est localisée (LSPR – Localized Surface Plasmon Resonance) et non propagée (SPR – Surface Plasmon Resonance) comme ce qui se produit pour des surfaces où les dimensions du matériau permettent à l'onde de se propager dans le milieu. La polarisation oscillante des AuNP engendre un champ électrique opposé au champ d'excitation et entraîne ainsi une force de rappel [132], [133].

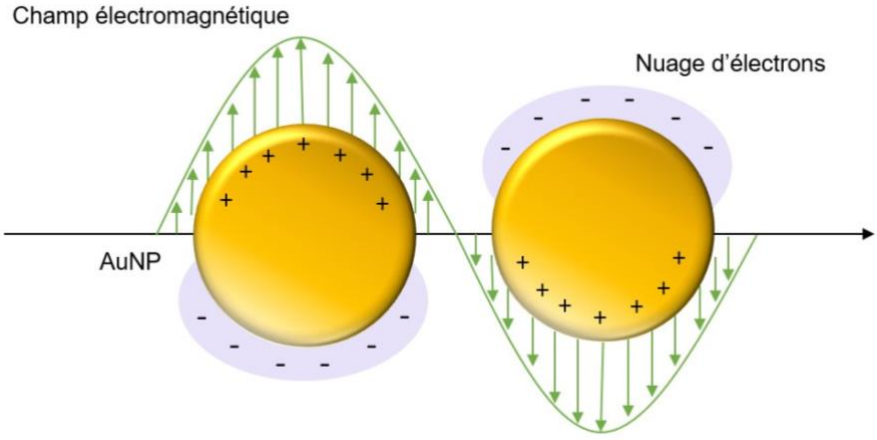


Figure 15. Représentation du principe de résonance de plasmon localisé dans des AuNP.

La caractérisation du LSPR des AuNP peut être effectuée en spectrophotométrie UV-visible, pour les AuNP, le λ_{max} du LSPR étant généralement localisé autour de 520 nm [134]. Cependant cette valeur peut être modifiée selon la forme des AuNP, le solvant et la distance inter-AuNP [135]. En plus des caractéristiques citées ci-dessus, le LSPR est également dépendant de

l'environnement proche de la surface des AuNP, par exemple, si la couche de molécules adsorbées à la surface des AuNP est modifiée, un déplacement du LSPR sera observé [132]. Ce déplacement peut être hypsochrome (déplacement vers les longueurs d'ondes bleues), bathochrome (déplacement vers les longueurs d'ondes rouges), hyperchrome (augmentation de l'absorbance) ou hypochrome (diminution de l'absorbance) et est à la base du concept de biocaptage.

1.5.3. Fonctionnalisation de surface

La chimie de surface des AuNP est largement utilisée pour conférer aux AuNP une meilleure stabilité ou encore pour favoriser la vectorisation ou interaction avec d'autres composés molécules ou autres. De plus, les AuNP étant biocompatibles [136], de nombreuses études les emploient à des fins physiologiques telles que l'étude de leur interaction avec les protéines du sang [137], ou encore dans le traitement du glioblastome [138]. Dans de nombreuses études, les AuNP nécessitent un recouvrement spécifique afin de ne pas interagir avec les composés présents dans le corps (protéines du sang…) ou d'effectuer un ciblage précis. Il est possible de modifier la chimie de surface des AuNP, soit par adsorption spontanée de molécules d'intérêt ou alors par couplage covalent.

Liaison Au-S

Une méthode de fonctionnalisation de surface très répandue est basée sur la force de liaison Au-S. En effet, les AuNP possèdent une affinité envers le soufre d'environ 201 $kJ.mol^{-1}$ [139], énergie de liaison considérée comme quasi-covalente puisque les énergies de liaisons covalentes sont définies comme étant de 150 $kJ.mol^{-1}$ à environ 400 $kJ.mol^{-1}$ [140]. Cette force de liaison permet d'ajouter facilement des molécules possédant des groupements thiols à la surface des AuNP. Par exemple, des AuNP fonctionnalisées par l'acide dihydrolipoïque (DHLA) (AuNP@DHLA) ont été synthétisées afin d'étudier leur comportement *in vitro* avec le glutathion réduit [141]. L'ajout de DHLA a été effectué en incubant des AuNP stabilisées par du citrate de sodium avec une solution d'acide α-lipoïque préparée dans 10 mL de solution de NaOH à 0.5 M. Ce mélange a été laissé sous agitation pendant 24 h à température ambiante avant d'être dialysée pendant 48 heures contre un tampon phosphate salin (PBS) de manière à enlever les molécules n'ayant pas réagi avec les AuNP. Les résultats de l'étude ont montré que le DHLA diminue l'absorption des AuNP dans les macrophages par rapport aux AuNP stabilisées par le citrate de sodium. Ceci montre que les AuNP@DHLA permettent de maintenir l'intégrité cellulaire *via* la diminution de l'interaction avec les macrophages et de la réactivité envers les molécules de signalisation redox, faisant des AuNP@DHLA une plateforme prometteuse de vectorisation pharmaceutique. Cependant à ce jour, aucune étude ne décrit des AuNP@DHLA pour cette utilisation précise.

Tensioactifs

Les tensioactifs, molécules amphiphiles, sont également employées pour modifier la surface des AuNP. Dans une étude, le tensioactif 1,3-bis(cetyldimethylammonium) propane dibromide

(16-3-16) a été employé dans une synthèse d'AuNP dans un milieu toluène/H_2O afin de stabiliser les AuNP [142]. Le PEG, bien que n'étant pas réellement un tensioactif puisque complètement hydrophile, est un polymère constitué d'unités répétées et pouvant être de taille variable. Le PEG est une des molécules les plus employées pour modifier la surface de NP puisqu'il permet non seulement d'augmenter leur stabilité colloïdale, mais peut aussi être utilisé comme espaceur pour ajouter des molécules, acides nucléiques ou protéines sur les AuNP. De plus, le PEG facilite l'augmentation du temps de circulation de médicaments dans le sang en réduisant les interactions non-spécifiques avec les protéines grâce à un effet d'encombrement stérique [143]. La liaison entre le PEG et les AuNP s'effectue *via* le déplacement des molécules présentes à la surface des AuNP. Le groupe -OH du PEG effectue des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau du solvant, créant ainsi une couche de solvatation qui stabilise les AuNP [144]. Dans la majorité des cas, les molécules de PEG sont modifiées avec des groupes -SH à leur extrémité pour favoriser l'interaction avec l'or des AuNP [145].

Peptides et acides aminés

Les AuNP sont fréquemment modifiées par ajout de peptides ou d'acides aminés à leur surface, de manière à développer des vecteurs pour des médicaments. Les groupes fonctionnels associés à la liaison avec les AuNP sont les fonctions carboxyles pour les acides aminés. Les AuNP modifiées par des acides aminés sont utilisées pour des applications comme la vectorisation d'ADN dans les cellules grâce à de la lysine polycationique formant des complexes compacts avec l'ADN [146].

Des molécules ou protéines contenant des groupements amines peuvent être utilisées pour modifier la surface des AuNP. Une étude théorique et expérimentale a révélé que les amines interagissent avec les atomes Au(0) au travers de leurs électrons non liants. Une petite partie d'atomes Au(I) sont réduits par les amines, formant une liaison Au(0)-NR [147].

EDC/NHS

Une des méthodes les plus utilisées pour induire des liaisons covalentes est la méthode employant le 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et le N-hydrosuccinimide (NHS). Cette méthode s'effectue par l'action de l'EDC avec les groupes carboxyliques qui forme l'intermédiaire O-acylisourea. Cet intermédiaire instable réagit ensuite avec le NHS pour former un ester qui réagit par la suite avec une amine libre pour former une liaison amide (~ 400 $kJ.mol^{-1}$, [148]). Des AuNP ont été conjuguées avec un anticorps de thyroxine *via* l'utilisation de EDC/NHS. L'anticorps a d'abord été mis en présence d'EDC et

de NHS avant d'être mis en solution avec les AuNP sous agitation. Ces AuNP fonctionnalisées par l'anticorps de thyroxine ont par la suite été utilisées pour détecter différentes concentrations de l'hormone thyroxine impliquée dans le syndrome thyroïdien avec une LOD située à 9.1 $pg.mL^{-1}$ [149].

Les AuNP sont donc très versatiles grâce à ces méthodes de fonctionnalisation de surface. Celles-ci permettent de conférer différentes propriétés aux NP, de les vectoriser ou encore de les utiliser en tant que capteur. Il a été vu que des protéines peuvent être ajoutées à la surface d'AuNP et donc, les lectines peuvent être employées sur des AuNP. Dans la partie suivante, une revue de la littérature abordera des nanomatériaux fonctionnalisés par des lectines en se focalisant sur les méthodes de fonctionnalisation, de caractérisation ainsi que les performances obtenues pour les diverses applications observées.

1.6. Revue

Comme mentionné précédemment, il existe de nombreuses manières de fonctionnaliser la surface d'une NP. Des protéines sont fréquemment utilisées pour fonctionnaliser des NP et en faire des biocapteurs. Il est donc pertinent de s'intéresser aux méthodes de fonctionnalisation et de caractérisation employées pour le développement de ces biocapteurs. Dans cette partie, une revue de la littérature abordant ce sujet est exposée. Celle-ci s'intéresse à l'utilisation de lectines et de nanomatériaux pour en faire des biocapteurs pour diverses applications. Cette revue s'intéresse aux NP inorganiques, organiques, à des QD et à des surfaces nanostructurées.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans International Journal of Pharmaceutics. Sephora Lahouari, Jérémie Gouyon, Igor Clarot, Ariane Boudier. *Adsorption or covalent binding of a lectin to a nanoparticle and their immobilization for biosensing: is it a compromise between simplicity and performance?*

Accepté le 8 juin 2025 dans International Journal of Pharmaceutics.

Adsorption or covalent binding of a lectin to a nanoparticle and their immobilization for biosensing: is it a compromise between simplicity and performance?

Sephora Lahouari[1], Jérémie Gouyon[2], Igor Clarot[1], Ariane Boudier[1,3]*

[1] : Université de Lorraine, CNRS, LRGP, F-54000 Nancy, France
[2] : Université de Lorraine, CNRS, LCPME, F-54000 Nancy, France
[3] : Institut Universitaire de France, (IUF)

* : Corresponding author
E-mail address: ariane.boudier@univ-lorraine.fr

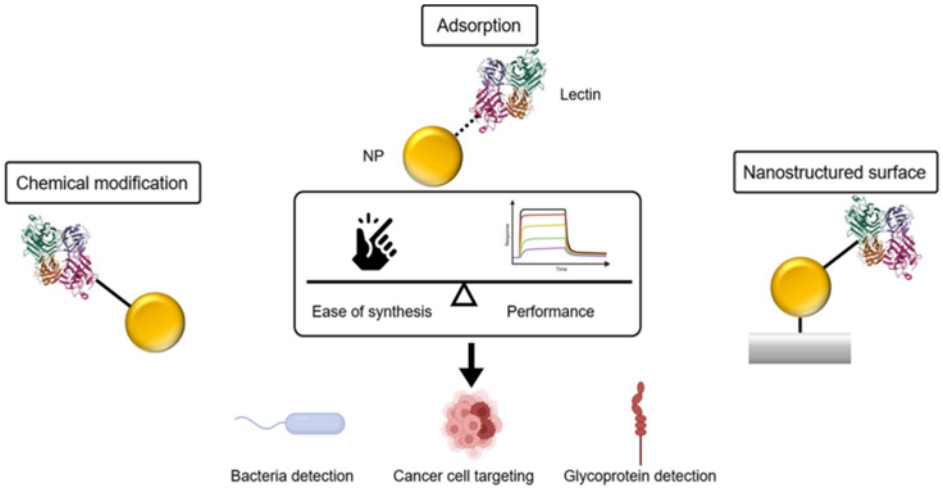
Abstract

Lectin-based techniques for sensing have gained a great interest in the past decades thanks to the carbohydrate-recognizing and binding activities of lectins. Additionally, with the exponential rise of nanomaterial research, many scientists have associated nanoparticles to lectins as a way to increase the threshold sensitivity (limit of detection or quantification), due to the excellent detection properties of nanoparticles through various techniques (UV-Visible, SERS, EIS…). Since then, a great number of protocols have been described to synthesize nanoparticle-lectin sensing platforms, which can be defined as biosensors. Methods ranging from simple adsorption to more elaborate protocols involving a chemical modification of either the lectin or the nanoparticle are described across the scientific literature. In this review, the design of these biosensors, focusing on the different ways to functionalize the nanomaterials with the lectin will be discussed. Special attention on the characterization methods as well as a discussion on the performances is provided, with a comparison between each functionalization method. All of these points highlight the novelty of this work which separates itself from previous ones by delving into the design and characterization specificities as opposed to only discussing applications. Altogether, this review emphasizes on the need for proper design and characterization methods prior to biosensor use. As such, proper characterization will help to understand the association mechanisms better which will in turn, allow for lower detection thresholds of relevant pathogens.

Keywords

Lectins
Functionalization
Nanomaterials
Characterization
Biosensors
Proteins
Diagnosis

Graphical abstract



Introduction

Lectins are a category of proteins found in plants, fungi and animals with carbohydrate-binding activity. Lectins are defined as "proteins that possess at least one noncatalytic domain that binds reversibly to a specific mono- or oligosaccharide" (Peumans and Van Damme, 1995). Lectins offer a wide range of carbohydrate specificity as they possess specificity for different carbohydrates. This allows for the recognition of various elements containing sugars such as lipopolysaccharides, or entities expressing them at their surface (*e.g.,* yeasts, certain cancer cells) which make lectins as interesting biosensors (Crosby et al., 2022; Váradi et al., 2017; Zhang et al., 2020). Traditionally, the diagnosis of bacteria or pathologies like cancer is made *via* more or less invasive methods such as biological fluid sampling to imaging methods coupled with a contrasting agent. However, in some cases, only limited volumes of biological samples are available, making the diagnosis process more challenging. Certain cancer types do not possess a clear and definite diagnosis method for their early stage (Gheorghe et al., 2020; Qu et al., 2024). This is why the lectin ability to bind to certain cancer cells through the different saccharides expressed at their surface can be harnessed to provide a solution to this issue. For bacterial infections, being able to detect the pathogen in a fast, specific, and sensible manner is of utmost importance in order to prevent health complications in patients (Sinha et al., 2018). Conventional methods for bacteria detection include Polymerase Chain Reaction (PCR) (Yamamoto, 2002) and culture with colony counting (Paczesny and Mierzejewski, 2021). These techniques are relatively time-consuming and require specifically trained staff, which is why new methods are needed to reduce the detection time. In most cases, the Limit of Detection (LOD) for *E. coli* detection using Polymerase Chain Reaction (PCR) reaches 10^3 Colony Forming Unit.mL^{-1} (CFU).mL^{-1}) (Nguyen et al., 2005). For culture based methods it is possible to reach a detection limit of 1 CFU.100 mL^{-1} for water samples (Brown et al., 2020) and ~ 2.6 CFU.100 g^{-1} for beef samples (Arthur et al., 2005). However, the enrichment steps and necessity to obtain replicates to confirm the results significantly extends the time needed from sampling to result, which can reach up to a week (Mostafa et al., 2021). It is therefore important to have a significant gain of time but also LOD and Limit of Quantification (LOQ) to improve performance.

Biosensors are tools consisting of a biological and/or molecular recognition element and a transmitter (Azad and Chandra, 2023; Bhalla et al., 2016; Vernekar et al., 2021). They can be presented in various formats, for example a microchip, a lateral flow assay test or even

solutions. For a biosensor to be functional, the biological element must retain its activity. In addition, the exponentially increasing use of nanomaterials has been put to use in the field of biosensors. The development of nanoparticles (NP) or quantum dots (QD) coupled to a recognition element are increasing in the development of biosensors thanks to the intrinsic properties of the nanomaterials (Khan et al., 2019; Mahato et al., 2020). Some nanomaterial-based biosensors employ lectins as a recognition element for different sugar-patterned targets. This manuscript, as opposed to others seen in the literature which mainly focus on the different applications (Vishweswaraiah et al., 2022; Wang and Anzai, 2015), will be centered on the functionalization and characterization methods of lectins coupled to nanomaterials as biosensors. Indeed, the characterization, as well as the design, of any sensor must be characterized to understand the results and provide rightful interpretations (Singh and Chandra, 2024). In addition, this review will tackle the different methods by which a lectin is attached to a nanomaterial or a nanostructured surface and will discuss the pros and cons of each method. Furthermore, the different applications and performances of the sensors will be compared, regarding which functionalization method provides the best performance. Additionally, a critical discussion regarding the characterization steps of the sensors will be provided, which highlights the lack thereof in many studies.

1. Adsorption vs chemical functionalization: preparation methods and characterization

1.1. Preparation methods

Taking a deeper look at the construction of lectin-nanomaterial biosensors, there are two clear inclinations to the addition of lectin to nanomaterials. The first one can be described as a direct approach, *i.e.* physical adsorption, usually by simple incubation of a lectin with the nanomaterial in solution. The second can be considered an indirect functionalization or a grafting approach *i.e.* chemical modification with a specific chemistry designed to anchor the lectin to the surface of the nanomaterial. These two methods differ in the steps of modification of the nanomaterial which influences the binding forces between the nanomaterial and the lectin. Figure 1 represents these two strategies.

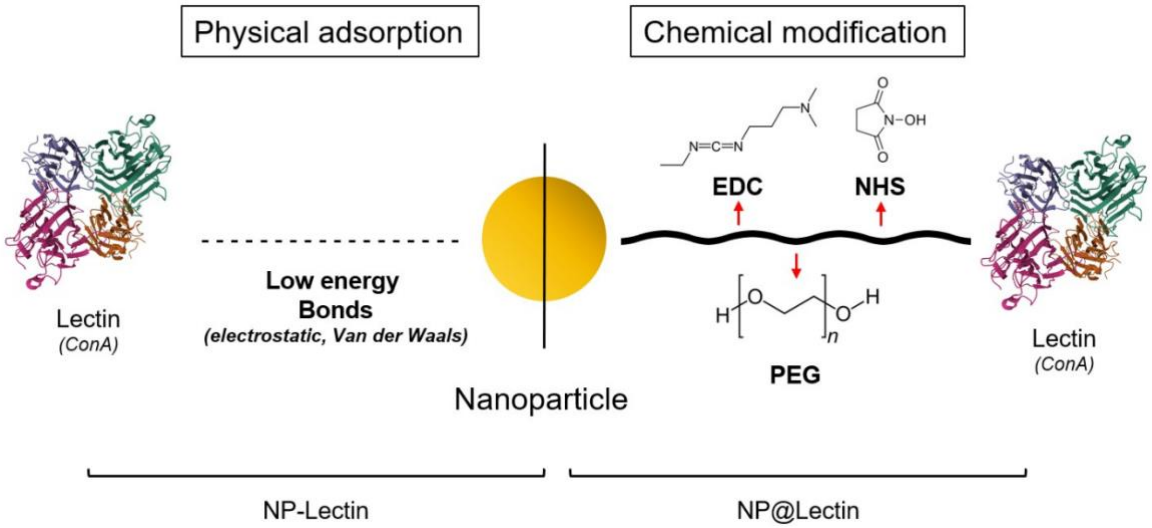


Figure 1. Schematic representation of the two main development strategies of lectin-nanomaterial biosensors. Image of Lectin Concanavalin A (ConA) from the RCSB PDB (RCSB.org) of PDB ID 1VLN (Kanellopoulos et al., 1996). EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide; NHS: N-hydroxysuccinimide; PEG: polyethylene glycol.

To go further, physical adsorption relies mostly on low energy binding (van der Waals, hydrogen bonds etc.), meanwhile indirect functionalization or grafting provides higher binding energies *via* the formation of covalent bonds. In this paper, physical adsorption will refer to the combination of the lectin and the nanomaterial by simple incubation, *i.e.* without any added

chemical process, linker or immobilization of any part of the biosensor. The term “adsorption” will be used throughout the manuscript to describe the addition of lectin to the nanomaterial being discussed in a non-covalent way, on the contrary to the modification leading to a creation of a covalent bond between the lectin and the nanomaterial. To homogenize the terms, the objects developed through incubation will be written using “NP-Lectin” whereas the ones developed by indirect functionalization or grafting modification will be “NP@Lectin”.

To prepare biosensors by physical adsorption, a simple incubation between the nanomaterial and the lectin can be sufficient. Table 1 details the biosensors prepared using this method. In most of the cases, inorganic NP mainly based on gold or silver, are the starting materials. This can be explained by the ease of synthesis of these NP and their photophysical properties, compatible with detection methods such as UV-Visible, fluorescence, Fourier Transformation Infrared spectrophotometry (FTIR), Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) etc. These NP are usually synthesized and obtained with molecules themselves adsorbed on the surface of the metallic core, such as citrate anions (Boukoufi et al., 2023). These ions can be displaced and replaced by the lectin (ligand exchange) or even overcoated by the lectin as it was already described for other biomolecules (Aravind et al., 2011; Kooti et al., 2023; Shin et al., 2012). In this protocol, researchers usually incubate the lectin and the nanomaterials at various molar ratios in a selected medium to obtain their biosensors. Lastly, as gold and silver are described as biocompatible, this can also explain their prevalence in the literature. Biocompatibility is, indeed, of great importance when designing an antipathogenic agent for pharmaceutical use (Baranwal et al., 2018).

Table 1. Summary of the physically adsorbed NP-Lectins and their characterization methods.

Initial material Size	**Lectin**	**Morphology Size of the NP-Lectin***	**Characterization methods**	**Applications**	**References**
AuNP 50 nm	MBL	Spherical Range from 50.75 to 58.77 nm	DLS TEM	Reduction of pathogens and modulation of immunity to improve sepsis survival	(Mao et al., 2025)
AuNP 18 nm	EHL	Spherical 54.4 nm	TEM DLS UV-Visible spectrophotometry	Toxicological studies against *C. elegans*	(Djafari et al., 2018)
AuNP 13 nm	RCA ConA SBA SNA MAA II GS II	Spherical 48.31 nm 32.39 nm 33.78 nm 25.91 nm 32.18 nm 27.83 nm	UV-visible spectrophotometry DLS TEM	Cell surface binding	(Wang et al., 2011)
Fe_2O_3@AuNP 22 nm	ConA RCA WGA	Spherical 24 nm 25 nm 31 nm	EDS DLS TEM UV-visible spectrophotometry	Contrasting agents for tumor detection	(He et al., 2014)
Bacterial Cellulose Nanocrystals decorated with AuNP 49 nm	ConA	Rods 400-800 nm (length) 30-40 nm (width)	SEM SERS	Detection of 19 bacterial strains	(Rahman et al., 2022)

PLGA 270 nm	LTA	Spherical 360 nm	AFM DLS Zeta potential SDS PAGE	Mucosal immunization against Hepatitis B	(Mishra et al., 2011)
PLA-PEG NP 70-80 nm	WGA	Spherical 85-90 nm	NMR SEM TEM	Brain delivery after intranasal administration	(Gao et al., 2006)
PLGA NP 407 nm	PNA	Spherical 399 nm	SEM DLS	Targeted formulation for oral immunization against Hepatitis B.	(Gupta et al., 2006)
GaN:Eu^{3+} NP 35 nm	LVA WGA	Hexagonal grains 500-1000 nm	XRD TEM Fluorescence spectrophotometry	Dying cells detection	(Bilyy et al., 2009)
Eu^{3+} NP 97 nm	WGA MGL	Spherical 107 nm	N/A	Detection of breast cancer-associated glycovariants of cancer antigen 15-3	(Terävä et al., 2019)
AgNP 15-20 nm	WGA	N/A	CD Fluorescence spectrophotometry	Characterization studies	(Kenoth et al., 2024)
AgNP 40 nm	ConA LCA	Spherical 48 nm	SERS SEM	Detection of cancerous prostate cells	(Craig et al., 2014)
Chitosan NP 174 nm	WGA	Spherical 186 nm	Cryo-FEG-SEM	POC bacterial infection detection	(Punjabi et al., 2022)

Silica NP 46 nm	ConA	Spherical N/A	UV-visible spectrophotometry Fluorescence spectrophotometry TEM CD	Photo and Bio-physical studies	(Wang et al., 2010)
Gliadin NP 412 nm	ConA UEA-I	Spherical 419-422 nm	SEM	*H. pylori* targeting	(Umamaheshwari and Jain, 2003)
CdTe QD 3.7 nm	PgTeL SteLL	N/A	Fluorescence spectrophotometry UV-visible spectrophotometry	Development of a fluorescent tool for *Cryptococcus neoformans* investigation	(da Silva et al., 2021)
CdTe QD 2.8 nm	CramoLL	N/A	Fluorescence spectrophotometry UV-visible spectrophotometry	Evaluation of glucose and mannose profiles in *Candida* species	(Oliveira et al., 2020)
CdTe QD 3.6 nm	CramoLL	N/A	UV-visible spectrophotometry Fluorescence spectrophotometry Flow cytometry	Targeting the cell wall of *C. albicans*	(Cunha et al., 2018)
Rifampicin Solid Lipid NP 47 nm	WGA	Spherical 65.48 nm	DLS Fluorescence spectrophotometry UV-visible spectrophotometry	Controlled delivery of Rifampicin	(Pooja et al., 2015)
PtNP N/A	Md-Lec	N/A	Fluorescence quenching	Antimicrobial and immunostimulatory effects in infected Nile tilapia	(Lakshmi et al., 2023)

* Indicated if mentioned in the referenced study

N/A: Not available

AFM: Atomic Force Microscopy; AgNP: Silver nanoparticles, AuNP: Gold nanoparticles; CD: Circular Dichroism; CdTe: Cadmium Telluride Quantum Dots; ConA: Concanavalin A; CramoLL: Cratylia mollis Lectin; DLS: Dynamic Light Scattering; EDS: Energy Dispersive X-ray spectrophotometry; EHL: Eranthis hyemalis Lectin; GS II: Griffonia simplicifolia; LCA: Lens culinaris Agglutinin; LTA: Lotus tetragonolobus Agglutinin; LVA: Leucojum vernum Agglutinin; MAA II : Maackia amurensis ; MBL: Mannose Binding Lectin; Md-Lec: Metapenaeus dobsoni Lectin; MGL: Macrophage Galactose-type Lectin; NMR: Nuclear Magnetic Resonance; NP: Nanoparticle; OniL: Oreochromis niloticus Lectin; PEG: Polyethylene Glycol; PgTeL: Punica granatum sarcotesta Lectin; PLA: Polylactic acid; PLGA: Poly(lactic-co-glycolic) acid; PNA: Peanut Agglutinin; POC: Point-of-care; PtNP: Platinum Nanoparticles; QD: Quantum dot; RCA: Ricinis communis Agglutinin; SBA: Soybean Agglutinin; SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis; SEM: Scanning Electron Microscopy; SNA: Sambucus nigra Agglutinin; SteLL: Schinus terebinthifolia leaves Lectin; TEM: Transmission Electron Microscopy; UEA-I: Ulex europaeus Lectin; WGA: Wheat Germ Agglutinin, XRD: X-Ray Diffraction

To functionalize lectins on NP, a chemical modification of either the lectin, NP or both can be performed. One of the most common ways to chemically functionalize lectins on NP is by using the very popular carbodiimide binding method *i.e.* EDC/NHS. EDC/NHS protocol works by activating the carboxylic groups to form amide bonds. EDC interacts with the carboxylic groups of nanomaterial to create the O-acylisourea intermediate. This intermediate is quite unstable and thus, reacts with NHS to form an NHS-ester that is much more stable. Once the NHS-ester is formed, it can react with a free amine group from the lectin to form an amide bond. This peptide bond is a covalent one that is especially useful to functionalize a lectin to a NP. Several authors used the EDC/NHS method to develop their sensor in a broad range of NP (chitosan (Punjabi et al., 2022), silver (Craig et al., 2014), silica (Wang et al., 2010), gold (Obaid et al., 2015)…) and lectins (WGA (Moulari et al., 2014), ConA (Craig et al., 2014), Helix pomatia (HPA) (Masigol et al., 2019)…). Not only that, EDC/NHS is applied to other NP such as Janus NP (Choi et al., 2021), nanopillar arrays (NPA) (Masigol et al., 2019) and QD (Cunha et al., 2018; Jafarzadeh et al., 2022) which proves this method to be really effective on a wide range of nanomaterials. Sometimes, there is a linker between the lectin and the nanoparticle such as a PEG moiety (He et al., 2014), (Wang et al., 2011). This can also permit a stronger bond between both partners, especially in the case of He *et al* who used a PEG NHS ester disulfide on the lectin (He et al., 2014). The different development strategies of NP@Lectin biosensors are listed in Table 2 and a representative scheme of a chemical functionalization method is illustrated in Figure 2.

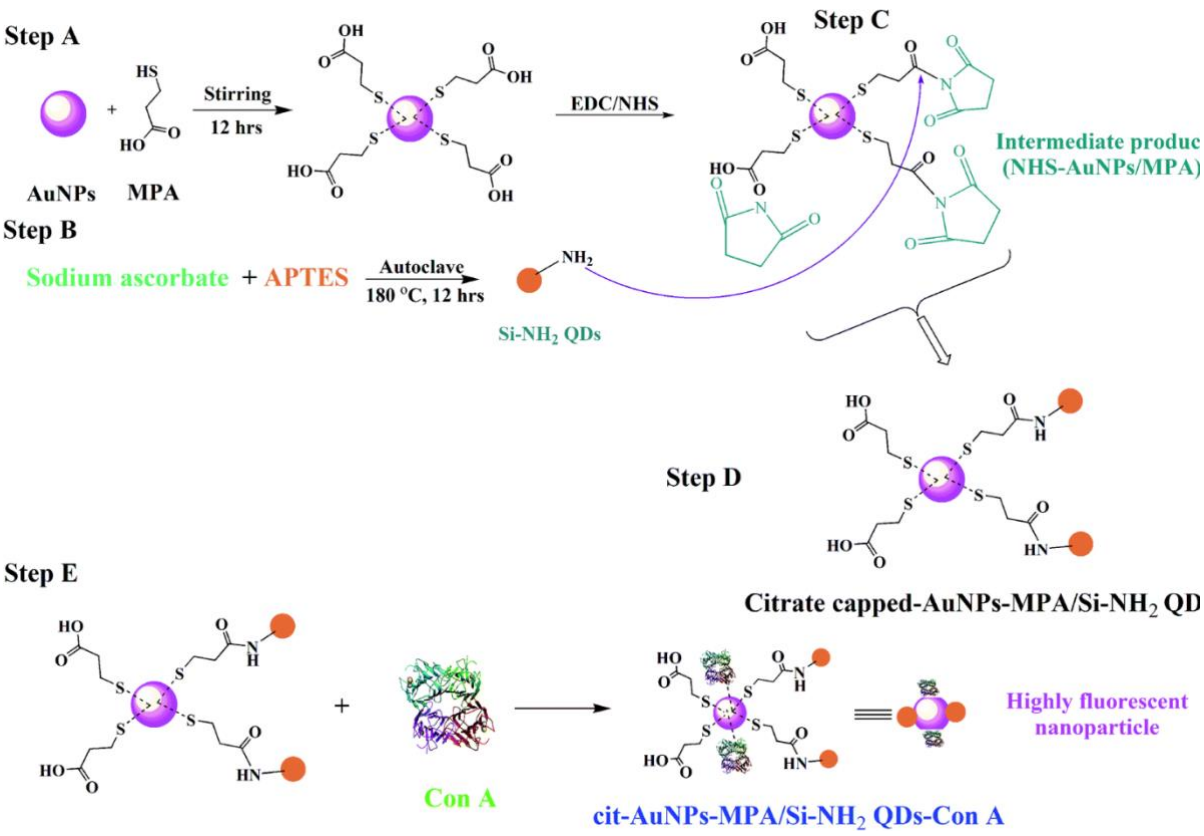


Figure 2. Scheme representing the synthesis of AuNP modified by mercaptopropionic acid, chemically functionalized by amine anchored-silica quantum dots for ConA attachment through thiol-Au bonds. Reproduced with permission from (Jafarzadeh et al., 2022). Abbreviations: APTES: (3-aminopropyl)trimethoxysilane; ConA: Concanavalin A; EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide; NHS: N-hydroxysuccinimide; MPA: mercaptopropionic acid; QDs: Quantum Dots

Table 2. Summary of the preparation methods of NP@Lectin biosensors using chemical modification.

Initial material Size	**Lectin**	**Morphology Size of the NP-Lectin ***	**Characterization methods**	**Purification**	**Application**	**References**
AuNP 30.9 nm	MBL WGA	Spherical 43.3 nm	MADLS Zeta potential NTA TEM UV-visible spectrophotometry Elemental analysis SDS-PAGE	Filtering on a 0.22 µm syringe filter	Interfacial interactions with cell membranes glycoproteins	(Yong et al., 2025)
AuNP 50 nm	AAL LCA SNA WGA	Spherical 65 nm	NTA Raman spectrophotometry UV-Visible spectrophotometry Zeta potential	Centrifugation to remove unbound lectins	Probe design for glycans	(Yaraki et al., 2024)
AuNP 20 nm	ABL	Spherical 35.82	DLS FTIR SEM UV-visible spectrophotometry XRD Zeta potential	Centrifugation to remove unbound lectins	Cytotoxicity and apoptosis induction in leukemic cell lines	(Akram et al., 2022)
Spherical cit-AuNP N/A	ConA	Semi-spherical FESEM: 60 nm DLS: 75 nm	DLS FESEM Fluorescence spectrophotometry UV-Visible spectrophotometry	Dialysis (molecular weight cutoff: 1 kDa) for removal of excess molecules	Bioimaging of glycan-positive cancer cells	(Jafarzadeh et al., 2022)

AuNP 4 nm	Jacalin	Spherical N/A	UV-visible spectrophotometry	Centrifugation to remove unbound lectins	Phtalocyanine-PEG gold nanoparticles functionalized with Jacalin for Photodynamic Therapy	(Obaid et al., 2015)
Spherical PAMAM-G4-AuNP 6.1 nm	Jacalin	Spherical 20 nm	UV-Visible spectrophotometry CD TEM DLS FTIR ITC Fluorescence quenching	Jacalin purification by affinity chromatography Centrifugation	Specific markers for leukemic K562 cells	(Marangoni et al., 2013)
Spherical cit-AuNP Dc: 12.09 nm Dh: 16.62 nm	MBL	Spherical Dc: 13.25 nm Dh: 177.47 nm	TEM DLS	Centrifugation to remove unbound lectins	Screening test against Methicillin-Resistant *S. aureus*	(Yi et al., 2023)
AuNP 20 nm	ECL	N/A	N/A	N/A	Affinity monolithic extraction phase	(Alwael et al., 2011)
Anisotropic cit-AgNP N/A	Potato lectin	Anisotropic N/A	UV-Visible spectrophotometry TEM	Lectin dialysis before adsorption	Detection of *E. coli*, *B. subtilis* and *S. aureus*	(Gasparyan and Bazukyan, 2013)
Anisotropic cit-AgNP N/A	WGA LCA	Anisotropic N/A	UV-Visible spectrophotometry TEM	Lectin dialysis before adsorption	Detection of *E. coli* and *S. aureus*	(Mikaelyan et al., 2017)
Spherical and anisotropic cit-AgNP CdSe QD	C-type lectin from egg shell	Spherical and anisotropic N/A	UV-Visible spectrophotometry	Lectin dialysis before adsorption	Detection of *S. aureus*	(Hovhannisyan et al., 2017)

N/A						
Spherical N14T-AgNP Dh: 10 nm	Jacalin	N/A	UV-Visible spectrophotometry Fluorescence quenching TEM EDS	N/A	Antibacterial and antibiofilm activity of AgNP-Jacalin against *S. aureus*	(Subramaniyan et al., 2021)
Anisotropic cit-AgNP N/A	WGA LCA Lectin from mushroom (Pleurotus ostreatus) Tomato lectin (Lycopersicon esculentum)	Anisotropic N/A	UV-visible spectrophotometry	N/A	Detection of *S. cerevisiae*	(Gyurjyan et al., 2020)
Spherical PEG-AgNP 3.89 nm	SBA	146.43 nm	DLS TEM	N/A	Cytotoxicity evaluation against breast cancer cells (MDA-MB-231 and MCF7)	(Casañas Pimentel et al., 2016)
Chitosan NP 20 nm	PHA PNA SNA	Spherical 30 – 35 nm 25.2 – 28 nm 36..3 – 128 nm	TEM UV-visible spectrophotometry	Centrifugation to remove unbound lectins	Antibacterial and anticancer activity assessment	(Soliman et al., 2024)
Spherical chitosan-capped AuNP Dc: 16 nm Dh: 50 nm	SNA	Spherical Dh: 100 nm	UV-Visible spectrophotometry DLS TEM FTIR	Centrifugation to remove unbound lectins by discarding the supernatant	Biosensor to differentiate between cervical cancer cell lines and fibroblasts	(Zamudio Cañas et al., 2024)
Eu^{3+} NP 107 nm	MGL	N/A	N/A	Centrifugation to separate the aggregates	Detection of PSA glycovariants	(Kekki et al., 2024)

				from the monodisperse suspension		
Polystyrene NP 100 nm	AAL	N/A	N/A	Centrifugation to remove unbound lectin	Quantification of fucosylation on free prostate specific antigen	(Ali et al., 2020)
Polystyrene NP N/A	BPA BPL DC-SIGN DSL GSL-I MAA-II MBL PWM UEA-I WFA	N/A	N/A	Centrifugation to remove aggregates	Detection of extravesicular vesicles	(Islam et al., 2019)
Polystyrene latex 230 nm	ConA	N/A	SdFFF SEM	N/A	Glycosylation analysis	(Fromell et al., 2005)
Fe_3O_4 19 nm	PNA	Spherical 2090 nm	DLS FTIR Raman spectrophotometry TEM Zeta potential	Magnetic separation	Evaluation of beneficial effects on donkey sperm characteristics	(Yousef et al., 2020)
Spherical SiNP 61.6 nm	UEA-I	Spherical 75.4 nm	TEM DLS Zeta potential TGA Fluorescence spectrophotometry	Centrifugation	Endoscopic detection of premalignant colonic lesions	(Chen et al., 2017)

Carbon QD 2-5 nm	LEL	Spherical 230 nm	Agarose gel electrophoresis Capillary electrophoresis DLS Fluorescence spectrophotometry UV-visible spectrophotometry Zeta potential	Dialysis in a 1000 Da dialysis bag for one day followed by centrifugation in a 30 kDa ultrafiltration tube	Labelling and imagine of liver vessels	(An et al., 2022)
Cubic MSA-stabilized CdTe QD 3 nm	ConA	N/A	UV-visible spectrophotometry DLS TEM XRD CD	N/A	Saccharide detection in *C. albicans*	(Tenório et al., 2015)
Gliadin NP 460 nm	DBL	Spherical 521 nm	DLS Zeta potential HPLC	Centrifugation to remove unbound lectins	Evaluation of bioadhesive potential	(Arangoa et al., 2000)
PLGA NP 436 nm	PNA WGA	Spherical 525 ± 28 nm 475 ± 53 nm	DLS UV-visible spectrophotometry	N/A	Targeting of experimental colitis tissue	(Moulari et al., 2014)
Carbon nanodiamonds 120 nm	AAL TL WGA	Spherical 100-500 nm 100-1100 nm (WGA)	Confocal microscopy DLS TEM	Centrifugation to remove unbound lectins and excess reagents	Targeting cell surface glycans	(Fard et al., 2022)
Nano-MIL-53(Al)-NH_2 MOF 80 nm	FcMBL	Hexagonal prism 1.0-1.8 µm	Fluorescence spectrophotometry SEM TEM	N/A	*B. cereus* detection	(Yan et al., 2023)

* Indicated if mentioned in the referenced study
N/A: Not available

AAL: *Aleuria aurantia* Lectin; ABL: *Agaricus bisporus* Lectin; AgNP: Silver nanoparticles; AuNP: Gold nanoparticles; BPA: *Bauhinia purpurea* Lectin; CD: Circular Dichroism; CdSe QD: Cadmium Selenide Quantum Dots; CdTe QD: Cadmium Telluride Quantum Dots; ConA: Concanavalin A; DBL: *Dolichos biflorus* Lectin; DC-SIGN: Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin Lectin; DLS: Dynamic Light Scattering; DSL: *Datura stramonium* Lectin; ECL: *Erythrina cristagalli* Lectin; EDS: Energy Dispersive X-ray spectrophotometry; FcMBL: Fragment crystallizable Mannose Binding Lectin; FESEM: Field Emission Scanning Electron Microscopy; FTIR: Fourier-transform Infrared spectrophotometry; GSL-I: *Griffonia simplicifolia* Lectin; HPLC: High Performance Liquid Chromatography; ITC: Isothermal Titration Calorimetry; LCA: *Lens culinaris* Agglutinin; LEL: *Lycopersicon esculentum* Lectin; MAA-II: *Maackia amurensis* Lectin II; MADLS: Multi Angle Dynamic Light Scattering; MBL: Mannose Binding Lectin; MGL: Macrophage Galactose binding Lectin ; MIL: Materials of Institut Lavoisier; MOF: Metal Organic Framework; MSA: Mercaptopropionic acid ; NMR: Nuclear Magnetic Resonance; NTA: Nanoparticle Tracking Analysis; PEG: Polyethylene glycol; PHA: Phytohemagglutinin Lectin; PLGA: Poly(lactic-co-glycolic) acid; PNA: Peanut Agglutinin; PWM: *Phytolacca americana* Lectin; QD: Quantum dot; RCA: *Ricinis communis* Agglutinin; SBA: Soybean Agglutinin; SdFF: Sedimental Field-Flow Fractionation; SEM: Scanning Electron Microscopy; SNA: *Sambucus nigra* Agglutinin; TEM: Transmission Electron Microscopy; TGA: Thermogravimetric Analysis; TL: Tomato Lectin; UEA-I: *Ulex europaeus* Lectin; WFA:Wisteria floribunda Agglutinin ;WGA: Wheat Germ Agglutinin; XRD: X-Ray Diffraction

Comparing the two strategies mentioned above, the molar ratio between the lectin and the nanomaterials are usually close to unity (Marangoni et al., 2013) when researchers chose the direct method, whereas the ratios are increased when selecting the indirect method, up to 400/1 (lectin/nanoparticle)(Wang et al., 2011). This may be explained to force the reaction to lead to the formation of the final product NP@Lectin. However, it is mandatory to purify the medium (from lectin or nanomaterial or other reagent excess) to use the biosensor without any interfering agents. This can be performed by centrifugations (simple or successive (Djafari et al., 2018; Marangoni et al., 2013), respectively) or dialysis (simple or successive (Allen et al., 1973; Bilyy et al., 2009; Chen et al., 2017; Craig et al., 2014; Gasparyan and Bazukyan, 2013; Gyurjyan et al., 2020; Mikaelyan et al., 2017; Wang et al., 2000)). Size exclusion chromatography (SEC) also seems an appropriate alternative, though less used, which is less denaturizing for proteins and less degrading for NP (Gao et al., 2006). The selection of the correct molar ratio between the nanomaterial and the lectin is a crucial point to obtain the biosensor without aggregating the system. This was seen in (Djafari et al., 2018) with the EHL lectin being responsible for the aggregation of the system, when its concentration increased. Furthermore, proper design and molar ratio choice will impact the stability of the biosensor (Jafarzadeh et al., 2022), which is of importance. This is especially true for biosensors developed as a point-of-care (POC) device which has to be synthesized in advance of the testing and can be subjected to temperature and/or light variation.

1.2. Structure of the biosensors, focus on representative data and interpretations given by the physicochemical characterization

As with all nanomaterials synthesized, the physicochemical characterization of biosensors must be carried out to understand their architecture and benefit from their performance. Usual methods are devoted to characterizing the biosensor in term of a new nanomaterial using DLS, AFM or TEM and UV-vis spectrophotometry in the case of plasmonic NP. The relevance of interpreting the results obtained by DLS must be questioned when the sample does not satisfy the classical following assumptions: the objects analyzed must be assimilated to spheres, they do not interact with the laser in any way other than by scattering, nor do they interact with each other, there is no other parasitic reaction in progress, and the suspension is in a state of equilibrium. If these conditions are not satisfied, it would be beneficial to turn towards another technique, which allows for morphology characterization. Techniques such as electronic microscopy are usually well fitted to complete such task, though the immobilization of a suspension of a metallic grid for analysis can also disrupt the object. Other techniques such as CD, FTIR or XRD are used to check the impact of the functionalization process on the conformation of the lectin, mainly its secondary structure. The quantity of lectin adsorbed or grafted on the NP ought to be evaluated using for example thermogravimetry, or ITC or usual technics to quantify both the proteins (e.g. Bradford, bicinchoninic acid assays) and the NP (NP tracking, induced coupled plasma-optical spectrometry…). In parallel, depending on the properties of the initiate nanomaterial and the lectin, the affinity constant, the type of binding, especially when no covalent bond is created (adsorption), can be determined *via* the use of fluorescence and more precisely quenching of fluorescent (FQ) amino acid(s) of the protein by the NP (Hanigan-Diebel et al., 2024)) or ITC (Marangoni et al., 2013) or AFM in force mode (Pyrgiotakis et al., 2013). By doing so, researchers can draw conclusions on the strength of their system and can choose, or not, to modify their protocol depending on the application targeted to increase the binding forces between the partners.

The addition of the lectin on the NP is expected to increase the hydrodynamic diameter and to modify the surface charge of the native NP, depending on their innate physicochemical properties. Detailed examples from the literature are given in Table 1 for NP-Lectins. This was also observed for NP@Lectin as seen in Table 2. The binding of NP to the lectin induced either a slight increase of the size (85 to 90 nm (Gao et al., 2006)) or a higher one (270 to 360 nm (Mishra et al., 2011)). In another study, the characterization of mesoporous silica NP simply incubated with UEA-I showed an increase in hydrodynamic diameter from 61 for the NP alone

to 75 nm NP with UEA-I parallel to a significant decrease in the surface charge from +9.68 mV to -13.5 mV (Chen et al., 2017). On the contrary, the zeta potential value of citrate capped AuNP was – 32.9 mV and increased to a neutral value (-2.75 mV) after their incubation with MBL (AuNP-MBL) (Yi et al., 2023). From this result, the authors suggested that there was a contribution of electrostatic interactions through a positively charged MBL. Additionally, an increase in the polydispersity index (non-homogeneous NP population) is proof of either a poor process control or the beginning of destabilization of the biosensor. In order to optimize the shelf-life and for the sensor to gain the best performance, this observation should lead to a change in the chosen nanomaterial/lectin ratio, as it is shown with EHL in Figure 3a, 3b, 3c and 3d (Djafari et al., 2018). These TEM pictures show a EHL concentration-dependent aggregation of the AuNP-EHL with evident aggregation occurring in Figure 3a. Figure 3b shows the condition the authors selected in which no sign of NP aggregation is observed than in Figure 3a. Meanwhile, conditions obtained in Figures 3c and 3d were not selected by the authors as they both contain a higher EHL volume and also lead to aggregation. The aggregation was hypothesized to be due to the dimeric structure of EHL which could act as a linker between NP and thus, cause them to aggregate.

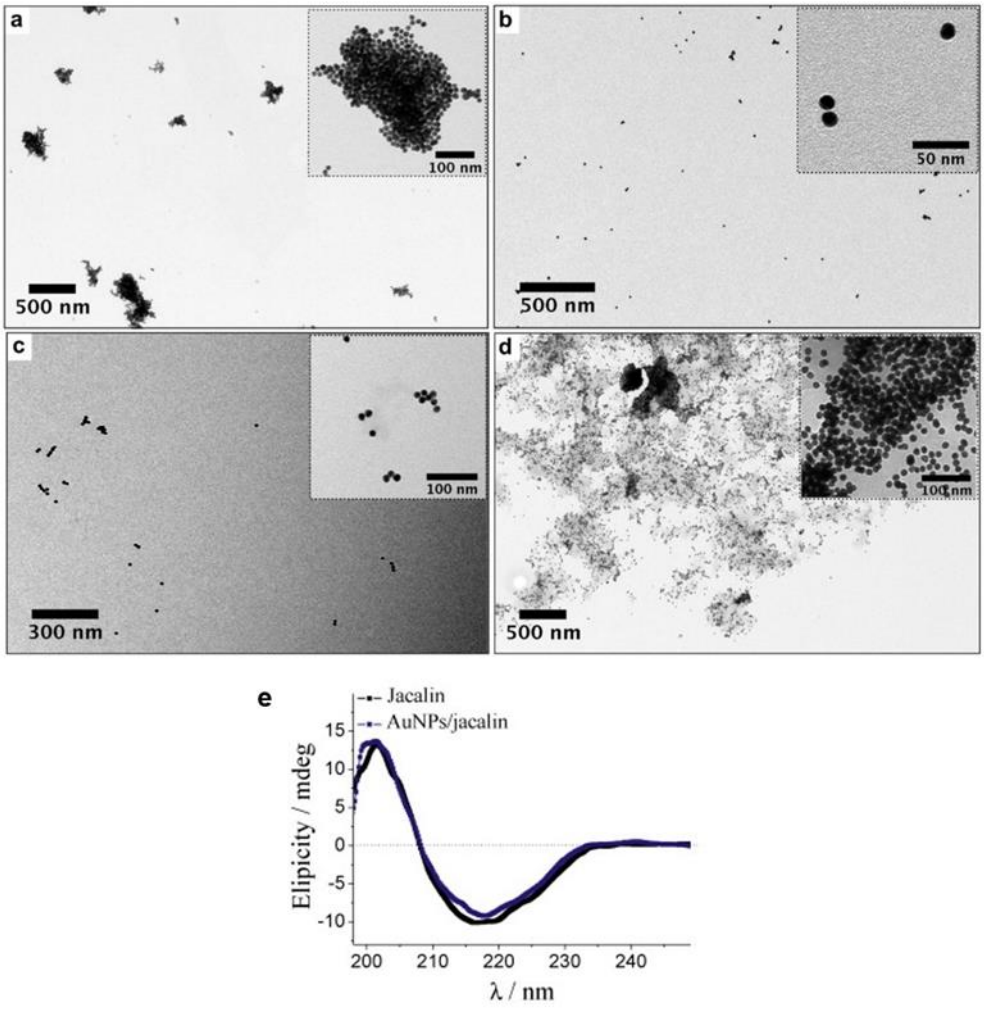


Figure 3. TEM photographs showing AuNP@EHL with different volumes of EHL added to 5 mL of AuNP at [Au (0)] = 0.8 mM : a) AuNP@EHL with 25 µL of EHL b) AuNP@EHL with 100 µL of EHL c) AuNP@EHL with 200 µL of EHL and d) AuNP@EHL with 500 µL of EHL. Reproduced with permission from (Djafari et al., 2018). e) CD spectra of Jacalin (black line) and Jacalin adsorbed on AuNP (dark blue line). Reproduced with permission from (Marangoni et al., 2013).

To further understand the structure of biosensors, we can cite the study of Marangoni *et al,* who performed several characterization techniques, using FTIR, CD, ITC and FQ to better understand the interaction process between Jacalin and AuNP after incubation and centrifugation step for purification (Marangoni et al., 2013). Their results indicated that the lectin did not undergo any modification in its secondary structure after the addition of AuNP using CD (Figure 3e). Data showed a percentage of α-helix of 3.7% for Jacalin alone and a percentage of 3.5% after addition of AuNP. For the β-sheets, the percentage slightly decreased from 42.9% to 41.7%. This is a very important conclusion as the structure of the protein is

directly related to its function (Berg et al., 2019; Voet and Voet, 2010) and in this case, the carbohydrate binding activity of the lectin for the biosensor. These results, while positive as very little changes in the structure are highlighted, emphasized the need for protein structure information before and after addition to the NP. It is seen here that very small changes affect the structure and could potentially affect the lectin activity.

ITC results, though no numerical data is available in this article (Marangoni et al., 2013), permitted the authors to conclude that there was an endothermic reaction with a constant calorimetric response after repeated injections of Jacalin to AuNP. This translated a saturation of the available binding sites for AuNP on Jacalin. This method also provided a binding stoichiometry of Jacalin onto AuNP with approximately 10 lectins adsorbed on a singular NP. This is an interesting result to discuss as the Jacalin and AuNP in this study are almost of the same size (5 nm (DLS) and 6.1 nm (TEM) respectively). However, certain experimental conditions are required to perform ITC, the NP and lectin must be in the same buffer to avoid heat artefacts from different buffers, experimental temperature should be chosen accordingly, so as not to interact with the binding enthalpy. The concentration of the NP and lectin must be properly chosen to allow for good data quality. ITC therefore seems a good characterization technique as it characterizes the NP-Lectin sensors prior to running the experimental acquisition. It is regretful that DLS graphs show AuNP size but the value is not available in the manuscript for a direct comparison, especially as the authors concluded that a 3.2 nm layer of Jacalin was present on the surface of AuNP. However, these results can bring forward the hypothesis of a multi-layer system of Jacalin on top of AuNP. Indeed, if Jacalin and AuNP are in the same size range and 10 lectins are present on a singular NP, steric hindrance would make this value impossible. The concept of a multi-layer system would be interesting to study, especially to compare the behavior of Jacalin proteins that are closer to the NP versus Jacalin proteins further away. As obtained by ITC, the affinity constant of 1.5×10^9 M^{-1} was measured, and it was in the same order as the FQ. This value is important and may prove the good stability of this association as it was seen with albumin and AuNP in (Beurton et al., 2020).

Specific agents (such as salt to space the electrostatic binding or urea to destabilize hydrogen bonds) can be selected and added to demonstrate the type of binding involved into the adsorption of the lectin on the nanomaterial. For example, to demonstrate the adsorption of EHL on the surface of citrate capped-AuNP, NaCl was added. It was shown that NaCl caused an aggregation of citrate capped-AuNP, which is already reported in the literature (Blaškovičová et al., 2023), but more interestingly not of AuNP-EHL. This proved that EHL

interacted with AuNP and stabilized them enough not to be disrupted by the added salt. The authors therefore concluded that the interaction between AuNP and EHL was not governed by electrostatic interactions (Djafari et al., 2018).

2. Biosensors obtained by physical adsorption *i.e.*, NP-Lectin

2.1. Advantages, drawbacks

The major advantage of using physical adsorption is the ease of process. It requires less solvents and products and relies on adding one component to the other. There is also usually no need for important changes of the medium (pH, temperature…). The time gain is also a major point. All of these advantages are attractive factors when deciding to develop a POC sensor as it means there is no need to extensively train medical staff or the patient themselves. Not having to modify the chemical environment of the nanomaterial cuts off several synthesis steps and incubation times. Importantly, since the lectin is used for its carbohydrate binding activity, the structure integrity is a key element to determine the activity retention of the lectin (Raval et al., 2004). Indeed, it is well known that proteins are highly sensitive to the variations of pH, salt, temperature and certain solvents (Guckeisen et al., 2021). Not having to introduce new solvents without temperature and pH modification reduces the risk of the lectins to be denatured and further lose their properties. Comparing the results in presence or not of the NP is therefore a great way to observe NP-induced modifications and confirm that the protein retains its secondary structure as it was described in (Marangoni et al., 2013). It is especially important as the structure of the protein is directly related to its function (recognition mechanism) (Berg et al., 2019; Voet and Voet, 2010).

However, physical adsorption means that the lectin attaches itself to the nanomaterial through low energy bonds (1-40 $kJ.mol^{-1}$) (Israelachvili, 2011) even if there is a good affinity between the two compounds. Electrostatic interactions (Andrade et al., 2011; Cunha et al., 2018; Xue et al., 2011) are usually the type of bonds involved. The main problem concerns ligand competition: the NP or lectin could detach itself from the other in the presence of a compound that has a stronger affinity for the partner. In that regard, it would be of great importance to quantify the binding forces between each partner to evaluate the state of the biosensor in presence or not of the target analyte or in the medium of analysis which is usually more complex than the medium of preparation.

A question that can also be raised regarding the low energy interactions, is the stability of the biosensors comparing to the chemical grafting of the lectin on the nanomaterial. As an illustration of this problem, Gasparyan and Bazukyan showed that their AgNP were stable and retained their optical properties for at least one month. After addition of potato lectin, this stability decreased to 1 week as they noticed optical changes that were attributed to aggregation

of the NP and changes of refractive index on their surface (Gasparyan and Bazukyan, 2013). Meanwhile, Gao and coworkers noted that their AuNP-Lectin biosensors can be stored for over 6 months at 4 °C without undergoing any modification, though it was not specified which parameters were evaluated to come to this conclusion (Gao et al., 2010). These unpredictable stabilities are not ideal and could be a reason to turn towards a chemical modification to allow for a covalent binding of the lectin. They can be explained if samples undergo several steps of centrifugation or dialyses to discard unbound proteins. The repeated centrifugation cycles, if performed at extremely high speeds for long periods of time, can lead to the aggregation of NP (Chen et al., 2024), modification of the lectin structure or conformation (Krzek et al., 2022) and could result in a less stable biosensor. Meanwhile, the shape of the NP seems of great importance in the stability of the biosensor. For example, spherical AgNP were more stable in comparison to the anisotropic AgNP after incubation with the C-type lectin from egg (5 $\mu g.mL^{-1}$ NP vs. 0.2 $\mu g.mL^{-1}$ NP) shell (Hovhannisyan et al., 2017).

2.2. Performances

Lectin based sensors find applications in various fields ranging from pathogen detection, specific cancer cell markers and in agricultural fields. Studies provide a novel way of detecting certain species (E. coli, S. aureus) and with an extremely low time range compared to routine tests. The results of the different biosensors and corresponding performances are listed in Table 3.

Table 3. Applications and performance results of NP-Lectins.

Application	**Biosensor**	**Performance (*method*)**	**Reference**
Detection of *E. coli*	WGA-AgNP	10^7 to 3 x 10^3 cells.mL^{-1} (*UV-Visible spectrophotometry*)	(Mikaelyan et al., 2017)
	LCA-AgNP	10^7 to 8 x 10^4 cells.mL^{-1} (*UV-Visible spectrophotometry*)	(Mikaelyan et al., 2017)
	Potato lectin-AgNP	Up to 1.5 x 10^4 mL^{-1} (*UV-Visible spectrophotometry*)	(Gasparyan and Bazukyan, 2013)
Detection of *S. aureus*	Potato lectin-AgNP	Up to 1.5 x 10^4 mL^{-1} (*UV-Visible spectrophotometry*)	(Gasparyan and Bazukyan, 2013)
	WGA-AgNP	10^7 to 10^3 cells.mL^{-1} (*UV-Visible spectrophotometry*)	(Mikaelyan et al., 2017)
	LCA-AgNP	10^7 to 1.6 x 10^4 cells.mL^{-1} (*UV-Visible spectrophotometry*)	(Mikaelyan et al., 2017)
	C-type lectin- AgNP CdSe QD	6 x 10^3 – 2 x 10^7 cells.mL^{-1} (*UV-Visible spectrophotometry*)	(Hovhannisyan et al., 2017)
	Jacalin-AgNP	Kills *S. aureus* in less than 30 minutes and reduces the biofilm thickness (*Confocal laser scanning microscopy, crystal violet assay*)	(Subramaniyan et al., 2021)
Detection of *B. subtilis*	Potato lectin-AgNP	Up to 1.5 x 10^4.mL^{-1} (*UV-Visible spectrophotometry)*	(Gasparyan and Bazukyan, 2013)
Detection of *S. cerevisiae*	Potato lectin-AgNP	10^7 to 3.2 x 10^3 cells.mL^{-1} (*UV-Visible spectrophotometry*)	(Gyurjyan et al., 2020)
Detection of leukemic cells K562	Jacalin-AgNP	N/A	(Marangoni et al., 2013)
Labelling of *C. neoformans*	SteLL-QD PgTeL-QD	Over 90% cells labelling *(Flow cytometry)*	(da Silva et al., 2021)

Assessment of glucose and mannose profiles in *C.* species	CramoLL-CdTeQD	Higher amount of glucose and mannose in *C. parapsilosis* than in *C. albicans* and *C glabrata*.	(Oliveira et al., 2020)
Targeted delivery of therapeutics to breast cancer cells	WGA-AgCu NP	N/A	(Ashraf et al., 2022)
Endoscopic detection of premalignant colonic lesions	UEA-I-SiNP	N/A	(Chen et al., 2017)

N/A: Not available

AgCu NP: Silver Copper Nanoparticles; AgNP: Silver Nanoparticles; CdSe QD: Cadmium Selenium Quantum Dots: CdTe QD: Cadmium telluride Quantum Dots; CramoLL: *Cratylia mollis* Lectin; LCA: *Lens culinaris* Agglutinin; PgTeL; *Punica granatum* sarcotesta Lectin; SiNP: Silica Nanoparticles; SteLL: *Schinus terebinthifolia* leaves Lectin ; UEA-I: *Ulex europaeus*; WGA: Wheat Germ Agglutinin

Lectin biosensors prepared by adsorption are mainly devoted to bacteria detection with a focus on *E. coli* and *S. aureus*. These two species are the most common pathogens in nosocomial infections and bacteremia, causing around 90 000 deaths in North America and 157 000 deaths in Europe each year (Goto and Al-Hasan, 2013), which explains the focus on these bacteria as there is still a need for proper early detection. The biosensors seem performative enough to detect the pathogens with a significantly lower analysis time (few minutes to a few hours) than with gold standard methods (18-72 h), this fast response is crucial to orient the patient therapy, enabling a more targeted probabilistic antibiotic therapy to increase the recovery chances. For *E. coli*, a detection range of 3 x 10^3 to 10^7 cells.mL^{-1} was obtained with different lectins (WGA and LCA) and AgNP (Mikaelyan et al., 2017) with a spectrophotometric technique. In the same study, the detection range of *S. aureus* with the same lectins and AgNP was similar. For comparison, using flow cytometry, one study showed that it was possible to detect viable *E. coli* down to a singular cell by targeting *E.coli* Ribonucleic acids (Williams et al., 2017) in 9 h. One characteristic worth mentioning is that because the biosensor forms instantly, the results can be obtained as soon as the target is added to the biosensor, depending on the detection method chosen. On the contrary, gold standard methods such as microbiological culture will be more time-consuming as there is a need for bacteria enrichment which usually takes 24 h. Biosensors that possess low detection thresholds can therefore bypass this use. One biosensor made of Jacalin functionalized AgNP (Figure 4) could even kill *S. aureus* in less than 30 min versus 120 min for the AgNP alone (Figure 4B) (Subramaniyan et al., 2021). In this specific case, non-methicillin resistant *S. aureus* was cultured at 37°C for 24 h. After incubation with the biosensor, the concentration of *S. aureus* decreased from 1.2 x 10^7 to 0 CFU.mL^{-1} in 30 min.

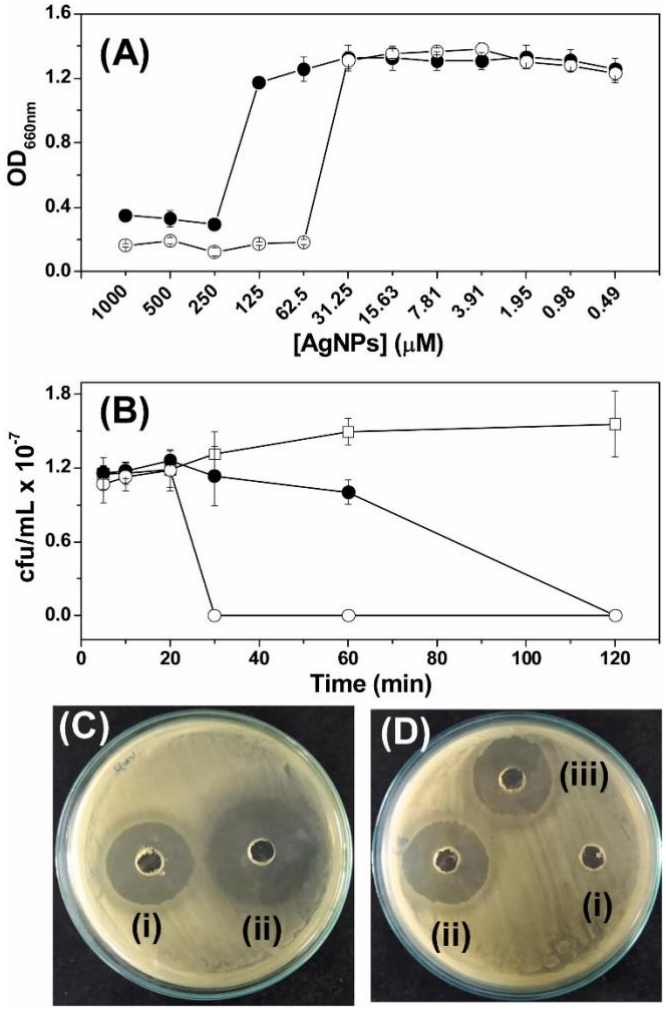


Figure 4. Antibacterial activity results of Jacalin adsorbed on AgNP. A) represents the minimum inhibitory concentration (MIC) of *S. aureus* when in presence of AgNP (black circle) and Jacalin-AgNP (white circle). B) represents the formation of bacterial colonies as a function of time, with no treatment of the bacteria (white square), treatment of bacteria with AgNP (black circle) and treatment of bacteria with Jacalin AgNP (white circle). C) shows the zones of inhibition of *S. aureus* by (i) 250 µM AgNP, (ii) 250 µM Jacalin- AgNP and D) shows the zones of inhibition of *S. aureus* by (i) 62.5 µM AgNP, (ii) 62.5 µM Jacalin-AgNP and (iii) 3 µM ciprofloxacin, an antibiotic. Reproduced with permission from (Subramaniyan et al., 2021). Abbreviations: AgNPs: Silver nanoparticles; OD_{600}: Optical Density measured at 600 nm.

One study worth citing here is the study of (Islam et al., 2019) which employs 9 lectins in a physical adsorption protocol. This brings the hypothesis that in the future, as the research advances, it would be of great pertinence to utilize the different sugar-binding specificities of different lectins to create a discriminating assay or probe. In that way, it could become possible

to screen several pathogens all at once and possibly in a single device. Additionally, one could also think of a multi-target probe, which could be used for pathogen detection as well as cancer cells.

Cancer cells are also the target of lectin biosensors as seen with the targeting of leukemic cells (Marangoni et al., 2013) which is a great perspective for less invasive cancer diagnosis and/or imaging procedures. Whilst the study did not provide a LOD for the detection of these cells, it did however share a positive conclusion on the efficiency of the biosensor. Additionally, most studies cited in this section concluded with a positive outlook on the doors these sensors can open soon.

3. Biosensors obtained by chemical functionalization *i.e.*, NP@Lectin

3.1. Advantages, drawbacks

The main reason behind using a chemical modification to functionalize NP with lectins is that the lectin is anchored with a stronger bond to the NP versus the physical adsorption protocol (430-870 kJ.mol-1 (Israelachvili, 2011). Being able to have a biosensor that is covalently linked is of great importance to ensure the lectin does not leave the surface of the NP. The strong energy binding could allow for a longer storage period and enhance the stability of the NP@Lectin. Indeed, it was shown that PEGylation helps prevent aggregation of AuNP in presence of NaCl (Guerrini et al., 2018). This implies that using PEG would also increase the stability of lectin-modified AuNP in such medium. Another positive dimension of using chemical modification is that by using a specific linker or method that reacts with a known part of the protein (Zhang et al., 2006), it can be possible to make sure that the active sites of the lectin are not hidden and thus, reduce the risk of losing the lectin activity.

It should be noted that most studies cited in this review do not provide a detailed focus on the stability of their systems, whether they retain activity overtime or if time-dependent aggregation occurs. In fact, little to no information is provided regarding their definition of stability, what precisely is considered good stability and stability experiments. While it is great to explore alternative ways and methods that can provide increased stability of NP and NP-Lectins, a common consensus should be provided by studies to lift the cast on this issue. For instance, evolution of the size of the NP, surface charge, presence of aggregation and decrease of performance should be some of the key points to describe. To illustrate this, the study of Jafarzadeh et al dedicated a specific part to the stability of their nanocomposite. They provided results regarding the influence of ionic strength of the medium, influence of UV light on their nanocomposite and storage stabilities when the nanocomposite is kept in the fridge. These results permit to better understand the behavior of their nanocomposite as well as the best time window to use it to obtain the best performances (Jafarzadeh et al., 2022) which was concluded to be 10 min as their nanocomposite starts to experience meaningful fluorescence intensity changes. This time frame is very short and highlights the importance of such information, especially when the main goal is to obtain the lowest LOD/LOQ possible.

Additionally, another study which delved into this topic performed flow cytometry not only to quantify the biosensor interaction with C. albicans but also to test the most effective conjugation protocol (covalent versus adsorption). Surprisingly, after one year, the percentage of labeled

cells was increased for the biosensor developed with a physical adsorption approach (62%) compared to the covalent protocol tests (17%) (Cunha et al., 2018). This result, while surprising, can also be a direct drawback of the addition of chemical components during the covalent binding process which could interfere with the cells or components of the biosensor. However, the authors did not provide a hypothesis or explanation that can confirm what caused this difference. This also raises the concern that, even if purification steps are performed to remove all the excess reagents, one cannot be certain of the possibility of remaining traces.

3.2. Performances

Compared to the range of applications listed in the previous part, chemically modified biosensors are used in a wider range of applications and are not only focused on bacteria detection. This fact does not come with a proper explanation and could simply be attributed to the fact that teams tried to broaden the use of NP@Lectin. The quantified results of detection, loading and encapsulation efficiency are listed in Table 4. In fact, most studies focused on cancer detection, drug delivery or targeting certain species. For instance, E. coli detection was performed through Bacterial Cellulose Nanocrystals with ConA (BCNC@ConA) and the authors highlighted a LOD of 10^3 CFU.mL^{-1} when combined with a SERS detection method (Rahman et al., 2022). Because the performances in the previous parts for E. coli detection were expressed in cells.mL-1, no direct comparison can be made on which method seems to be the most efficient. However, when comparing this result with ethidium monoazide or propidium monoazide methods for the detection of viable E. coli (Zhuang et al., 2024), the value found for BCNC@AuNP falls in the same range, proving to be very efficient. The study of Punjabi et al describes the development of a POC device based on the visual aggregation of a suspension containing WGA functionalized chitosan NP when bacteria is present at a concentration down to 10^5 CFU.mL^{-1} (Figure 5). While these performance results are not as sensible as some others previously mentioned, this POC device is extremely useful for a fast response in an environment which does not possess lab equipment, for instance, directly in the house of the patient. Furthermore, authors mentioned that the threshold of 10^5 CFU.mL^{-1} is a sufficient limit for the type of samples they wished to evaluate (urinary tract infections requiring 105 CFU.mL-1 and respiratory infections 10^7 CFU.mL^{-1}). However, these results were performed in simulated medium and still need to be assessed in real biological media, which would also imply a thorough study of the potential matrix interferences on the binding mechanism. Additionally, it will be important to confirm the WGA lectin remains attached to the NP during the process.

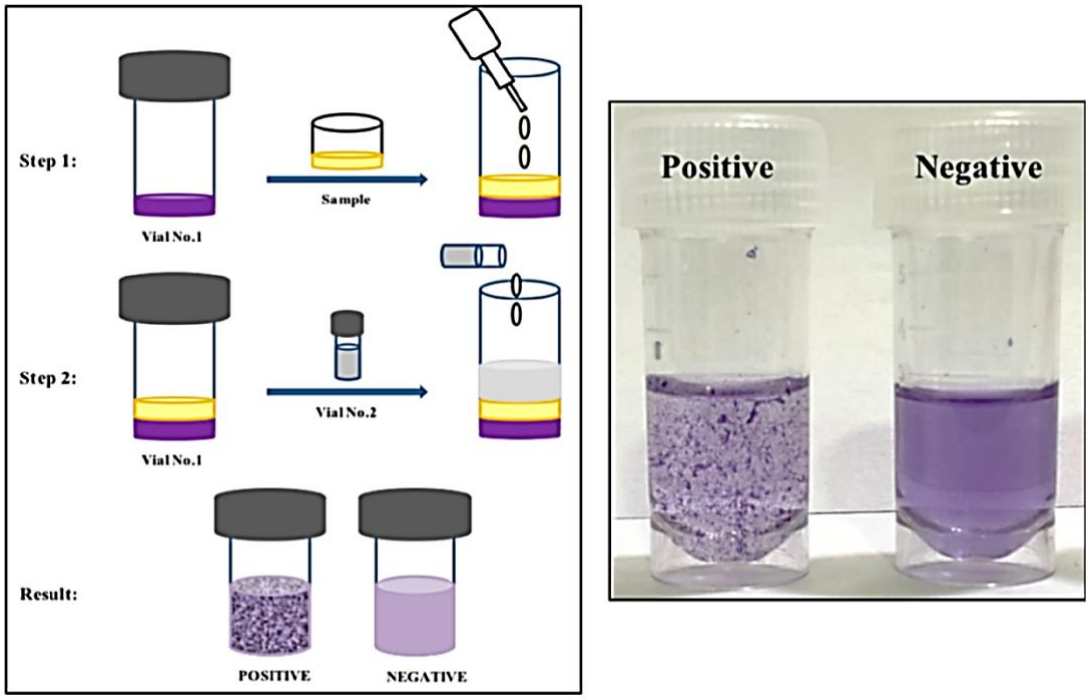


Figure 5. Schematic representation of a test protocol for bacteria detection through WGA functionalized chitosan NP (Chitosan@WGA NP). Vial No.1 contains 100 µL of Chitosan@WGA NP, to which 100 µL of sample (urine mimicking medium) is added. In the second step, Vial No.2 represents 200 µL of 1M NaOH (left) and visual results of a positive and negative test (right) appear after 10 min. Reproduced with permission from (Punjabi et al., 2022). Copyright 2025 American Chemical Society.

In the same manner as for the NP-Lectin performance, Akram et al. have developed a sensor cytotoxic against leukemic cell line K562 as well as HL-60 (Akram et al., 2022). This activity was evaluated through the half maximal inhibitory concentration which were determined to be 314.8 $\mu g.mL^{-1}$ and 132.5 $\mu g.mL^{-1}$ for each cell line, respectively. Additionally, this study is a great example to follow in terms of characterization of a lectin sensor. The team not only described properly their protocol but also evaluated the size, morphology, charge surface, crystalline structure and functional groups differences between the functionalized and non-functionalized nanoparticles. All of this allows for the performance results to be more legitimate and valid compared to other studies that can appear as less robust in this sense. As far as other quantifications of performances, not much is explicitly described in the studies. This is somewhat disappointing as the studies cannot be fully compared to others and find areas of improvements for other projects to be based on.

Other applications were highlighted for NP@Lectin such as the delivery of rifampicin through a solid lipid NP functionalized with WGA lectin (Pooja et al., 2015), targeting of experimental colitis tissue (Moulari et al., 2014) or contrasting agents for cancer detection (He et al., 2014). All studies provided several positive results for the efficiency of their developed system.

Table 4. Applications and performance results of NP@Lectins.

Application	**Biosensor**	**Performance (*method*)**	**Reference**
POC bacterial infection	Chitosan NP@WGA	10^5 CFU.mL^{-1} (*POC biosensor*)	(Punjabi et al., 2022)
Detection of *E. coli*	BCNC@ConA	10^3 CFU.mL^{-1} (*SERS*)	(Rahman et al., 2022)
Detection of *B. cereus*	FcMBL@Nano-MIL-53(Al)-NH_2	4 CFU.mL^{-1}	(Yan et al., 2023)
Antibacterial activity against *E. coli*	Chitosan@PHA Chitosan@PNA Chitosan@SBA	48 µg.mL^{-1} (*MIC*) 96 µg.mL^{-1} (*MIC*) 48 µg.mL^{-1} (*MIC)*	(Soliman et al., 2024)
Antibacterial activity against *S. typhimurium*	Chitosan@PHA Chitosan@PNA Chitosan@SBA	48 µg.mL^{-1} (*MIC*) 12 µg.mL^{-1} (*MIC*) 96 µg.mL^{-1} (*MIC*)	
Antibacterial activity against *S. sonnei*	Chitosan@PHA Chitosan@PNA Chitosan@SBA	48 µg.mL^{-1} (*MIC*) 24 µg.mL^{-1} (*MIC*) 96 µg.mL^{-1} (*MIC*)	
Antibacterial activity against *E. faecalis*	Chitosan@PHA Chitosan@PNA Chitosan@SBA	1.5 µg.mL^{-1} (*MIC*) 48 µg.mL^{-1} (*MIC*) 12 µg.mL^{-1} (*MIC*)	
Antibacterial activity against *S. aureus*	Chitosan@PHA Chitosan@PNA Chitosan@SBA	24 µg.mL^{-1} (*MIC*) 48 µg.mL^{-1} (*MIC*) 24 µg.mL^{-1} (*MIC*)	
C. albicans cell wall targeting	CdTe QD@Cramoll	17% labelling (*Flow cytometry*)	(Cunha et al., 2018)
Delivery of Rifampicin	SLN@WGA	Encapsulation efficiency: 68.71% (*UV-Visible Spectrometry*)	(Pooja et al., 2015)
H. pylori targeting	Gliadin NP@ConA Gliadin NP@WGA	91% growth inhibition 95% growth inhibition (*Optical density*)	(Umamaheshwari and Jain, 2003)

Oral immunization against Hepatitis B	PLGA NP@PNA	52.18% loading (*micro-BCA*)	(Gupta et al., 2006)
Photodynamic therapy	AuNP@Jacalin	80-90% phototoxicity (*Photodynamic therapy*)	(Obaid et al., 2015)
Fucosylation evaluation of the prostate specific antigen	Eu^{3+}-chelate-dyed@AAL	Significant increase of the fucosylation in malign tissue compared to benign tissue (p = 0.001)	(Kekki et al., 2017)
Targeting of experimental colitis tissue	PLGA@PNA PLGA@WGA	52% adhesion 22% adhesion	(Moulari et al., 2014)
Mucosal immunization against Hepatitis B	PLGA@LTA	N/A	(Mishra et al., 2011)
Dying cells detection	GaN:Eu^{3+}@LVA GaN:Eu^{3+}@WGA	N/A	(Bilyy et al., 2009)
Brain delivery after intranasal administration	PLA-PEG@WGA	N/A	(Gao et al., 2006)
Photo and Biophysical studies	Silica@ConA	N/A	(Wang et al., 2010)
Contrasting agents for tumor detection	Fe_2O_3@AuNP@ConA Fe_2O_3@AuNP@RCA Fe_2O_3@AuNP@WGA	Satisfying tumor imaging targeting ability Strong computed tomography contrast	(He et al., 2014)
Cell surface binding	AuNP@ConA AuNP@RCA AuNP@SBA AuNP@SNA AuNP@MAA II AuNP@GS II	Suitable for biological applications Interaction with 6 living cell lines	(Wang et al., 2011)
Detection of cancerous prostate cells	AgNP@ConA AgNP@LCA	Screening of non-cancerous and cancerous prostate cells (*SERS*)	(Craig et al., 2014)

Detection of breast cancer associated glycovariants of antigen 15-3	Eu^{3+}NP@WGA Eu^{3+}NP@MGL	67.9% sensitivity 81.1% sensitivity (*Immunoassay*)	(Terävä et al., 2019)
Cytotoxic activity against HL-60 and K562 leukemic cells	AuNP@ABL	HL-60: 132.5 µg.mL^{-1} K562: 314.8 µg.mL^{-1} (*Inhibitory Concentration$_{50}$*)	(Akram et al., 2022)

N/A: Not Available

AAL: *Aleuria arantia* Lectin; ABL: *Agaricgus bisporus* Lectin; AuNP: Gold nanoparticles; BCNC: Bacterial Cellulose Nanocrystal; CdTe QD: Cadmium Telluride Quantum Dots; CFU: Colony Forming Unit; ConA: Concanavalin A; CramoLL: *Cratylia mollis* Lectin; FcMBL@Nano-MIL-53(Al)-NH_2: Fragmented crystalline mannose-conjugated lectin-modified nano-Material of Institute Lavoisier-53(Al)-NH_2; GS II: *Griffonia simplicifolia*; LCA: *Lens culinaris* Agglutinin; LTA: *Lotus tetragolonobus* Agglutinin; LVA: *Leucojum vernum*; MAA II: *Maackia amurensis*; MGL: Macrophage Galactose-type Lectin; MIC: Minimum Inhibitory Concentration; Micro-BCA: micro Bicinchoninic Assay; PEG: Polyethylene Glycol; PHA: Phytohemagglutinin Lectin; PLGA: Poly(lactic-co-glycolic) acid; PNA: Peanut Agglutinin; POC: Point-of-care; QD: Quantum dot; RCA: *Ricinis communis* Agglutinin; SBA: Soybean Agglutinin; SERS: Surface Enhanced Raman Scattering; SLN: Solid-lipid NP; SNA: *Sambucus nigra* Agglutinin; WGA: Wheat Germ Agglutinin

4. Nanostructured surfaces

The previous parts of the review focused on biosensors in suspension or liquid form. It is important to mention another aspect of lectin-based biosensors which relies on nanostructured surfaces, as an illustration of this, a scheme is represented in Figure 6 to describe the different surface functionalization methods. Within nanostructured surfaces, electrodes especially have garnered a lot of attention for a broad range of applications such as environmental concerns with the detection of mefenamic acid through a carbon paste electrode (Vernekar et al., 2021). This final part of this review will cover nanostructured surfaces modified with nanomaterials and lectins to act as platforms for different applications using, for instance, electrochemical sensing or Raman spectrophotometry.

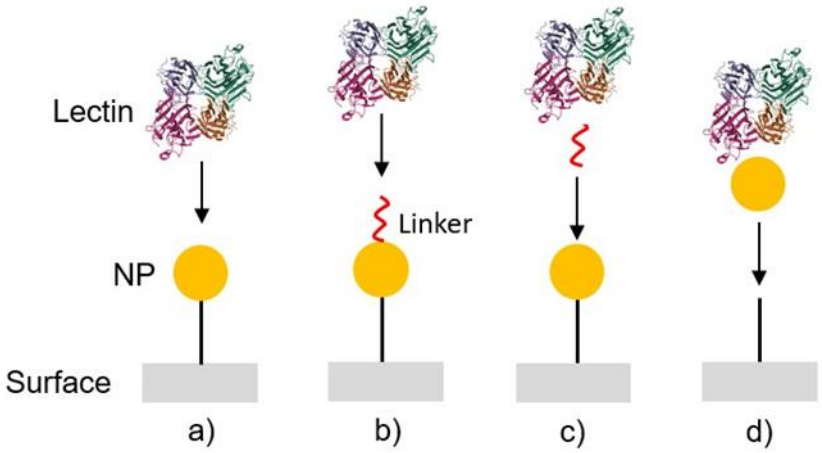


Figure 6. Schematic representation of the methods of surface functionalization described in this review with NP-Lectin with a) seen in (Andrade et al., 2011), b) in (da Silva Junior et al., 2021), c) in (Bertok et al., 2013) and d) (Oliveira et al., 2009). Abbreviation: NP: Nanoparticle.

4.1. Synthesis and characterization

This development method has seen a surge in interest in the past few years. The choice of the metal or other compound used for surface nanostructuration is a key point, as it can offer new characterization methods through electrochemistry *i.e.* EIS which relies on a current applied to the surface. EIS, while used for characterization of the nanostructured surface, is also a sensing technique performed in various papers of this review. It works by perturbating the system through a sinusoidal current across a range of frequencies and measuring the response obtained to calculate a transfer function (Wang et al., 2021). Another widely used technique is Cyclic Voltametry (CV) which works by applying a linear sweep potential which allows to obtain different current responses of the system (Elgrishi et al., 2018).

This part contains modification of the nanostructured surfaces and nanomaterials using both physical adsorption and covalent binding methods. In the same manner as seen in previous parts, gold is heavily present in the nanostructured surfaces, not only regarding the surface composition but also with NP linked to these surfaces. For the surfaces, the wide use of gold must reside in the fact apart it is describes as a biocompatible element, and shows a high chemical stability and a good conductivity which is beneficial for electrochemical measurements (Vafaiee et al., 2019). Gold surfaces are the most used and cleaning protocols are similar for all types, generally consisting of a bath in an acidic solution followed by washing steps with distilled water or a buffer. It also happens that the electrode is polished before cleaning to ensure a smooth surface for the nanomaterials to be deposited on.

We can quote the works of Oliveira, da Silva Junior and Andrade for instance who immobilized cysteine coated AuNP, gold coated magnetic NP and AuNP respectively on gold surfaces (Andrade et al., 2011; da Silva Junior et al., 2021; Oliveira et al., 2011a). In the first study, AuNP were modified with L-cysteine (AuNP@Cys) *via* a sulfur bond to introduce -NH_3^+ and -COOH groups. The AuNP@Cys were then added onto a gold electrode and immersed into a CramoLL lectin solution. The electrode was left to incubate in Phosphate Buffer Saline (PBS) containing Bovine Serum Albumin (BSA) to block the remaining active sites which is usually used in other works. In the second study, da Silva Junior and co-workers first modified a bare gold electrode by the formation of a self-assembled monolayer (SAM) of 4-mercaptobenzoic acid (MBA). Using EDC/NHS chemistry, they coupled the NHS esters with droplet addition of gold-coated magnetic NP presenting amine function at their surface. ConA coupling was ensured after glutaraldehyde addition to the surface, *via* the formation of an amide bond between the linker and the amine function of the amino acids constituting the lectin. EDC/NHS

chemistry is widely used in the protocols described in this part of the review in the same fashion as the previous part.

As opposed to the aforementioned studies, an adsorption protocol is employed here to synthesize a nanocomposite material made of gold nanoparticles-polyaniline (PANI) hybrid (AuNP@PANI) (Andrade et al., 2011). PANI is a polymer widely used in electrochemistry for its great conductivity (Ma et al., 2016). AuNP@PANI are synthesized and then deposited on a gold electrode which provides a large surface area and excellent conductivity for lectin immobilization especially for EIS usage. The *Bauhinia monandra* lectin (BmoLL) is then electrostatically adsorbed onto the nanocomposite-modified surface thanks to the negative charges of the lectin and positive ones of AuNP@PANI. This immobilization method allows for high density and activity of the lectin.

This same team also developed a biosensor based on cit-AuNP and ConA deposited on a gold electrode to study their interaction with serum glycoproteins of patients infected with dengue fever (Oliveira et al., 2009). ConA was added to cit-AuNP before adding polyvinyl butyral (PVB) to the suspension and dipping the electrode in it. PVB is used here as it was mentioned by the authors that, according to a previous study, it can trap the NP-Lectin conjugate on top of the desired surface. This functionalization method is interesting as it combines the physical adsorption method of ConA on top of AuNP with the electrode deposition. Additionally, it is one of the very few studies showing the formation of a NP-Lectin complex before addition to a surface rather than adding the lectin to a NP-modified surface. However, authors do not mention the possible pros and/or cons of using one method rather than the other.

On the topic of dengue detection, another gold electrode was modified with Fe_3O_4 NP functionalized with CramoLL lectin (Oliveira et al., 2011b). The same protocol as before was applied except no PVB was used but glutaraldehyde was employed instead. A solution of polyvinyl formal in chloroform was prepared to dip the electrode in this solution. While no point specifically describes the use of this solution, we can assume that the authors needed a liquid form of polyvinyl formal, which is a thermoplastic, to act as a coating agent for the electrode. This electrode was then incubated with BSA to block the remaining active sites.

A common point with the studies from this team is found in the characterization methods of the electrodes. Indeed, there are images of the surface, mostly with AFM topography results but also with EIS and CV, showing the evolution of the surface throughout the different protocol steps. This allows to follow and see the changes induced at each step and obtain information

regarding the morphology of the tool developed. An example of this is represented in Figure 7. Additionally, it is interesting to note that all the NP used in these studies are synthesized in-house rather than commercially bought. By doing so, each team selects the used reagents and development methods as well as their characterization.

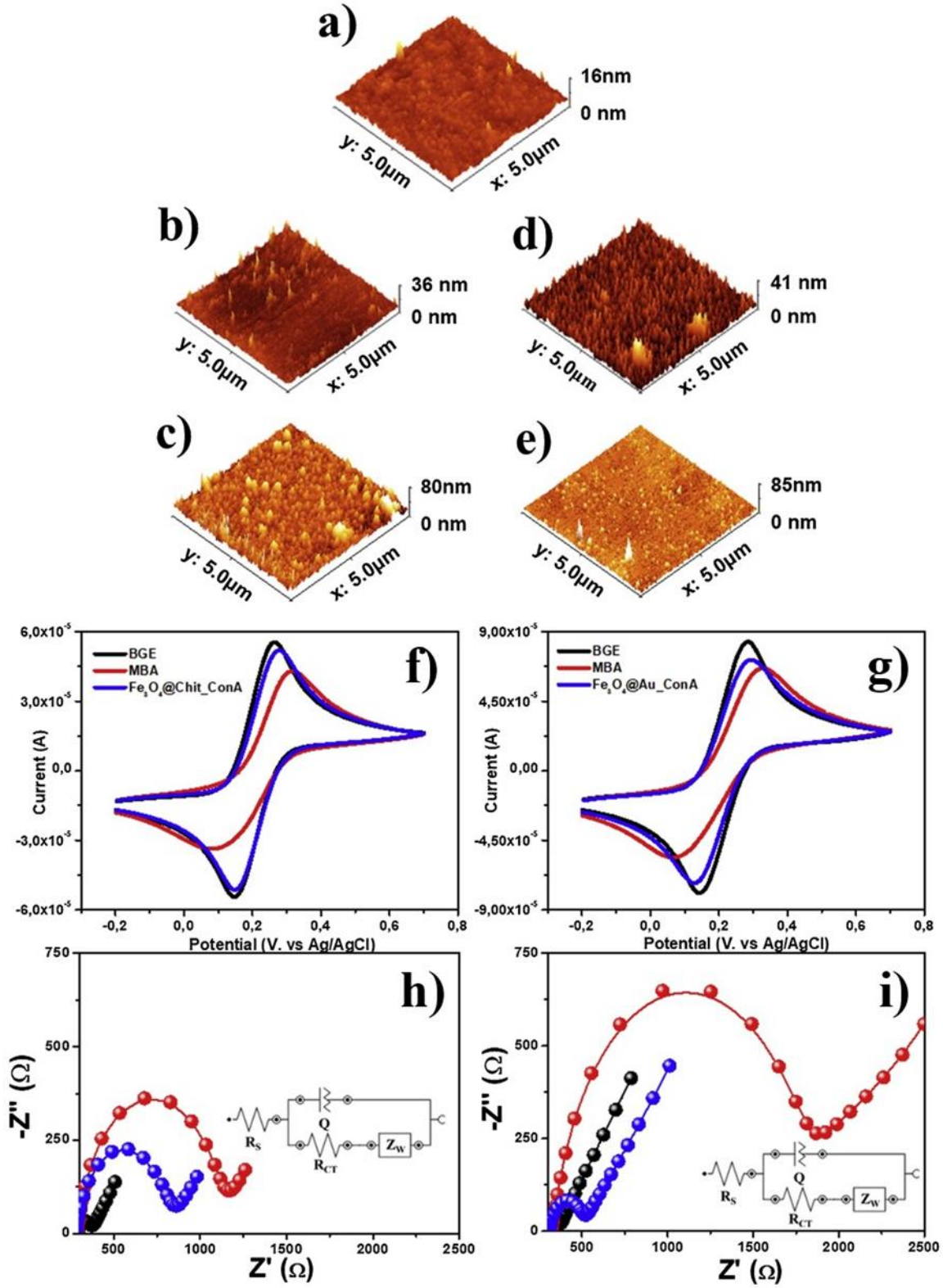


Figure 7. Characterization of a gold electrode at different steps of the assembly process. a), b), c), d) and e) are 3D AFM images of MBA deposited on the Self-Assembled Monolayer (SAM), b) shows the Fe_3O_4@Au NP, c) shows the Fe_3O_4@Chitosan NP, d) shows Fe_3O_4@Au_ConA and e) shows Fe_3O_4@Chitosan_ConA. f), g), h), and i) show the voltammograms and Nyquist plots of the assembly process with f) and h) for Fe_3O_4@Chitosan_ConA and g) and i) for Fe_3O_4@Au_ConA. The black lines represent the Bare Gold electrode (BGE), the red ones MBA and blue ones ConA. Reproduced and modified with permission from (da Silva Junior et al., 2021). Abbreviations: BGE: Bare Gold Electrode; MBA: 4-mercaptobenzoic acid.

A different way of developing a biosensor was reported with the use of photolithography and lithography to develop a gold nanostructured surface on a glass wafer (Khamis et al., 2023). This protocol was developed to obtain an ultra-small and precise design of biosensor with a smooth surface. Alongside the glass wafer subjected to photolithography and lithography for design printing, another glass wafer was baked at 110°C before being developed with the help of an AZ 726 MIF developer (a photoresist developer that dissolves certain areas exposed to light during the photolithography process). To finish the surface, a layer of Ti (10 nm) was deposited on the wafer followed by a thicker layer of Au (200 nm). To functionalize the Jacalin lectin, the surface was incubated in dithiobis succinimidyl propionate (DSP) in DMSO before washing in ethanol and PBS and finally adding the lectin.

The last paper describing the use of a gold nanostructured surface presented a thorough polishing and cleaning protocol that will not be covered here as it is too extensive (Bertok et al., 2013). Briefly, after polishing, cleaning and washing, the gold electrodes underwent a linker layer formation of aminoalkanethiol by dipping to allow for the deposition of AuNP on the surface. A second self-assembled monolayer was created using 11-mercaptoundecanoic acid and 6-mercaptohexanol. The SNA lectin was covalently linked using EDC/NHS chemistry and poly(vinylalcohol) (PVA) was used to block the remaining sites.

Three studies list the use of carbon surface. In one, multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) were bought and cleaned with 3/1 H_2SO_4/HNO_3 before use to generate carboxylate groups (Xue et al., 2011). These MWCNT were added to a solution of poly(diallyldimethylammonium) (PDDA). PDDA-MWCNT were dropped on the glassy carbon electrode before immersing it in a solution of ConA in PBS. The second study using a carbon surface used lubricin as a way to anchor the PNA lectin on the surface through the mucin domain of lubricin recognized by PNA

(Li et al., 2023). Both studies used EIS to characterize their surface but the first one also performed SEM and AFM to observe the morphology. The last paper containing a glassy carbon electrode explained the development of the surface as such: the electrode was first polished and rinsed (Yang, 2020). A graphene solution and a Nafion solution were prepared before combining each other (1:1 v/v) and drop casting it onto the electrode. CV was used to polymerize aniline on top of the surface and the surface was then kept in glutaraldehyde for 2h. EIS and SEM were used to characterize the electrodes. EIS was performed here to observe the electron transfer resistance which is then used to quantify the concentration of *E. coli*. Additionally, CV measurements were recorded and obtained as the electrodeposition step took place to observe the different states of PANI according to the current applied. The results showed the observation of three redox peaks which were attributed to the reduced form of PANI, the emeraldine base oxidizing into a pernigraniline state and the oxidation of PANI chain segments. These three peaks confirmed the polymerization of PANI and the obtention of the electrode.

A different type of surface was observed with the use of zinc oxide nanorod (ZnO NRs) (Zheng et al., 2017). First, the surface was treated with a 3-aminopropyltriethoxysilane APTMS solution to introduce amine groups, then with dissucinimidyl suberate (DSS) to act as a crosslinker between APTMS and ConA. This method ensures that the lectin is strongly and specifically bound to the surface. After attaching ConA, the surface was cleaned and blocked with BSA. These ZnO NRs were characterized using SEM and XRD. SEM images revealed well-aligned ZnO NRs with a hexagonal structure, averaging 350 nm in diameter and 3 µm in length, growing perpendicular to the substrate. XRD analysis confirmed the wurtzite crystal structure of the ZnO NRs. This surface was used to act as a detection platform for *E. coli* and did not use any electrochemical method. In fact, the authors used this surface to detect *E. coli* through fluorescence microscopy by using a fluorescent stain called DAPI (4’,6-diamidino-2-phenylindole). Table 5 provides a detailed summary of nanostructured lectin surfaces.

Table 5. Summary of nanostructured lectin surfaces and their characterization methods.

Surface and initial material	Morphology Size of the NP	Lectin	Functionalization method	Characterization	References
Graphene QD immobilized on an indium tin oxide electrode polymerized by polypyrrole	N/A 1-2 nm	ConA	EDC/NHS	CV EIS	(Santos et al., 2024)
Iron oxide magnetic NP immobilized on a glassy carbon electrode and gold surfaces	Spherical 6.6 nm	ConA	EDC/NHS	EIS SPR	(Selzer et al., 2022)
ZnO NP immobilized on a gold electrode	Spherical 37 nm	ConA	EDC/NHS	AFM CV	(Simão et al., 2020)
Cysteine coated gold nanoparticles immobilized on a gold electrode	N/A	CramoLL	Adsorption	AFM	(Oliveira et al., 2011a)
Gold and chitosan coated magnetic nanoparticles immobilized on a gold electrode	N/A	ConA	EDC/NHS	AFM Voltammetry	(da Silva Junior et al., 2021)
Gold nanoparticles/polyaniline composite deposited on a gold electrode	N/A 45 nm	BmoLL	Adsorption	AFM Cyclic voltammetry EIS	(Andrade et al., 2011)
Gold microelectrode	Spherical 60 nm	Jacalin	Dithiobis succinimidyl propionate binding	Raman	(Khamis et al., 2023)
SNA immobilized on a self-assembled monolayer formed on AuNP	Spherical 20 nm	SNA	EDC/NHS	EIS AFM SEM SPR	(Bertok et al., 2013)
Iron NP with PVB on a gold electrode	N/A	CramoLL	Glutaraldehyde crosslinking	SEM	(Oliveira et al., 2011b)

TiO_2	Tubes 73.8 nm	OniL	Incubation of TiO_2 nanotubes with 10% ethanolic NaOH before spin coating of lectin	HRTEM CV EIS FTIR	(dos Anjos et al., 2021)
Magnetic copper silicate carbon microtubes	Tubes 7 nm	ConA	Adsorption	SEM TEM XPS XRD FTIR Fluorescence spectrophotometry	(Zheng et al., 2020)
ConA-functionalized carbon nanotubes on electrode surfaces and glass slides	Tubes 20-30 nm	ConA	Adsorption	SEM AFM Fluorescence microscopy	(Xue et al., 2011)
Lubricin and lectin-modified carbon screen printed electrode	N/A	PNA	Adsorption	Quartz Crystal Microbalance Cyclic voltametry EIS	(Li et al., 2023)
Zinc oxide nanorods array	Hexagonal rods 350 nm	ConA	APTMS and DSS	SEM XRD Fluorescence microscopy	(Zheng et al., 2017)
Polyaniline/graphene nanocomposite	N/A	ConA	Glutaraldehyde crosslinking	Cyclic voltametry	(Yang, 2020)

N/A : Not Available

AFM: Atomic Force Microscopy; APTMS: (3-Aminopropyl) trimethoxysilane; CV: Cyclic Voltametry; DSS: Disuccinimidyl suberate; EIS: Electrochemical Impedance spectrophotometry; FTIR: Fourier-transform Infrared spectrophotometry; BmoLL: *Bauhinia monandra* Leaf Lectin; ConA: Concanavalin A; CramoL: *Cratylia mollis*; HRTEM: High Resolution Transmission Electron Microscopy; NP: Nanoparticle ; OniL: *Oreochromis niloticus* Lectin; PNA: Peanut Agglutinin; PVB: Polyvinyl butyrate; QD: Quantum Dots; SEM: Scanning Electron Microscopy; SNA: *Sambucus nigra* Agglutinin; SPR: Surface Plasmon Resonance ; XPS: X-ray Photoelectron spectrophotometry; XRD: X-Ray Diffraction; ZnO NP: Zinc Oxide Nanoparticles.

4.2. Advantages and drawbacks

The use of electrochemistry for lectin-based nanosensors proves to be very advantageous as it opens a whole new catalog of characterization methods. Indeed, the addition of lectin-modified NP to the electrode surfaces offers significant advantages in electrochemical sensing applications. NP, especially metallic ones like gold, dramatically enhance the electroactive surface area and conductivity of electrodes (Gheorghiu et al., 2024). The electron transfer between NP and the metal electrode was shown to be up to 10^{12} times more efficient than when compared to a NP and redox species in solution (Chazalviel and Allongue, 2011). The increased surface area enables a higher loading of lectins which leads to improved sensitivity. However, challenges arise in achieving uniform and stable nanoparticle deposition on electrode surfaces, which can affect the reproducibility of the experiments as the number of NP deposited cannot be controlled. The orientation and density of immobilized lectins on the surfaces are critical factors that influence the sensor performance. Additionally, non-specific adsorption of interfering species on the surface could lead to false signals. Electrochemically, the presence of NP and lectins can alter the electrode double-layer capacitance and charge transfer resistance, which must be carefully characterized and accounted for in sensor design.

On the other hand, the development of these sensors can require quite heavy protocols when compared to sensors using a physical adsorption method. Specific apparatus and experts in the electrochemical field are also needed to conduct these experiments. This could make a protocol such as physical adsorption or chemical modification more attractive and simpler to perform for a team. As mentioned previously, the heavy protocols come with many chemical reagents which can interfere with the lectin and/or the results. For instance, glutaraldehyde is often used but can denature proteins if too concentrated, used for long periods of time or depending on the protein (Bik et al., 2020). Additionally, there is a lack of discussion regarding glutaraldehyde and its possible impact on the conformation of the lectins and hence their activity. More characterization before and after using glutaraldehyde would be beneficial to prove its use does not interfere with the structure and activity of the lectin.

All in all, nanostructured surfaces offer fast response times and are convenient for on-site or POC testing as they can be portable, miniaturized and automated for non-specialists (Michalska et al., 2021). Unfortunately, none of the cited papers are used in this context but opening a perspective for a POC test can be of great pertinence to reduce time between diagnosis and treatment administration.

4.3. Applications and performances

For nanostructured surfaces as biosensors using lectins, applications are not as broad as in the previous part. However, they find applications in the fields mentioned for both biosensors developed through physical adsorption and with chemical modification. Results of the performances are listed in Table 6. This allows to draw a comparison between the ranges obtained according to each method. Especially for bacteria detection as nanostructured surfaces provided a detection range for *E. coli* ranging from $1.0x10^3$-$1.0x10^7$ CFU.mL^{-1} for (Zheng et al., 2017) to 43 cells.mL^{-1} for (Yang, 2020). The first result falls in the same range as both previous methods; however, for the second result, this is a much lower detection limit than prior, which highlights the potential of nanostructured surfaces in the detection of *E. coli*. For three other bacterial strains (*K. pneumoniae, B. subtilis and E. faecalis*) one study achieved a LOD of 10^1 CFU.mL^{-1} which is the lowest listed in this review (da Silva Junior et al., 2021). Figure 8 shows the performance results for chitosan and gold coated Fe_3O_4 NP functionalized with ConA, expressed as the relative variation of the electron transfer resistance (denoted ΔR_{CT}) as a function of bacteria concentration in CFU.mL^{-1} (da Silva Junior et al., 2021). These results highlight that the gold-coated Fe_3O_4 NP have a better response than their chitosan-capped counterpart. This was discussed by the authors who concluded that because ConA agglomerated on top of chitosan-capped Fe_3O_4 NP but were more refined on gold-capped Fe_3O_4 NP, ConA had a higher available area in the latter and thus improved the contact with the bacterial cells. Such interpretation would not have been possible if the authors had not characterized their nanostructure every step of the way. This, once again, emphasizes the importance of proper characterization to understand the mechanisms by which the sensors operate and to be able to critically discuss the results obtained. It is also observed in these results that different sensitivities are recorded for each bacteria detected which shows the specificity of ConA for different bacteria.

For LPS detection, it was possible to reach a value of 25-50 µg.mL^{-1} which was recognized as an appropriate interface for this task by the authors (Oliveira et al., 2011a).

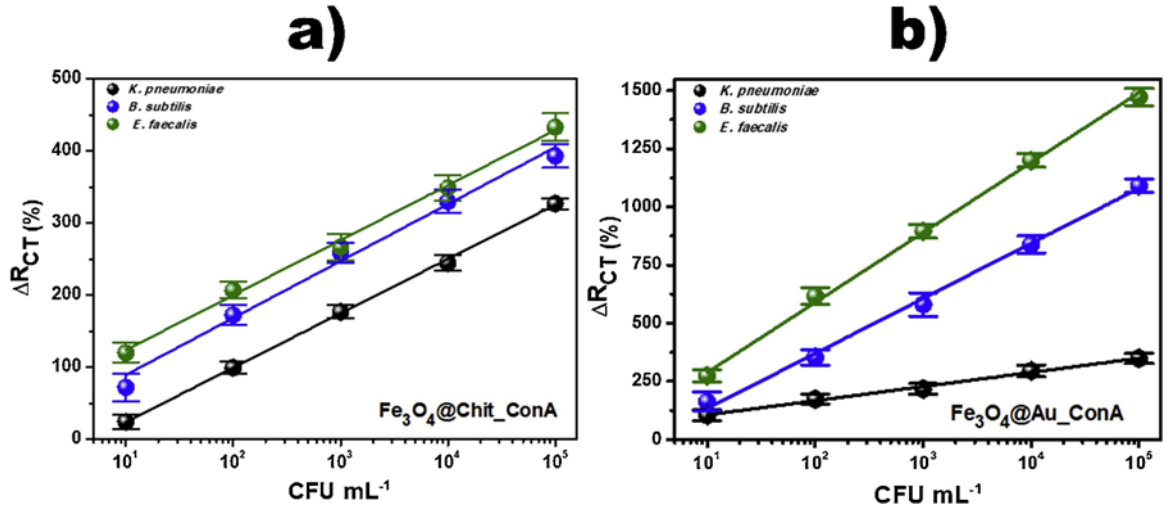


Figure 8. Detection results of ConA sensors in presence of different bacteria and concentrations, a) represents results for chitosan coated Fe_3O_4 NP and b) represents results for gold coated Fe_3O_4 NP. Reproduced with permission from (da Silva Junior et al., 2021).

Regarding cancer applications, when targeting glycoproteins and antigens, the range of detection falls in the order of $ng.mL^{-1}$ and $pg.mL^{-1}$ respectively. These results are highly promising as they allow a very sensitive detection in quite limited time, around 30 min for (Zheng et al., 2020). As for (Khamis et al., 2023), the result is obtained instantly since the used method is SERS. It is important, however, to take note of the time taken during the preparation of each component prior to starting the measurements.

When observing the performance obtained through nanostructured surfaces with lectins, the results are noticeably lower than what was found in previous parts of this reviews (*i.e.* non-immobilized). Figure 9 provides a detailed comparison of the detection range for different bacteria. This difference is mainly due to the different techniques used with surfaces rather than with colloidal biosensors. It then seems that when designing a biosensor, not only the synthesis protocol and characterization methods should be considered but also the expected performances. It is very interesting to discuss the barrier of 10^1 $CFU.mL^{-1}$ which seemed to be the lowest LOD achievable. However, in 2024, the team of (Santos et al., 2024) managed to break this barrier by going down to 0.18 $CFU.mL^{-1}$ for the detection of C. tropicalis. Their study focused on 6 different pathogens and all of the LOD recorded were lower than 101 $CFU.mL^{-1}$. These results are extremely positive and provide hope that in the future, more LOD barriers will be broken which will enable even more sensible detection of relevant pathogenic species, through novel technologies, usage of novel biorecognition elements and/or development of analytical platforms possessing extreme sensitivities.

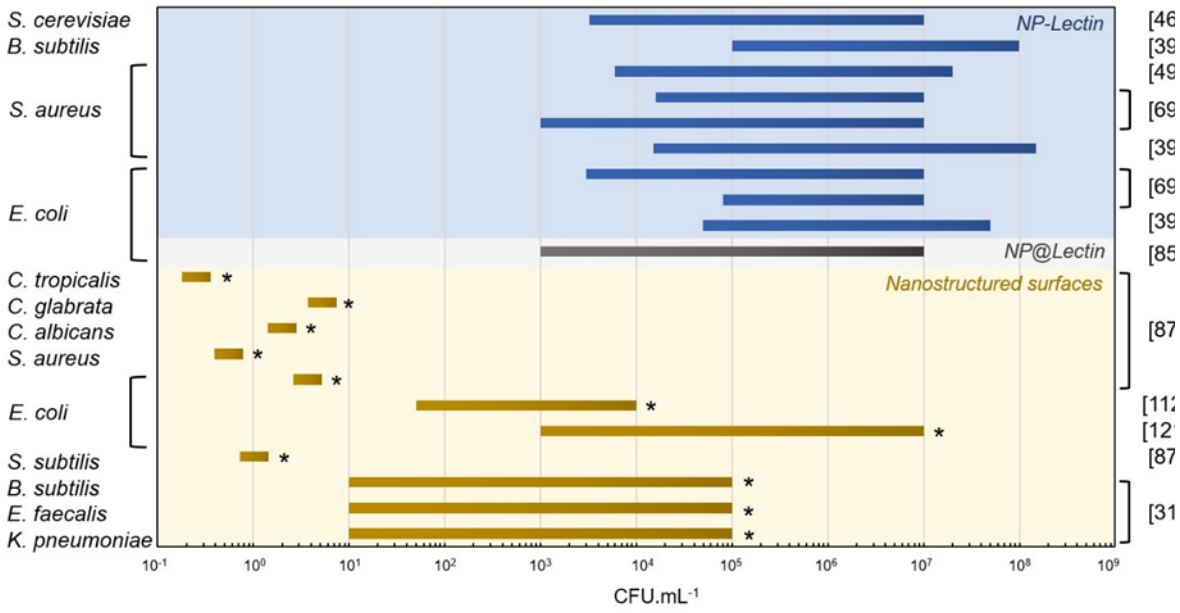


Figure 9. Detection range of several methods for bacteria sensing using lectin biosensors from references . *: techniques which used a chemical modification process for the biosensor development.

Table 6. Applications and performances of nanostructured surfaces

Application	**Surface**	**Lectin**	**Performance (*Method*)**	**Reference**
E. coli detection	ZnO nanoarrays	ConA	10^3 to 10^7 CFU.mL^{-1} (*Fluorescence microscopy*)	(Zheng et al., 2017)
	Polyaniline/Graphene nanocomposite	ConA	43 cells.mL^{-1} (*EIS*)	(Yang, 2020)
	Graphene QD on a polypyrrole film	ConA	2.63 CFU.mL^{-1} *(EIS)*	(Santos et al., 2024)
B. subtilis detection	Graphene QD on a polypyrrole film	ConA	0.72 CFU.mL^{-1} *(EIS)*	(Santos et al., 2024)
S. aureus detection	Graphene QD on a polypyrrole film	ConA	0.39 CFU.ml^{-1} *(EIS)*	(Santos et al., 2024)
C. tropicalis detection	Graphene QD on a polypyrrole film	ConA	0.18 CFU.mL^{-1} *(EIS)*	(Santos et al., 2024)
C. albicans detection	Graphene QD on a polypyrrole film	ConA	1.42 CFU.mL^{-1} *(EIS)*	(Santos et al., 2024)
C. glabrata detection	Graphene QD on a polypyrrole film	ConA	3.72 CFU.mL^{-1} *(EIS)*	(Santos et al., 2024)
LPS recognition	Gold electrode	CramoLL	25-50 µg.mL^{-1} (*EIS*)	(Oliveira et al., 2011a)
Dengue infection diagnosis through serum glycoprotein detection	Gold nanoparticles/polyaniline composite deposited on a gold electrode	BmoLL	Dilution of 1:150 of serum in PBS (*EIS*)	(Andrade et al., 2011)
Dengue virus serotypes detection	Iron NP with PVB on a gold electrode	CramoLL	Good sensibility and reproducibility for the detection of three dengue serotypes (*EIS*)	(Oliveira et al., 2011b)

Detection of *K. pneumoniae*, *B. subtilis* and *E. faecalis*	Gold and chitosan coated magnetic nanoparticles immobilized on a gold electrode	ConA	10^1 CFU.mL^{-1} (*Voltammetry and EIS*)	(da Silva Junior et al., 2021)
Carcinoembryonic antigen sensor	Magnetic copper silicate carbon microtubes	ConA	5.38 pg.mL^{-1} (*Voltammetry*)	(Zheng et al., 2020)
Serum glycosylated protein detection for esophageal adenocarcinoma screening	Gold microelectrode	Jacalin	C9 23 ng.mL^{-1} GSN 30 ng.mL^{-1} KLKB1 53 ng.mL^{-1} (*SERS*)	(Khamis et al., 2023)
Cell surface glycan expression monitoring	ConA-functionalized carbon nanotubes on electrode surfaces and glass slides	ConA	10^4 to 10^7 cells.mL^{-1} (*EIS*)	(Xue et al., 2011)
Label free detection of glycoproteins	SNA immobilized on a self-assembled monolayer formed on AuNP	SNA	40 yoctomoles (*EIS*)	(Bertok et al., 2013)
Glycoprotein cancer biomarker detection	Lubricin and lectin-modified carbon screen printed electrode	PNA	39 nM (*Voltammetry and EIS*)	(Li et al., 2023)

AuNP: Gold nanoparticles; BmoLL: *Bauhinia monandra* Leaf Lectin; CFU: Colony Forming Unit; ConA : Concanavalin A; CramoLL: *Cratylia mollis*; EIS: Electrochemical Impedance Spectrophotometry; NP: Nanoparticle; PNA: Peanut Agglutinin; PVB: Polyvinyl butyral; QD: Quantum Dots; SERS: Surface Enhanced Raman Spectrophotometry; SNA: *Sambucus nigra* Agglutinin; ZnO: Zinc Oxide.

5. Conclusion

To conclude, different functionalization methods for lectin-based nanosensors allowed the development of sensitive and various materials. Lectins, as the biorecognition element, allow for the detection, targeting and even killing of pathogens. The sensors described find applications in health with bacteria and cancer detection but also in environmental science with carriers developed for the health of crops. The different methods reviewed (physical adsorption, covalent binding and surface nanostructuration) present advantages and drawbacks, all of which can justify the use of one method above another. However, when digging deeper into the characterization methods of the developed sensors, there is a lack of information regarding morphology, size or even proof of lectin binding to the nanomaterial. While the studies all concluded with positive outlooks on the different experiments and tests that were run, it is highly important to start a discussion about the type of characterization we require when using a complex for certain applications. Especially when these biosensors have a goal to be used *in vivo*. Size, surface charge, morphology, conformation of lectins before and after being added to a surface or NP should be described. Evaluating the interaction and energy forces between the NP and the lectin is also a crucial step to understand and predict the behavior and performances of the biosensor. Additionally, stability should be described and numbered according to the parameters evaluated during the characterization process. As research in this field progresses, we are expecting that the performances of these sensors improve, to detect pathogens at an even lower concentration with just as fast response as it is evident that the POC applications present a promising perspective for the future. It is important that, as research progresses, more transparency on the developed analytical tools ought to be provided, not only to understand the mechanisms by which it operates but also to convince the scientific community on the strength of the published works and to improve the reproducibility and robustness of science.

Acknowledgements

The authors would like to thank ANR NanoBioID (ANR-22-CE09-001) and Institut Universitaire de France (IUF) for funding. The authors would also like to thank BioRender.com for bacteria icons used in the Graphical Abstract.

Author contributions

Sephora Lahouari: Writing - original draft, Writing - review & editing. **Jérémie Gouyon** : Writing - original draft, Writing - review & editing, Supervision. **Igor Clarot**: Writing - review & editing. **Ariane Boudier** : Writing - original draft, Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition.

References

Akram, Sarah M., Al-Saffar, A.Z., Hadi, N.A., Akram, Sally M., 2022. Utilization of novel lectin-conjugated Au nanoparticles as Thomsen-Friedenreich onco-antigen target for in vitro cytotoxicity and apoptosis induction in leukemic cell line. Life Sciences 311, 121163. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121163

Ali, A.M., Abdul-Rasheed, O.F., Obaid, A.T., 2020. Evaluate the fPSA for Discriminate between Prostate Cancer Patients (PCa) and Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) Depending on PSA Fucosylation by Using Nano-Lectin Immunoassay. Systematic Reviews in Pharmacy 11, 440–444. https://doi.org/10.31838/srp.2020.5.60

Allen, A.K., Neuberger, A., Sharon, N., 1973. The purification, composition and specificity of wheat-germ agglutinin. Biochem J 131, 155–162.

Alwael, H., Connolly, D., Clarke, P., Thompson, R., Twamley, B., O'Connor, B., Paull, B., 2011. Pipette-tip selective extraction of glycoproteins with lectin modified gold nano-particles on a polymer monolithic phase. Analyst 136, 2619–2628. https://doi.org/10.1039/C1AN15137A

An, C.-Z., Li, C.-Q., Song, L.-B., He, Y.-F., Chen, W., Liu, B., Zhao, Y.-D., 2022. A simple fluorescent strategy for liver capillary labeling with carbon quantum dot-lectin nanoprobe. Analyst 147, 1952–1960. https://doi.org/10.1039/D1AN02364K

Andrade, C.A.S., Oliveira, M.D.L., de Melo, C.P., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S., Nogueira, M.L., Singh, P.R., Zeng, X., 2011. Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic–inorganic nanocomposite and Bauhinia monandra lectin. Journal of Colloid and Interface Science 362, 517–523. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.013

Arangoa, M.A., Ponchel, G., Orecchioni, A.M., Renedo, M.J., Duchêne, D., Irache, J.M., 2000. Bioadhesive potential of gliadin nanoparticulate systems. European Journal of Pharmaceutical Sciences 11, 333–341. https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00121-4

Aravind, S.S.J., Baby, A.T.T., Arockiadoss, T., Rakhi, R.B., Ramaprabhu, S., 2011. A cholesterol biosensor based on gold nanoparticles decorated functionalized graphene nanoplatelets. Thin Solid Films 519, 5667–5672. https://doi.org/10.1016/j.tsf.2011.03.032

Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Nou, X., Koohmaraie, M., 2005. Evaluation of Culture- and PCR-Based Detection Methods for *Escherichia coli* O157:H7 in Inoculated Ground Beef†. Journal of Food Protection 68, 1566–1574. https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.8.1566

Ashraf, S., Qadri, S., Akbar, S., Parray, A., Haik, Y., 2022. Biogenesis of Exosomes Laden with Metallic Silver–Copper Nanoparticles Liaised by Wheat Germ Agglutinin for Targeted Delivery of Therapeutics to Breast Cancer. Advanced Biology 6, 2200005. https://doi.org/10.1002/adbi.202200005

Azad, U.P., Chandra, P., 2023. Handbook of Nanobioelectrochemistry: Application in Devices and Biomolecular Sensing. Springer Nature.

Baranwal, A., Chiranjivi, A.K., Kumar, A., Dubey, V.K., Chandra, P., 2018. Design of commercially comparable nanotherapeutic agent against human disease-causing parasite, Leishmania. Sci Rep 8, 8814. https://doi.org/10.1038/s41598-018-27170-1

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Gatto, G.J., Stryer, L., 2019. Biochemistry. New York N.Y.: Macmillan international higher education.

Bertok, T., Sediva, A., Katrlik, J., Gemeiner, P., Mikula, M., Nosko, M., Tkac, J., 2013. Label-free detection of glycoproteins by the lectin biosensor down to attomolar level using gold nanoparticles. Talanta 108, 11–18. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.02.052

Beurton, J., Lavalle, P., Pallotta, A., Chaigneau, T., Clarot, I., Boudier, A., 2020. Design of surface ligands for blood compatible gold nanoparticles: Effect of charge and binding energy. International Journal of Pharmaceutics 580, 119244. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119244

Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., Estrela, P., 2016. Introduction to biosensors. Essays Biochem 60, 1–8. https://doi.org/10.1042/EBC20150001

Bik, E., Dorosz, A., Mateuszuk, L., Baranska, M., Majzner, K., 2020. Fixed *versus* live endothelial cells: The effect of glutaraldehyde fixation manifested by characteristic bands on the Raman spectra of cells. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 240, 118460. https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118460

Bilyy, R., Tomyn, A., Kit, Y., Podhorodecki, A., Misiewicz, J., Nyk, M., Strek, W., Stoika, R., 2009. Detection of dying cells using lectin-conjugated fluorescent and luminescent nanoparticles. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik 40, 234–237. https://doi.org/10.1002/mawe.200900432

Blaškovičová, J., Vyskočil, V., Augustín, M., Purdešová, A., 2023. Ethanol and NaCl-Induced Gold Nanoparticle Aggregation Toxicity toward DNA Investigated with a DNA/GCE Biosensor. Sensors 23, 3425. https://doi.org/10.3390/s23073425

Boukoufi, C., Boudier, A., Lahouari, S., Vigneron, J., Clarot, I., 2023. Activity and reusability of immobilized gold nanoparticles for the catalysis of both oxidation and reduction reactions. Results in Chemistry 5, 100979. https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.100979

Brown, J., Bir, A., Bain, R.E.S., 2020. Novel methods for global water safety monitoring: comparative analysis of low-cost, field-ready E. coli assays. npj Clean Water 3, 1–6. https://doi.org/10.1038/s41545-020-0056-8

Casañas Pimentel, R.G., Robles Botero, V., San Martín Martínez, E., Gómez García, C., Hinestroza, J.P., 2016. Soybean agglutinin-conjugated silver nanoparticles nanocarriers in the treatment of breast cancer cells. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 27, 218–234. https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1116892

Chazalviel, J.-N., Allongue, P., 2011. On the Origin of the Efficient Nanoparticle Mediated Electron Transfer across a Self-Assembled Monolayer. J. Am. Chem. Soc. 133, 762–764. https://doi.org/10.1021/ja109295x

Chen, N.-T., Souris, J.S., Cheng, S.-H., Chu, C.-H., Wang, Y.-C., Konda, V., Dougherty, U., Bissonnette, M., Mou, C.-Y., Chen, C.-T., Lo, L.-W., 2017. Lectin-functionalized mesoporous silica nanoparticles for endoscopic detection of premalignant colonic lesions. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 13, 1941–1952. https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.03.014

Chen, Y., Zhang, Z., Wu, Yanzhou, Wu, Yixuan, Wang, J., Liu, M., Chen, L., 2024. Surfactant-Free Method to Prevent Gold Nanoparticle Aggregation and Its Surface-Enhanced Raman Scattering Applications. Langmuir 40, 21832–21841. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.4c03096

Choi, Y., Park, U., Koo, H.-J., Park, J., Lee, D.H., Kim, K., Choi, J., 2021. Exosome-mediated diagnosis of pancreatic cancer using lectin-conjugated nanoparticles bound to selective glycans. Biosensors and Bioelectronics 177, 112980. https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.112980

Craig, D., McAughtrie, S., Simpson, J., McCraw, C., Faulds, K., Graham, D., 2014. Confocal SERS Mapping of Glycan Expression for the Identification of Cancerous Cells. Anal. Chem. 86, 4775–4782. https://doi.org/10.1021/ac4038762

Crosby, D., Bhatia, S., Brindle, K.M., Coussens, L.M., Dive, C., Emberton, M., Esener, S., Fitzgerald, R.C., Gambhir, S.S., Kuhn, P., Rebbeck, T.R., Balasubramanian, S., 2022.

Early detection of cancer. Science 375, eaay9040. https://doi.org/10.1126/science.aay9040

Cunha, C.R.A., Andrade, C.G., Pereira, M.I.A., Cabral Filho, P.E., Carvalho, L.B., Coelho, L.C.B.B., Santos, B.S., Fontes, A., Correia, M.T.S., 2018. Quantum dot–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 178, 85–91. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.020

da Silva, A.R., de Oliveira, W.F., da Silva, P.M., de Siqueira Patriota, L.L., de Vasconcelos Alves, R.R., de Oliveira, A.P.S., dos Santos Correia, M.T., Paiva, P.M.G., Vainstein, M.H., Filho, P.E.C., Fontes, A., Napoleão, T.H., 2021. Quantum dots conjugated to lectins from *Schinus terebinthifolia* leaves (SteLL) and *Punica granatum* sarcotesta (PgTeL) as potential fluorescent nanotools for investigating *Cryptococcus neoformans*. International Journal of Biological Macromolecules 192, 232–240. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.002

da Silva Junior, A.G., Frias, I.A.M., Lima-Neto, R.G., Sá, S.R., Oliveira, M.D.L., Andrade, C.A.S., 2021. Concanavalin A differentiates gram-positive bacteria through hierarchized nanostructured transducer. Microbiological Research 251, 126834. https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126834

Djafari, J., McConnell, M.T., Santos, H.M., Capelo, J.L., Bertolo, E., Harvey, S.C., Lodeiro, C., Fernández-Lodeiro, J., 2018. Synthesis of Gold Functionalised Nanoparticles with the Eranthis hyemalis Lectin and Preliminary Toxicological Studies on Caenorhabditis elegans. Materials 11, 1363. https://doi.org/10.3390/ma11081363

dos Anjos, K.F.L., da Silva, C.D.C., de Souza, M.A.A., de Mattos, A.B., Coelho, L.C.B.B., Machado, G., de Melo, J.V., de Figueiredo, R.C.B.Q., 2021. The Deposition of a Lectin from Oreochromis niloticus on the Surface of Titanium Dioxide Nanotubes Improved the Cell Adhesion, Proliferation, and Osteogenic Activity of Osteoblast-like Cells. Biomolecules 11, 1748. https://doi.org/10.3390/biom11121748

Elgrishi, N., Rountree, K.J., McCarthy, B.D., Rountree, E.S., Eisenhart, T.T., Dempsey, J.L., 2018. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. J. Chem. Educ. 95, 197–206. https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361

Fard, M.G., Khabir, Z., Reineck, P., Cordina, N.M., Abe, H., Ohshima, T., Dalal, S., Gibson, B.C., Packer, N.H., Parker, L.M., 2022. Targeting cell surface glycans with lectin-coated fluorescent nanodiamonds. Nanoscale Adv. 4, 1551–1564. https://doi.org/10.1039/D2NA00036A

Fromell, K., Andersson, M., Elihn, K., Caldwell, K.D., 2005. Nanoparticle decorated surfaces with potential use in glycosylation analysis. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 46, 84–91. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.06.017

Gao, J., Liu, C., Liu, D., Wang, Z., Dong, S., 2010. Antibody microarray-based strategies for detection of bacteria by lectin-conjugated gold nanoparticle probes. Talanta 81, 1816–1820. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.03.052

Gao, X., Tao, W., Lu, W., Zhang, Q., Zhang, Y., Jiang, X., Fu, S., 2006. Lectin-conjugated PEG–PLA nanoparticles: Preparation and brain delivery after intranasal administration. Biomaterials 27, 3482–3490. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.038

Gasparyan, V.K., Bazukyan, I.L., 2013. Lectin sensitized anisotropic silver nanoparticles for detection of some bacteria. Analytica Chimica Acta 766, 83–87. https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.015

Gheorghe, G., Bungau, S., Ilie, M., Behl, T., Vesa, C.M., Brisc, C., Bacalbasa, N., Turi, V., Costache, R.S., Diaconu, C.C., 2020. Early Diagnosis of Pancreatic Cancer: The Key for Survival. Diagnostics 10, 869. https://doi.org/10.3390/diagnostics10110869

Gheorghiu, A., Yang, D., Li, T., Dief, E.M., Darwish, N., Priest, C., MacGregor, M., 2024. Enhancing the conductivity of plasma polymer functionalized electrodes using gold nanoparticles. Mater. Adv. 5, 209–219. https://doi.org/10.1039/D3MA00641G

Goto, M., Al-Hasan, M.N., 2013. Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe. Clinical Microbiology and Infection 19, 501–509. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12195

Guckeisen, T., Hosseinpour, S., Peukert, W., 2021. Effect of pH and urea on the proteins secondary structure at the water/air interface and in solution. Journal of Colloid and Interface Science 590, 38–49. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.01.015

Guerrini, L., Alvarez-Puebla, R.A., Pazos-Perez, N., 2018. Surface Modifications of Nanoparticles for Stability in Biological Fluids. Materials 11, 1154. https://doi.org/10.3390/ma11071154

Gupta, P.N., Mahor, S., Rawat, A., Khatri, K., Goyal, A., Vyas, S.P., 2006. Lectin anchored stabilized biodegradable nanoparticles for oral immunization: 1. Development and in vitro evaluation. International Journal of Pharmaceutics 318, 163–173. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.03.017

Gyurjyan, Q.G., Mikaelyan, M.V., Poghosyan, G.G., Hovhannisyan, V.A., Gasparyan, V.K., 2020. Detection of Saccharomyces cerevisiae by silver nanoparticles sensitized with various lectins. Anal. Methods 12, 3508–3512. https://doi.org/10.1039/D0AY00614A

Hanigan-Diebel, J.L., Costin, R.J., Myers, L.C., Vandermeer, C.I., Willis, M.S., Takhar, K., Odinakachukwu, O.V., Carroll, M.G., Schiffbauer, J.E., Lohse, S.E., 2024. Affinity Constants of Bovine Serum Albumin for 5 nm Gold Nanoparticles (AuNPs) with ω-Functionalized Thiol Monolayers Determined by Fluorescence Spectroscopy. Langmuir 40, 15558–15568. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.4c01234

He, X., Liu, F., Liu, L., Duan, T., Zhang, H., Wang, Z., 2014. Lectin-Conjugated Fe2O3@Au Core@Shell Nanoparticles as Dual Mode Contrast Agents for in Vivo Detection of Tumor. Mol. Pharmaceutics 11, 738–745. https://doi.org/10.1021/mp400456j

Hovhannisyan, V.A., Bazukyan, I.L., Gasparyan, V.K., 2017. Application of silver nanoparticles and CdSe quantum dots sensitized with of C-like lectin for detection of St. aureus. Comparison of various approaches. Talanta 175, 366–369. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.062

Islam, M.K., Syed, P., Lehtinen, L., Leivo, J., Gidwani, K., Wittfooth, S., Pettersson, K., Lamminmäki, U., 2019. A Nanoparticle-Based Approach for the Detection of Extracellular Vesicles. Sci Rep 9, 10038. https://doi.org/10.1038/s41598-019-46395-2

Israelachvili, J.N., 2011. Intermolecular and Surface Forces. Elsevier.

Jafarzadeh, S., Bargahi, N., Shamloo, H.B., Soleymani, J., 2022. Concanavalin A-conjugated gold nanoparticle/silica quantum dot (AuNPs/SiQDs-Con A)-based platform as a fluorescent nanoprobe for the bioimaging of glycan-positive cancer cells. RSC Adv 12, 8492–8501. https://doi.org/10.1039/d2ra00035k

Kanellopoulos, P.N., Tucker, P.A., Pavlou, K., Agianian, B., Hamodrakas, S.J., 1996. A Triclinic Crystal Form of the Lectin Concanavalin A. Journal of Structural Biology 117, 16–23. https://doi.org/10.1006/jsbi.1996.0065

Kekki, H., Montoya Perez, I., Taimen, P., Boström, PJ., Gidwani, K., Pettersson, K., 2024. Lectin-nanoparticle concept for free PSA glycovariant providing superior cancer specificity. Clinica Chimica Acta 559, 119689. https://doi.org/10.1016/j.cca.2024.119689

Kekki, H., Peltola, M., van Vliet, S., Bangma, C., van Kooyk, Y., Pettersson, K., 2017. Improved cancer specificity in PSA assay using *Aleuria aurantia* lectin coated Eu-nanoparticles for detection. Clinical Biochemistry 50, 54–61. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.06.015

Kenoth, R., Pothuraju, S., Anand Prabu, A., Kamlekar, R.K., 2024. Spectroscopic and thermodynamic characterization of the interaction between sugar-stabilised silver nanoparticles and wheat germ agglutinin (WGA), a chitin binding lectin. Carbohydrate Research 535, 109014. https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.109014

Khamis, R., Shanmugasundaram, K.B., Zhou, Q., Lu, J., Zhang, Z., Hill, M.M., Sina, A.A.I., Trau, M., Wuethrich, A., 2023. Multiplex SERS-Lectin-Immunoassay for Esophageal Adenocarcinoma Screening. ACS Appl. Nano Mater. 6, 20190–20197. https://doi.org/10.1021/acsanm.3c03987

Khan, Ibrahim, Saeed, K., Khan, Idrees, 2019. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. Arabian Journal of Chemistry 12, 908–931. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011

Kooti, S., Kadivarian, S., Abiri, R., Mohajeri, P., Atashi, S., Ahmadpor, H., Alvandi, A., 2023. Modified gold nanoparticle colorimetric probe-based biosensor for direct and rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum specimens. World J Microbiol Biotechnol 39, 118. https://doi.org/10.1007/s11274-023-03564-w

Krzek, M., Stroobants, S., Gelin, P., De Malsche, W., Maes, D., 2022. Influence of Centrifugation and Shaking on the Self-Assembly of Lysozyme Fibrils. Biomolecules 12, 1746. https://doi.org/10.3390/biom12121746

Lakshmi, S., Rubeena, A.S., Subramaniyan, S.B., Raman, T., Vaseeharan, B., Arockiaraj, J., Karthikeyan, S., Anbazhagan, V., Preetham, E., 2023. Hybrid of Metapenaeus dobsoni lectin and platinum nanoparticles exert antimicrobial and immunostimulatory effects to reduce bacterial bioburden in infected Nile tilapia. Sci Rep 13, 525. https://doi.org/10.1038/s41598-022-26719-5

Li, M., Abeyrathne, C., Langley, D.P., Cossins, L.R., Samudra, A.N., Green, G.W., Moulton, S.E., Silva, S.M., 2023. Highly specific lubricin-lectin electrochemical sensor for glycoprotein cancer biomarker detection. Electrochimica Acta 457, 142508. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2023.142508

Ma, L., Su, L., Zhang, J., Zhao, D., Qin, C., Jin, Z., Zhao, K., 2016. A controllable morphology GO/PANI/metal hydroxide composite for supercapacitor. Journal of Electroanalytical Chemistry 777, 75–84. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.07.033

Mahato, K., Kumar, A., Purohit, B., Mahapatra, S., Srivastava, A., Chandra, P., 2020. Nanomaterial Functionalization Strategies in Bio-Interface Development for Modern Diagnostic Devices, in: Biointerface Engineering: Prospects in Medical Diagnostics and Drug Delivery. Springer, Singapore, pp. 195–214. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4790-4_9

Mao, J., Yan, Y., Wu, Q., Wang, M., Dai, Jimin, Niu, K., Zheng, L., Jiang, C., Jiang, F., Zhang, W., Tao, K., Dai, Jingyao, 2025. Gold Nanoparticles Carrying Mannose-Binding Lectin and Inflammatory Cytokine Antibodies Improve Sepsis Survival by Modulating Immunity and Reducing Pathogens. ACS Appl. Mater. Interfaces 17, 20658–20670. https://doi.org/10.1021/acsami.4c21055

Marangoni, V.S., Paino, I.M., Zucolotto, V., 2013. Synthesis and characterization of jacalin-gold nanoparticles conjugates as specific markers for cancer cells. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 112, 380–386. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.07.070

Masigol, M., Fattahi, N., Barua, N., Lokitz, B.S., Retterer, S.T., Platt, T.G., Hansen, R.R., 2019. Identification of Critical Surface Parameters Driving Lectin-Mediated Capture of Bacteria from Solution. Biomacromolecules 20, 2852–2863. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00609

Michalska, M., Divan, R., Noirot, P., Laible, P.D., 2021. Antimicrobial properties of nanostructured surfaces – demonstrating the need for a standard testing methodology. Nanoscale 13, 17603–17614. https://doi.org/10.1039/D1NR02953C

Mikaelyan, M.V., Poghosyan, G.G., Hendrickson, O.D., Dzantiev, B.B., Gasparyan, V.K., 2017. Wheat germ agglutinin and Lens culinaris agglutinin sensitized anisotropic silver nanoparticles in detection of bacteria: A simple photometric assay. Analytica Chimica Acta 981, 80–85. https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.022

Mishra, N., Tiwari, S., Vaidya, B., Agrawal, G.P., Vyas, S.P., 2011. Lectin anchored PLGA nanoparticles for oral mucosal immunization against hepatitis B. Journal of Drug Targeting 19, 67–78. https://doi.org/10.3109/10611861003733946

Mostafa, A., Ganguli, A., Berger, J., Rayabharam, A., Saavedra, C., Aluru, N.R., Bashir, R., 2021. Culture-free biphasic approach for sensitive detection of E. coli O157:H7 from beef samples. Biotechnol Bioeng 118, 4516–4529. https://doi.org/10.1002/bit.27920

Moulari, B., Béduneau, A., Pellequer, Y., Lamprecht, A., 2014. Lectin-decorated nanoparticles enhance binding to the inflamed tissue in experimental colitis. Journal of Controlled Release 188, 9–17. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.046

Nguyen, T.V., Le Van, P., Le Huy, C., Gia, K.N., Weintraub, A., 2005. Detection and Characterization of Diarrheagenic Escherichia coli from Young Children in Hanoi, Vietnam. J Clin Microbiol 43, 755–760. https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.755-760.2005

Obaid, G., Chambrier, I., Cook, M.J., Russell, D.A., 2015. Cancer targeting with biomolecules: a comparative study of photodynamic therapy efficacy using antibody or lectin conjugated phthalocyanine-PEG gold nanoparticles. Photochem Photobiol Sci 14, 737–747. https://doi.org/10.1039/c4pp00312h

Oliveira, M.D.L., Andrade, C.A.S., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Singh, P.R., Zeng, X., 2011a. Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. Journal of Colloid and Interface Science 362, 194–201. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.06.042

Oliveira, M.D.L., Correia, M.T.S., Diniz, F.B., 2009. A novel approach to classify serum glycoproteins from patients infected by dengue using electrochemical impedance spectroscopy analysis. Synthetic Metals, International Conference on Science and Technology of Synthetic Metals, Porto de Galinhas Pernambuco, Brazil, July 6-11, 2008 159, 2162–2164. https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2009.09.022

Oliveira, M.D.L., Nogueira, M.L., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Andrade, C.A.S., 2011b. Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on *Cratylia mollis* lectin affinity. Sensors and Actuators B: Chemical 155, 789–795. https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.01.049

Oliveira, W.F., Cabrera, M.P., Santos, N.R.M., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., Neves, R.P., Silva, M.V., Santos, B.S., Coelho, L.C.B.B., Cabral Filho, P.E., Fontes, A., Correia, M.T.S., 2020. Evaluating glucose and mannose profiles in *Candida* species using quantum dots conjugated with Cramoll lectin as fluorescent nanoprobes. Microbiological Research 230, 126330. https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126330

Paczesny, J., Mierzejewski, P.A., 2021. The use of probes and bacteriophages for the detection of bacteria, in: Methods in Microbiology. Elsevier, pp. 49–93. https://doi.org/10.1016/bs.mim.2020.11.003

Peumans, W.J., Van Damme, E.J., 1995. Lectins as plant defense proteins. Plant Physiol 109, 347–352.

Pooja, D., Tunki, L., Kulhari, H., Reddy, B.B., Sistla, R., 2015. Characterization, biorecognitive activity and stability of WGA grafted lipid nanostructures for the controlled delivery of Rifampicin. Chemistry and Physics of Lipids 193, 11–17. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.09.008

Punjabi, K., Adhikary, R.R., Patnaik, A., Bendale, P., Saxena, S., Banerjee, R., 2022. Lectin-Functionalized Chitosan Nanoparticle-Based Biosensor for Point-of-Care Detection of Bacterial Infections. Bioconjugate Chem. 33, 1552–1563. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.2c00299

Pyrgiotakis, G., Blattmann, C.O., Pratsinis, S., Demokritou, P., 2013. Nanoparticle–Nanoparticle Interactions in Biological Media by Atomic Force Microscopy. Langmuir 29, 11385–11395. https://doi.org/10.1021/la4019585

Qu, H.-T., Li, Q., Hao, L., Ni, Y.-J., Luan, W.-Y., Yang, Z., Chen, X.-D., Zhang, T.-T., Miao, Y.-D., Zhang, F., 2024. Esophageal cancer screening, early detection and treatment: Current insights and future directions. World J Gastrointest Oncol 16, 1180–1191. https://doi.org/10.4251/wjgo.v16.i4.1180

Rahman, A., Kang, S., Wang, W., Huang, Q., Kim, I., 2022. Lectin-Modified Bacterial Cellulose Nanocrystals Decorated with Au Nanoparticles for Selective Detection of Bacteria Using SERS Coupled with Machine Learning. ACS Appl. Nano Mater., ACS Appl. Nano Mater. 5, 259–268. https://doi.org/10.1021/acsanm.1c02760

Raval, S., Gowda, S.B., Singh, D.D., Chandra, N.R., 2004. A database analysis of jacalin-like lectins: sequence–structure–function relationships. Glycobiology 14, 1247–1263. https://doi.org/10.1093/glycob/cwh140

Santos, M.P.M.C., de Oliveira, L.S., Lima-Neto, R.G., Andrade, C.A.S., Oliveira, M.D.L., 2024. New bioelectrode based on graphene quantum dots-polypyrrole film and Concanavalin A for pathogenic microorganism detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 248, 116299. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2024.116299

Selzer, S.M., Vico, R.V., Ferreyra, N.F., 2022. Immobilization of Concanavalin A on iron oxide magnetic nanoparticles. Effect of Bovine Serum Albumin in the recognition interactions of the lectin. Surfaces and Interfaces 30, 101908. https://doi.org/10.1016/j.surfin.2022.101908

Shin, S.-H., Kim, G.-Y., Shim, J., Kim, J., Hur, H.-G., Lee, D.-J., Song, J.-I., Moon, S.-H., 2012. Use of biologically designed gold nanowire for biosensor application. Korean J. Chem. Eng. 29, 1666–1669. https://doi.org/10.1007/s11814-012-0140-y

Simão, E.P., Silva, D.B.S., Cordeiro, M.T., Gil, L.H.V., Andrade, C.A.S., Oliveira, M.D.L., 2020. Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection. Talanta 208, 120338. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120338

Singh, S.K., Chandra, P. (Eds.), 2024. Protein Biomarkers: Discovery and Applications in Clinical Diagnostics. Springer Nature, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-97-5045-0

Sinha, M., Jupe, J., Mack, H., Coleman, T.P., Lawrence, S.M., Fraley, S.I., 2018. Emerging Technologies for Molecular Diagnosis of Sepsis. Clin Microbiol Rev 31, e00089-17. https://doi.org/10.1128/CMR.00089-17

Soliman, M.M., El-Shatoury, E.H., El-Araby, M.M.I., 2024. Antibacterial and anticancer activities of three novel lectin-conjugated chitosan nanoparticles. Appl Microbiol Biotechnol 108, 1–15. https://doi.org/10.1007/s00253-024-13344-7

Subramaniyan, S.B., Megarajan, S., Dharshini, K.S., Veerappan, A., 2021. Artocarpus integrifolia seed lectin enhances membrane damage, oxidative stress and biofilm inhibition activity of silver nanoparticles against Staphylococcus aureus. Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp. 624, 126842. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126842

Tenório, D.P.L.A., Andrade, C.G., Cabral Filho, P.E., Sabino, C.P., Kato, I.T., Carvalho, L.B., Alves, S., Ribeiro, M.S., Fontes, A., Santos, B.S., 2015. CdTe quantum dots conjugated to concanavalin A as potential fluorescent molecular probes for saccharides detection

in *Candida albicans*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 142, 237–243. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.11.010

Terävä, J., Tiainen, L., Lamminmäki, U., Kellokumpu-Lehtinen, P.-L., Pettersson, K., Gidwani, K., 2019. Lectin nanoparticle assays for detecting breast cancer-associated glycovariants of cancer antigen 15-3 (CA15-3) in human plasma. PLoS One 14, e0219480. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219480

Umamaheshwari, R.B., Jain, N.K., 2003. Receptor Mediated Targeting of Lectin Conjugated Gliadin Nanoparticles in the Treatment of Helicobacter pylori. Journal of Drug Targeting 11, 415–424. https://doi.org/10.1080/10611860310001647771

Vafaiee, M., Vossoughi, M., Mohammadpour, R., Sasanpour, P., 2019. Gold-Plated Electrode with High Scratch Strength for Electrophysiological Recordings. Sci Rep 9, 2985. https://doi.org/10.1038/s41598-019-39138-w

Váradi, L., Luo, J.L., Hibbs, D.E., Perry, J.D., Anderson, R.J., Orenga, S., Groundwater, P.W., 2017. Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future. Chem. Soc. Rev. 46, 4818–4832. https://doi.org/10.1039/C6CS00693K

Vernekar, P.R., Purohit, B., Shetti, N.P., Chandra, P., 2021. Glucose modified carbon paste sensor in the presence of cationic surfactant for mefenamic acid detection in urine and pharmaceutical samples. Microchemical Journal 160, 105599. https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105599

Vishweswaraiah, R.H., Tenguria, S., Chandrasekhar, B., Harshitha, C.G., Gandhi, K., Kumar, N., Aluko, R.E., Puniya, A.K., 2022. Monitoring of Microbial Safety of Foods Using Lectins: A Review. Front. Food. Sci. Technol. 2. https://doi.org/10.3389/frfst.2022.842063

Voet, D., Voet, J.G., 2010. Biochemistry, 4th Edition. John wiley & Sons.

Wang, B., Anzai, J., 2015. Recent Progress in Lectin-Based Biosensors. Materials (Basel) 8, 8590–8607. https://doi.org/10.3390/ma8125478

Wang, H., Gao, J., Ng, T.B., 2000. A New Lectin with Highly Potent Antihepatoma and Antisarcoma Activities from the Oyster Mushroom *Pleurotus Ostreatus*. Biochemical and Biophysical Research Communications 275, 810–816. https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3373

Wang, J., Liu, D., Wang, Z., 2011. Synthesis and cell-surface binding of lectin-gold nanoparticle conjugates. Anal. Methods 3, 1745–1751. https://doi.org/10.1039/C1AY05151B

Wang, S., Zhang, J., Gharbi, O., Vivier, V., Gao, M., Orazem, M.E., 2021. Electrochemical impedance spectroscopy. Nat Rev Methods Primers 1, 1–21. https://doi.org/10.1038/s43586-021-00039-w

Wang, Y., Gildersleeve, J.C., Basu, A., Zimmt, M.B., 2010. Photo- and Bio-physical Studies of Lectin-Conjugated Fluorescent Nanoparticles: Reduced Sensitivity in High Density Assays. J Phys Chem B 114, 14487–14494. https://doi.org/10.1021/jp101854m

Williams, A.J., Cooper, W.M., Ramsaroop, S., Alusta, P., Buzatu, D.A., Wilkes, J.G., 2017. Rapid Flow Cytometry Detection of a Single Viable Escherichia coli O157:H7 Cell in Raw Spinach Using a Simplified Sample Preparation Technique. Front Microbiol 8, 1493. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01493

Xue, Y., Bao, L., Xiao, X., Ding, L., Lei, J., Ju, H., 2011. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes with lectin for label-free dynamic monitoring of cell-surface glycan expression. Anal Biochem 410, 92–97. https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.11.019

Yamamoto, Y., 2002. PCR in Diagnosis of Infection: Detection of Bacteria in Cerebrospinal Fluids. Clin Vaccine Immunol 9, 508–514. https://doi.org/10.1128/CDLI.9.3.508-514.2002

Yan, J., Chen, L., Teng, M., Hao, M., Feng, B., Yang, F., Shen, H., Yu, S., Wang, L., 2023. Dual recognition strategy for the rapid and precise detection of *Bacillus cereus* using post-modified nano-MOF and aptamer. Sensors and Actuators B: Chemical 386, 133745. https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.133745

Yang, H., 2020. Label-free Lectin Impedimetric Biosensor Based on a Polyaniline/Graphene Nanocomposite for the Detection of Escherichia coli. Int. J. Electrochem. Sci. 8913–8927. https://doi.org/10.20964/2020.09.34

Yaraki, M.T., Wongtrakul-Kish, K., Moh, E.S.X., Packer, N.H., Wang, Y., 2024. Lectin-conjugated nanotags with high SERS stability: selective probes for glycans. Analyst 149, 1774–1783. https://doi.org/10.1039/D3AN02108D

Yi, S.Y., Jeong, J., Lee, W.S., Kwon, J., Yoon, K., Park, K., 2023. A Simple and Rapid Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Screening Test Using a Mannose-Binding Lectin (MBL)-Conjugated Gold Nanoparticle Probe. J. Microbiol. Biotechnol. 33, 698–705. https://doi.org/10.4014/jmb.2301.01004

Yong, J., Wang, D., Kwok, L., Mahmud, S.A.Z., Hakobyan, K., Lord, M.S., Mao, G., 2025. Interfacial Interactions between Neural Tracing Lectin–Gold Nanoparticle Conjugate and Cell Membrane Glycoproteins. Langmuir 41, 10161–10176. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.4c05034

Yousef, M.S., López-Lorente, A.I., Diaz-Jimenez, M., Consuegra, C., Dorado, J., Pereira, B., Ortiz, I., Cárdenas, S., Hidalgo, M., 2020. Nano-depletion of acrosome-damaged donkey sperm by using lectin peanut agglutinin (PNA)-magnetic nanoparticles. Theriogenology 151, 103–111. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.011

Zamudio Cañas, R., Jaramillo Flores, M.E., Vallejo Ruiz, V., Delgado Macuil, R.J., López Gayou, V., 2024. Detection of Sialic Acid to Differentiate Cervical Cancer Cell Lines Using a Sambucus nigra Lectin Biosensor. Biosensors 14, 34. https://doi.org/10.3390/bios14010034

Zhang, N., Wang, L., Deng, X., Liang, R., Su, M., He, C., Hu, L., Su, Y., Ren, J., Yu, F., Du, L., Jiang, S., 2020. Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans. Journal of Medical Virology 92, 408–417. https://doi.org/10.1002/jmv.25674

Zhang, Y., So, M., Loening, A.M., Yao, H., Gambhir, S.S., Rao, J., 2006. HaloTag Protein-Mediated Site-Specific Conjugation of Bioluminescent Proteins to Quantum Dots. Angewandte Chemie International Edition 45, 4936–4940. https://doi.org/10.1002/anie.200601197

Zheng, J., Wang, J., Song, D., Xu, J., Zhang, M., 2020. Electrochemical Aptasensor of Carcinoembryonic Antigen Based on Concanavalin A-Functionalized Magnetic Copper Silicate Carbon Microtubes and Gold-Nanocluster-Assisted Signal Amplification. ACS Appl. Nano Mater. 3, 3449–3458. https://doi.org/10.1021/acsanm.0c00194

Zheng, L., Wan, Y., Qi, P., Sun, Y., Zhang, D., Yu, L., 2017. Lectin functionalized ZnO nanoarrays as a 3D nano-biointerface for bacterial detection. Talanta 167, 600–606. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.007

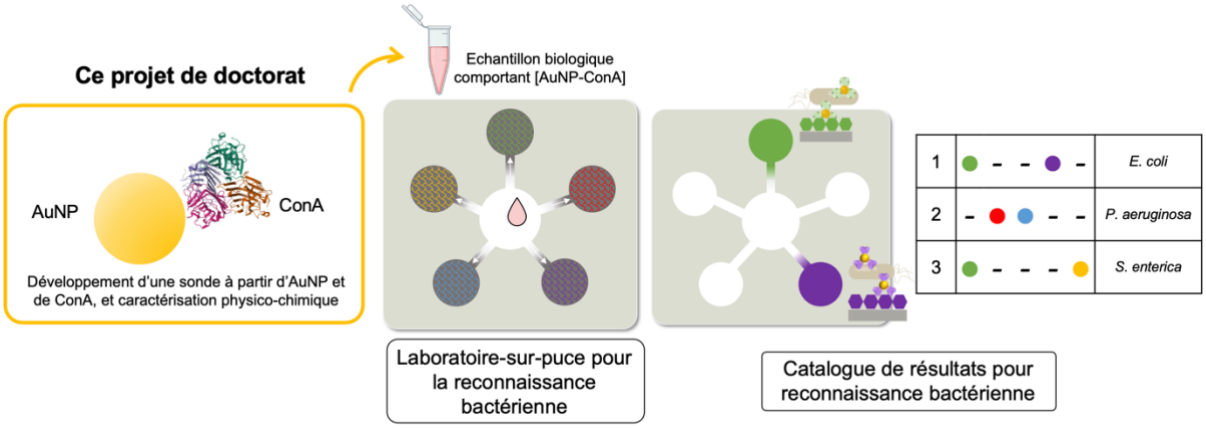
Zhuang, L., Gong, J., Zhao, Y., Yang, J., Liu, G., Zhao, B., Song, C., Zhang, Y., Shen, Q., 2024. Progress in methods for the detection of viable *Escherichia coli*. Analyst 149, 1022–1049. https://doi.org/10.1039/D3AN01750H

1.7. Objectif de travail

Comme il a été décrit dans ce chapitre, les AuNP sont un excellent outil pour permettre la détection de molécules ou de pathogènes. Elles sont largement décrites dans la littérature pour la détection de bactéries, de cellules tumorales ou d'hormones. Les AuNP profitent également de la vaste diversité de chimie de surface disponible pouvant leur conférer de nouvelles propriétés et fonctions. Les lectines, comme décrites dans la revue de la littérature, sont employées pour modifier divers types de nanomatériaux et développer de nouveaux biocapteurs. Cependant, un manque crucial de caractérisation a pu être relevé, rendant certains résultats questionnables ou peu robustes.

Le développement d'un système lectine-NP semble donc représenter un concept prometteur pour la création de nouveaux capteurs rapides, sensibles et spécifiques. En utilisant la ConA pour sa reconnaissance envers les sucres (mannose et glucose) et les AuNP pour leur simplicité de synthèse, propriétés optiques et facilité de modification de surface, il est possible de développer un système de capteur envers ces sucres. De plus, la synthèse et caractérisation des AuNP est largement maîtrisée par l'équipe. En caractérisant de manière détaillée la morphologie, la taille, les propriétés optiques (LSPR, fluorescence) et la chimie de surface, il est possible de suivre les modifications induites par l'addition de la ConA. Par ailleurs, comme les bactéries possèdent des sucres à leur surface sous différentes forme (LPS pour les BGN et peptidoglycane pour les BGP) ce système pourra être utilisé afin de détecter la présence de bactéries de manière à apporter une alternative aux méthodes plus chronophages et coûteuses.

Ce projet de doctorat représente le premier travail d'un projet plus important tentant de développer un laboratoire-sur-puce portable, basé sur le système *point-of-care* permettant la détection ultra-rapide de bactéries. Il serait alors possible d'effectuer un test discriminant de plusieurs bactéries en simultané selon la présence ou l'absence de certains sucres étant présents ou non sur les espèces bactériennes recherchées. Une représentation schématique du projet est présentée ci-dessous.



Représentation schématique du projet de doctorat visant à développer une sonde à partir d'AuNP et ConA pour la détection de bactéries via un laboratoire-sur-puce.

Le travail de cette thèse repose donc sur le développement d'AuNP sur lesquelles la ConA est présente afin de disposer d'un système capable de reconnaître et d'interagir avec les sucres spécifiques à la ConA. Le développement de ce système ainsi que sa caractérisation et son interaction avec des sucres et LPS a été entrepris durant ce projet. De plus, l'interaction directe avec une bactérie a été expérimentée, en effectuant un parallèle avec la présence ou non de ConA et d'AuNP. Il sera important de confirmer la présence de la ConA sur les AuNP et non uniquement dans le milieu, en prenant en compte l'évolution des caractéristiques physico-chimiques et de la stabilité dans le temps. L'étude de l'interaction de ce système avec les sucres, LPS et bactéries permettra de valider notre hypothèse préalable mais aussi de confirmer la rétention d'activité de la ConA après être mise en contact avec les AuNP.

1.8. Références

[1] H. Stillmark, *Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen*. 1888.

[2] J. B. Sumner, "THE GLOBULINS OF THE JACK BEAN, CANAVALIA ENSIFORMIS: Preliminary Paper," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 37, no. 1, pp. 137–142, Jan. 1919, doi: 10.1016/S0021-9258(18)86371-2.

[3] W. C. Boyd and R. M. Reguera, "Hemagglutinating Substances for Human Cells in Various Plants*," *The Journal of Immunology*, vol. 62, no. 3, pp. 333–339, Jul. 1949, doi: 10.4049/jimmunol.62.3.333.

[4] W. M. Watkins and W. T. J. Morgan, "Neutralization of the Anti-H Agglutinin in Eel Serum by Simple Sugars," *Nature*, vol. 169, no. 4307, pp. 825–826, May 1952, doi: 10.1038/169825a0.

[5] W. C. Boyd and E. Shapleigh, "Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins)," *Science*, vol. 119, no. 3091, pp. 419–419, Mar. 1954, doi: 10.1126/science.119.3091.419.a.

[6] I. J. Goldstein, R. C. Hughes, M. Monsigny, T. Osawa, and N. Sharon, "What should be called a lectin?," *Nature*, vol. 285, no. 5760, pp. 66–66, May 1980, doi: 10.1038/285066b0.

[7] Jan Kocourek and V. Hořejší, "A NOTE ON THE REGENT DISCUSSION ON DEFINITION OS1 THE TERM 'LECTIN,'" in *Vol. 3 Proceedings of the Fifth Lectin Meeting Bern, May 31–June 5, 1982*, 1983, p. 710.

[8] W. J. Peumans and E. J. Van Damme, "Lectins as plant defense proteins.," *Plant Physiol*, vol. 109, no. 2, pp. 347–352, Oct. 1995.

[9] A. G. Morell, R. A. Irvine, I. Sternlieb, I. H. Scheinberg, and G. Ashwell, "Physical and Chemical Studies on Ceruloplasmin: V. METABOLIC STUDIES ON SIALIC ACID-FREE CERULOPLASMIN IN VIVO," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 243, no. 1, pp. 155–159, Jan. 1968, doi: 10.1016/S0021-9258(18)99337-3.

[10] A. A. D'Souza and P. V. Devarajan, "Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting — Strategies and applications," *Journal of Controlled Release*, vol. 203, pp. 126–139, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.02.022.

[11] D. Bojar *et al.*, "A Useful Guide to Lectin Binding: Machine-Learning Directed Annotation of 57 Unique Lectin Specificities," *ACS Chem. Biol.*, vol. 17, no. 11, pp. 2993–3012, Nov. 2022, doi: 10.1021/acschembio.1c00689.

[12] V. Rosilio, M.-M. Boissonnade, L. C. B. B. Coelho, N. S. Santos-Magalhaes, C. A. S. Andrade, and A. Baszkin, "Interaction of *Bauhinia monandra* lectin (BmoLL) with lipid monolayers," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 250, no. 1, pp. 491–497, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.colsurfa.2004.05.023.

[13] M. T. S. Correia and L. C. B. B. Coelho, "Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of Cratylia mollis mart. (Camaratu Bean)," *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 55, no. 3, pp. 261–273, Dec. 1995, doi: 10.1007/BF02786865.

[14] L. Lei *et al.*, "Rapid and sensitive detection of cell surface N-glycans in live cancer cells using a novel acid-activated concanavalin A nanosensor," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 308, p. 142207, May 2025, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2025.142207.

[15] M. K. Islam *et al.*, "A Nanoparticle-Based Approach for the Detection of Extracellular Vesicles," *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, p. 10038, Jul. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-46395-2.

[16] K. Turton, R. Natesh, N. Thiyagarajan, J. A. Chaddock, and K. R. Acharya, "Crystal structures of Erythrina cristagalli lectin with bound N-linked oligosaccharide and

lactose," *Glycobiology*, vol. 14, no. 10, pp. 923–929, Oct. 2004, doi: 10.1093/glycob/cwh114.

[17] B. P. Cammue, B. Peeters, and W. J. Peumans, "Isolation and partial characterization of an N-acetylgalactosamine-specific lectin from winter-aconite (Eranthis hyemalis) root tubers," *Biochemical Journal*, vol. 227, no. 3, pp. 949–955, May 1985, doi: 10.1042/bj2270949.

[18] G. Hester and C. S. Wright, "The Mannose-specific Bulb Lectin fromGalanthus nivalis(Snowdrop) Binds Mono- and Dimannosides at Distinct Sites. Structure Analysis of Refined Complexes at 2.3 Å and 3.0 Å Resolution," *Journal of Molecular Biology*, vol. 262, no. 4, pp. 516–531, Oct. 1996, doi: 10.1006/jmbi.1996.0532.

[19] H. Matoba *et al.*, "Increased GS-II lectin binding and SATB2 downregulation are biological features for sessile serrated lesions and microvesicular hyperplastic polyps," *Pathol Int*, vol. 73, no. 6, pp. 246–254, Jun. 2023, doi: 10.1111/pin.13321.

[20] J. Balzarini, "Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins," *Antiviral Research*, vol. 71, no. 2, pp. 237–247, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.antiviral.2006.02.004.

[21] L. C. Von Kuster, B. H. Liwnicz, and D. E. Ward, "Concanavalin A and Lens culinaris agglutinin binding patterns in normal and neoplastic sebaceous epithelium," *Journal of Cutaneous Pathology*, vol. 13, no. 4, pp. 274–284, 1986, doi: 10.1111/j.1600-0560.1986.tb01523.x.

[22] F. B. M. B. Moreno *et al.*, "Identification of a new quaternary association for legume lectins," *Journal of Structural Biology*, vol. 161, no. 2, pp. 133–143, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.jsb.2007.10.002.

[23] R. Bilyy *et al.*, "Detection of dying cells using lectin-conjugated fluorescent and luminescent nanoparticles," *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, vol. 40, no. 4, pp. 234–237, 2009, doi: 10.1002/mawe.200900432.

[24] P. M. da Silva *et al.*, "*Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) has antibacterial activity and synergistic effects with antibiotics against β-lactamase-producing *Escherichia coli*," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 135, pp. 931–939, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.011.

[25] M. M. Soliman, E. H. El-Shatoury, and M. M. I. El-Araby, "Antibacterial and anticancer activities of three novel lectin-conjugated chitosan nanoparticles," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 108, no. 1, pp. 1–15, Dec. 2024, doi: 10.1007/s00253-024-13344-7.

[26] R. Lotan, E. Skutelsky, D. Danon, and N. Sharon, "The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (Arachis hypogaea).," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 250, no. 21, pp. 8518–8523, Nov. 1975, doi: 10.1016/S0021-9258(19)40790-4.

[27] A. M. Wu, J. H. Wu, T. Singh, L.-J. Lai, Z. Yang, and A. Herp, "Recognition factors of *Ricinus communis* agglutinin 1 (RCA1)," *Molecular Immunology*, vol. 43, no. 10, pp. 1700–1715, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.molimm.2005.09.008.

[28] I. J. Goldstein, H. C. Winter, and R. D. Poretz, "Chapter 12 - Plant lectins: tools for the study of complex carbohydrates," in *New Comprehensive Biochemistry*, vol. 29, J. Montreuil, J. F. G. Vliegenthart, and H. Schachter, Eds., in Glycoproteins II, vol. 29. , Elsevier, 1997, pp. 403–474. doi: 10.1016/S0167-7306(08)60625-0.

[29] N. Shibuya, I. J. Goldstein, W. F. Broekaert, M. Nsimba-Lubaki, B. Peeters, and W. J. Peumans, "The elderberry (Sambucus nigra L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(alpha 2-6)Gal/GalNAc sequence.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, no. 4, pp. 1596–1601, Feb. 1987, doi: 10.1016/S0021-9258(19)75677-4.

[30] B. R. F. de Lima *et al.*, "The Anxiolytic Activity of Schinus terebinthifolia Leaf Lectin (SteLL) Is Dependent on Monoaminergic Signaling although Independent of the

Carbohydrate-Binding Domain of the Lectin," *Pharmaceuticals*, vol. 15, no. 11, Art. no. 11, Nov. 2022, doi: 10.3390/ph15111364.

[31] Y. Xu, N. Shrestha, V. Préat, and A. Beloqui, "Overcoming the intestinal barrier: A look into targeting approaches for improved oral drug delivery systems," *Journal of Controlled Release*, vol. 322, pp. 486–508, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.04.006.

[32] P. R. Shewry, R. D'Ovidio, D. Lafiandra, J. A. Jenkins, E. N. C. Mills, and F. Békés, "CHAPTER 8 - Wheat Grain Proteins," in *Wheat (Fourth Edition)*, K. Khan and P. R. Shewry, Eds., in American Associate of Cereal Chemists International. , AACC International Press, 2009, pp. 223–298. doi: 10.1016/B978-1-891127-55-7.50015-X.

[33] W. Zhang *et al.*, "Expression and characterization of recombinant chicken mannose binding lectin," *Immunobiology*, vol. 222, no. 3, pp. 518–528, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.imbio.2016.10.019.

[34] M. W. Turner, "The role of mannose-binding lectin in health and disease," *Molecular Immunology*, vol. 40, no. 7, pp. 423–429, Nov. 2003, doi: 10.1016/S0161-5890(03)00155-X.

[35] M. Pirro *et al.*, "Characterization of Macrophage Galactose-type Lectin (MGL) ligands in colorectal cancer cell lines," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1864, no. 4, p. 129513, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.bbagen.2020.129513.

[36] K. F. L. dos Anjos *et al.*, "The Deposition of a Lectin from Oreochromis niloticus on the Surface of Titanium Dioxide Nanotubes Improved the Cell Adhesion, Proliferation, and Osteogenic Activity of Osteoblast-like Cells," *Biomolecules*, vol. 11, no. 12, Art. no. 12, Dec. 2021, doi: 10.3390/biom11121748.

[37] S. Nakamura-Tsuruta, J. Kominami, A. Kuno, and J. Hirabayashi, "Evidence that *Agaricus bisporus* agglutinin (ABA) has dual sugar-binding specificity," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 347, no. 1, pp. 215–220, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.06.073.

[38] L. Bhattacharyya and C. F. Brewer, "Lectin-carbohydrate interactions," *European Journal of Biochemistry*, vol. 176, no. 1, pp. 207–212, 1988, doi: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb14270.x.

[39] A. F. S. Santos, M. D. C. da Silva, T. H. Napoleão, P. M. G. Paiva, M. T. S. Correia, and L. C. B. B. Coelho, "Lectins: Function, structure, biological properties andpotential applications," 2014. Accessed: May 02, 2025. [Online]. Available: https://core.ac.uk/outputs/76177195/?utm_source=pdf&utm_medium=banner&utm_campaign=pdf-decoration-v1

[40] S. Elgavish and B. Shaanan, "Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 22, no. 12, pp. 462–467, Dec. 1997, doi: 10.1016/S0968-0004(97)01146-8.

[41] C. D. Raposo, A. B. Canelas, and M. T. Barros, "Human Lectins, Their Carbohydrate Affinities and Where to Find Them," *Biomolecules*, vol. 11, no. 2, Art. no. 2, Feb. 2021, doi: 10.3390/biom11020188.

[42] D. H. Janzen, H. B. Juster, and I. E. Liener, "Insecticidal Action of the Phytohemagglutinin in Black Beans on a Bruchid Beetle," *Science*, vol. 192, no. 4241, pp. 795–796, May 1976, doi: 10.1126/science.1265481.

[43] W. F. Broekaert, J. Van Parijs, F. Leyns, H. Joos, and W. J. Peumans, "A Chitin-Binding Lectin from Stinging Nettle Rhizomes with Antifungal Properties," *Science*, vol. 245, no. 4922, pp. 1100–1102, Sep. 1989, doi: 10.1126/science.245.4922.1100.

[44] M. Regente *et al.*, "A Sunflower Lectin with Antifungal Properties and Putative Medical Mycology Applications," *Curr Microbiol*, vol. 69, no. 1, pp. 88–95, Jul. 2014, doi: 10.1007/s00284-014-0558-z.

[45] S. Charungchitrak, A. Petsom, P. Sangvanich, and A. Karnchanatat, “Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen,” *Food Chemistry*, vol. 126, no. 3, pp. 1025–1032, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.114.

[46] C. Arokiyaraj, K. Tamilarasan, R. Manikandan, and S. Janarthanan, “Purification and structural characterization of lectin with antibacterial and anticancer properties from grubs of hide beetle, *Dermestes frischii*,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 203, pp. 312–332, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.01.099.

[47] G. Chandrasekaran, Y.-C. Lee, H. Park, Y. Wu, and H.-J. Shin, “Antibacterial and Antifungal Activities of Lectin Extracted from Fruiting Bodies of the Korean Cauliflower Medicinal Mushroom, *Sparassis latifolia* (Agaricomycetes),” *IJM*, vol. 18, no. 4, 2016, doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i4.20.

[48] J. Balzarini *et al.*, “The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium* hybrid and *Epipactis helleborine* and the (*N*-acetylglucosamine)n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro,” *Antiviral Research*, vol. 18, no. 2, pp. 191–207, Jun. 1992, doi: 10.1016/0166-3542(92)90038-7.

[49] J. Favero *et al.*, “Inhibition of human immunodeficiency virus infection by the lectin jacalin and by a derived peptide showing a sequence similarity with gp120,” *European Journal of Immunology*, vol. 23, no. 1, pp. 179–185, 1993, doi: 10.1002/eji.1830230128.

[50] J. Ciopraga, O. Gozia, R. Tudor, L. Brezuica, and R. J. Doyle, “*Fusarium* sp. growth inhibition by wheat germ agglutinin,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1428, no. 2, pp. 424–432, Aug. 1999, doi: 10.1016/S0304-4165(99)00085-9.

[51] A. Q. Pinheiro *et al.*, “Antifungal and marker effects of Talisia esculenta lectin on Microsporum canis in vitro,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 107, no. 6, pp. 2063–2069, Dec. 2009, doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04387.x.

[52] Y. R. Li, Q. H. Liu, H. X. Wang, and T. B. Ng, “A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1780, no. 1, pp. 51–57, Jan. 2008, doi: 10.1016/j.bbagen.2007.09.004.

[53] M. D. Swanson, H. C. Winter, I. J. Goldstein, and D. M. Markovitz, “A Lectin Isolated from Bananas Is a Potent Inhibitor of HIV Replication*,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 12, pp. 8646–8655, Mar. 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.034926.

[54] S. Naik and S. Kumar, “Lectins from plants and algae act as anti-viral against HIV, influenza and coronaviruses,” *Mol Biol Rep*, vol. 49, no. 12, pp. 12239–12246, Dec. 2022, doi: 10.1007/s11033-022-07854-8.

[55] M. Mazalovska and J. C. Kouokam, “Lectins as Promising Therapeutics for the Prevention and Treatment of HIV and Other Potential Coinfections,” *BioMed Research International*, vol. 2018, no. 1, p. 3750646, 2018, doi: 10.1155/2018/3750646.

[56] Y. Nagata, “d-Amino Acids in Nature,” in *Advances in BioChirality*, G. Pályi, C. Zucchi, and L. Caglioti, Eds., Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1999, pp. 271–283. doi: 10.1016/B978-008043404-9/50018-8.

[57] G.-J. Jeong, F. Khan, N. Tabassum, K.-J. Cho, and Y.-M. Kim, “Controlling biofilm and virulence properties of Gram-positive bacteria by targeting wall teichoic acid and lipoteichoic acid,” *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 62, no. 4, p. 106941, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2023.106941.

[58] T. J. Silhavy, D. Kahne, and S. Walker, “The Bacterial Cell Envelope,” *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 2, no. 5, p. a000414, Jan. 2010, doi: 10.1101/cshperspect.a000414.
[59] X. Wang and P. J. Quinn, “Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification,” *Progress in Lipid Research*, vol. 49, no. 2, pp. 97–107, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.plipres.2009.06.002.
[60] E. Frirdich and C. Whitfield, “Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the Enterobacteriaceae,” *J Endotoxin Res*, vol. 11, no. 3, pp. 133–144, 2005, doi: 10.1179/096805105X46592.
[61] R. F. Maldonado, I. Sá-Correia, and M. A. Valvano, “Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection,” *FEMS Microbiol Rev*, vol. 40, no. 4, pp. 480–493, Jul. 2016, doi: 10.1093/femsre/fuw007.
[62] J. Malheiro and M. Simões, “4 - Antimicrobial resistance of biofilms in medical devices,” in *Biofilms and Implantable Medical Devices*, Y. Deng and W. Lv, Eds., Woodhead Publishing, 2017, pp. 97–113. doi: 10.1016/B978-0-08-100382-4.00004-6.
[63] C. Molina-Santiago, A. de Vicente, and D. Romero, “Bacterial extracellular matrix as a natural source of biotechnologically multivalent materials,” *Computational and Structural Biotechnology Journal*, vol. 19, pp. 2796–2805, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.csbj.2021.05.008.
[64] H.-C. Flemming, J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S. A. Rice, and S. Kjelleberg, “Biofilms: an emergent form of bacterial life,” *Nat Rev Microbiol*, vol. 14, no. 9, pp. 563–575, Sep. 2016, doi: 10.1038/nrmicro.2016.94.
[65] N. Ezzariga *et al.*, “Biofilm and Antibiotic Resistance Study of Bacteria Involved in Nosocomial Infections,” *Cureus*, vol. 17, no. 2, Feb. 2025, doi: 10.7759/cureus.78673.
[66] J. W. Costerton, P. S. Stewart, and E. P. Greenberg, “Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections,” *Science*, vol. 284, no. 5418, pp. 1318–1322, May 1999, doi: 10.1126/science.284.5418.1318.
[67] C. Michaelis and E. Grohmann, “Horizontal Gene Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Biofilms,” *Antibiotics*, vol. 12, no. 2, Art. no. 2, Feb. 2023, doi: 10.3390/antibiotics12020328.
[68] S. Saini, S. Tewari, J. Dwivedi, and V. Sharma, “Biofilm-mediated wastewater treatment: a comprehensive review,” *Materials Advances*, vol. 4, no. 6, pp. 1415–1443, 2023, doi: 10.1039/D2MA00945E.
[69] Y. Xing *et al.*, “Effective immobilization of heavy metals via reactive barrier by rhizosphere bacteria and their biofilms,” *Environmental Research*, vol. 207, p. 112080, May 2022, doi: 10.1016/j.envres.2021.112080.
[70] C. Margot, W. Rhoads, M. Gabrielli, M. Olive, and F. Hammes, “Dynamics of drinking water biofilm formation associated with Legionella spp. colonization,” *npj Biofilms Microbiomes*, vol. 10, no. 1, pp. 1–11, Oct. 2024, doi: 10.1038/s41522-024-00573-x.
[71] L. Hall-Stoodley and P. Stoodley, “Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens,” *Trends in Microbiology*, vol. 13, no. 1, pp. 7–10, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.tim.2004.11.004.
[72] V. J. A. Fonseca, A. L. Braga, J. R. Filho, C. S. Teixeira, G. C. A. da Hora, and M. F. B. Morais-Braga, “A review on the antimicrobial properties of lectins,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 195, pp. 163–178, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.11.209.
[73] A. Man-Kupisinska *et al.*, “Interaction of Mannose-Binding Lectin With Lipopolysaccharide Outer Core Region and Its Biological Consequences,” *Front Immunol*, vol. 9, p. 1498, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01498.

[74] K. el Biari, Á. Gaudioso, M. C. Fernández-Alonso, J. Jiménez-Barbero, and F. J. Cañada, "Peptidoglycan Recognition by Wheat Germ Agglutinin. A View by NMR," *Natural Product Communications*, vol. 14, no. 5, p. 1934578X19849240, May 2019, doi: 10.1177/1934578X19849240.

[75] M. M. El-Araby, E. H. El-Shatoury, M. M. Soliman, and H. F. Shaaban, "Characterization and antimicrobial activity of lectins purified from three Egyptian leguminous seeds," *AMB Express*, vol. 10, no. 1, p. 90, May 2020, doi: 10.1186/s13568-020-01024-4.

[76] M. C. Moura *et al.*, "Multi-effect of the water-soluble Moringa oleifera lectin against Serratia marcescens and Bacillus sp.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 123, no. 4, pp. 861–874, Oct. 2017, doi: 10.1111/jam.13556.

[77] H. Jang, C. Lee, Y. Hwang, and S. J. Lee, "Concanavalin A: coordination diversity to xenobiotic metal ions and biological consequences," *Dalton Trans.*, vol. 50, no. 48, pp. 17817–17831, Dec. 2021, doi: 10.1039/D1DT03501K.

[78] B. S. Cavada, V. R. Pinto-Junior, V. J. S. Osterne, and K. S. Nascimento, "ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 1, Art. no. 1, Jan. 2019, doi: 10.3390/ijms20010030.

[79] A. S. Moraes and M. L. S. Mello, "The Con-A-peroxidase method for tissue localization of glucosyl and mannosyl groups applied to mouse hepatocytes and chicken erythrocytes," *Acta Histochemica*, vol. 108, no. 6, pp. 475–479, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.acthis.2006.09.001.

[80] R. V. Rebois, P. Schuck, and J. K. Northup, "[2] - Elucidating Kinetic and Thermodynamic Constants for Interaction of G Protein Subunits and Receptors by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy," in *Methods in Enzymology*, vol. 344, R. Iyengar and J. D. Hildebrandt, Eds., in G Protein Pathways, Part B: G Proteins and their Regulators, vol. 344. , Academic Press, 2002, pp. 15–42. doi: 10.1016/S0076-6879(02)44703-9.

[81] S. Kaushik, D. Mohanty, and A. Surolia, "The role of metal ions in substrate recognition and stability of concanavalin A: a molecular dynamics study," *Biophys J*, vol. 96, no. 1, pp. 21–34, Jan. 2009, doi: 10.1529/biophysj.108.134601.

[82] A. Deacon *et al.*, "The structure of concanavalin A and its bound solvent determined with small-molecule accuracy at 0.94 [Aring]resolution," *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, vol. 93, no. 24, pp. 4305–4312, Jan. 1997, doi: 10.1039/A704140C.

[83] S. G. Nonis *et al.*, "Structural and biochemical analyses of concanavalin A circular permutation by jack bean asparaginyl endopeptidase," *The Plant Cell*, vol. 33, no. 8, pp. 2794–2811, Aug. 2021, doi: 10.1093/plcell/koab130.

[84] D. M. Carrington, A. Auffret, and D. E. Hanke, "Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A," *Nature*, vol. 313, no. 5997, pp. 64–67, Jan. 1985, doi: 10.1038/313064a0.

[85] T. Mori, M. Toyoda, T. Ohtsuka, and Y. Okahata, "Kinetic analyses for bindings of concanavalin A to dispersed and condensed mannose surfaces on a quartz crystal microbalance," *Analytical Biochemistry*, vol. 395, no. 2, pp. 211–216, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.ab.2009.08.029.

[86] L. L. So and I. J. Goldstein, "Protein-Carbohydrate Interaction: IX. Application of the Quantitative Hapten Inhibition Technique to Polysaccharide-Concanavalin a Interaction. Some Comments on the Forces Involved in Concanavalin a-Polysaccharide Interaction1," *The Journal of Immunology*, vol. 99, no. 1, pp. 158–163, Jul. 1967, doi: 10.4049/jimmunol.99.1.158.

[87] G. M. Bradbrook *et al.*, "X-Ray and molecular dynamics studies of concanavalin-A glucoside and mannoside complexes Relating structure to thermodynamics of binding," *Faraday Trans.*, vol. 94, no. 11, pp. 1603–1611, 1998, doi: 10.1039/a800429c.
[88] J. B. Sumner and S. F. Howell, "Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A," *J Bacteriol*, vol. 32, no. 2, pp. 227–237, Aug. 1936.
[89] A. R. Archibald and H. E. Coapes, "The interaction of concanavalin A with teichoic acids and bacterial walls," *Biochemical Journal*, vol. 123, no. 4, pp. 665–667, Jul. 1971, doi: 10.1042/bj1230665.
[90] R. J. Doyle and D. C. Birdsell, "Interaction of Concanavalin A with the Cell Wall of Bacillus subtilis," *Journal of Bacteriology*, vol. 109, no. 2, pp. 652–658, Feb. 1972, doi: 10.1128/jb.109.2.652-658.1972.
[91] A. R. Archibald and H. E. Coapes, "Blocking of Bacteriophage Receptor Sites by Concanavalin A," *Microbiology*, vol. 73, no. 3, pp. 581–585, 1972, doi: 10.1099/00221287-73-3-581.
[92] A. Cantelli, F. Piro, P. Pecchini, M. Di Giosia, A. Danielli, and M. Calvaresi, "Concanavalin A-Rose Bengal bioconjugate for targeted Gram-negative antimicrobial photodynamic therapy," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 206, p. 111852, May 2020, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111852.
[93] M. P. M. C. Santos, L. S. de Oliveira, R. G. Lima-Neto, C. A. S. Andrade, and M. D. L. Oliveira, "New bioelectrode based on graphene quantum dots-polypyrrole film and Concanavalin A for pathogenic microorganism detection," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 248, p. 116299, Sep. 2024, doi: 10.1016/j.jpba.2024.116299.
[94] M. Naghavi *et al.*, "Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050," *The Lancet*, vol. 404, no. 10459, pp. 1199–1226, Sep. 2024, doi: 10.1016/S0140-6736(24)01867-1.
[95] L. M. Abayasekara *et al.*, "Detection of bacterial pathogens from clinical specimens using conventional microbial culture and 16S metagenomics: a comparative study," *BMC Infectious Diseases*, vol. 17, no. 1, p. 631, Sep. 2017, doi: 10.1186/s12879-017-2727-8.
[96] M. Bonnet, J. C. Lagier, D. Raoult, and S. Khelaifia, "Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology," *New Microbes and New Infections*, vol. 34, p. 100622, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.nmni.2019.100622.
[97] E. H. Anderson and C. A. Stuart, "A Quantitative Differential Method for Counting Mixed Cultures of Bacteria," *J Bacteriol*, vol. 30, no. 2, pp. 207–209, Aug. 1935, doi: 10.1128/jb.30.2.207-209.1935.
[98] J. A. Capobianco, C. M. Armstrong, J. Lee, and A. G. Gehring, "Detection of pathogenic bacteria in large volume food samples using an enzyme-linked immunoelectrochemical biosensor," *Food Control*, vol. 119, p. 107456, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107456.
[99] S. Persson, K. E. P. Olsen, F. Scheutz, K. A. Krogfelt, and P. Gerner-Smidt, "A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 13, no. 5, pp. 516–524, May 2007, doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01692.x.
[100] J.-F. Masson, "Consideration of Sample Matrix Effects and 'Biological' Noise in Optimizing the Limit of Detection of Biosensors," *ACS Sens.*, vol. 5, no. 11, pp. 3290–3292, Nov. 2020, doi: 10.1021/acssensors.0c02254.
[101] S. Ogwang, P. Mubiri, C. M. Bark, M. L. Joloba, W. H. Boom, and J. L. Johnson, "Incubation time of *Mycobacterium tuberculosis* complex sputum cultures in BACTEC

MGIT 960: 4 weeks of negative culture is enough for physicians to consider alternative diagnoses," *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 83, no. 2, pp. 162–164, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.07.002.

[102] E. Gerace, G. Mancuso, A. Midiri, S. Poidomani, S. Zummo, and C. Biondo, "Recent Advances in the Use of Molecular Methods for the Diagnosis of Bacterial Infections," *Pathogens*, vol. 11, no. 6, Art. no. 6, Jun. 2022, doi: 10.3390/pathogens11060663.

[103] S. Zhang *et al.*, "Molecular Methods for Pathogenic Bacteria Detection and Recent Advances in Wastewater Analysis," *Water*, vol. 13, no. 24, Art. no. 24, Jan. 2021, doi: 10.3390/w13243551.

[104] Y. Yamamoto, "PCR in Diagnosis of Infection: Detection of Bacteria in Cerebrospinal Fluids," *Clin Vaccine Immunol*, vol. 9, no. 3, pp. 508–514, May 2002, doi: 10.1128/CDLI.9.3.508-514.2002.

[105] P. A. Rice and G. E. Madico, "Polymerase Chain Reaction to Diagnose Infective Endocarditis," *Circulation*, vol. 111, no. 11, pp. 1352–1354, Mar. 2005, doi: 10.1161/01.CIR.0000160383.67586.7B.

[106] K. Matsuda, H. Tsuji, T. Asahara, Y. Kado, and K. Nomoto, "Sensitive Quantitative Detection of Commensal Bacteria by rRNA-Targeted Reverse Transcription-PCR," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 1, pp. 32–39, Jan. 2007, doi: 10.1128/AEM.01224-06.

[107] J. Tkadlec *et al.*, "The use of broad-range bacterial PCR in the diagnosis of infectious diseases: a prospective cohort study," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 25, no. 6, pp. 747–752, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.cmi.2018.10.001.

[108] J. E. Clarridge, "Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 17, no. 4, pp. 840–862, Oct. 2004, doi: 10.1128/cmr.17.4.840-862.2004.

[109] B. H. Aly, M. S. Hamad, M. Mohey, and S. Amen, "Polymerase Chain Reaction (PCR) Versus Bacterial Culture in Detection of Organisms in Otitis Media with Effusion (OME) in Children," *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, vol. 64, no. 1, pp. 51–55, Mar. 2012, doi: 10.1007/s12070-011-0161-6.

[110] S. Guiducci *et al.*, "Culture and Real-time Polymerase Chain reaction sensitivity in the diagnosis of invasive meningococcal disease: Does culture miss less severe cases?," *PLOS ONE*, vol. 14, no. 3, p. e0212922, Mar. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0212922.

[111] J. H. Melendez *et al.*, "Real-time PCR assays compared to culture-based approaches for identification of aerobic bacteria in chronic wounds," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 16, no. 12, pp. 1762–1769, Dec. 2010, doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03158.x.

[112] A. Mostafa *et al.*, "Culture-free biphasic approach for sensitive detection of E. coli O157:H7 from beef samples," *Biotechnol Bioeng*, vol. 118, no. 11, pp. 4516–4529, Nov. 2021, doi: 10.1002/bit.27920.

[113] F. Adzitey, N. Huda, and G. R. R. Ali, "Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks," *3 Biotech*, vol. 3, no. 2, pp. 97–107, Apr. 2013, doi: 10.1007/s13205-012-0074-4.

[114] F. Codony, L. Barreto, G. Agustí, and D. Asensio, "Understanding the reaction balances behind the viability PCR protocols based on photoreactive dyes," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 209, p. 106737, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.mimet.2023.106737.

[115] M. Mathelié-Guinlet *et al.*, "Silica nanoparticles-assisted electrochemical biosensor for the rapid, sensitive and specific detection of *Escherichia coli*," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 292, pp. 314–320, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.snb.2019.03.144.

[116] "ISO/TR 18401:2017(fr), Nanotechnologies — Explication en langage simple des termes choisis de la série de normes ISO/IEC 80004." Accessed: Apr. 28, 2025. [Online]. Available: https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:tr:18401:ed-1:v1:fr
[117] Á. I. López-Lorente and M. Valcárcel, "Chapter 1 - Analytical Nanoscience and Nanotechnology," in *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 66, M. Valcárcel and Á. I. López-Lorente, Eds., in Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry, vol. 66. , Elsevier, 2014, pp. 3–35. doi: 10.1016/B978-0-444-63285-2.00001-8.
[118] W. E. Ghann, O. Aras, T. Fleiter, and M.-C. Daniel, "Syntheses and Characterization of Lisinopril-Coated Gold Nanoparticles as Highly Stable Targeted CT Contrast Agents in Cardiovascular Diseases," *Langmuir*, vol. 28, no. 28, pp. 10398–10408, Jul. 2012, doi: 10.1021/la301694q.
[119] Y. Ding *et al.*, "A Nanomedicine Fabricated from Gold Nanoparticles-Decorated Metal–Organic Framework for Cascade Chemo/Chemodynamic Cancer Therapy," *Advanced Science*, vol. 7, no. 17, p. 2001060, 2020, doi: 10.1002/advs.202001060.
[120] R. Gupta, A. Kumar, S. Kumar, A. K. Pinnaka, and N. K. Singhal, "Naked eye colorimetric detection of *Escherichia coli* using aptamer conjugated graphene oxide enclosed Gold nanoparticles," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 329, p. 129100, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.snb.2020.129100.
[121] D. ÇAM and H. A. ÖKTEM, "Optimizations needed for lateral flow assay for rapid detection of pathogenic E. coli," *Turk J Biol*, vol. 41, no. 6, pp. 954–968, Dec. 2017, doi: 10.3906/biy-1705-50.
[122] C. Lu, Gao ,Xiaoxu, Chen ,Ya, Ren ,Jiangtao, and C. and Liu, "Aptamer-Based Lateral Flow Test Strip for the Simultaneous Detection of Salmonella typhimurium, Escherichia coli O157:H7 and Staphylococcus aureus," *Analytical Letters*, vol. 53, no. 4, pp. 646–659, Mar. 2020, doi: 10.1080/00032719.2019.1663528.
[123] T. Trakoolwilaiwan *et al.*, "Development of a thermochromic lateral flow assay to improve sensitivity for dengue virus serotype 2 NS1 detection," *Nanoscale*, vol. 15, no. 31, pp. 12915–12925, 2023, doi: 10.1039/D3NR01858J.
[124] A. Momeni *et al.*, "Gold-based nanoplatform for a rapid lateral flow immunochromatographic test assay for gluten detection," *BMC Biomedical Engineering*, vol. 4, no. 1, p. 5, May 2022, doi: 10.1186/s42490-022-00062-2.
[125] L. S. De Bortoli, C. R. Vanoni, C. L. Jost, D. Z. Mezalira, and M. C. Fredel, "Stable and ligand-free gold nanoparticles produced by laser ablation as efficient electrocatalysts for electrochemical sensing of dopamine," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 947, p. 117744, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.jelechem.2023.117744.
[126] T. E. Itina and A. Voloshko, "Nanoparticle formation by laser ablation in air and by spark discharges at atmospheric pressure," *Appl. Phys. B*, vol. 113, no. 3, pp. 473–478, Dec. 2013, doi: 10.1007/s00340-013-5490-6.
[127] M. Pišlová *et al.*, "A new way to prepare gold nanoparticles by sputtering – Sterilization, stability and other properties," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 115, p. 111087, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.msec.2020.111087.
[128] J. Turkevich, P. C. Stevenson, and J. Hillier, "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold," *Discuss. Faraday Soc.*, vol. 11, no. 0, pp. 55–75, Jan. 1951, doi: 10.1039/DF9511100055.
[129] N. Temur, S. Dadi, M. Nisari, N. Ucuncuoglu, I. Avan, and I. Ocsoy, "UV light promoted dihydrolipoic acid and its alanine derivative directed rapid synthesis of stable gold nanoparticles and their catalytic activity," *Sci Rep*, vol. 14, no. 1, p. 24697, Oct. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-76772-5.

[130] K. L. McGilvray, M. R. Decan, D. Wang, and J. C. Scaiano, “Facile Photochemical Synthesis of Unprotected Aqueous Gold Nanoparticles,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 50, pp. 15980–15981, Dec. 2006, doi: 10.1021/ja066522h.
[131] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, and R. Whyman, “Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system,” *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, vol. 0, no. 7, pp. 801–802, 1994, doi: 10.1039/C39940000801.
[132] C. Louis and O. Pluchery, *Gold Nanoparticles for Physics, Chemistry and Biology*. IMPERIAL COLLEGE PRESS, 2012. doi: 10.1142/p815.
[133] Olivier Pluchery and J.-F. Bryche, *An Introduction to Plasmonics | Advanced Textbooks in Physics*. World Scientific Publishing Europe Ltd, 2024. Accessed: Jun. 03, 2025. [Online]. Available: https://www.worldscientific.com/worldscibooks/10.1142/q0395
[134] V. Amendola, R. Pilot, M. Frasconi, O. M. Maragò, and M. A. Iatì, “Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review,” *J. Phys.: Condens. Matter*, vol. 29, no. 20, p. 203002, Apr. 2017, doi: 10.1088/1361-648X/aa60f3.
[135] O. PLUCHERY and M. CARRIERE, “Nanoparticules d’or,” *Techniques de l’ingénieur Nanosciences et nanotechnologies*, vol. base documentaire : TIP155WEB., no. ref. article : nm900. Editions T.I., 2011. doi: 10.51257/a-v1-nm900.
[136] M. R. Kumalasari, R. Alfanaar, and A. S. Andreani, “Gold nanoparticles (AuNPs): A versatile material for biosensor application,” *Talanta Open*, vol. 9, p. 100327, Aug. 2024, doi: 10.1016/j.talo.2024.100327.
[137] J. Beurton, P. Lavalle, A. Pallotta, T. Chaigneau, I. Clarot, and A. Boudier, “Design of surface ligands for blood compatible gold nanoparticles: Effect of charge and binding energy,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 580, p. 119244, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119244.
[138] P. Kumthekar *et al.*, “A first-in-human phase 0 clinical study of RNA interference–based spherical nucleic acids in patients with recurrent glioblastoma,” *Science Translational Medicine*, vol. 13, no. 584, p. eabb3945, Mar. 2021, doi: 10.1126/scitranslmed.abb3945.
[139] Y. Zhao, F. Zhou, H. Zhou, and H. Su, “The structural and bonding evolution in cysteine–gold cluster complexes,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, no. 5, pp. 1690–1698, Jan. 2013, doi: 10.1039/C2CP42830J.
[140] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*. Elsevier, 2011.
[141] J. Tournebize *et al.*, “Impact of gold nanoparticle coating on redox homeostasis,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 438, no. 1, pp. 107–116, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.07.026.
[142] J. Xu, Zhou ,Lihui, Liu ,Honglai, and Y. and Hu, “Synthesis and self-assembly of gold nanoparticles using gemini surfactant as a phase transfer reagent and a stabilizer,” *Journal of Experimental Nanoscience*, vol. 1, no. 1, pp. 103–111, Mar. 2006, doi: 10.1080/17458080500367704.
[143] K. Rahme, L. Chen, R. G. Hobbs, M. A. Morris, C. O’Driscoll, and J. D. Holmes, “PEGylated gold nanoparticles: polymer quantification as a function of PEG lengths and nanoparticle dimensions,” *RSC Adv.*, vol. 3, no. 17, pp. 6085–6094, Apr. 2013, doi: 10.1039/C3RA22739A.
[144] A. Reznickova, P. Slepicka, N. Slavikova, M. Staszek, and V. Svorcik, “Preparation, aging and temperature stability of PEGylated gold nanoparticles,” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 523, pp. 91–97, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.colsurfa.2017.04.005.
[145] W. Wang, Q.-Q. Wei, J. Wang, B.-C. Wang, S. Zhang, and Z. Yuan, “Role of thiol-containing polyethylene glycol (thiol-PEG) in the modification process of gold

nanoparticles (AuNPs): Stabilizer or coagulant?," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 404, pp. 223–229, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.jcis.2013.04.020.
[146] S. Rana, A. Bajaj, R. Mout, and V. M. Rotello, "Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, no. 2, pp. 200–216, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.addr.2011.08.006.
[147] Y. Lyu *et al.*, "The Interaction of Amines with Gold Nanoparticles," *Advanced Materials*, vol. 36, no. 10, p. 2211624, 2024, doi: 10.1002/adma.202211624.
[148] I. I. Marochkin and O. V. Dorofeeva, "Amide bond dissociation enthalpies: Effect of substitution on NC bond strength," *Computational and Theoretical Chemistry*, vol. 991, pp. 182–191, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.comptc.2012.04.018.
[149] Mradula, R. Raj, S. Devi, and S. Mishra, "Antibody-labeled Gold Nanoparticles Based Immunosensor for the Detection of Thyroxine Hormone," *ANAL. SCI.*, vol. 36, no. 7, pp. 799–806, Jul. 2020, doi: 10.2116/analsci.19P418.

Chapitre II

Recouvrement dynamique des nanoparticules d'or par la Concanavaline A

Chapitre 2

2. Recouvrement dynamique des nanoparticules d'or par la Concanavaline A

Comme cela a été exposé dans le chapitre 1, les NP peuvent être modifiées par des lectines pour en faire des biosenseurs. Cependant, un manque d'information concernant la caractérisation de ces derniers a été relevé, notamment par l'étude de la bibliographie telle qu'elle est exposée dans l'**article 1**. La première partie du travail expérimental de ce doctorat s'est focalisée sur le développement et la caractérisation fine d'un biosenseur. Il a notamment été question de la synthèse de ce dernier, afin de confirmer l'association de la ConA et des AuNP. La stabilité dans le temps en termes de taille (D_H) et de propriétés spectrales a également été abordée ainsi que la conservation d'activité de reconnaissance aux carbohydrates de la ConA à la suite de son ajout sur les AuNP.

Pour ce faire, des AuNP ont été synthétisées et caractérisées avant d'être modifiées par la lectine, ConA, pour former ce que nous définissons par la suite l'assemblage [AuNP-ConA]. Deux méthodes de développement ont été entreprises : une méthode reposant sur l'adsorption de la ConA sur les AuNP et une méthode reposant sur une modification chimique. Le complexe [AuNP-ConA] a finalement été obtenu *via* adsorption de la ConA, ce qui fait l'objet de **l'article 1**. Ce complexe a été étudié par de nombreuses méthodes de caractérisation telles que la spectroscopie UV-Visible (Shimadzu UV-3600), la DLS (Malvern ZetaSizer Ultra), la TEM (Philips CM20 avec une cathode LaB_6), la spectroscopie de fluorescence (Jasco FP-8300) et la mesure de l'anisotropie de fluorescence (Horiba Fluorolog FL-3 22). Des caractérisations utilisant l'AFM et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ont été conduites au sein de l'UMR 7564 Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME). Ces techniques ont été effectuées sous la supervision scientifique de Dr. Grégory Francius et Dr. Fabienne Quilès qui m'ont formée et encadrée pour chaque méthode respectivement, me rendant autonomes sur celles-ci. De plus, les résultats expérimentaux obtenus par ces méthodes ont également été confrontés à des résultats de simulation de DM. Ces travaux ont été conduits par le Dr. Fabien Picaud (Université Marie et Louis Pasteur) au sein de l'UR Soins Intégrés, Nanomédecine, IA & Ingénierie pour la Santé (SINERGIES). Certains de ces résultats sont présentés dans un article scientifique, d'autres

complémentaires à l'article sont situés dans la section *supporting information* associée à l'article et enfin certains se trouvent à la fin de ce chapitre.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*: **Sephora Lahouari**, Jérémie Gouyon, Grégory Francius, Fabien Picaud, Roberta Albino dos Reis, Amedea B. Seabra, Igor Clarot, Ariane Boudier, *Concanavalin A adsorption on gold nanoparticles: Influence of citrate ions on nanoparticle-protein interactions*. Des données annexes ne faisant pas partie de la publication sont présentées dans la deuxième partie de ce chapitre.

2.1. Article 1 : *Concanavalin A adsorption on gold nanoparticles: Influence of citrate ions on nanoparticle-protein interactions*

Accepté le 29 mai 2025 dans Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects.

Concanavalin A adsorption on gold nanoparticles: Influence of citrate ions on nanoparticle-protein interactions

Sephora Lahouari[a,b], Jérémie Gouyon[a,c], Grégory Francius[c], Fabien Picaud[d], Roberta Albino dos Reis[e], Amedea B. Seabra[e], Igor Clarot[a,b], Ariane Boudier[a,b,f*]

a: Université de Lorraine, CITHEFOR, F-54000 Nancy, France

b : Université de Lorraine, CNRS, LRGP, F-54000 Nancy, France

c : Université de Lorraine, CNRS, LCPME, F-54000 Nancy, France

d : Université Marie et Louis Pasteur, SINERGIES, F-25030 Besançon, France

e : Federal University of ABC, Center for Natural and Human Sciences, Santo andré 09210-580, SP, Brazil

f: Institut Universitaire de France

* Corresponding author : ariane.boudier@univ-lorraine.fr

Abstract

We report in this article a dynamic overcoating of a protein on gold nanoparticles (AuNP). By exploring in depth the experimental and theoretical aspects of the interactions between AuNPs, stabilized by a layer of sodium citrate (AuNP–cit), and a lectin, Concanavalin A (ConA), we highlighted a dynamic interaction between these two entities. Experiments (physicochemical characterization, fluorescence quenching of tryptophan residues of ConA, and atomic force microscopy in force mode) were run in parallel with a numerical approach using molecular dynamics (MD) to explain in detail the different aspects of the [AuNP–cit ConA] interactions. Our results were compared to the ones obtained using human serum albumin (HSA) and bare AuNP (without the sodium citrate coating) obtained *via* MD. The complex [AuNP–cit ConA] was of low energy non-covalent binding *via* electrostatic interactions (with ionic binding) and low affinity between the two partners. Additionally, ConA was not able to displace the sodium citrate corona from AuNP–cit, leading to an important electrostatic competition between the different species in the solvent. This phenomenon suggested that a dynamic overcoating of the sodium citrate corona of the AuNPs took place rather than a ligand exchange, in which sodium citrate is displaced from the surface of AuNPs, which is more classically described in the case of NP – protein interactions.

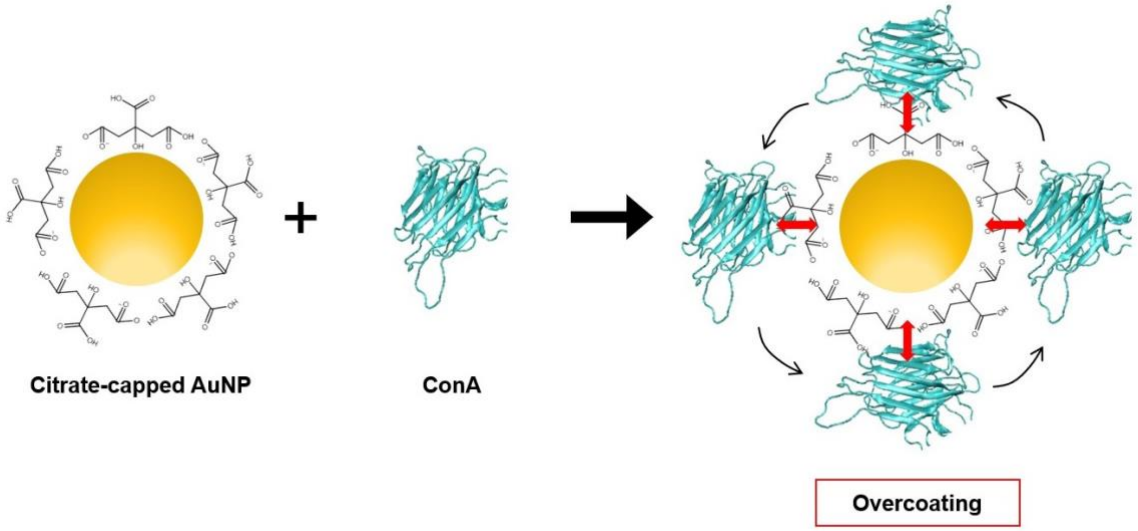
Keywords

Concanavalin A, gold nanoparticles, dynamic complex, low energy binding, molecular dynamics.

Highlights

- AuNP functionalized by Concanavalin A are prepared and characterized.
- Fluorescence quenching and Force Mode AFM showed high affinity and low interaction energy.
- Molecular Dynamics showed Concanavalin A cannot displace citrate ions of AuNP.

Graphical abstract



Introduction

Lectins are a class of proteins found in plants, mushrooms and animals, that can reversibly bind carbohydrates *via* hydrogen bonds and hydrophobic interactions[1]. Uses are reported for bacterial[2], [3] and cancer cells detection[4], [5]. Concanavalin A (ConA) is a lectin obtained after purification from the Jack Bean (*Canavalia ensiformis*) and is part of the legume lectin family, which is the most described and used in the literature. It is a homo-tetrameric protein bearing 4 recognition sites that specifically binds mannosyl and glucosyl residues[6]. Lectins are often coupled with nanoparticles (NP) to enable a wider range of detection methods and applications. The NP functionalized by lectins are already used in breast cancer bioimaging[4], [7] and bacteria detection[8], [9], [10] with very good detection thresholds, down to tens of colony forming unit (CFU) per milliliter [11]. In these studies, NP functionalization by lectin is performed either in an undirect[4], [7], [8] (*via* covalent binding using a spacer) or in a direct manner (direct incubation of lectin and NP) [9], [10], [12].

Interactions between NP and proteins have been extensively studied in the literature [13], [14], [15]. The protein corona, the phenomenon by which a NP is covered by proteins when incubated in a serum or a solution containing a purified protein, is fast (within seconds) and ruled by intricate equilibria, creating complexes *i.e.* [NP protein] [16]. These equilibria are often governed by low energy binding [17], [18], [19]. They can be modified in a dynamic manner depending on the presence and concentration of other proteins, the [NP protein] affinity or the NP surface chemistry [20], [21], [22]. All proteins are concerned by this phenomenon. One of the main phenomena taking place is the Vroman effect which is a continuous adsorption and desorption of plasma proteins on the surface of NP [23]. In this mechanism, the protein corona changes according to the abundance and the association kinetics of the different proteins in the medium. The NP properties strongly affect the protein corona. For example, the increase of AuNP size (from 5 to 100 nm) was shown to increase the protein binding constant [24]. The surface chemistry of NP is also responsible for the different behaviors and composition of the protein corona. In fact, charged surfaces of NP are reported to form more stable complexes with proteins compared to neutral charged NP [16]. Additionally, the isoelectric point (pI) of the protein is to be considered when describing the protein corona formation. Indeed, a protein with a pI lower than 5.5 may show higher affinity for positively charged NP, whereas a protein with a pI higher than 5.5 tends to prefer negatively charged NP [16].

Our study will specifically focus on gold nanoparticles (AuNPs) which are frequently used for lectin coupling, due to their plasmonic properties [4], [7], [8], [11], [12] among others. AuNPs

synthesis protocols, such as the Turkevich's one, require the use of sodium citrate. Sodium citrate provides the stabilization of the suspension through charge repulsion by creating a negatively-charged layer around the AuNPs, *i.e.* AuNP–cit [25]. The resulting sodium citrate corona is a key structure in the surface functionalization of AuNPs. It is currently accepted that, when adding a ligand to the NP, the sodium citrate corona will be modified. If sodium citrate molecules are displaced from the gold core to the medium by thiol groups for example, a ligand exchange occurs [26]. On the contrary, if the sodium citrate corona is covered by ligands containing, for example, amine groups at the surface of AuNP–cit, an overcoating takes place [27], [28]. Since proteins bear a great variety of functional groups it becomes more complex to interpret the mechanisms by which the NP–protein interactions occur. For instance, it was demonstrated that for Human Serum Albumin (HSA, a heart-shaped, globular protein with a pI of ~5 [29]), citrate ions were displaced by the protein and not overcoated, as proved by Surface–Enhanced Raman Scattering [27]. Our group previously showed that HSA has a strong affinity towards AuNP with an affinity constant of more than 10^{13}, involving H bonds and Van der Waals bindings [21]. However, the mechanisms behind the interaction of proteins and the discussions regarding citrate ions possibly being displaced (and how many) remain to be addressed. The displacement of sodium citrate ions finds its importance in discussions regarding NP design and stability. Indeed, modifying the surface of a NP directly influences the stability: either a stabilization of the NP takes place, which was the case in our previous work [21] or a subsequent aggregation is observed [25]. Many discussions in the literature focus on the citrate corona of AuNP, proving that the role of sodium citrate is not limited to a stabilizing agent of AuNP nor an actor to be exchanged to benefit to a ligand of better affinity [25], [30], [31], [32]. Therefore, diving into the behavior of the sodium citrate corona of AuNP in contact with proteins is extremely important to properly design and understand the behavior and fate of AuNP.

In this article, we studied the mechanisms of the interaction between AuNP–cit and ConA using two different experimental approaches: the study of the quenching of fluorescence of the tryptophan residues in ConA in presence of AuNP–cit and the study of the adhesion forces between AuNP–cit and ConA through atomic force microscopy (AFM) in force mode. These experimental approaches were compared to numerical results obtained by molecular dynamics (MD). The data were confronted to the ones obtained studying the interaction between HSA (from our previous work [21]) and AuNP-cit completed, in the present paper, by MD and AFM in force mode analyses. Performing these experiments with this new methodology allowed us to further solidify our previous findings as well as confirm and justify the use of HSA as a

reference. The behavior of the sodium citrate layer was analyzed by the comparison of the results obtained by MD using bare AuNP (bAuNP) *i.e.* AuNP without sodium citrate ions adsorbed at the surface of the gold core, *vs* AuNP–cit. The dynamics of the binding, the involved energy, and the possibility of sodium citrate displacement or overcoating were addressed.

Experimental section

Reagents and standards

All reagents were of analytical grade and used without further purification. ConA from *Canavalia ensiformis* (Jack bean) type IV lyophilized powder, HSA, sodium borohydride, sodium citrate, tetrachloroauric acid trihydrate ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$), H_3PO_4, chloroform, sodium hydroxide, ethanolamine, triethylamine, and sodium cyanoborohydrate were obtained from Sigma-Aldrich. KCl was purchased from Merck. NaCl and Dimethylsulfoxide (DMSO) were obtained from VWR. Na_2HPO_4, 12 H_2O was purchased from Carlo Erba. KH_2PO_4 was purchased from Labosi. Acetal-polyethyleneglycol–N–hydroxysuccinimide (Acetal–PEG–NHS) was purchased from Linz University (Austria). Phosphate buffer (PBS 0.148 M) was prepared by combining Na_2HPO_4 6.68 mM, KH_2PO_4 1.47 mM, NaCl 138.00 mM and KCl 2.67 mM. The final pH was adjusted to 7.4 with NaOH 0.1 M. Ultrapure deionized water (>18.2 MΩ cm) was used for the preparation of all solutions.

Gold nanoparticles synthesis

AuNP–cit were synthesized according to previous work [26]. Briefly, 90 mL of water was put under inert atmosphere (N_2) and stirred, 1 mL of $AuCl_4^-$ solution (10 mg/mL) was then added. A solution of 55 mM sodium citrate was added and 1 mL of $NaBH_4$ 19.5 mM was added after 1 min. The resulting colloidal suspension was kept under stirring for 5 min and then stored in the dark at 4°C. The molar concentration of AuNP–cit (expressed in NP and not in gold molar concentration [33]) was determined by Beer-Lambert's law.

$$A_{AuNPs} = \varepsilon_{AuNPs} \times l \times c_{AuNPs}$$

With ε_{AuNPs} the absorbance value of AuNPs previously determined to be 1.2×10^7 $M^{-1}.cm^{-1}$ (acquired at the Surface Plasmon Resonance (SPR) band) [33].

Incubation of ConA with AuNP-cit

[AuNP–cit ConA] were obtained by a direct incubation with AuNP–cit. The method was carried out by adding a solution of ConA in a citrate sodium solution of 1.53 mM, with AuNP–cit. [AuNP–cit ConA] was obtained at a molar ratio of 1:1, calculated through the determination of the molar concentration of AuNP–cit and the preparation of ConA solution, accordingly. For this ratio and in this study, the exact molar concentration was 30 nM for both components, which corresponds to 1.8×10^{13} NP/L. The suspension was kept in the dark at 4°C.

Physicochemical characterization

After synthesis, AuNP–cit and [AuNP–cit ConA] were characterized without any dilution step. A UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu UV-2600) was used to obtain spectra recordings and absorbance measurements. The hydrodynamic diameter (Dh) and zeta potential (ζ) measurements were carried out at 20°C using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments UK). Images from Transmission Electron Microscopy (TEM) were recorded using a Philips CM20 instrument with a LaB_6 cathode at 200 kV and with CF200–CU carbon covered copper grids. ImageJ software was used to determine AuNPs cores diameters (Dc). Atomic force microscopy (AFM) measurements were performed at room temperature on a Bioscope Resolve (Bruker) device using the Quantitative Nanomechanical Mapping (QNM) method. A Peakforce HIRS-SSB probe (Bruker) was used after thorough cleaning in piranha solution (H_2SO_4/H_2O_2 3/1). The experiments were conducted using a freshly cleaved mica surface on which the samples were deposited before being dried with nitrogen (5 x 100 µL). AFM allowed to obtain the AFM Diameter (Da) after data analysis. Aside from TEM and AFM force results, all the results are given as a mean of three measurements performed on three independent samples related to their standard deviation.

AFM force measurements

Cantilever functionalization

AFM force measurements were carried out using a Bruker MLCT cantilever (non-conductive, silicon nitride) and an ultra-flat silicon wafer from Tedpella. An amino-functionalization protocol was followed to functionalize the cantilevers [34], [35] with either ConA or HSA. Functionalization of AFM tips was carried out by washing the cantilevers in chloroform and ethanol before generating amino groups on the tip surface by immersing them overnight in a solution of ethanolamine hydrochloride in DMSO (3.3 g in 6 mL). The amino groups were reacted with the N–hydroxysuccinimide (NHS) ester function of 1 mg Acetal–PEG–NHS dissolved in 0.5 mL chloroform and triethylamine (30 µL). After washing the cantilevers in chloroform, the acetal groups were converted into aldehydes by immersing them in a 1 % citric acid solution for 10 min. To couple the proteins (ConA or HSA) on the cantilever tips, a 1 mg/mL solution in PBS was prepared and a 100 µL drop was used to cover the tip. A solution of 1 M sodium cyanoborohydride with 20 mM NaOH was prepared and 2 µL was added to the drop. After 1 h of incubation, 5 µL of a 1 M solution of ethanolamine (pH 8.0) was added to the drop and left to incubate for 10 min before washing and storing the cantilevers in PBS.

Force adhesion data processing

For each force measurement, a 5 x 5 µm² force map was recorded which corresponds to 32 x 32 points or 1024 curves, equating to 62.5 nm for one point. The curves were analyzed on the Nanoscope analysis software to highlight the adhesive events, which correspond to the interaction force between the protein (ConA or HSA) and the substrate (with D–mannose and AuNPs on the surface for ConA and strictly AuNPs for HSA).

The substrate was composed of silicon wafer. The wafer was thoroughly cleaned first in piranha solution (H_2SO_4/H_2O_2 3/1), rinsed with milli-Q water and dried under a nitrogen stream. Another wash in ethanol and drying with nitrogen is performed before washing once more in chloroform for 10 min and drying as mentioned. Lastly, the wafer was put in a UV-ozone cleaner (PSD UV4, Novascan Technologies Inc. Ames, IA) for 30 min. Deposition of D-mannose or AuNP on the wafer was conducted by depositing a 200 µL drop of the required solution on the surface and drying it with nitrogen. This deposition step was repeated 5 times. The statistical analysis of the curves was executed on all the detected peaks of each retraction curve as well as the intensity of the peak. A Kruskal-Wallis One Way Analysis Variance on Ranks was performed on SigmaPlot software to determine the significant differences between the different groups. The intensity of the peaks corresponds to the force needed to break the interaction between the protein and the substrate. The peaks are representative of the interaction between the protein and the substrate. 552 curves were analyzed for HSA–AuNP, 527 for HSA–SAM–NH_2, 178 for ConA–Mannose, 801 for ConA–AuNP and 242 for ConA–SAM–NH_2.

Fluorescence quenching study

The interaction between ConA and AuNP–cit was studied through a fluorescence quenching study performed at 20, 30, 40, 50 and 60 °C based on a previous work [21]. AuNP–cit acted as the quencher with varied concentrations (1, 2, 3 and 5 nM) while ConA concentration was kept constant (15 nM), greater than AuNP–cit and with a reasonable fluorescence signal to carry out the study. All the solutions were pre-incubated for one hour at the temperatures needed prior to mixing and measurements. After mixing AuNP–cit with ConA, the fluorescence intensity was recorded using a quartz cuvette from Hellma Analytics with a light path of 10 x 2 mm. A Jasco FP–8300 Spectrofluorometer equipped with a Xenon lamp and with a temperature-controlled chamber was used to perform the measurements. The parameters were set as follows: excitation wavelength = 280 ± 5 nm, emission wavelength = 340 ± 5 nm. The sensitivity was set on high. The basis of the protein fluorescence quenching value relies on the interaction of ConA with AuNP–cit according to the following equation (1):

$$\text{AuNP–cit} + \text{ConA} \xrightarrow{Ka} [\text{AuNP–cit ConA}] \quad (1)$$

With Ka representing the affinity constant.

The Stern-Volmer's equation was used to determine the fluorescence quenching mechanism (2):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}\,[\text{AuNP–cit}] \quad (2)$$

F_0 and F are the fluorescence intensities of ConA in the absence and presence of the quencher (AuNP–cit) respectively. K_{SV} represents the Stern-Volmer's quenching constant.

The affinity constant (Ka) as well as Hill's coefficient (n) can be calculated in the case of static quenching through the following equation (3):

$$\log\frac{F_0 - F}{F} = \log Ka + n\log[\text{AuNP–cit}] \quad (3)$$

The aforementioned constants were determined through the plotting of $\log\frac{F_0 - F}{F}$ against log[AuNP–cit]. The resulting curves allowed the determination of logKa through the slopes and intercepts respectively.

Van't Hoff's model was used to determine the entropy (ΔS) and enthalpy (ΔH) variations. These constants were determined by plotting lnKa as a function of $\frac{1}{T}$, with T being the temperature in K. The slopes and intercepts of the resulting curves represented $\frac{-\Delta H}{R}$ and $\frac{\Delta S}{R}$ respectively, with R as the universal gas constant equal to 8.314 $J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$.
Gibbs free energy (ΔG) was determined through the following equation (4):

$$\Delta G = - RT\ln Ka \qquad (4)$$

Statistical analysis was performed on R software version 4.4.2 (http://www.r-project.org 2025) using dunn.test package. Results were obtained by running a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn test with Bonferroni correction. Statistical significance was determined as a p value < 0.05.

Molecular dynamics study

Simulated systems

The two proteins were studied during our investigations (*i.e.* ConA and HSA). Their structure was obtained through the protein data bank internet library with ID 1I3H or 6M4R for ConA–dimannose or HSA, respectively. Before associating each protein with AuNP, we first equilibrated the protein in a water solvent with 0,15 M NaCl at room temperature for 25 ns. Mannose molecules were extracted from the 1I3H pdb structure.
bAuNP was built according to CHARMM–GUI procedure. The chosen model was an equilibrated structure composed of 887 Au atoms with a truncated octahedron shape [25]. Its maximum diameter was around 3 nm for a material volume of 18,5 nm^3 and the low index (111), (100) and (110) facets were all available for binding citrate molecules.
Citrate was modeled by bound and unbound interactions where parameter models were obtained through the SWISS-PARAM protocol [36], [37]. bAuNP was described only by nonbonded interactions using van der Waals (vdW) contributions for pair interaction with the other components of the systems.
To create the modelled AuNP–cit, citrate anions (fully deprotonated $C_6H_5O_7^{3-}$) were bound near the bAuNP (90 citrate molecules to respect a local concentrated layer around the NP as reported in[38], [39]). To keep the total system neutral, sodium ions were added to an amount of three Na^+ cations per citrate molecule. The resulting system was then minimized in vacuum. No restraint on gold atom was applied to allow it to move freely. Once optimized in vacuum, the AuNP–cit was released in a solvent bath made of water molecules (depicted in the TIP3P

framework) and ions (Na^+ and Cl^-) at 1 M plus supplementary Na^+ ions to compensate the citrate ion charges. Note that citrate ions were modeled in their fully deprotonated tri-anionic form (Cit^{3-}), following a well-established model previously reported in the literature [38], [39] and widely used in similar studies. This approach emphasizes the electrostatic interactions between citrate and the surfaces (protein and gold) and provides a consistent framework for comparative analysis. We acknowledge that at pH 5.5, citrate may exist in partially protonated forms, as shown in structural studies [25]. However, given the widespread use of the fully deprotonated model and its capacity to capture the dominant interaction features, we believe this representation remains appropriate for the scope of our study.

Simulation protocol

MD simulations for all systems are carried out using the NAMD 12 package[40] with explicit TIP3P water molecules and the CHARMM36 force field [41].

TIP3P water model remains consistent with the general force field depicting the protein behavior in solvent [42]. In these simulations, a 1 fs time step is employed to increment the time simulation. The cut–off distance applied to the vdW interactions was equal to 1.2 nm with a pair list distance of 1.3 nm. The temperature was set to 310 K in a Langevin piston scheme [43] and pressure was fixed at 1 bar using the Nose-Hoover Langevin piston control [44]. Periodic boundary conditions were applied in all dimensions. Full electrostatic interactions were performed using the Particle–Mesh–Ewald method [45].

Initial conformations for the MD simulations implying protein and bAuNP (or AuNP–cit) are obtained from docking

simulations performed in Hex package [46]. The best ranking positions were extracted from these simulations. To avoid a too high constraint simulation, we separated bAuNP (or AuNP–cit) from the protein by around 1 nm before running the MD simulations.

Each MD simulation was separated in three phases, *i.e.* one minimization stage lasting 3.8 ps, one equilibration stage for 1 ns and a final production stage for 200 ns, at least. The minimization stage was calibrated according to the total energy variation between each calculation step. The duration of the equilibration stage was set to 1 ns in order to let the system converge to the imposed temperature, pressure and density. As shown in Fig.S1, all these data tend to their targeted value before 1 ns or around 1 ns, explaining our choice for the system.

Different analyses were then produced to determine the stability variations of the protein when interacting with the different AuNP. For instance, we will extract and discuss the protein RMSD in order to obtain the average variations of the protein backbone positions during the

simulations (Eq.5). The total unbound pair interactions ($\Delta E_{A/B}$) (Eq.6) between the proteins and the AuNP (or ions) were also extracted to interpret the behavior of the AuNP around the simulated protein. From these data, ΔH will be calculated as defined below in Eq.7. To compare the simulations and the experimental data extracted from the AFM measurements, we also computed the total force between the AuNP and the protein during the simulations.

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N}\sum_{1}^{N}(r_i - r_0)^2} \quad (5)$$

Where r_i is the position at time t and r_0 is the reference position

$$\Delta E_{A/B} = E_{A/B} - E_A - E_B \quad (6)$$

With $E_{A/B}$, representing the pair interaction energy between A and B species and E_A (resp. E_B) is the interaction energy of the isolated system A (resp. B)

$$\Delta H = E_{complex/water} + \Delta E - E_{A/water} - E_{B/water} \quad (7)$$

Where $E_{complex/water}$ described the pair interaction energy between the formed complex (A+B) and the water molecules and $E_{A/water}$ (resp. $E_{B/water}$) is the interaction energy of the isolated system A (resp. B) with water molecules.

Results and discussion

Characterization of [AuNP–cit ConA] complex

MD was performed on bAuNP, AuNP–cit and the proteins, ConA and HSA. In parallel, AuNP–cit were synthesized and directly incubated with ConA. [AuNP–cit ConA] was prepared at a final molar ratio of 1:1 with a concentration of 30 nM each (1.8×10^{13} NP/L of AuNP). This 1:1 ratio came as the result of Dh and UV-visible spectra stability over 5 days, which was not observed with other ratios which had either higher concentration of AuNP or ConA (0.02:1; 0.2:1; 0.5:1; 0.6:1; 0.75:1; 1.5:1; 2:1; 4:1; 20:1; 40:1, ratios given for [AuNP-ConA], respectively). Meanwhile, the AuNP concentration in MD was equal to 1.6 mM. The formation of the AuNP-cit functionalized by ConA ([AuNP–cit ConA]) complex was first attempted using PBS as the medium. However, the presence of this buffer induced AuNPs aggregation. This aggregation happened as the result of a charge screening effect due to the increased ionic strength of the medium induced by the PBS buffer. The [AuNP–cit ConA] complex could not be formed in this medium and so, PBS was substituted by a sodium citrate solution (1.53 mM in water) which is the AuNPs synthesis medium. We followed through with this solvent as our study was not aimed at developing a biocompatible complex but rather to understand the effect of the presence of a protein on the surface of the AuNP at a fundamental level. This method allowed for the stabilization of AuNPs in presence of ConA. The characterization results are presented in Figure 1 and Table 1.

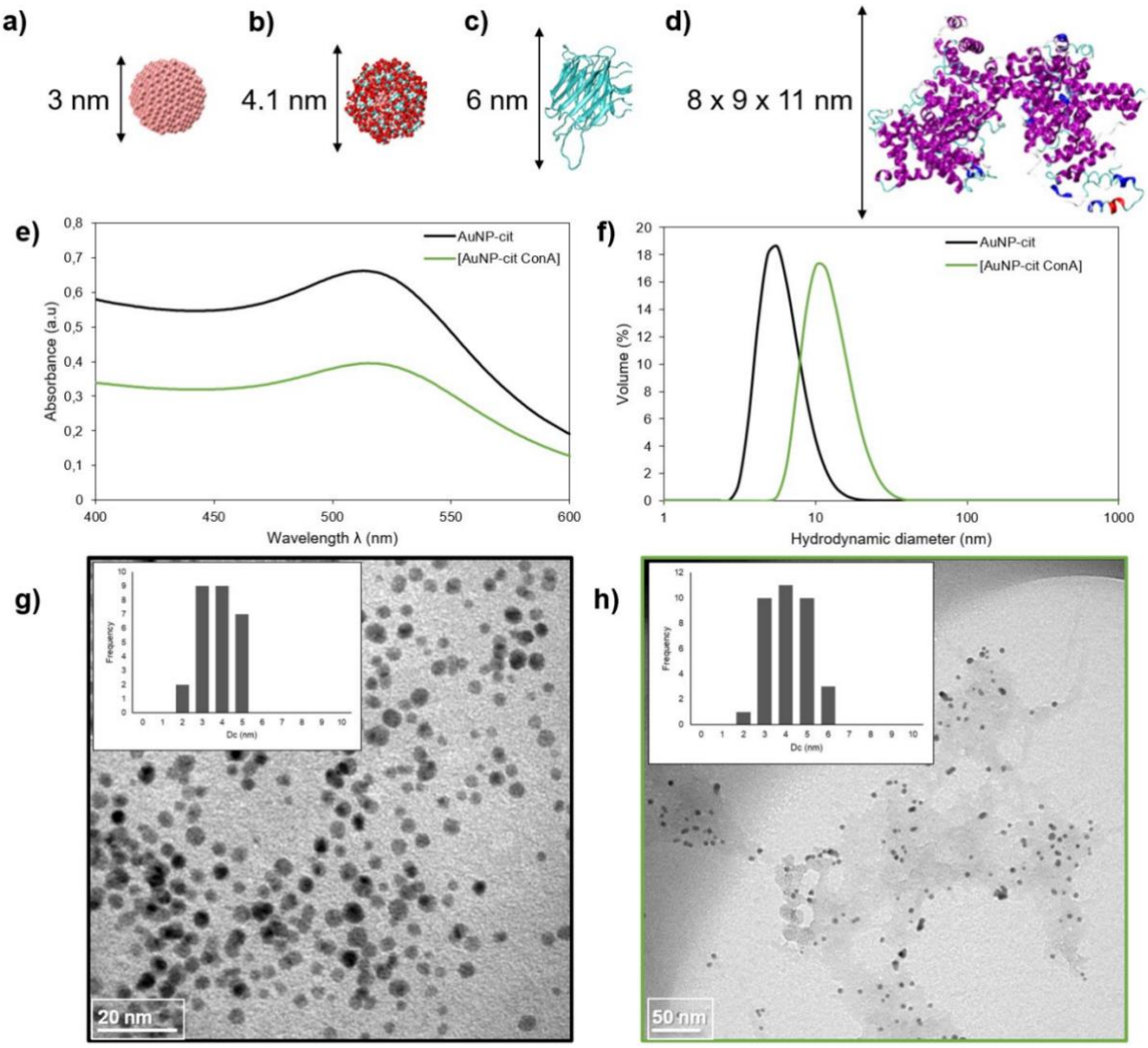


Figure 1. Visualization of the optimized structures obtained through MD simulations of a) bAuNP, b) AuNP–cit, c) ConA, and d) and HSA. Gold, oxygen, hydrogen, carbon and nitrogen atoms are depicted in pink, red, white, blue and dark blue balls, respectively. ConA and HSA proteins are shown in ribbons representation for simplicity. Physicochemical characterizations of AuNP–cit and [AuNP–cit ConA] using e) spectrophotometry, f) dynamic light scattering, g) TEM of AuNP–cit and size distribution (inserted graph) and h) TEM of [AuNP–cit ConA] and size distribution (inserted graph).

Table 1. Physicochemical characterization of [AuNP–cit ConA]. AuNP–cit 1:1 at 30 nM for each component, which translates to 1.8 x 10^{13} NP/L.

	λ_{max} (nm)	Absorbance (a.u.)	Dh (nm)	Dc (nm)	Da (nm)	Zeta potential (mV)
[AuNP–cit]	513 ± 1	0.674 ± 0.026	6.5 ± 0.4	3.4 ± 0.7	5.7 ± 1.9	-30.2 ± 9.1
[AuNP–cit ConA] 1:1	517 ± 1	0.393 ± 0.003	18.4 ± 2.4	4.0 ± 0.8	23.2 ± 3.1	-29.6 ± 4.7

The characterization of the different elements (bAuNP, AuNP–cit and the proteins, ConA and HSA) was performed using both numerical (MD simulations) and experimental techniques. To model bAuNP, 887 gold atoms were used (Figure 1 a)) and 90 citrate ions were adsorbed on the surface of the crystal [25] as explained in the Experimental section. Sodium cations were added in the solvated system in excess to compensate for the negative charge of the citrate ions (Figure 1 b)). All systems were relaxed in a solvent with [NaCl] 1 M and T = 37 °C. At the end of these preliminary simulations, the modelled bAuNP and AuNP–cit showed diameters of 3 and 4 nm, respectively, which was in accordance with the obtained experimental data (Figure 1 e), f) and g) and Table 1) and our previous work [21]. The size of ConA was almost the same as the AuNP while the one of HSA was twice the size of them as shown in Figure 1 c) and d), respectively. After the incubation with ConA, the AuNP–cit remained individualized without aggregation (Figure 1 e), f) and h)), which was proved by TEM and the visible spectra.

The dynamic light scattering (DLS) results provided a Dh value of 6.5 ± 0.4 nm for AuNP–cit, which was in accordance with our previously published results [47] and with the AuNP diameter from the AFM analysis Da (5.7 ± 1.9 nm) as shown in Figure 1 f) and Figure 2 a) and b). Additionally, DLS and AFM results highlighted the modification in the layers surrounding the metallic core of the NP due to ConA interaction, as demonstrated by the increase of both the plasmonic band (+ 4 nm), the Dh (+ 11.9 nm) and Da (+ 17.5 nm) (Figure 1 e) and f) and Figure 2 c). The increase in Dh after addition of a lectin to a NP is often seen and documented in the literature [9], [48], [49]. The characterization shows no significant difference after 5 days, results can be found in Table S2.

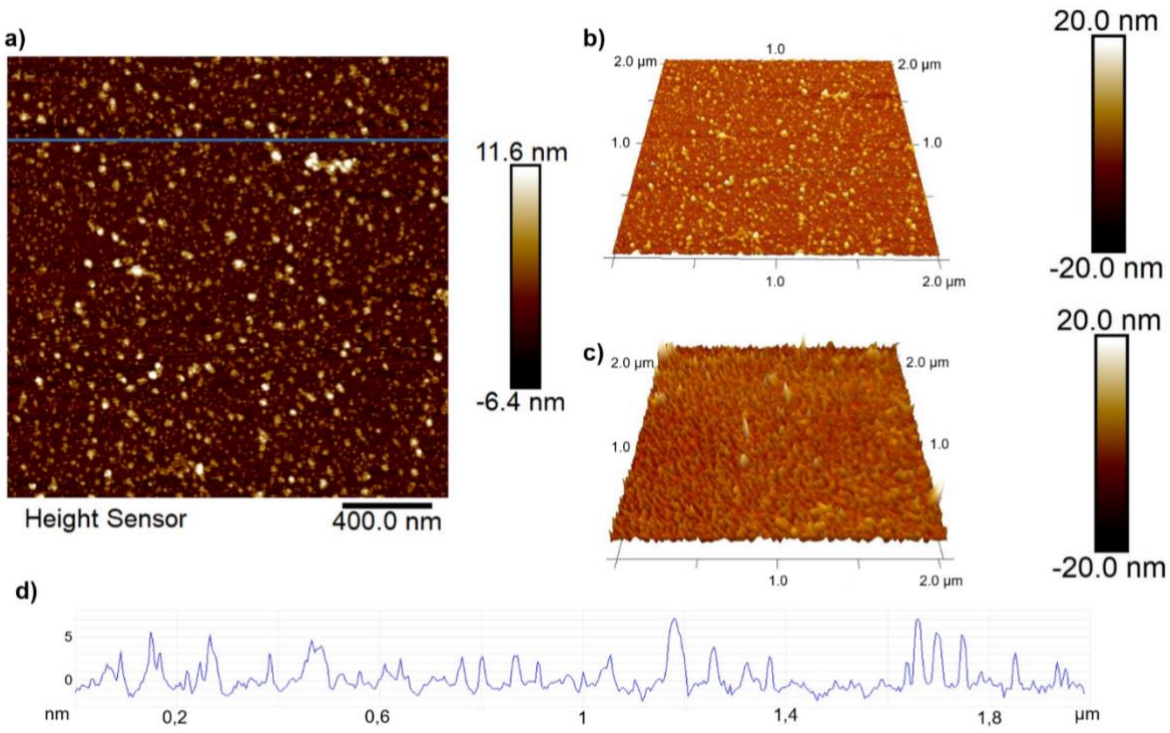


Figure 2. a) AFM recording of AuNP–cit (blue line shows the representative line section shown in d)) and 3D topography of [AuNP–cit] b) and [AuNP–ConA] c).

Dynamic interaction between AuNPs and ConA

The interactions between AuNP and ConA were studied using fluorescence quenching from the innate fluorescence of the 4 tryptophan residues in ConA and MD respectively. The results illustrated in Figure 3, Table 2, Figure S3, Movie S5, and S6 can be compared to the ones obtained when incubating AuNPs with HSA from our previous study [21] (see Figure 4, Movies S7, and S8.)

The incubation of AuNP–cit with ConA led to a significant decrease of its innate fluorescence in a concentration-dependent manner, proving that at least one of its four tryptophan residues was near the AuNP–cit (Figures 3 a) and b), and Table 2). No modification of emission wavelength value was noticed, demonstrating that there was no modification in the protein structure by AuNP–cit [50]. In a more mechanistical point–of–view, two kinds of quenching are described. A static one appears *via* the formation of a complex in which the quencher (AuNP–cit) is within a distance ranging between 10 to 100 Å from the tryptophan residue(s) of ConA and/or a dynamic or collisional quenching [51]. To study this, the experiment was run at different temperatures. Using the Stern–Volmer's equation, a good linearity was obtained, as shown by the R^2 values. The deduced K_{SV} values showed a decrease from 20 °C to 30 °C, proving that a static complex predominates whereas these values increased from 30 °C to 50 °C proving a modification of the quenching type: from a static one to a dynamic complex predominance [50]. This result was unexpected since our previous results measured with HSA showed that a static complex was created in interaction with AuNP–cit [21] whatever the temperature. However, we know that the interaction between NP and proteins highly depends on the NP (shape, core and surface chemistry) and the protein itself (pI, size, amino acid sequence).

MD was then performed on AuNP–cit and bAuNP, interacting with either ConA or HSA. For bAuNP, we observed a rapid adsorption of the NP on the ConA towards a stable site, demonstrated by a constant pair interaction energy between bAuNP and ConA and a constant distance between each center of mass (Figure 3 c) e) for T= 37 °C). This adsorption site belongs to an area of protein containing a tryptophan group. The presence of the AuNP would tend to reduce the displacement range of this group that could potentially explain the quenching observed in the fluorescence spectra. For AuNP–cit, the behavior is fundamentally different. Indeed, the AuNP–cit could not reach a stable configuration on a right place with ConA. It diffused around the protein, still remaining in its neighboring area. The evolution of the mean

pair interaction energy and the mean distance between the AuNP–cit and the protein with time (Figure 3 d) and f)) described well these first observations.

The protein stability was studied using the root medium square deviation of atomic positions (RMSD) analysis. As shown in Figure 3 e) and f), the RMSD values of the protein tend towards a stable value around 3.5 +/- 0.1 Å (for AuNP–cit and bAuNP). The RMSD appear to slightly fluctuate at the end of the simulation but remains in a narrow range of 3.0–3.3 Å during the final 80 ns of the simulation. Combined to the evolution of the total energy of the system which presents a small drift of 0,05% and the temperature, clearly stable over time simulation (see Figure 5 of the Supporting Information), we can conclude on the good stability of the whole system. Moreover, on its own, we found that the protein backbone is modified through a RMSD value equal to about 3.0 +/- 0.1 Å. This means that, even if they interact with the protein, the NP does not introduce important changes in the protein backbone compared to its usual solvent.

Table 2. Values obtained from the Stern Volmer model from fluorescence quenching.

Temperature (°C)	K_{SV} (.10^8 L/mol^{-1})	R^2	Association mode
60	6.15 ± 1.03	0.9738	Dynamic[52]
50	6.56 ± 1.45	0.8994	
40	4.95 ± 1.94	0.8674	
30	3.84 ± 1.60	0.9897	Static[52]
20	4.59 ± 1.84	0.9929	

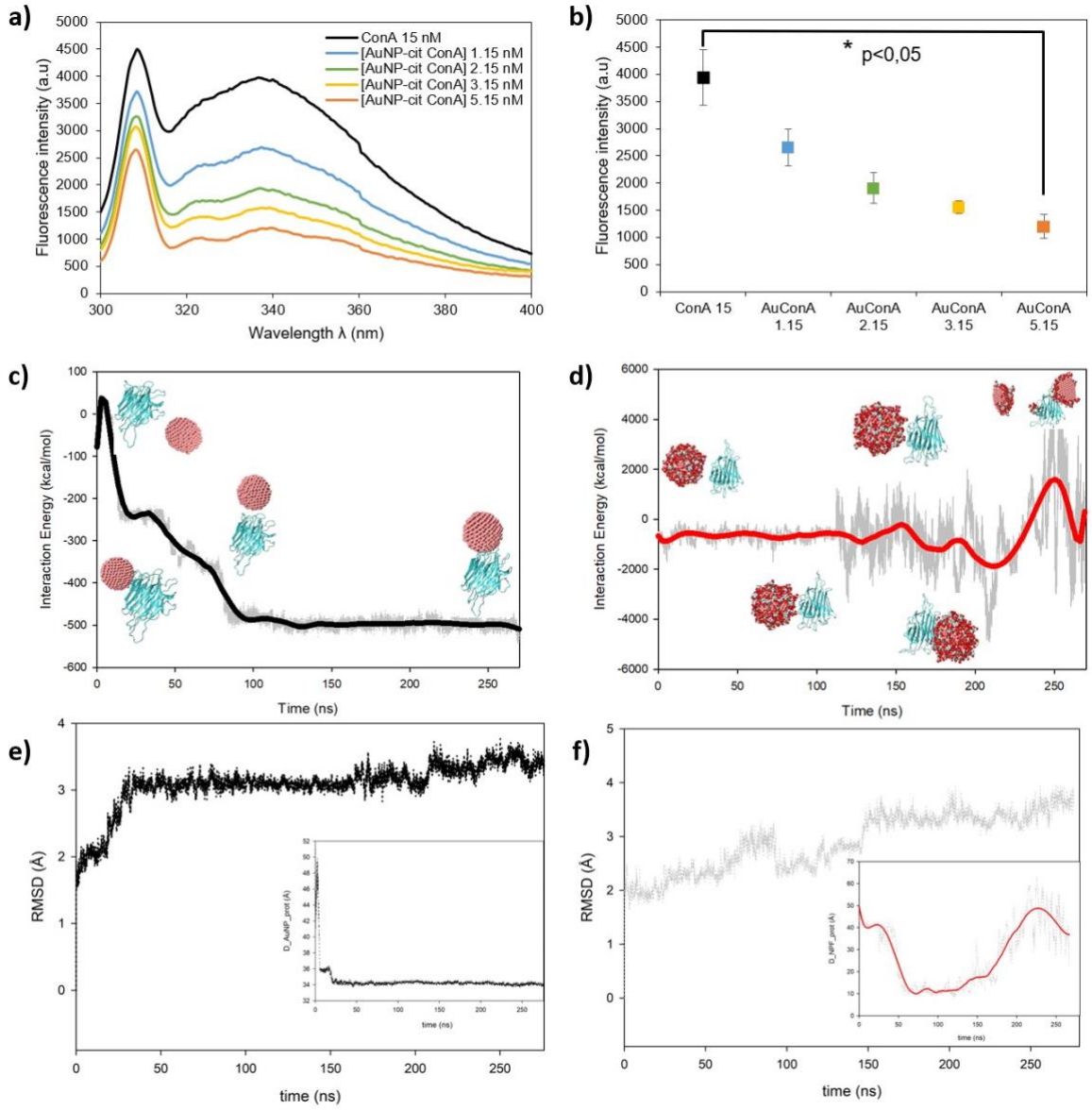


Figure 3. Data illustrating the interaction between AuNP–cit and ConA in a), b), d) and f) using fluorescence and MD or between bAuNP and ConA in c) and e) by MD a) Fluorescence spectra of ConA after incubation with different AuNP–cit concentrations at 20 °C; b) plot of the value of fluorescence intensity of ConA at 340 nm at 20 °C as a function of the concentration of AuNP expressed as a mean of 3 measurements with their standard deviation a). Total unbonded pair interactions c) $\Delta \boldsymbol{E_{bAuNP/ConA}}$ between bAuNP and ConA and d) $\Delta \boldsymbol{E_{AuNP-cit/ConA}}$ between AuNP–cit and ConA at T= 37 °C. Snapshots in Figure 3 c) and 3 d) show the positions of the NP at different simulation time from Movies S4 and S5. RMSD of the protein and mean distance (inserted graph) between e) the mass centers of the bAuNP and the protein; and f) the mass centers of the AuNP–cit and the protein, as a function of time.

The same simulations were carried out on HSA at T= 37 °C for bAuNP and AuNP–cit. In these two cases, we observed the same behavior for the two kinds of NP (bAuNP and AuNP–cit). After a rapid diffusion inside the solvent, the NP found a stable adsorption site where it stayed for the rest of the simulations. Figure 4 illustrates these conclusions with a constant pair

interaction energy obtained after 300 ns for bAuNP (200 ns for AuNP–cit). The RMSD of the HSA did not show further variations after these simulation times (as such as the distance between the centers of mass of the protein and the NP). These simulations revealed an entirely different behavior of the same NP toward different kinds of proteins. Our results obtained here for ConA, appear thus in opposition to what was described in another work in which authors proved a static complex between silver NP and jacalin lectin (extracted from *Artocarpus integrifolia*) as for HSA here [9]. However, the dual behavior of the AuNP–cit towards ConA has already been observed for titanium oxide NP with bovine serum albumin and lysozyme for which both a static and a dynamic complex were co–existing [53].

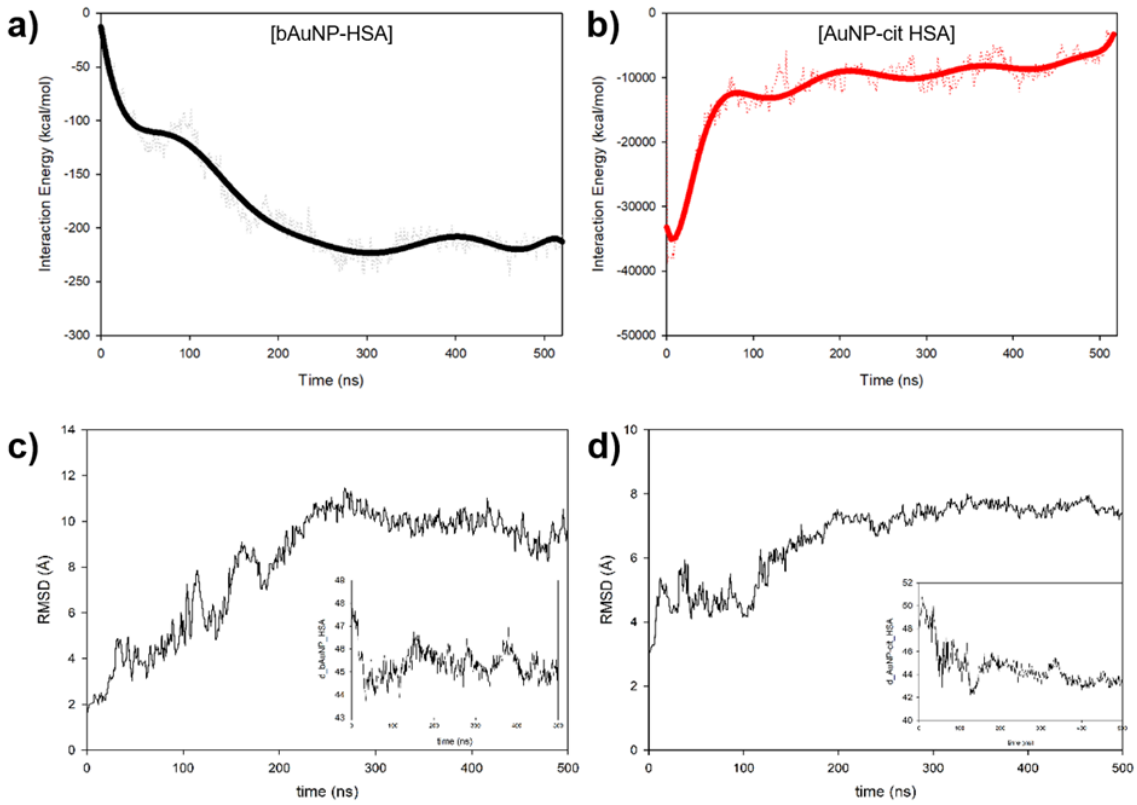


Figure 4. Total unbonded pair interactions a) $\Delta E_{bAuNP/HSA}$ between bAuNP and HSA and b) $\Delta E_{bAuNP/HSA}$ between AuNP–cit and HSA at T= 37 °C. RMSD of the HSA protein (c and d) and mean distance (inserted graph) between c) the mass centers of the bAuNP and the protein; and d) the mass centers of the AuNP–cit and the protein, as a function of time.

Interaction *via* low–energy binding

To go further, the thermodynamic parameters were calculated from fluorescence quenching using Eq 4, Van't Hoff's model and MD simulations. The results are presented in Table 3 for ConA and Table 4 for HSA.

Table 3. Thermodynamic parameters obtained by calculation based on either fluorescence quenching data or on MD, on AuNPs (functionalized or not) interacting with ConA.

	AuNP–cit					bAuNP
	Fluorescence quenching				MD	MD
Temperature (°C)	Ka	ΔG (kJ.mol^{-1})	ΔH (kJ.mol^{-1})	ΔS (J.K^{-1}.mol^{-1})	ΔH (kJ.mol^{-1})	ΔH (kJ.mol^{-1})
60	$8.04.10^6$	- 44				
50	$2.94.10^8$	- 52				
40	$3.34.10^8$	- 51	- 32	50	- 15500 ± 5000	- 1400 ± 200
30	$8.26.10^6$	- 40				
20	$3.54.10^8$	- 48				

The interaction with AuNP–cit was spontaneous for both proteins as shown by the negative value of ΔG. The affinity constant Ka of [AuNP–cit ConA](3.5 x 10^8 at 20 °C) was 10^5 less fold than the one obtained for [AuNP–cit HSA] (1.8 x 10^{13}) [21]. From the values of ΔH and ΔS, it was concluded that ionic bonds were involved in [AuNP-ConA] formation as per [52]. To confirm this, [AuNP–cit ConA] was incubated in presence of high concentrations of NaCl and the fluorescence emission spectra were recorded (Figure 5 a)). Interestingly, in the presence of a high concentration of salt, the complex seemed partially dissociated. Indeed, the fluorescence intensity of ConA was not as quenched as when incubated without NaCl. The ionic bonds contribution was therefore confirmed. This result was in opposition to what was previously obtained with other AuNPs and lectin from *Eranthis hyemalis* (EHL)[12]. In their work, the interaction of AuNP–cit by EHL was strong enough not to be destabilized by the addition of 200 mL of NaCl 2M. It should be noted, however, that this study managed to stabilize AuNP with a molar ratio not equal to 1:1 but with a high concentration in EHL. Nonetheless, the AuNP in this study possess a Dh of 18.8 nm whereas our present study uses smaller AuNP of 6.5 nm. While the difference in size of AuNP must play a role in the association dynamics between AuNP and EHL or ConA, this reference is interesting to mention as very little studies focus on the binding mechanisms between AuNP and lectins. In MD simulations, the calculations of the ΔH for bAuNP did not show differences between HSA and ConA. However, when AuNP–cit is taken into consideration, we observed negative values and

a ratio of 5 between the two ΔH in favor of HSA. The interaction of AuNP–cit with ConA was weaker than the one with HSA with a 6-fold when extracted from fluorescence quenching data. These values are relatively close and reproduce qualitatively the general behavior of the AuNPs with the proteins. The presence of citrate ions and sodium counter ions that increase the global electrostatic contribution to the energy seems to be at the origin of these differences.

Table 4. Thermodynamic parameters obtained by calculation based on either fluorescence quenching data or on MD, on AuNPs (functionalized or not) interacting with HSA.

	AuNP–cit				bAuNP
	Fluorescence quenching			MD	MD
Ka*$	ΔG ($kJ.mol^{-1}$)*$	ΔH ($kJ.mol^{-1}$)*$	ΔS ($J.K^{-1}.mol^{-1}$)*$	ΔH ($kJ.mol^{-1}$)	ΔH ($kJ.mol^{-1}$)
$1.8.10^{13}$	- 65	- 200	- 432	- 79000 ± 4600	- 800 ± 280

*Values obtained from fluorescence quenching data from.[21].$ Value given at 37 °C

To further confirm these results, AFM in force mode was carried out to quantify the adhesion forces between ConA or HSA and AuNPs. For this, an AFM cantilever tip was functionalized with ConA or HSA to probe interactions on a gold amine self-assembled monolayer (SAM_NH_2) which surface was modified according to different conditions (AuNPs or D-mannose deposition). Force curves were recorded first between the ConA-modified tips and SAM_NH_2 with a mannose deposition to confirm that ConA retained its carbohydrate-binding activity. The analysis of the force curves showed an adhesion value of 0.5 nN for the interaction of ConA and mannose and a value of 0.25 nN for ConA and the SAM–NH_2 surface. Interestingly, the adhesion value for the ConA tip on an AuNP–modified SAM–NH_2 surface was lower than both previous conditions at 0.1 nN. When comparing with the same surface but with a HSA functionalized AFM cantilever tip, we obtained a 90 times more important adhesion value of 9 nN. These new original data were also estimated by MD simulations by which the mean interaction forces between the protein (HSA or ConA) and the AuNP–cit were calculated. We found in these different cases, values ranging of 49 ± 5 nN for HSA with AuNP–cit compared to 8 ± 0 nN for ConA with AuNP–cit, *i.e.*, a factor of 6.3 between the two proteins. These computational data confirmed once again our results. While the systems (experimental and modelling) are not strictly the same ones, we can, however, observe, for both, a strong tendency toward a stronger interaction between the AuNP–cit and HSA compared to the one

obtained for AuNP–cit and ConA. This has been demonstrated with an enthalpy ratio that clearly shows preference for HSA and with the adhesion force ratio, that confirms this result. Note also that growth orders are well respected between experiment and simulations, especially for the adhesion forces that remain very challenging to compute precisely for comparison with experiments due to complexity in experimental setups. In experiments, measurements have been performed between a protein and a surface of AuNP while in simulation, only one protein and one NP have been considered. Nevertheless, the tendency and order of magnitude remain satisfying.

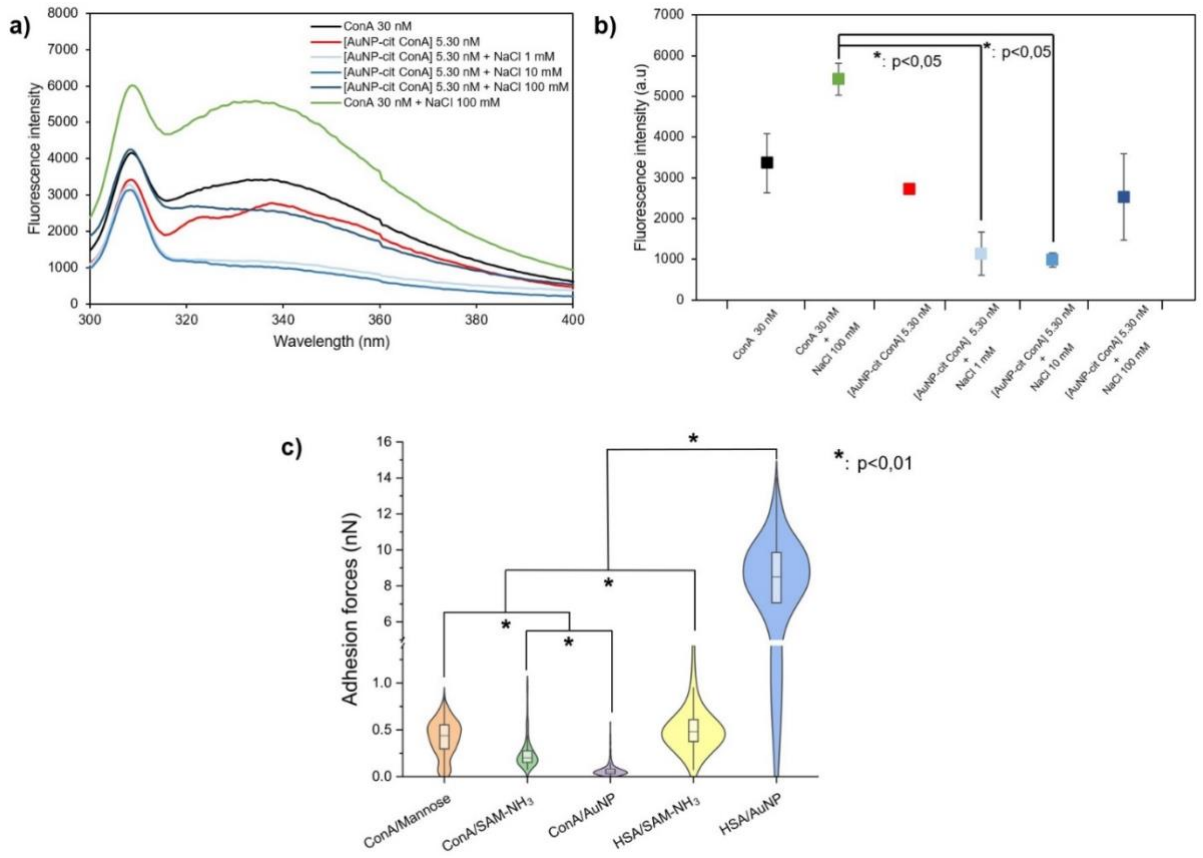


Figure 5. a,b) Experimental data representing the low energy, non-covalent interactions of [AuNP–cit ConA] by showing the emission spectra of fluorescence in presence or absence of NaCl to confirm the presence of ionic bonds and c) violin plot showing the adhesion force values obtained in AFM force mode for [AuNP–cit ConA] and [AuNP–cit HSA]. A Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks test was performed with * representing $p < 0.001$.

ConA can displace neither citrate anions nor sodium cations from the surface of AuNP–cit

Lastly, we tried to understand even further the mechanisms occurring at the surface of the AuNPs. Depending on the type of protein submitted to AuNP–cit, we observed different behaviors during the MD simulations. Indeed, as shown in Movies S5 and S6, we can conclude that no citrate ion left AuNP–cit surface during its interaction with ConA, while several ones are liberated from the AuNP–cit when it approaches the HSA. This allows the HSA to adsorb on AuNP–cit on a specific place while it was not possible when the AuNP–cit interacted with ConA. These observations are demonstrated by plotting in Figure 6 a) the distribution of sodium and citrate ions around the proteins. From this graph, we can deduce several information on the direct surrounding of the AuNP-cit. First, as it can be expected, the number of sodium ions is about 3 times larger than the number of citrate ions in order to modulate the global charges around the AuNP–cit. Second, by comparing the ions number between the ConA vs. HSA systems, we clearly show that the number of ions is decreasing slightly when AuNP–cit is interacting with HSA compared to its interaction with ConA (full curve remains higher than dashed ones).

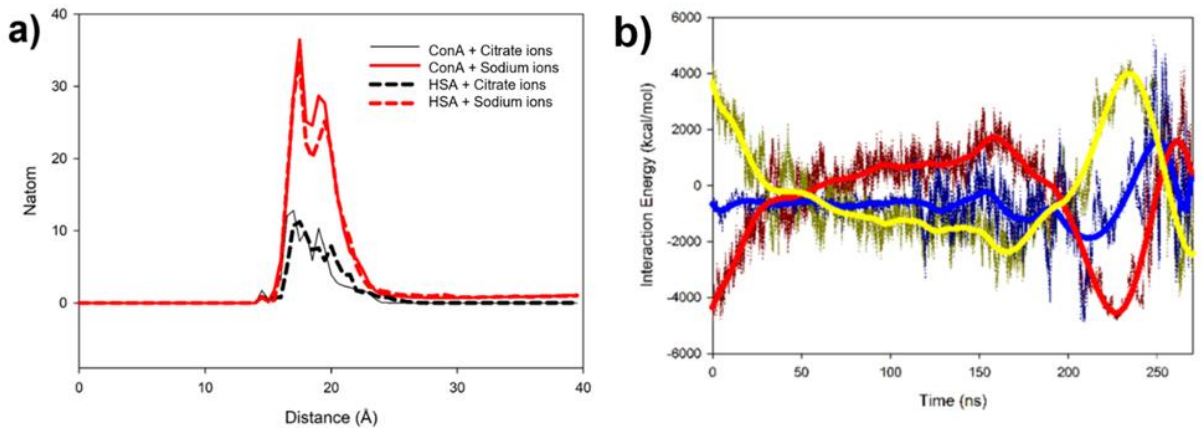


Figure 6. a) Distribution number of sodium (red) and citrate (black) ions as a function of the distance from the center of mass of the AuNP–cit. Full curves have been computed for ConA proteins while dotted ones are for HSA. b) Pair interaction energy between sodium ions and ConA (yellow curves); AuNP–cit and ConA (red curves) and AuNP–cit surrounded by its sodium ions and ConA (blue curves) at T= 37 °C.

This modification of behavior is also clearly highlighted in Tables 3 and 4. bAuNP was adsorbed on both proteins with the same enthalpy energy (for which only gold atoms interacted with the proteins), while the modification of the AuNP by sodium citrate creates a major imbalance when comparing the interactions of the AuNP–cit with the 2 proteins. This situation is not easy to understand, as the proteins are globally negatively charged (-7 for ConA and -28 for HSA at pH 5). We would even have expected to observe the opposite situation: a repulsive tendency for HSA under these conditions. But the surface modification of AuNP–cit (departure of citrate and sodium ions) and its specific interaction on a given area of HSA changes these interpretations. When we look at the contact zones between AuNP–cit and HSA (over 10 Å² around the contact), the total charge carried by AuNP–cit in this zone is +5, while that proposed by HSA in the same zone is -7. We can therefore see that there is a significant electrostatic affinity in this precise zone between the protein and AuNP–cit freed from these few surface ions.

For ConA, this is made much more difficult by the fact that the size of ConA and AuNP–cit are almost equivalent. This makes it more difficult for AuNP–cit to meet an attractive area of the protein if no surface ions are removed.

Based on these initial findings, it is fair to assume that ionic interactions are responsible for this difference in behavior. To prove this, we plotted in Figure 6 b) the interaction energies between sodium ions in solution and ConA (or between AuNP–cit and ConA) at 37 °C. We then obtained a curve corresponding to the interaction energies of AuNP–cit surrounded by its sodium counterions. Although no specific adsorption was seen, at 37°C, thermal agitation makes the diffusion of sodium ions much more significant. This diffusion disturbs the direct environment of the AuNP–cit, itself surrounded by static sodium ions, through electrostatic repulsion. The result fluctuations that are almost symmetrical between the direct interaction of the NP with the protein (red curve) and those caused by sodium ions (yellow and blue curves). These fluctuations alternate between moments for which the interaction becomes favorable (attractive) and moments when the interaction is unfavorable (repulsive). This was not observed with HSA where the protein liberated citrate and sodium ions as soon as it approached the protein to adsorb it. ConA is thus not able to displace the sodium citrate corona from AuNP–cit, suggesting a dynamic overcoating of the sodium citrate corona of the AuNPs. Once more, these findings are in accordance with the ones from our experimental data as we are able to draw the same conclusions.

Conclusions

To sum up, this work helped to understand the mechanism of the interaction between ConA and AuNPs. NP–protein interactions are well-documented in the literature and many discussions regarding the fate of the citrate capping layer of AuNPs can be found. Studying an environment that contains both NP and proteins is particularly challenging. This study highlighted, through experimental and theoretical methods, that a dynamic interaction occurs between AuNP–cit and ConA. The nature of these interactions was also determined to be non-covalent and of low energy through electrostatic bonds, with confirmation of ionic bonds, and with a low affinity between the two partners of the complex. These low energy non-covalent bonds were confirmed through AFM in force mode which allowed for the quantification of these interactions, confirming once more the previously obtained results. MD simulations further validated the experimental results and provided more information regarding the behavior of the [AuNP–cit ConA] complex according to the presence of sodium counter ions. Through all these experiments, we concluded that ConA is not able to displace the sodium citrate corona from AuNP–cit which rather suggests a dynamic overcoating of the sodium citrate corona of the AuNPs. Further work on the impact of environmental factors (*i.e.* the different components of the medium, different media, etc.), the protein hydrophobicity, structure and flexibility will be able to enrich our findings and provide an overall better understanding of the binding mechanism of a protein to a NP. The strength of this study relies on the complementarity of the methods used. These three methods support the originality of this work as they are performed to investigate the behavior of proteins on top of AuNP as opposed to molecules or ligands. Moreover, all the collected data from the experimental physicochemical characterization, fluorescence quenching, AFM in force mode and from the theoretical chemistry *via* MD were consistent and converged towards the same conclusions.

Author contributions

Sephora Lahouari: Writing – original draft, Data curation, Formal analysis, Investigation, Validation. **Jérémie Gouyon:** Conceptualization, Supervision, Investigation, Validation, Methodology, Writing – review & editing. **Grégory Francius:** Data curation, Formal analysis, Writing – review & editing. **Fabien Picaud:** Data curation, Formal analysis, Writing – review & editing. **Roberta Albino dos Reis:** Data curation, Writing – review & editing. **Amedea B. Seabra:** Writing – review & editing. **Igor Clarot:** Writing – review & editing. **Ariane Boudier**: Writing – original draft, Supervision, Funding acquisition, Project administration, Conceptualization, Methodology, Investigation, Validation.

All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Data availability

Data will be made available on request

Acknowledgements

The authors would like to thank COFECUB/CAPES program (Ph-C983/23, 49445SA, 88881.711920/2022−01), ANR NanoBioID (ANR-22-CE09-001) and IUF for funding. ABS and RAR thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Capes, Brazil) – Finance Code 001 and Capes 88881.711920/2022−01. Support from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, grant no. 313117/2019–5), São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil, grant no. 2023/16363-7 and grants no 2022/14645-2; 2024/12112-2).The authors thank the Spectroscopy and Microscopy Service Facility (SMI) of LCPME (www.lcpme.ul.cnrs.fr/equipements/smi/) where AFM experiments were performed. Computations have been performed on the supercomputer facilities of the *Mésocentre de calculs de Franche-Comté*. The authors acknowledge also the national Jean Zay supercomputer for its access to the HPC ressources under the allocation AD010713746R1.

References

[1] N. Sharon, "Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 18, no. 6, pp. 221–226, Jun. 1993, doi: 10.1016/0968-0004(93)90193-Q.

[2] A. Rahman, S. Kang, W. Wang, Q. Huang, and I. Kim, "Lectin-Modified Bacterial Cellulose Nanocrystals Decorated with Au Nanoparticles for Selective Detection of Bacteria Using SERS Coupled with Machine Learning," *ACS Appl. Nano Mater.*, vol. 5, no. 1, pp. 259–268, Jan. 2022, doi: 10.1021/acsanm.1c02760.

[3] F. Mi, M. Guan, C. Hu, F. Peng, S. Sun, and X. Wang, "Application of lectin-based biosensor technology in the detection of foodborne pathogenic bacteria: a review," *Analyst*, vol. 146, no. 2, pp. 429–443, 2021, doi: 10.1039/D0AN01459A.

[4] S. Jafarzadeh, N. Bargahi, H. B. Shamloo, and J. Soleymani, "Concanavalin A-conjugated gold nanoparticle/silica quantum dot (AuNPs/SiQDs-Con A)-based platform as a fluorescent nanoprobe for the bioimaging of glycan-positive cancer cells," *RSC Adv*, vol. 12, no. 14, pp. 8492–8501, Mar. 2022, doi: 10.1039/d2ra00035k.

[5] G. Obaid, I. Chambrier, M. J. Cook, and D. A. Russell, "Cancer targeting with biomolecules: a comparative study of photodynamic therapy efficacy using antibody or lectin conjugated phthalocyanine-PEG gold nanoparticles," *Photochem Photobiol Sci*, vol. 14, no. 4, pp. 737–747, Apr. 2015, doi: 10.1039/c4pp00312h.

[6] K. D. Hardman, R. C. Agarwal, and M. J. Freiser, "Manganese and calcium binding sites of concanavalin A," *Journal of Molecular Biology*, vol. 157, no. 1, pp. 69–86, May 1982, doi: 10.1016/0022-2836(82)90513-7.

[7] H. B. Shamloo, S. Jafarzadeh, A. Jouyban, and J. Soleymani, "Synthesis and application of concanavalin A-conjugated green luminescent gold nanoparticle/fluorescent polydopamine nanoparticles for specific differentiation of cancer cells from normal cells using glycan bioreceptors," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 288, p. 126344, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.matchemphys.2022.126344.

[8] J. Gao, C. Liu, D. Liu, Z. Wang, and S. Dong, "Antibody microarray-based strategies for detection of bacteria by lectin-conjugated gold nanoparticle probes," *Talanta*, vol. 81, no. 4–5, pp. 1816–1820, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.talanta.2010.03.052.

[9] S. B. Subramaniyan, S. Megarajan, K. S. Dharshini, and A. Veerappan, "Artocarpus integrifolia seed lectin enhances membrane damage, oxidative stress and biofilm inhibition activity of silver nanoparticles against Staphylococcus aureus," *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 624, p. 126842, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.colsurfa.2021.126842.

[10] Q. G. Gyurjyan, M. V. Mikaelyan, G. G. Poghosyan, V. A. Hovhannisyan, and V. K. Gasparyan, "Detection of Saccharomyces cerevisiae by silver nanoparticles sensitized with various lectins," *Anal. Methods*, vol. 12, no. 27, pp. 3508–3512, Jul. 2020, doi: 10.1039/D0AY00614A.

[11] H. Kearns, R. Goodacre, L. E. Jamieson, D. Graham, and K. Faulds, “SERS Detection of Multiple Antimicrobial-Resistant Pathogens Using Nanosensors,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 23, pp. 12666–12673, Dec. 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.7b02653.

[12] J. Djafari *et al.*, “Synthesis of Gold Functionalised Nanoparticles with the Eranthis hyemalis Lectin and Preliminary Toxicological Studies on Caenorhabditis elegans,” *Materials*, vol. 11, no. 8, Art. no. 8, Aug. 2018, doi: 10.3390/ma11081363.

[13] K. Kadu, G. Ghosh, L. Panicker, M. Kowshik, and S. Roy Ramanan, “Role of surface charges on interaction of rod-shaped magnetic hydroxyapatite nanoparticles with protein,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 177, pp. 362–369, May 2019, doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.02.021.

[14] B. Yuan *et al.*, “Interactions between TiO2 nanoparticles and plant proteins: Role of hydrogen bonding,” *Food Hydrocolloids*, vol. 124, p. 107302, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.107302.

[15] G. Viola *et al.*, “New Paradigm for Nano–Bio Interactions: Multimolecular Assembly of a Prototypical Disordered Protein with Ultrasmall Nanoparticles,” *Nano Lett.*, vol. 22, no. 22, pp. 8875–8882, Nov. 2022, doi: 10.1021/acs.nanolett.2c02902.

[16] S. M. Ahsan, C. M. Rao, and Md. F. Ahmad, “Nanoparticle-Protein Interaction: The Significance and Role of Protein Corona,” in *Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles*, vol. 1048, Q. Saquib, M. Faisal, A. A. Al-Khedhairy, and A. A. Alatar, Eds., in Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 1048. , Cham: Springer International Publishing, 2018, pp. 175–198. doi: 10.1007/978-3-319-72041-8_11.

[17] S. H. Brewer, W. R. Glomm, M. C. Johnson, M. K. Knag, and S. Franzen, “Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces,” *Langmuir*, vol. 21, no. 20, pp. 9303–9307, Sep. 2005, doi: 10.1021/la050588t.

[18] K. Giri *et al.*, “Understanding Protein–Nanoparticle Interaction: A New Gateway to Disease Therapeutics,” *Bioconjugate Chem.*, vol. 25, no. 6, pp. 1078–1090, Jun. 2014, doi: 10.1021/bc500084f.

[19] S. R. Saptarshi, A. Duschl, and A. L. Lopata, “Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle,” *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 11, no. 1, p. 26, Jul. 2013, doi: 10.1186/1477-3155-11-26.

[20] M. P. Monopoli, C. Åberg, A. Salvati, and K. A. Dawson, “Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials,” *Nature Nanotech*, vol. 7, no. 12, pp. 779–786, Dec. 2012, doi: 10.1038/nnano.2012.207.

[21] J. Beurton, P. Lavalle, A. Pallotta, T. Chaigneau, I. Clarot, and A. Boudier, “Design of surface ligands for blood compatible gold nanoparticles: Effect of charge and binding energy,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 580, p. 119244, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119244.

[22] A. Umerska, A. Sapin-Minet, M. Parent, L. Tajber, P. Maincent, and A. Boudier, "Understanding the Thermodynamic Mechanisms Leading to the Binding of Albumin to Lipid Nanocapsules," *Langmuir*, vol. 36, no. 15, pp. 4165–4173, Apr. 2020, doi: 10.1021/acs.langmuir.9b03147.

[23] L. Vroman and A. L. Adams, "Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces," *Surface Science*, vol. 16, pp. 438–446, Aug. 1969, doi: 10.1016/0039-6028(69)90037-5.

[24] S. H. D. P. Lacerda *et al.*, "Interaction of Gold Nanoparticles with Common Human Blood Proteins," *ACS Nano*, vol. 4, no. 1, pp. 365–379, Jan. 2010, doi: 10.1021/nn9011187.

[25] J.-W. Park and J. S. Shumaker-Parry, "Structural Study of Citrate Layers on Gold Nanoparticles: Role of Intermolecular Interactions in Stabilizing Nanoparticles," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 5, pp. 1907–1921, Feb. 2014, doi: 10.1021/ja4097384.

[26] J. Tournebize, A. Boudier, A. Sapin-Minet, P. Maincent, P. Leroy, and R. Schneider, "Role of Gold Nanoparticles Capping Density on Stability and Surface Reactivity to Design Drug Delivery Platforms," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 4, no. 11, pp. 5790–5799, Nov. 2012, doi: 10.1021/am3012752.

[27] H. Wei *et al.*, "Real-Time Monitoring of Ligand Exchange Kinetics on Gold Nanoparticle Surfaces Enabled by Hot Spot-Normalized Surface-Enhanced Raman Scattering," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 53, no. 2, pp. 575–585, Jan. 2019, doi: 10.1021/acs.est.8b03144.

[28] H. Wang and H. Wei, "Controlled Citrate Oxidation on Gold Nanoparticle Surfaces for Improved Surface-Enhanced Raman Spectroscopic Analysis of Low-Affinity Organic Micropollutants," *Langmuir*, vol. 38, no. 16, pp. 4958–4968, Apr. 2022, doi: 10.1021/acs.langmuir.2c00367.

[29] L. Turell *et al.*, "HPLC separation of human serum albumin isoforms based on their isoelectric points," *Journal of Chromatography B*, vol. 944, pp. 144–151, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.jchromb.2013.11.019.

[30] G. Brancolini *et al.*, "Probing the Influence of Citrate-Capped Gold Nanoparticles on an Amyloidogenic Protein," *ACS Nano*, vol. 9, no. 3, pp. 2600–2613, Mar. 2015, doi: 10.1021/nn506161j.

[31] S. Zhang, Y. Moustafa, and Q. Huo, "Different Interaction Modes of Biomolecules with Citrate-Capped Gold Nanoparticles," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 23, pp. 21184–21192, Dec. 2014, doi: 10.1021/am506112u.

[32] H. Al-Johani *et al.*, "The structure and binding mode of citrate in the stabilization of gold nanoparticles," *Nature Chem*, vol. 9, no. 9, pp. 890–895, Sep. 2017, doi: 10.1038/nchem.2752.

[33] J. Tournebize, A. Sapin-Minet, R. Schneider, A. Boudier, P. Maincent, and P. Leroy, "Simple spectrophotocolorimetric method for quantitative determination of gold in

nanoparticles," *Talanta*, vol. 83, no. 5, pp. 1780–1783, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.talanta.2010.12.005.

[34] P. Hinterdorfer and Y. F. Dufrêne, "Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy," *Nat Methods*, vol. 3, no. 5, pp. 347–355, May 2006, doi: 10.1038/nmeth871.

[35] G. Francius *et al.*, "Stretching polysaccharides on live cells using single molecule force spectroscopy," *Nat Protoc*, vol. 4, no. 6, pp. 939–946, Jun. 2009, doi: 10.1038/nprot.2009.65.

[36] M. Bugnon *et al.*, "SwissParam 2023: A Modern Web-Based Tool for Efficient Small Molecule Parametrization," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 63, no. 21, pp. 6469–6475, Nov. 2023, doi: 10.1021/acs.jcim.3c01053.

[37] V. Zoete, M. A. Cuendet, A. Grosdidier, and O. Michielin, "SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 32, no. 11, pp. 2359–2368, 2011, doi: 10.1002/jcc.21816.

[38] S. Monti, G. Barcaro, L. Sementa, V. Carravetta, and H. Ågren, "Characterization of the adsorption dynamics of trisodium citrate on gold in water solution," *RSC Adv.*, vol. 7, no. 78, pp. 49655–49663, Oct. 2017, doi: 10.1039/C7RA10759E.

[39] O. A. Perfilieva, D. V. Pyshnyi, and A. A. Lomzov, "Molecular Dynamics Simulation of Polarizable Gold Nanoparticles Interacting with Sodium Citrate," *J Chem Theory Comput*, vol. 15, no. 2, pp. 1278–1292, Feb. 2019, doi: 10.1021/acs.jctc.8b00362.

[40] J. C. Phillips *et al.*, "Scalable Molecular Dynamics with NAMD," *J Comput Chem*, vol. 26, no. 16, pp. 1781–1802, Dec. 2005, doi: 10.1002/jcc.20289.

[41] J. Huang and A. D. MacKerell, "CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data," *J Comput Chem*, vol. 34, no. 25, pp. 2135–2145, Sep. 2013, doi: 10.1002/jcc.23354.

[42] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein, "Comparison of simple potential functions for simulating liquid water," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 79, no. 2, pp. 926–935, Jul. 1983, doi: 10.1063/1.445869.

[43] T. Geyer, "Many-particle Brownian and Langevin Dynamics Simulations with the Brownmove package," *BMC Biophysics*, vol. 4, no. 1, p. 7, Apr. 2011, doi: 10.1186/2046-1682-4-7.

[44] S. E. Feller, Y. Zhang, R. W. Pastor, and B. R. Brooks, "Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 103, no. 11, pp. 4613–4621, Sep. 1995, doi: 10.1063/1.470648.

[45] T. Darden, D. York, and L. Pedersen, "Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 98, no. 12, pp. 10089–10092, Jun. 1993, doi: 10.1063/1.464397.

[46] A. W. Ghoorah, M.-D. Devignes, M. Smaïl-Tabbone, and D. W. Ritchie, "Protein docking using case-based reasoning," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 81, no. 12, pp. 2150–2158, 2013, doi: 10.1002/prot.24433.

[47] C. Boukoufi, A. Boudier, S. Lahouari, J. Vigneron, and I. Clarot, "Activity and reusability of immobilized gold nanoparticles for the catalysis of both oxidation and reduction reactions," *Results in Chemistry*, vol. 5, p. 100979, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.rechem.2023.100979.

[48] V. S. Marangoni, I. M. Paino, and V. Zucolotto, "Synthesis and characterization of jacalin-gold nanoparticles conjugates as specific markers for cancer cells," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 112, pp. 380–386, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.07.070.

[49] S. Y. Yi, J. Jeong, W. S. Lee, J. Kwon, K. Yoon, and K. Park, "A Simple and Rapid Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Screening Test Using a Mannose-Binding Lectin (MBL)-Conjugated Gold Nanoparticle Probe," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 33, no. 5, pp. 698–705, May 2023, doi: 10.4014/jmb.2301.01004.

[50] A. N. Abraham, T. K. Sharma, V. Bansal, and R. Shukla, "Phytochemicals as Dynamic Surface Ligands To Control Nanoparticle–Protein Interactions," *ACS Omega*, vol. 3, no. 2, pp. 2220–2229, Feb. 2018, doi: 10.1021/acsomega.7b01878.

[51] R. S. Swathi and K. L. Sebastian, "Long range resonance energy transfer from a dye molecule to graphene has (distance)−4 dependence," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 130, no. 8, p. 086101, Feb. 2009, doi: 10.1063/1.3077292.

[52] P. D. Ross and S. Subramanian, "Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability," *Biochemistry*, vol. 20, no. 11, pp. 3096–3102, May 1981, doi: 10.1021/bi00514a017.

[53] S. Pandit and S. Kundu, "Fluorescence quenching and related interactions among globular proteins (BSA and lysozyme) in presence of titanium dioxide nanoparticles," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 628, p. 127253, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.colsurfa.2021.127253.

[Supporting Information]

Concanavalin A adsorption on gold nanoparticles: Influence of citrate ions on nanoparticle-protein interactions

Sephora Lahouari[a,b], Jérémie Gouyon[a,c], Grégory Francius[c], Fabien Picaud[d], Roberta Albino dos Reis[e], Amedea B. Seabra[e], Igor Clarot[a,b], Ariane Boudier[a,b,f]*

[a] Université de Lorraine, CITHEFOR, F-54000 Nancy, France

[b] Université de Lorraine, CNRS, LRGP, F-54000 Nancy, France

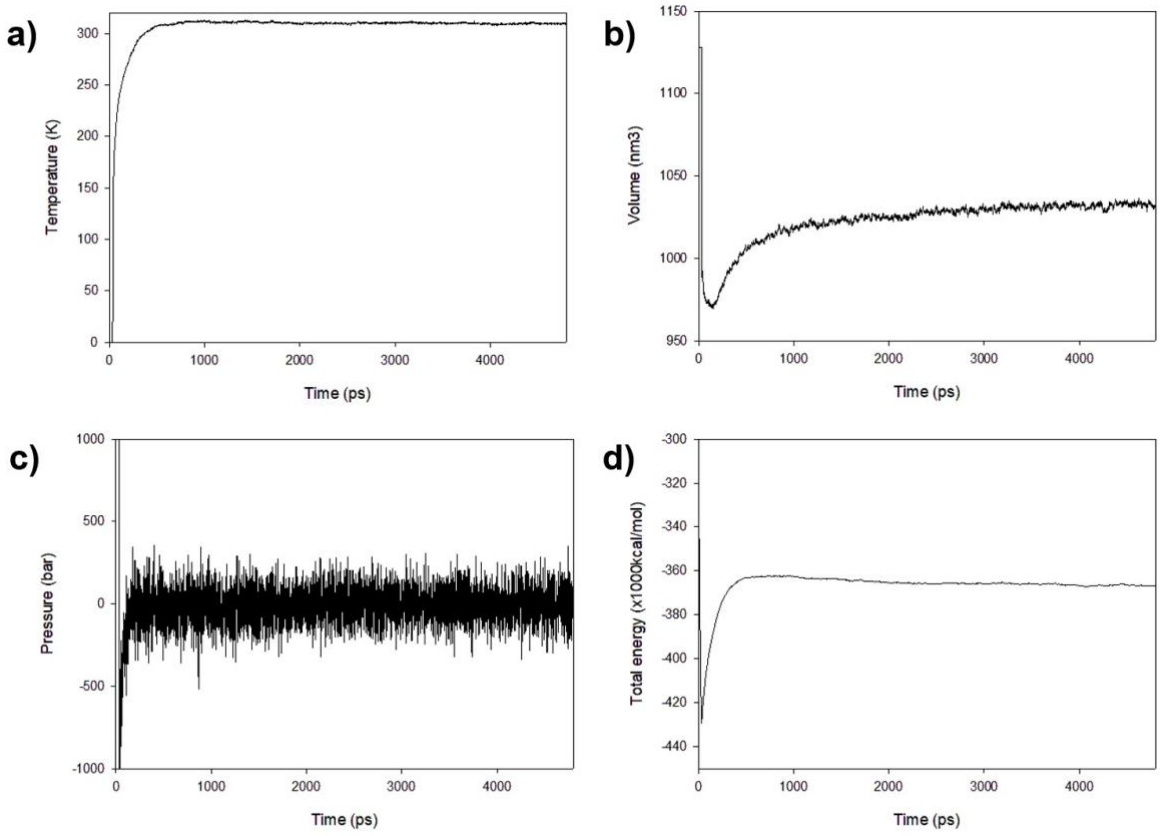
[c] Université de Lorraine, CNRS, LCPME, F-54000 Nancy, France

[d] Université Marie et Louis Pasteur, SINERGIES, F-25030 Besançon, France

[e] Federal University of ABC, Center for Natural and Human Sciences, Santo André 09210-580, SP, Brazil

[f] Institut Universitaire de France

*Corresponding Author : Ariane Boudier – Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), Université de Lorraine, CNRS, F-54000, Nancy, France. Institut Universitaire de France (IUF). Email : ariane.boudier@univ-lorraine.fr

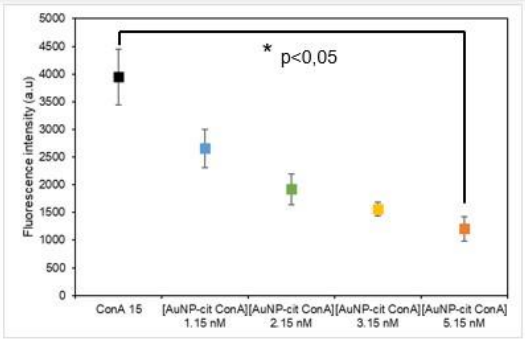


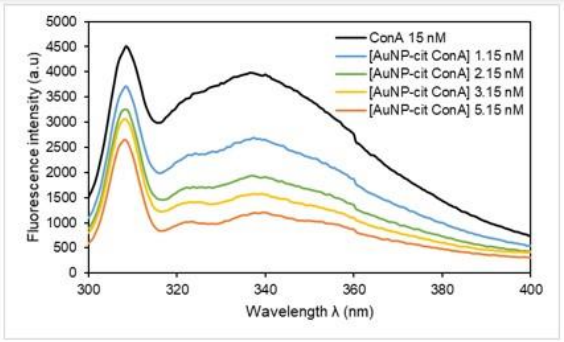
S1. Evolution of the different physical observables during the equilibration phase of the simulations as a function of the simulation time in ps: a) Temperature; b) Volume; c) Pressure; d) Total energy.

S2. Table representing the physicochemical characterization of [AuNP–cit ConA] at day 0 and day 5.

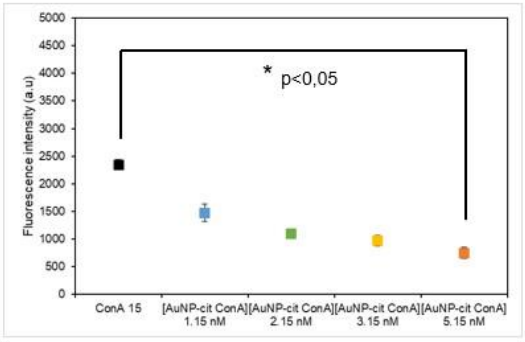
	λ_{max} (nm)	Absorbance	Dh (nm)	Zeta potential (mV)
AuNP	513 ± 1	0.674 ± 0.026	6.5 ± 0.4	- 30.2 ± 9.1
[AuNP–cit ConA] 1:1 Day 0	517 ± 1	0.393 ± 0.003	18.4 ± 2.4	- 29.6 ± 4.7
[AuNP–cit ConA] 1:1 Day 5	516 ± 2	0.338 ± 0.118	14.9 ± 0.9	- 25.0 ± 2.1

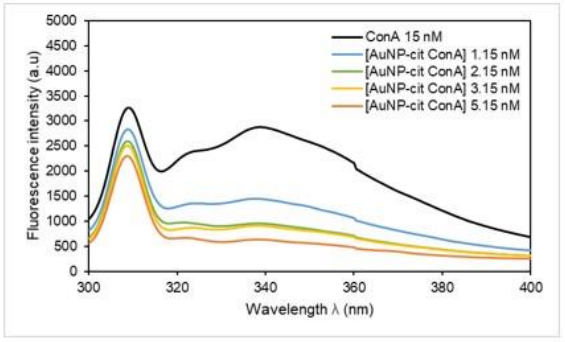
20 °C



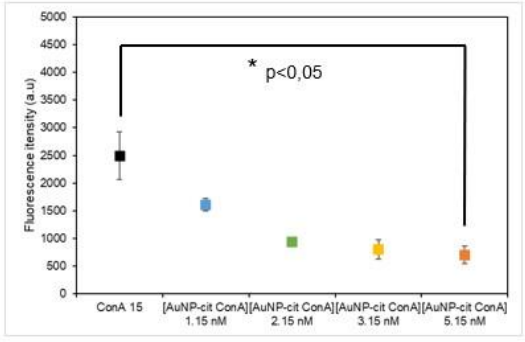


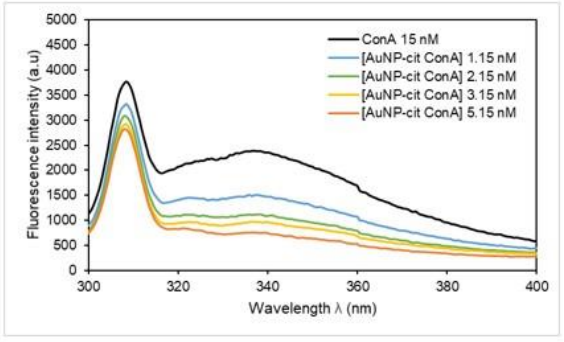
30 °C



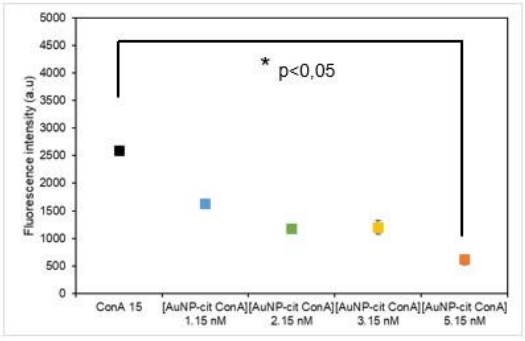


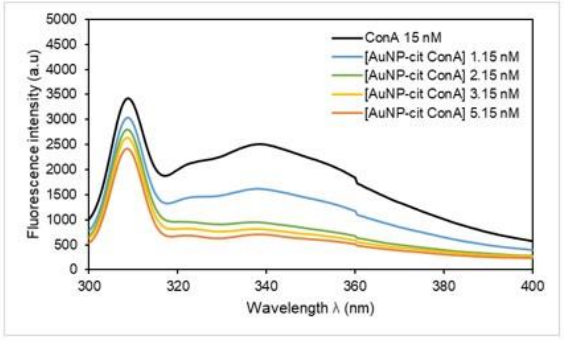
40 °C



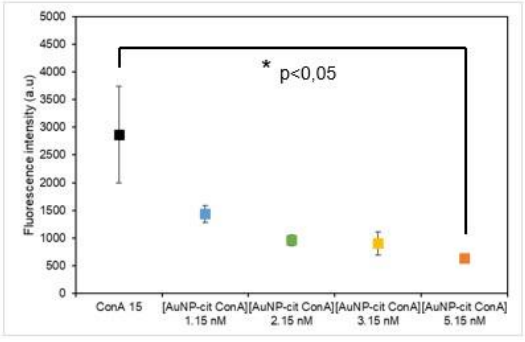


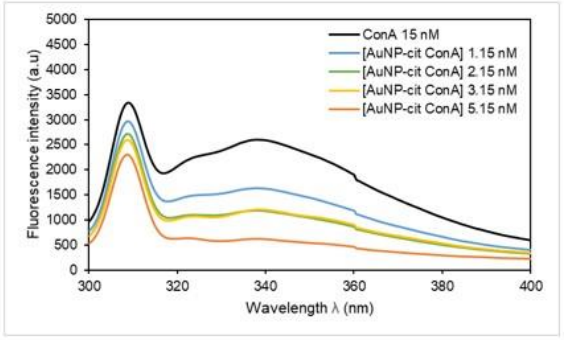
50 °C





60 °C

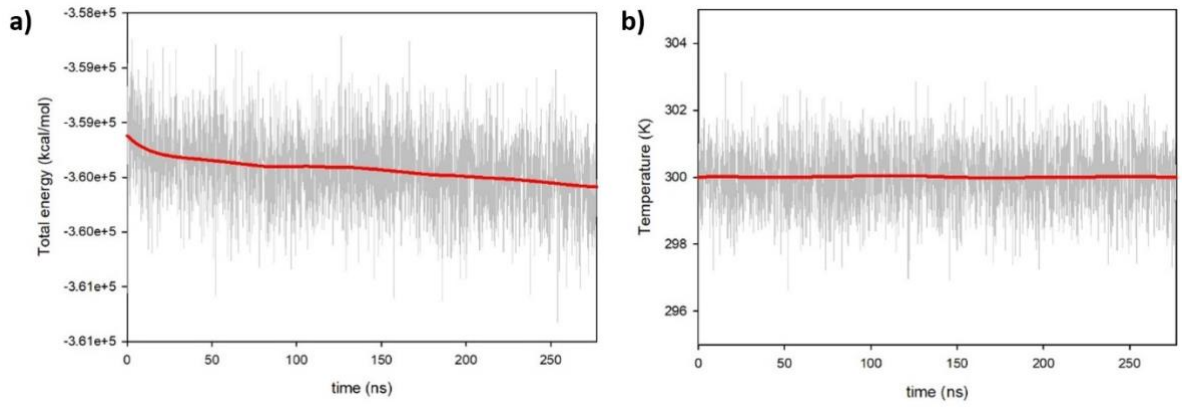




S3. On the left fluorescence spectra of ConA after incubation with different AuNP–cit concentrations at various temperatures and on the right plot of the value of fluorescence intensity at 340 nm of ConA as a function of the concentration of AuNP expressed as a mean of 3 measurements with their standard deviations.

The pair interaction energy between the gold nanoparticle and the protein shows local fluctuations. These variations reflect the dynamic nature of the nanoparticle around the protein and the ongoing molecular rearrangements, which are expected even under equilibrium conditions. Importantly, the interaction energy does not exhibit any long-term drift, only higher fluctuations and its mean value stabilizes over the final portion of the simulation. This indicates that the observed configuration will clearly show a diffusion of the AuNP around the protein and not a stable adsorption on a specific site.

To show the stable state of the system, we plotted the evolution of the total energy and the temperature depending on time simulation (Figure S4). Even if a very small decrease of the energy is observed, this evolution is only 0.05% of the total energy value while the temperature is clearly stable.



S4. Evolution of the total energy a) and temperature b) as a function of time for [AuNP-ConA] 1:1 simulation.

S5. Film showing the interaction between bAuNP and ConA obtained by MD (MP4).

https://ars-els-cdn-com.bases-doc.univ-lorraine.fr/content/image/1-s2.0-S0927775725012737-mmc2.mp4

S6. Film showing the interaction between [AuNP–cit] and ConA obtained by MD (MP4).

https://ars-els-cdn-com.bases-doc.univ-lorraine.fr/content/image/1-s2.0-S0927775725012737-mmc3.mp4

S7. Film showing the interaction between [AuNP–cit] and HSA obtained by MD (MP4).

https://ars-els-cdn-com.bases-doc.univ-lorraine.fr/content/image/1-s2.0-S0927775725012737-mmc4.mp4

S8. Film showing the interaction between bAuNP and HSA obtained by MD (MP4).

Liens de téléchargement des vidéos

https://ars-els-cdn-com.bases-doc.univ-lorraine.fr/content/image/1-s2.0-S0927775725012737-mmc5.mp4

2.2. Étude de l'interaction du complexe nanoparticule d'or – Concanavaline A

La première partie de ce travail de doctorat a été dédiée au développement du complexe [AuNP-ConA]. Ci-dessous sont présentés les méthodes et résultats complémentaires à l'article. Ces résultats comprennent la synthèse des AuNP ainsi que les méthodes de fonctionnalisation directes et indirectes par la ConA qui ont été entreprises. L'adsorption présentée dans l'article a été choisie après avoir testé différentes méthodes, le milieu PBS ayant d'abord été entrepris avant de choisir d'effectuer les expérimentations dans un milieu de citrate de sodium (natif des AuNP). Une modification chimique de la ConA a également été entreprise par l'utilisation de 2-iminothiolane (2-IT) de manière à lier la lectine aux AuNP avec une forte énergie de liaison (formation de pont Au-S). Les résultats de caractérisation en spectrophotométrie UV-visible et DLS sont présentées afin d'évaluer la stabilité de la suspension selon le LSPR et le D_H dans le temps et l'anisotropie de fluorescence a été expérimentée afin d'évaluer la rigidité des résidus tryptophane de la ConA lorsque celle-ci est en présence d'AuNP. Par ailleurs des spectres infrarouge sont présentés afin de tenter d'apporter des informations quant à la structure secondaire de la protéine avant et après ajout sur les AuNP. Plus de contexte quant au choix de l'utilisation d'[AuNP-ConA] 1:1 est présenté.

2.2.1. Nanoparticules d'or et fonctionnalisation par la Concanavaline A : synthèse et caractérisation

2.2.1.1. Synthèse des nanoparticules d'or

La synthèse colloïdale des AuNP a été réalisée avec un protocole fusionnant deux méthodes classiques : la méthode de Turkevich [1] et la méthode de Brust [2]. Ces deux méthodes reposent sur l'utilisation d'un précurseur d'or puis de sa réduction et stabilisation. Ce protocole a déjà été publié pour de nombreuses études antérieures par le laboratoire [3], [4], [5]. Dans la synthèse réalisée, l'acide tétrachloroaurique ($HAuCl_4$) est utilisé en tant que précurseur d'or. Pour réduire l'or, du tétrahydruroborate de sodium ($NaBH_4$) est utilisé. Dans cette synthèse, le citrate de sodium est utilisé en tant que stabilisant et dans une moindre mesure comme réducteur. La caractérisation physico-chimique des AuNP est décrite dans l'article ci-dessus. La synthèse des AuNP est représentée dans la Figure 1.

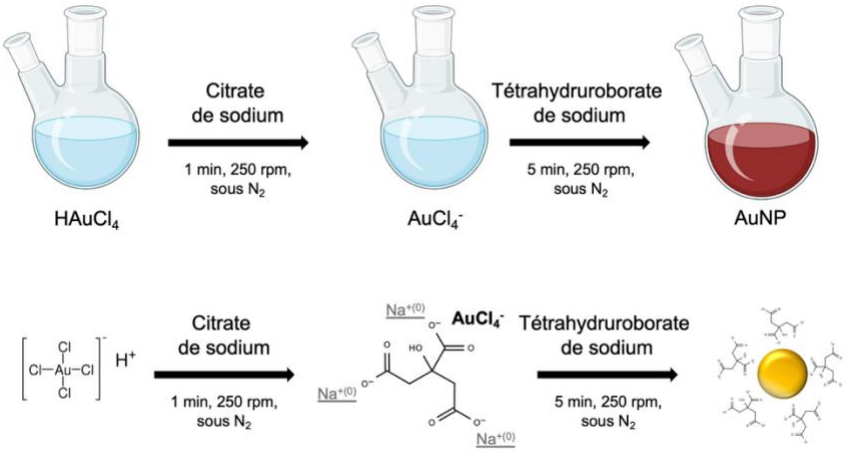


Figure 1. Représentation schématique de la synthèse d'AuNP stabilisées par le citrate de sodium.

2.2.1.2. Méthodes d'obtention des AuNP fonctionnalisées par la ConA

2.2.1.2.1. Matériel et méthodes

Un tampon PBS a été préparé en combinant $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ 6.48 mM, KH_2PO_4 1.47 mM, NaCl 137 mM et KCl 2.68 mM dans un litre d'H_2O. Le pH a été ajusté à 7.4 avec une solution d'acide phosphorique. La solution de citrate de sodium (1.53 mM) a été préparée en solubilisant 45 mg de sodium de citrate dihydraté pour un volume de 100 mL d'H_2O.

2.2.1.2.2. AuNP fonctionnalisées par la ConA : Etude dans un milieu constitué par du PBS

Afin de modifier les AuNP avec la ConA à leur surface, différentes méthodes (adsorption dans un milieu citrate de sodium comme il a été exposé dans l'**article 1** et modification chimique) ont été employées avant de retenir la plus performante en termes de stabilité de D_H, de la condition engendrant la plus petite modification de LSPR et ne présentant pas d'agrégation.
La première méthode consistait à solubiliser la lectine dans un PBS à pH 7,4 puis à ajouter la solution de ConA à la suspension d'AuNP. Ceci s'est effectué à différents ratios de ConA pour AuNP, calculés selon leur concentration molaire. Les différents ratios testés sont décrits dans le Tableau 1.

Tableau 1. Récapitulatif des ratios molaires de ConA pour AuNP testés.

ConA						1					
AuNP	0.02	0.2	0.5	0.6	0.75	1	1.5	2	4	20	40

Ces différentes suspensions (obtenues à différents ratios) ont été caractérisées en spectroscopie UV-Visible ainsi qu'en DLS. La première technique sert à observer une modification de la valeur de longueur d'onde maximale (λ_{max}) du LSPR de manière à témoigner du changement d'environnement électronique de la NP. La DLS, quant à elle, permet d'observer l'évolution du D_H.

La présence de sels dans le tampon PBS engendre une déstabilisation du système colloïdal observable par une modification de la valeur de λ_{max} traduite par la variation de couleur (rouge pourpre à violet foncé) de la suspension. Ce phénomène d'agrégation est observable sur les spectres UV-Visible avec un étalement (+ 3 nm) et déplacement bathochrome du LSPR (Figure 2) observables directement après modification des AuNP avec la ConA. De plus, après quelques heures, un dépôt noir est retrouvé au fond du tube dans lequel est stocké la suspension. Ceci nous permet d'émettre une hypothèse concernant l'agrégation des AuNP *via* un écrantage des charges et un décrochage des ions citrates autour du cœur or [6] dû à la présence du PBS. Le ratio choisi pour cette Figure ([AuNP-ConA] 2:1) est représentatif des résultats obtenus pour les autres ratios testés.

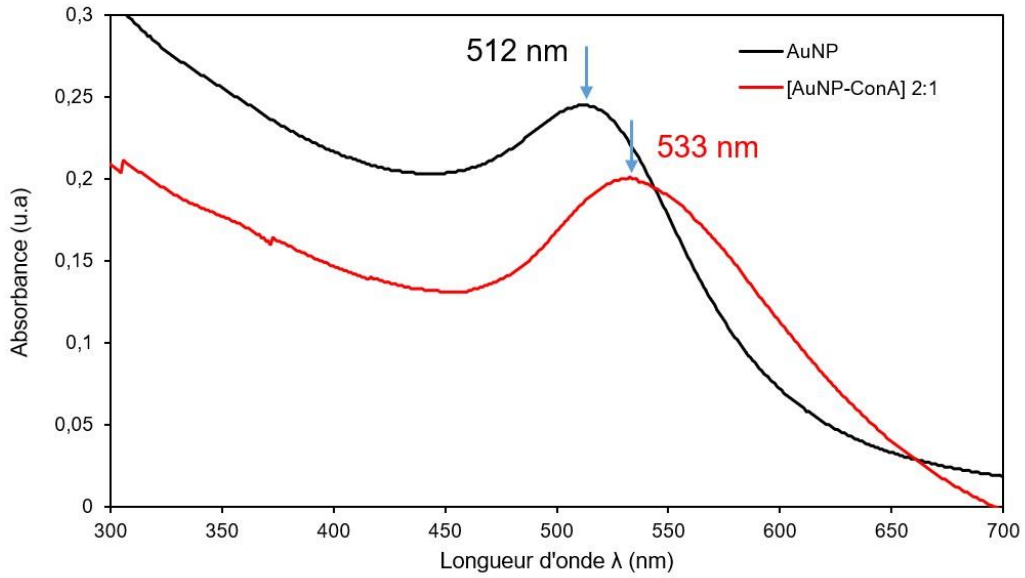


Figure 2. Spectres UV-Visible d'AuNP et d'[AuNP-ConA] 2:1 préparés dans du PBS montrant un déplacement bathochrome ainsi qu'un élargissement du LSPR.

Ces résultats vont à l'encontre d'une étude dans laquelle des AuNP sont fonctionnalisées avec une autre lectine : EHL [7]. Dans cette étude, les auteurs ajoutent du NaCl à différentes concentrations dans le milieu de manière à prouver que la lectine est adsorbée à la surface des AuNP. Lorsqu'une solution de NaCl 2 M est ajoutée à une concentration finale d'environ 200

mM, aucune agrégation ne se produit, ce qui a laissé les auteurs conclure que l'EHL demeure à la surface des AuNP, solidement ancrée, et permet de stabiliser le système contre la modification de force ionique induite par le NaCl.

Afin de d'observer l'évolution du D_H des AuNP après ajout de ConA, des acquisitions en DLS ont été réalisées pour chacun des ratios testés sur une durée de 5 jours (Figure 3).

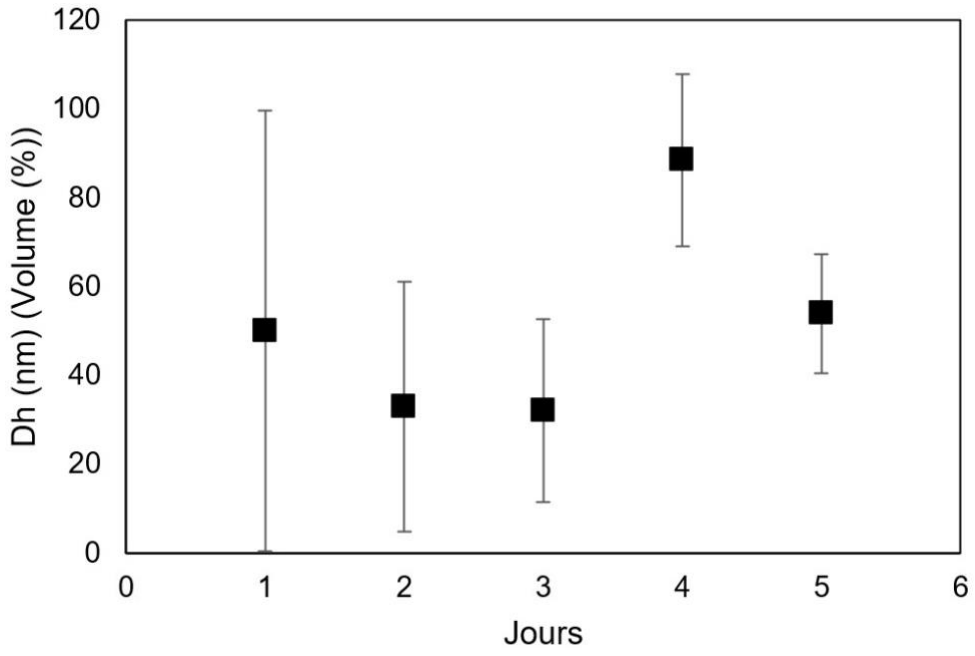


Figure 3. Résultats des D_H obtenus en DLS pour [AuNP-ConA] 2:1 préparé dans du PBS sur une durée de 5 jours.

Bien qu'une augmentation du D_H soit attendue après addition de la ConA due à l'adsorption de celle-ci sur les AuNP, les différents D_H obtenus ne permettaient pas de conclure quant à la formation d'un complexe [AuNP-ConA] avec un D_H stable dans le temps. De plus, il a été observé que les valeurs de D_H augmentaient de manière drastique (de ~ 6 nm pour AuNP à 30-100 nm après ajout de ConA). Plusieurs hypothèses ont été émises : l'échantillon peut se retrouver dans une forme étant non sphérique et donc ne pas être approprié pour la DLS, de l'agrégation est très probablement présente et un surplus de ConA libre peut être présent. Afin de tenter de résoudre le problème lié à la dernière hypothèse, une étape de purification de l'échantillon a été entrepris, le but étant d'éliminer l'excès de ConA et d'AuNP afin de garder uniquement les [AuNP-ConA] obtenus. Nous avons décidé de ne pas réaliser de dialyse pour s'affranchir du changement de tampon et de la durée assez longue de cette expérimentation qui peut modifier l'équilibre chimique. C'est pour cela que la purification s'est effectuée en utilisant

des colonnes de chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Celles-ci agissent également comme des colonnes de dessalage. Ces colonnes sont utilisées selon le protocole du fournisseur (PD Miditrap G-25, GE Healthcare).

Dans un premier temps, les témoins AuNP d'une part et ConA d'autre part ont été injectés dans ces colonnes et les fractions d'élution ont été analysées. Concernant les AuNP, après dépôt de l'échantillon dans la colonne, un halo rouge de NP était visible (Figure 4), indiquant la rétention de celles-ci sur le gel. Les fractions collectées contenaient par conséquent une concentration extrêmement faible en AuNP et ne permettaient pas leur utilisation pour effectuer une caractérisation complète.

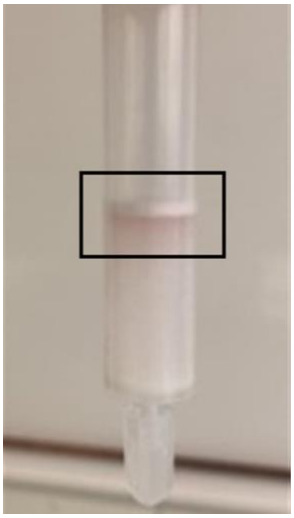


Figure 4. Colonne de SEC après injection des AuNP. On observe un halo rouge correspondant aux AuNP.

Quant à la ConA, un signal en spectroscopie UV-Visible a été recherché à 280 nm. Les protéines absorbent à cette longueur d'onde en raison de la présence d'acides aminés aromatiques et, avec une contribution moins importante, des liaisons disulfures [8]. En enregistrant les spectres couvrant cette région sur toutes les fractions collectées (Figure 5), un signal est observé dans les fractions 1, 2 et 5. Aucun signal n'est obtenu pour les fractions 3 et 4 sans pouvoir justifier ce résultat. Les fractions 1, 2 et 5 ne contiennent pas ou très peu d'AuNP, comme le montre l'absence de LSPR, et par conséquent cette méthode ne permet pas de purifier les [AuNP-ConA].

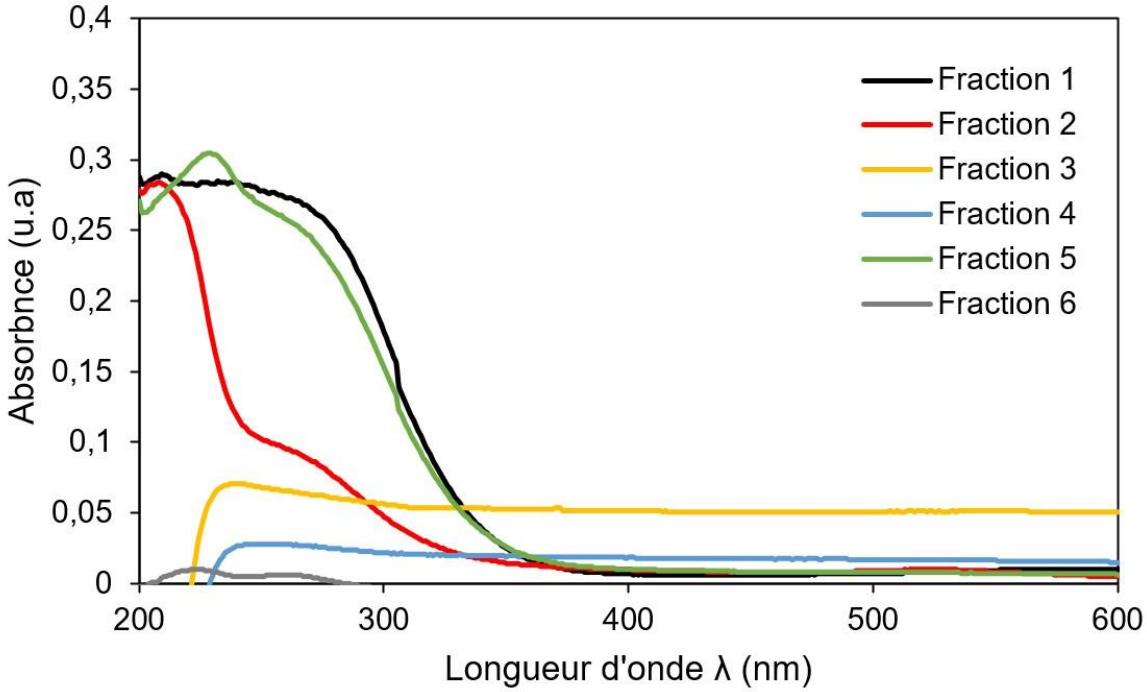


Figure 5. Spectres UV-visible des différentes fractions de SEC collectées après élution d'[AuNP-ConA].

Cette méthode d'obtention d'[AuNP-ConA] avec utilisation de PBS n'a donc pas été retenue pour plusieurs raisons. Tout d'abord, peu importe le ratio étudié, le système ne pouvait pas être obtenu sans la présence d'agrégation en quelques heures des AuNP. De plus, ceci engendre un manque crucial de stabilité vis-à-vis des spectres UV-Visible et des résultats de D_H. Finalement, la technique de SEC pour dessaler et purifier l'échantillon ne permettait pas de confirmer la présence de ConA et donc d'[AuNP-ConA]. Tous ces éléments pris en compte ont fait que cette méthode de développement n'a pas été poursuivie.

2.2.1.2.3. AuNP fonctionnalisées par la Concanavaline A : Etude dans un milieu constitué d'une solution de citrate de sodium

A la suite des résultats non probants obtenus précédemment, une approche différente a été entreprise. De manière à ne pas perturber la stabilité des AuNP (suspension colloïdale native), une solution de citrate de sodium à une concentration identique à celle du milieu de synthèse des AuNP (1.53 mM) a été produite. Cette solution a été utilisée en tant que milieu de solubilisation de la ConA mais également comme milieu de travail pour effectuer les dilutions. Les ratios molaires présentés dans le Tableau 1 ont été répétés et caractérisés de la même manière que précédemment. La Figure 6 représente les spectres UV-Visibles des AuNP en

comparaison avec AuNP-ConA 2:1, cette fois-ci préparé dans une solution aqueuse de citrate de sodium 1.53 mM.

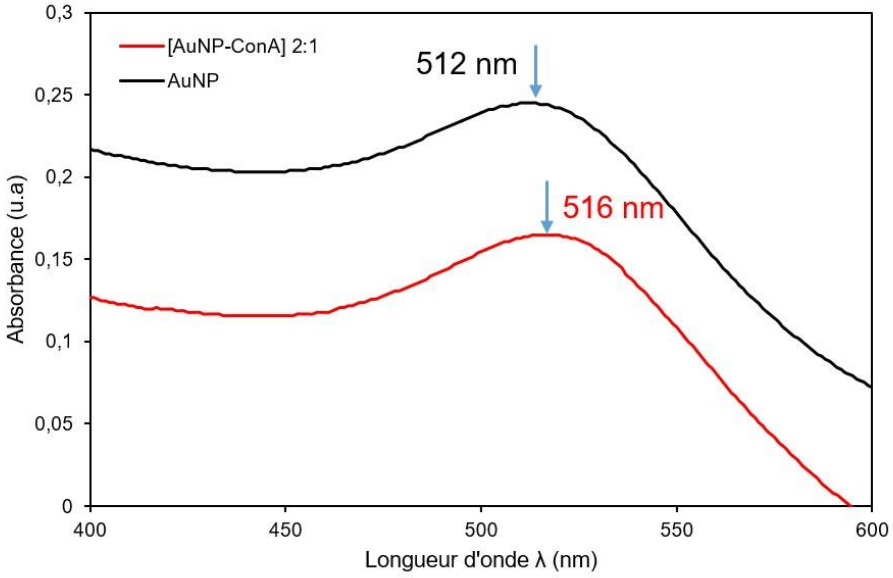


Figure 6. Spectres UV-Visible d'AuNP et [AuNP-ConA] 2:1 préparé dans du citrate de sodium 1.53 mM.

De la même manière que précédemment, une baisse de la valeur d'absorbance est observée pour la condition [AuNP-ConA] 2 :1 par rapport aux AuNP natives à concentration identique. Cependant, la valeur de LSPR augmente ici de 4 nm contre 21 nm dans la condition en PBS, ce qui indique que l'environnement de la NP subit moins de modifications en milieu citrate de sodium qu'en milieu PBS. Au vu de ces résultats, nous avons décidé de ne pas travailler dans un milieu PBS mais dans un milieu citrate de sodium.

2.2.1.3. Etude de la stabilité des ratios AuNP/ConA.

Dans l'optique d'évaluer l'impact de la concentration d'AuNP ou de ConA sur l'évolution du D_H des [AuNP-ConA], différentes suspensions à différents ratios ont été développées et caractérisées comme il a été établi dans le tableau 1. Certains de ces résultats sont présentés dans la Figure 7, montrant la valeur moyenne avec écart-type en n=3.

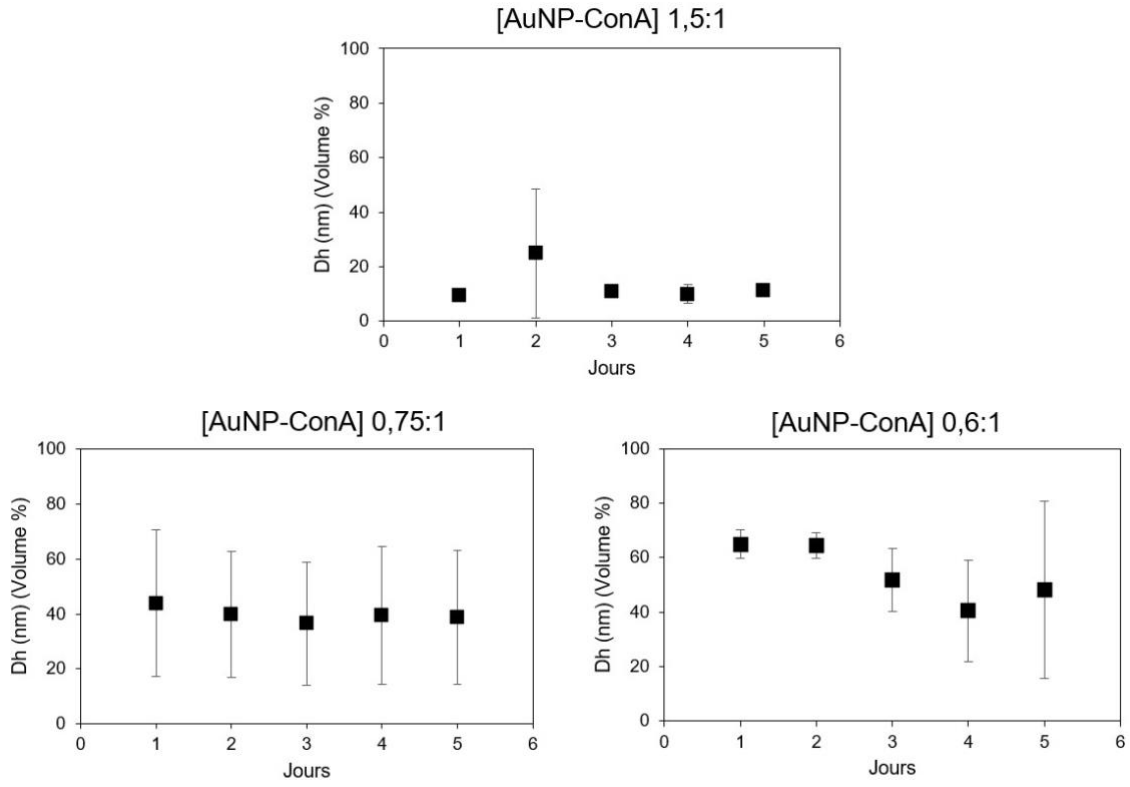


Figure 7. Résultats des DH obtenus pour différents ratios d'[AuNP-ConA] préparés dans du citrate de sodium sur une durée de 5 jours. Résultats exprimés en moyenne et écarts-types sur 3 échantillons indépendants.

De manière générale, nous pouvons constater que chaque condition possède sa propre tendance d'évolution de D_H. Il est cependant possible de noter que pour les ratios où la concentration en AuNP est plus faible que celle de la ConA, les écarts-types sont beaucoup plus prononcés, indiquant une variation élevée dans les mesures ou traduisant une méthode non adaptée puisque l'échantillon comporte plusieurs composants différents. Il est possible que cela traduise un manque de stabilité dans ces conditions. La condition pour laquelle la concentration en AuNP est plus élevée que celle en ConA (1,5:1), les D_H semblent peu fluctuer et possèdent de faibles écarts-types. Cependant pour le deuxième jour d'analyse, un D_H de 24.85 nm est observé avec un écart-type de 23.27 nm.

Finalement, l'analyse de la condition [AuNP-ConA] avec un ratio molaire égal (1:1) a été entreprise. Les résultats de D_H sont présentés en Figure 8.

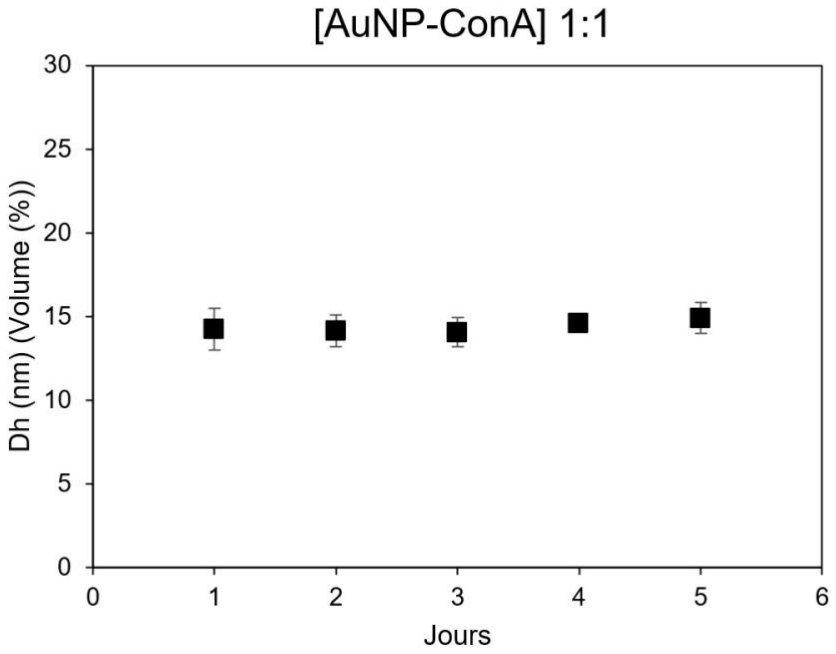


Figure 8. Résultats de DLS pour [AuNP-ConA] 1:1 préparé dans du citrate de sodium 1.53 mM sur une durée de 5 jours.

Les résultats obtenus montrent que [AuNP-ConA] 1:1 conserve une valeur de D_H comprise entre 14.2 et 14.9 nm pendant 5 jours. Ces valeurs sont obtenues avec de très faibles écarts-types (entre 0.9 et 1.2), indiquant une variation dans les mesures très faibles, qui peuvent permettre de conclure sur une très bonne stabilité d'[AuNP-ConA] 1:1 pendant 5 jours.

Parallèlement, afin d'établir la stabilité de la suspension par spectroscopie UV-Visible, des spectres ont été enregistrés sur ces mêmes échantillons pour les mêmes durées de conservation. Les résultats sont présentés dans la Figure 9.

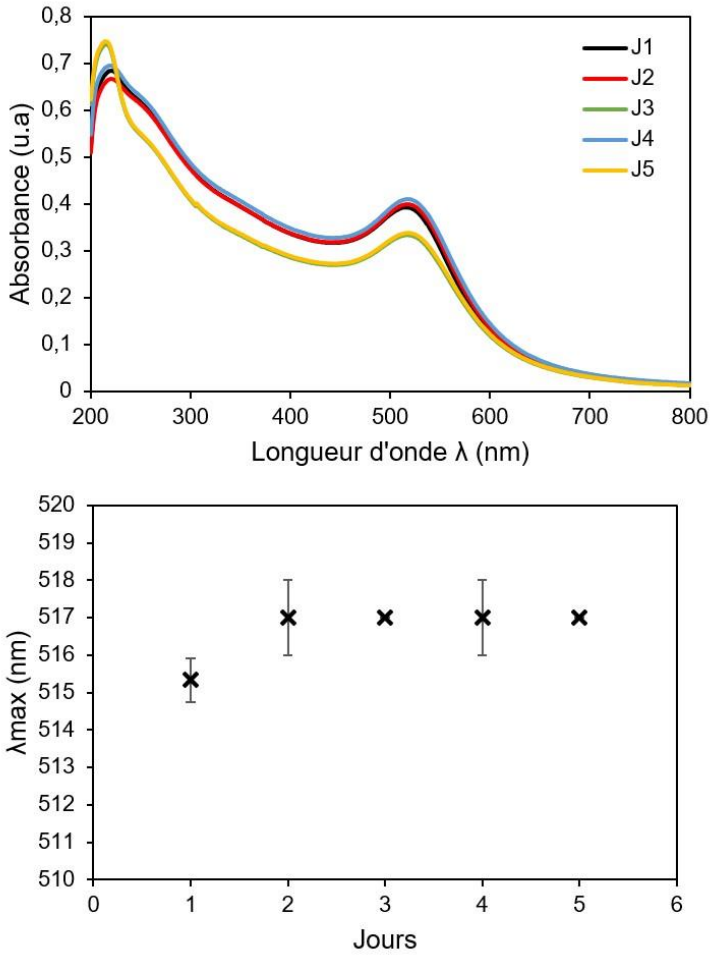


Figure 9. Spectres UV-visible d'[AuNP-ConA] 1 :1 préparé dans du citrate de sodium 1.53 mM sur une durée de 5 jours avec l'évolution de la valeur de λ_{max}. Les écarts-types sont calculés sur 3 échantillons individuels.

Les figures permettent d'observer des spectres ayant gardé la même tendance sur les 5 jours malgré une légère baisse d'absorbance soulignée à J3 et J5. Cependant, les valeurs de λ_{max} au LSPR demeurent dans la même région (516 ± 1 nm) sur ces 5 jours. Les résultats de spectroscopie UV-Visible indiquent très peu de changements des propriétés optiques et les valeurs de λ_{max} au LSPR montrent que l'environnement des AuNP est très peu perturbé durant cette période.

Mis bout à bout, les résultats de D_H et de spectroscopie UV-Visible pour [AuNP-ConA] 1:1 indiquent une très bonne stabilité à 5 jours. C'est pour ces raisons que nous avons décidés de nous focaliser sur cet objet pour le reste des expérimentations de ce travail. Durant la suite du manuscrit, l'utilisation de [AuNP-ConA] fera donc référence à [AuNP-ConA] au ratio 1:1 développé dans un milieu aqueux contenant du citrate de sodium.

Des expérimentations complémentaires non publiées dans l'**article 1** sont présentées à la suite. Ces dernières reposent sur l'utilisation de l'anisotropie de fluorescence du fluorophore tryptophane de la ConA pour approfondir la caractérisation du complexe [AuNP-ConA].

2.2.2. *Anisotropie de fluorescence*

Des expérimentations d'anisotropie de fluorescence ont été menées. Il s'agit de comparer le comportement des résidus tryptophanes de la ConA dans [AuNP-ConA] et des AuNP modifiées par l'albumine de sérum humain (HSA), [AuNP-HSA]

Cette technique consiste à exciter un fluorophore grâce à une lumière polarisée et à observer la dépolarisation de celle-ci. La définition de l'anisotropie de fluorescence est décrite comme suit. La lumière incidente est polarisée de manière verticale (*i.e* dans un champ parallèle à l'axe z). L'intensité de fluorescence est composée de deux paramètres : l'intensité de fluorescence des composantes verticales ($I_{/\!/}$) et horizontales ($I_{\perp}$). L'anisotropie de fluorescence est donc décrite comme le rapport entre la différence d'intensité de fluorescence des composantes verticale et horizontale ($I_{\parallel} - I_{\perp}$) et la somme $I_{\parallel} + 2I_{\perp}$, c'est-à-dire l'intensité de fluorescence totale pondérée des deux composantes [9].

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Lorsque la valeur de r augmente, le fluorophore tend à se rigidifier. On peut interpréter cela comme une conformation pouvant être plus stable, moins à même de se mouvoir. A l'inverse, une valeur de r qui diminue traduit un fluorophore plus fluide, avec une liberté plus importante.

Le fluorophore principalement considéré ici est le tryptophane dû à son rendement quantique de fluorescence plus élevé que celui des autres acides aminés fluorescents (tyrosine et phénylalanine). Ceci est dû à la structure du tryptophane, son noyau indole lui conférant un rendement quantique plus important [10]. La ConA possède 4 résidus tryptophane et la HSA n'en possède qu'un seul.

Afin d'apporter des données supplémentaires quant à la liberté de mouvement du fluorophore dans les deux types de conditions étudiées dans l'article : ([AuNP-ConA] 1 :1 et [AuNP-HSA] 1 :1), des expérimentations en anisotropie de fluorescence ont été menées. Les résultats de cette expérimentation sont présentés dans la Figure 10 ci-dessous.

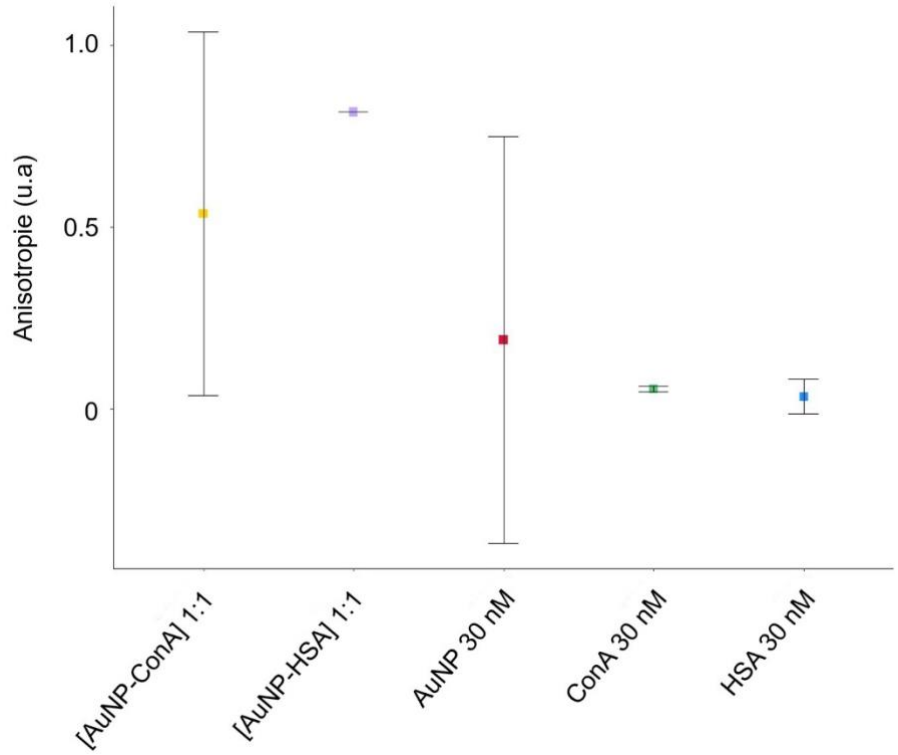


Figure 10. Résultats d'anisotropie de fluorescence pour [AuNP-ConA] 1:1, [AuNP-HSA] 1:1 et les échantillons témoins respectifs. La longueur d'onde d'excitation est de 280 nm les fentes sont fixées à 2 nm.

Les résultats obtenus montrent une valeur d'anisotropie plus importante pour [AuNP-HSA] que pour [AuNP-ConA]. Ces résultats indiquent donc que le fluorophore excité possède une plus grande rigidité rotationnelle dans [AuNP-ConA] que dans [AuNP-HSA]. Cependant, l'écart-type pour [AuNP-ConA] 1:1 est très important et indique une variation entre chaque échantillon qui peut traduire une instabilité du système, un dynamisme des interactions et donc du fluorophore. Nos conclusions précédentes ont démontré que l'affinité entre AuNP et HSA est plus importante que pour AuNP et ConA. Ces résultats d'anisotropie apportent une nouvelle dimension aux précédents en ajoutant que le tryptophane est plus stable dans le cas d'[AuNP-HSA] que pour [AuNP-ConA], ce qui consolide les résultats obtenus précédemment.

2.2.3. Etude de la conformation de la Concanavaline A par spectroscopie infrarouge

Par la suite, la problématique d'une possible modification de la conformation de la ConA avant et après ajout des AuNP a émergé. La première méthode envisagée pour le mettre en exergue fut le dichroïsme circulaire. Cette technique permet, grâce aux chromophores présents dans les protéines, d'obtenir des informations spectrales sur le contenu des structures secondaires (hélices α et feuillets β). Cependant, la concentration totale en ConA de nos échantillons (30 nM) ne permettait pas d'utiliser cette méthode, la concentration minimale requise étant de 10 µM. Une alternative a dû être proposée. C'est pour cette raison que, en partenariat avec le laboratoire LCPME et sous la supervision scientifique du Dr. Fabienne Quilès, des acquisitions en spectroscopie infrarouge ont pu être mises en place sur un spectromètre infrarouge Bruker Vertex 70V (logiciel OPUS). La spectroscopie infrarouge repose sur l'irradiation de molécules par des radiations infrarouges de manière à détecter les transitions vibrationnelles de celles-ci. Des bandes d'absorption caractérisées par leur nombre d'ondes sont ainsi obtenues, correspondant à des transitions entre les niveaux d'énergie vibrationnelle des molécules présentes dans l'échantillon [11]. Pour les protéines, ces changements de nombre d'onde peuvent être directement reliés à des changements de conformation de la structure protéique après adsorption.

Plusieurs techniques sont disponibles pour effectuer de la spectroscopie infrarouge : la Réflectance Totale Atténuée (ATR), la transmission ou encore la spectroscopie Infrarouge de Réflexion Absorption (IRRAS). C'est cette dernière qui a été choisie pour effectuer l'analyse de nos échantillons. En IRRAS, une lumière infrarouge est dirigée sur un échantillon qu'elle va traverser puis elle sera réfléchie par un substrat vers le détecteur (Figure 11). Cette technique a été privilégiée car il est possible d'effectuer plusieurs étapes de dépôt d'échantillon et de séchage pour augmenter la quantité d'échantillon à analyser sur la surface.

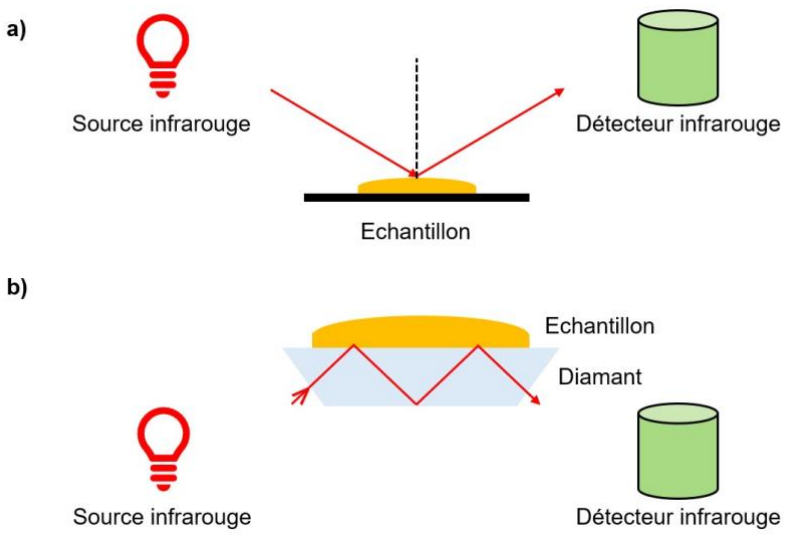


Figure 11. Représentation schématique du principe de la méthode IRRAS a) comparé à la méthode ATR b).

Dans notre cas, un premier dépôt d'une fine couche de chrome servant à faciliter le second dépôt d'une couche d'or métallique est réalisé sur une lame de verre par pulvérisation plasma [12]. Les échantillons correspondants aux différentes conditions à analyser sont ensuite déposés sur cette surface de manière à la recouvrir complètement puis laissées à évaporer. Les échantillons déposés sur les surfaces sont les suivants :

- ConA 30 nM (dans du citrate de sodium 1.53 mM)
- ConA 30 nM (dans H_2O)
- [AuNP-ConA] 1 :1
- AuNP
- Citrate de sodium 1.53 mM
- HSA 30 nM (dans du citrate de sodium 1.53 mM)
- [AuNP-HSA] 1 :1

Avant de démarrer les acquisitions, de l'azote liquide est ajouté dans la chambre dédiée du spectromètre et une dépression est effectué dans la cellule d'analyse de manière à limiter les interférences vibrationnelles dues à la présence de vapeur d'eau et de CO_2 dans l'atmosphère [13]. Les résultats d'analyse d'IRRAS sont présentés dans la Figure 12.

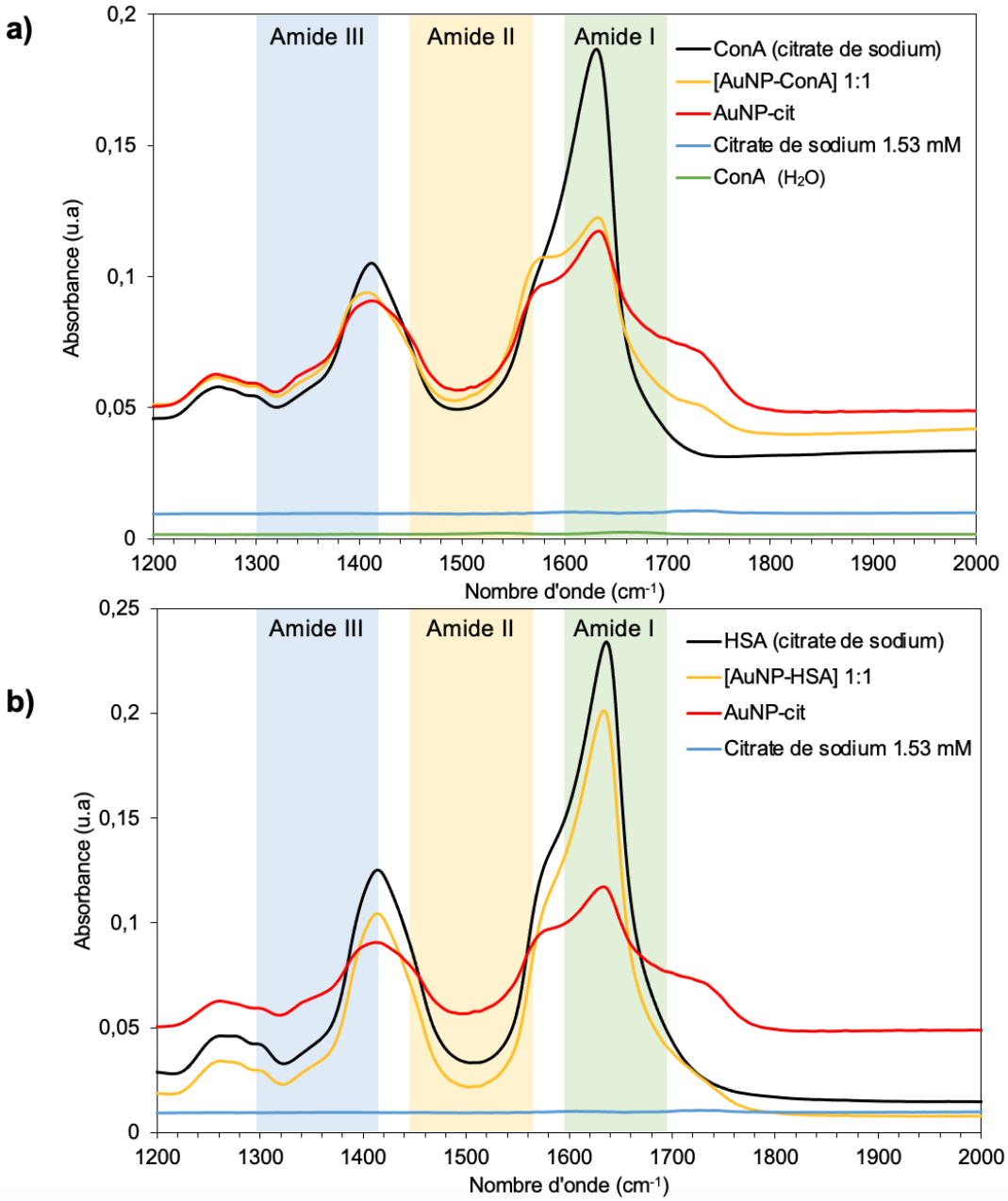


Figure 12. Spectres infrarouge d'[AuNP-ConA] 1 :1, [AuNP-HSA] 1 :1 et les témoins respectifs obtenus en IRRAS avec les différentes régions Amide représentées.

De manière à observer les modifications de conformation de la structure secondaire des protéines (ConA et HSA), il est possible de se focaliser sur 3 régions distinctes du spectre infrarouge :

- La région Amide I (~ 1600-1700 cm^{-1})
- La région Amide II (~ 1450-1580 cm^{-1})
- La région Amide III (~ 1300-1420 cm^{-1})

La première donne des informations sur l'élongation des liaisons C=O, les élongations hors phase C-N et les déformations des groupements C-C-N. La seconde région est attribuée à la combinaison hors phase du balancement dans le plan des liaisons N-H, de l'élongation C-N et du balancement dans le plan C=O. Enfin, la région Amide III est attribuée aux chaînes latérales des acides aminés des protéines ainsi que de la combinaison en phase du balancement dans le plan du groupement N-H et de l'élongation C-N [11].

Les spectres obtenus en Figure 12, montrent qu'aucun signal n'est présent dans la région Amide II pour la ConA, qu'il s'agisse de la condition dans l'H_2O ou dans la solution de citrate de sodium. Par ailleurs, un signal fort est présent en région Amide I et Amide III. De plus, le spectre d'[AuNP-ConA] est sensiblement le même que celui d'AuNP. Ces observations sont les mêmes pour les résultats des spectres de HSA et [AuNP-HSA] et aucune conclusion sur un changement de la structure secondaire de ConA ou HSA ne peut en être tirée.

2.2.4. AuNP fonctionnalisées par la ConA : Modification chimique avec le 2-iminothiolane

De manière à apporter une force de liaison plus importante, un protocole contenant une modification chimique d'une protéine a été suivi. Plusieurs méthodes sont classiquement employées telles que l'EDC/NHS comme il a été mentionné dans la revue de la littérature dans le Chapitre 1 de ce manuscrit (**article 1**). Cependant, il a été reporté que l'EDC peut modifier la structure de certaines protéines, allant de simples modifications structurelles jusqu'à la dénaturation pour l'hémoglobine [14]. C'est pour cela que nous avons décidé de ne pas utiliser cette méthode de modification chimique et, à la place, d'employer le 2-IT (Figure 13).

Le 2-IT interagit de manière spécifique avec les amines primaires $-NH_2$, telles que retrouvées dans les acides aminés des lectines. Cette interaction engendre une ouverture du cycle du 2-IT, formant une liaison amidine et introduisant un groupement sulfhydryl (-SH), possédant une forte énergie de liaison pour les AuNP ($1.6.10^2$ kJ.mol^{-1}) [15]. Le protocole établi a été basé sur l'étude de Ma et al [16] avec quelques modifications. Premièrement, une solution tampon de PBS a été utilisée pour solubiliser le 2-IT en ajustant son pH à 8 avec du NaOH 0,1 M. Le 2-IT a ensuite été introduit à une solution de ConA (30 nM dans PBS) à différents excès molaires (0, 5, 20 et 50) de 2-IT. La réaction du 2-IT avec la ConA s'est déroulée sous agitation lente pendant une heure à température ambiante avant d'être stoppée par une centrifugation dans une colonne de SEC et élution en PBS. Les AuNP sont ensuite ajoutées à la fraction obtenue après centrifugation pour permettre l'association des AuNP avec la ConA (dans du PBS) modifiée par le 2-IT. La représentation de ce protocole est illustrée en Figure 13.

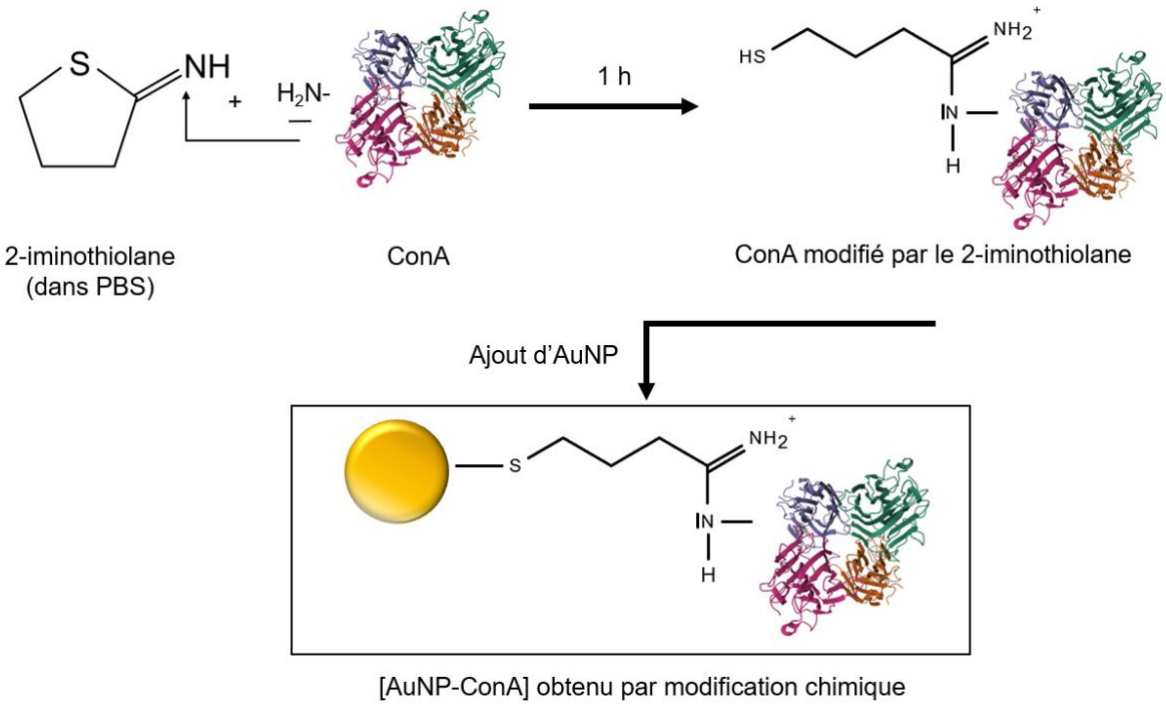


Figure 13. Représentation schématique du principe de modification chimique de la ConA par le 2-IT pour créer une liaison covalente avec l'AuNP.

Après ajout des AuNP à la ConA modifiée par le 2-IT et pour toutes les concentrations en 2-IT, un changement de couleur de la suspension de NP a été observé, passant de rouge à un bleu-gris foncé, caractéristique d'une agrégation colloïdale. Des analyses en spectroscopie UV-Visible ont montré que le signal d'absorbance était trop faible et aucune bande plasmonique n'a pu être observée.

Il est important d'ajouter que le 2-IT peut dénaturer la protéine si le site actif possède une amine libre. Dans ce cas, la protéine perdrait sa fonctionnalité et la méthode ne serait plus adaptée.

À la suite des résultats non-positifs de cette méthode (agrégation, absence de bande plasmonique), la volonté de lier la ConA de manière covalente aux AuNP a été mise de côté au profit de la méthode de développement employant l'adsorption de la ConA sur l'AuNP. Il est cependant important de mentionner que d'autres techniques peuvent être utilisées pour réaliser un couplage covalent de la lectine sur l'AuNP. En effet, l'utilisation de PEG [17] est une méthode très répandue et relativement simple à mettre en œuvre. Par ailleurs, notre équipe avait développé une méthode de fonctionnalisation des AuNP par le DHLA [18], celle-ci pourrait également être utilisée pour lier la ConA sur l'AuNP avec une force de liaison plus importante.

2.3. Conclusion

Pour conclure ce chapitre, différentes méthodes ont été testées pour associer la ConA aux AuNP. Nous avons montré que l'utilisation d'un milieu PBS perturbait la suspension et ne permettait pas d'obtenir des objets stables. Il a cependant été possible d'obtenir [AuNP-ConA] grâce à une simple addition d'un composé dans l'autre à un ratio molaire final identique dans un milieu citrate (natif des AuNP). Cet objet à été caractérisé par différentes méthodes (AFM, DLS, TEM, UV-Visible) pour définir sa morphologie et ses différentes dimensions (D_C et D_H). Des études de modélisations *via* la DM associées à des études des paramètres thermodynamiques *via* le quenching de fluorescence et d'AFM en mode force ont été menées. Celles-ci ont permis d'obtenir des conclusions sur les modes d'interactions mis en jeu entre AuNP et ConA, démontrant que leur interaction repose sur un système dynamique et sur des liaisons de faible énergie par des liaisons ioniques et que la ConA n'est pas capable de déplacer les ions citrate à la surface des AuNP. La suite de ce travail s'est consacrée à l'étude d'[AuNP-ConA] par la technique de TDA en mettant en place une nouvelle méthodologie d'analyse et de traitement des données. Cette méthode a été employée afin de mesurer les variations de D_H d'une manière alternative à la DLS. En effet, la question de la morphologie sphérique d'[AuNP-ConA] se pose, la DLS n'étant pas adaptée aux objets non-sphériques, et la TDA représentant une alternative pertinente. De plus, l'ajout de sucres et de LPS à [AuNP-ConA] permettra, grâce à la TDA, d'évaluer l'activité de reconnaissance de la ConA après adsorption sur les AuNP.

2.4. Références

[1] J. Turkevich, P. C. Stevenson, et J. Hillier, « A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold », *Discuss. Faraday Soc.*, vol. 11, nº 0, p. 55-75, janv. 1951, doi: 10.1039/DF9511100055.

[2] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, et R. Whyman, « Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system », *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, vol. 0, nº 7, p. 801-802, 1994, doi: 10.1039/C39940000801.

[3] C. Boukoufi, A. Boudier, S. Lahouari, J. Vigneron, et I. Clarot, « Activity and reusability of immobilized gold nanoparticles for the catalysis of both oxidation and reduction reactions », *Results in Chemistry*, vol. 5, p. 100979, janv. 2023, doi: 10.1016/j.rechem.2023.100979.

[4] M. Berthou *et al.*, « Gold nanostructured membranes to concentrate low molecular weight thiols, a proof of concept study », *Journal of Chromatography B*, vol. 1198, p. 123244, mai 2022, doi: 10.1016/j.jchromb.2022.123244.

[5] A. Pallotta *et al.*, « Analytical strategy for studying the formation and stability of multilayered films containing gold nanoparticles », *Anal Bioanal Chem*, vol. 413, nº 5, p. 1473-1483, févr. 2021, doi: 10.1007/s00216-020-03113-6.

[6] S. Christau, T. Moeller, J. Genzer, R. Koehler, et R. von Klitzing, « Salt-Induced Aggregation of Negatively Charged Gold Nanoparticles Confined in a Polymer Brush Matrix », *Macromolecules*, vol. 50, nº 18, p. 7333-7343, sept. 2017, doi: 10.1021/acs.macromol.7b00866.

[7] J. Djafari *et al.*, « Synthesis of Gold Functionalised Nanoparticles with the Eranthis hyemalis Lectin and Preliminary Toxicological Studies on Caenorhabditis elegans », *Materials*, vol. 11, nº 8, Art. nº 8, août 2018, doi: 10.3390/ma11081363.

[8] N. J. Anthis et G. M. Clore, « Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm », *Protein Sci*, vol. 22, nº 6, p. 851-858, juin 2013, doi: 10.1002/pro.2253.

[9] B. Valeur, *Invitation à la fluorescence moléculaire*, Bruxelles : De Boeck. 2004. Consulté le: 17 mars 2025. [En ligne]. Disponible sur: https://ulysse.univ-lorraine.fr/discovery/fulldisplay/alma991004768379705596/33UDL_INST:UDL

[10] Salmahaminati et D. Roca-Sanjuán, « The Photophysics and Photochemistry of Phenylalanine, Tyrosine, and Tryptophan: A CASSCF/CASPT2 Study », *ACS Omega*, vol. 9, nº 33, p. 35356-35363, août 2024, doi: 10.1021/acsomega.4c00875.

[11] Poilblanc René, *Spectroscopies infrarouge et Raman / René Poilblanc et François Crasnier*. in Collection Grenoble sciences. Les Ulis: EDP Sciences, 2006.

[12] A. Beaussart *et al.*, « Supported lysozyme for improved antimicrobial surface protection », *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 582, p. 764-772, janv. 2021, doi: 10.1016/j.jcis.2020.08.107.

[13] S. W. Bruun, A. Kohler, I. Adt, G. D. Sockalingum, M. Manfait, et H. Martens, « Correcting Attenuated Total Reflection—Fourier Transform Infrared Spectra for Water Vapor and Carbon Dioxide », *Appl Spectrosc*, vol. 60, nº 9, p. 1029-1039, sept. 2006, doi: 10.1366/000370206778397371.

[14] J. P. López-Alonso *et al.*, « Carbodiimide EDC Induces Cross-Links That Stabilize RNase A C-Dimer against Dissociation: EDC Adducts Can Affect Protein Net Charge, Conformation, and Activity », *Bioconjugate Chem.*, vol. 20, nº 8, p. 1459-1473, août 2009, doi: 10.1021/bc9001486.

[15] E. Pensa *et al.*, « The Chemistry of the Sulfur–Gold Interface: In Search of a Unified Model », *Acc. Chem. Res.*, vol. 45, nº 8, p. 1183-1192, août 2012, doi: 10.1021/ar200260p.

[16] X. Ma, A. Bussonniere, et Q. Liu, « A facile sonochemical synthesis of shell-stabilized reactive microbubbles using surface-thiolated bovine serum albumin with the Traut's reagent », *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 36, p. 454-465, mai 2017, doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.12.033.

[17] X. Gao *et al.*, « Lectin-conjugated PEG–PLA nanoparticles: Preparation and brain delivery after intranasal administration », *Biomaterials*, vol. 27, nº 18, p. 3482-3490, juin 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.038.

[18] J. Beurton, P. Lavalle, A. Pallotta, T. Chaigneau, I. Clarot, et A. Boudier, « Design of surface ligands for blood compatible gold nanoparticles: Effect of charge and binding energy », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 580, p. 119244, avr. 2020, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119244.

Chapitre III

Étude par analyse par dispersion de Taylor de de l'interaction de la Concanavaline A avec des nanoparticules d'or et détection de sucres et LPS

Chapitre 3

3. Étude par analyse par dispersion de Taylor de de l'interaction de la Concanavaline A avec des nanoparticules d'or et détection de sucres et LPS

Comme il a été décrit dans le Chapitre 2, des AuNP fonctionnalisées par voie directe avec la ConA ont été développées et caractérisées. La suite du projet de thèse impliquant les propriétés de reconnaissance envers les sucres de la ConA, il a été question d'ajouter des sucres et des éléments en contenant, tels que les LPS (Figure 6, Chapitre 1) dans l'environnement d'[AuNP-ConA]. De cette façon, il est possible d'évaluer les capacités de la ConA à se lier à sa cible après adsorption sur les AuNP et d'établir une méthode d'analyse du nouveau complexe formé. La méthode utilisée pour ces expérimentations est l'Analyse de la Dispersion de Taylor (Taylor Dispersion Analysis, TDA). Cette méthode a été choisie afin d'apporter des résultats complémentaires à la DLS, pour déterminer l'évolution du D_H d'[AuNP-ConA] en présence de différentes cibles. En effet, une reconnaissance des cibles par [AuNP-ConA] entraîne une modification de son D_H et traduit l'interaction de la cible avec le complexe. Les expérimentations ont été menées sur une électrophorèse capillaire (EC) P/ACE MDQ (Beckman Coulter, Brea, USA) équipée d'un détecteur à barrette de diodes (Diode Array Detector, DAD) possédant une gamme de longueur d'onde allant de 200 à 600 nm.
Le présent chapitre établit les bases théoriques et pratiques de la TDA, et introduit une méthode alternative de mise en œuvre et de traitement des Taylorgrammes obtenus *via* le mode « pulsé ». Après sa validation sur des molécules modèles (caféine, glutathion réduit (GSH), insuline, albumine de sérum bovin (bovin serum albumin, BSA) et AuNP), cette méthode a été appliquée à la caractérisation des [AuNP-ConA], en présence de sucres et de LPS (*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*) pour lesquels la ConA possède ou non une spécificité.

Ces travaux font l'objet de **l'article 3**, accepté dans le journal *Analytical Chemistry* de l'American Chemical Society: *Alternative Taylor dispersion analysis methodology for studying lectin-corona on gold nanoparticles for carbohydrates sensing* ; **Sephora Lahouari**, Ariane Boudier, Igor Clarot, Jérémie Gouyon.

3.1. L'analyse par dispersion de Taylor

3.1.1. Introduction à la TDA et fondement théorique

La TDA a été introduite en 1953 par Geoffrey Taylor [1]. Il y décrit le principe de détermination du coefficient de diffusion (D) d'un analyte *via* l'injection d'un échantillon dans un capillaire à l'intérieur duquel un liquide se déplace selon un flux laminaire (Figure 1). Le principe de cette méthode repose sur l'élargissement de la bande d'un échantillon dans un flux laminaire constant où il ne se produit pas de phénomène d'adsorption à la surface interne du capillaire et où le débit est contrôlé et constant. Un élargissement proportionnel à la taille de l'objet étudié sera observé : plus l'objet est grand (D petit), plus le pic sera élargi.

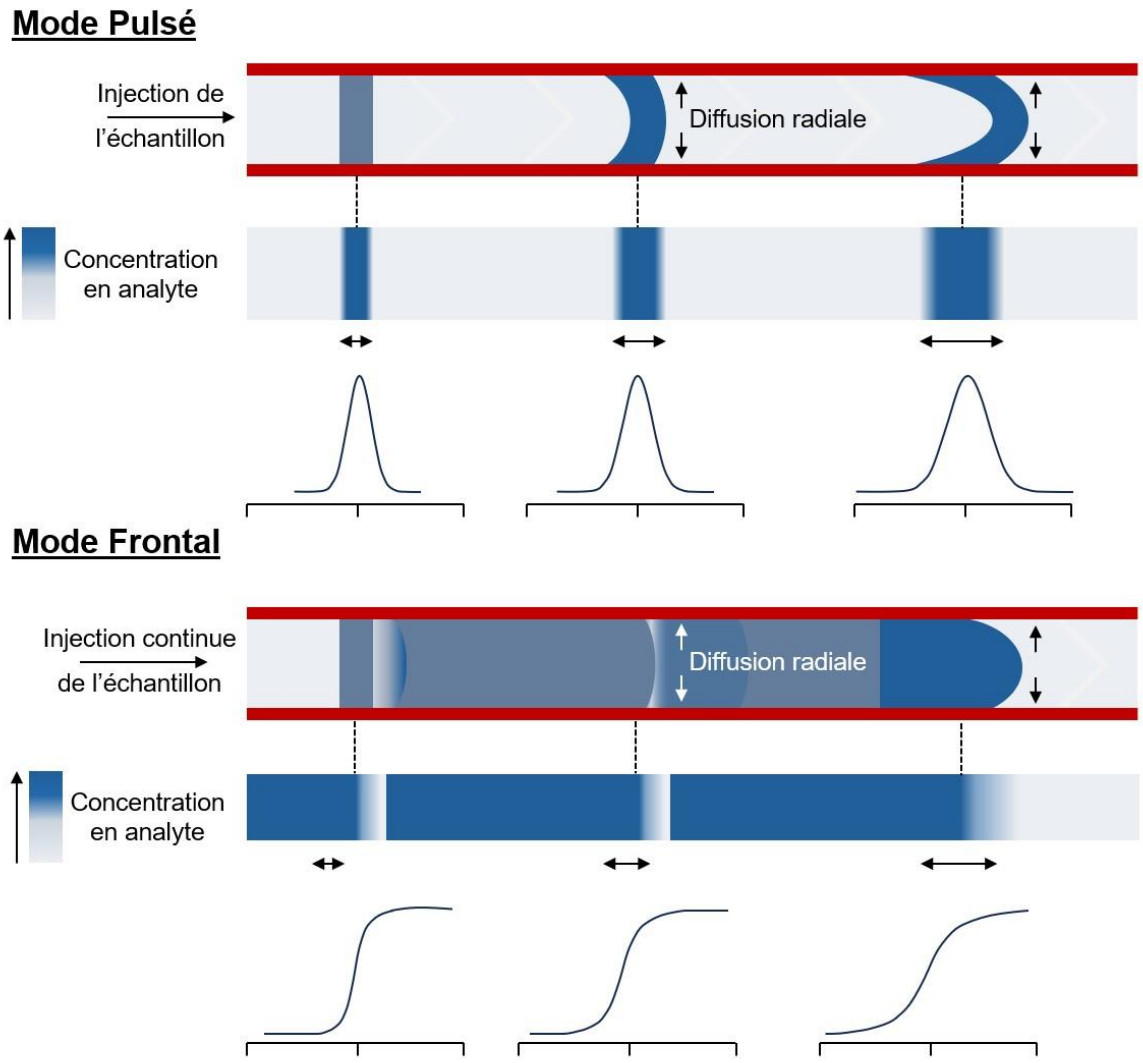


Figure 1. Représentation schématique de la TDA en mode pulsé/frontal et des Taylorgrammes obtenus.

L'obtention de D permet, après intégration dans l'équation de Stokes-Einstein (Equation 1), de déterminer le r_h (et par conséquent le D_H) de l'analyte étudié.

$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

Avec D_H, le diamètre hydrodynamique, k, la constante de Boltzmann ($1.380\ 649.10^{-23}$ $J.K^{-1}$), T la température (K), η la viscosité (Pa.s) et D le coefficient de diffusion ($m^2.s^{-1}$).

L'appareillage d'EC est parfaitement adapté à la réalisation de la TDA de par ses fonctionnalités : (i) la possibilité d'injecter des échantillons dans un capillaire à des volumes contrôlés (ordre de grandeur du nL), (ii) le contrôle du débit (stable et répétable) (iii) le couplage à un mode de détection (avec un détecteur UV ou DAD dans la majorité des cas), (iv) les dimensions micrométriques des capillaires employés et (v) l'acquisition de données [2].
Les capillaires usuellement employés avec l'EC (et donc pour la TDA) sont composés de silice fondue et revêtus de polyimide. La surface interne du capillaire est donc recouverte de groupements silanols (Si-OH). Le diamètre interne (*internal diameter*, i.d.) du capillaire est généralement compris entre 10 et 100 µm. La longueur du capillaire (longueur totale, L_{tot}), quant à elle, est comprise entre 10 et 100 cm [3]. Les dimensions (i.d., L_{tot}) ainsi que les paramètres d'injection (volume d'injection V_{inj}, pression de mobilisation ΔP) doivent être choisies de façon à respecter les conditions d'utilisation de la TDA qui seront explicitées dans la suite de ce chapitre. Néanmoins, la nature de la surface interne du capillaire peut entraîner des phénomènes d'adsorption des analytes, délétères à l'application de la méthode. De manière à limiter cette adsorption, il est possible de modifier la surface interne du capillaire (greffage covalent, dynamique, modification du tampon) [4].

La TDA permet de combler les inconvénients des autres méthodes disponibles pour la détermination de taille. Par exemple, la détermination de taille (D_c ou D_H) *via* les méthodes de microscopies telles que la TEM ou l'AFM est dépendante du champ de vision et ne reflète pas l'environnement réel d'une solution puisqu'une étape d'immobilisation de l'échantillon est nécessaire. La DLS, quant à elle, permet d'obtenir de manière rapide des informations concernant la taille d'analytes en solution ainsi qu'un indice de polydispersité. Cependant, cette méthode comporte plusieurs limitations telles que la sensibilité des mesures à la température, la nécessité de l'objet à caractériser à être supérieur à 1 nm, la nécessité de l'échantillon à être assez transparent pour que le laser puisse le traverser mais ne devant pas non plus être trop dilué sous peine de fausser les résultats. De plus, les particules ne doivent pas posséder de

fluorescence, ne doivent pas interagir avec le laser et doivent être sphériques. Par ailleurs, comme le signal d'intensité de DLS est dépendant de la taille de l'analyte élevé à la puissance de 6, les agrégats ou poussières affectent grandement les résultats de mesure [5]. Ceci peut poser des problèmes de sensibilité lorsque des particules de petites tailles sont à caractériser [6].
La TDA présente différents avantages : sa mise en œuvre n'exige pas de calibration préalable; elle peut être effectuée avec des volumes restreints de l'ordre du nanolitre [7]; elle permet de déterminer des tailles allant de l'ordre de petites molécules jusqu'à des particules nanométriques [8]. Par ailleurs, la TDA peut distinguer l'agrégation des complexes en suspension [9] et ne surestime donc pas le D_H contrairement à la DLS.

La TDA s'effectue classiquement selon deux modes : (i) le mode pulsé (*pulse mode*) et (ii) le mode frontal (*frontal mode*). Le mode pulsé consiste en l'injection d'un petit volume d'échantillon à l'entrée du capillaire (moins d'1% du volume entre l'entrée et la fenêtre de détection du capillaire) suivi d'une mobilisation à pression fixe avec une solution sans la cible [10]. Les Taylorgrammes obtenus décrivent un pic Gaussien dont la largeur est proportionnelle à la taille de l'analyte à caractériser [11]. Le mode pulsé possède toutefois une limite de sensibilité dû à la quantité réduite de volume d'échantillon injecté, limite qui peut être contournée en utilisant des détecteurs plus performants (fluorescence, spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS) [12], [13]) ou alors en utilisant le mode frontal. Le mode frontal consiste à injecter continuellement l'échantillon jusqu'à son arrivée à la fenêtre de détection, ce qui se traduit en un Taylorgramme en forme de demi-vague après remplissage du capillaire par l'échantillon. Le principe de chaque mode et les courbes respectives obtenues sont présentés dans la Figure 1.

La TDA repose sur le principe de dispersion de Taylor. Cette dispersion est présente lorsqu'un fluide avec une vélocité non-uniforme (plus rapide au centre du capillaire et plus lent contre les parois) est soumis à une diffusion moléculaire (représenté par « diffusion radiale » dans la Figure 1). La dispersion de Taylor permet de déterminer la concentration locale en analyte (C) en fonction de la position axiale x, de la position radiale r et du temps t [2]. La vitesse moyenne du fluide (u) est calculée selon la longueur entre le point d'injection (l'entrée du capillaire) et le point de détection (fenêtre) divisé par le temps nécessaire pour atteindre le détecteur. R_C est le rayon du capillaire.

Selon l'équation (3) suivante :

$$\frac{\partial \mathrm{C}}{\partial t} + 2u\left(1 - \frac{\mathrm{r}^2}{{R^2}_C}\right)\frac{\partial \mathrm{C}}{\partial \mathrm{x}} = D\left(\frac{\partial^2 \mathrm{C}}{\partial^2 \mathrm{x}} + \frac{1}{r}\frac{\partial}{\partial \mathrm{r}} r \frac{\partial \mathrm{C}}{\partial \mathrm{r}}\right) \quad (3)$$

Avec u correspondant à l'équation (4) :

$$u = \frac{L_{det}}{t_r} \quad (4)$$

Avec L_{det} la longueur entre l'entrée du capillaire et la fenêtre de détection et t_r le temps de rétention (s).

Pour les modes pulsé et frontal, les équations décrivant les Taylorgrammes sont obtenus en négligeant la diffusion le long de l'axe. L'équation (5) relative au mode pulsé est décrite ci-dessous : $\bar{C} = \frac{\mathrm{M}}{2\pi^{3/2}{R_C}^2\sqrt{kt}} exp\left[-\frac{(t-t_r)^2}{2\sigma^2}\right]$ (5)

Avec, $\bar{C}$ la concentration moyenne en analyte dans la section transversale du capillaire en fonction du temps t et à une position fixée sur le capillaire, t est le temps (s), t_r est le temps de rétention (s), M est la masse des particules en solution (g), R_C est le rayon du capillaire (m), k est le coefficient de dispersion (m².s-1) et σ est la racine carrée de la variance temporelle du profil d'élution (s).

L'équation (6) correspondant au mode frontal est décrite ci-dessous :

$$\frac{\bar{C}}{\overline{C_0}} = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} erf\left[\frac{(t-t_r)}{\sigma\sqrt{2}}\right] \quad (6)$$

$\overline{C_0}$ représente la concentration de l'analyte dans la partie remplie du capillaire (correspondant au plateau sur la courbe en demi-vague) et *erf* est la fonction d'erreur.

σ est directement liée à k selon l'équation (7) ci-dessous :

$$\sigma^2 = 2\frac{kt_r}{u^2} \quad (7)$$

L'équation (8) de Taylor-Aris permet la détermination du coefficient de diffusion D à partir de k *via* l'équation ci-dessous :

$$k = D + \frac{{R_c}^2 u^2}{48\mathrm{D}} \quad (8)$$

D peut donc être déterminé à partir de t_r et σ² obtenus par les équations décrites ci-dessus.

Pour pouvoir effectuer la TDA et obtenir des déterminations de tailles précises, deux conditions supplémentaires, dénommées les conditions de Taylor, doivent être respectées. La première condition concerne le fait que la TDA prend en compte la diffusion radiale et néglige la diffusion longitudinale. De manière à satisfaire cette condition, le taux d'advection doit être significativement plus important que le taux de diffusion. Cette condition est satisfaite lorsque le nombre de Péclet (Pe) est supérieur à 69 [14]. Pe est défini par l'équation (9) pour un capillaire cylindrique comme étant :

$$Pe = \frac{\mathrm{u}R_C}{\mathrm{D}} \tag{9}$$

Avec u, la vitesse moyenne du fluide, R_C le rayon du capillaire et D le coefficient de diffusion. La deuxième condition concerne le temps durant lequel l'échantillon doit être mobilisé dans le capillaire de manière à observer les élargissements de bande dus à la dispersion de Taylor. Il a été déterminé un facteur de temps correspondant au temps nécessaire à une molécule pour diffuser à travers le rayon du capillaire. Ce facteur est noté τ et doit être supérieur à 1.4 [15], [16], [17]. Il est cependant important de mentionner que certaines divergences sur cette valeur limite sont reportées avec des valeurs minimales de τ décrites comme étant 1.25 ou 2.5 [6]. Cependant, les démonstrations mathématiques ne semblent pas aussi robustes que celles déjà décrites pour τ > 1.4. Ce paramètre est défini par l'équation (10) comme suit :

$$\tau = \frac{{R^2}_C}{D} \tag{10}$$

Lorsque ces deux conditions sont respectées, l'utilisation de σ est validée et donc, D peut être déterminé en utilisant l'équation (11) ci-dessous :

$$D = \frac{{R^2}_C t_r}{24\ \sigma^2} \tag{11}$$

Avec R_c le rayon du capillaire, t_r le temps de rétention (s) et σ² la variance du pic.

La valeur de σ se trouvant impactée par l'adsorption d'analytes sur la surface interne du capillaire mais également par les rampes de pression à l'injection, il existe une manière d'approximer ou de négliger ce dernier paramètre en utilisant la TDA avec deux fenêtres de détection. Certains appareils d'EC possèdent ou peuvent être modifiés pour ajouter une seconde fenêtre de détection (Figure 2) mais une équipe a proposé de boucler le capillaire afin qu'il passe deux fois devant le même détecteur [18]. Ce mode n'a pas été utilisé durant cette thèse

car l'interface disponible ne permettait pas de modification. D est déterminé avec cette méthode selon une modification de l'équation de Taylor-Aris, présenté en équation (12)

$$D = \frac{Rc^2}{24\,(\sigma_2^2 - \sigma_1^2)}(t_2 - t_1) \tag{12}$$

Avec t_1 et t_2 les temps de rétention (s) de l'échantillon jusqu'à la première et deuxième fenêtre de détection respectivement et σ_1 et σ_2 les variances des pics aux deux fenêtres.

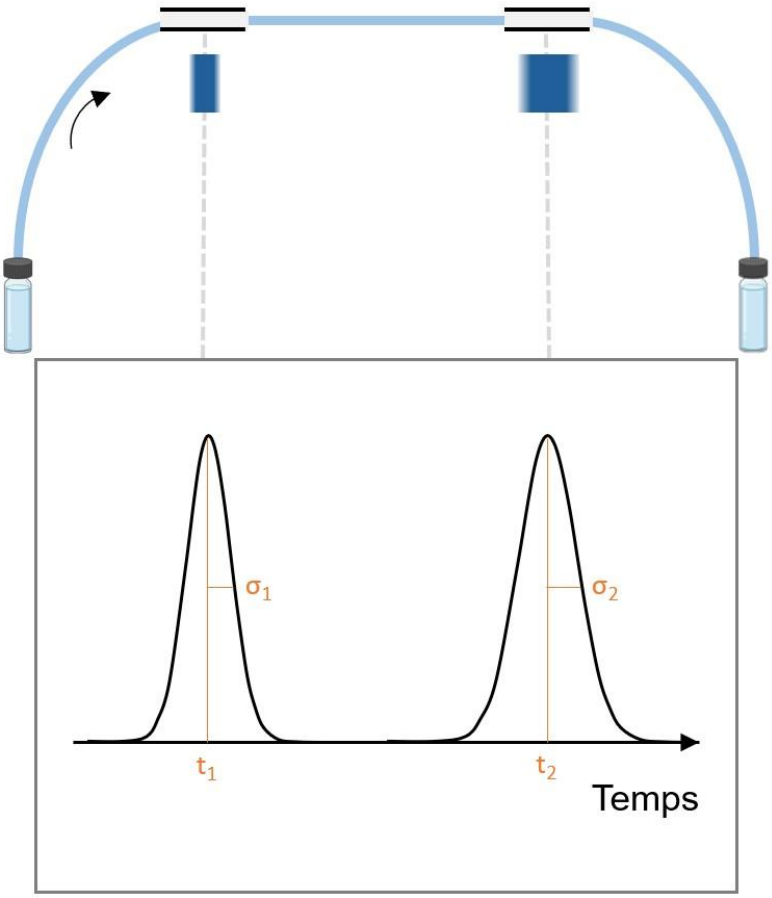


Figure 2. Représentation schématique de la TDA à deux fenêtres de détection.

3.1.2. Hypothèse de travail

La TDA est donc une méthode adaptée à la détermination du D_H des NP. Diverses études emploient déjà la TDA à cette fin, notamment pour les NP métalliques [14]. De ce fait, la TDA peut être appliquée à ce projet de thèse de manière à mesurer l'évolution de la taille des AuNP avec et sans ConA. De plus, la TDA permet d'évaluer le D_H dans un milieu comportant plusieurs analytes différents, ceci est surtout intéressant lorsqu'il s'agit d'étudier des composés censés interagir ou non avec la ConA. L'ajout de cibles peut rendre l'utilisation de la DLS inadaptée puisque l'ajout de sucres et de LPS peut former un complexe non-sphérique ou même dissocier la ConA de l'AuNP. La DLS étant sensible à l'agrégation, elle ne représente pas une technique adaptée puisqu'il est nécessaire de discriminer les différents objets obtenus.
De cette manière, la TDA permettra une détermination de taille plus précise que la DLS puisqu'elle détectera l'agrégation et les valeurs obtenues ne seront pas sujettes à des surestimations.
La TDA comporte deux modes d'utilisation, le mode frontal et le mode pulsé. Une étude précédente de notre équipe a décrit une nouvelle méthode alternative au mode frontal, dénommée le *cross-frontal* (ou frontal croisée s'il fallait apporter une traduction) [11].

Du fait de la faible sensibilité du mode pulsé (dû à un faible volume d'injection), une nouvelle approche mathématique est proposée, dénommée par la suite mode *dual-erf*. Cette approche permet une sensibilité plus accrue que le mode pulsé pour les échantillons faiblement concentrés car le volume injecté n'est plus limité (< 1% du $V_{det,}$ volume entre l'entrée du capillaire et la fenêtre de détection en mode pulsé). Ce mode, en plus d'être étendu à des volumes d'injection importants, simplifie le traitement mathématique des données car il n'y a pas nécessairement besoin d'effectuer d'ajustement (*fitting*) des données pour extraire les grandeurs d'intérêt. Ce mode est également simple à mettre en œuvre puisqu'il ne nécessite pas de modification de l'appareil d'EC et peut donc être employé en lieu et place du mode pulsé tel que décrit actuellement.

Le *dual-erf* se met en œuvre de la même manière que le mode pulsé à la différence que le volume d'injection peut être plus important (Figure 3) :

1. Remplissage du capillaire avec un tampon (solution sans analyte)
2. Injection de l'échantillon (volume jusqu'à 30% de V_{det})
3. Mobilisation de l'échantillon avec le tampon
4. Injection continue de l'échantillon

Ceci permet d'obtenir un Taylorgramme grâce auquel $\bar{C}$ et $\overline{C_0}$ peuvent être obtenus (Figure 3a). La représentation schématique de la mise en œuvre du mode *dual-erf* ainsi qu'une vue représentative d'un Taylorgramme sont représentés en Figure 3 ci-dessous.

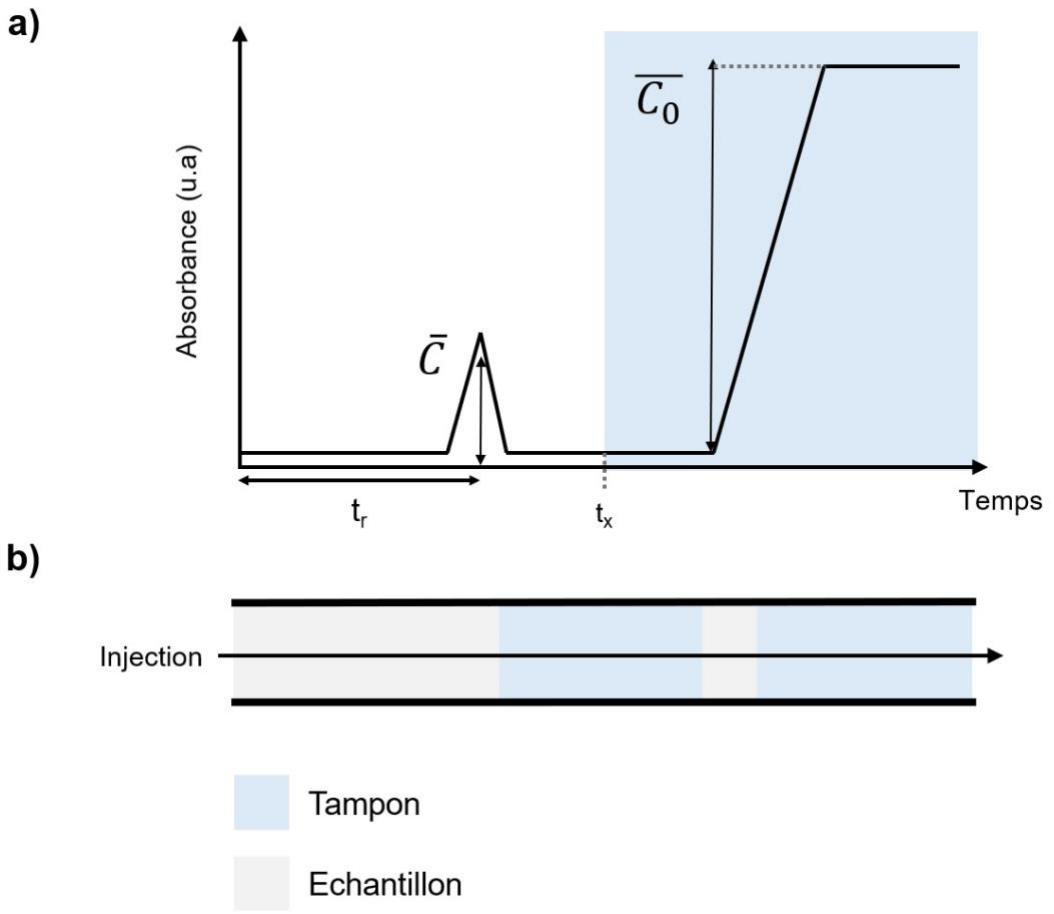


Figure 3. Représentation schématique a) d'un Taylorgramme en mode dual-erf, la partie bleue représente le moment où l'échantillon est poussé par le solvant dans le capillaire. b) du profil du capillaire en mode dual-erf.

Le pic obtenu sur le Taylorgramme à t = tr, pour des volumes d'injection important, ne peut plus être décrit par une courbe Gaussienne. L'hypothèse du mode *dual-erf* consiste à considérer que le pic obtenu à t_R est la somme de deux demi-vagues (deux fronts) décalées l'une de l'autre d'une durée correspondant à t_{inj}. Ces deux Taylorgrammes seront dénommés i et j par la suite et sont représentés dans la Figure 4.

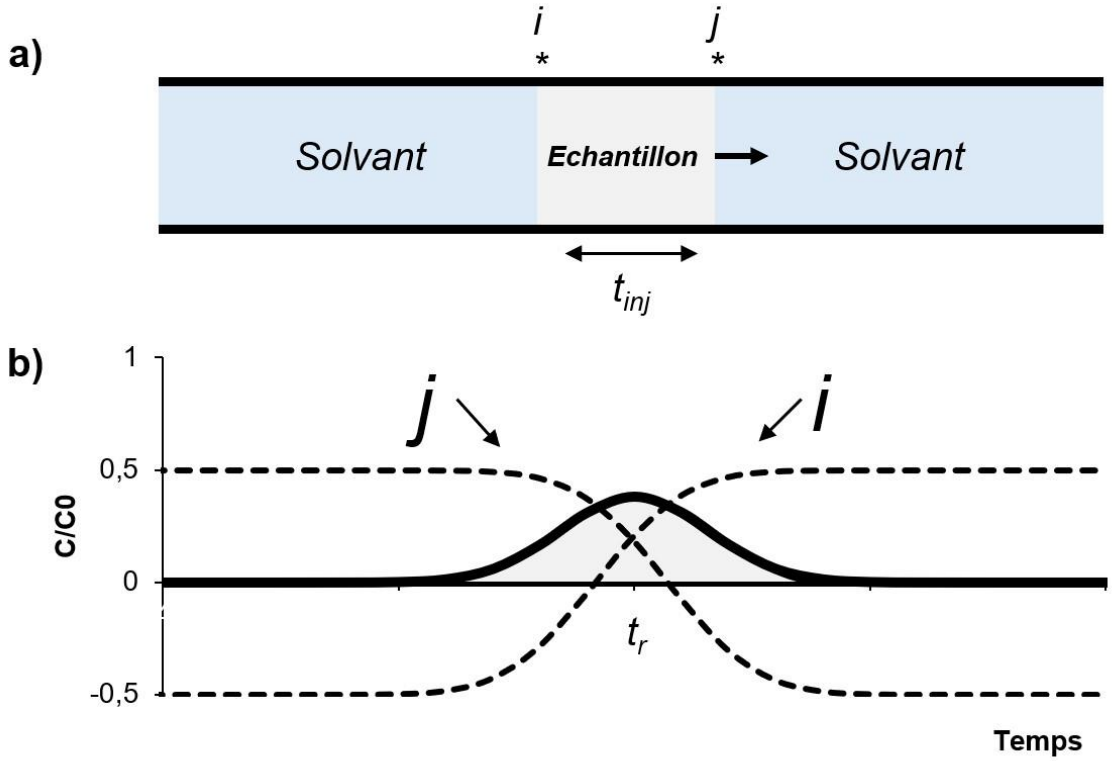


Figure 4. Représentation de l'obtention des Taylorgrammes i et j obtenus aux deux limites de la prise d'échantillon dans le capillaire.

3.1.2.1. Démonstration mathématique du mode dual-erf

Comme mentionné précédemment dans la partie théorique, le Taylorgramme résultant du mode frontal est donné par l'équation (5) préalablement définie.

En se basant sur l'injection échantillon-tampon-échantillon à la même vélocité et en considérant le flux comme étant laminaire, chaque interface tampon-échantillon du mode pulsé dual-erf peut être décrite par deux demi-vagues, nommées i et j (voir Figure 4). Ces deux Taylorgrammes i et j sont définis par les équations (13) et (14) respectivement comme :

$$\frac{\overline{C_\iota}}{\overline{C_0}} = \frac{1}{2} erf \left[\frac{t - \left(t_r + \frac{t_{inj}}{2} \right)}{\sigma\sqrt{2}} \right] \tag{13}$$

$$\frac{\overline{C_J}}{\overline{C_0}} = -\frac{1}{2} erf \left[\frac{t - \left(t_r - \frac{t_{inj}}{2} \right)}{\sigma\sqrt{2}} \right] \tag{14}$$

Le Taylorgramme final est égal à la somme des demi-vagues i et j, et peut être exprimé par l'équation (15) suivante :

$$\frac{\overline{C_\iota}}{\overline{C_0}} + \frac{\overline{C_J}}{\overline{C_0}} = \frac{1}{2} erf \left[\frac{\left(t - \left(t_r + \frac{t_{inj}}{2} \right) \right)}{\sigma\sqrt{2}} \right] - \frac{1}{2} erf \left[\frac{\left(t - \left(t_r - \frac{t_{inj}}{2} \right) \right)}{\sigma\sqrt{2}} \right] \tag{15}$$

Cette expression peut donc être employée pour décrire les pics obtenus peu importe le volume injecté, et permet (en théorie) d'étendre l'usage du mode pulsé sans limitation. Un ajustement (par variation de t_R, t_{inj} et σ) permet donc de retrouver les grandeurs d'intérêt dans la détermination de D.

Il est toutefois possible d'éviter l'ajustement des courbes. En effet, lorsque $t = t_r$, c'est-à-dire à l'intersection des Taylorgrammes i et j (*i.e.* le sommet du pic), l'équation (14) peut être simplifiée comme décrit dans l'équation (16) :

$$\frac{\overline{C_\iota}}{\overline{C_0}} + \frac{\overline{C_J}}{\overline{C_0}} = \frac{1}{2} \mathrm{erf} \left[\frac{t_{inj}}{\sigma 2\sqrt{2}} \right] - \frac{1}{2} \mathrm{erf} \left[\frac{-t_{inj}}{\sigma 2\sqrt{2}} \right] \tag{16}$$

et puisque $\mathrm{erf}\,(-a) = -\,\mathrm{erf}\,(a)$, l'équation suivante est obtenue :

$$erf^{-1} \frac{\bar{C}}{\overline{C_0}} = \frac{t_{inj}}{\sigma 2\sqrt{2}} \tag{17}$$

En pratique, cela signifie que le rapport de l'intensité du signal obtenu au sommet de pic (proportionnel à C) sur l'intensité du signal au sommet de la demi-vague (proportionnel à C_0) peut être utilisé pour la détermination de σ. En effet, le tracé de erf^{-1} (C/C_0) en fonction du t_{inj} (contrôlé par l'appareillage) permet l'obtention d'une droite de pente égale à $\frac{1}{\sigma 2\sqrt{2}}$.

Cette approche, ainsi que l'ajustement de la courbe expérimentale par l'équation 12, nécessite toutefois la connaissance de C_0, correspondant au signal obtenu lorsque le capillaire est rempli d'échantillon. Autrement dit, il n'y a pas d'avantages apparents quant à l'utilisation de cette approche par rapport au mode frontal, puisqu'une étape d'injection continue de l'échantillon demeure indispensable. Toutefois, l'équation (18) (décrivant la valeur du signal au sommet du pic) peut être simplifiée comme suit :

$$\frac{\overline{C_i}}{\overline{C_0}} + \frac{\overline{C_j}}{\overline{C_0}} = erf\left[\frac{t_{inj}}{2\sigma\sqrt{2}}\right] \tag{18}$$

Finalement, $\bar{C}$ peut être défini comme (19) :

$$\bar{C} = \overline{C_0}\,\mathrm{erf}\left[\frac{t_{inj}}{2\sigma\sqrt{2}}\right] \tag{19}$$

L'évolution de $\bar{C}$ en fonction de t_{inj} peut donc être représentée selon l'équation (19). En pratique, C étant directement proportionnelle à l'absorbance maximale du pic, il est possible de tracer l'absorbance maximale (obtenue à t_R) en fonction du t_{inj} puis d'ajuster le signal en faisant varier C_0 et σ. En effectuant plusieurs mesures pour plusieurs t_{inj}, il est donc possible de tracer cette évolution, comme en Figure 5, permettant de déterminer σ

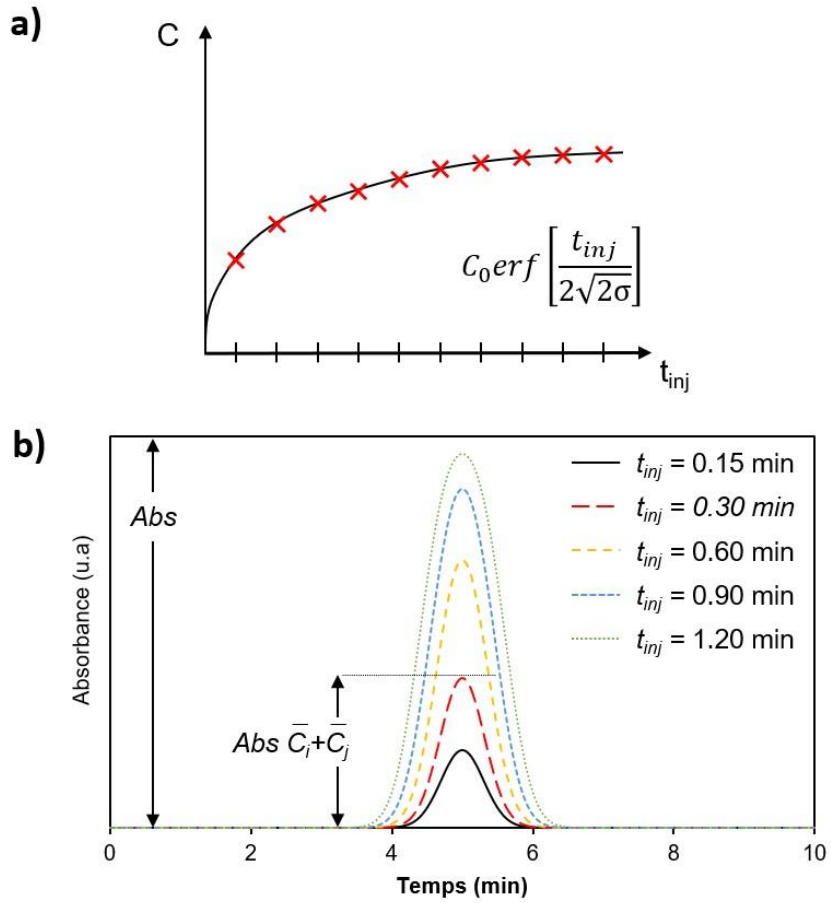


Figure 5. a) représentation graphique de l'évolution de $\overline{C}$ en fonction de t_{inj} et b) méthode de détermination de $\overline{C}$.

3.1.2.2. Application

Les AuNP (citrate, natives) ont tout d'abord été analysées par TDA en mode pulsé afin de tenter de déterminer leur D_H. Cependant, le Taylorgramme obtenu traduit un manque crucial de sensibilité (Figure 6). Ceci est expliqué par un bruit de fond très important à la longueur d'onde considérée (514 nm) qui diminue la sensibilité de la technique, mais aussi par le faible niveau de concentration de l'échantillon (environ 60 nM).

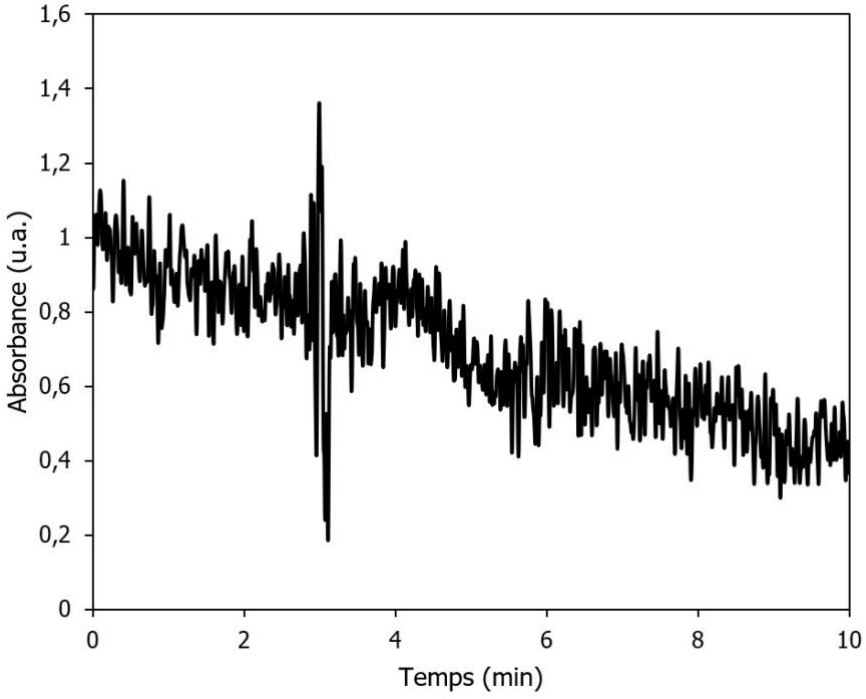


Figure 6. Taylorgramme d'AuNPs en mode pulsé. Paramètres : Capillaire en silice fondue, longueur du capillaire = 40 cm, Ldet = 30 cm, i.d = 75 µm, tinj = 5 s, pression = 0.4 psi, 514 nm.

Le mode *dual-erf* pourrait donc servir d'alternative afin d'augmenter la sensibilité du Taylorgramme tout en ne limitant plus le volume d'échantillon à injecter par rapport au mode pulsé, mais en consommant moins d'échantillon que le mode frontal.

Si le mode *dual-erf* parvient à résoudre le problème de sensibilité, alors la caractérisation des AuNP pourra s'effectuer *via* cette méthode (voir Figure S2). De plus, la caractérisation d'[AuNP-ConA] pourra être réalisée de manière à observer les variations de tailles selon le sucre ou le LPS ajouté au milieu. Ces hypothèses et les résultats associés font l'objet d'une publication en cours de soumission dans le journal Analytical Chemistry : *Alternative Taylor dispersion analysis methodology for studying lectin-corona on gold nanoparticles for carbohydrates sensing ;* Sephora Lahouari, Ariane Boudier, Igor Clarot, Jérémie Gouyon. L'article et ses données complémentaires sont exposés ci-après.

3.2. Article 2 : Alternative Taylor dispersion analysis methodology for studying lectin-corona on gold nanoparticles for carbohydrates sensing

Accepté le 30 juin 2025 dans Analytical Chemistry.

Chapitre III

Alternative Taylor dispersion analysis methodology for studying lectin-corona on gold nanoparticles for carbohydrates sensing

Sephora Lahouari[a,b], Ariane Boudier[a,b,c], Igor Clarot[a,b], Jérémie Gouyon[a,d]

[a] Université de Lorraine, CITHEFOR, F-54000 Nancy, France

[b] Université de Lorraine, CNRS, LRGP, F-54000 Nancy, France

[c] Institut Universitaire de France (IUF), France

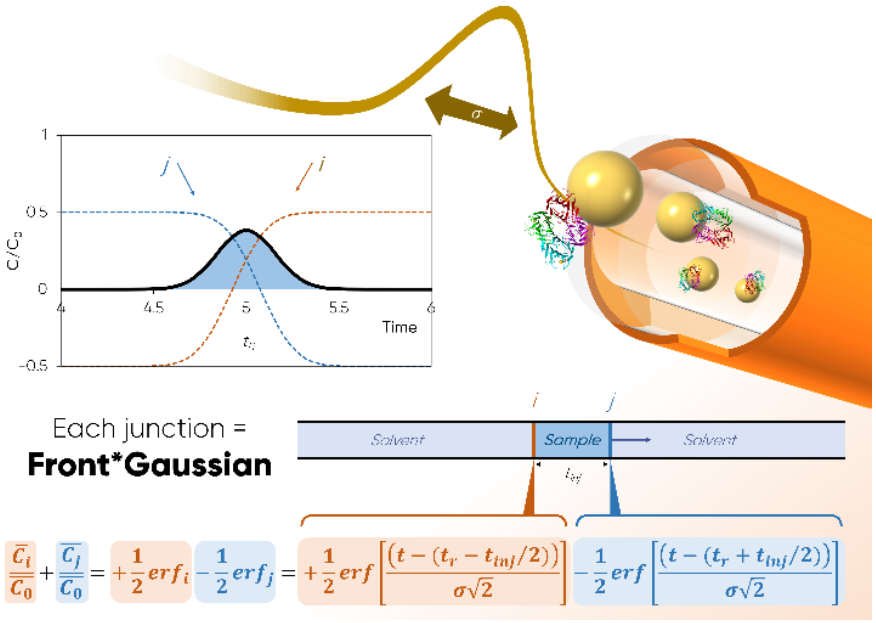
[d] Université de Lorraine, CNRS, LCPME, Nancy F-54000, France

* Corresponding author : Jérémie Gouyon – Université de Loraine, CNRS, LCPME, Nancy F-54000, France ; orcid.org/0000-0002-8834-9009; Email : jeremie.gouyon@univ-lorraine.fr

Abstract

Taylor dispersion analysis (TDA) is a technique used for the measurement of the molecular diffusion coefficient (D) of species (organic or inorganic). It is based on band broadening of a sample in a laminar flow. Pulse mode is one of the modes by which TDA can be performed. In this mode, a Gaussian fitting of the signal is required. We propose here an alternate fitting model for the pulse mode, denoted as dual-erf fitting. It allows the injection of larger sample volume in the capillary (> 1% Vcap), thus extending the use of pulse mode to low concentrated sample. Accurate determination of D of caffeine, reduced glutathione (GSH), insulin from bovine pancreas, bovine serum albumin (BSA) and citrate-capped gold nanoparticles (AuNP) are presented. Theoretical aspects and methodology are described, showing a good correlation between the so-called dual-erf fitting and reported values of the literature. Application of TDA is then performed to study the interaction mechanism between a lectin (concanavalin A, ConA) and AuNP. Finally, a particular focus on the recognition ability of AuNP-ConA nanoprobe toward carbohydrates moieties (monosaccharides and lipopolysaccharides) is studied.

Graphical abstract



Introduction

Proteins are known to interact with colloidal nanoparticles (NP), forming a corona through an adsorption phenomenon [1]. This process can be leveraged for developing nanocarriers for drug delivery [2] or designing nanobiosensors [3]. Such NP-protein complexes are advantageous due to their ease of production, as no chemical modifications are typically required; the proteins are simply incubated in a solution containing the colloidal NP. Lectins are a promising class of proteins for biosensing applications. These proteins, derived from plants, animals or fungi, exhibit strong affinities for sugar moieties – for instance, jacalin with galactose or concanavalin A (ConA) with D(+)glucose and D(+)mannose [4]. This high affinity is widely used in agglutination assays [5] and glucose sensing [6] for instance, and it strongly depends on the accessibility of the protein recognition sites. Understanding lectins binding capacities under different conditions (e.g., in the presence of interfering agents or when coupled with NP) is therefore critical for their evaluation. Testing the interaction between lectins and their targets becomes particularly significant when lectins are conjugated. This is especially relevant in cases where protein corona formation alters the protein's conformation and consequently its recognition ability. A nanoprobe – composed of a lectin adsorbed onto a NP – may lose its effectiveness, making careful characterization a crucial step before practical use [7]. When a protein interacts with a NP to form a nanoprobe, or when the nanoprobe interacts with its intended target, one key parameter to be assessed is the size, directly correlated to its diffusion coefficient (D). As the nanoprobe binds to its target and forms larger complexes, D decreases with increasing size. The sizes of the nanoprobe and the resulting complexes can be measured using techniques such as Dynamic Light Scattering (DLS), Atomic Force Microscopy (AFM), or Taylor Dispersion Analysis (TDA) [8,9].

TDA is a technique used to determine D of molecular and nanoscale species [10]. It is effective for characterizing both organic [11,12] and inorganic [9,13] molecules, including peptides, proteins and NP, and can be conveniently implemented using capillary electrophoresis (CE) devices [14] coupled with a variety of detector, such as UV-Visible, fluorescence [15], mass spectrometry (MS) [12] or inductively coupled plasma MS [16]. TDA complements DLS [17] by offering the ability to measure hydrodynamic radii (r_H) as small as 1 nm, and even lower. TDA operates within a laminar Poiseuille flow, where the broadening of analyte peaks is directly related to D. The use of micrometer-scale capillaries in CE systems makes TDA both accessible and practical [18]. As such, TDA can be employed to characterize nanoprobes and assess their target recognition capabilities.

TDA is typically performed in one of two modes: pulse or frontal [19]. Both approaches require fitting the signal to an appropriate mathematical model. Recently, our team introduced a third approach, the cross-frontal mode [20], which offers similar advantages over the frontal mode but eliminates the need for signal fitting in monomodal sample characterization using peak height value. Each mode produces distinct Taylorgram profiles, summarized in **Figure 1**. In pulse mode, a finite plug of the analyte is

injected [21]. For the results to be accurately modeled by a Gaussian distribution, the injected volume must be less than 1% of the capillary volume between the inlet and detection window. This limitation affects the sensitivity of the method, as the detector (typically UV-Visible) relies on the amount of injected analyte. While increasing the injected volume improves sensitivity, it disrupts the Gaussian model's applicability. Efforts to enhance sensitivity – such as incorporating fluorescence detection for lower limit of detection – are ongoing but require changes to the detection system or experimental setup [22]. Still, mathematical approaches are also feasible: P. Lemal et al. proposed treating Taylor dispersion as a linear time-invariant system [23]. Based on this approach, they derived an expression for the Taylorgram applicable to uniform or moderately polydisperse particles, accounting for arbitrary injection and detection volumes. This extension enhances the model's validity for larger injection and detection volumes, offering a significant advantage over classical TDA methods. It enables the use of Pulse mode for samples with low sensitivity due to factors like low concentration or inadequate detection methods.

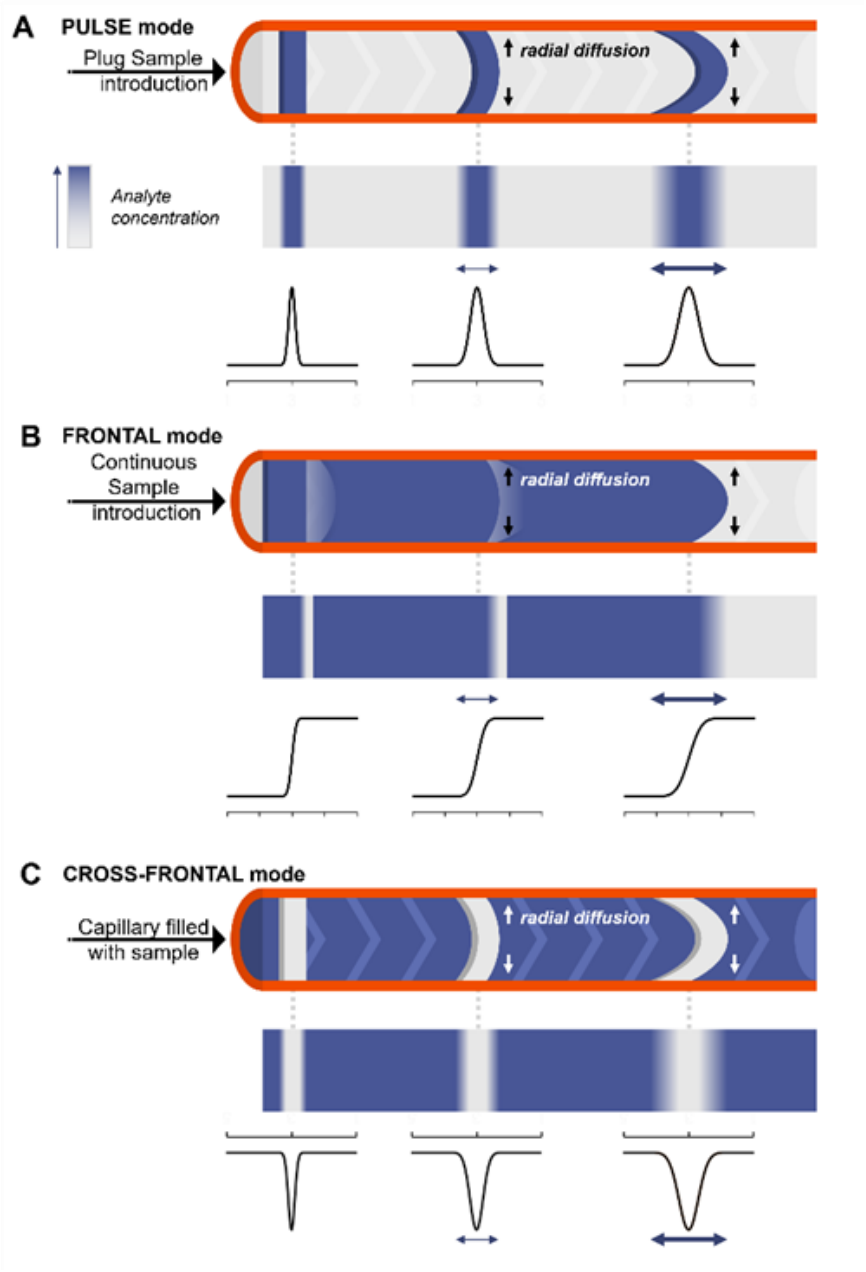


Figure 1. General scheme of the different approaches to perform TDA, and their corresponding profile: (A) Pulse mode, (B) Frontal mode, (C) Cross-frontal mode

In this paper, we propose the use of an alternative mathematical model (considering a linear time-invariant system) for the description of Taylorgram for the analysis of NP (gold, AuNP) and protein interaction (lectin). This model describes Taylorgram obtained using pulse mode, and allows for the use of increased injection volume (up to 30% of the volume of the capillary instead of 1%). This model has been applied to a large variety of analytes, from small-organic molecule to inorganic NP, for validation. Comparison with Gaussian model and with results using frontal mode are presented for monomodal samples, and discussion regarding the general solution from [23] is aborded. This approach was applied to study the formation of AuNP-ConA complex (denoted as nanoprobes) through direct

functionalization. Their ability to recognize carbohydrate functions was then evaluated using various sugars and lipopolysaccharides (LPS), revealing the evolution of D for the different analyzed species.

Experimental section

Materials and reagents, Apparatus and TDA experimental methodologies are available in supplementary information.

Application to lectin-AuNP characterization and sugar/LPS interaction study.

For the analysis of lectin interactions with AuNP and target molecules (D(+)glucose, D(+)mannose, D(-)fructose, LPS), TDA experiments were conducted in a 40 cm bare fused silica capillary, 75 µm i.d. (Macherey Nagel, Hoerdt, France) to meet the necessary conditions, ensuring that the Peclet number (Pe) and dimensionless residence time (τ) reached the required values for model validation (see Dual-erf fitting mathematical description section for more details). Indeed, larger values of r_H are expected (> 10 nm). Unless otherwise stated, all experiments were conducted as follows and repeated 3 times: the capillary was first conditioned with 0.1 M NaOH and deionized water (2 min, 10 psi) before being filled with 1.5 mM sodium citrate. The sample was then injected for 20 s at 0.5 psi, followed by a hydrodynamic injection of sodium citrate (5 min, 0.5 psi) and subsequently another hydrodynamic injection of the sample (5 min, 0.5 psi), as represented in supplementary information (see Figure S1). The UV detector was set at 220, 280, and 514 nm, depending on the studied analyte (220 nm for ConA, 280 and 514 for AuNP-based nanoprobes). The injected volume represents 11.3% of the total volume between the inlet and the detection window of the capillary.

Results and discussion

Dual-erf fitting mathematical description.

The current mathematical representation of the Taylorgram, modeled as a Gaussian distribution over time S(t), is expressed by Equation 1 [16]:

$$S(t) = y_0 + \frac{A}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{1}{2}\frac{(t-t_R)^2}{\sigma^2}\right) (1)$$

with t the experimental time, t_R the mean residence time of the solute, y_0 the baseline intensity, A a constant which depends on analyte concentration and detection sensitivity, and σ^2 the mean temporal variance.

The mathematical model proposed in this work is based on a different hypothesis. In frontal mode, the Taylorgram is described by Equation 2 [24]:

$$\frac{\bar{C}}{\overline{C_0}} = \frac{1}{2} \pm \frac{1}{2} front * Gaussian = \frac{1}{2} \pm \frac{1}{2} erf\left[\frac{(t-t_R)}{\sigma\sqrt{2}}\right] (2)$$

with $\bar{C}$ the mean solute concentration across the section of the capillary, $\overline{C_0}$ the concentration of the front, erf the error function being the convolution of a front and a Gaussian function. D being related to σ through equation 3, its determination is used to estimate r_H using the Stokes-Einstein's equation:

$$D = \frac{r_c^2}{24\sigma^2} t_R (3)$$

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H} (4)$$

With r_c, capillary radius (m), k_B the Boltzmann constant ($1.380649.10^{-23}$ $m^2.kg.s^{-2}.K^{-1}$), T the temperature (K) and η the viscosity of the medium (Pa.s). It is to be noted that τ and Pe (equation 5 and 6) have to fulfilled conditions so as to validate TDA use:

$$\tau = \frac{Dt_0}{r_c^2} > 1.4 (5) \text{ and } Pe = \frac{ur_c}{D} > 69 (6)$$

Our methodology involves associating each front of the initial plug with a mathematical representation of a front, centered at 0 instead of 0.5. In essence, the signal is modeled as the convolution of the injection (represented by a block pulse) and the dispersion (represented by a Gaussian). Each front of the plug is described by Equations 7 and 8:

$$\frac{\bar{C}_\iota}{\overline{C_0}} = +\frac{1}{2} front_i * Gaussian = +\frac{1}{2} erf_i = +\frac{1}{2} erf\left[\frac{(t-(t_R-t_{inj}/2))}{\sigma\sqrt{2}}\right] (7)$$

$$\frac{\overline{C_J}}{\overline{C_0}} = -\frac{1}{2} front_j * Gaussian = -\frac{1}{2} erf_j = -\frac{1}{2} erf\left[\frac{(t-(t_R+t_{inj}/2))}{\sigma\sqrt{2}}\right] (8)$$

with $\overline{C_\iota}$ and $\overline{C_J}$, the mean solute concentration across the section of the capillary at the interface i and j respectively (see **Figure 2A**) and t_{inj} the injection time.

The sum of both fronts gives the general description of the Taylorgram (equation 9):

$$\frac{\bar{C}_i}{\bar{C}_0} + \frac{\bar{C}_j}{\bar{C}_0} = +\frac{1}{2}erf_i - \frac{1}{2}erf_j = +\frac{1}{2}erf\left[\frac{(t-(t_R-t_{inj}/2))}{\sigma\sqrt{2}}\right] - \frac{1}{2}erf\left[\frac{(t-(t_R+t_{inj}/2))}{\sigma\sqrt{2}}\right] \quad (9)$$

Representation of the Taylorgram is given in **Figure 2B**. The peak height and wave height values are used to determine $\bar{C}$ and $\overline{C_0}$ respectively. This description will be denoted as "dual-erf" fitting/model in the following section.

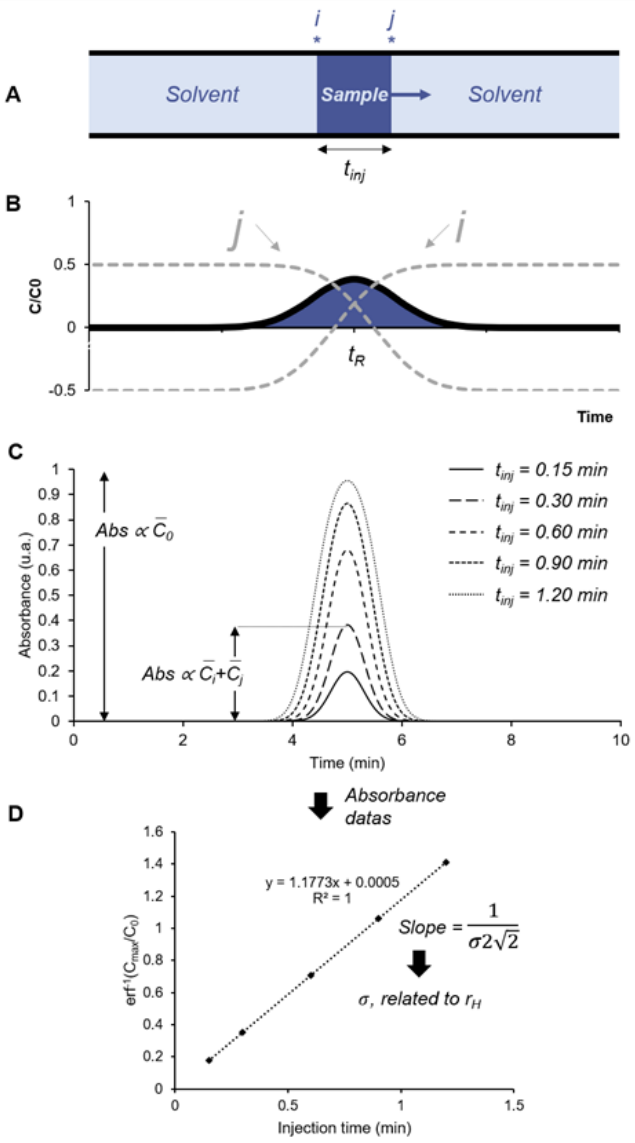


Figure 2. (A) Schematic capillary profile of the pulse mode and (B) typical example of resulting Taylorgram centred on t_R. Sample (blue) contains the analyte to be measured. (C) Calculated Taylorgrams using variable t_{inj} for t_R = 5 min and σ = 0.15 min and (D) eq. (10) plot for the second determination method of σ, used to calculate diffusion coefficient D and r_H.

Experimental results in ideal cases.

Using TDA methodology, D and r_H were determined for caffeine (194.2 g/mol), GSH (307.3 g/mol), insulin (approximately 5 kDa), BSA (approximately 66 kDa), and AuNP. These measurements employed Gaussian, dual-erf, and frontal fitting approaches. The results obtained through pulse (Gaussian and dual-erf fitting) and frontal modes are summarized in Table 1 and Taylorgrams are represented in Figure S2**.** The ratios of the r_H estimated using Gaussian/frontal and dual-erf/frontal fitting methods are depicted in **Figure 3** as functions of injection time (or injection volume).

Table 1. Calculated values of r_H of different analytes using different mathematical description to fit the experimental signal and associated referenced values.

	Pulse		**Frontal**	
	Gaussian	*Dual-erf*	*Frontal*	
Sample	D ($.10^{-10}$ $m^2.s^{-1}$)			**Reported values from literature or our work**
	r_H (nm)			
	τ / Pe			Ref
Caffeine *(from 1 to 9% V_{cup})*	4.97 ± 1.13	6.93 ± 0.10	7.14 ± 0.06	
	0.43 ± 0.10	**0.29 ± 0.01**	**0.28 ± 0.01**	**0.32[a] - 0.491** ± *0.008*[a]
	34 / 173	*48 / 124*	*50 / 119*	25–27
GSH *(from 1 to 9% V_{cup})*	3.93 ± 0.69	5.09 ± 0.06	5.24 ± 0.07	
	0.56 ± 0.14	**0.39 ± 0.01**	**0.38 ± 0.01**	**0.36[b] - 0.81** ± *0.05*[c]
	25 / 239	*34 / 177*	*34 / 174*	28,29
Insulin *(from 3 to 15% V_{cup})*	1.71 ± 0.37	2.15 ± 0.11	2.08 ± 0.02	
	1.23 ± 0.29	**0.94 ± 0.04**	**0.96 ± 0.01**	**1.05** ± *0.10*[d] **- 1.7**[a]
	12 / 509	*15 / 406*	*18 / 325*	30,31
BSA *(from 6 to 30% V_{cup})*	5.80 ± 1.60	7.70 ± 0.64	8.05 ± 0.69	
	3.67 ± 1.02	**2.61 ± 0.22**	**2.50 ± 0.23**	**3.30[d] - 4.84** ± **0.03**[a]
	7 / 956	*10 / 721*	*11 / 656*	25,32,33
AuNP *(from 6 to 30% V_{cup})*	6.42 ± 1.28	9.15 ± 1.02	8.68 ± 1.34	
	3.26 ± 0.72	**2.22 ± 0.24**	**2.37 ± 0.35**	**3.2** ± 0.2 *(vol, DLS)*
	4 / 1465	*6 / 1028*	*10 / 609*	

Each set of data is calculated by estimation of the average value obtained for every injected volume (n=3 per volume, 5 tested volumes p

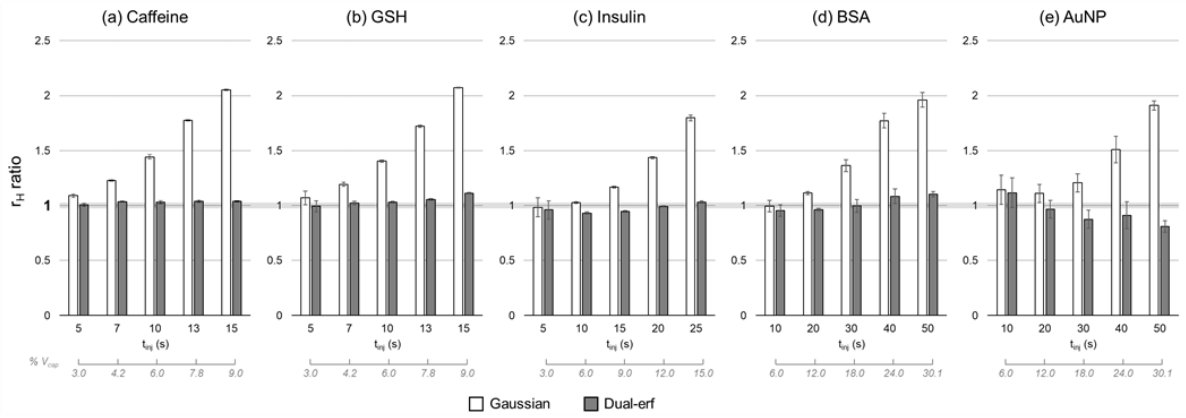


Figure 3. r_H of Gaussian (white bar) or dual-erf (grey bar) fitting on r_H of frontal fitting ratio as a function of t_{inj} (or V_{inj}, grey) for (a) caffeine, (b) GSH, (c) Insulin, (d) BSA and (e) AuNP. n=3, results are presented as a mean ± standard deviation of three independent measurements.

R_H of caffeine was measured using both pulse methods (Gaussian and dual-erf fittings) and frontal mode (frontal fitting). When the dual-erf function was used to fit the Taylorgram, the r_H was determined to be 0.29 ± 0.01 nm, which aligns closely with the range of 0.32 to 0.49 nm reported in the literature [25–27]. These results are also comparable to those obtained using the frontal mode (0.28 ± 0.01 nm). Conversely, results from Gaussian fitting showed a clear dependence on the t_{inj}, leading to an overestimation of r_H under all tested conditions (with a mean value of 0.43 ± 0.10 nm). This overestimation is attributed to the large sample injection volumes, which exceeded 1% of the capillary volume between the inlet and the detection window (ranging from 3% to 9%). While Gaussian fitting requires injection volumes below 1%, the dual-erf model remains reliable even with larger injection volumes (up to 9% in this case).

Figure 3a illustrates the evolution of the r_H ratio as a function of t_{inj} for the different fitting models, clearly demonstrating the agreement between dual-erf and frontal fitting results, whereas the Gaussian model becomes unreliable at higher injection volumes. A similar trend is observed for all other tested molecules, as discussed in subsequent sections.

For GSH, similar observations were made, showing good agreement between the dual-erf fitting (0.39 ± 0.01 nm), frontal fitting (0.38 ± 0.01 nm), and literature values (ranging from 0.36 to 0.81 nm [28,29]). As with caffeine, an overestimation of the r_H value was observed when using Gaussian fitting, yielding a mean r_H of 0.56 ± 0.14 nm.

For insulin, Gaussian fitting produced an r_H value of 1.23 ± 0.29 nm, which is included the literature range of 1.05 ± 0.10 to 1.7 nm [30,31]. Nonetheless, the calculated r_H value is strongly dependent on the injected volume (varying from 0.95 ± 0.09 for V_{inj} = 3 % to 1.73 ± 0.04 nm for V_{inj} = 15%), which shows that the fitting model is not adequate for every tested injection volume. In this case, the injected

volume reached up to 15% of the total capillary volume, significantly deviating from the conditions required for accurate Gaussian fitting. This deviation explains the high variability in the obtained results. Conversely, dual-erf fitting (0.94 ± 0.04 nm) and frontal fitting (0.96 ± 0.01 nm) yielded results consistent with the literature, demonstrating their suitability for the characterization of this protein.

For AuNP, DLS measurements yielded an r_H value of 3.2 ± 0.2 nm. Using dual-erf fitting and frontal fitting, slightly lower values were obtained (2.22 ± 0.24 nm and 2.37 ± 0.35 nm, respectively). This aligns with expectations since DLS is an intensity-based method (converted to volume), while TDA is a mass-based method due to the UV-Visible detector used. The DLS value is expected to be higher than the r_H measured via TDA. However, results obtained using Gaussian fitting were higher (3.26 ± 0.72 nm) and showed greater variability. As the injected volume increased, so did the deviation, as shown in **Figure 3e**, with injection volumes reaching up to 30% of the total capillary volume. This highlights the unsuitability of the Gaussian model under these conditions.

To evaluate the applicability of the dual-erf model in comparison to the general solution from [23], Taylorgrams of insulin (with t_{inj} of 15 s and 25 s) and AuNP (with t_{inj} of 20 s and 50 s) were fitted using the function described in the SI, and shown in Figure S3 & S4. Qualitatively, a slight discrepancy is observed between the two models, particularly since the general solution produces a slightly asymmetrical signal due to the minor contribution of the cumulative signal measured at the detection window (corresponding to a low δt value; see SI for details). Both fitting approaches provide a good approximation of the signal for both analytes at the shortest t_{inj}. However, as the t_{inj} increases (25 s for insulin and 50 s for AuNP), the deviation of the general solution from the experimental data becomes more pronounced compared to the dual-erf model.

Notably, for AuNP, the general solution exhibits a significant deviation, particularly reflected in the altered peak height. The sum of squared residuals (SSR) was calculated for both fitting methods and compared; in all cases, the SSR values were higher for the general solution than for the dual-erf model (see Table S1). Moreover, the r_H values obtained from both fitting methods are consistent at low t_{inj} but diverge for longer t_{inj} of insulin (1.12 ± 0.07 nm, see Table S1). This discrepancy can be attributed to the decreasing accuracy of the general solution for a given set of operational parameters (such as mobilization pressure, i.d., …), which becomes more pronounced with decreasing particle size, as previously described in [23]. The use of the dual-erf fitting yields results comparable to those of the general solution while avoiding deviations from the experimental data at longer t_{inj}. Although this improved agreement at higher t_{inj} may seem unexpected, it highlights the robustness of the dual-erf approach in such conditions and looks like a promising model toward simplification of the mathematical treatment of the Taylorgrams.

Experimental results in case of adsorbed sample.

Since BSA is prepared at near-neutral pH without the addition of a surfactant or chemical modification of the inner capillary wall, the protein can undergo non-specific adsorption. This is evident from the asymmetric signals observed in the Taylorgram. To characterize samples affected by adsorption, fitting can be performed on the left-half curve of the signal for both pulse and frontal modes, as suggested in previous research [34]. Using this approach, the r_H of BSA was estimated at 2.61 ± 0.22 nm with dual-erf fitting and 2.50 ± 0.23 nm with frontal fitting (Table). In contrast, Gaussian fitting yielded a significantly higher r_H value of 3.67 ± 1.02 nm. This discrepancy is notable when compared to literature values, which range from 3.3 to 4.8 nm [25,32,33]. This is attributed to the adsorption of BSA under the tested conditions, as well as changes in viscosity due to the high protein concentration. This adsorption could be restricted by an appropriate surface coating (whether dynamic or static), but it falls outside the scope of this study.

Injection time dependency and peak-height method approaches.

Using dual-erf mathematical model, it is possible to correlate t_{inj} with the ratio $\overline{C_{max}}/\overline{C_0}$, which can be defined as the relative peak-height of the signal (ratio between the peak-height and the wave intensity). The model described in equation 9 can be rewritten, for $t = t_R$, as follow (equation 10):

$$erf^{-1}\left(\frac{\overline{C_{max}}}{\overline{C_0}}\right) = \frac{t_{inj}}{2\sqrt{2}\sigma} \quad (10)$$

Theoretically, for different t_{inj}, the previous expression will fit a linear curve with a slope equal to $1/(2\sqrt{2}\sigma)$. This methodology is based upon the same approach as described by our group in a previous study, the so-called cross-frontal methodology [20]. The limitations remain the same: (i) adsorption needs to be prevented, (ii) TDA conditions are to be fulfilled, (iii) t_{inj} must be controlled and (iv) t_{inj} must be limited to avoid to high value of C/C_0. The main difference here, is about sample consumption: instead of working with a capillary filled with the sample, the experimental relies on Pulse mode, i.e. injections of sample pulses. Using variable volumes of sample (correlated to variable t_{inj}), plot of eq. (10) can be used to calculate σ. An illustration of this approach is presented in **Error! Reference source not found.**Figure 2C-D. Using this mathematical model, r_H was estimated for every tested molecule using previous data (see figure S5): for caffeine, a value of 0.24 ± 0.02 nm was obtained; for GSH, 0.32 ± 0.03 nm; for insulin, 0.93 ± 0.02 nm; for AuNP, 1.83 ± 0.30 nm; for BSA, 2.89 ± 0.09 nm. The results agree with the fitting operation (<16% deviation), except for AuNP and BSA. Indeed, a deviation from the model was observed for AuNP at the largest t_{inj} (50 s), attributed to the high variability of the inverse error function erf^{-1} when $\frac{\overline{C_{max}}}{\overline{C_0}}$ ratio is close to one. As a result, this methodology (using of equation 10) should be applied within a reasonable range of injection volumes to prevent capillary saturation and deviation from the linear model. Without considering this high t_{inj} value (i.e. keeping the values of t_{inj} 10/20/30/40 s), the estimated r_H of AuNP is 2.28 ± 0.30 nm, which is consistent with

previous observations. In the case of BSA, this deviation, similar to previous observations, can be attributed to undesirable adsorption. Using this model, no fitting of the signal is required, as for the cross-frontal mode previously developed [20]. Nonetheless, determining $\overline{C_0}$ (the concentration of the front) is still necessary, which implies to increase sample consumption due to capillary filling (see step (v) in **TDA experimental methodology** section).

One way to overcome the experimental determination of $\overline{C_0}$ (and thereby reduce the injection volume) is to directly use the peak height value $\overline{C_{\max}}$ from the Taylorgram obtained for various t_{inj}. By plotting $\overline{C_{\max}}$ as a function of t_{inj}, the signal can be fitted to equation (11), derived from equation (9):

$$\overline{C_{max}} = \overline{C_0}\ erf\left(\frac{t_{inj}}{2\sqrt{2}\sigma}\right) \quad (11)$$

By using data from previous acquisitions, the deviation between the experimental results and the theoretical representation of $\overline{C_{max}}$ can be minimized by adjusting the values of $\overline{C_0}$ and σ (see figure S6). In this case, r_H was estimated to: for caffeine, 0.26 ± 0.01 nm; for GSH, 0.38 ± 0.06 nm; for insulin, 0.96 ± 0.12 nm; for AuNP, 2.97 ± 0.17 nm; for BSA, 2.40 ± 0.24 nm. Good accuracy was obtained for all results, except for AuNP. This discrepancy can be attributed to a strong deviation of the model (equation 11) at the lowest tested t_{inj}, which strongly influences the fitting procedure. Indeed, if the injection time (t_{inj} = 10 s) is excluded, the r_H drops to a value of 2.60 ± 0.31 nm, aligning more closely with the value obtained using the frontal approach. Since the derivative of erf is high at shorter t_{inj}, even small variations in $\overline{C_{max}}$ will have a larger impact on the determination of σ, thus affecting r_H determination. This highlights a general consideration: careful selection of t_{inj} is crucial, as values that are too low or too high can lead to greater model deviations. Still, using this methodology, multiple injections are sufficient to accurately estimate r_H of a given species, without requiring signal deconvolution.

As described, depending on the procedure applied, too low or too high t_{inj} might lead to misinterpretation, and to stronger deviation of the final r_H value. To help to predict the sensitivity of a measurement to both temporal shifts and changes in the dispersion profile, we can introduce a contrast function $C(t_{inj},\sigma)$ represented in **Figure 4** (see SI for more details about its construction). This function quantifies the ability of a point (t_{inj},σ) to discriminate profile variations induced by Taylor dispersion. The contour lines indicate optimal regions for selecting a value of t_{inj} based on the expected theoretical σ. The most contrasted region (light blue) corresponds to (t_{inj},σ) pairs for which the function is most sensitive, and thus most informative for identifying or estimating σ from observations. This contrast matrix enables the identification of optimal (t_{inj},σ) pairs for enhancing the characterization of dispersion profiles, and better approximation of the r_H value.

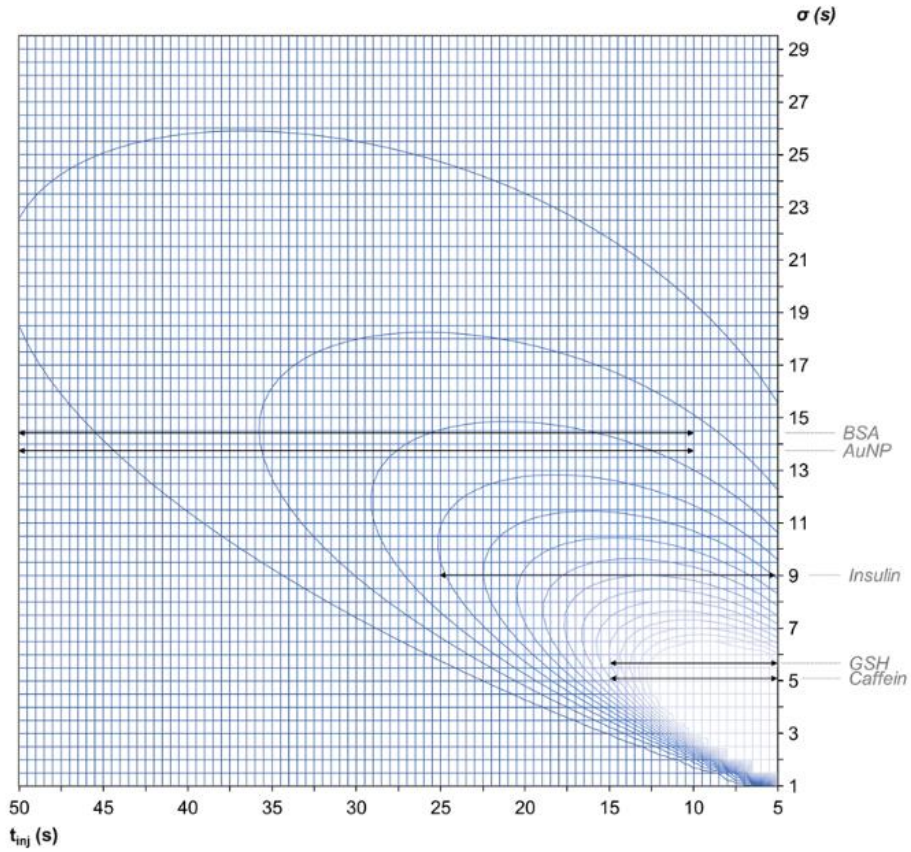


Figure 4. C(t_{inj},σ) function representation, evaluated numerically over a discrete grid. The contrast matrix is visualized as a map and can be used for the determination of optimal t_{inj} depending on the theoretical σ expected. Arrows indicate the t_{inj} selection range for each tested analyte. *The figure free of arrows is available in SI (figure S7).*

AuNP-ConA complex formation and aggregation.

A fresh batch of AuNP was synthesized and characterized for the experiments. DLS measurements indicated an r_H of 2.9 ± 0.3 nm, while TDA results (see **Figure 5a**)) using the dual-erf approach, yielded values of 2.69 ± 0.06 nm (514 nm). As for the previous section, the results show slight differences, as DLS is an intensity-based method, which tends to slightly overestimate r_H compared to TDA. The same method was applied for ConA size determination. In solutions with a pH below 6, ConA is known to form dimers [35], with a reported r_H of 3.3 nm [36,37]. To verify this, ConA was prepared in citrate buffer at pH 5.5 and analyzed using the dual-erf methodology, yielding an r_H of 2.60 ± 0.15 nm. This result was consistent with the frontal approach measurement (3.02 ± 0.43 nm) and, as in the case of BSA, indicated a deviated value compared to the literature, attributed to adsorption of the protein to the inner surface of the capillary.

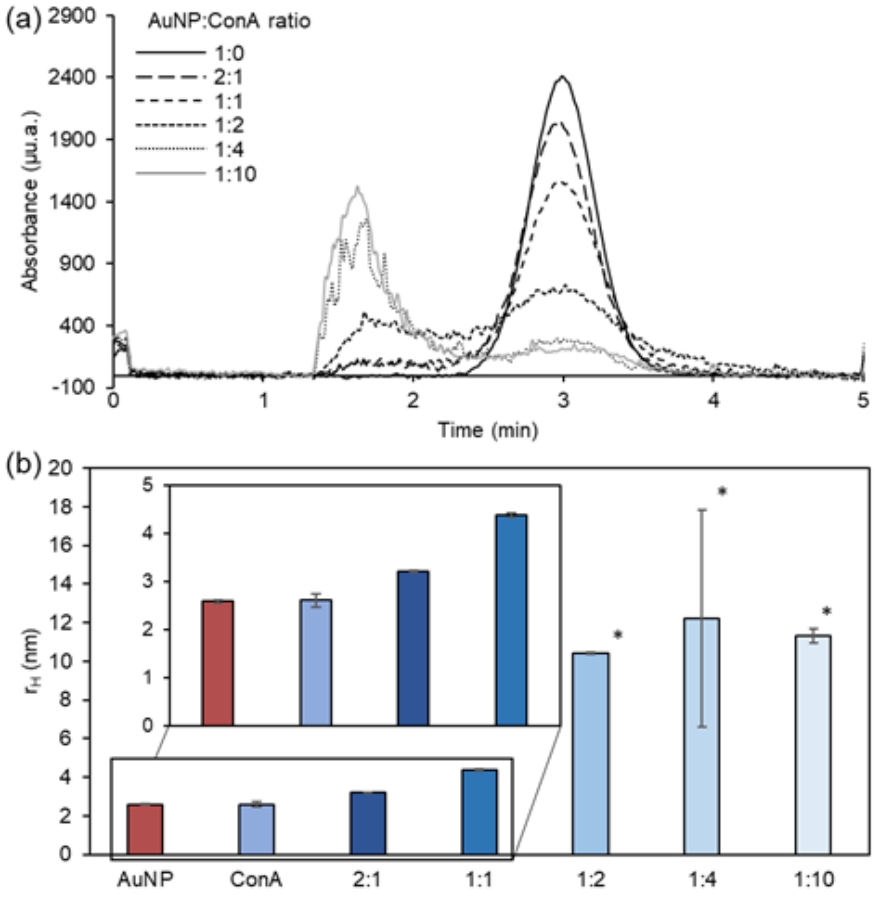


Figure 5. (a) Taylorgrams of different AuNP:ConA ratio samples and (b) r_H values evolution obtained using dual-erf approach. *Fitting obtained on the portion of the curve with no aggregates. Ratio 1:0 corresponds to citrate-capped AuNP alone.

Citrate-capped AuNP were exposed to ConA to form a protein corona, with AuNP:ConA molar ratios varying from 10:1, 8:1, 6:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, to 1:10 (with a fixed AuNP concentration of 50 nM in citrate buffer). Taylorgram results (see **Figure 5a)** and Table 2) indicate a progressive signal change, characterized by peak broadening (due to an increase in r_H), a change in plasmon band (up to 526 nm for 1:10 ratio) and the emergence of a noisy peak, characteristic of aggregation. The latter is stronger with higher protein concentration, suggesting a reduction in electrostatic repulsion between NP, ultimately leading to flocculation. Aggregates being larger, they are not flowing at the same velocity as the other analytes since they are not following a Taylor regime, but rather a convective regime[38]. Despite the aggregation, peak fitting using a dual-erf approach allowed for r_H estimation (**Figure 5b**)), ranging from 2.71 ± 0.13 nm for AuNP:ConA 10:1 to 11.3 ± 0.4 nm for ratio 1:10. From the results, it is clear that there is an evolution of the r_H as a function of the quantity of ConA introduced. Higher ConA concentrations result in the formation of progressively larger complexes, most likely consisting of multiple proteins and AuNP. This aggregation process follows three distinct stages: (i) for low protein content, the NP remain in suspension due to charge repulsion and steric hindrance, (ii) for a

critical protein concentration, the protein adsorption begins, modifying NP stability, initiating the aggregation process, and (iii) for higher protein concentration, rapid increase in r_H occurs, due to extensive aggregation. This allegation is supported by the change in plasmon band, which highlights a change in the electronic environment of the AuNP attributed to the presence of proteins in its corona.

Table 2. Calculated values of r_H of AuNP, ConA, AuNP-ConA for different AuNP:ConA ratio and AuNP-carbohydrates. AuNP to a constant concentration of 50 nM.

Sample		***Mode dual-erf***
		D ($.10^{-11}$ $m^2.s^{-1}$)
		r_H (nm)
	AuNP	7.41 ± 0.44
	(514 nm)	**2.69 ± 0.06**
	ConA (dimer form)	7.73 ± 0.44
	(220 nm)	**2.60 ± 0.15**
AuNP:ConA ratio	*10:1*	7.39 ± 0.36
	-*	**2.71 ± 0.13**
	8:1	7.11 ± 0.15
	-*	**2.82 ± 0.06**
	6:1	6.83 ± 0.19
	-*	**2.93 ± 0.09**
	4:1	6.74 ± 0.17
	-*	**2.97 ± 0.08**
	2:1	6.24 ± 0.04
	-*	**3.21 ± 0.02**
	1:1	4.58 ± 0.05
	*+ 1 nm**	**4.37 ± 0.05**
	1:2	1.92 ± 0.01
	*+ 4 nm**	**10.41 ± 0.05**
	1:4	1.86 ± 0.65
	*+ 12 nm**	**12.55 ± 5.17**
	1:10	1.77 ± 0.06
	*+ 12 nm**	**11.32 ± 0.36**
	AuNP:D(+)glucose	7.04 ± 0.09
	1:10	**2.84 ± 0.03**
	AuNP:D(+)mannose	6.91 ± 0.16
	1:10	**2.90 ± 0.07**
	AuNP:D(+)fructose	7.02 ± 0.01

1:10	**2.85 ± 0.01**

$\Delta\lambda_{plasmon}$ = change in plasmon band (reference: 514 nm)

For lower ConA concentration (below 50 nM), the NP seem stable. Since aggregation is clear for ratio 1:2 and below, AuNP:ConA 1:1 was chosen to study its recognition capacity toward carbohydrates moieties after nanoprobe formation.

AuNP-ConA interaction with sugar and LPS.

ConA is known to interact with sugar moieties, particularly D(+)glucose and D(+)mannose residues, inducing agglutination upon contact with carbohydrates. Its recognition ability may be affected by conformational changes, especially after adsorption onto AuNP. To evaluate the recognition capability of the nanoprobe (i.e. AuNP-ConA complex), changes in r_H of AuNP-ConA (ratio 1:1, in citrate buffer) were analyzed at 514 nm after incubation with different monosaccharides (D(+)glucose, D(-)fructose, D(+)mannose). D(-)fructose was used as a control, as ConA is not expected to interact with this sugar. The evolution of r_H as a function of sugar concentration is shown in **Figure 6a**, and results are summarized in Table 3.

Table 3. Calculated values of r_H of AuNP-ConA 1:1 nanoprobes with sugars and LPS. AuNP-ConA to a constant concentration of 50 nM (ratio AuNP:ConA 1:1)

Sugar concentration (nM)	*D ($.10^{-11}$ $m^2.s^{-1}$))* / **r_H (nm)**	***25***	***50***	***100***	***250***	***500***
D(+)glucose		*4.12 ± 0.14*	*3.68 ± 0.08*	*3.47 ± 0.06*	*3.43 ± 0.09*	*3.41 ± 0.07*
		4.86 ± 0.16	**5.45 ± 0.11**	**5.78 ± 0.10**	**5.84 ± 0.14**	**5.87 ± 0.12**
D(+)mannose		*4.38 ± 0.08*	*4.26 ± 0.07*	*3.01 ± 0.02*	*2.92 ± 0.09*	*2.85 ± 0.02*
		4.58 ± 0.08	**4.70 ± 0.08**	**6.65 ± 0.05**	**6.87 ± 0.19**	**7.02 ± 0.03**
D(-)fructose		*3.58 ± 0.02*	*3.52 ± 0.03*	*3.49 ± 0.04*	*3.69 ± 0.11*	*3.77 ± 0.03*
		5.58 ± 0.03	**5.69 ± 0.04**	**5.74 ± 0.07**	**5.44 ± 0.16**	**5.31 ± 0.03**

LPS concentration (µg/mL)	D ($.10^{-11}$ $m^2.s^{-1}$)) / **r_H (nm)**	**0.001**	**0.01**	**0.1**	**1**	**2,5**	**5**	**10**
S. enterica		*3.06 ± 0.06*	*3.32 ± 0.38*	*3.38 ± 0.36*	*3.01 ± 0.15*	*3.52 ± 0.36*	*1.93 ± 0.08*	*4.14 ± 0.13*
		6.54 ± 0.12	**6.11 ± 0.70**	**5.99 ± 0.59**	**6.66 ± 0.33**	**5.75 ± 0.59**	**10.40 ± 0.42**	**4.84 ± 0.15**
K. pneumoniae		*3.97 ± 0.19*	*4.92 ± 0.29*	*3.56 ± 0.29*	*3.82 ± 0.25*	*2.66 ± 0.16*	*2.15 ± 0.06*	*2.80 ± 0.23*
		5.05 ± 0.25	**4.09 ± 0.23**	**5.67 ± 0.49**	**5.26 ± 0.36**	**7.56 ± 0.46**	**9.34 ± 0.25**	**7.21 ± 0.62**

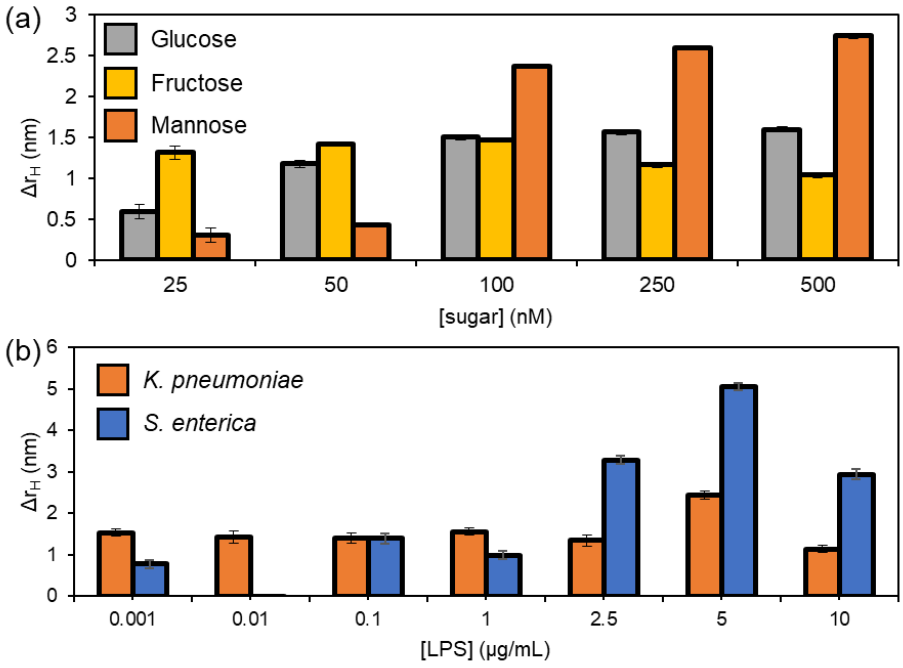


Figure 6. R_H difference evolution of AuNP:ConA 1:1 nanoprobe as a function of (a) sugar concentration (nM) and (b) LPS concentration (µg/mL). (Δr_H = r_H AuNP-ConA-sugar - r_H AuNP-ConA) for (a) and (Δr_H = r_H AuNP-ConA-LPS - r_H AuNP-ConA) for (b).

In all cases, a change in r_H was observed, even at low sugar concentrations, without signs of aggregation. However, the nanoprobe exhibited different behaviors depending on the monosaccharides it interacted with. In the presence of D(-)fructose, r_H increased to a maximum value of 5.74 ± 0.07 nm (concomitantly to a change in plasmon band of + 4 nm), suggesting a possible nonspecific interaction with the target. This change remained independent of D(-)fructose concentration, which might indicate a limited interaction with the nanoprobe. For D(+)glucose and D(+)mannose, r_H increased with sugar concentration, rising from 4.86 ± 0.16 to 5.87 ± 0.12 nm for D(+)glucose and from 4.58 ± 0.08 to 7.02 ± 0.03 nm for D(+)mannose (ratio 2:1 and 1:10 respectively) while no significant change in plasmon band was observed (514 ± 1 nm). These results demonstrate a correlation between nanoprobe size and sugar concentration, indicating specific interactions. The attachment of a sugar to the nanoprobe via ConA increases its size, thereby reducing its diffusion coefficient. The exact mechanism cannot be determined solely by measuring r_H. However, variations in r_H suggest differences in interaction dynamics. Notably, D(+)mannose induced a greater change than D(+)glucose, supporting a form of specificity between adsorbed ConA and the sugars. These findings suggest that ConA retains its carbohydrate recognition capability after adsorption onto AuNP, which is promising for the design of nanoprobe for carbohydrate sensing.

Finally, the nanoprobe was exposed to LPS from two different bacterial strains: *S. enterica* and *K. pseumoniae*. The O-antigen of *S. enterica* is expected to contain glucose and mannose [39], whereas *K. pseumoniae* O-antigen primarily consists of repeating units of galactopyranose and galactofuranose [40,41]. Theoretically, LPS from *S. enterica* should induce a significant change in AuNP-ConA r_H, while no interaction should occur with LPS from *K. pneumoniae*. As shown in Figure 6 b), a change in r_H was observed under all conditions, reaching 10.40 ± 0.42 nm and 9.34 ± 0.25 for each strain respectively (for 5 µg/mL LPS in citrate buffer). No clear trend was observed between size change and LPS concentration, suggesting that nanoprobes interact, regardless of whether the LPS contains mannose or glucose moieties. For LPS from *S. enterica*, one can assume that the nanoprobe interacts with the mannose and glucose moieties, while for LPS from *K. pneumoniae*, non-specific interactions occur as it was observed with fructose. Still, the Taylorgrams exhibited signs of aggregation (figure S8), similar to AuNP-ConA at high ConA content. The interaction between LPS and AuNP-ConA appears to destabilize the colloidal suspension, as suggested by a shift in plasmon band for the largest LPS concentration (+8 nm for both strains at 10 µg mL^{-1}). This could be due to charge screening effects resulting from changes in the overall charge of the nanoprobes upon LPS binding. Since the Taylorgrams are specific to AuNP (514 nm wavelength detection), no significant desorption of ConA from the NP surface was observed, as no r_H values were close to those of citrate-capped AuNP value.

Conclusion

The alternative mathematical approach to describe Taylorgram using pulse mode allows to extend the use of larger injection volumes (up to 30% of the volume of the capillary for the larger particles tested). This is a considerable advantage over Gaussian model, since it allows a higher sensitivity, which is one of the main encountered drawbacks nowadays. The model is proved to work for small molecules (caffeine, GSH) as much as larger object (AuNP, proteins) if TDA conditions are still reached, and shows good correlation with the general solution proposed in [23]. The application of this method to the characterization of AuNP-ConA nanoprobes confirms the formation of stable NP at low lectin concentrations, whereas aggregation occurs when ConA is in excess (ratio 1:2 and below). Au-ConA (1:1) shows a greater r_H change upon interaction with D(+)mannose and D(+)glucose compared to D(-)fructose at high equivalent concentrations (≥ 100 nM). It suggests that ConA retains its recognition capability for both moieties. Nanoprobes in contact with LPS exhibit similar behavior, with an aggregation for each tested concentration and shows no specificity for either strain. However, the results suggest that ConA remains attached to the AuNP, which is a significant advantage for designing nanoprobes as potential nanosensors for diagnostic applications. The described methodology is transferable to a range of other applications, such as investigating the behavior of various NP (organic and/or inorganic) as a function of their surrounding medium. The dual-erf mode can be integrated with detection techniques beyond UV-Visible spectrometry, including fluorescence or MS / ICP-MS. This extension broadens the scope of potential applications, such as the study of protein conformational changes, and offers enhanced sensitivity. Finally, studies have demonstrated the possibility to integrate TDA with mobility capillary electrophoresis [42,43], enabling simultaneous measurements of r_H and effective charge determination of proteins. Incorporating the dual-erf approach into this method should be the focus of future research.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge online: Materials and reagents, Apparatus, TDA experimental methodology, AuNP synthesis and characterization, TDA results, contrast matrix construction details (PDF).

Author information

Corresponding Author

* Jérémie Gouyon – Université de Lorraine, CNRS, LCPME, Nancy F-54000, France; orcid.org/0000-0002-8834-9009; Email : jeremie.gouyon@univ-lorraine.fr

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. Sephora Lahouari: Investigation, Writing – review & editing. Ariane Boudier: Writing – review & editing. Igor Clarot: Writing – review & editing. Jérémie Gouyon: Conceptualization, Investigation, Methodology, Writing – original draft & editing. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

The authors thank ANR NanoBioID ANR-22-CE09 and Institut Universitaire de France (IUF) for funding.

References

(1) Bilardo, R.; Traldi, F.; Vdovchenko, A.; Resmini, M. Influence of Surface Chemistry and Morphology of Nanoparticles on Protein Corona Formation. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2022**, *14* (4), e1788. https://doi.org/10.1002/wnan.1788.

(2) Guo, F.; Luo, S.; Wang, L.; Wang, M.; Wu, F.; Wang, Y.; Jiao, Y.; Du, Y.; Yang, Q.; Yang, X.; Yang, G. Protein Corona, Influence on Drug Delivery System and Its Improvement Strategy: A Review. *International Journal of Biological Macromolecules* **2024**, *256*, 128513. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128513.

(3) Kulkarni, M. B.; Ayachit, N. H.; Aminabhavi, T. M. Recent Advancements in Nanobiosensors: Current Trends, Challenges, Applications, and Future Scope. *Biosensors* **2022**, *12* (10), 892. https://doi.org/10.3390/bios12100892.

(4) Wang, B.; Anzai, J. Recent Progress in Lectin-Based Biosensors. *Materials* **2015**, *8* (12), 8590–8607. https://doi.org/10.3390/ma8125478.

(5) Gerlach, J. Q.; Flannery, A.; Kilcoyne, M. Chapter 2 - Lectins and Their Applications in Biomedical Research. In *Translational Glycobiology in Human Health and Disease*; Kilcoyne, M., Joshi, L., Eds.; Academic Press, 2024; pp 37–53. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819655-7.00012-6.

(6) Wei, H.; Han, L.; Yin, R.; Yang, T.; Liu, Y.; Mou, C.; Pang, F.; Wang, T. Micro-3D Printed Concanavalin A Hydrogel Based Photonic Devices for High-Sensitivity Glucose Sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2023**, *386*, 133707. https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.133707.

(7) Yin, Y.; Chen, D.; Qiao, M.; Lu, Z.; Hu, H. Preparation and Evaluation of Lectin-Conjugated PLGA Nanoparticles for Oral Delivery of Thymopentin. *Journal of Controlled Release* **2006**, *116* (3), 337–345. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.09.015.

(8) Kopac, T. Protein Corona, Understanding the Nanoparticle–Protein Interactions and Future Perspectives: A Critical Review. *International Journal of Biological Macromolecules* **2021**, *169*, 290–301. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.108.

(9) Gouyon, J.; Boudier, A.; Barakat, F.; Pallotta, A.; Clarot, I. Taylor Dispersion Analysis of Metallic-Based Nanoparticles – A Short Review. *ELECTROPHORESIS* **2022**, *43* (23–24), 2377–2391. https://doi.org/10.1002/elps.202200184.

(10) Adamo, G.; Campora, S.; Ghersi, G. Chapter 3 - Functionalization of Nanoparticles in Specific Targeting and Mechanism Release. In *Nanostructures for Novel Therapy*; Ficai, D., Grumezescu, A. M., Eds.; Micro and Nano Technologies; Elsevier, 2017; pp 57–80. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46142-9.00003-7.

(11) Ye, F.; Jensen, H.; Larsen, S. W.; Yaghmur, A.; Larsen, C.; Østergaard, J. Measurement of Drug Diffusivities in Pharmaceutical Solvents Using Taylor Dispersion Analysis. *Journal of*

Pharmaceutical and Biomedical Analysis **2012**, *61*, 176–183. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.11.030.

(12) Hong, J.; Wu, H.; Zhang, R.; He, M.; Xu, W. The Coupling of Taylor Dispersion Analysis and Mass Spectrometry to Differentiate Protein Conformations. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (7), 5200–5206. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05745.

(13) Pyell, U.; Jalil, A. H.; Pfeiffer, C.; Pelaz, B.; Parak, W. J. Characterization of Gold Nanoparticles with Different Hydrophilic Coatings via Capillary Electrophoresis and Taylor Dispersion Analysis. Part I: Determination of the Zeta Potential Employing a Modified Analytic Approximation. *Journal of Colloid and Interface Science* **2015**, *450*, 288–300. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.03.006.

(14) R. Moser, M.; A. Baker, C. Taylor Dispersion Analysis in Fused Silica Capillaries: A Tutorial Review. *Analytical Methods* **2021**, *13* (21), 2357–2373. https://doi.org/10.1039/D1AY00588J.

(15) Moser, M. R.; Smith, C. M.; Gutierrez, G. G.; Baker, C. A. 3D Printed Instrument for Taylor Dispersion Analysis with Two-Point Laser-Induced Fluorescence Detection. *Anal. Chem.* **2022**, *94* (16), 6089–6096. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c04566.

(16) Labied, L.; Rocchi, P.; Doussineau, T.; Randon, J.; Tillement, O.; Lux, F.; Hagège, A. Taylor Dispersion Analysis Coupled to Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry for Ultrasmall Nanoparticle Size Measurement: From Drug Product to Biological Media Studies. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (3), 1254–1259. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03988.

(17) Urban, D. A.; Milosevic, A. M.; Bossert, D.; Crippa, F.; Moore, T. L.; Geers, C.; Balog, S.; Rothen-Rutishauser, B.; Petri-Fink, A. Taylor Dispersion of Inorganic Nanoparticles and Comparison to Dynamic Light Scattering and Transmission Electron Microscopy. *Colloid and Interface Science Communications* **2018**, *22*, 29–33. https://doi.org/10.1016/j.colcom.2017.12.001.

(18) Saetear, P.; Chamieh, J.; Kammer, M. N.; Manuel, T. J.; Biron, J.-P.; Bornhop, D. J.; Cottet, H. Taylor Dispersion Analysis of Polysaccharides Using Backscattering Interferometry. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (12), 6710–6718. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00946.

(19) Leclercq, L.; Reinhard, S.; Chamieh, J.; Döblinger, M.; Wagner, E.; Cottet, H. Fast Characterization of Polyplexes by Taylor Dispersion Analysis. *Macromolecules* **2015**, *48* (19), 7216–7221. https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b01824.

(20) Gouyon, J.; Boudier, A.; Pallotta, A.; Boukoufi, C.; Clarot, I. Cross-Frontal Mode: An Alternative Methodology for Taylor Dispersion Analysis of Monomodal Sample. *Journal of Chromatography A* **2023**, *1694*, 463913. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463913.

(21) Cottet, H.; Biron, J.-P.; Martin, M. Taylor Dispersion Analysis of Mixtures. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (23), 9066–9073. https://doi.org/10.1021/ac071018w.

(22) Deleanu, M.; Hernandez, J.-F.; Cottet, H.; Chamieh, J. Taylor Dispersion Analysis Discloses the Impairment of Aβ Peptide Aggregation by the Presence of a Fluorescent Tag. *ELECTROPHORESIS* **2023**, *44* (7–8), 701–710. https://doi.org/10.1002/elps.202200192.

(23) Lemal, P.; Petri-Fink, A.; Balog, S. Nanoparticles and Taylor Dispersion as a Linear Time-Invariant System. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (2), 1217–1221. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04228.

(24) d'Orlyé, F.; Varenne, A.; Gareil, P. Determination of Nanoparticle Diffusion Coefficients by Taylor Dispersion Analysis Using a Capillary Electrophoresis Instrument. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1204* (2), 226–232. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.008.

(25) Hulse, W. L.; Forbes, R. T. A Nanolitre Method to Determine the Hydrodynamic Radius of Proteins and Small Molecules by Taylor Dispersion Analysis. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *411* (1), 64–68. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.040.

(26) Leaist, Derek.; Hui, Lu. Intradiffusion Coefficients and Integral Mutual Diffusion Coefficients of Dilute Associating Solutes Are Identical: Caffeine in Water. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94* (24), 8741–8744. https://doi.org/10.1021/j100387a021.

(27) Chamieh, J.; Oukacine, F.; Cottet, H. Taylor Dispersion Analysis with Two Detection Points on a Commercial Capillary Electrophoresis Apparatus. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1235*, 174–177. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.049.

(28) Mazloum-Ardakani, M.; Sheikh-Mohseni, M. A.; Mirjalili, B.-F. Selective and Simultaneous Voltammetric Determination of Glutathione, Uric Acid and Penicillamine by a Modified Carbon Nanotube Paste Electrode. *Electroanalysis* **2013**, *25* (8), 2021–2029. https://doi.org/10.1002/elan.201300151.

(29) Stricks, W.; Kolthoff, I. M. Polarography of Glutathione. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74* (18), 4646–4653. https://doi.org/10.1021/ja01138a060.

(30) Yousefi, R.; Taheri, B.; Alavi, P.; Shahsavani, M. B.; Asadi, Z.; Ghahramani, M.; Niazi, A.; Alavianmehr, M. M.; Moosavi-Movahedi, A. A. Aspirin-Mediated Acetylation Induces Structural Alteration and Aggregation of Bovine Pancreatic Insulin. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2016**, *34* (2), 362–375. https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1039584.

(31) Jensen, S. S.; Jensen, H.; Cornett, C.; Møller, E. H.; Østergaard, J. Insulin Diffusion and Self-Association Characterized by Real-Time UV Imaging and Taylor Dispersion Analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014**, *92*, 203–210. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.01.022.

(32) Jachimska, B.; Wasilewska, M.; Adamczyk, Z. Characterization of Globular Protein Solutions by Dynamic Light Scattering, Electrophoretic Mobility, and Viscosity Measurements. *Langmuir* **2008**, *24* (13), 6866–6872. https://doi.org/10.1021/la800548p.

(33) Hulse, W.; Forbes, R. A Taylor Dispersion Analysis Method for the Sizing of Therapeutic Proteins and Their Aggregates Using Nanolitre Sample Quantities. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *416* (1), 394–397. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.06.045.

(34) Malburet, C.; Leclercq, L.; Cotte, J.-F.; Thiebaud, J.; Marco, S.; Nicolaï, M.-C.; Cottet, H. Antigen-Adjuvant Interactions in Vaccines by Taylor Dispersion Analysis: Size Characterization and Binding Parameters. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (16), 6508–6515. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00420.

(35) Senear, D. F.; Teller, D. C. Thermodynamics of Concanavalin A Dimer-Tetramer Self-Association: Sedimentation Equilibrium Studies. *Biochemistry* **1981**, *20* (11), 3076–3083. https://doi.org/10.1021/bi00514a014.

(36) Di Silvio, D.; Silvestri, A.; Lay, L.; Polito, L.; Moya, S. E. Impact of ConcanavalinA Affinity in the Intracellular Fate of Protein Corona on Glucosamine Au Nanoparticles. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 9046. https://doi.org/10.1038/s41598-018-27418-w.

(37) Reeke, G. N.; Becker, J. W.; Edelman, G. M. The Covalent and Three-Dimensional Structure of Concanavalin A. IV. Atomic Coordinates, Hydrogen Bonding, and Quaternary Structure. *Journal of Biological Chemistry* **1975**, *250* (4), 1525–1547. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)41843-7.

(38) Deleanu, M.; Hernandez, J.-F.; Cipelletti, L.; Biron, J.-P.; Rossi, E.; Taverna, M.; Cottet, H.; Chamieh, J. Unraveling the Speciation of β-Amyloid Peptides during the Aggregation Process by Taylor Dispersion Analysis. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (16), 6523–6533. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00527.

(39) Kintz, E.; Heiss, C.; Black, I.; Donohue, N.; Brown, N.; Davies, M. R.; Azadi, P.; Baker, S.; Kaye, P. M.; van der Woude, M. Salmonella Enterica Serovar Typhi Lipopolysaccharide O-Antigen Modification Impact on Serum Resistance and Antibody Recognition. *Infection and Immunity* **2017**, *85* (4), 10.1128/iai.01021-16. https://doi.org/10.1128/iai.01021-16.

(40) Kelly, S. D.; Clarke, B. R.; Ovchinnikova, O. G.; Sweeney, R. P.; Williamson, M. L.; Lowary, T. L.; Whitfield, C. Klebsiella Pneumoniae O1 and O2ac Antigens Provide Prototypes for an Unusual Strategy for Polysaccharide Antigen Diversification. *Journal of Biological Chemistry* **2019**, *294* (28), 10863–10876. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008969.

(41) Shankar-Sinha, S.; Valencia, G. A.; Janes, B. K.; Rosenberg, J. K.; Whitfield, C.; Bender, R. A.; Standiford, T. J.; Younger, J. G. The Klebsiella Pneumoniae O Antigen Contributes to Bacteremia and Lethality during Murine Pneumonia. *Infect Immun* **2004**, *72* (3), 1423–1430. https://doi.org/10.1128/IAI.72.3.1423-1430.2004.

(42) Zhang, W.; Wu, H.; Zhang, R.; Fang, X.; Xu, W. Structure and Effective Charge Characterization of Proteins by a Mobility Capillary Electrophoresis Based Method. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (33), 7779–7787. https://doi.org/10.1039/C9SC02039J.

(43) Zhang, R.; Wu, H.; He, M.; Zhang, W.; Xu, W. Mobility Capillary Electrophoresis-Restrained Modeling Method for Protein Structure Analysis in Mixtures. *J. Phys. Chem. B* **2019**, *123* (10), 2335–2341. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.9b01148.

[Supplementary informations]

Supporting Information

Alternative Taylor dispersion analysis methodology for studying lectin-corona on gold nanoparticles for carbohydrates sensing

Sephora Lahouari[a,b], Ariane Boudier[a,b,c], Igor Clarot[a,b], Jérémie Gouyon[a,d]*

[a] Université de Lorraine, CITHEFOR, Nancy, F-54000, France
[b] Université de Lorraine, CNRS, LRGP, Nancy, F-54000, France
[c] Institut Universitaire de France (IUF), France
[d] Université de Lorraine, CNRS, LCPME, Nancy, F-54000, France

***Corresponding Author**
jeremie.gouyon@univ-lorraine.fr

Materials and reagents.

All reagents and solvents were of analytic grade and were used without further purification. Ultrapure deionized water (> 18.2 MΩ cm) was used for the preparation of all solutions. Sodium phosphate monobasic monohydrate $NaH_2PO_4.H_2O$ (for analysis, 99 %) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium phosphate dibasic dodecahydrate $Na_2HPO_4.12H_2O$ (for analysis, 98 %) was purchased from Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France). Sodium citrate dihydrate (≥ 99%), sodium borohydride $NaBH_4$ (99 %), gold(III) chloride trihydrate $HAuCl_4.3H_2O$ (≥ 49% Au basis), caffeine, L-glutathione reduced (GSH, ≥ 98.0 %), Insulin from bovine pancreas, Bovine serum albumin (BSA, 98 %), ConA from Canavalia ensiformis (Jack bean) type IV lyophilized powder, D(+)glucose (≥ 99.5 %), D(-)fructose (≥ 99 %), D(+)mannose (≥ 99 %), LPS from *S. enterica* serotype typhimurium, from *K. pneumoniae*, hydrochloric acid, HCl, and nitric acid, HNO_3, were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Phosphate buffer 20 mM was prepared by mixing 213 mg $NaH_2PO_4.H_2O$ and 951 mg $Na_2HPO_4.12H_2O$ in 200 mL deionized water, for a pH value of 7.4. Citrate-capped AuNP were synthesized according to our previous work [1,2]. They present plasmon band of 514 ± 1 nm for an absorbance of 0.804, leading to a concentration of 67 nM (using $\varepsilon = 1.2.10^7$ L/(mol.cm)[3]). R_H estimated using DLS is 3.2 nm ± 0.2 (expressed in volume), and a core radius (transmission electron microscopy, TEM) of 1.7 ± 0.4 nm. More information about citrate-capped AuNP synthesis can be found below. To prepare AuNP-ConA nanoprobes, an appropriate amount of citrate-capped AuNP (fixed final concentration of 50 nM) was mixed with ConA in citrate

solution and incubated for 1 hour at room temperature before characterization. To investigate the interactions of AuNP-ConA nanoprobes with different targets, varying amounts of sugars (D(+)glucose, D(-)fructose, D(+)mannose) and LPS (*S. enterica* or *K. pneumoniae*) were added to a fixed concentration of AuNP-ConA (50 nM) and incubated for 1 h at room temperature.

Apparatus.

TDA were performed using a P/ACE MDQ CE system (Beckman Coulter, Brea, United States) equipped with a diode array detector (DAD, wavelength ranging from 200 to 600 nm). Measurements for the demonstration of the methodology were performed at 25 ± 1 °C using a 40 cm bare fused silica capillary (effective length: 30 cm, Polymicro Tech., Lisles, United States) with an inner diameter (i.d.) of 100 µm, while a 75 µm i.d. was employed for carbohydrate sensing application. A UV-Visible spectrophotometer (UV-1800 Shimadzu, Kyoto, Japan) was used for spectra recording, absorbance measurements and plasmon resonance determination. Hydrodynamic diameters (d_H) of AuNP were measured by DLS at 20 ± 1°C using a Zetasizer Nano ZS (20°C, 633 nm laser, backscattered angle of 173°, Malvern Instruments UK). Cumulant method was used for mathematical treatment. TEM image was recorded using a Philips CM20 instrument with a LaB6 cathode at 200 kV (Amsterdam, Netherlands).

TDA experimental methodology.

Depending on the analyte, mobilization pressure P, injection time t_{inj} and duration of the experiment were adjusted:

(i) The capillary was flushed with water, 0.1 M NaOH, and water (5 min, 10 psi each).

(ii) the capillary was filled with the analyte-free solvent (a solution of 1.5 mM sodium citrate for citrate-capped AuNP analysis, 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) for 5 mM caffeine and 2 g/L BSA analysis, 10 mM HCl for 0.3 g/L insulin analysis or 1 mM HCl for 2.5 mM GSH analysis).

(iii) the corresponding sample was injected at 0.4 psi for a duration t_{inj} (varying from 5 to 50 s, depending on the analyte). Each sample was prepared in a specific solvent, depending on its properties as mentioned in (ii) above.

(iv) Starting the UV-Visible acquisition (at 514 nm for AuNP, 272 nm for caffeine, 214 nm for GSH and 220 nm for BSA and insulin), the sample plug was pushed hydrodynamically with the analyte-free solvent using the same pressure (t_0).

(v) Sample was pushed using the same pressure after measurement of the peak (t_x).

Figure S1 summarizes the methodology.

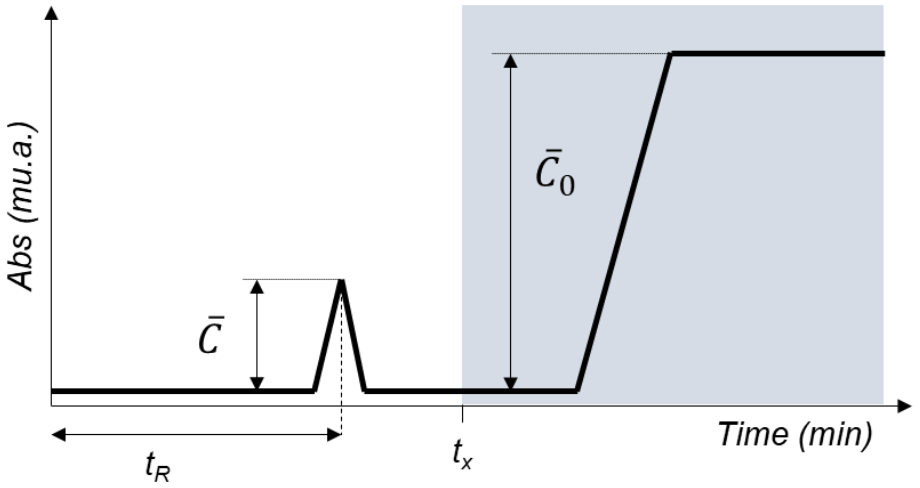


Figure S1. Schematic view of a Taylorgram. The coloured part indicates the time at which the sample is hydrodynamically pushed.

Citrate-capped gold nanoparticles synthesis

Citrate capped gold nanoparticles (AuNPs, stabilized with citrate ions) were synthesized in aqueous solution according to previous works [1,2]. Briefly, under N_2 atmosphere, 1 mL of 10 mg/mL $HAuCl_4.3H_2O$ was added into 90 mL of deionized water, followed by 2 mL of 55 mM sodium citrate. 1 mL of 19 mM $NaBH_4$ in 55 mM sodium citrate was added after 1 mL stirring, resulting in an intense red wine-like coloration. Colloidal citrate-capped AuNP solutions were stocked at 4°C overnight in plastic tubing to insure complete reaction before characterization. The sample was directly characterized and used without any further treatment. Citrate-capped AuNPs present plasmon band of 514 ± 1 nm for an absorbance of 0.804, or a concentration of 67 nM (using $\varepsilon = 1.2.10^7$ L/(mol.cm) [15]). r_H measured using DLS is 3.2 ± 0.2 nm (vol.), and a core radius obtained by TEM of 1.7 ± 0.4 nm.

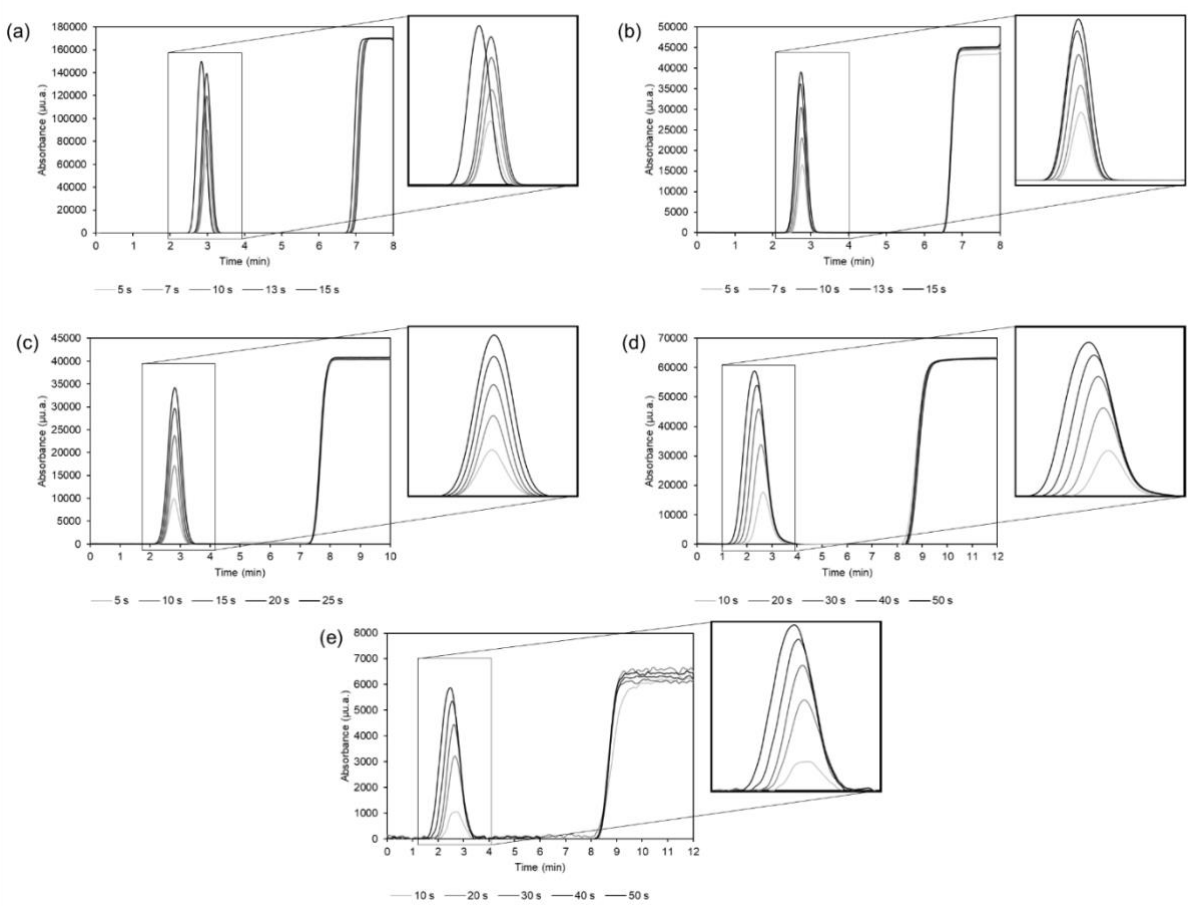


Figure S2. Taylorgrams of (a) Caffeine, (b) GSH, (c) Insulin, (d) BSA and (e) AuNP. Experimental conditions are described in experimental section.

General description application

from [4]

The General description of a Taylorgram can be expressed as follow (equation 1):

$$A_x(r,t_0,\Delta t,\delta t;t)=\frac{1}{8\sqrt{\pi}\delta t\Delta t}\left(4\left(e^{-\frac{(2t+\delta t-2t_0)^2}{4\delta rt}}\sqrt{\delta rt}-e^{-\frac{(-2t+\delta t+2t_0)^2}{4\delta rt}}\sqrt{\delta rt}-e^{-\frac{(2t+\delta t-2\Delta t-2t_0)^2}{4\delta r(t-\Delta t)}}\sqrt{\delta r(t-\Delta t)}+e^{-\frac{(-2t+\delta t+2\Delta t+2t_0)^2}{4\delta r(t-\Delta t)}}\sqrt{\delta r(t-\Delta t)}\right)+\sqrt{\pi}erf\left[\frac{2t-\delta t-2t_0}{2\sqrt{\delta rt}}\right](\delta r-4t+2\delta t+4t_0)+\sqrt{\pi}\left(e^{-2\delta t+\frac{4t_0}{\delta r}}\delta r\left(-1+erf\left[\frac{2t-\delta t-2\Delta t+2t_0}{2\sqrt{\delta r(t-\Delta t)}}\right]+e^{\frac{4\delta t}{\delta r}}\left(erf\left[\frac{\delta t+2(t+t_0)}{2\sqrt{\delta rt}}\right]-erf\left[\frac{2t+\delta t-2\Delta t+t_0}{2\sqrt{\delta r(t-\Delta t)}}\right]\right)+erfc\left[\frac{-\delta t+2(t+t_0)}{2\sqrt{\delta rt}}\right]\right)+erf\left[\frac{2t+\delta t-2t_0}{2\sqrt{\delta rt}}\right](4t-\delta r+2\delta t-4t_0)+erf\left[\frac{2t+\delta t-2\Delta t-2t_0}{2\sqrt{\delta r(t-\Delta t)}}\right](\delta r-4t-2\delta t+4\Delta t+4t_0)-erf\left[\frac{2t-\delta t-2\Delta t-2t_0}{2\sqrt{\delta r(t-\Delta t)}}\right](\delta r-4t+2\delta t+4\Delta t+4t_0)\right)\right) \quad (1)$$

With r, hydrodynamic radius of the species; t_0, = x/v, the so-called residence time defined by the distance between detection and injection points ($x = x_{det} - x_{inj}$) and the mean velocity of the flow (v) averaged over the cross section of the capillary; $\delta = \pi\eta r_c^2/(2k_BT)$, r_c the capillary radius, η the viscosity of the fluid, T the temperature, k_B the Boltzmann constant; Δt the finite injection time; δt the finite time accounting for the finite volume of the detected analyte reaching the detector window; erf, error function ; erfc, complementary error function.

For the experiment, δt was estimated using a detection window length δ_{window} of 1 mm with $\delta t = \frac{\delta_{window}.t_0}{l_{det}}$ with l_{det}, capillary length from the inlet to the detection window.

Table S1. Comparison of r_H between dual-erf fitting and the general description from [4]

Sample	t_{inj} (s)	r_H dual-erf (nm)	r_H g.d. (nm)	ΔSSR (%)
Insulin	15	0.92 ± 0.01	0.94 ± 0.02	26%
	25	0.99 ± 0.01	1.12 ± 0.07	259%
AuNP	20	2.07 ± 0.02	2.52 ± 0.21	44%
	50	2.34 ± 0.07	2.36 ± 0.02	156%

SSR: sum of squared residuals; ΔSSR (%) = [SSR (g.d.) - SSR (dual-erf)] / SSR (dual-erf)
g.d : general description

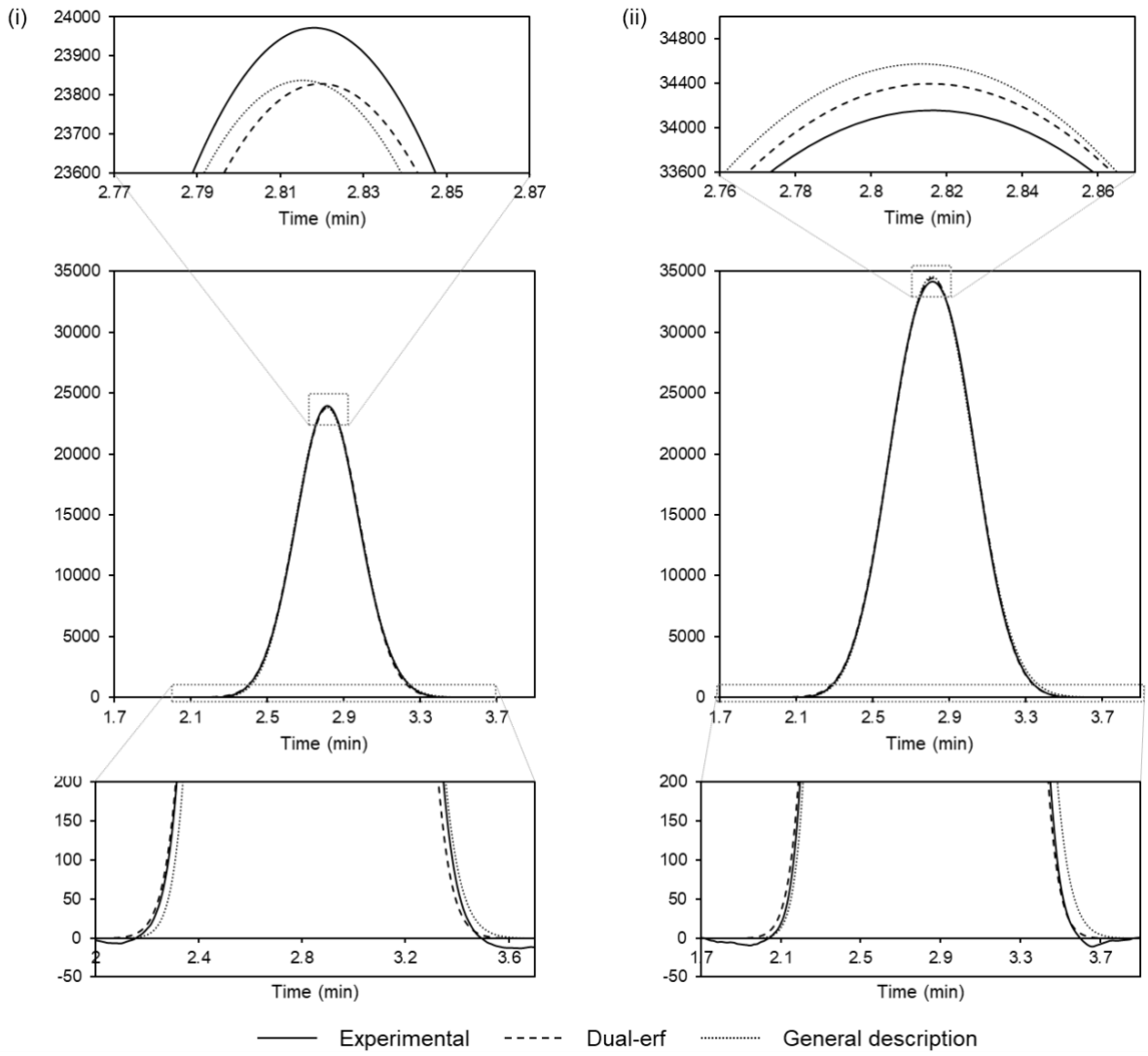


Figure S3. Experimental Taylorgram (continuous line), dual-erf fitting (dashed line) and fitting using the general description in ref. 21 (dotted line) for insulin analysis with t_{inj} = (i) 15 s and (ii) 25 s.

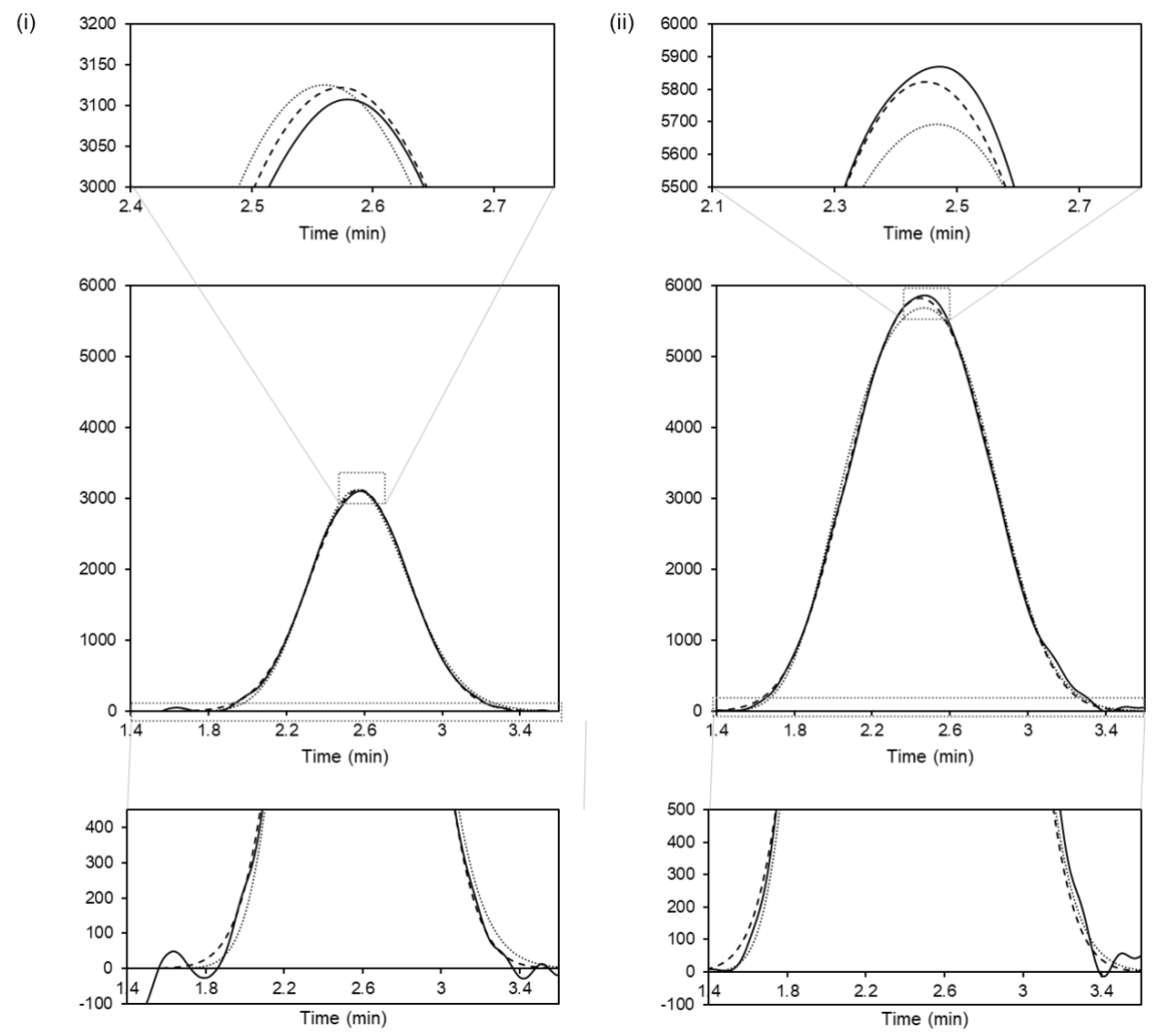


Figure S4. Experimental Taylorgram (continuous line), dual-erf fitting (dashed line) and fitting using the general description in ref. 21 (dotted line) for AuNP analysis with t_{inj} = (i) 20 s and (ii) 50 s.

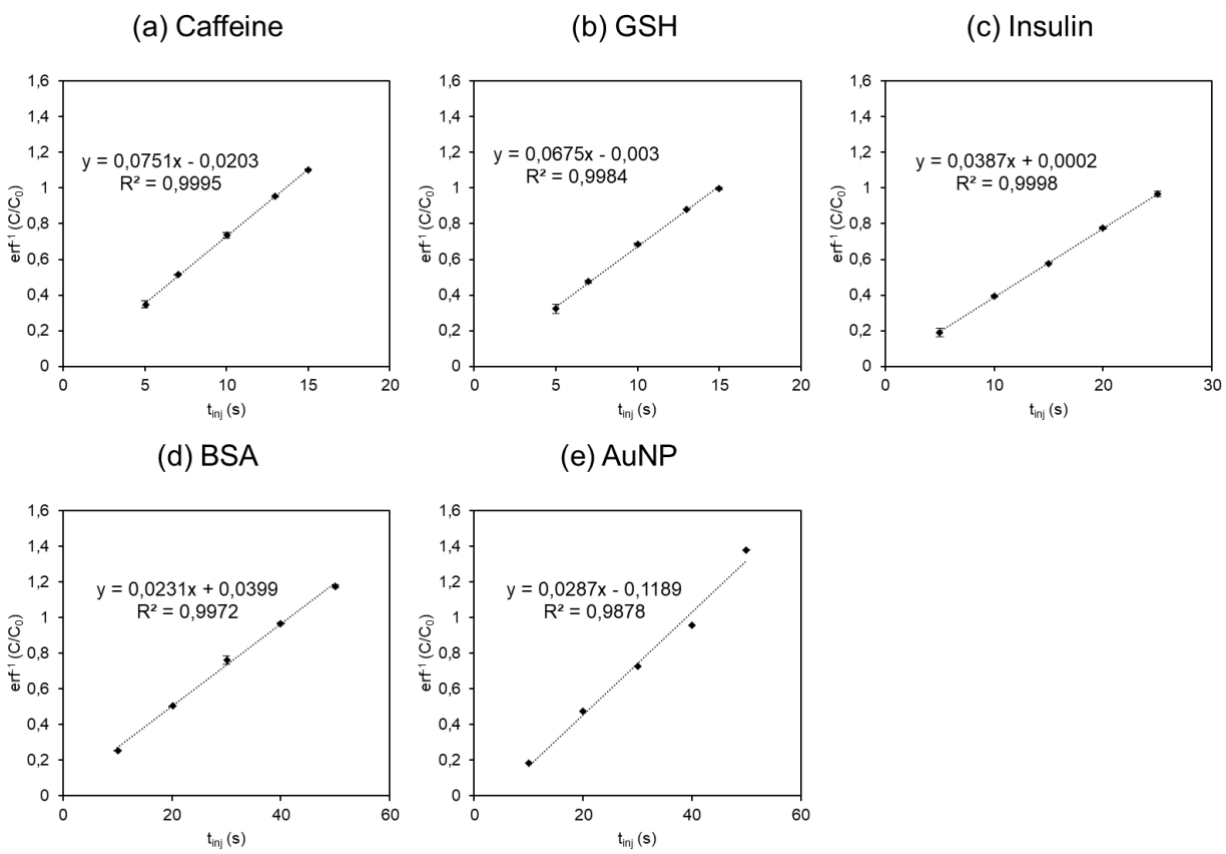


Figure S5. (a,b,c,d,e) erf^{-1} (C/C_0) as a function of t_{inj} for the tested molecules. Fitting curves correspond to equation (10).

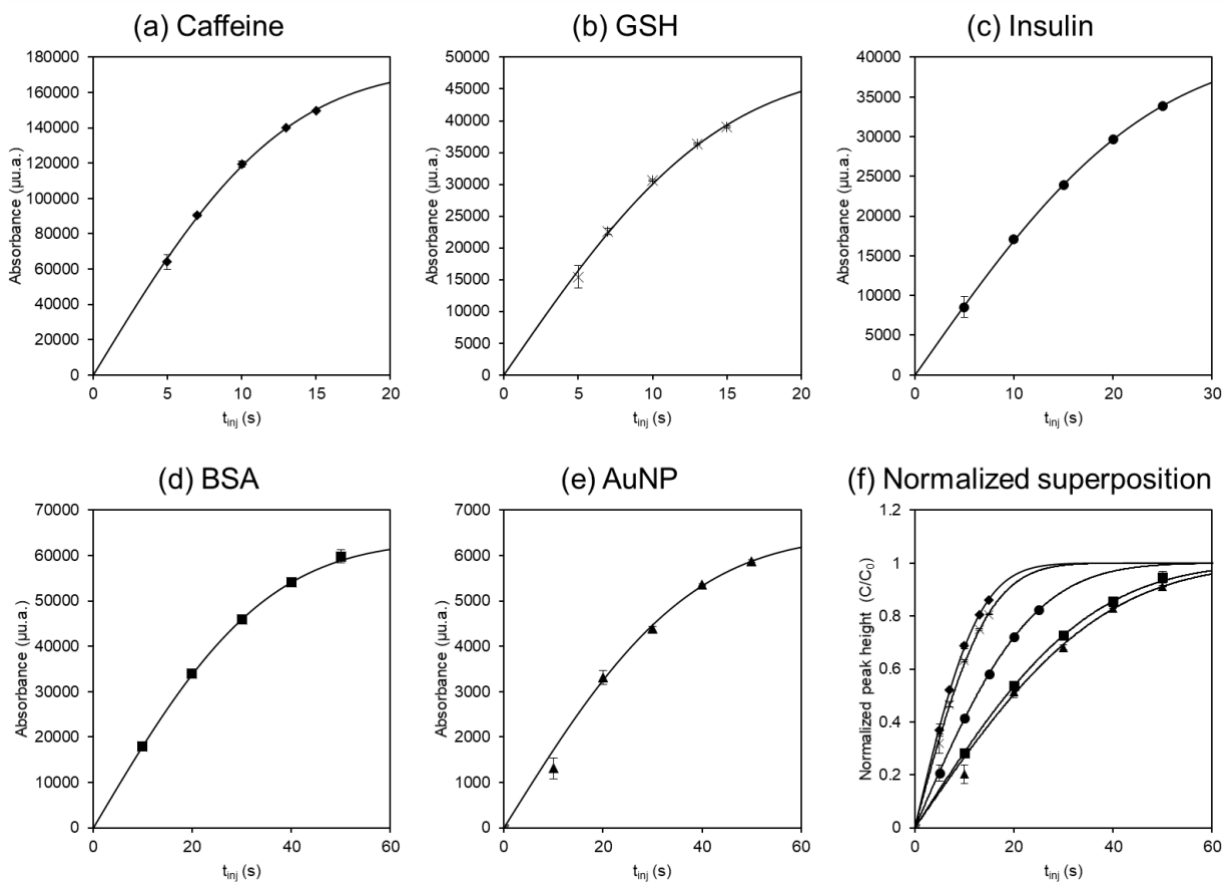


Figure S6. (a,b,c,d,e) Peak height absorbance as a function of t_{inj} for the tested molecules and (f) normalized representation (C/C_0). Fitting curves correspond to the equation (11). diamond = caffeine, cross = GSH, circle = insulin, square = BSA, triangle = AuNP.

Contrast matrix construction C(tinj,σ)

The following expression is used to compute a contrast map (denoted as contrast matrix, equation 2):

$$C(t_{inj},\sigma) = \left[\mathrm{erf}\left(\frac{t_{inj}+\Delta t}{2\sqrt{2}\sigma}\right) - \mathrm{erf}\left(\frac{t_{inj}}{2\sqrt{2}\sigma}\right)\right].\left[\mathrm{erf}\left(\frac{t_{inj}}{2\sqrt{2}(\sigma+\Delta\sigma)}\right) - \mathrm{erf}\left(\frac{t_{inj}}{2\sqrt{2}\sigma}\right)\right] \quad (2)$$

Where Δt and Δσ are fixed to simulate temporal resolution and uncertainty in dispersion, respectively.

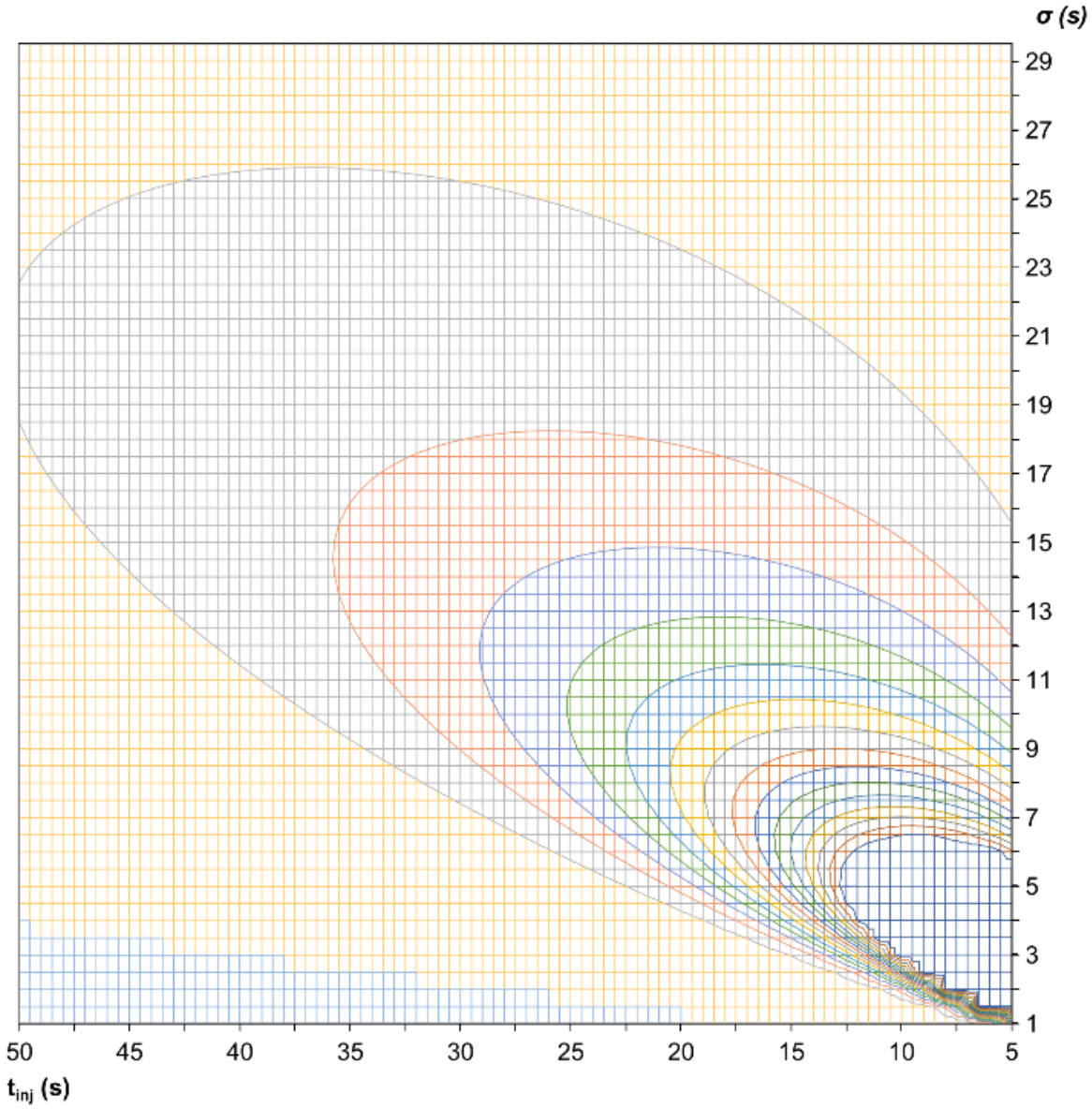


Figure S7. C(tinj,σ) function representation, evaluated numerically over a discrete grid. The contrast matrix is visualized as a map and can be used for the determination of optimal tinj depending on the theoretical σ expected.

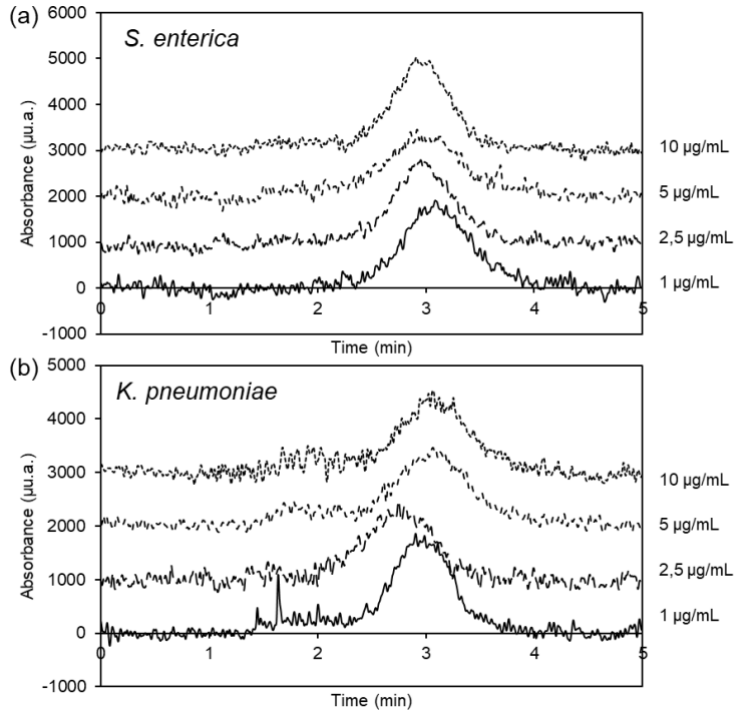


Figure S8. Taylorgrams of different AuNP-ConA-LPS for different (a) S. enterica and (b) K. pneumoniae LPS concentration.

References

(1) Beurton, J.; Lavalle, P.; Pallotta, A.; Chaigneau, T.; Clarot, I.; Boudier, A. Design of Surface Ligands for Blood Compatible Gold Nanoparticles: Effect of Charge and Binding Energy. *International Journal of Pharmaceutics* **2020**, *580*, 119244. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119244.

(2) Berthou, M.; Pallotta, A.; Beurton, J.; Chaigneau, T.; Athanassiou, A.; Marcic, C.; Marchioni, E.; Boudier, A.; Clarot, I. Gold Nanostructured Membranes to Concentrate Low Molecular Weight Thiols, a Proof of Concept Study. *Journal of Chromatography B* **2022**, *1198*, 123244. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123244.

(3) Tournebize, J.; Sapin-Minet, A.; Schneider, R.; Boudier, A.; Maincent, P.; Leroy, P. Simple Spectrophotocolorimetric Method for Quantitative Determination of Gold in Nanoparticles. *Talanta* **2011**, *83* (5), 1780–1783. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.12.005.

(4) Lemal, P.; Petri-Fink, A.; Balog, S. Nanoparticles and Taylor Dispersion as a Linear Time-Invariant System. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (2), 1217–1221. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04228.

3.3. Conclusion

Ce chapitre a permis d'établir le développement d'une nouvelle approche mathématique pour la TDA afin de l'appliquer pour la caractérisation du diamètre d'[AuNP-ConA] en présence de différents sucres et de LPS. Nous avons établi la description mathématique du mode *dual-erf* et l'avons validé en déterminant les r_H de molécules modèles en mettant les résultats des r_H obtenus par mode pulsé *dual-erf* et frontal en confrontation. Il a été montré qu'il se produit une déviation du modèle classique reposant sur une courbe Gaussienne pour les grands volumes d'injection, tandis que le mode *dual-erf* permet d'obtenir des résultats cohérents et pertinents peu importe le volume injecté. Le mode *dual-erf* a été appliqué d'abord à [AuNP-ConA], qui a permis de confirmer les résultats de taille préalablement obtenus ainsi que de visualiser l'agrégation engendrée lorsque la concentration en ConA augmente par rapport à celle en AuNP (1:2 ; 1:4 ; 1:10). La variation de taille selon l'ajout de sucres à [AuNP-ConA] a été évaluée. Une augmentation de taille est observée pour chaque condition, qu'il s'agisse d'un sucre reconnu spécifiquement par la ConA ou non. Cependant, dans le cas des sucres reconnus spécifiquement par la ConA (glucose, mannose) l'augmentation de taille est proportionnelle à la concentration en sucre alors que celle-ci est constante avec le fructose. Ceci suggère un complexe [AuNP-ConA-Sucre] de taille plus importante mais aussi que la ConA distingue la présence des sucres dans le milieu avec une affinité semblant plus prononcée pour ses sucres spécifiques. Pour l'interaction d'[AuNP-ConA] avec les LPS issus de *K. pneumoniae* et *E. coli*, une augmentation de la taille est observée pour les deux souches, montrant une interaction non-spécifique d'[AuNP-ConA] envers le LPS de *K. pneumoniae*, non spécifique à la reconnaissance par la ConA (car ne possédant pas de glucose ni de mannose [19]). De plus, un profil caractéristique d'agrégation attribué à une déstabilisation du système colloïdal par un écrantage des charges dû à la présence des LPS a été souligné (à 10 $\mu g.mL^{-1}$). Ce chapitre permet de finaliser la caractérisation d'[AuNP-ConA] *via* une nouvelle technique présentant un nouveau traitement mathématique et confirme que la ConA permet de cibler des sucres lui étant spécifiques. Cependant, ce chapitre ne donne pas lieu à une confirmation d'interaction spécifique avec des LPS. Il est donc nécessaire d'évaluer [AuNP-ConA] en présence directe de bactéries de manière à confirmer l'hypothèse générale de son action de reconnaissance et de détection envers des espèces bactériennes. Le Chapitre IV propose des techniques expérimentales tentant de fournir une réponse à ce postulat.

3.4. Références

[1] G. I. Taylor, "The dispersion of matter in turbulent flow through a pipe," *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, vol. 223, no. 1155, pp. 446–468, May 1954, doi: 10.1098/rspa.1954.0130.

[2] F. d'Orlyé, A. Varenne, and P. Gareil, "Determination of nanoparticle diffusion coefficients by Taylor dispersion analysis using a capillary electrophoresis instrument," *Journal of Chromatography A*, vol. 1204, no. 2, pp. 226–232, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.chroma.2008.08.008.

[3] A. Hagège and T. N. S. Huynh, "Electrophorèse capillaire," *Techniques de l'Ingénieur*, Oct. 10, 2013. Accessed: Jun. 06, 2025. [Online]. Available: https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/methodes-electrochimiques-42388210/electrophorese-capillaire-p3366/separation-p3366v2niv10002.html

[4] S. Štěpánová and V. Kašička, "Separation and analysis of proteins by capillary electromigration methods in the period mid-2021–2024," *Analytica Chimica Acta*, p. 344323, Jun. 2025, doi: 10.1016/j.aca.2025.344323.

[5] J. Stetefeld, S. A. McKenna, and T. R. Patel, "Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences," *Biophys Rev*, vol. 8, no. 4, pp. 409–427, Dec. 2016, doi: 10.1007/s12551-016-0218-6.

[6] M. R. Moser and C. A. Baker, "Taylor dispersion analysis in fused silica capillaries: a tutorial review," *Anal. Methods*, vol. 13, no. 21, pp. 2357–2373, Jun. 2021, doi: 10.1039/D1AY00588J.

[7] W. L. Hulse and R. T. Forbes, "A nanolitre method to determine the hydrodynamic radius of proteins and small molecules by Taylor dispersion analysis," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 411, no. 1, pp. 64–68, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.03.040.

[8] C. Malburet *et al.*, "Optimization of limit of detection in Taylor dispersion analysis: Application to the size determination of vaccine antigens," *Talanta Open*, vol. 7, p. 100209, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.talo.2023.100209.

[9] W. L. Hulse, J. Gray, and R. T. Forbes, "Evaluating the inter and intra batch variability of protein aggregation behaviour using Taylor dispersion analysis and dynamic light scattering," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 453, no. 2, pp. 351–357, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.05.062.

[10] C. Somnin *et al.*, "Taylor dispersion analysis for measurement of diffusivity and size of gadolinium-based contrast agents," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 200, p. 106831, Sep. 2024, doi: 10.1016/j.ejps.2024.106831.

[11] J. Gouyon, A. Boudier, A. Pallotta, C. Boukoufi, and I. Clarot, "Cross-frontal mode: An alternative methodology for Taylor dispersion analysis of monomodal sample," *Journal of Chromatography A*, vol. 1694, p. 463913, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.chroma.2023.463913.

[12] M. R. Moser, C. M. Smith, G. G. Gutierrez, and C. A. Baker, "3D Printed Instrument for Taylor Dispersion Analysis with Two-Point Laser-Induced Fluorescence Detection," *Anal. Chem.*, vol. 94, no. 16, pp. 6089–6096, Apr. 2022, doi: 10.1021/acs.analchem.1c04566.

[13] D. Baron, T. Pluháček, and J. Petr, "Characterization of Nanoparticles in Mixtures by Taylor Dispersion Analysis Hyphenated to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 96, no. 14, pp. 5658–5663, Apr. 2024, doi: 10.1021/acs.analchem.4c00586.

[14] U. B. Høgstedt, G. Schwach, M. van de Weert, and J. Østergaard, "Taylor Dispersion Analysis as a promising tool for assessment of peptide-peptide interactions," *European*

Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 93, pp. 21–28, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.ejps.2016.07.015.

[15] S. S. Jensen, H. Jensen, C. Cornett, E. H. Møller, and J. Østergaard, "Insulin diffusion and self-association characterized by real-time UV imaging and Taylor dispersion analysis," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 92, pp. 203–210, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.jpba.2014.01.022.

[16] U. Sharma, N. J. Gleason, and J. D. Carbeck, "Diffusivity of Solutes Measured in Glass Capillaries Using Taylor's Analysis of Dispersion and a Commercial CE Instrument," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 3, pp. 806–813, Feb. 2005, doi: 10.1021/ac048846z.

[17] S. Latunde-Dada, R. Bott, J. Crozier, M. Trikeriotis, O. I. Leszczyszyn, and D. Goodall, "Rapid determination of hydrodynamic radii beyond the limits of Taylor dispersion," *Journal of Chromatography A*, vol. 1472, pp. 66–73, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2016.10.032.

[18] J. Chamieh, F. Oukacine, and H. Cottet, "Taylor dispersion analysis with two detection points on a commercial capillary electrophoresis apparatus," *Journal of Chromatography A*, vol. 1235, pp. 174–177, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.chroma.2012.02.049.

[19] S. Shankar-Sinha *et al.*, "The Klebsiella pneumoniae O antigen contributes to bacteremia and lethality during murine pneumonia," *Infect Immun*, vol. 72, no. 3, pp. 1423–1430, Mar. 2004, doi: 10.1128/IAI.72.3.1423-1430.2004.

Chapitre IV

Interaction des [AuNP-ConA] avec *Pseudomonas fluorescens* : une preuve de concept expérimentale.

Chapitre 4

4. Interaction des nanoparticules d'or modifiées par la ConA avec *Pseudomonas fluorescens* : une preuve de concept expérimentale

Il a été vu dans le chapitre précédent qu'il n'a pas été possible de faire de distinction pour la détection de deux LPS (*K. pneumoniae*, supposément non reconnu par la ConA et *E. coli* reconnu par la ConA) par [AuNP-ConA] au vu de l'évolution similaire des r_H traduisant des interactions non-spécifiques. C'est pour cela qu'une expérimentation de mise en contact directe avec une souche bactérienne a été entreprise. Ce dernier chapitre de doctorat se focalise donc sur la détection expérimentale par [AuNP-ConA] des bactéries *Pseudomonas fluorescens*. Cette bactérie a été choisie du fait de la composition de son LPS (répétitions de glucose) et puisqu'elle excrète un EPS qui contient ces mêmes unités. Ce chapitre comporte des expérimentations encore en cours et, à l'inverse des précédents, n'est pas associé à une publication. Des expérimentations supplémentaires seront effectuées entre la date de dépôt du présent manuscrit et la date de soutenance du doctorat afin de conforter les données et pour valoriser ce travail sous forme d'un article si les résultats le permettent.

Ce chapitre comporte des résultats provenant d'expérimentations réalisées en AFM et en épifluorescence. Celles-ci se sont déroulées au sein du laboratoire UMR 7564 LCPME sous la supervision scientifique du Dr. Grégory Francius m'ayant formé à ces deux méthodes, me rendant ainsi autonome sur celles-ci.

Par ailleurs, des expérimentations réalisées en SERS et en Raman ont été effectuées et sont toujours en cours. Celles-ci sont réalisées par Dr. Yun Luo et Pr. Claire Mangeney de l'UMR 8601 Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques (LCBPT) de l'Université Paris Cité.

4.1. Contexte et hypothèse de travail

Comme mentionné précédemment, ce chapitre se focalisera sur l'interaction des [AuNP-ConA] avec une bactérie. L'espèce sélectionnée est *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens* ou Pf dans la légende de certains graphiques). Cette bactérie est une bactérie à Gram négatif (voir Figure 5, Chapitre I), de forme bacille et possède un ou plusieurs flagelle(s) pour sa motilité [1]. *P. fluorescens* a été choisie car il a été démontré que cette bactérie est capable de sécréter des EPS composés principalement de glucose [2] même si certaines études lui attribuent également la présence de mannose [3], [4]. Cette bactérie est fluorescente sous lumière UV grâce à la sécrétion d'une molécule, la pyoverdine [1]. Cependant, un fluorophore sera utilisé dans les expérimentations afin de marquer les acides nucléiques des bactéries en fluorescence, le SYBR Green II (λ_{ex} : 497 nm, λ_{em} : 520 nm). Le LPS de *P. fluorescens* possède des résidus glucose [5] mais aucune donnée quant à la composition en mannose de ce LPS n'est disponible dans la littérature.

La composition de l'EPS en glucose est intéressante puisqu'elle permet de mettre en œuvre la fonction de reconnaissance de la ConA envers ce sucre avec l'utilisation des [AuNP-ConA]. De plus, il existe une ConA marquée par un fluorochrome (Alexa Fluor) permettant de révéler en rouge (λ_{ex} : 590 nm, λ_{em} : 617 nm) la localisation de la ConA par microscopie de fluorescence (épifluorescence) après mise en contact du complexe avec la souche bactérienne. Bien que représentant une possibilité, le complexe [AuNP-ConA] n'a pas été développé avec ConA-Alexa puisque le marquage fluorescent peut déstabiliser le complexe formé (*cf* Chapitre II). Tout cela permet de poser l'hypothèse de travail de ce chapitre. En incubant *P. fluorescens* avec [AuNP-ConA], AuNP ou ConA et en enregistrant des images d'AFM et d'épifluorescence, il serait possible de déterminer la localisation des [AuNP-ConA] immobilisées à proximité ou sur la bactérie (vs les AuNP et vs la ConA). Ceci permettra alors de mettre en évidence la présence d'interactions entre les [AuNP-ConA] et la bactérie (Figure 1).

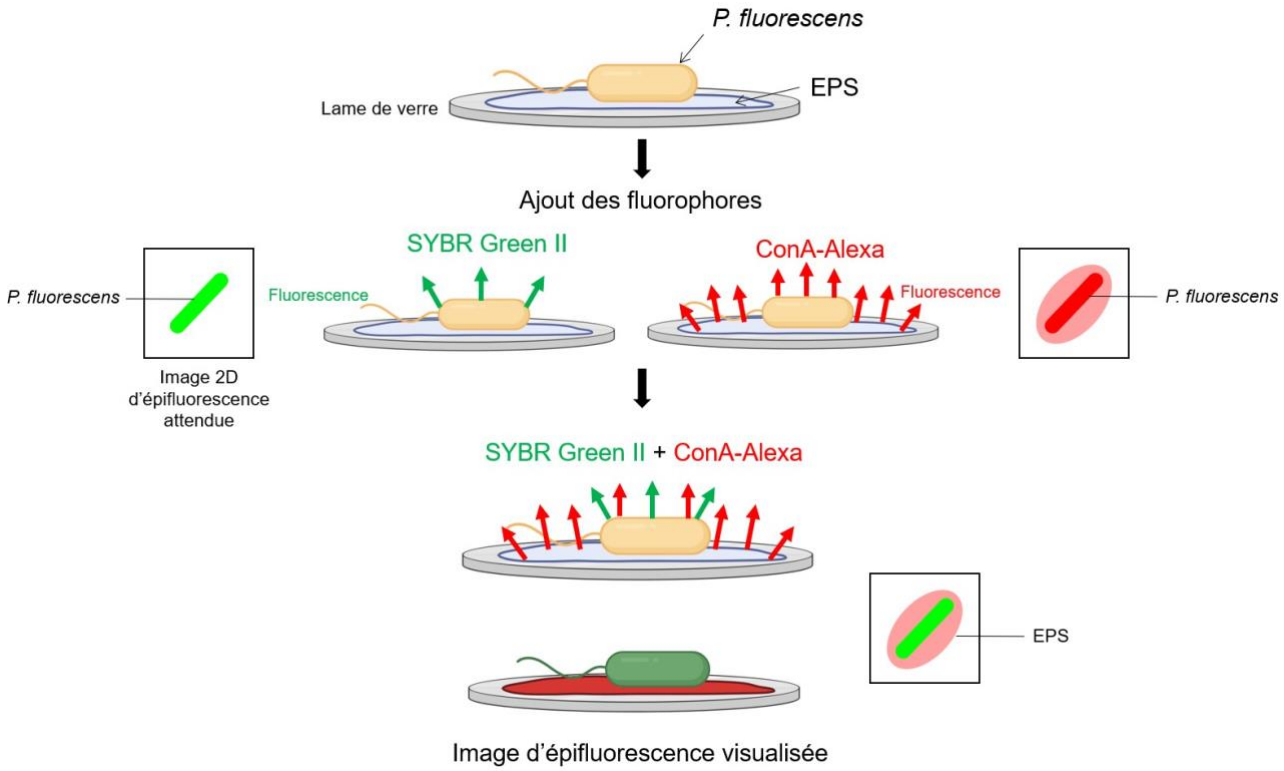


Figure 1. Représentation schématique de la fluorescence de SYBR Green II et ConA-Alexa observée en épifluorescence. EPS : exopolysaccharides.

L'hypothèse de travail est élargie aux expérimentations en cours. Dans le but d'effectuer un contrôle négatif, nous proposons un complexe [AuNP-Lectine] avec une lectine n'interagissant pas avec la bactérie *P. fluorescens*. Les expérimentations présentées ci-dessous seront entreprises avec une lectine dont l'activité n'est pas ciblée envers le glucose ou le mannose. Nous avons choisi de travailler avec la lectine *Helix pomatia* (HPA, extraite de l'escargot de Bourgogne) reconnaissant le N-acétylgalactosamine.

En raison de la chronologie, les expérimentations d'interaction des [AuNP-ConA] sont présentées dans ce manuscrit et celles avec les [AuNP-HPA] seront réalisées après son dépôt.

4.2. Matériel et méthodes

4.2.1. Culture bactérienne

Les bactéries *Pseudomonas fluorescens* (CIP 69.13) proviennent de la collection de l'Institut Pasteur (Paris, France) et sont conservées à - 80 °C. Après une préculture de 24 h, les bactéries sont divisées en deux populations pour être cultivées pendant 2 h et 4 h afin d'observer la différence de sécrétion d'EPS pour ces deux conditions. Cette culture s'effectue dans 10 mL de milieu Luria-Bertani (LB) (25 $g.L^{-1}$) à 37 °C sous agitation à 160 rpm grâce à un incubateur-agitateur. Le milieu LB est un milieu de culture nutritif permettant la croissance des bactéries et contient du tryptone, de l'extrait de levure et du NaCl. Le tryptone permet d'apporter des peptides et l'extrait de levure apporte des vitamines et oligo-éléments [6]. Au bout de 2 h et 4 h, les suspensions bactériennes sont extraites de l'incubateur-agitateur et leur densité optique (DO) est mesurée avec un densimètre de cellules (Fisher Scientific) avant la mise en plaque pour la préparation des échantillons. Pour la condition à 2 h, la DO est de 0.26 tandis que pour la condition à 4 h, la DO est de 0.80. Puisqu'une DO de 0.28 pour cette bactérie équivaut à 10^8 $UFC.mL^{-1}$ [2], la concentration en bactéries est égale à $0.93.10^8$ $UFC.mL^{-1}$ pour la condition à 2 h et à $2.86.10^8$ $UFC.mL^{-1}$ pour la condition à 4 h.

4.2.2. Préparation des échantillons

Afin d'effectuer les analyses en AFM et en épifluorescence, les bactéries ont été immobilisées sur des lames de verre circulaires préalablement traitées par de la polydopamine (PDA) (*cf* protocole de préparation des lames ci-dessous) avant d'y ajouter différents éléments sous différentes conditions. Les conditions préparées sont les suivantes :

- *P. fluorescens* ($0.93.10^8$ $UFC.mL^{-1}$ ou $2.86.10^8$ $UFC.mL^{-1}$)
- *P. fluorescens* ($0.93.10^8$ $UFC.mL^{-1}$ ou $2.86.10^8$ $UFC.mL^{-1}$) + ConA 5 nM
- *P. fluorescens* ($0.93.10^8$ $UFC.mL^{-1}$ ou $2.86.10^8$ $UFC.mL^{-1}$) + AuNP 5 nM
- *P. fluorescens* ($0.93.10^8$ $UFC.mL^{-1}$ ou $2.86.10^8$ $UFC.mL^{-1}$) + [AuNP-ConA] 1:1 (5 nM)

Ces deux étapes sont décrites ci-dessous.

4.2.2.1. Préparation des lames

Des lames de verre circulaires de diamètre 15 mm (Dutscher) sont rincées abondamment à l'éthanol puis avec de l'eau Milli-Q. Elles sont ensuite séchées grâce à un flux d'azote.
De manière à ce que les bactéries adhèrent à la surface des lames de verre, de la PDA est employée. La PDA est un biopolymère aux propriétés adhérentes grâce aux composés catécholamines qu'elle comporte [7] permettant des liaisons hydrogènes et interactions π-π [8].

La PDA est préparée en dissolvant 100 mg de dopamine hydrochloride (Sigma-Aldrich) dans 20 mL d'H_2O. À cette solution sont ajoutés 200 µL de NaOH 4 M avant de laisser la polymérisation s'effectuer jusqu'à l'obtention d'une solution de couleur noire. Le NaOH a pour but d'activer les groupes catéchols et amines qui vont ensuite s'auto-oxyder, menant à la polymérisation de la PDA.

Les lames de verre sont immergées dans la solution de PDA pendant une heure, puis délicatement rincées à l'eau Milli-Q et séchées à l'azote. Après cela, chaque lame est déposée dans un puits d'une plaque stérile de 12 puits.

4.2.2.2. Dépôt des échantillons

Dans chaque puits contenant une lame, 1 mL de suspension bactérienne (obtenue après 2 h, $0.93.10^8$ UFC.mL^{-1} ou 4 h d'incubation, $2.86.10^8$ UFC.mL^{-1}) est ajouté et laissé à reposer pendant 1 h. Par la suite, la suspension est délicatement retirée de manière à ne pas arracher les bactéries accrochées à la surface des lames mais aussi pour éliminer celles n'ayant pas adhéré. Une étape de rinçage avec du NaCl 25 mM est effectuée. Après rinçage, 1 mL de NaCl 25 mM est ajouté dans chaque puits. La concentration de NaCl a été choisie après avoir incubé [AuNP-ConA] avec des concentrations croissantes de NaCl dans du PBS (protocole décrit dans le Chapitre II, page 161) allant de 5 à 25 mM (en NaCl) et sélectionné la condition la plus élevée qui n'engendrait pas d'agrégation comme évalué par spectroscopie UV-visible (Figure 2). La condition choisie possède une différence d'étalement du LSPR de 10 nm par rapport au LSPR d'[AuNP-ConA].

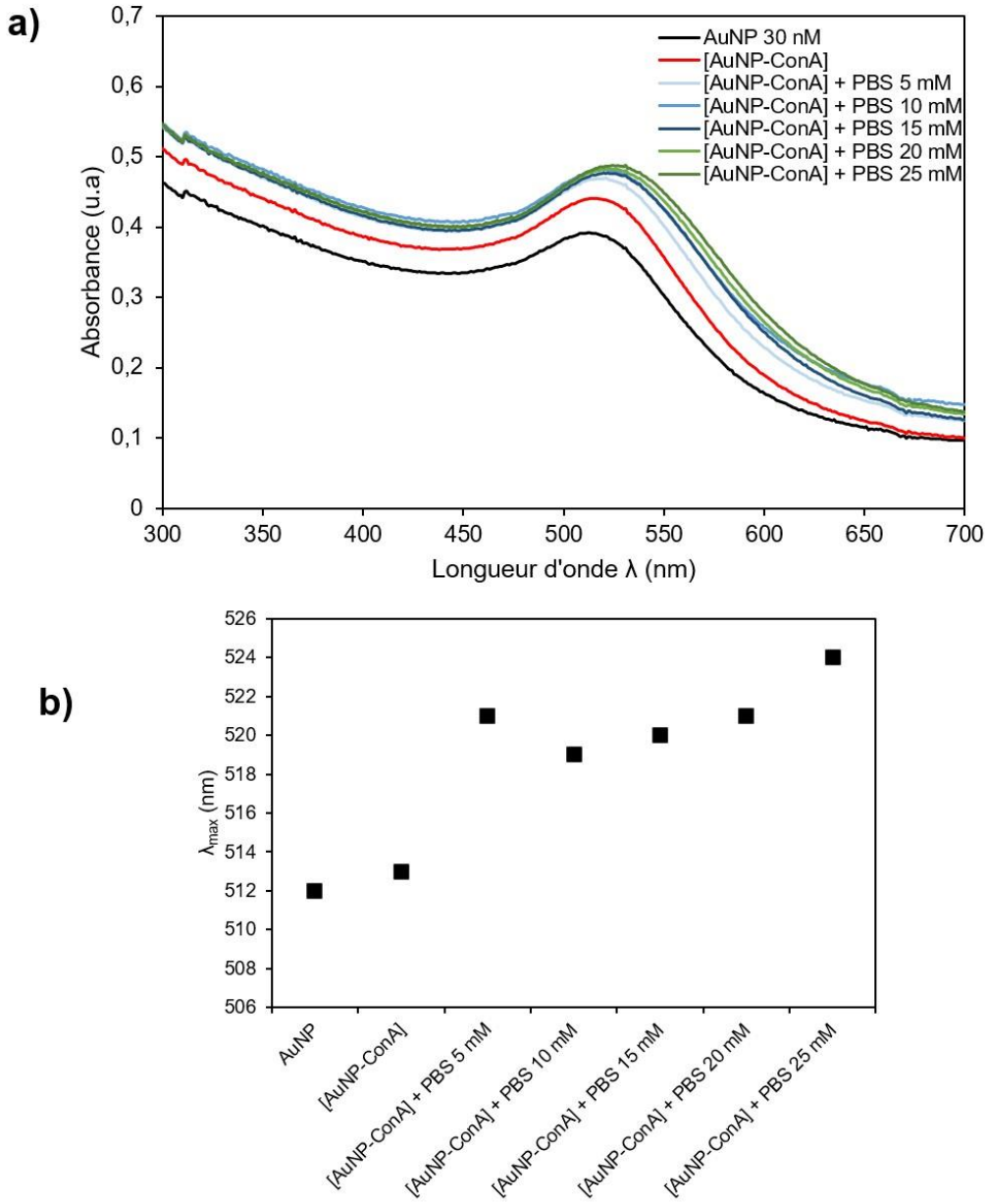


Figure 2. a) Spectres UV-Visible des AuNP, et [AuNP-ConA] à différentes concentrations en PBS et b) Evolution de la valeur de λ_{max}.

Pour chaque condition, 200 µL de l'échantillon (AuNP, ConA, [AuNP-ConA]) sont ajoutés. Les échantillons sont à concentration finale de 5 nM. Après 15 min, 100 µL de fluorophore SYBR Green II (0.05 %) sont ajoutés de manière à révéler l'ADN bactérien. Simultanément, 100 µL de ConA-Alexa (1 $mg.L^{-1}$) sont ajoutés dans tous les puits sauf le témoin contenant uniquement la bactérie et le SYBR Green II. Les fluorophores sont laissés à incuber dans les puits pendant 45 min, puis une étape de rinçage au NaCl 25 mM est effectuée. Finalement, 1 mL de NaCl 25 mM est ajouté dans les puits, suivi de 200 µL de glutaraldéhyde 25 %. Le glutaraldéhyde sert ici à fixer les éléments (bactéries, EPS, AuNP, ConA, [AuNP-ConA]) à la

surface de la lame. Les lames sont ensuite conservées au frigo après avoir retiré le mélange NaCl-glutaraldéhyde au bout d'une heure et l'avoir remplacé par du NaCl 25 mM. Les fluorophores sont uniquement employés pour la réalisation des échantillons destinés à l'épifluorescence, les échantillons destinés à l'AFM négligent cette étape. Une représentation schématique du protocole est illustrée en Figure 3 ci-dessous.

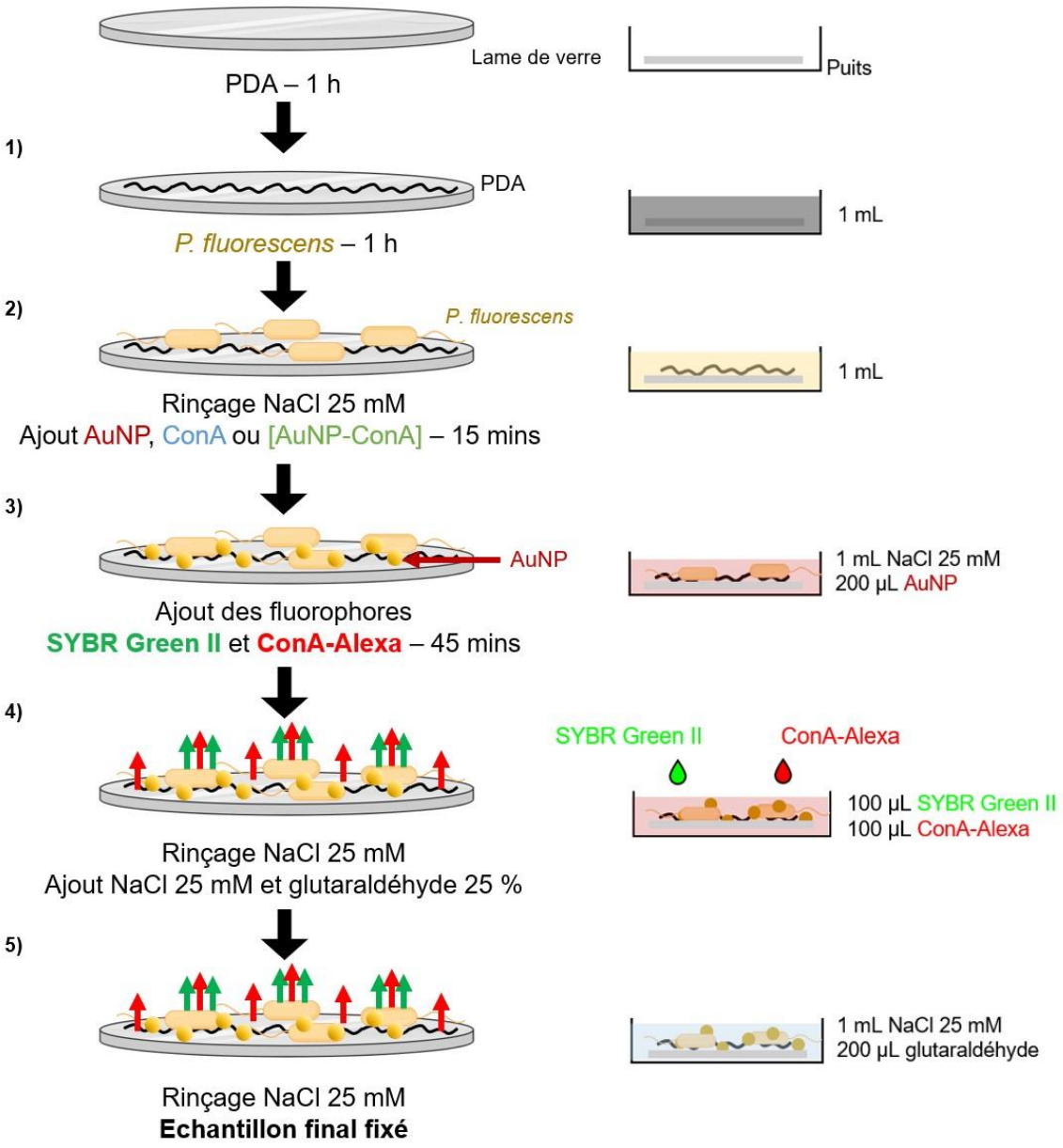


Figure 3. Représentation schématique du protocole de développement des lames employées en AFM et épifluorescence. L'étape 3) illustre uniquement la condition d'étude des AuNP mais s'effectue également avec la ConA et [AuNP-ConA]. PDA : Polydopamine.

4.2.3. AFM

Les images AFM ont été obtenues grâce à un Drive AFM (Nanosurf AG, Zurich, Suisse). La topographie des bactéries pour les différentes conditions de préparation sur les lames de verre a été obtenue en utilisant le WaveMode NMA. Les pointes AFM utilisées sont en nitrure de silicium de référence SCANASYST-AIR-HR (Bruker) avec une constante de ressort de 0,4 N/m et une fréquence de 130 ± 30 kHz.

4.2.4. Epifluorescence

Les bactéries et leur biofilm ont été observés grâce au marquage fluorescent SYBR Green II et au marquage par la lectine ConA-Alexa. Le SYBR Green II (Invitrogen) marque les acides nucléiques de manière à visualiser les bactéries et la ConA-Alexa (Invitrogen) reconnaît les résidus mannose et glucose afin de visualiser la sécrétion d'EPS par les bactéries.

L'observation des échantillons s'effectue grâce au logiciel CellP et avec un microscope Olympus BX51 équipé d'une caméra Olympus XC50. Le temps d'acquisition est de 300 ms pour chaque cliché. L'échantillon est préparé comme suit : (1) sur une lame de microscope est déposée une lame ronde d'échantillon à visualiser, (2) sur celle-ci est déposée une goutte d'huile de montage BacLight. (3) Une fine lamelle en verre est déposée par-dessus, recouverte d'huile d'immersion pour l'observation à grossissement x 100.

4.2.5. Spectroscopie d'Emission Optique à Plasma à Couplage Inductif (ICP-OES)

De manière à estimer la quantité d'AuNP et [AuNP-ConA] attachés à la surface bactérienne, une quantification de l'élément or a été entreprise. Pour ce faire, des suspensions bactériennes auxquelles sont ajoutés AuNP, ConA et [AuNP-ConA] ont été évaluées après centrifugation par la méthode de spectroscopie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES) (ICP-OES, iCAP Pro, ThermoScientific). Une centrifugation permet de quantifier l'or dans le surnageant et le culot obtenu et d'établir une comparaison de la masse d'or retrouvée dans chaque fraction. Cette quantification s'effectue selon deux étapes.

4.2.5.1. Préparation et minéralisation des échantillons

Brièvement, 200 µL des solutions d'AuNP, [AuNP-ConA] ou ConA sont ajoutés à 200 µL des deux conditions de temps des suspension bactérienne (2 h ou 4 h), ces suspensions ne sont pas laissées à incuber et sont directement centrifugées pendant 5 min à 4 000 rpm (MINISPIN, Eppendorf) puis les surnageants et culots sont récupérés (Figure 4).

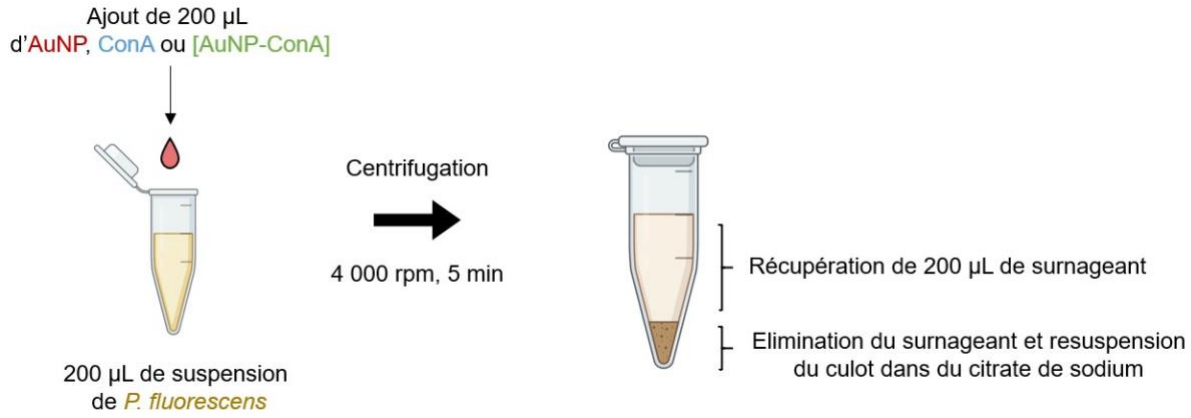


Figure 4. Représentation schématique de l'obtention des surnageants et culots bactériens avec les différentes conditions à évaluer.

Les fractions récupérées sont ensuite minéralisées en ajoutant 3,5 mL d'H_2O, 2,5 mL d'acide nitrique 65 % et 500 µL de HCl 37 %. La minéralisation s'effectue dans un système de minéralisation micro-ondes (Multiwave GO, Anton Paar) pendant 30 min à 185 °C. Les échantillons sont ensuite récupérés puis le volume est ajusté à 10 mL avec une solution H_2O + 1 % HNO_3.

4.2.5.2. ICP-OES

Les acquisitions en ICP-OES se sont effectuées grâce au logiciel Qtegra. Des gammes d'étalonnage de l'élément or dans H_2O de concentration allant de 0.005 $mg.L^{-1}$ à 1 $mg.L^{-1}$ sont préparées à partir de $HAuCl_4$ et enregistrées avant mesures des échantillons. Les échantillons sont injectés par une pompe péristaltique dans le système ICP-OES sous un flux de gaz d'argon.

4.2.6. Spectroscopie Raman-SERS

Les spectres Raman sont obtenus grâce à un microscope Xplora Plus (Horiba). Pour la ConA solide (forme native poudre) ; 8 spectres ont été enregistrés sur une lame de verre en utilisant un objectif x10 avec un laser 638 nm et avec une puissance de 20 mW. Pour les mesures SERS des AuNP (synthèse native 60 nM) et [AuNP-ConA] (ratio 1:1, 30 nM) uniquement (les bactéries seront évaluées ultérieurement), les échantillons sont centrifugés pendant 20 min à 13.400 rpm. Une goutte du culot est récupérée et laissée à sécher sur une lame de verre puis une image de microscopie est réalisée avec un objectif x10. Les paramètres Raman sont les mêmes que mentionnés ci-dessus. La cartographie pour les AuNP est de 266 x 256 µm et de 219 x 207 µm pour [AuNP-ConA]. Pour ces deux échantillons, le spectre représenté est obtenu grâce à la

moyenne de plus de 200 spectres ayant été réalisés avec un laser à 638 nm (filtre 100 %) et une acquisition de 3 s avec 2 accumulations. Tous les spectres sont corrigés selon la ligne de base.

4.3. Résultats et discussion

4.3.1. Caractérisation des bactéries par AFM et épifluorescence

P. fluorescens est une bactérie en forme de bacille possédant un ou plusieurs flagelle(s). Après culture, sa morphologie a été étudiée par AFM et épifluorescence de manière à confirmer l'intégrité membranaire et qu'aucune contamination n'a eu lieu durant la culture et la préparation des échantillons. Les résultats de caractérisation morphologique sont représentés en Figure 5 et permettent d'observer la forme en bacille des bactéries ainsi que des flagelles. De plus, le cliché d'épifluorescence permet de visualiser les bactéries, confirmant que le SYBR Green II est fixé à l'ADN des bactéries.

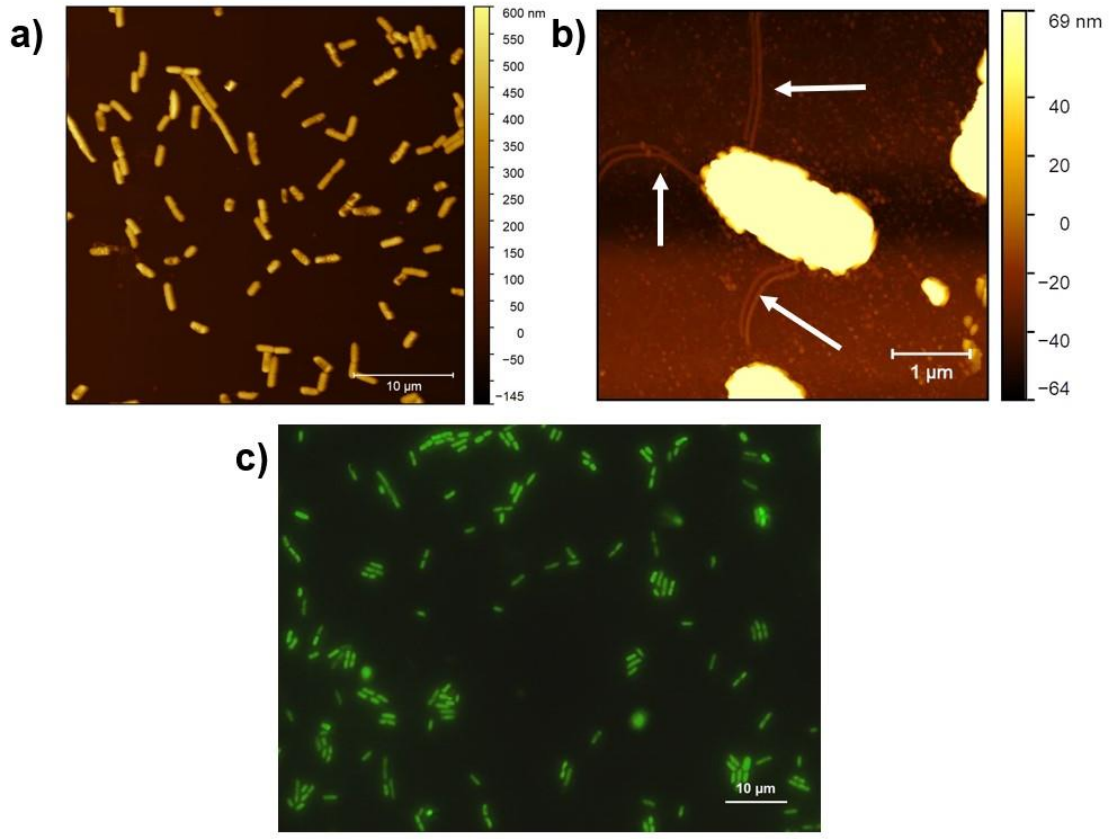


Figure 5. Caractérisation morphologique de P. fluorescens a) et b) en AFM et c) en épifluorescence. Les flèches blanches désignent les flagelles de la bactérie.

4.3.2. Étude de l'interaction des AuNP, de la ConA et d'[AuNP-ConA] par AFM

L'observation en AFM a été entreprise afin d'évaluer la topographie des bactéries seules, en présence de ConA, d'AuNP et d'[AuNP-ConA]. Il est observé de manière générale que le nombre de bactéries à 4 h est plus important qu'à 2 h, ce qui corrobore les valeurs de DO obtenues (0.26 et 0.80, $0.93.10^8$ UFC.mL^{-1} et $2.86.10^8$ UFC.mL^{-1} respectivement). Les résultats de topographie en AFM sont représentés en Figure 6 pour la vue en 2D et en Figure 7 pour la vue en 3D.

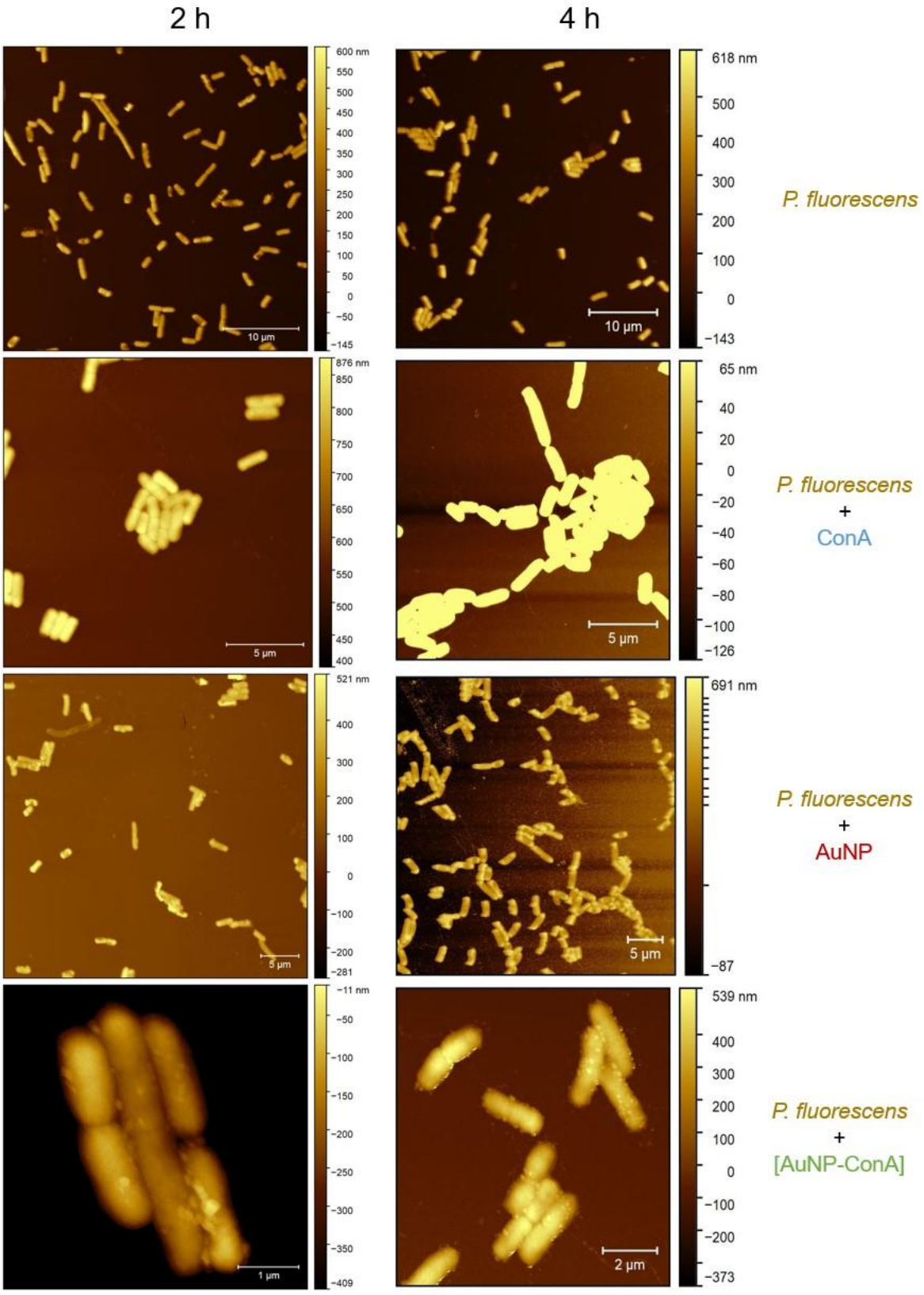


Figure 6. Clichés 2D d'AFM représentant P. fluorescens à 2 h et 4 h dans les différentes conditions.

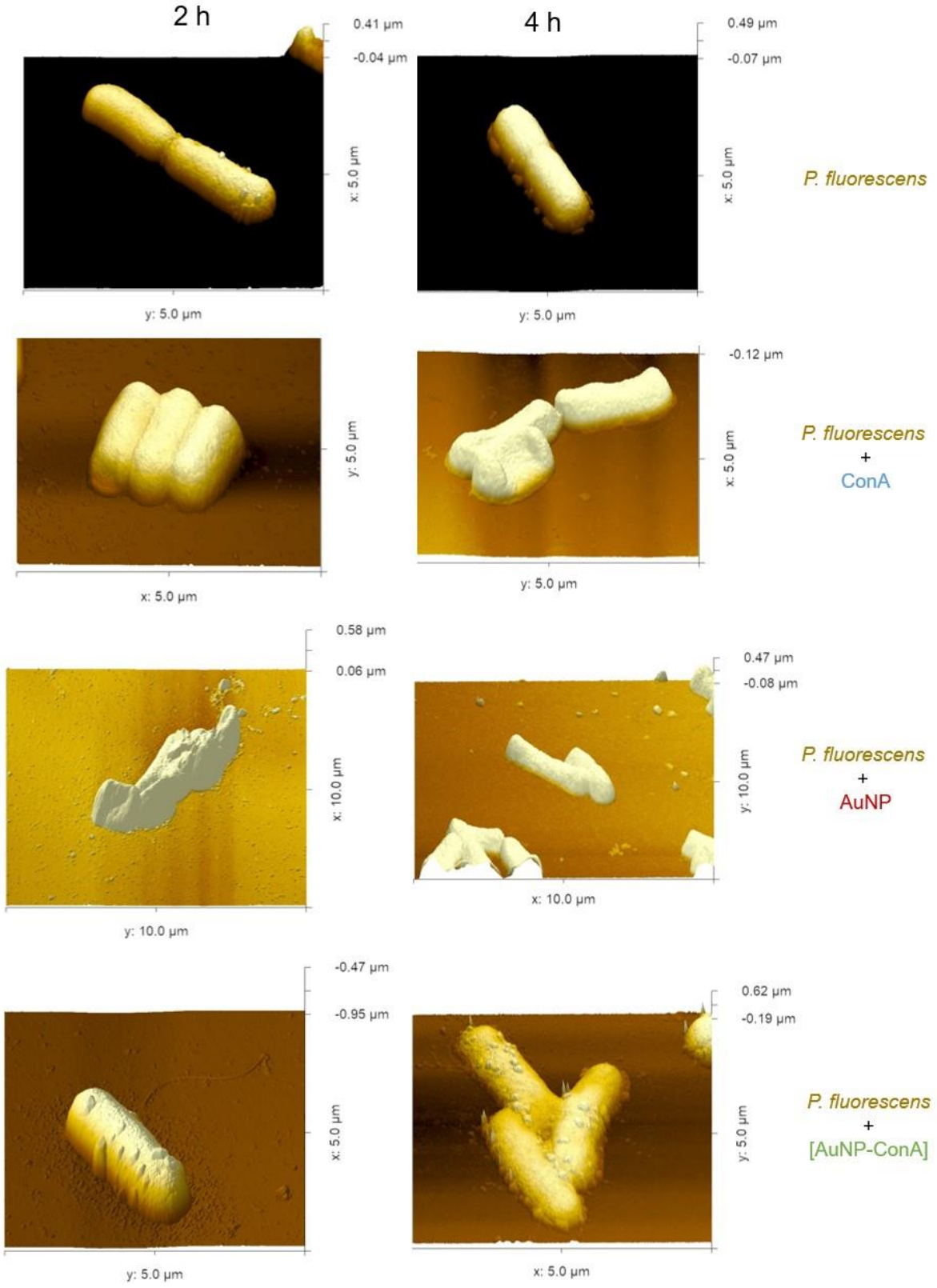


Figure 7. Clichés 3D d'AFM représentant P. fluorescens à 2 h et 4 h dans les différentes conditions.

Les bactéries seules sont en forme de bacille et il est possible d'observer à 2 h la division et la croissance d'un bacille. Les descriptions ci-dessous provenant des clichés d'AFM sont valables pour chaque condition de temps de croissance bactérienne.

Lorsque la bactérie est en présence de ConA, un phénomène s'apparentant à de « l'agrégation » se produit. Les bactéries forment un réseau et sont beaucoup moins individualisées. L'hypothèse posée ici est que la ConA, en se liant à l'EPS des bactéries, forme des « ponts » entre les bactéries et est donc responsable de la formation de ces « agrégats ». Ceci est un premier élément allant en faveur de l'interaction entre la ConA et les bactéries.

Les AuNP ont été ajoutées aux bactéries afin d'évaluer deux aspects : est-ce que les AuNP possèdent un effet délétère envers les bactéries (toxicité, interaction forte avec les parois) et les AuNP possèdent-elles le même comportement que la ConA seule en présence de bactéries (adhésion à la surface) ?
Il a été observé que les AuNP ne causent pas de dommages au niveau de la paroi et ne nuisent pas à l'intégrité de la bactérie, ce qui est une conclusion positive. Le but de l'utilisation des [AuNP-ConA] est, en effet, de détecter des bactéries, si bien qu'il ne faudrait pas qu'un des constituants du complexe nuise à cette espèce et soit délétère à la détection des bactéries par un effet de ce type. Par ailleurs, il est possible d'observer une répartition des AuNP sur la totalité de la zone topographiée, celles-ci formant un « tapis » à la surface de la lame et conférant une allure « rugueuse » à la surface bactérienne qui n'était pas observée dans les deux conditions précédentes. Ceci permet de conclure que les AuNP n'ont pas d'affinité spécifique avec les bactéries.

Finalement, lorsque les bactéries sont mises en contact avec [AuNP-ConA], des phénomènes différents sont observés. La vue en 2D (Figure 6) a d'abord permis d'observer des structures sphériques de diamètre 145 ± 27 nm sur la surface des bactéries et, de manière moindre, à la proximité directe autour de la bactérie. Lorsque cette même condition est observée en 3D (Figure 7), la visualisation de ces structures sphériques est d'autant plus marquée, nous observons qu'elles sont uniquement présentes sur les bactéries et, comme mentionné précédemment, autour de celle-ci, à sa base. Additionnellement, des structures sphériques de diamètre 18 ± 10 nm sont observées de manière récurrente sur l'ensemble de la surface en verre. Étant donné les tailles obtenues et en les comparant avec les valeurs d'AFM de l'**article 2** (23.2 ± 3.1 nm), il est très probable qu'il s'agisse d'[AuNP-ConA] libres. De plus, nous observons également un tapissage d'AuNP seules (non modifiées par la ConA) (7 ± 2 µm) sur toute la surface. Cependant, ce tapissage semble être moins dense en AuNP que pour la condition *P.*

fluorescens + AuNP. Il est possible que ceci soit dû au fait que pour la condition *P. fluorescens* + [AuNP-ConA], les AuNP sont surtout mobilisées pour former [AuNP-ConA]. Par conséquent, il y a moins d'AuNP seules et celles-ci forment le tapissage observé. Ici, les structures à la surface des bactéries sont de taille plus conséquentes ce qui laisse penser que [AuNP-ConA] s'assemblent entre eux lors de l'adhésion à la bactérie. Afin de mieux visualiser ces propos, une représentation schématique est dépeinte en Figure 8.

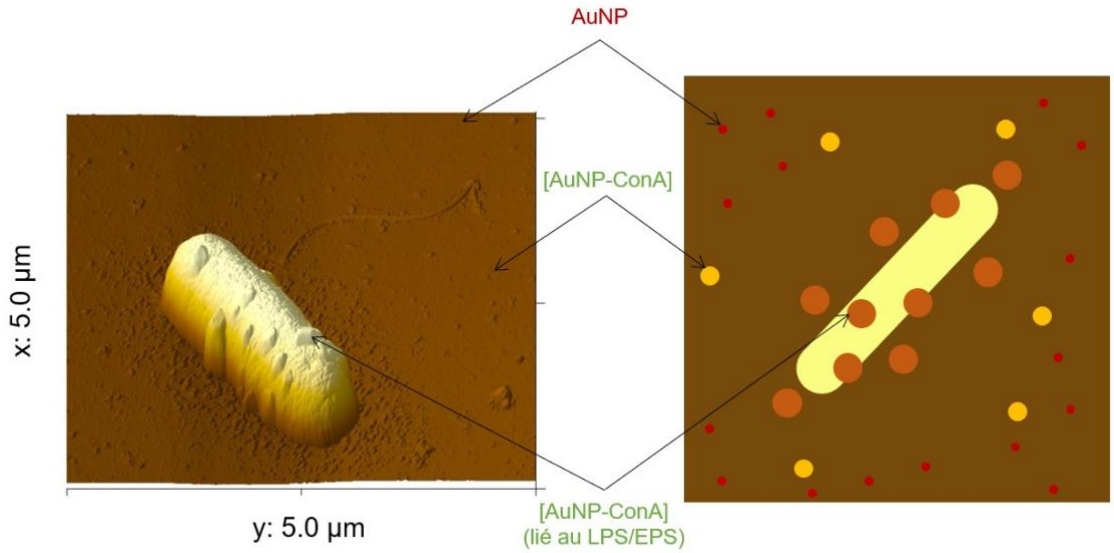


Figure 8. Représentation schématique des différentes structures observées en AFM.

Finalement, les [AuNP-ConA] possèdent une activité différente de la ConA et des AuNP seules puisque leur présence est observée sur la bactérie et surtout à sa base. L'épifluorescence a ensuite été utilisée par la suite de manière à révéler par fluorescence la localisation des EPS produit par les bactéries.

4.3.3. Détermination de la localisation de l'EPS de P. fluorescens par épifluorescence

L'observation en épifluorescence a été entreprise afin d'observer les bactéries *via* le fluorophore SYBR Green II mais également l'EPS produit par celles-ci *via* la ConA-Alexa selon le principe schématisé en Figure 1. De la même manière qu'en AFM, les mêmes conditions ont été évaluées afin d'établir un parallèle sur les conclusions et hypothèses posées. Les résultats d'épifluorescence sont présentés en Figure 9.

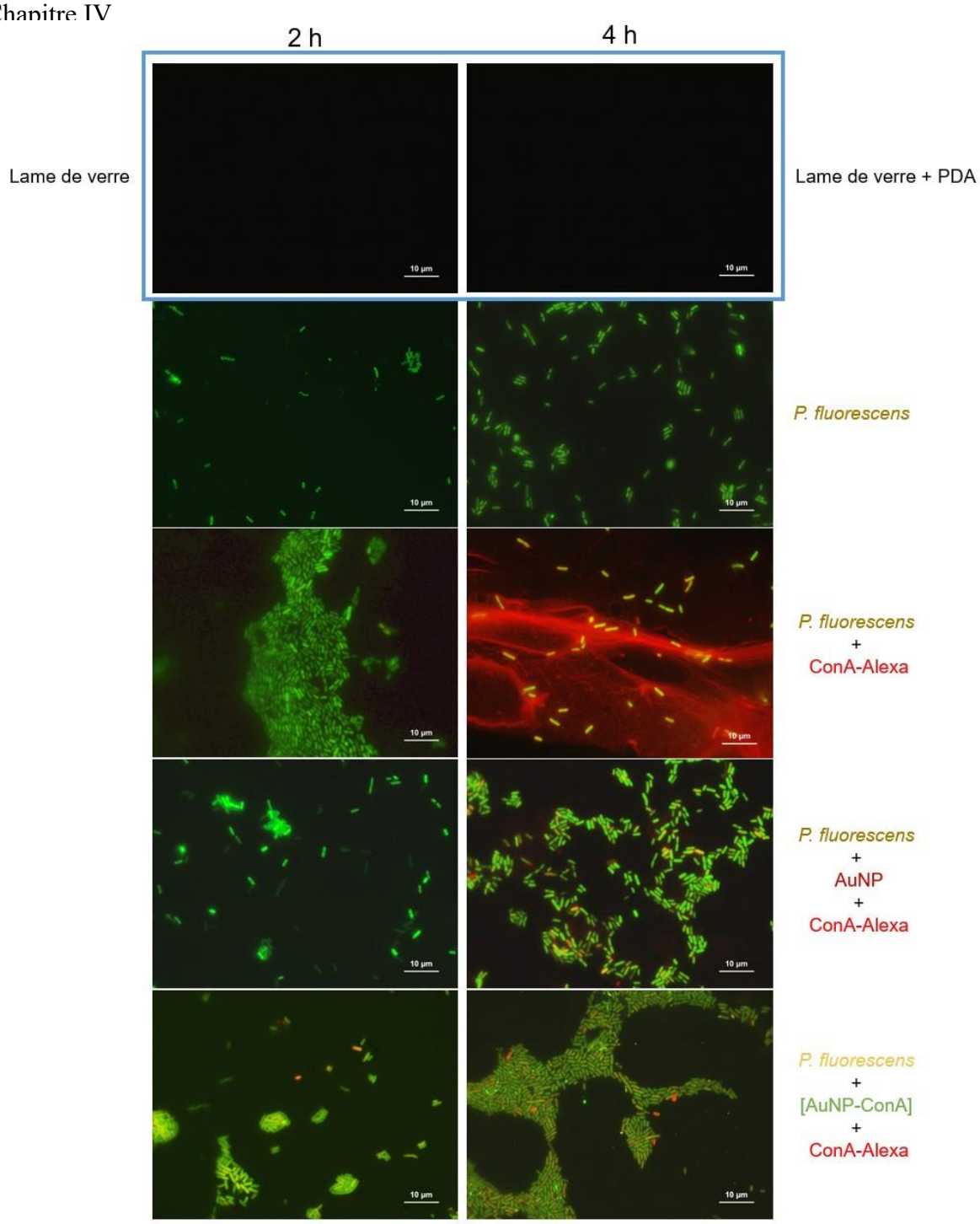


Figure 9. Clichés d'épifluorescence de P. fluorescens à 2 h et 4 h dans les différentes conditions ainsi que les témoins associés.

Premièrement, des témoins ont été réalisés de manière à confirmer que la fluorescence observée l'est uniquement en présence de bactéries. Les témoins sont une lame ronde de verre seule et une lame de verre sur laquelle a été déposé de la PDA. Ces deux lames ont été traitées avec les deux fluorophores et aucune fluorescence n'a été observée.

Lorsque la ConA-Alexa est ajoutée aux bactéries, la fluorescence rouge (propre à la ConA-Alexa) n'apparaît presque pas dans la condition à 2 h mais apparaît systématiquement à 4 h. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'après 2 h d'incubation, les bactéries sont encore en phase de croissance et n'ont pas encore débuté la sécrétion d'EPS (ou de façon très limitée). À 4 h, un film rouge est observé, ce qui semble correspondre à l'apparition d'un biofilm formé par l'importante sécrétion d'EPS. Il est possible d'observer la formation d'un liseré rouge autour des bactéries. Ceci indique la présence d'EPS au pourtour de la bactérie, ce qui corrobore l'observation effectuée en AFM. Ceci permet de confirmer que la bactérie sécrète un EPS, que celui-ci est présent à son pourtour (< 0.5 µm), aux mêmes zones où les [AuNP-ConA] se fixent selon les images AFM (Figure 6 et 7).

L'analyse des bactéries en présence d'AuNP et de ConA-Alexa permet d'observer que les bactéries conservent leur morphologie et que les AuNP n'induisent pas leur mort. Les bactéries présentent plus « d'agrégation » que le témoin. De plus, la présence de ConA-Alexa et de fluorescence rouge indique que les AuNP ne nuisent pas à la formation et à la conservation de la liaison entre la ConA-Alexa à l'EPS.

Lorsque les bactéries sont mises en contact avec les [AuNP-ConA] puis avec la ConA-Alexa, elles forment un réseau compact ressemblant à un réseau avec peu de bactéries individualisées. La fluorescence rouge est localisée soit sur le pourtour des bactéries (de la même manière que décrit précédemment) soit d'une manière semblant recouvrir la totalité de la bactérie avec des bacilles totalement rouges. Il est possible que ce phénomène découle d'un stade de sécrétion d'EPS différent des autres bactéries ou alors que le SYBR Green II ait mal marqué ces bactéries en particulier.

Finalement, les résultats d'épifluorescence mis en corrélation avec les résultats d'AFM permettent de conclure que [AuNP-ConA] se lie à la surface de *P. fluorescens* (obtenues à 2 h et à 4 h d'incubation), indiquant que même si très peu d'EPS est sécrété (*jeunes* bactéries), la fonction de reconnaissance de la ConA est assez performante pour se lier au glucose composant l'EPS. Le LPS de *P. fluorescens* comportant du glucose, il est possible que l'action de reconnaissance par la ConA soit favorisée même en présence de très peu d'EPS. Ces deux méthodes expérimentales mises bout à bout permettent de valider l'hypothèse d'une possible détection par les [AuNP-ConA] d'une bactérie produisant un EPS dont les sucres présents sont reconnus par la lectine. Il faudra poursuivre avec des expériences parallèles utilisant des [AuNP-HPA] non spécifiques du LPS de *P. fluorescens* ni de son EPS pour valider cette hypothèse, et que ces observations ne sont pas dues à des interactions non spécifiques.

Il est important de préciser que l'EPS observé à 4 h pour la condition *P. fluorescens* + ConA-Alexa est également visualisé pour chaque autre condition contenant ConA-Alexa à 4 h. Des images obtenues le prouvent mais avec des bactéries et l'EPS dans deux plans différents, ce qui rend l'image de faible qualité. Ces résultats pourront être nuancés en effectuant une lame sur laquelle un ajout successif de (1) ConA puis (2) d'AuNP est réalisé sur les bactéries, au lieu d'un ajout direct d'[AuNP-ConA]. Ainsi, nous pourrons déterminer si la ConA, en s'associant à la bactérie, n'induit pas une possible agrégation d'AuNP. En effet, bien que l'interaction entre [AuNP-ConA] et la bactérie est confirmée, son mécanisme ne l'est pas. Il n'est pas impossible que le complexe se dissocie, entraînant l'adsorption de la ConA sur la bactérie puis l'agrégation des AuNP en surface.

4.3.4. Quantification d'or par ICP-OES

La quantification d'or dans des échantillons bactériens a été entreprise par ICP-OES. Cette expérimentation a pour but de comparer la concentration en or dans le culot et le surnageant de suspensions bactériennes. La bactérie est mise en contact avec [AuNP-ConA] ou AuNP, puis les bactéries sont séparées par centrifugation, donnant un culot (contenant les bactéries) et un surnageant. Si davantage d'or est décelé dans le culot des conditions où la bactérie est mise en contact avec que celle où elle est en contact avec AuNP seule, cela permettra de conclure que [AuNP-ConA] se fixent aux bactéries de manière préférentielles par rapport aux AuNP seules. Les résultats de la quantification sont présentés en Figure 10, ces résultats sont exprimés en moyenne avec écarts-types sur 3 échantillons indépendants.

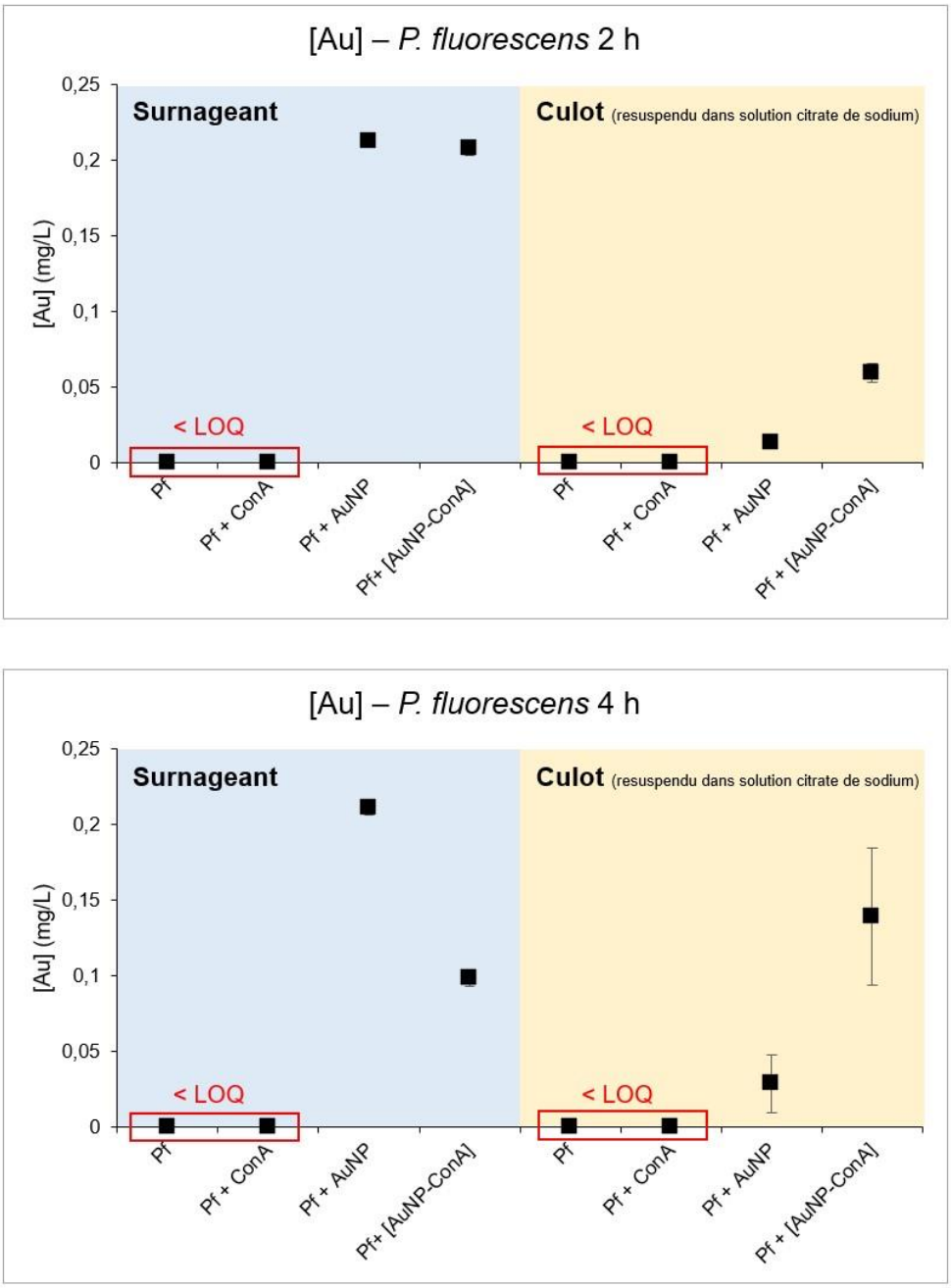


Figure 10. Résultats de quantification d'or en ICP-OES dans deux conditions de P. fluorescens (2 h et 4 h) dans différentes conditions. LOQ : limite de quantification.

Les résultats de quantification montrent qu'il n'y a pas d'or retrouvé dans les conditions sans AuNP et permettant de valider les témoins et les conditions évaluées. La quantité d'or dans les culots (exprimée en AuNP/ bactérie) et les masses d'or dans chaque milieu (culot / surnageant) ainsi que les rendements d'or exprimés en pourcentage par rapport à la quantité d'or initialement ajoutée sont reportées dans le Tableau 1. Une comparaison de la masse totale en or

y est également présentée, en comparaison avec la masse d'or initialement ajoutée dans chaque échantillon qui est de 2.72 µg.

Tableau 1. Résultats de la quantité d'or retrouvée en ICP-OES pour chaque fraction et condition. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type de 3 échantillons indépendants.

	***P. fluorescens* 2 h**		***P. fluorescens* 4 h**	
	AuNP	[AuNP-ConA]	AuNP	[AuNP-ConA]
Culot (AuNP/bactérie)	9000 ± 2000	42000 ± 5000	7000 ± 5000	30000 ± 11000
Culot (µg, rendement (%))	0.13 ± 0.03 (5 %)	0.59 ± 0.06 (21 %)	0.29 ± 0.19 (10 %)	1.39 ± 0.45 (51 %)
Surnageant (µg, rendement (%))	2.12 ± 0.04 (78 %)	2.08 ± 0.05 (77 %)	2.11 ± 0.05 (78 %)	0.99 ± 0.06 (36 %)
Total (µg, rendement (%))	2.25 ± 0.05 (83 %)	2.67 ± 0.08 (98 %)	2.40 ± 0.20 (88 %)	2.38 ± 0.46 (88 %)

Il est observé une diminution de la quantité d'AuNP par bactérie dans la condition [AuNP-ConA] à 4 h par rapport à la condition 2 h. Ceci peut être expliqué par le fait qu'à 4 h, plus de bactéries sont présentes dans le milieu, de ce fait, les AuNP sont mobilisées pour chacune de ces bactéries, rendant le résultat en AuNP/ bactérie moins important à 4 h. Lorsque le résultat est exprimé en µg d'or, on observe une quantité plus importante retrouvée à 4 h (1.39 ± 0.45 µg) qu'à 2 h (0.59 ± 0.06 µg), ce qui semble confirmer notre hypothèse. De manière à normaliser les résultats exprimés en AuNP/bactérie, il serait judicieux de diluer la suspension bactérienne de 4 h pour atteindre la même concentration que la suspension de 2 h. De ce fait, la même concentration en bactérie sera évaluée mais la suspension diluée de bactéries à 4 h possédera normalement une plus grande quantité d'EPS. Ainsi, la concentration en AuNP/bactérie devrait être plus importante à 4 h qu'à 2 h.

Dans les deux conditions de temps de croissance des bactéries, toutes les quantités d'or retrouvées dans le culot sont plus élevées pour la condition [AuNP-ConA] que pour la condition AuNP. Une hypothèse pouvant expliquer ceci est que ce [AuNP-ConA] se fixe préférentiellement aux bactéries en formant des structures de taille plus importante que les AuNP, comme il a été démontré grâce aux images AFM. Par conséquent, plus d'or est engagé dans [AuNP-ConA] que dans AuNP seulement.

Une plus grande quantité d'or est présente dans le surnageant par rapport au culot (resuspendu dans la solution de citrate de sodium) dans toutes les conditions hormis pour [AuNP-ConA] ajouté aux bactéries à 4 h de croissance. Ce phénomène peut être dû au fait qu'une quantité d'or trop importante par rapport à la quantité de bactéries a été ajoutée et que, même si les AuNP et [AuNP-ConA] se fixent aux bactéries et sédimentent avec dans le culot, les bactéries peuvent se retrouver saturées et le surplus d'or est donc retrouvé dans le surnageant. Dans nos conditions de centrifugation, les AuNP seules (sans bactéries) ne peuvent pas se retrouver dans le culot. Pour les bactéries à 4 h de croissance auxquelles sont ajouté [AuNP-ConA], le rendement plus important retrouvé dans le culot peut être expliqué par le fait que les bactéries ont eu plus de temps pour produire de l'EPS et donc, que plus d'[AuNP-ConA] a pu s'accrocher à leur surface et sédimenter avec pendant l'étape de centrifugation.

4.3.5. *Études en spectroscopies Raman et SERS de l'interaction entre AuNP et ConA*

De manière à approfondir les résultats d'interaction entre AuNP et ConA, des expérimentations menées par Dr. Yun Luo et Pr. Claire Mangeney ont été réalisées au Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques (LCBPT, Paris). Ces résultats présentent un spectre Raman du lyophilisat de ConA et des spectres SERS des AuNP et [AuNP-ConA] puisque les AuNP exaltent le signal Raman. Les résultats présentés ci-dessous sont des résultats préliminaires d'une étude visant à effectuer une cartographie SERS-Raman de *P. fluorescens* avec AuNP et [AuNP-ConA]. Au moment où ce manuscrit est rédigé, les expérimentations avec les bactéries n'ont pas encore eu lieu mais des résultats sur le lyophilisat de ConA, les AuNP et [AuNP-ConA] ont déjà été obtenus.

La première étape consistait à effectuer un spectre Raman d'une solution de ConA à 30 nM. Cependant, aucun signal n'a été obtenu et des spectres ont été effectuées sur la poudre lyophilisée à la place. Ces résultats concernant la poudre de ConA sont présentés en Figure 11. Le spectre Raman permet d'observer plusieurs pics d'intérêts, notamment dans la région correspondante aux vibrations C=C, N-C=O et COO^- (liaison C=O), aux alentours de 1670 cm^{-1}. Un pic à 1000 cm^{-1} typiquement associé à la vibration de flexion angulaire du groupe phényle de la Phénylalanine [9], acide aminé présent dans la ConA (Figure 9, Chapitre I) est observé.

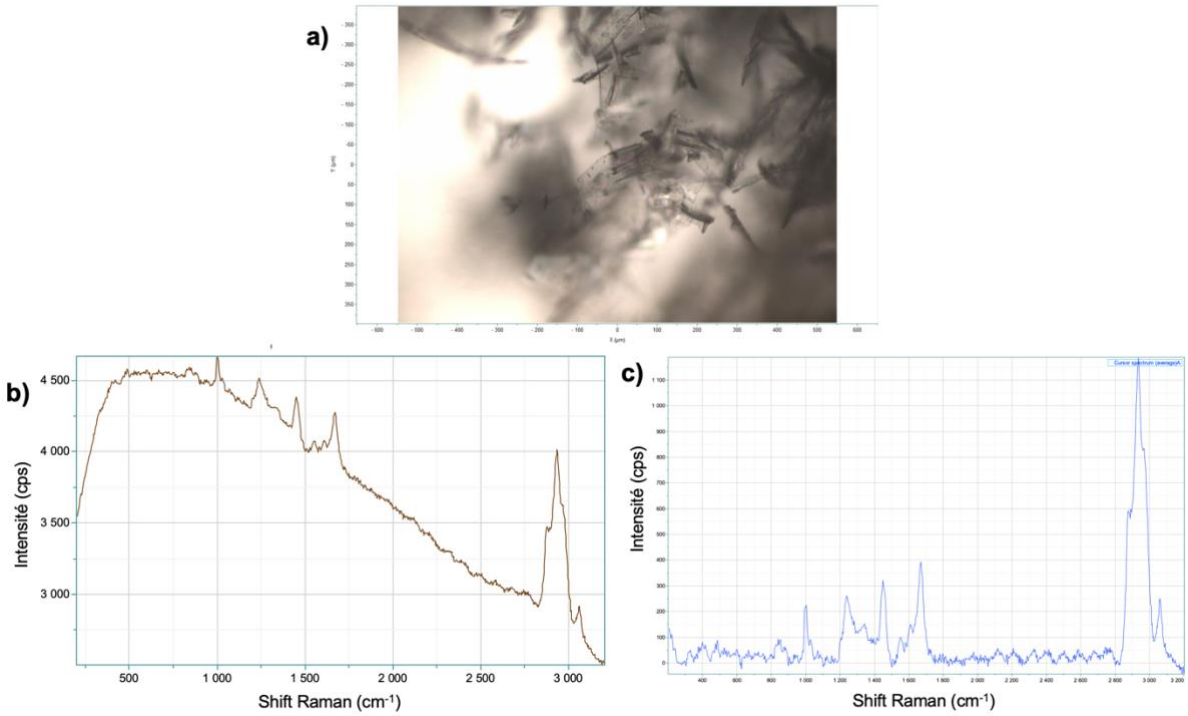


Figure 11. a) Photographie au microscope de la poudre de ConA, b) spectre Raman non-corrigé et c) spectre Raman corrigé de la poudre de ConA.

Le spectre Raman des AuNP (60 nM) a ensuite été réalisé, les résultats sont présentés en Figure 12.

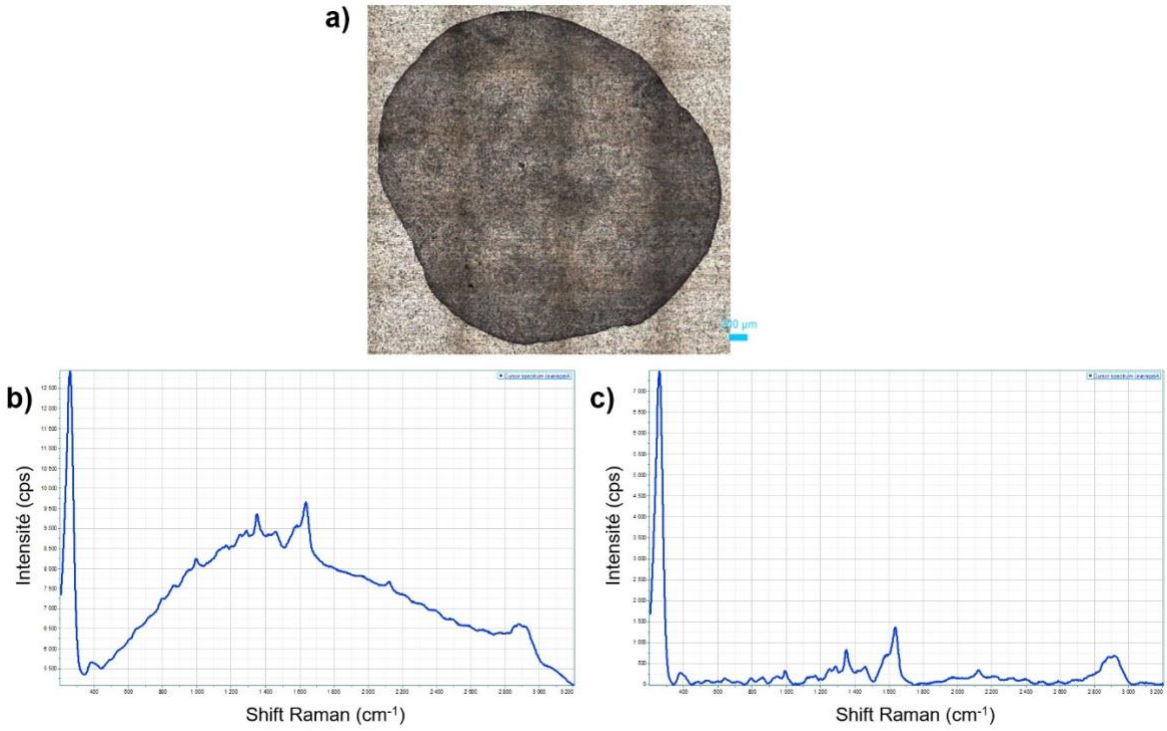


Figure 12. a) Photographie au microscope d'une goutte d'AuNP séchée, b) spectre Raman non-corrigé et c) spectre Raman corrigé des AuNP.

En plus d'un pic à 254 cm^{-1} correspondant à la liaison Au-Cl [10], trois autres pics peuvent être observés : premier pic à 2879 cm^{-1}, un second à 1632 cm^{-1} et un dernier à 1344 cm^{-1}. Le premier pic est présent dans une région généralement associée aux vibrations C-H provenant de molécules organiques. Cependant, le signal du citrate de sodium sur des AuNP est généralement observé vers 1385 cm^{-1} et 1020 cm^{-1} [11]. Ceci peut laisser sous-entendre que le signal observé dans cette région provient de résidus ou contaminations durant la synthèse d'AuNP ou du contenant plastique dans lesquelles elles sont conservées. Les pics observés à 1632 cm^{-1} et 1344 cm^{-1} sont associés à la vibration symétrique du groupe carboxyle (COO^-) présent dans le citrate de sodium [11].

Finalement, les résultats du spectre Raman pour les [AuNP-ConA] 1:1 (30 nM) sont présentés en Figure 13 .

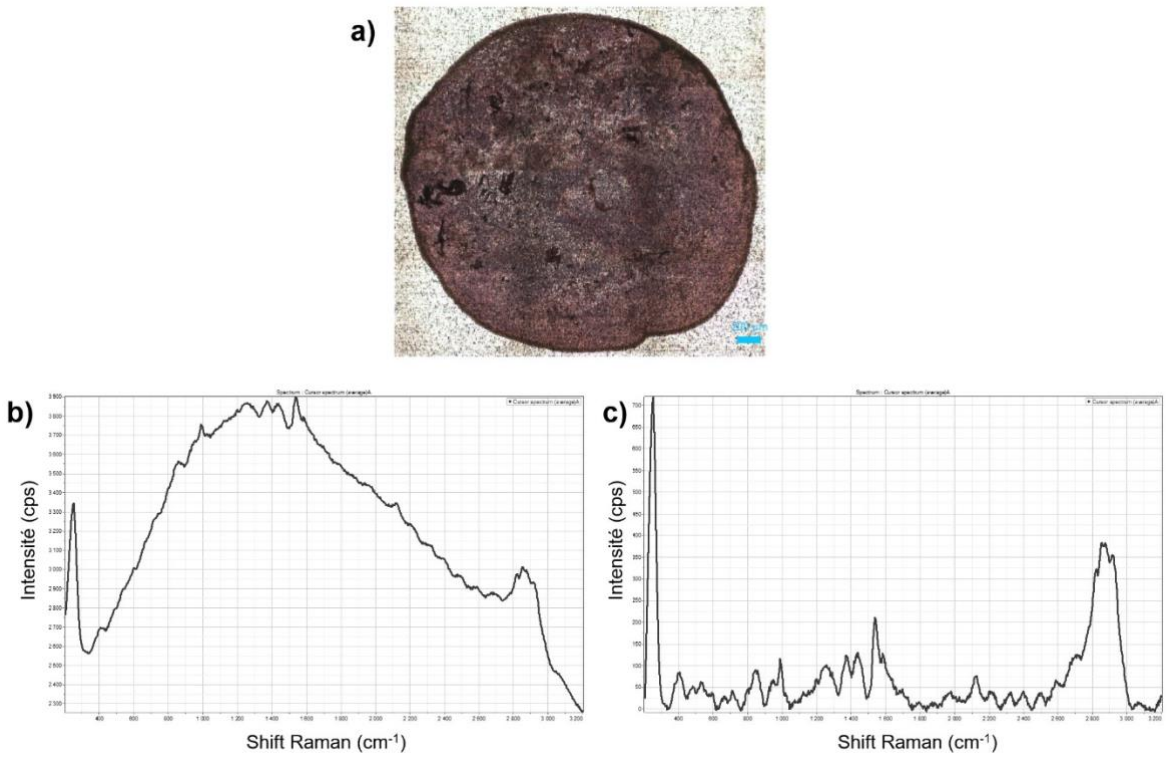


Figure 13. a) Photographie au microscope d'une goutte des [AuNP-ConA] séchée, b) spectre Raman non-corrigé et c) spectre Raman corrigé d'[AuNP-ConA].

Le pic correspondant à la liaison Au-Cl est toujours observé à 254 cm^{-1} [10]. De plus un pic à 2850 cm^{-1}, correspondant la vibration de la liaison C-H et plus particulièrement de la vibration symétrique de groupes méthylènes (CH_2) [12], est observé. Celui-ci peut être attribué aux chaines aliphatiques des acides aminés de la ConA comme la leucine, l'isoleucine, la glycine, la valine et l'alanine (Figure 9, Chapitre I). Ce pic peut également être assimilé à celui retrouvé à 2879 cm^{-1} sur le spectre des AuNP seules décrit ci-dessus. Plusieurs autres pics sont observés sur ce spectre :

- 1540 cm^{-1} :

Ce pic est présent dans une région caractéristique de la bande amide II des protéines et est donc attribué à la ConA.

- 1436 cm^{-1} :

Il s'agit d'un pic pouvant être associé à la vibration en ciseaux des groupes CH_2, en particulier des chaînes latérales d'acides aminés aliphatiques.

- 1371 cm^{-1} :

Ce pic peut être attribué à l'élongation C-N des chaines latérales des acides aminés.

- 1248 cm^{-1} :

Localisé dans la région amide III, ce pic est associé à une combinaison d'élongation C-N et la déformation N-H dans la structure protéique. Cette région amide III est par ailleurs sensible à la structure secondaire des protéines (hélices α et feuillets β).

- 990 cm^{-1} :

De la même manière que précédemment, ce pic peut être attribué à la phénylalanine de la ConA.

Finalement, le spectre Raman des [AuNP-ConA] permet de visualiser les éléments caractéristiques des AuNP et de la ConA.

La Figure 14 ci-dessous récapitule ces trois spectres Raman superposés afin de visualiser les similitudes retrouvées.

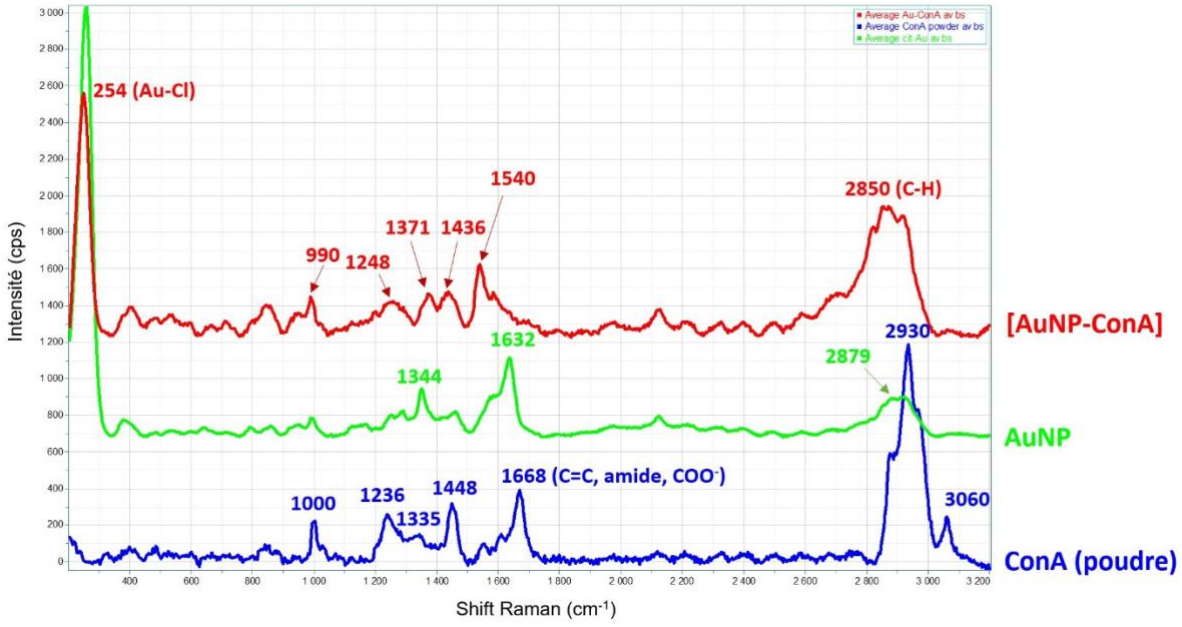


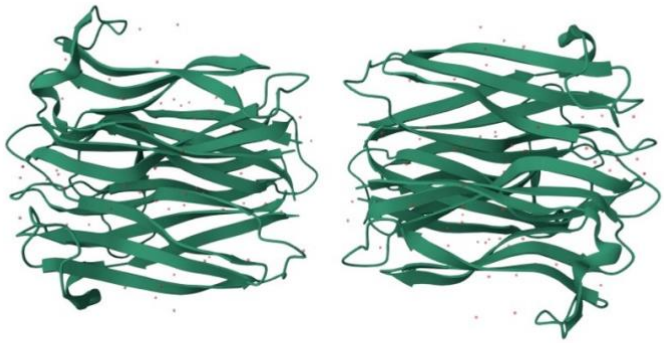
Figure 14. Spectres Raman de la poudre de ConA, AuNP et [AuNP-ConA] superposés.

L'étape suivante de ces expérimentations Raman sera d'effectuer ces spectres en présence de *P. fluorescens* afin d'apporter des résultats complémentaires à l'interaction des [AuNP-ConA] sur cette bactérie. Ces expérimentations sont programmées pour cet été.

4.4. Discussion et perspectives du chapitre 4

Les résultats obtenus par AFM et épifluorescence permettent d'observer l'interaction des [AuNP-ConA] avec *P. fluorescens*. Cependant, des perspectives doivent être envisagées afin d'approfondir les hypothèses et les résultats. La première a été discutée précédemment, il s'agit d'effectuer des spectres Raman de *P. fluorescens* en présence de ConA, AuNP et [AuNP-ConA] afin de mettre en parallèle ces résultats, à ceux déjà obtenus et traités. Ces analyses seront menées rapidement grâce à la collaboration avec Dr. Yun Luo et Pr. Claire Mangeney. La deuxième possibilité sera de réaliser un témoin négatif à ces expérimentations en utilisant une lectine ne se liant pas aux EPS produits par la bactérie, ni à ses LPS.

Afin d'effectuer ce témoin négatif, une lectine a d'ores et déjà été sélectionné. Il s'agit de la lectine HPA, lectine animale contrairement à la ConA (d'origine végétale, issue de ***Canavalia ensiformis***). Ces deux lectines sont cependant similaires au niveau structurel puisqu'elles possèdent majoritairement une composition en feuillets β (Figure 15 et Figure 9 Chapitre I). La HPA peut être séparée en deux isolectines HPA I et HPA II, ces deux isolectines possèdent un point isoélectrique de 6.77 et 8.47 respectivement [13]. La HPA est une lectine dimérique possédant 101 acides aminés et reconnaît le N-acétylgalactosamine [14]. Elle ne devrait donc pas interagir avec l'EPS ni avec le LPS de *P. fluorescens*. Le sourçage des lectines est important en termes de pureté et d'éléments contaminants issus de l'extraction/purification. Il existe dans la littérature des équipes de recherche ayant purifiés eux-mêmes les lectines utilisées à partir des plantes de référence [15]. Il est également possible de se procurer des lectines commerciales purifiées de différentes manières et de différentes qualités, ce qui a été notre cas pour la ConA et HPA. Cependant, en ouvrant ce sujet à d'autres lectines, il faudra potentiellement se tourner vers des lectines moins caractérisées en termes de pureté et de substances contaminantes. Chaque méthode de purification devra être prise en compte dans le choix final car certaines peuvent contenir des résidus de réactifs chimiques n'étant pas compatible avec le protocole. Ces problématiques ont été discutées dans l'**article 1**.



RVQSGKINCGDDAGWAKVPSNDPGRDNTRELAKNITFASPYCRPPVVLLS
ITQLDVEQSQNLRVIARLYSVSPTGFKASCYTWHNTKVYSMSISWISIENY

Figure 15. Structure dimérique de la lectine HPA avec sa séquence en acides aminés. Provenant de l'entrée 2CE6 de ProteinDataBank. Les sphères représentent des molécules d'H2O.

De cette manière, si les résultats concordent, il sera possible d'affirmer que l'interaction observée est uniquement due à la capacité de reconnaissance de la ConA et de prouver l'intérêt de l'utilisation des [AuNP-ConA]. Ceci permettra alors d'aller plus loin et de proposer des méthodes de discrimination selon la bactérie choisie, les sucres présents sur le LPS et les EPS (si la bactérie en sécrète) et la lectine mise en jeu et pourra valider le concept de laboratoire sur puce comme il l'a été énoncé dans l'objectif de thèse (Chapitre I, page 104). Cependant, il reste à prendre en compte que, chaque lectine étant différente en structure et composition, la formation d'un complexe [AuNP-lectine] peut requérir la mise en place d'un protocole différent afin d'obtenir un objet stable. Par exemple, il est possible que le protocole d'adsorption d'[AuNP-ConA] ne soit pas adapté pour la HPA et qu'il soit nécessaire d'effectuer des modifications chimiques afin d'obtenir un complexe stable.

A l'heure actuelle, les résultats disponibles nécessitent des expérimentations complémentaires afin de les alimenter et de les nuancer. Il existe dans la littérature des études montrant la détection de bactéries grâce à des lectines couplées à des NP *via* le SERS [16] ou la fluorescence [17]. Cependant, à notre connaissance, il n'existe pas d'étude utilisant ces deux méthodes couplées à de l'AFM afin de prouver la détection bactérienne grâce à une sonde formé de NP et lectines. Dans cette optique, et en se basant sur ce qui a été présenté dans ce manuscrit, les prochaines expérimentations à effectuer seront les suivantes :

- Développer les [AuNP-HPA] sur le même principe que les [AuNP-ConA] par adsorption *via* une incubation simple
- Effectuer des tests de caractérisation et de stabilité en UV-Visible et en DLS

- Effectuer la TDA avec [AuNP-HPA] et N-acétylgalactosamine, et d'autres sucres non spécifiques.
- Étudier l'interaction entre AuNP et HPA grâce au quenching de fluorescence induit par les AuNP en contact avec HPA
- Effectuer les études en AFM et épifluorescence sur le même principe que présenté plus haut dans ce chapitre.
- Études en Raman et SERS de [AuNP-ConA] et [AuNP-HPA] avec *P. fluorescens*

Les résultats attendus sont une stabilité similaire à celle de [AuNP-ConA], *a minima* suffisante pour les expérimentations en milieu biologique, une détermination du mécanisme de liaison par étude de quenching de fluorescence (*i.e*. dynamique ou statique). Il serait préférable de ne pas observer de structures similaires à [AuNP-ConA] à la surface de *P. fluoresc*ens en AFM. En épifluorescence il serait attendu que la coloration rouge de HPA-Alexa (Invitrogen, 647 conjugate) ne soit pas observée de la même manière que ConA-Alexa puisque HPA-Alexa ne devrait en théorie pas se fixer sur l'EPS et donc ne pas émettre la même fluorescence. Par ailleurs, il conviendra d'effectuer un complexe [AuNP-ConA] et [AuNP-HPA] dans lesquels la ConA et la HPA sont en réalité ConA-Alexa et HPA-Alexa respectivement. Ceci permettra d'évaluer si une différence de fluorescence est observée en épifluorescence par rapport aux conditions présentées dans ce chapitre. Cependant, cela sera possible uniquement si le label fluorescent de ces deux lectines ne représente pas un désavantage dans le développement de ces complexes et n'interagit pas de façon négative avec les AuNP ou encore avec le site de liaison des lectines. Finalement, les dernières expérimentations en spectroscopie Raman devraient permettre d'observer des différences de signaux entre *P. fluorescens* et [AuNP-ConA] et *P. fluorescens* et [AuNP-HPA]. Toutes ces expérimentations mises en corrélation pourront alors proposer une validation de la détection bactérienne par [AuNP-ConA] avec une caractérisation fine de cette détection par différentes méthodes. À l'heure actuelle, la combinaison de techniques d'AFM, d'épifluorescence et de SERS n'est pas décrite pour confirmer la détection bactérienne grâce à un nano-biocapteur, ces expérimentations proposeront alors un concept nouveau pour une thématique d'importance biomédicale.

Les résultats présentés dans ce chapitre ainsi que ce manuscrit reflètent l'activité du complexe [AuNP-ConA] dans lequel les AuNP sont sphériques. Cependant, une multitude de morphologies existe et peut être employée. Certaines possèdent différentes propriétés pouvant *in fine* devenir plus intéressantes pour améliorer la sensibilité de notre sonde. Par exemple, les nano-bâtonnets ou nano-étoiles (*nanorods* ou *nanostars* en anglais) peuvent être utilisés

puisqu'ils possèdent deux LSPR [18], [19], améliorant la sensibilité et permettant d'observer les modifications de leur environnement de manière plus précise. L'amélioration de la sensibilité en utilisant deux LSPR a été démontrée par une étude ayant utilisé la méthode de sensibilité par décalage du double pic (*double peak shift sensitivity*) [20]. Grâce à l'implémentation de deux métaux possédant chacun un LSPR (oxyde de zinc dopé à l'aluminium et oxyde de zinc dopé au gallium), les performances du capteur sont décrites comme étant largement supérieures à celles de capteurs plus traditionnels utilisant l'or ou l'argent. Ce même article discute du fait que le pic de résonance de l'argent est plus important que celui de l'or, ce phénomène s'explique par le fait que l'argent ne possède pas de transitions interbandes dans le domaine visible contrairement à l'or [21]. Ceci entraîne des pics de résonance plus larges ainsi que moins intenses pour l'or par rapport à l'argent. Ceci pourrait représenter une future perspective de ce projet, c'est-à-dire la modification du métal employé dans la formation d'[AuNP-ConA] afin d'obtenir une meilleur sensibilité. Cependant, certains métaux pourraient ne pas être compatible avec les lectines employées. En effet, comme mentionné dans l'**article 1**, une étude employant une surface nanostructurée a montré que la ConA s'agglomère sur une surface composée de NP Fe_3O_4 recouvertes de chitosan mais que ce phénomène n'est pas observé pour ces mêmes NP recouvertes d'or [22].

4.5. Conclusion

Pour conclure, ce chapitre a montré que les [AuNP-ConA] sont susceptibles de se lier à la surface de *P. fluorescens via* les sucres (glucose) présents dans les EPS. Les résultats d'AFM et d'épifluorescence ont montré que la localisation des [AuNP-ConA] était préférentiellement située à l'endroit où l'EPS est excrété. Ceci permet une nouvelle fois de confirmer la rétention d'activité de reconnaissance de la ConA après adsorption sur les AuNP mais également d'obtenir des informations sur ses interactions avec une bactérie. De plus, les résultats obtenus en AFM ont démontré que la formation de structures à la base de la bactérie, à l'interface entre la bactérie et la surface semble uniquement possible avec [AuNP-ConA]. Ceci pourrait permettre de justifier l'utilisation des [AuNP-ConA] et ainsi de prioriser son utilisation à de la ConA seule d'une part ou des AuNP seules d'autre part. Les expérimentations complémentaires en cours sur les hypothèses présentées dans ce chapitre permettront d'étoffer les résultats déjà obtenus. Il s'agira en particulier de les valider grâce au développement d'un témoin négatif basé sur l'emploi d'une lectine ne possédant – théoriquement – pas de faculté de reconnaissance des EPS de *P. fluorescens*.

4.6. Références

[1] B. S. Scales, R. P. Dickson, J. J. LiPuma, and G. B. Huffnagle, "Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the Pseudomonas fluorescens Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 27, no. 4, pp. 927–948, Oct. 2014, doi: 10.1128/cmr.00044-14.

[2] F. Quilès, P. Polyakov, F. Humbert, and G. Francius, "Production of Extracellular Glycogen by Pseudomonas fluorescens: Spectroscopic Evidence and Conformational Analysis by Biomolecular Recognition," *Biomacromolecules*, vol. 13, no. 7, pp. 2118–2127, Jul. 2012, doi: 10.1021/bm300497c.

[3] M. L. Fishman, P. Cescutti, W. F. Fett, S. F. Osman, P. D. Hoagland, and H. K. Chau, "Screening the physical properties of novel *Pseudomonas* exopolysaccharides by HPSEC with multi-angle light scattering and viscosity detection," *Carbohydrate Polymers*, vol. 32, no. 3, pp. 213–221, Mar. 1997, doi: 10.1016/S0144-8617(97)00012-X.

[4] C.-C. Hung, P. H. Santschi, and J. B. Gillow, "Isolation and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Pseudomonas fluorescens* Biovar II," *Carbohydrate Polymers*, vol. 61, no. 2, pp. 141–147, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.carbpol.2005.04.008.

[5] A. J. Anderson, "Differences between lipopolysaccharide compositions of plant pathogenic and saprophytic pseudomonas species," *Appl Environ Microbiol*, vol. 48, no. 1, pp. 31–35, Jul. 1984, doi: 10.1128/aem.48.1.31-35.1984.

[6] B. Ezraty, C. Henry, M. Hérisse, E. Denamur, and F. Barras, "Commercial Lysogeny Broth culture media and oxidative stress: A cautious tale," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 74, pp. 245–251, Sep. 2014, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.010.

[7] J. Lim, S. Zhang, J.-M. Heo, M. C. Dickwella Widanage, A. Ramamoorthy, and J. Kim, "Polydopamine Adhesion: Catechol, Amine, Dihydroxyindole, and Aggregation Dynamics," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 16, no. 24, pp. 31864–31872, Jun. 2024, doi: 10.1021/acsami.4c08603.

[8] M. Zhang *et al.*, "Polydopamine-Based Biomaterials in Orthopedic Therapeutics: Properties, Applications, and Future Perspectives," *DDDT*, vol. 18, pp. 3765–3790, Aug. 2024, doi: 10.2147/DDDT.S473007.

[9] B. Hernández, F. Pflüger, S. G. Kruglik, and M. Ghomi, "Characteristic Raman lines of phenylalanine analyzed by a multiconformational approach," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 44, no. 6, pp. 827–833, 2013, doi: 10.1002/jrs.4290.

[10] M. Y. Chan, W. Leng, and P. J. Vikesland, "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Characterization of Salt-Induced Aggregation of Gold Nanoparticles," *ChemPhysChem*, vol. 19, no. 1, pp. 24–28, 2018, doi: 10.1002/cphc.201700798.

[11] H. Wang and H. Wei, "Controlled Citrate Oxidation on Gold Nanoparticle Surfaces for Improved Surface-Enhanced Raman Spectroscopic Analysis of Low-Affinity Organic Micropollutants," *Langmuir*, vol. 38, no. 16, pp. 4958–4968, Apr. 2022, doi: 10.1021/acs.langmuir.2c00367.

[12] A. P. Ault *et al.*, "Raman microspectroscopy and vibrational sum frequency generation spectroscopy as probes of the bulk and surface compositions of size-resolved sea spray aerosol particles," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 15, no. 17, pp. 6206–6214, 2013, doi: 10.1039/C3CP43899F.

[13] A. Markiv, D. Peiris, G. P. Curley, M. Odell, and M. V. Dwek, "Identification, Cloning, and Characterization of Two *N*-Acetylgalactosamine-binding Lectins from the Albumen Gland of *Helix pomatia*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 23, pp. 20260–20266, Jun. 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.184515.

[14] J.-F. Sanchez *et al.*, “Biochemical and Structural Analysis of *Helix pomatia* Agglutinin,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 29, pp. 20171–20180, Jul. 2006, doi: 10.1074/jbc.M603452200.

[15] V. S. Marangoni, I. M. Paino, and V. Zucolotto, “Synthesis and characterization of jacalin-gold nanoparticles conjugates as specific markers for cancer cells,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 112, pp. 380–386, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.07.070.

[16] H. Kearns, R. Goodacre, L. E. Jamieson, D. Graham, and K. Faulds, “SERS Detection of Multiple Antimicrobial-Resistant Pathogens Using Nanosensors,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 23, pp. 12666–12673, Dec. 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.7b02653.

[17] L. Sutarlie, H. L. Chee, S. Y. Ow, and X. Su, “A Rapid Total Bacterial Count Method for Food Samples using Syringe Filters and Lectin-Conjugated Semiconductor Nanorods,” *Chemistry – An Asian Journal*, vol. 19, no. 15, p. e202400332, 2024, doi: 10.1002/asia.202400332.

[18] S. Liao *et al.*, “Improvement of Gold Nanorods in Photothermal Therapy: Recent Progress and Perspective,” *Front. Pharmacol.*, vol. 12, Apr. 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.664123.

[19] V. Raghavan *et al.*, “Synthesis and characterisation of dual plasmonic gold nanostars as high-performance surface-enhanced Raman spectroscopy substrate,” *Micro & Nano Letters*, vol. 11, no. 11, pp. 769–774, 2016, doi: 10.1049/mnl.2016.0095.

[20] M. R. Islam, A. N. M. Iftekher, I. Marshad, N. F. Rity, and R. U. Ahmad, “Analysis of a dual peak dual plasmonic layered LSPR-PCF sensor – Double peak shift sensitivity approach,” *Optik*, vol. 280, p. 170793, Jun. 2023, doi: 10.1016/j.ijleo.2023.170793.

[21] R. Borah, R. Ninakanti, S. Bals, and S. W. Verbruggen, “Plasmon resonance of gold and silver nanoparticle arrays in the Kretschmann (attenuated total reflectance) vs. direct incidence configuration,” *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, p. 15738, Sep. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-20117-7.

[22] A. G. da Silva Junior, I. A. M. Frias, R. G. Lima-Neto, S. R. Sá, M. D. L. Oliveira, and C. A. S. Andrade, “Concanavalin A differentiates gram-positive bacteria through hierarchized nanostructured transducer,” *Microbiological Research*, vol. 251, p. 126834, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.micres.2021.126834.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse était de développer des AuNP modifiées par la ConA ainsi que d'étudier leur mode d'interaction. Il était également question d'étudier l'activité de reconnaissance de la ConA après modification des AuNP envers des sucres, LPS et bactéries.

Des AuNP, stabilisées par des ions citrate, ont été synthétisées puis caractérisées. Après leur synthèse, la modification par la ConA a été entreprise. Il a d'abord été tenté d'effectuer une modification des AuNP par la ConA en milieu PBS. Nous avons vu que ce milieu engendrait une déstabilisation de la suspension, que celui-ci ne permettait pas d'obtenir de résultats de DLS probants et finalement, ce milieu PBS n'a pas été retenu. Une modification chimique de la ConA par le 2-IT a été entreprise afin de tenter de la lier de manière covalente aux AuNP *via* une liaison or-soufre. Cependant, ce réactif engendrait également une déstabilisation totale de la suspension et il n'a pas été possible de modifier les AuNP par la ConA. Finalement, nous avons décidé d'utiliser le milieu de synthèse des AuNP, *i.e* une solution de citrate de sodium, pour y ajouter la ConA par simple incubation. En effectuant ceci, nous avons obtenu une suspension dont la LSPR et les valeurs de D_H (obtenues en DLS) sont stables pendant 5 jours. Grâce à cela, nous avons pu nous focaliser sur le mécanisme d'interaction entre les deux composés. Les résultats présentés dans l'**article 1** ont montré que l'interaction entre AuNP et ConA s'effectue *via* des liaisons ioniques, de faible énergie, et qu'un système de recouvrement dynamique des AuNP est mis en jeu.

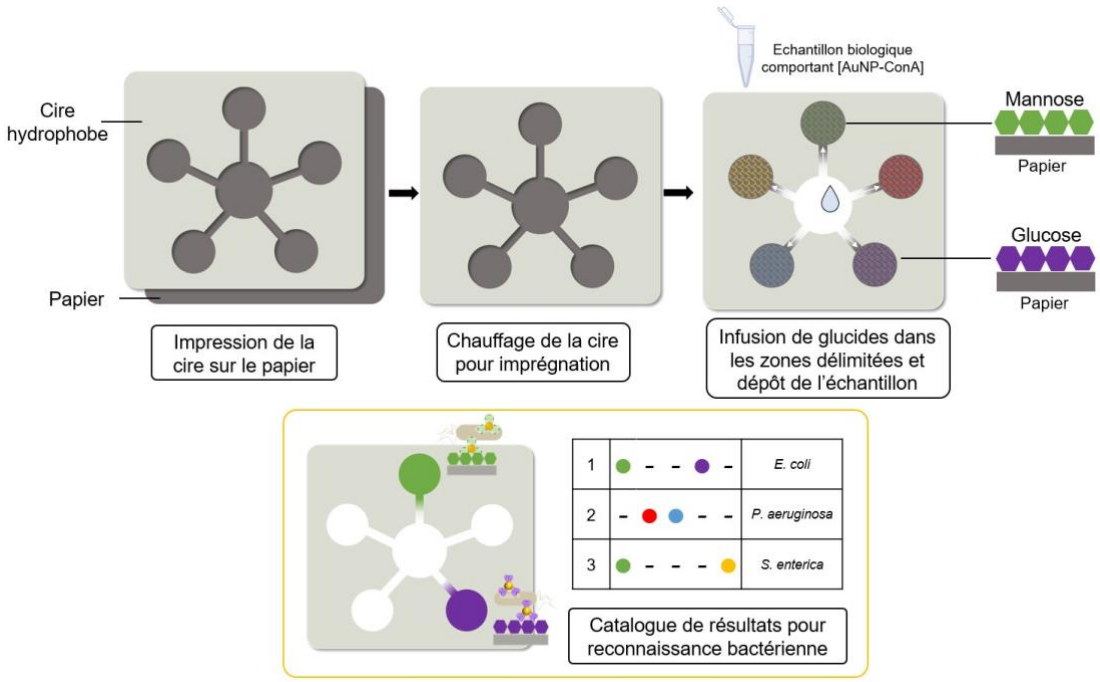
L'**article 2** a permis d'évaluer, grâce à une nouvelle méthode mathématique de traitement de données de TDA, les r_H d'[AuNP-ConA] à différents ratios, permettant de mettre en lien les résultats précédents. De plus, cette méthode a permis d'étudier le comportement de [AuNP-ConA] en présence de différents sucres et LPS afin d'évaluer les variations de tailles engendrées par ces différents composés. Nous avons pu conclure que la ConA possède toujours son activité de reconnaissance envers les sucres après adsorption sur les AuNP mais que la reconnaissance s'effectuait envers les sucres, les résultats obtenus pour les LPS ne permettaient pas de tirer de conclusions sur une interaction spécifique entre la ConA et ceux-ci.

Finalement, nous avons pu mettre [AuNP-ConA] en interaction directe avec des bactéries *P. fluorescens*. Ces bactéries possèdent un LPS contenant du glucose et produisent un EPS riche en glucose également. En utilisant l'épifluorescence et l'AFM, il a été montré que [AuNP-ConA] se fixe aux endroits comportant du glucose, *i.e* sur la bactérie et à son pourtour. Ces expérimentations ont permis de valider l'interaction d'[AuNP-ConA] avec une bactérie comportant des motifs reconnus par la ConA.

Des expérimentations complémentaires restent cependant nécessaires. En effet, de manière à valider les résultats d'interaction d'[AuNP-ConA] avec P. fluorescens, une étude avec une lectine ne devant pas reconnaître les motifs présents doit être menée. C'est pour cela que des expérimentations sont d'ores et déjà prévues afin d'obtenir les résultats associés et d'approfondir nos conclusions. Pour ce faire, la lectine HPA sera utilisée. Cette lectine reconnaît le sucre N-acétylgalactosamine, et ne doit en théorie pas reconnaître *P. fluorescens*. Cependant, avant d'effectuer ces expérimentations avec les bactéries, nous devrons d'abord effectuer une caractérisation physico-chimique de [AuNP-HPA] basé sur le même principe que pour [AuNP-ConA] où il est attendu d'observer une stabilité de LSPR et de D_H pendant 5 jours. Dans le cas où les résultats confirment la non-interaction de HPA avec les bactéries, nous serons alors capables de procéder au développement d'un test bactérien discriminant, basé sur le principe d'un laboratoire-sur-puce pour une utilisation en *point-of-care*.

Cependant, avant de pouvoir développer ce système, plusieurs études seront nécessaires. Premièrement, le support du laboratoire-sur-puce devra être choisi, il est possible de développer celui-ci sur du papier sur le même principe que les tests à flux latéraux. Dans ce cas, le choix du papier sera primordial puisque le papier est composé de cellulose qui est un sucre. Il faudra que le traitement du papier choisi ne soit pas en interaction défavorable avec la lectine ni avec les AuNP. De plus, la porosité du papier sera un point très important à prendre en compte afin de ne pas retenir la lectine ou le complexe AuNP-lectine.

Afin d'effectuer un test discriminant en un seul laboratoire-sur-puce, il faudra concevoir le modèle permettant de tester plusieurs souches. Une ébauche de ce travail peut être représenté ci-dessous.



Représentation schématique d'un laboratoire-sur-puce discriminant différentes espèces bactériennes simultanément

Dans cette ébauche, le modèle du laboratoire-sur-puce est imprimé avec une cire hydrophobe qui est ensuite chauffée pour être imprégnée dans le papier sélectionné. Une première preuve de concept devra immobiliser des sucres différents dans les zones délimitées puis faire migrer l'échantillon contenant [AuNP-ConA] dans ces zones. Par la suite, des LPS et des bactéries pourront y être immobilisées pour valider l'action du complexe. Une méthode de détection colorimétrique pourra ensuite être employée de manière à visualiser l'interaction du complexe avec les sucres cibles.

Une optimisation majeure sera à établir pour cette perspective, il s'agit de la composition du milieu de l'échantillon. En effet, si l'échantillon à évaluer est un fluide biologique comme le sang, l'urine ou la salive par exemple, il faudra prendre en compte tous les composés présents dans ces milieux et leur possible interaction avec le complexe. Une nouvelle problématique se pose alors, comme nous avons développé [AuNP-ConA] grâce à une méthode d'adsorption, il est probable que le complexe se dissocie en présence d'éléments extérieurs tels que les protéines sanguines, des sels etc. Dans ce cas, il sera judicieux d'effectuer une modification chimique par un autre protocole que la modification avec le 2-IT afin d'obtenir une liaison covalente entre AuNP et ConA. De cette manière, l'interaction entre le complexe et les éléments des milieux biologiques sera limitée.

Pour conclure, ce travail de thèse a permis de développer des AuNP modifiées par la ConA et d'en établir leur caractérisation et mode d'interaction. De plus, leur interaction avec des sucres et une bactérie, *P. fluorescens*, a été validée. Des expérimentations finales demeurent en suspens mais les conclusions de ce projet permettent d'ores et déjà d'établir des perspectives quant à une détection rapide de plusieurs bactéries simultanées. Ces perspectives pourront permettre de proposer un outil simple d'utilisation pour l'amélioration de la prise en charge d'infections bactériennes.

Résumé

Français

Un complexe composé de nanoparticules d'or (AuNP) fonctionnalisées par une protéine de la famille des lectines (***Concanavaline A***, ConA, reconnaissant les sucres glucose et mannose) a été développé dans l'objectif de détecter des bactéries de manière rapide, sensible et spécifique, dans le but de développer un laboratoire-sur-puce permettant une utilisation de *point-of-care*. L'objectif du travail de thèse repose sur la modification d'AuNP par la ConA [AuNP-ConA], leur caractérisation physico-chimique et l'étude de leur interaction avec une bactérie, *Pseudomonas fluorescens*.

L'adsorption de la ConA sur les AuNP permet d'obtenir un complexe [AuNP-ConA] de diamètre hydrodynamique et de résonance de plasmon localisée stable sur une période de 5 jours. L'étude de l'interaction d'[AuNP-ConA] a été déterminé via des méthodes expérimentales (quenching de fluorescence et microscopie à force atomique (AFM) en mode force) ainsi qu'en simulations de dynamique moléculaire. Les résultats permettent de conclure que l'adsorption de la ConA sur les AuNP s'effectue *via* des liaisons ioniques de faible énergies, dans un système dynamique et sans déplacement des ions citrate présents autour des AuNP.
L'interaction du complexe [AuNP-ConA] avec des sucres et des lipopolysaccharides (LPS), structures à la paroi de bactéries à Gram négatif, a été étudié par l'analyse de dispersion de Taylor en développant une nouvelle approche mathématique pour le traitement des données. Il a été montré que la ConA reconnaît les sucres pour lesquels elle possède une spécificité même après adsorption sur les AuNP.
L'interaction d'[AuNP-ConA] avec une bactérie à finalement été étudiée. En employant l'AFM et l'épifluorescence, nous avons montré que le complexe se lie aux LPS mais aussi aux saccharides bactériens contenant tous deux du glucose, validant ainsi la possibilité de détection bactérienne grâce à ce complexe.

Cette thèse propose un premier travail de développement d'un complexe [AuNP-ConA] servant à détecter des bactéries, et s'inscrit dans un projet visant à développer un laboratoire-sur-puce pour une utilisation en *point-of-care* de détection bactérienne.

Mots-clés : nanoparticules d'or, lectines, bactéries, complexe dynamique, quenching de fluorescence, dynamique moléculaire, analyse par dispersion de Taylor, microscopie à force atomique, épifluorescence.

English

A complex composed of gold nanoparticles (AuNP) functionalized with a protein from the lectin family (***Concanavalin A***, ConA, which recognizes glucose and mannose) has been developed for rapid, sensitive and specific detection of bacteria, with the aim of developing a lab-on-chip for point-of-care use. The aim of this thesis is based on the modification of AuNP with ConA [AuNP-ConA], their physicochemical characterization and the study of their interaction with the *Pseudomonas fluorescens* bacteria.

The adsorption of ConA onto AuNP produces a complex [AuNP-ConA] with a hydrodynamic diameter and localized surface plasmon resonance stable over 5 days. The study of [AuNP-ConA] interaction was determined *via* experimental methods (fluorescence quenching and atomic force microscopy (AFM) in force mode) as well as molecular dynamics simulations. The results suggest that ConA adsorption onto AuNP takes place *via* low-energy ionic bonds, in a dynamic system, without displacement of the citrate ions present around the AuNP.

The interaction of [AuNP-ConA] complex with sugars and lipopolysaccharides (LPS), which are wall structures of Gram-negative bacteria, was studied by Taylor dispersion analysis, while developing a new mathematical approach to data processing. It was shown that ConA recognizes sugars for which it has specificity even after adsorption onto AuNP.

Finally, the interaction of [AuNP-ConA] with bacteria was studied. Using AFM and epifluorescence, we showed that the complex binds not only to LPS but also to bacterial exopolysaccharides, both containing glucose, thus validating the possibility of bacterial detection using this complex.

This thesis presents the first work to develop [AuNP-ConA] complex for bacterial detection to be used as part of a project to develop a lab-on-chip for use in point-of-care bacterial detection.

Keywords : gold nanoparticles, lectins, bacteria, dynamic complex, fluorescence quenching, molecular dynamics, Taylor dispersion analysis, atomic force microscopy, epifluorescence.