

Université de Montréal

**Design rationnel de nanothermomètres
programmables à base d'ADN**

par

David Gareau

Chimie, Université de Montréal

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en chimie

Septembre 2015

© David Gareau, 2015

Résumé

Développer de nouveaux nanomatériaux, interrupteurs et machines nanométriques sensibles à de petites variations de température spécifiques devrait être de grande utilité pour une multitude de domaines œuvrant dans la nanotechnologie. De plus, l'objectif est de convaincre le lecteur que les nanotechnologies à base d'ADN offrent d'énormes possibilités pour la surveillance de température en temps réel à l'échelle nanométrique. Dans la section Résultats, nous exploitons les propriétés de l'ADN pour créer des thermomètres versatiles, robustes et faciles à employer. En utilisant une série de nouvelles stratégies inspirées par la nature, nous sommes en mesure de créer des nanothermomètres d'ADN capables de mesurer des températures de 25 à 95°C avec une précision de $<0.1^{\circ}\text{C}$. En créant de nouveaux complexes d'ADN multimériques, nous arrivons à développer des thermomètres ultrasensibles pouvant augmenter leur fluorescence 20 fois sur un intervalle de 7°C. En combinant plusieurs brins d'ADN avec des plages dynamiques différentes, nous pouvons former des thermomètres montrant une transition de phase linéaire sur 50°C. Finalement, la vitesse de réponse et la précision des thermomètres développés et leur réversibilité sont illustrées à l'aide d'une expérience de surveillance de température à l'intérieur d'un unique puits d'un appareil de qPCR. En conclusion, les applications potentielles de tels nanothermomètres en biologie synthétique, imagerie thermique cellulaire, nanomachines d'ADN et livraison contrôlée seront considérées.

Mots-clés : Nanothermométrie, ADN, nanotechnologie, matériel thermosensible, senseurs

Abstract

Developing nanomaterials, probes, switches or nanomachines that are able to respond to specific temperature changes should prove of utility for several applications in the fields of *in vivo* imaging, clinical diagnostics, and drug-delivery. Here, we describe various bio-inspired strategies to engineer DNA thermostiches with programmable linear response ranges for precise temperature sensing between 25 to 95°C with thermal precision <0.1°C. Using multimeric switch architectures, we are able to create ultrasensitive thermometers that display large 20-fold, quantitative signal changes within only 7°C. Lastly, by combining thermostiches of different stabilities, or a mix of stabilizers of various strengths, we can create extended thermometers that respond linearly in a 50°C temperature window. Using these programmable DNA thermometers we measured, for the first time, the temperature equilibration time inside PCR wells using a fluorescent readout. Their potential applications in *in vivo* imaging, DNA nanomachines, drug delivery systems and synthetic biology are further discussed.

Keywords: Nanothermometry, DNA, nanotechnology, thermosensitive materials, sensors

Table des matières

Résumé.....	I
Abstract.....	II
Table des matières.....	III
Liste des tableaux.....	V
Liste des figures.....	VI
Liste des abréviations.....	VIII
Remerciements.....	X
1. Introduction.....	1
1.1. La nanotechnologie comme science émergente.....	2
1.1.1. Historique «There’s plenty of room at the bottom».....	3
1.1.2. La nanotechnologie : un domaine multidisciplinaire.....	5
1.1.3. Les défis liés à l’échelle nanométrique.....	7
1.1.4. L’ADN comme senseur nanométrique de température.....	8
1.2. Nanothermométrie.....	9
1.2.1. Applications et techniques conventionnelles de la nanothermométrie.....	10
1.2.2. Différents nanothermomètres pour différentes applications.....	12
1.2.3. Nanothermomètres d’ADN.....	18
1.3. La nanotechnologie d’ADN.....	20
1.3.1. L’ADN : structure chimique et repliement 2D prédictible.....	21
1.3.2. La nanotechnologie d’ADN structural.....	27
1.3.3. Synthèse et fonctionnalisation d’ADN.....	31
1.3.4. L’ADN dynamique comme interrupteur nanométrique.....	35
2. Résultats.....	47
2.1. Abstract:.....	49
2.2. Results.....	53
2.3. Conclusion.....	63

2.4. Supplementary Information and experimental section	71
2.4.1. DNA synthesis	71
2.4.2. DNA sequences.....	71
2.4.3. Extended thermometer mix.....	73
2.4.4. Thermometer characterization	74
2.4.5. PCR experiments	75
3. Conclusion	76
3.1. Avancées rendues possibles par nos travaux	77
3.1.1. Modulation rationnelle de la transition de phase	77
3.1.2. Modulation de la coopérativité et du bruit de fond d'un nanothermomètre d'ADN	78
3.1.3. Conception de nanothermomètres ayant des plages dynamiques étendues	80
3.2. Perspectives.....	81
3.2.1. Améliorations à apporter.....	82
3.2.2. Applications potentielles et projets futurs.....	84
4. Références.....	86

Liste des tableaux

Tableau I : Sommaire d'une variété de méthodes de nanothermométrie.....	13
---	----

Liste des figures

1. Introduction

Figure 1.1: Sommaire de l'historique de la nanotechnologie	5
Figure 1.2 : Différentes propriétés de luminescence de nanothermomètres optiques	15
Figure 1.3: Appariement Watson-Crick de deux brins d'ADN complémentaire	22
Figure 1.4: Différentes conformations structurales de l'ADN	24
Figure 1.5: Replissements d'ADN non conventionnels	26
Figure 1.6 : Formation d'un treillis d'ADN à l'aide de multiples « <i>Holliday Junctions</i> ».....	28
Figure 1.7: Concepts de base de l'origami d'ADN.....	30
Figure 1.8: Cycle de la synthèse automatisée d'ADN sur support solide.	33
Figure 1.9: Ouverture d'un interrupteur moléculaire par l'association avec un brin complémentaire d'ADN.....	37
Figure 1.10: Courbe de liaison à l'équilibre théorique	39
Figure 1.11: Variation du K_d d'une balise moléculaire	41
Figure 1.12: Modulation de l'affinité d'un aptamère de mercure.....	43
Figure 1.13: Un interrupteur électrochimique à base d'ADN pour la détection d'anticorps....	45

2. Résultats

Figure 2.1: Bio-inspired strategies to engineer programmable DNA-based nanothermometers.	52
Figure 2.2: Tuning the dynamic range of DNA nanothermometers	54
Figure 2.3: High gain, ultrasensitive multimeric DNA thermoswitches.	58
Figure 2.4: Extending the dynamic range of DNA nanothermometers	60
Figure 2.5 Real-time temperature monitoring in individual PCR wells using fluorescent DNA nanothermometers.....	62
Figure 2.S1: Tuning the dynamic range of DNA nanothermometers by modifying the stability of the thermoswitches.	65
Figure 2.S2: Folding and unfolding kinetics of DNA nanothermometers.....	66
Figure 2.S3: Melting transitions of DNA duplex, triplex, and G-quadruplex thermoswitches and their dynamic ranges.	67

Figure 2.S4: Comparing the sensitivity of our different DNA thermometers. 68

Figure 2.S5: DNA thermometer mix that responds linearly within the temperature range of typical PCR experiment (45°-95° C) 69

3.Conclusion

Figure 3.1 : Transition de phase extrêmement coopérative d'une agglomération d'ADN et de nanoparticules d'or..... 79

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

PCR : *Polymerase chain reaction*

STM : *Scanning tunnelling microscope*

K_d : Constante de dissociation

K_s : Constante d'association

SELEX : *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment*

CPG: *Controlled porous glass*

QDs : *Quantum dots*

G : Acide nucléique guanine

C : Acide nucléique cytosine

A : Acide nucléique Adénine

T : Acide nucléique Thymine

FRET : *Förster resonance energy transfer*

FAM : *Fluorescein Fluorophore*

BHQ-1 : *Black Hole Quencher 1*

*La beauté d'un être vivant n'est pas dans les atomes qui le constituent,
mais la façon dont ils sont placés ensemble.*

- Traduit de Carl Sagan

Remerciements

Premièrement, j'aimerais remercier Prof. Alexis Vallée-Bélisle pour m'avoir accueilli dans son nouveau groupe : Le laboratoire de biosenseurs et nanomachines. Les deux années passées dans le groupe ont été une expérience incomparable. Il est difficile à croire qu'il y a si peu de temps je faisais le ménage dans les anciens laboratoires du Prof. Keillor qui allait devenir notre salle d'instrumentation. Malgré les nombreuses difficultés de mettre sur pied un nouveau laboratoire, Alexis a su garder sa patience et son sens remarquable de résolution de problèmes durant tout ce stress. J'espère tout le meilleur pour le laboratoire et ses futurs étudiants.

Liliana Pedro, notre incroyable assistante de laboratoire, mérite aussi une mention d'honneur. Elle a su résoudre tous nos petits problèmes dans le laboratoire avec une patience et un professionnalisme incomparable. De plus, Liliana a fait un incroyable travail de corrections et de suggestions constructives dans ce mémoire. J'en suis éternellement reconnaissant.

Je prends aussi le temps de remercier mes collègues suivants ayant participé à monter le laboratoire et à soutenir d'innombrables discussions scientifiques : Carl Prévost Tremblay, Mathieu Arcand de Biopra, Andrea Idilli, Antoine Caron, Minh Nguyen et mes stagiaires Jean-Antoine Gauthier Cyr et Arnaud Desrosiers

Aussi, mes parents, Gilles Gareau et Barbara Finch, m'ont appuyé tout au long de mes études. Je suis certain qu'ils m'auraient soutenu dans n'importe quel projet que je voudrais entreprendre. Ce genre de soutien est le meilleur cadeau que l'on peut faire à son enfant. Je les remercie du fond de mon cœur.

Finalement, je voudrais remercier le lecteur de ce mémoire. Que ce soit par obligation ou désir personnel que vous lisiez ce texte, j'espère d'être en mesure de communiquer l'essentiel de mes deux années de travail en laboratoire. Tout compte fait, ce mémoire a été écrit pour vous, le lecteur, puisque toute science est inutile si elle n'est pas communiquée convenablement.

1. Introduction

La vie est basée sur l'organisation dynamique de macromolécules dans l'espace. La liaison de substrats aux sites actifs de protéines est un exemple classique d'un processus qui est à la fois nécessaire à la vie et qui requiert une organisation moléculaire précise au nanomètre près. Inspirés par la nature, les chercheurs tentent de répliquer ce contrôle nanométrique, cette capacité à disposer des atomes de façon précise, dans le but de créer des outils aussi puissants que ceux ayant été développés par des millions d'années d'évolution. L'idée de la nanotechnologie va au-delà du contrôle de la disposition des atomes dans une molécule; l'ambition de la nanotechnologie est aussi de contrôler la dynamique, la forme et la fonction d'un système nanométrique. Cet objectif ambitieux rassemble une multitude de domaines de chimie comme la biologie synthétique, la chimie des matériaux, des polymères et la chimie organique. Ces domaines, qui étaient précédemment mutuellement exclusifs, sont maintenant en étroite collaboration, du aux applications potentielles du domaine. Ainsi, il semble que le futur de cette discipline réside dans la capacité des chercheurs de différentes spécialités à unir leur expertise pour relever les défis d'une nouvelle génération de science nanométrique.

Un des grands défis de la nanotechnologie est de suivre précisément des propriétés physiques de base à l'échelle nanométrique. En effet, plusieurs caractéristiques physiques comme le pH, la température et l'activité ionique peuvent varier localement dans un système nanométrique, changeant ainsi sa dynamique sans pouvoir être détectées par une lecture macrométrique conventionnelle. Il semble alors essentiel de développer de nouveaux outils permettant de détecter et même suivre en temps réel ces propriétés physiques dans le but de

mieux comprendre leurs effets à des grandeurs nanométriques. Plus précisément, ce mémoire s'attaquera à la mesure de la température à l'échelle du nanomètre : la nanothermométrie. Toutefois, avant de présenter le domaine, il serait important d'expliquer le contexte dans lequel la nanothermométrie sera utilisée.

1.1. La nanotechnologie comme science émergente

Toutes les branches de la nanotechnologie ont un objectif qui les rassemble : contrôler précisément la disposition des atomes et les molécules à un niveau nanométrique. En effet, ceci est un concept qui a longtemps fait rêver les scientifiques de tous les domaines. Les physiciens voudraient fixer les atomes pour mieux les étudier, les biologistes voudraient contrôler les dynamiques de protéines en réarrangeant leurs acides aminés ¹ et les chimistes voudraient disposer des atomes précisément pour créer des nouvelles molécules. ² Bref, étant donné que tout comportement macrométrique découle d'une sommation d'événements nanométriques, il semble inévitable pour la science de se diriger vers la compréhension des phénomènes à l'échelle nano pour ensuite pouvoir les utiliser à des fins pratiques. Bien que ceci semble évident, les recherches en nanotechnologie ont uniquement pris leur envol au cours des 25 dernières années. ^{3,4} Ainsi, ce court chapitre sert à mettre en contexte l'historique de ce nouveau domaine et ces multiples défis qui sont encore importants aujourd'hui.

1.1.1. Historique «There's plenty of room at the bottom»

Le concept de manipuler de la matière à l'échelle nanométrique n'a pas été discuté sérieusement avant 1956.⁵ Dans ces années, l'hypothèse était que la seule possibilité d'accéder à ces dimensions serait d'avoir des outils de la même taille. En utilisant cette logique, la seule possibilité de former ces outils serait de concevoir d'autres outils ayant une taille légèrement plus grande. Idéalement, ce cycle pourrait être répété jusqu'aux plus petites dimensions possibles. L'analogie utilisée pour ceci est souvent celle du pantographe (Figure 1.1a) qui crée d'autres pantographes et ainsi de suite.⁵ Cette idée, aussi farfelue qu'elle semble, était la base de la nanotechnologie moderne. Pourrions-nous contrôler des effets nanométriques avec une série d'actions ayant des répercussions de plus en plus petites? C'est le concept qui était à la base de la célèbre présentation du physicien Richard Feynman intitulée: «*There's plenty of room at the bottom*».⁶ Au début de sa présentation, Feynman pose la question : «Pourquoi sommes-nous incapables d'inscrire l'encyclopédie Britannica sur la tête d'une aiguille? ». Il propose que si l'on était en mesure de réduire la taille de l'écriture 25000 fois, l'*Encyclopædia Britannica* pourrait être inscrite sur la tête d'une aiguille. Faisant référence au titre de sa présentation, cet exemple met en contexte la quantité d'espace inutilisé qui existe à une échelle si petite. L'exemple explique aussi comment une si grande quantité d'information et de complexité peut être comprimée dans un espace quasiment négligeable. De plus, Feynman étoffe le potentiel de la nanotechnologie en proposant qu'il serait possible «d'arranger les atomes de la façon que nous le voulons» à l'aide de machines nanométriques. Dans un élan purement théorique, Feynman imagine des nanorobots pouvant placer des atomes précisément dans le but d'assembler des molécules, des polymères et même des tissus de façon purement physique, en déplaçant de la matière à l'échelle nano.

La conclusion de sa présentation fait allusion au monde biologique comme étant une preuve de ce que la nanotechnologie pourrait devenir. En reconsidérant les exemples précédents, il tire le parallèle entre l'écriture sur une tête d'aiguille et l'ADN dans nos cellules qui est capable de stocker une quantité phénoménale d'information génétique dans un très petit milieu. Quant à la comparaison avec les nanorobots, Feynman fait l'analogie avec les protéines et enzymes qui peuvent lier, transformer et transporter des molécules à l'échelle nanométrique.

Le domaine des « nanotechnologies » tel que nous le concevons aujourd'hui est en grande partie un produit de l'imagination de l'ingénieur Eric Drexler. En 1986, soit 27 ans après la présentation du Professeur Feynman, Drexler publie le livre : *«Engines of creation : the coming era of nanotechnology»*.⁷ Cette œuvre avant-gardiste tente de décrire ce que deviendra la science du futur. Il introduit une panoplie d'idées inspirées par le contrôle nanométrique de la matière. Il suggère l'idée des assembleurs moléculaires plus petits que des cellules. Ces assembleurs pourraient créer des nouveaux matériaux plus légers et robustes. Ils seraient aussi en mesure d'être injectés chez un humain dans le but de réparer et de diagnostiquer des pathologies pour ainsi prolonger la vie d'un individu. Drexler touche à une multitude de sujets et leurs implications telles que la communication par l'hypertexte (le code de base de l'internet), l'intelligence artificielle, le remède possible pour le vieillissement et la possibilité d'éliminer les carburants fossiles à l'aide d'énergie solaire, tous des sujets d'actualité qui semblent impossible en 1986. Bien que seulement quelques-unes de ces idées aient été développées sérieusement, son livre a su néanmoins susciter beaucoup d'intérêt pour ce nouveau domaine scientifique.

1.1.2. La nanotechnologie : un domaine multidisciplinaire

Un mois après la parution de «*Engines of creation*», un article de vulgarisation sur la nanotechnologie est publié dans le magazine OMNI (figure 1.1b).⁸ Citant l'ouvrage de Drexler, l'article introduit les idées de la nanotechnologie à plus d'un million d'Américains.

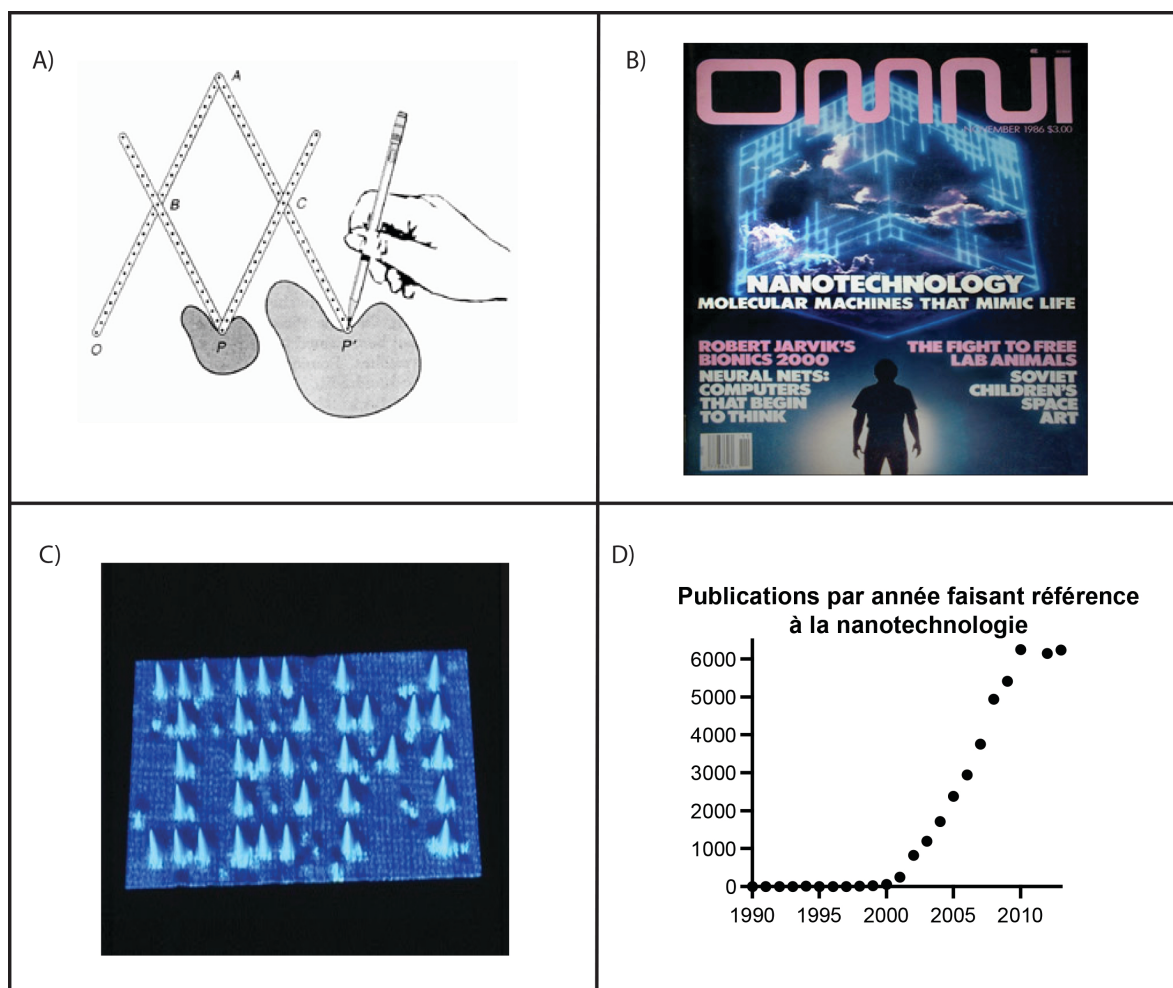


Figure 1.1: Sommaire de l'histoire de la nanotechnologie A) Un pantographe : un dessin est répliqué exactement à une plus petite échelle B) Première page du magazine OMNI novembre 1986. C) Image STM de 35 atomes de xénon arrangés dans la forme du logo IBM D) Montée drastique du nombre de publications utilisant le terme «nanotechnologie» de 1990 à 2014. Données tirées de Pubmed en utilisant la référence⁹.

Historiquement, la croissance de l'intérêt pour le domaine des nanotechnologies coïncide également avec l'invention du microscope à effet tunnel (STM) par Binnig et Rohrer de la compagnie américaine IBM.¹⁰ Ces microscopes étaient les premiers outils permettant de visualiser des surfaces nanométriques en exploitant les effets quantiques de la matière. En 1989, IBM a démontré la puissance d'un tel appareil en arrangeant 35 atomes de xénon en forme du logo de la compagnie; formant ainsi la célèbre expérience «*IBM in atoms*» (Figure 1.1c).

La combinaison de l'attention du public et de nouvelles méthodologies a finalement fait exploser le domaine des nanotechnologies. En 1991, le Fonds national de la recherche des États-Unis (NSF) a établi le premier programme dédié à l'étude de nanoparticules.¹¹ Dans la même année, le nanotube de carbone est découvert et caractérisé par Sumio Iijima.¹² En 1992, le volume scientifique sur la nanotechnologie est publié sous le nom de *Nanosystems* par Eric Drexler.¹³ La décennie suivante a vu le nombre de publications dans les domaines de nanoélectronique, nanomatériaux, nanomanufacture et bionanotechnologie exploser (Figure 1.1d) tout en voyant l'apparition des premiers produits commerciaux de la nanotechnologie. Ces derniers sont en fait des produits existants auxquels des nanostructures ont été ajoutées pour en améliorer les propriétés optiques ou physiques. À titre d'exemple, on peut mentionner des écrans solaires contenant des nanoparticules de titane absorbant les rayons ultraviolets,¹⁴ des vêtements qui résistent aux taches en ayant une fine couche de nanoparticules et même des revêtements super hydrophobes utilisant des nanocomposites pour repousser l'eau.¹⁵ Durant les années 2005 à aujourd'hui, des nanostructures actives ont été développées (mais pas nécessairement commercialisées). Ces nouvelles structures peuvent être dynamiques et peuvent répondre à des stimuli nanométriques. Notons par exemple les

biosenseurs¹⁶, les plateformes de stockage d'énergie, des prothèses et des pansements¹⁷, pour n'en citer que quelques-uns.¹⁸ De plus, le traitement du cancer à l'aide de nanotechnologies représente un énorme domaine de recherche aujourd'hui¹⁹⁻²⁰, tout comme certaines applications en régénération tissulaire²¹ et en régénération axonale de neurones.²²

1.1.3. Les défis liés à l'échelle nanométrique

Il reste à noter que notre compréhension de l'échelle nanométrique est encore relativement limitée. Il va de soi que le comportement de la matière est différent à très petite échelle. La disposition spatiale entre deux molécules ou atomes, par exemple, est un facteur à prendre en considération lorsque l'on discute d'interactions moléculaires prenant place sous l'échelle de 100 nm. Il faut alors développer des méthodes pour fixer les composantes d'un système nano par rapport à un autre pour pouvoir l'étudier convenablement. Les effets quantiques des nuages électroniques doivent également être pris en compte pour pouvoir optimiser des systèmes comme les nanoparticules d'or²³, les points quantiques²⁴ et les nanotubes de carbone.²⁵ Ainsi, ces phénomènes quantiques pourraient être précisément étudiés et exploités à l'aide d'outils permettant de précisément fixer la disposition spatiale de ces structures au niveau moléculaire.

Outre la disposition spatiale, le comportement de la matière est aussi influencé par la température. En effet, la température à l'échelle nanométrique est un facteur essentiel à considérer puisqu'il détermine la thermodynamique de tout système. Par ailleurs, il ne faut pas confondre une température nanométrique avec une température macrométrique. La température au niveau macrométrique donne une indication générale de l'agitation des molécules dans le système et ne reflète pas nécessairement l'agitation thermique locale entre

les composantes nano. En somme, la disposition spatiale et la température restent des paramètres extrêmement difficiles à caractériser de manière expérimentale avec les outils conventionnels. Il apparaît donc essentiel de mettre au point des instruments nanométriques qui permettraient de mesurer, à l'échelle nanométrique, ces différents paramètres et ainsi permettre de mieux comprendre leur importance.

1.1.4. L'ADN comme senseur nanométrique de température

L'outil nanométrique qui sera présenté au sein de ce mémoire permettra d'élucider deux des défis énoncés plus haut soit la disposition spatiale précise et la température. En exploitant ses dimensions nanométriques, sa dynamique de transition de phase et la chimie de fonctionnalisation de l'ADN, nous avons conçu des nanothermomètres d'ADN pouvant être programmés pour répondre à différentes plages de températures. Ce genre de construction est possible puisque la structure secondaire et la stabilité de l'ADN duplex sont très facilement prédictibles et permettent leur modélisation informatique.²⁶ La haute fidélité de cette modélisation est attribuable à la géométrie simple de l'appariement de deux brins d'ADN en forme duplex. En effet, ce repliement hautement prédictible provient d'un alignement parfait des atomes formant des ponts hydrogènes stabilisant l'intérieur de ces brins.²⁷ Alors, en additionnant les différentes stabilisations apportées par les paires de base A-T/G-C (i.e. les interactions hydrophobes, les effets électrostatiques et leur empilement π), il est possible de prédire précisément la structure secondaire majoritaire d'un complexe d'ADN à des conditions physiques précises. Par la suite, les brins d'ADN peuvent être marqués stratégiquement avec une panoplie de groupements fonctionnels comme 1) des fluorophores et des agents extincteurs ou désactivateurs de type "quencher" pour une détection par luminosité, 2) des échangeurs oxydoréductifs pour l'adaptation à un système électrochimique, et 3) des thiols

et/ou des amines pour conjuguer l'ADN à une surface ou à toute autre molécule. Ainsi, l'ADN est en mesure d'être fixé précisément dans un système, avoir une forme prédictible lorsque lié et offrir un signal optique ou électrochimique local. Il est aussi possible de prédire le comportement de transition de phase de l'ADN face à un stimulus. En effet, le changement conformationnel prédictible de l'ADN permet ainsi de créer un interrupteur moléculaire nanométrique. C'est pour ces raisons, parmi d'autres qui seront explorées plus tard, que l'ADN est un matériel de construction nanométrique incomparable et un excellent candidat pour la lecture de température à très petite échelle.

Cependant, avant de discuter davantage de ces nanothermomètres, il est impératif de cibler plus en détail le domaine dans lequel ils seront utilisés : la nanothermométrie. Le prochain chapitre aura donc pour fonction d'expliquer les applications potentielles de la nanothermométrie, les techniques existantes pour la détection de température locale, leurs limitations et le rôle que joue l'ADN dans ce domaine. Par la suite, le domaine de la nanotechnologie d'ADN sera présenté dans le but d'introduire les différentes stratégies qui seront utilisées pour concevoir rationnellement des interrupteurs nanothermométriques uniquement à partir des séquences d'ADN marquées.

1.2. Nanothermométrie

Le développement de nouveaux systèmes nanostructurés a soulevé une foule de questions portant sur les fluctuations des propriétés physiques à l'échelle du nanomètre.²⁸ Une de ces interrogations importantes est sans doute celle de la température locale à l'échelle nanométrique. En effet, la température gouverne la dynamique, l'état et même la phase de tout système. Ainsi, avec l'essor de multiples domaines opérant à l'échelle nanométrique, il

semble primordial de développer des outils permettant d'étudier précisément la température à une résolution spatiale la plus petite possible. De tels outils permettraient de mesurer, en temps réel, la température à l'intérieur de minuscules cavités dans le but d'étudier ou optimiser le système nanométrique. Bien qu'il soit difficile d'énumérer tous les domaines pouvant bénéficier du développement de nanothermomètres efficaces, quatre sphères de recherche semblent particulièrement intéressantes : la nanoélectronique ²⁹, l'imagerie thermique cellulaire, les appareils micro/nanofluidiques et la nanomédecine. ^{30,31}

1.2.1. Applications et techniques conventionnelles de la nanothermométrie

La nanoélectronique œuvre à créer des circuits et des contacts électroniques tellement petits qu'une petite fluctuation de résistance peut conduire à des effets Joule et Peltier importants.³² Ces effets peuvent causer l'apparition de zones chaudes dans le circuit qui sont engendrées par la dissipation de l'énergie des transporteurs de charges en énergie thermique lorsqu'ils rencontrent une résistance. Une zone chaude peut drastiquement réduire la performance d'un circuit nanoélectronique voire même l'endommager de façon irréversible. De plus, ces singularités sont notoirement difficiles à prédire puisqu'elles sont généralement issues d'infimes défauts dans le circuit ou à des interfaces entre différentes parties des circuits. Ainsi, il semble évident que l'étude et la prévention de ces zones chaudes peuvent se faire à l'aide de thermomètres nanométriques. Ce type d'application pourrait être très convenable pour des nanothermomètres d'ADN puisque la même séquence fluorescente pourrait être adaptée en format électrochimique et intégrée dans l'appareil nanoélectronique.

La microfluidique est similaire à la nanoélectronique dans le sens où des effets nanométriques locaux doivent être considérés lors de la conception de l'appareil. Un bon

exemple est le design d'une micropuce pour des réactions de polymérase en chaîne (PCR).³³ Un tel appareil demande des températures précises dans différentes sections de la puce dans le but de simuler les cycles thermiques d'un protocole de PCR. Ainsi, la température ne doit pas se propager entre les différentes sections de la puce puisqu'elle affecterait l'efficacité des cycles de chauffage et refroidissement analogues aux réactions de PCR. Pour effectuer la mesure de température de tels microvolumes, certains senseurs macrométriques peuvent être utilisés mais seulement de façon indirecte i.e. en mesurant la température du canal où circule le liquide de réaction plutôt que celle du liquide. Bref, un nanothermomètre serait nécessaire pour surveiller la température du liquide en temps réel. Un tel outil pourrait ainsi être très utile dans le but d'étudier et optimiser un tel système ou bien tout autre appareil micro/nanofluidique où la variation de température pourrait en affecter la performance.³⁴

Une dernière application intéressante de la nanothermométrie se trouve dans le domaine émergent de la nanomédecine et plus précisément dans le traitement de tumeurs cancéreuses par hyperthermie de nanoparticules magnétiques.³⁵ Ayant injecté ces particules typiquement faites de magnétite (Fe_3O_4) superparamagnétique près d'une tumeur, il est possible d'appliquer un champ magnétique oscillant afin de chauffer la tumeur localement pour la traiter. Bien qu'il existe plusieurs autres sources de chaleur pour les traitements d'hyperthermie outre les nanoparticules magnétiques³⁶ le principe de base reste le même : chauffer la tumeur jusqu'à 40-45°C de façon contrôlée pour l'éradiquer et minimiser le dommage induit aux cellules avoisinantes. L'utilisation de nanothermomètres pourraient ainsi permettre la détection de températures locales, précises et en temps réel afin de s'assurer d'un traitement optimal. À ce sujet, le prochain chapitre traitera des paramètres à considérer lors de la conception d'un nanothermomètre selon l'application projetée.

1.2.2. Différents nanothermomètres pour différentes applications

Il est important de noter qu'il n'existe pas encore de nanothermomètres universels et que chaque nanothermomètre doit être conçu selon l'application envisagée. Par exemple, un thermomètre qui serait utilisé dans un contexte biologique devrait être soluble dans l'eau, non-toxique et être sensible à des températures avoisinant les 37°C. De plus, ce nanothermomètre doit être en mesure de distinguer de très petites fluctuations de température de l'ordre d'une fraction de degré. Ainsi, il existe un grand nombre de méthodes, opérant sur différentes propriétés thermosensibles de la matière, qui ont des résolutions thermiques ($\pm^{\circ}\text{C}$), spatiales ($\pm\text{nm}$) et des temps de réponse différents (secondes) (Tableau I).

Tableau I : Sommaire d'une variété de méthodes de nanothermométrie. Tiré de la référence ³⁷.

Méthode	Principe	Résolution			Classification	Avantages	Désavantages
		Spatiale ($\pm\mu\text{m}$)	Thermique ($\pm\text{K}$)	Temporelle ($\pm\mu\text{s}$)			
Thermographie infrarouge	Émission de corps noir	10	1	10	•Optique •3D	•Technique commerciale bien implémentée	•Saturation du détecteur à haute températures •Précision variable selon l'émissivité de la surface
Thermoréflectance	Réflectance dépendante de la température	0.1	0.01	0.1	•Optique •Surface	•Bonne résolution thermique et temporelle •Mesure quantitative	•Calibration de l'indice de réfraction nécessaire •Coefficient de thermoréflectance du matériel est nécessaire (pas répertorié pour tout matériel)
Raman	Diffusion inélastique de lumière monochromatique	1	0.1	1000000	•Optique •Surface	•Fonctionne en phase solide et liquide •Pas de préparation d'échantillons	•Temps d'analyse long •Interférences avec molécules fluorescentes
Micro Thermocouple	Effet Seeback	100	0.1	10	•Électrique •Surface	•Calibration précise •Excellente résolution spatiale en 1D	•Fabrication difficile (fragile) •Thermomètre séparé de la zone d'analyse
Thermographie de fluorescence	Multiples (Voir figure 7)	1	0.01	10	•Optique •3D	•Haute sensibilité •Multiples techniques disponibles •Faciles d'utilisation	•Photoblanchiment •Effets de concentration locale
Microscopie de balayage à champs proche	Utilisation du champs proche pour meilleur résolution	0.01	0.1	10	•Optique •Surface	•Résolution spatiale <100nm	•Vide et température cryogénique nécessaires •Dépend des caractéristiques de la surface
Thermographie par cristaux liquides	Transition de phase du cristal (couleur)	10	0.1	100	•Optique •Surface	•Beaucoup de matériaux disponibles pour différentes températures	•Une couche de cristaux doit être appliquée à la surface •Semi-quantitatif si non callibré
Microscopie thermique à balayage	AFM avec thermocouple	0.1	0.1	100	•Mécanique •Surface	•Donne une image thermique et topographique de la surface	•Acquisition lente •Solides seulement •Transfert de température entre la pointe et la surface
Microscopie électronique en transmission	Expansion thermique (gallium liquide)	0.01	0.1	10	•Mécanique •Surface	•Excellente résolution spatiale	•Vide nécessaire •Difficile à fixer/manipuler
Interferométrie optique	Expansion thermique ou variation de l'indice de réfraction	1	0.00001	0.001	•Optique •Surface	•Compatible avec tous nanotubes de carbone •Signal complètement optique	•Détermination de température par analyse d'image •Affecté par autres stimulus locaux

Tous ces thermomètres possèdent des propriétés thermosensibles différentes, mais peuvent être généralement classés en 3 catégories : électrique, mécanique ou optique. Les thermomètres électriques comme les micro-thermocouples de Pt-Cr peuvent déduire la température à partir d'une variation de résistance, voltage ou conductance. ³⁸ Cette technique peut alors analyser des surfaces de quelques mm^2 avec une résolution de 100 nm. La nanothermométrie mécanique est une autre technique de surface qui remplace le thermocouple par un cantilevier et un microscope à force atomique (AFM).³⁹ Ces pointes en silicone dopée peuvent détecter de petits changements de température sur une surface par changement de leur motif de réflexion de lumière incidente. Ces deux techniques peuvent accéder à des résolutions

thermiques et spatiales impressionnantes. Cependant, il ne faut pas oublier qu'elles demeurent des techniques de surface et donc requièrent un contact continu avec la surface à analyser. De plus, ce contact peut potentiellement induire des gradients de température artificiels dans un échantillon hétérogène. Les derniers nanothermomètres de type mécanique sont les nanotubes remplis de gallium liquide. Tout comme le mercure dans les thermomètres macrométriques, le gallium dans un nanotube de carbone⁴⁰ ou de silice⁴¹ peut se dilater et occuper un plus grand volume dépendamment de la température. Le niveau du gallium dans un nanotube de silice varie de 1.15 nm par °C permettant la lecture de la température locale avec un microscope électronique et une plaque à température contrôlée pour la calibration. Cependant, ces nanothermomètres utilisent encore une méthodologie de contact avec un rapporteur indirect qui est difficile à remplir, fixer et lire. De plus, ils requièrent, tout comme le micro-thermocouple, des composantes micro/nanofabriquées qui peuvent être dispendieuses et difficiles à obtenir. La combinaison de ces aspects exclut par le fait même les techniques mécaniques et électriques de beaucoup d'applications biologiques ou d'imagerie tridimensionnelle.

C'est pour ces raisons que la catégorie la plus populaire de nanothermomètres reste celle opérant à travers des signaux optiques. Comme leur nom l'implique, les nanothermomètres optiques donnent une mesure de la température via leurs propriétés lumineuses qui varient proportionnellement avec la température. Jusqu'à présent, six types de variations optiques thermodépendantes ont été exploitées en nanothermométrie: la position de la bande d'excitation / émission, la forme de la bande d'excitation / émission, la largeur de bande, l'intensité lumineuse, la polarisation et le temps de vie de fluorescence (Figure 1.2).^{30,37} De ces six modes de détection, l'intensité lumineuse et le temps de vie de fluorescence

semblent être les plus prometteurs étant donné leur facilité d'utilisation et leur grande variation de signal pour de petits intervalles de température (sensibilité).

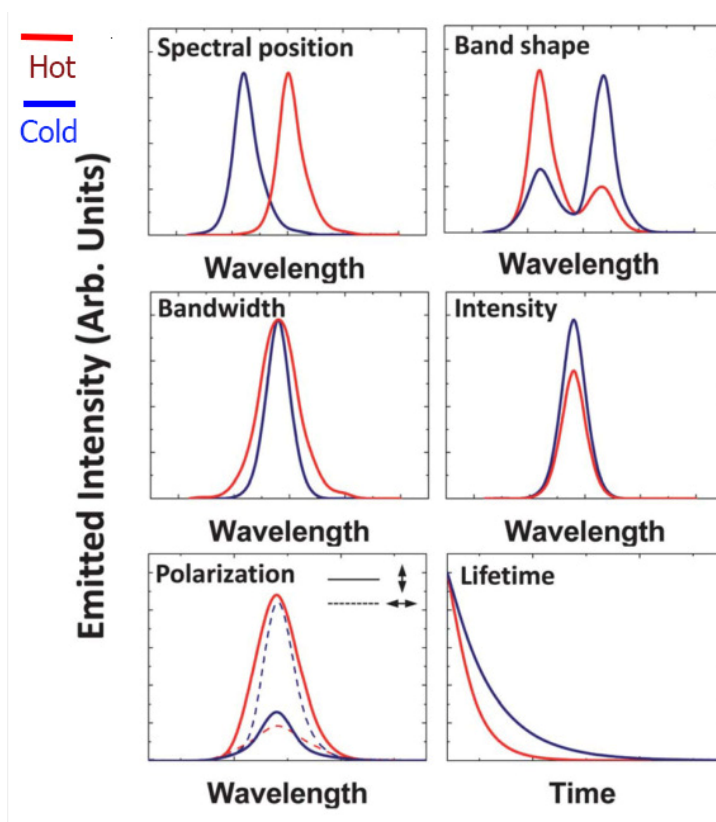


Figure 1.2 : Différentes propriétés de luminescence de nanothermomètres optiques qui dépendent de la température et qui peuvent être exploitées pour mesurer la température à l'échelle nanoscopique.³⁰

Le meilleur exemple de nanothermométrie par temps de vie de fluorescence est celui des polymères fluorescents thermosensibles développés par le groupe Uchiyama.^{42,43} Ces copolymères possèdent une coquille extérieure thermosensible composée de poly N-isopropylacrylamide (poly NIPAM) et un cœur en (N-2-[(7-N,Ndimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl](methyl)aminoethyl-N-methylacrylamide (poly-DBD-AA) pouvant fluorescer lorsque exposé à l'eau. Ces thermomètres peuvent donc fluctuer entre une forme

fluorescente (à chaud) où le polymère interne est exposé au milieu aqueux et une forme fermée (à froid) où le polymère hydrophobe thermosensible se replie sur le cœur fluorescent et exclut l'eau, éteignant la fluorescence. En utilisant un laser pulsé et en observant le profil de la diminution de l'intensité lumineuse, ce groupe a démontré que le temps de vie de fluorescence de ces polymères fluctue de manière linéaire en fonction de la température. Ces polymères sont aussi insensibles aux conditions cellulaires et peuvent être injectés *in vivo* pour détecter des variations de température à l'intérieur de la cellule. Ces polymères (ainsi que la méthode de détection par temps de vie de fluorescence) sont remarquables dans des applications d'imagerie puisqu'ils remplacent la lecture de l'intensité lumineuse par une mesure indépendante de la concentration locale de nanothermomètre fluorescent, soit le temps de vie de fluorescence. En effet, un problème majeur des techniques d'imagerie par fluorescence traditionnelle est que l'accumulation de fluorophore fait augmenter l'intensité lumineuse. Ceci rend les lectures quantitatives difficiles à interpréter puisque la fluorescence due à l'accumulation de fluorophore est indistinguable de celle engendrée par un changement de température.

Un autre exemple remarquable de nanothermomètre optique pouvant être utilisé en milieu biologique sont les nanodiamants du groupe de Lukin.⁴⁴ En interrogeant le spin quantique d'un poste vacant d'azote dans le nanodiamant avec des pulsations micro-ondes, il est possible de corrélérer l'écho de fluorescence à la température à travers une équation polynomiale de 6^e degré. Évidemment, les propriétés quantiques de ces sites vacants d'azote ne sont pas affectées par les conditions ioniques ou stériques à l'intérieur des cellules et sont donc d'excellents thermomètres *in vivo*. Cependant, ces deux derniers exemples de nanothermomètres optiques souffrent des mêmes problèmes que les nanothermomètres

mécaniques et électriques : les composantes nécessaires pour l'utilisation sont exotiques, difficiles d'utilisation et la traduction du signal est très complexe à interpréter.

À l'opposé, les nanothermomètres optiques fonctionnant par intensité lumineuse relative représentent une classe de thermomètres relativement facile à utiliser. Ces thermomètres ont tous en commun la propriété d'augmenter l'intensité de leur luminescence proportionnellement à la température de façon linéaire sur une certaine plage de température. Ainsi, une simple calibration ratiométrique est nécessaire pour déterminer cette corrélation entre l'intensité lumineuse et la température. Par exemple, les nanocristaux de points quantiques semiconducteurs, communément appelés «*quantum dots*» (QDs), sont très populaires puisque l'intensité de fluorescence de plusieurs types de QDs est linéairement dépendante de la température locale.⁴⁵ De plus, leurs bandes d'excitation/émission sont très fines permettant une analyse multiplexe. Parmi les nombreux types de QDs disponibles, les alliages de CdSe sont généralement les plus utilisés en contexte *in vivo* dû à leur thermosensibilité avoisinant les températures biologiques communes (30-50°C).⁴⁶ Certaines nanoparticules dopées aux ions de terres rares comme l'Er³⁺ peuvent aussi être utilisées comme nanothermomètres puisque certaines transitions optiques de leurs sphères électroniques 4f sont extrêmement dépendantes de la température.⁴⁷ En parallèle, un grand nombre de systèmes thermosensibles à base de nanoparticules d'ions lanthanides ont été développés avec des excitations infrarouges et des émissions dans le spectre visible.⁴⁸ Ces particules de lanthanides offrent de très bons rendements quantiques et une longueur d'onde d'excitation dans l'infrarouge, deux propriétés importantes pour la thermométrie *in vivo*. Cependant, leur biocompatibilité, ainsi que leur dépendance à l'environnement local, restent encore à être étudiées.⁴³ De plus, la chimie de fonctionnalisation de ces particules et polymères

thermosensibles est mal caractérisée pour l'instant. Il est alors difficile de précisément fixer ces nanothermomètres à l'échelle nanométrique. Ces deux dernières limitations restreignent l'utilisation de ces nanothermomètres optiques dans des applications biomédicales et dans des appareils micro/nanofluidiques où le senseur doit être fixé pour offrir un signal local et ne pas être emporté par le fluide qui circule dans le système.

1.2.3. Nanothermomètres d'ADN

Malgré leurs propriétés intéressantes, tous les nanothermomètres présentés dans la section précédente ont certaines faiblesses communes. Premièrement, leurs plages dynamiques dans lesquelles l'intensité lumineuse est corrélée linéairement à la température sont fixes et limitées à quelques dizaines de degrés.⁴⁹ Ceci fait en sorte que ces thermomètres peuvent seulement être utilisés dans un nombre limité d'applications. Deuxièmement, la majorité des nanothermomètres optiques par intensité lumineuse décrits dans la littérature ont un bruit de fond considérable. Le bruit de fond est un paramètre qui doit à tout prix être minimisé dans le but d'obtenir un système ayant un gain de signal élevé (*i.e.* sensibilité) et une bonne précision. Nous croyons que ces deux aspects peuvent être grandement améliorés en utilisant une approche de design rationnel qui tiendrait compte de la structure secondaire de l'ADN.

L'ADN semble être un matériel de choix pour la nanothermométrie. Étant un biopolymère chargé négativement, l'ADN est très soluble dans l'eau et suffisamment petit pour être incorporé à même un système nanométrique. La diversité des groupements fonctionnels pouvant être ajoutés à un brin d'ADN implique que ce dernier pourrait être attaché à des surfaces, des nanoparticules, des protéines et même des membranes cellulaires. L'ADN est aussi remarquablement stable et résiste à des conditions arides telles que la

température et le pH élevé.⁵⁰ La vitesse de changement conformationnel de l'ADN est aussi très rapide et offre des temps de réponse de l'ordre de la milliseconde⁵¹ pour des petits brins d'ADN permettant l'étude de la température en temps réel.

Le concept derrière l'idée de l'ADN comme nanothermomètre est relativement simple : utiliser la transition de phase de l'ADN entre deux états conformationnels pour détecter un changement de température. En fonctionnalisant des brins d'ADN avec un couple fluorophore/extincteur à des positions stratégiques, il est possible de voir une augmentation de fluorescence linéaire en fonction d'une plage de températures, l'étendue de cette plage étant dépendante de la stabilité du système (i.e. de la composition des brins d'ADN). De tels systèmes ont préalablement été développés par les groupes d'Andersen⁵² et Yang.⁵³ Ces deux groupes ont utilisé une architecture tige-boucle classique qui a été popularisée en 1996 par la mise au point de balises moléculaires par Kramer et Tyagi,⁵⁴ communément appelées «*molecular beacons*». Andersen et ses collègues ont exploré la dépendance au sel et à la nature des paires de bases (A-T *versus* G-C) des transitions de phase d'une balise moléculaire marquée, alors que Yang et ses collègues ont utilisé la même architecture tige-boucle d'ADN, mais avec une séquence de ADN-L, pour protéger la construction de la nucléase cellulaire. Pour démontrer l'application de leur nanothermomètre, ces derniers ont transfecté cette séquence marquée dans des cellules *HeLa* auxquelles des nanofeuilles de palladium ont préalablement été ajoutées. En chauffant les nanofeuilles de palladium à l'aide d'un laser pendant 10 minutes, les auteurs ont pu détecter des changements de température de l'ordre de 12°C. Il est à noter que la faible sensibilité de ce thermomètre et son haut bruit de fond limitent grandement la précision de cet outil.

En révisant la littérature, il semble évident que le potentiel des nanothermomètres d'ADN n'est pas encore pleinement exploité. En effet, aucune nouvelle architecture d'ADN, dite thermosensible, n'a été explorée malgré la grande variété de structures possibles. De plus, la modulation de la plage dynamique des nanothermomètres d'ADN a seulement été explorée en changeant les conditions ioniques pour stabiliser le brin. Par conséquent, l'étude des réponses thermiques de nouvelles structures d'ADN reste entière, d'autant plus qu'il est possible de combiner ces nouvelles structures à des stratégies de conception d'interrupteurs moléculaires existantes dans le but de créer des nanothermomètres d'ADN rationnellement programmables.

1.3. La nanotechnologie d'ADN

L'essence même de toutes les protéines de notre corps, leur séquence en acides aminés, découle d'un décodage simple de trois monomères d'ADN par acide aminé. Afin de conserver l'énorme complexité fonctionnelle de la vie, l'association de deux brins d'ADN doit être excessivement efficace, voire même parfaite. Pour y parvenir, l'ADN a évolué de manière à être réversiblement complémentaire à lui-même i.e. qu'un brin d'ADN s'associe, de manière réversible et dans une orientation antiparallèle, à un autre brin d'ADN dont la séquence est complémentaire pour former une structure hélicoïdale très stable (ADN duplex). Cette propriété permet à l'ADN d'être inactif (i.e. non transcrit) en forme complexée avec lui-même et actif (i.e. transcrit) en présence d'une protéine reconnaissant une séquence spécifique de nucléotides sur le brin. Après la transcription de l'ADN à l'ARN, les brins d'ADN se réassocient en forme duplex. C'est en grande partie grâce à cette fonction d'association/dissociation réversible que l'ADN est un outil nanométrique hors pair.

Cependant, la caractéristique qui distingue l'ADN de tout autre matériel nanotechnologique est la possibilité de moduler et prédire la stabilité de différentes structures secondaires de façon rationnelle. Ainsi, des séquences d'ADN peuvent être adaptées en différents interrupteurs ou machines moléculaires pour accomplir une tâche précise à l'échelle nanométrique. Pour ce faire, les chercheurs utilisent non seulement une grande variété de formes d'ADN, mais aussi différents repliements où plus de deux brins d'ADN s'associent ensemble. De plus, les propriétés prédictibles de l'association de l'ADN permettent de créer des nanostructures incroyablement bien définies en utilisant des simulations informatiques. En somme, la nanotechnologie d'ADN néglige les propriétés de codage génétique de l'ADN pour se concentrer sur la thermodynamique de ses transitions structurelles et utiliser ces dernières à des fins pratiques.

1.3.1. L'ADN : structure chimique et repliement 2D prédictible

La première caractérisation de l'ADN a été faite en 1863 lorsque le physicien Suisse Johannes Friedrich Miescher a isolé une substance avec un très haut taux de phosphate du noyau d'un globule blanc.⁵⁵ C'était la preuve d'une nouvelle classe de biomolécules qui n'étaient pas constituées d'acides aminés. Il a nommé cette substance *nucléine*, qui deviendra connu sous le nom d'acide nucléique. D'un point de vue chimique, l'acide désoxyribonucléique est un copolymère alterné de phosphate et de désoxyribose qui est ramifié en position C1 avec une base purique (Adénine ou Guanine) ou une base pyrimidique (Cytosine ou Thymine) (Figure 1.3). Cette unité de l'ADN se nomme un nucléotide et elle contient le sucre désoxyribose, une nucléobase et un groupe phosphate lié à l'hydroxyle en position 5' du sucre. Ce même phosphate est lié à un autre nucléotide en position 3' du désoxyribose. Ainsi, l'ADN possède une directionnalité de chaîne dans sa séquence. Par

convention, les séquences d'ADN sont présentées en ordre du nucléotide ayant un phosphate non ramifié sur le carbone 5' du sucre à celui avec un phosphate terminal en position 3' (Figure 1.3)

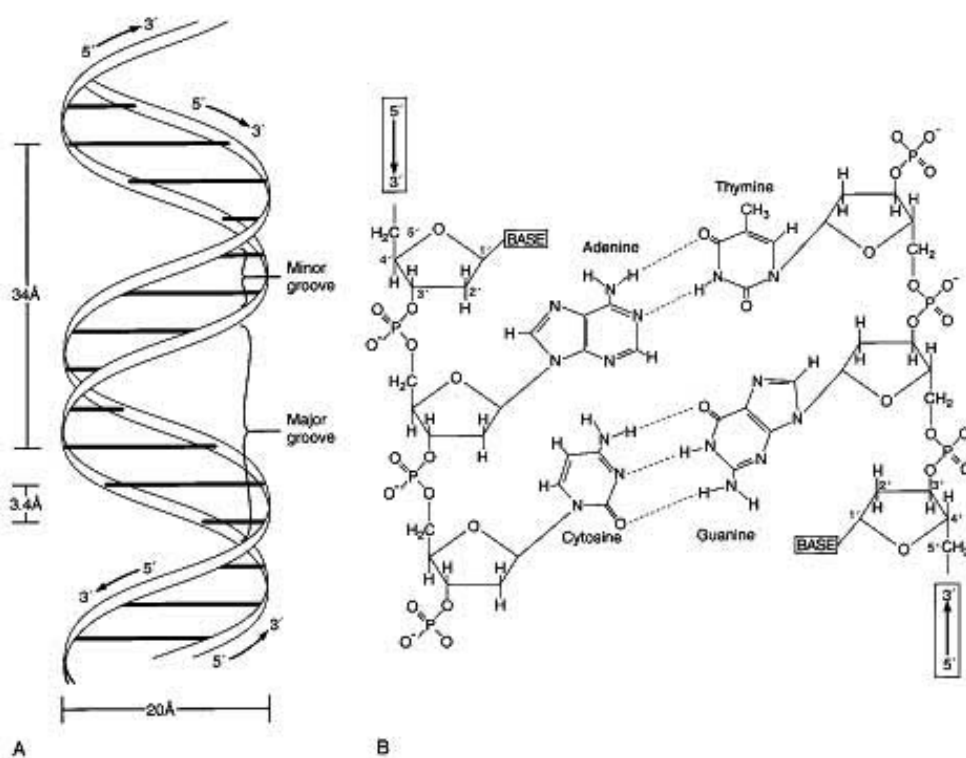


Figure 1.3: Appariement Watson-Crick de deux brins d'ADN complémentaires, leur directionnalité et les dimensions résultantes.⁵⁶

L'association sélective de brins de nucléotides confère à l'ADN des propriétés de reconnaissance remarquables et une géométrie prédictible. Cet appariement résulte en un duplex d'ADN-B traditionnel (figure 1.3) ayant un diamètre d'environ 2.0 nm et un pas d'hélice de 0.34 nm par paire de base formée. La structure hélicoïdale provient d'une rotation de 34.3° par paire de base; l'hélice d'ADN-B fait donc un tour complet à chaque 10.5 nucléotides dans le sens horaire. Cette géométrie prédictible permet à l'ADN d'être facile à

modéliser en deux dimensions. Ainsi, il est possible d'effectuer des modifications dans la séquence d'ADN tout en sachant quelles seront leurs positions et leurs orientations relatives dans l'espace.

L'ADN existe aussi sous plusieurs autres conformations tridimensionnelles dans lesquelles deux brins peuvent s'associer dépendamment ou non de leur séquence. Par exemple, l'hélice de type A, qui a été observée pour la première fois par Franklin et Gosling,⁵⁷ est une forme d'ADN beaucoup plus compacte qui est généralement observée dans des échantillons cristallographiques déshydratés. C'est une hélice de type droite où les bases ne sont pas perpendiculaires à l'axe principal de l'hélice. Ceci agrandit le sillon majeur du duplex aux dépens du sillon mineur. (Figure 1.4) Une autre structure d'ADN, la forme Z, peut se former à de très hautes concentrations de cations. En fait, cette forme est seulement possible lorsque l'une des deux liaisons glycolytiques entre le sucre et la base est en conformation *syn* au lieu d'*anti* (Figure 1.4).⁵⁸ Ceci donne au repliement une forme de zigzag qui peut être favorisée à l'aide de séquence d'ADN alternant des unités de purine-pyrimidine (*i.e.* poly-(GC)₂). Cette forme possède un diamètre de 1.8 nm, une rotation de 30° par paire de base et montre un pas d'hélice de 0.38 nm. Notablement, cette hélice est sous forme de pas gauche, contrairement à l'ADN-B classique.

L'ADN peut également adopter plusieurs autres conformations 3D. Il existe une multitude d'autres repliements symbolisés par des lettres (ADN-E⁵⁹, ADN-C⁶⁰, ADN-L⁶¹, etc.). Cependant, ces formes ne sont stables que dans des conditions particulières en laboratoire. La conformation de l'ADN la plus utilisée en nanotechnologie est de loin l'hélice ADN-B classique puisqu'elle est la forme la plus stable pour un duplex dans un milieu aqueux avec une concentration de cations modérée. Cependant, la forme ADN-L, est aussi utilisée *in*

vivo puisque son hélicité inverse (comparée à l'ADN-B) protège le brin contre la dégradation par les nucléases.

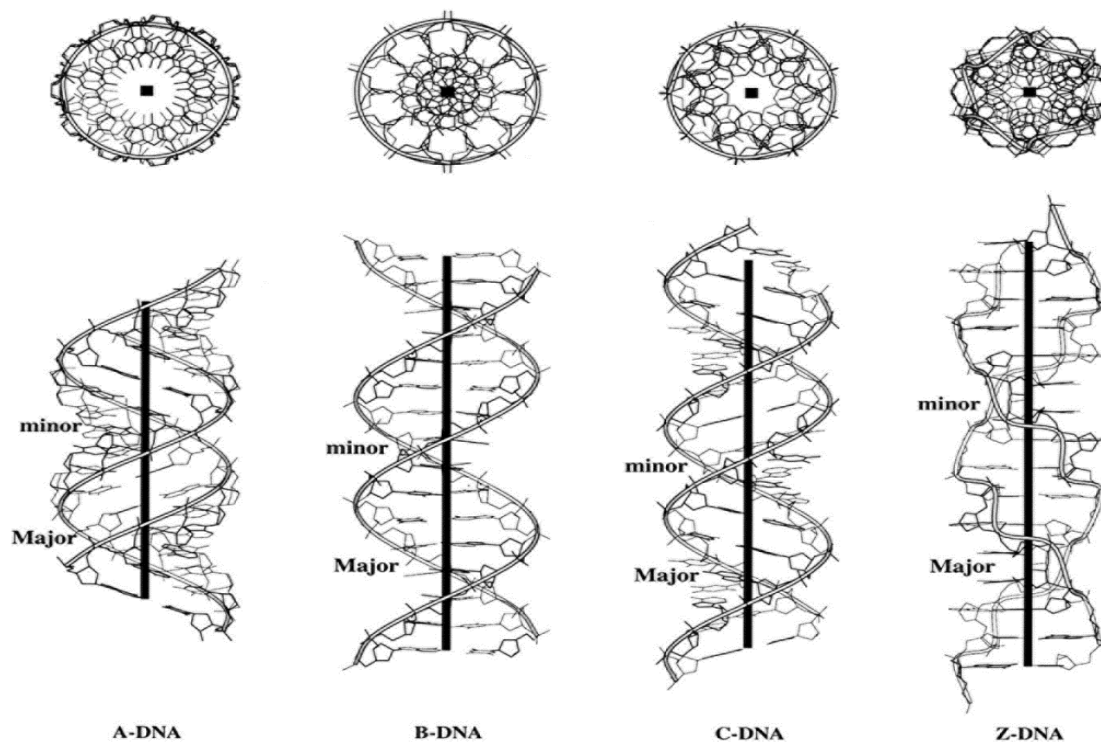


Figure 1.4: Différentes conformations structurales de l'ADN modélisées par le logiciel 3DNA.⁶²

De façon intéressante, il existe d'autres géométries de ponts hydrogènes possibles entre les acides nucléiques naturelles. Récemment, un motif de ponts hydrogènes qui ne se classe pas à l'intérieur d'appariement Watson-Crick a été découvert. En effet, l'interaction Høøgsteen permet de former des hybridations d'ADN avec trois ou quatre brins au lieu de deux. (Figure 1.5a).⁶³ La possibilité de lier trois brins d'ADN ensemble provient d'un site de liaison dans le sillon majeur de l'hélice d'ADN-B où un simple brin d'ADN peut s'y insérer. En effet, si la séquence est favorable à la liaison, un troisième brin d'ADN peut s'intercaler dans le sillon

majeur (indiqué comme «*Major*» dans la figure 1.4) d'un duplex pour former de l'ADN triplex. Un lien Høogsteen entre trois brins se dénotent comme T•TA (dépendamment des bases impliquées).⁶³ Cette interaction est très intéressante d'un point de vue de design rationnel de nanotechnologie d'ADN puisqu'elle est légèrement moins stable que l'interaction Watson-Crick traditionnelle. Ainsi, l'interaction Høogsteen permet d'affiner la stabilité d'un complexe d'ADN de façon très précise. De plus, la faible stabilité des liens Høogsteen comparativement à celle dans l'ADN duplex permet d'observer des transitions de phases d'ADN à des températures plus basses. Ainsi, l'interaction Høogsteen est un outil indispensable dans la conception de plusieurs interrupteurs moléculaires à base d'ADN. Cependant, la diversité des séquences pouvant être adaptées en ADN triplex est limitée. En effet, l'interaction Høogsteen peut seulement se faire à l'aide de deux brins composés uniquement de bases pyrimidines (**C** et **T**) et un brin ayant uniquement des bases purines (**A** et **G**). L'interaction Høogsteen inverse est aussi possible, rassemblant deux brins homopurines avec un brin homopyrimidine. Ainsi, cette limitation diminue de moitié la diversité de séquences possibles pouvant former des liens triplex. C'est donc un facteur important à considérer lors de la conception de système de nanotechnologie d'ADN.

Ce type d'interaction non covalente est aussi responsable d'autres structures secondaires d'ADN comme la formation des structures tétramériques G-quadruplex et i-motif retrouvé dans certains génomes^{64,65}. Le G-quadruplex, initialement observé dans l'ADN télomérique, a pour objectif de protéger les séquences codantes des chromosomes.⁶⁶ Ce genre de repliement tétramérique dans une séquence est en mesure d'inhiber l'activité de l'enzyme télomérase en gênant son site de liaison par un repliement tétramérique. La structure G-quadruplex est constituée de plusieurs étages d'unités G-tétrades. Ces G-tétrades sont un

rassemblement de quatre guanines autour d'un cation comme le potassium. Ce complexe peut alors être formé à l'aide d'une seule séquence répétitive d'unités guanine se repliant sur elle-même ou bien jusqu'à 4 brins qui s'associent ensemble en une géométrie similaire (Figure 1.5b).

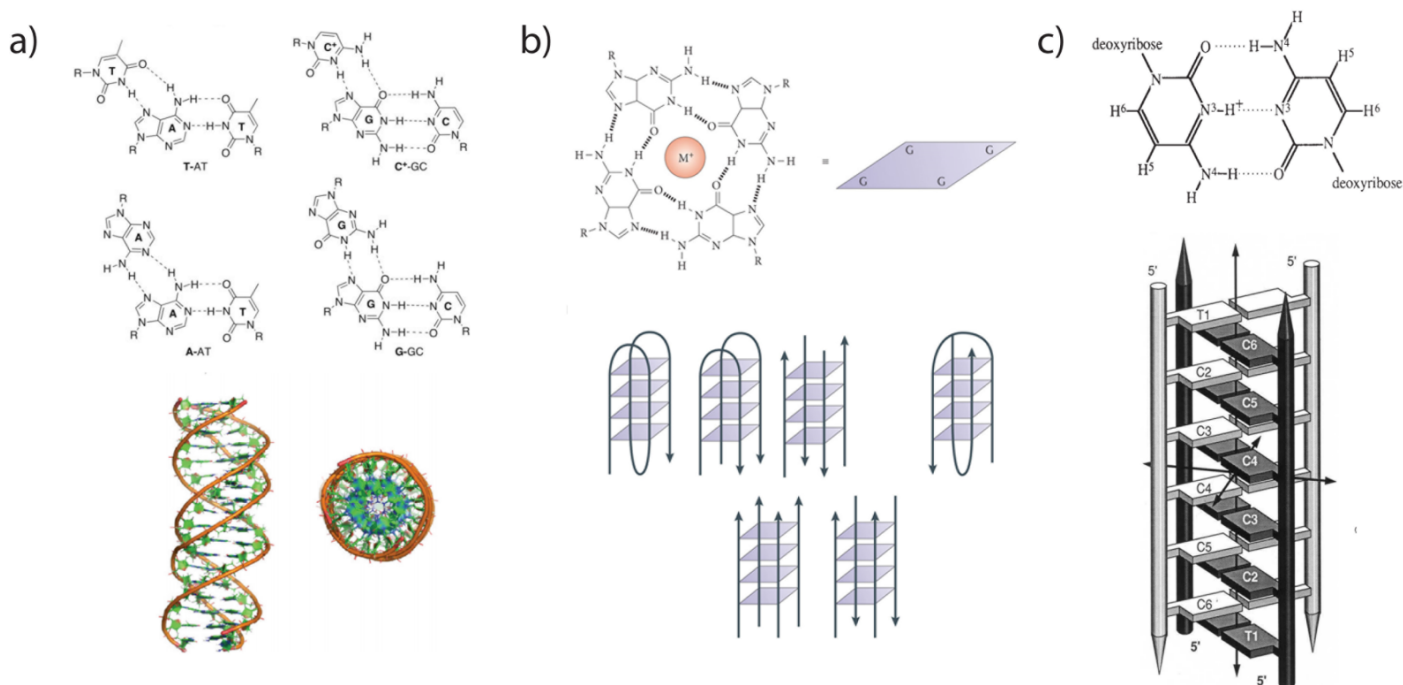


Figure 1.5: Repliements d'ADN non conventionnels : A) Appariement triplex Høogstein.⁶³ B) Repliement tétramérique G-Quadruplexe.⁶⁶ C) Repliement tétramérique I-motif.⁶⁷

Ce style de repliement à étages de plusieurs brins de même séquence est aussi retrouvé chez la structure appelée i-motif (Figure 1.5c). Cependant, les bases azotées impliquées sont plutôt des cytosines et la structure à étages est remplacée par des liens intercalés.⁶⁷ Lorsqu'il se replie, le i-motif se forme en deux temps : deux paires de cytosines forment un duplex parallèle lorsque protonées. Ensuite, deux autres paires de cytosines s'intercalent à l'intérieur et au-dessus des deux paires originales. Le G-quadruplex et le i-motif possèdent deux

caractéristiques importantes pour la nanotechnologie d'ADN. Tout d'abord, ces repliements sont sensibles aux ions et au pH leur permettant ainsi d'être utilisés comme senseur d'ions ou bien comme porte logique dans des systèmes nanométriques. Ensuite, ces repliements rassemblent quatre éléments distincts de façon précise et réversible. En effet, quatre différents brins d'ADN pourraient être fonctionnalisés avec quatre molécules différentes dans le but de les disposer l'une par rapport à l'autre de façon précise. Par la suite, cet assemblage pourrait être activé ou désactivé à l'aide d'un stimulus comme le pH, la température ou même un autre brin d'ADN complémentaire qui lie un brin de la construction avec plus d'affinité que le tétramère. De par leurs caractéristiques, le G-quadruplex et le i-motif sont souvent utilisés dans de nouveaux systèmes nanotechnologiques à base d'ADN, par exemple en tant que moteur réversible⁶⁸, canal ionique⁶⁹, senseur d'ions⁷⁰, interrupteurs moléculaires⁷¹ et même comme agent thérapeutique pouvant réguler l'expression de gènes⁷². Ces applications prennent non seulement avantage du repliement prédictible de l'ADN, mais aussi de la facilité de synthèse de l'ADN et sa capacité de fonctionnalisation.

1.3.2. La nanotechnologie d'ADN structural

Bien que les repliements Høogsteen et G-quadruplex aient des propriétés d'assemblage intéressantes, la versatilité et la stabilité de l'appariement Watson-Crick permettent de créer des nanostructures incomparables. En effet, la spécificité de l'appariement des bases d'ADN et la structure prédictible du duplex Watson-Crick font de l'ADN duplex le matériel par excellence de construction nanométrique rapporté dans la littérature. En effet, il existe un large domaine de recherche consacré à l'utilisation de l'ADN pour la conception de nanostructures de formes et de dimensions précises. La première parution de ce concept a été faite par Nadrian Seeman en 1982 qui a suggéré que plusieurs brins d'ADN pouvaient être programmés

pour s'assembler en jonctions de 3 ou 4 voies.⁷³ Quinze ans plus tard, Seeman montre que ces jonctions, nommées «*Holliday junctions*», pourraient être modifiées avec des bouts collants d'ADN pouvant servir de points d'attache vers d'autres nanostructures d'ADN, créant ainsi un réseau bidimensionnel de biopolymère.⁷⁴ (Figure 1.6) Ainsi, Seeman a démontré qu'il est possible de créer des treillis d'ADN nanométriquement précises à l'aide d'un simple design rationnel basé sur l'appariement de type Watson-Crick des nucléotides (Figure 1.6). Ainsi, il était maintenant possible de disposer précisément différents éléments les uns par rapport aux autres pour créer une scène nanométrique.⁷⁵

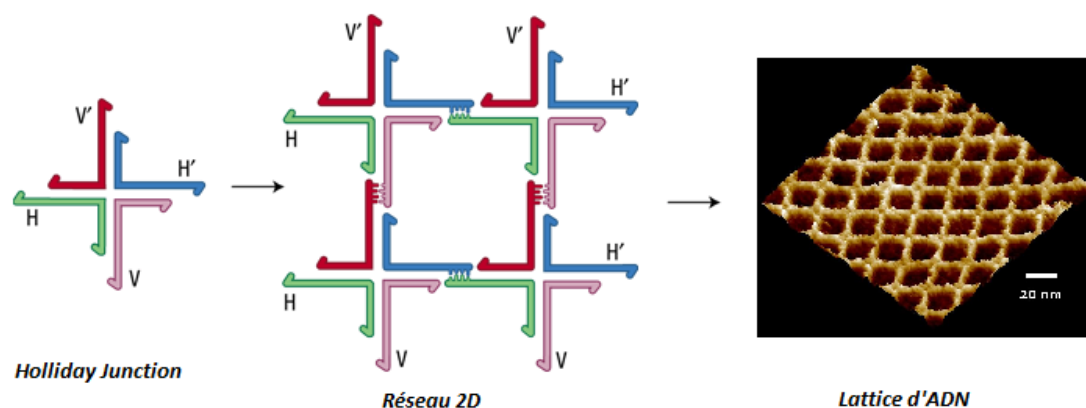


Figure 1.6 : Formation d'un treillis d'ADN à l'aide de multiples «*Holliday Junctions*».⁷⁵

Suite à ces travaux, un grand effort a été déployé pour comprendre la thermodynamique liée à l'association des brins d'ADN. Cet effort a mené au développement de logiciels permettant de prédire la structure d'un complexe d'ADN formée par l'autoassemblage de plusieurs brins d'ADN.⁷⁶ L'apparition de ces logiciels a permis de mettre à jour un nouveau domaine appelé l'origami d'ADN.²⁷ Cette technique consiste à utiliser une longue chaîne d'ADN viral (<5000 bases) dans le but de la replier en une structure 2D définie préalablement. Ceci est fait par une série d'algorithmes qui replient le brin viral en la structure

désirée et ensuite calculent quelles combinaisons de petits brins d'ADN pourraient stabiliser cette nouvelle forme. Une structure complexe peut contenir quelques centaines de ces brins agrafes, communément appelés «*staple strands*» ou brin agrafes, ayant tous une longueur d'environ 10-50 bases. Les brins agrafes et le brin viral peuvent simplement être mélangés, chauffés et refroidis (recuit) pour obtenir une structure nanométrique définie (Figure 1.7).²⁷ Le recuit (ou «*annealing*») de l'ADN consiste simplement en une étape de chauffage permettant de dissocier tous les brins ayant des repliements secondaires suivi par une étape lente de refroidissement qui sert à obtenir la formation du complexe étant le plus stable thermodynamiquement. L'utilisation de cette technique permet d'accéder à une diversité impressionnante de structures nanométriques. Ces assemblages sont généralement des formes complexes de quelques dizaines de nanomètres ⁷⁷ et peuvent même contenir des parties flexibles ⁷⁸ permettant une certaine mobilité. Un exemple classique de ceci est le dauphin d'ADN possédant une queue labile pouvant être soit rigide ou flexible (i.e. fluctuant entre deux différentes conformations dépendamment de la température locale) (Figure 1.7).

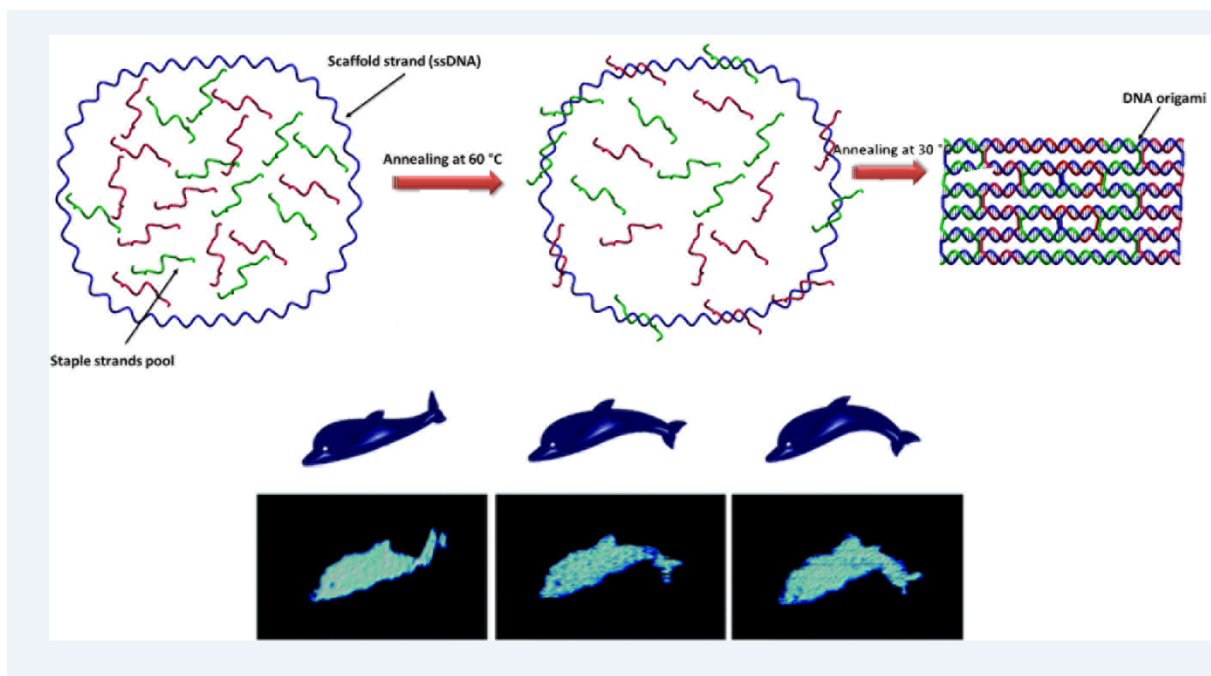


Figure 1.7: Concepts de base de l'origami d'ADN. Haut: Autoassemblage de brins agrafes autour d'un brin viral. Bas : Origami d'ADN en forme de dauphin avec une queue labile. Tiré de la référence ⁷⁰

Le progrès dans l'origami s'est fait de façon fulgurante durant les vingt dernières années. De nouveaux algorithmes informatiques peuvent maintenant modéliser presque n'importe quel objet 3D en polygones à jonctions triangulaires et fournir les séquences nécessaires pour l'assemblage de cet objet. En fait, ce développement utilise une modélisation triangulaire similaire au standard utilisé en imagerie graphique par ordinateur.⁷⁹ Malgré sa puissance, l'origami d'ADN présente certains désavantages: la synthèse de brins viraux et des centaines de brins agrafes est très dispendieuse, les rendements d'assemblages sont faibles et la purification peut être problématique.⁸⁰

Le perfectionnement des algorithmes permettant de prédire les structures secondaires d'ADN a aussi influencé l'émergence de nanotechnologies de moindre complexité et

requérant une quantité minimale d'ADN. Cette approche consiste à utiliser une combinaison de recuits précis, de molécules organiques stabilisantes et d'additions séquentielles d'ADN pour obtenir des structures nanométriquement précises avec un rendement modeste. Par exemple, le groupe Sleiman a récemment développé un nanotube d'ADN utilisant du bromure d'éthidium pour stabiliser certaines parties des duplex d'ADN et faciliter les hybridations suivantes. Les séquences qui forment ce nanotube peuvent être changées pour obtenir un tube plus rigide, plus long et même en forme de simple ou de double brin.⁸¹ On pourrait ainsi envisager la formation d'un tel tube d'ADN dans lequel un agent thérapeutique est emprisonné, agent qui serait libéré par l'action d'un interrupteur d'ADN thermosensible inclus à même les séquences. On peut aussi penser à un échafaudage d'ADN pour guider la polymérisation de polymères bloc en attachant des monomères à des brins d'ADN complémentaires aux bouts collants sur le nanotube.⁸²

Comme le démontrent les applications précédentes, la chimie de l'ADN structural est définitivement un outil puissant dans le domaine des nanotechnologies à base d'ADN. Cette technique permet de créer de nouvelles structures nanométriques qui sont sans égal dans la littérature. Cependant, les applications les plus intéressantes de cette méthodologie restent celles qui sont en mesure de placer différentes fonctionnalités sur un support d'ADN pour créer des systèmes nanométriquement définis. Heureusement, la synthèse de ces nouveaux conjugués d'ADN se fait à l'aide de chimie relativement simple et éprouvée.

1.3.3. Synthèse et fonctionnalisation d'ADN

La synthèse d'ADN se base sur une chimie qui date de plus de 40 ans. En effet, la chimie de base a peu évolué depuis la première synthèse artificielle d'ADN en 1955 par

Michelson et Todd qui ont couplé deux thymines ensemble par un groupement phosphate.⁸³ Par la suite, un concept clé a été apporté par Khorana en 1956 soit celui d'utiliser des groupes protecteurs aux extrémités des bases lors de la synthèse d'ADN pour protéger contre des polymérisations ou des ramifications non désirées et permettre l'addition séquentielle de bases sur un brin.⁸⁴ Ensuite, c'est la synthèse sur support solide, développée par Letsinger en 1963, qui a révolutionné le domaine et donné naissance au synthétiseur d'ADN tel qu'on le connaît aujourd'hui.^{85,86} En greffant le premier nucléotide sur un support solide non réactif, comme la silice ou une bille de polymère, il est possible d'y ajouter un nucléotide protégé, laver le support, déprotéger le brin et refaire un autre couplage. Cette synthèse séquentielle possède des avantages impossibles à répliquer en solution. Premièrement, les réactifs peuvent être ajoutés en excès pour pousser l'équilibre de la réaction vers le produit. Deuxièmement, le support solide peut être lavé après le temps de réaction optimal directement dans l'appareil de synthèse. Troisièmement, les sous-produits des réactions sont aussi emportés par le lavage après chaque couplage, facilitant la purification et éliminant le risque de réactions croisées. Dernièrement, les différentes étapes de la réaction cyclique peuvent être automatisées par ordinateur au lieu de manipuler les réactifs à chaque étape.

Durant la synthèse d'oligonucléotides, chaque base est ajoutée à la chaîne d'ADN en utilisant des nucléotides phosphoramidites. Ces réactifs se composent d'un diester de phosphite ((RO)₂PNR₂) monoaminé par une diisopropylamine. Un des esters lie l'atome de phosphate à un ribose portant la base d'ADN en position 1' du sucre et un groupe protecteur 4,4'-diméthoxytrityl (DMT) en 5'. L'autre ester est protégé par un groupe cyanoéthyle. Le support solide est fait de silice poreuse (CPG pour «controlled porous glass») ayant été fonctionnalisée par un premier nucléotide en 3' sur lequel la séquence d'ADN va croître. Ceci

implique que l'ajout de nucléotide se fait de la direction 3' vers le bout 5', contrairement à la convention de lecture. Les ajouts se font par cycles comportant quatre étapes ⁸⁷ : 1) Déprotection, 2) Activation/Couplage, 3) Blocage ou «Capping» 4) Oxidation (Figure 1.8).

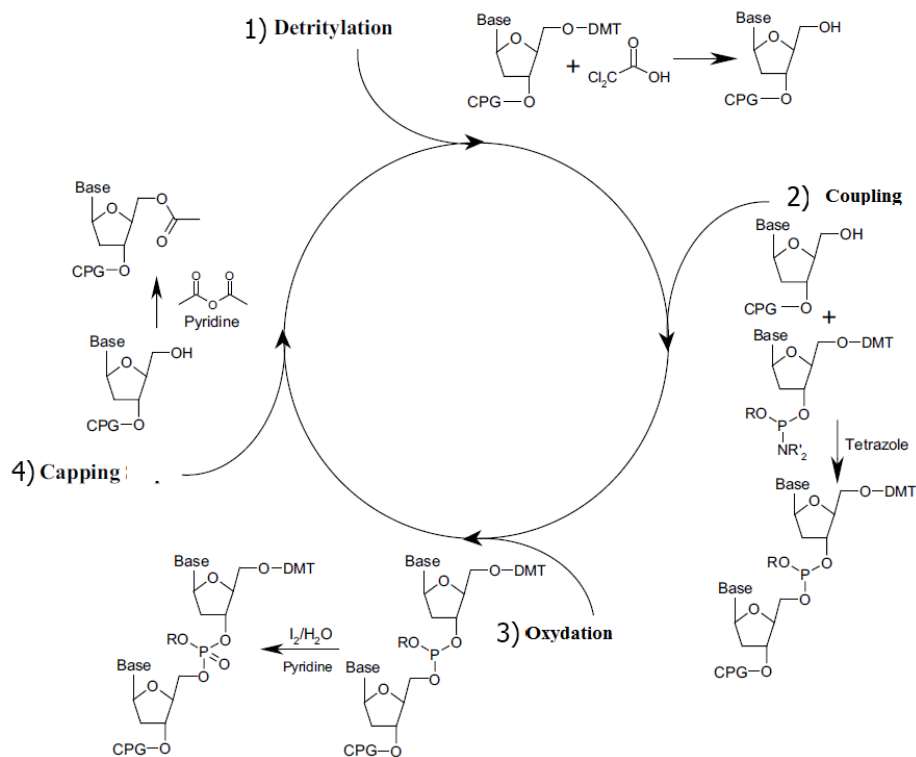


Figure 1.8: Cycle de la synthèse automatisée d'ADN sur support solide. Adapté de la référence.⁸⁷

Durant l'étape de détritylation (1), il est possible d'effectuer une mesure colorimétrique pour quantifier le rendement de la réaction. En effet, le groupe protecteur DMT qui est relâché à cette étape absorbe fortement dans le spectre visible. L'absorbance à chaque étape de la synthèse peut être comparée à l'absorbance initiale pour déduire un rendement relatif de synthèse. Grâce à cette méthode, on remarque que les rendements sont plus faibles lors de la synthèse de longs brins d'ADN comparativement à des brins plus courts, certains brins étant exclus de la réaction dus à la présence de longs brins d'ADN. La solution à ceci est

d'utiliser des supports solides ayant des diamètres de pores plus grands pour accommoder de plus grandes chaînes. C'est pour cette raison que les CPG sont les supports de choix pour une synthèse d'oligonucléotides automatisée. Puisque les pores de ce support en silice peuvent être arbitrairement contrôlés, une taille de pore peut être choisie pour une longueur de chaîne désirée, ainsi des pores plus grands permettent la synthèse de chaînes plus longues. Commercialement, différents CPG ayant des pores de 500, 1000, 1500, 2000 et 3000Å sont disponibles pouvant accommoder des chaînes de 50, 80, 100, 150 et 200 nucléotides, respectivement. Des oligonucléotides synthétiques de plus de 200 nucléotides peuvent être synthétisés, mais leur rendement est très bas et le temps de réaction peut s'étirer sur une dizaine d'heures.

Les CPG sont devenues beaucoup plus que des supports pour la synthèse d'ADN. En tirant avantage de la chimie simple de la silice, il est maintenant possible de fonctionnaliser le support avec le groupement fonctionnel désiré et de faire croître une chaîne d'ADN sur ce dernier. Par la suite, on peut cliver le brin d'ADN du support de silice et le récupérer muni de la fonctionnalité voulue en position 3'. Ces modifications peuvent être diverses telles que des fluorophores, des couples FRET, des fonctions amines utilisées lors de couplages avec des groupes N-Hydroxy Succinimide (NHS) ester, des thiols pour le greffage sur une surface d'or et des échangeurs oxydoréductifs. Les phosphoramidites A, T, C et G utilisés lors de la synthèse peuvent aussi être modifiés pour obtenir des brins fonctionnalisés en différents endroits. Par exemple, des phosphoramidites modifiés terminaux permettent de placer une fonctionnalité en positions 5'. Il est aussi possible de placer ces fonctions à l'intérieur du brin. Ceci peut être fait sans trop compromettre l'association éventuelle avec son brin complémentaire à l'aide de phosphoramidite de thymine modifié. En effet, la thymine est la

seule base pouvant être modifiée sans affecter la densité électronique de ses accepteurs et donneurs de ponts hydrogènes puisque la modification se situe sur le 5-méthyl de la thymine aromatique. Ainsi, il existe une panoplie de produits commerciaux permettant d'introduire le groupement fonctionnel désiré à l'intérieur ou aux extrémités d'un brin d'ADN.

La diversité des fonctionnalisations pouvant être introduites aux brins d'ADN rend possible une panoplie d'applications en nanotechnologie. En effet, la capacité de placer des molécules de façon nanométriquement précise les unes par rapport aux autres a permis la création de nouveaux biosenseurs, nanomatériaux et systèmes de relargage contrôlé de médicament. Cependant, ces applications tirent avantage non seulement des fonctionnalisations et de la structure secondaire prédictible de l'ADN, mais aussi de la thermodynamique contrôlable des changements conformationnels de l'ADN. En effet, l'ADN peut être utilisé comme interrupteur dynamique pour effectuer des tâches nanométriques. À ce sujet, la prochaine section traitera de la conception rationnelle de ces interrupteurs d'ADN dans le but de se familiariser avec les stratégies couramment utilisées dans le domaine. D'ailleurs, plusieurs de ces stratégies seront utilisées dans la section Résultats dans le cadre du design de nouveaux nanothermomètres d'ADN.

1.3.4. L'ADN dynamique comme interrupteur nanométrique

L'ADN est un excellent outil nanométrique pour une variété de raisons. Premièrement, l'ADN peut conserver ses propriétés d'association en présence de multiples fonctionnalisations sur sa structure. Ceci permet d'autoassembler des systèmes complexes contenant plusieurs brins à l'échelle nanométrique de façon rapide et efficace. Deuxièmement, le comportement d'association/dissociation entre un ou plusieurs brins peut être facilement

prédit par modélisation. Ce comportement est dicté par la différence d'énergie libre entre les différentes conformations structurales de l'ADN. De manière simplifiée, il suffit d'additionner la stabilisation apportée par les ponts hydrogènes des nucléotides complémentaires, l'empilement π des bases azotées et la stabilisation du squelette ribose/phosphate largement négatif par des cations positifs.⁸⁸ L'énergie libre de plusieurs états ou conformations du système peut alors être calculée à l'aide de logiciel simple, comme Mfold, de manière à prédire les conformations du système qui seront les plus stables à une concentration spécifique de brin et de cation pour une température donnée. Il sera ensuite possible de permettre aux molécules d'ADN de changer de conformation en utilisant un stimulus qui permet de stabiliser préférentiellement une conformation alternative. Ainsi, il devient possible d'exploiter des transitions conformationnelles en plaçant certaines modifications sur le brin d'ADN de façon rationnelle dans le but de détecter la transition à travers la génération d'un signal lumineux ou électrochimique.

Une application qui a découlé de l'exploitation des changements conformationnels de l'ADN est celle de la détection de séquences spécifiques d'ADN à l'aide d'un biocapteur dynamique conçu rationnellement. Un tel biocapteur est en fait un brin d'ADN ou d'ARN qui est en mesure de se lier à une molécule ou une macromolécule spécifique à l'aide d'interactions réversibles et non-covalentes. Tel l'appariement de deux brins d'ADN complémentaires, la thermodynamique du complexe lié biosenseur-cible peut être calculée. Connaissant la différence énergétique de l'ADN entre son état natif et lié, il est possible d'introduire des fonctionnalisations de façon stratégique pour détecter le changement conformationnel du biosenseur d'ADN lors de la liaison avec la cible. L'exemple classique illustrant cette approche est l'architecture de la balise moléculaire développée par Kramer et

Tyagi⁵⁴ en 1996 utilisée dans de nombreux tests diagnostiques (i.e. diagnostic moléculaire par PCR).⁸⁹ Cette architecture est composée d'une chaîne d'environ 20 à 35 nucléotides qui est fonctionnalisée avec un couple fluorophore/extincteur aux extrémités 5' et 3'. (Figure 1.9) Comportant une séquence complémentaire aux deux extrémités (5 nucléotides), la chaîne se replie sur elle-même et forme un court duplex avec une longue partie du brin sous forme non appariée. Ainsi replié, ce brin d'ADN adopte une structure tige-boucle, aussi appelé «*stem loop*», qui maintient le brin (ou biocapteur) dans son état fermé caractérisé par une absence de signal optique puisque le couple fluorophore/extincteur reste à proximité l'un de l'autre. En présence d'un brin complémentaire à la séquence de la boucle, celui-ci s'hybride à la boucle, induit le changement conformationnel du senseur et active la balise moléculaire en séparant le couple fluorophore/extincteur pour ainsi générer un signal optique. Cette tige-boucle d'ADN agit donc, en quelque sorte, comme un interrupteur moléculaire qui permet de détecter de courts brins d'ADN spécifiques en générant un signal lumineux. (Figure 1.9)

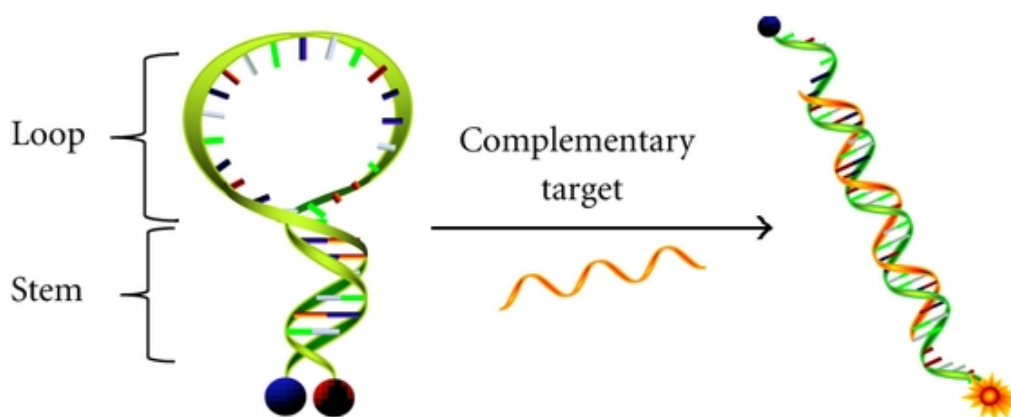


Figure 1.9: Ouverture d'un interrupteur moléculaire par l'association avec un brin complémentaire d'ADN. Le signal lumineux provient de la séparation du fluorophore et de l'extincteur en position 5' et 3'.⁹⁰

Le changement conformationnel que le biocapteur effectue suivant sa liaison à la cible est seulement possible si l'énergie libre du complexe biocapteur-cible est plus favorable que l'énergie libre du biocapteur replié sur lui-même. Par exemple, dans le cas de la balise moléculaire, la stabilisation apportée suivant la liaison avec une cible de dix paires de bases est plus grande que l'énergie de repliement du biocapteur en tige-boucle assurée par cinq paires de bases. Ainsi, la liaison de la cible au biocapteur peut induire un changement conformationnel vers une forme ouverte où la rigidité du duplex formé sépare le couple fluorophore/extincteur pour produire un signal lumineux. Malgré la différence énergétique favorable entre les deux états, l'hybridation de la cible sur l'interrupteur ne se fait nécessairement de façon stœchiométrique. Il faut noter que les interactions que font ces senseurs sont non-covalentes et réversibles et que le système atteint un équilibre réactionnel dépendamment de la température et des concentrations de cible et d'interrupteur.

Il est possible de modéliser cet équilibre et de déterminer l'affinité d'un brin pour un autre à l'aide d'une courbe de liaison. La modélisation de cette courbe peut se faire à l'aide des équations suivantes : pour un système bimoléculaire simple comme $A + B \rightarrow AB$ où A et B sont les brins cible et biosenseur respectivement, et AB est le complexe cible-biosenseur, nous pouvons représenter la constante de dissociation du complexe comme étant $K_d = \frac{[A][B]}{[AB]}$ et la constante d'association comme étant $K_a = \frac{[AB]}{[A][B]}$. Lors d'un titrage d'une quantité fixe de biosenseur B avec des concentrations croissantes de cible A , on observe une augmentation du signal provenant de la formation du complexe lié AB . En normalisant le signal du complexe AB de 0 à 1 par rapport à la concentration de cible A libre, nous obtenons une courbe de liaison

correspondant à $Fraction\ liée\ de\ B = \frac{[AB]}{[B]+[AB]}$. Cette équation peut être transformée afin d'obtenir la constante de dissociation (K_d).

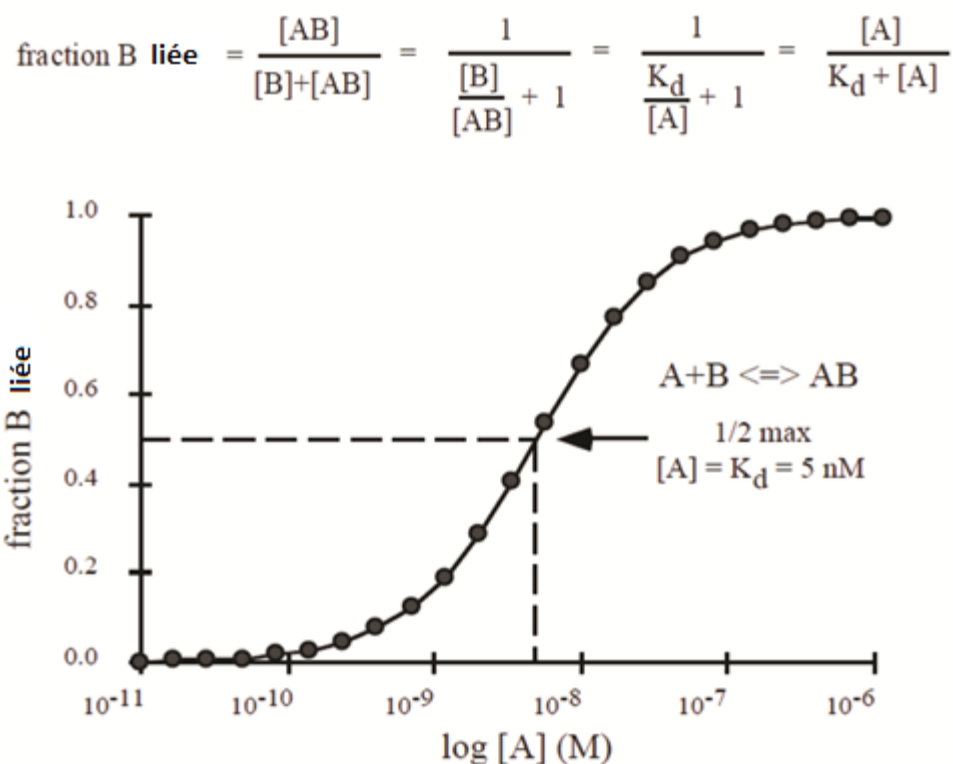


Figure 1.10: Courbe de liaison à l'équilibre théorique permettant de mesurer l'affinité de la cible A pour un récepteur B. Adapté de la référence.⁹¹

Dans la littérature, l'affinité de liaison entre deux composantes telles un senseur et une cible est représentée par la constante de dissociation K_d . Cette notation représente la concentration à laquelle 50% de la population de biosenseur est liée à la cible. Une meilleure affinité est donc définie par une constante de dissociation plus petite. De plus, le changement de conformation suivant la liaison se produit uniquement sur une plage dynamique fixe centrée autour du K_d (Figure 1.10). Cette plage linéaire se situe généralement entre 10% de B

lié ($[A] = \frac{K_d}{9}$) et 90% de B lié ($[A] = 9K_d$) et peut être utilisée pour une quantification précise de la cible à l'aide d'une courbe d'étalonnage.

Cette constante de dissociation (K_d) est fonction de la stabilité relative du biosenseur, sa cible et celle du complexe biosenseur-cible à une température donnée.⁹² Ainsi donc, si l'objectif est de mettre au point un senseur pouvant détecter des concentrations nanomolaires de cible et que le K_d du biosenseur sélectionné est de l'ordre du micromolaire, la quantification sera problématique. Cependant, dans le cas de l'ADN, il est possible de moduler le K_d d'un biocapteur à l'aide de stratégies de design rationnel. Tout repose sur la stabilité initiale du biocapteur dans son état non lié (forme inactive). En effet, s'il est possible de stabiliser davantage cette forme inactive, alors le K_d de l'association biocapteur-cible sera déplacé vers une plus grande concentration puisqu'une plus grande quantité de cible sera nécessaire pour induire le changement conformationnel. En fait, le K_d observé d'un système est intimement relié à l'énergie libre de la conformation native du biosenseur selon le modèle de déplacement de population. Dans ce modèle, la constante de dissociation observée (K_d^{obs}) entre deux molécules liantes est proportionnelle à la constante d'équilibre du changement conformationnel (K_s) du biosenseur entre une forme «aléatoire, non-liante» vers une forme «repliée liante» suivant la relation $K_d^{\text{obs}} = K_d \frac{K_s}{K_s+1}$.⁹³ Selon ce modèle de déplacement de population, ce K_s dicte l'équilibre entre la forme inactive (i.e. non-liante) et la conformation pouvant lier la cible. Ainsi, la modulation de cet équilibre permet de changer indirectement l'affinité observée du senseur. De manière pratique, quelques facteurs peuvent influencer la stabilité de cet équilibre. Premièrement, la substitution de paires A-T pour des paires G-C plus stables, ces dernières effectuant trois ponts hydrogènes contrairement à deux pour les paires

A-T. Un exemple illustrant bien cette modulation du K_d par substitution de bases sont les balises moléculaires de forme tige-boucle. En effet, une balise moléculaire comprenant une tige composée de 5 paires de bases A-T a un K_d d'environ 10 nM pour sa cible de 13 nucléotides parfaitement complémentaire à la boucle; mais lorsque ces paires A-T sont remplacées par cinq paires G-C, le K_d se voit modulé à ~ 0.5 mM (Figure 1.11). Bien que ce changement stabilise le brin sous sa forme liante et peut moduler le K_d , cette stratégie n'est pas universelle. Certaines substitutions peuvent compromettre la liaison de la cible ou même changer la structure secondaire du brin de façon à ce que le couple fluorophore/extincteur ne soit plus à proximité l'un de l'autre à l'état fermé.⁹⁴

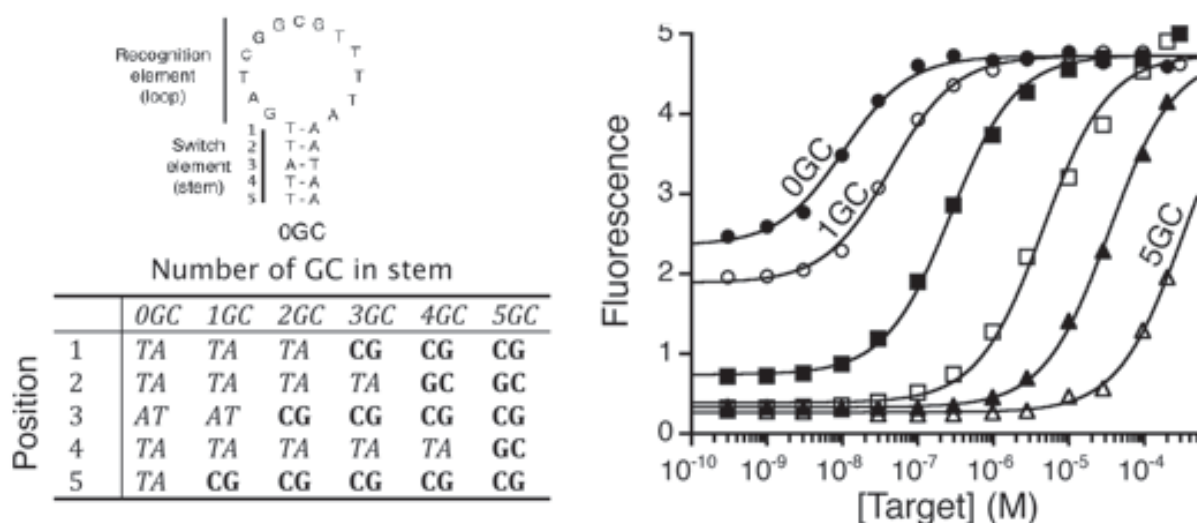


Figure 1.11: Variation du K_d d'une balise moléculaire tige-boucle pour sa cible d'ADN complémentaire selon la composition de sa tige. Le signal de fluorescence provient de la présence d'un couple fluorophore/extincteur aux extrémités du brin. Tiré de la référence⁹⁴.

De plus, cet exemple illustre bien le compromis qui doit être fait lors de la modulation du K_d à travers le K_s . Effectivement, si l'on diminue la stabilité de la forme aléatoire (non liante) d'un biosenseur, il est possible d'atteindre des limites de détection relativement basses,

comme dans le cas du senseur 0GC (Figure 1.11). Cependant, pour le senseur 0GC (Figure 1.11) l'équilibre entre la forme aléatoire (non liante) et la forme repliée (tige boucle pouvant lier) montre qu'environ 50% de la population de senseur existe sous différentes forme aléatoirese. Le problème est que ces formes non structurées sont fortement fluorescente dû à la séparation du couple fluorophore/extincteur. Ainsi, cette population de senseurs génère un bruit de fond élevé qui limite le gain et la sensibilité du senseur. À l'opposé, le biosenseur 5GC possède un très faible bruit de fond lorsque inactif puisque l'équilibre du changement conformationnel entraîne la grande majorité de la population de senseurs vers une forme liante non fluorescente, le couple fluorophore/extincteur étant à proximité l'un de l'autre. Par ailleurs, la plage dynamique du senseur se trouve fortement affectée par cette stabilité accrue de la tige puisque des concentrations plus élevées de cible sont nécessaires pour déplacer la population de ces biosenseurs vers une forme complexée.

Une seconde approche un peu plus flexible pour moduler le K_d d'un système consiste à utiliser des stabilisateurs allostériques sur des aptamères constituées d'ADN. Un aptamère est simplement un brin d'ADN or ARN qui peut lier sélectivement un molécule, une biomolécule ou même des ions de façon non covalente et réversible. Un exemple typique de la régulation allostérique d'un tel aptamère est celui du réglage du K_d de l'aptamère de mercure. L'aptamère de mercure est un unique brin d'ADN, pouvant lier multiples ions de mercure sélectivement. En effet, il est possible d'ajouter des petits brins d'ADN au système de façon à ce que l'aptamère voit son affinité réduite ou augmentée grâce à l'ajout d'un brin d'ADN pouvant inhiber ou activer la liaison de la cible, respectivement.⁹⁵ Il s'agit d'une stratégie d'inhibition ou d'activation allostérique inspirée par le monde des protéines. Un activateur allostérique sera en mesure de stabiliser l'état liant de l'aptamère, augmentant le K_s et diminuant le K_d . À

l'opposé, l'inhibiteur allostérique entraîne l'équilibre vers la forme non liante et diminue l'affinité observée (K_d^{obs}) (Figure 1.12).

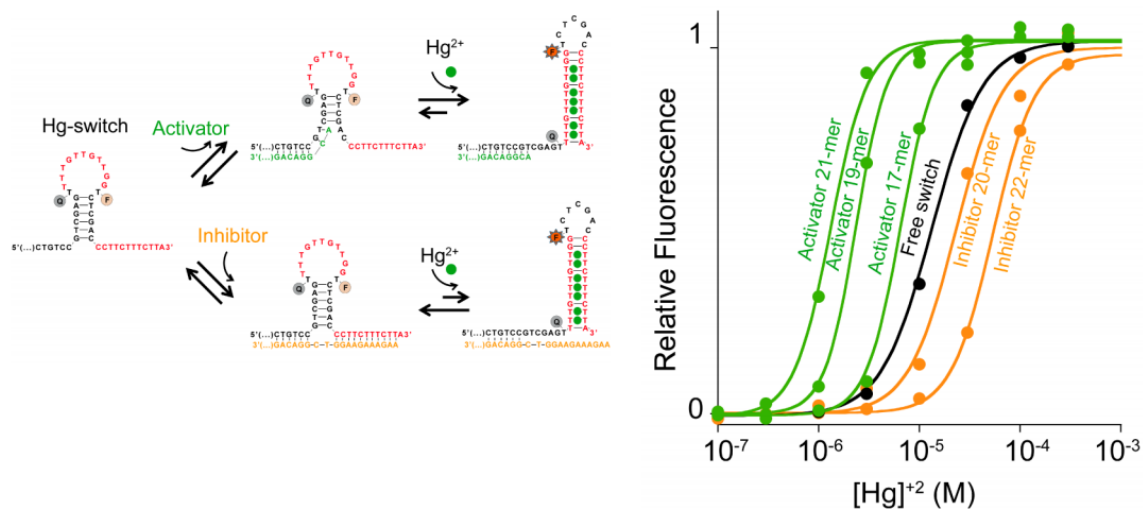


Figure 1.12: Modulation de l'affinité d'un aptamère de mercure selon l'ajout d'un activateur ou d'un inhibiteur allostérique.⁹⁵

Les ions et l'ADN ne sont pas les seules cibles pouvant être liées et détectées par des biosenseurs à base d'oligonucléotides. En fait, il est possible de développer des biosenseurs d'ADN capable de lier presque n'importe quel ion, molécule organique ou macromolécule biologique avec une grande spécificité. Ceci est possible à l'aide d'une technique d'évolution dirigée nommée : Évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (SELEX).⁹⁶ Ce processus de sélection utilise une librairie de brins d'ADN de séquences aléatoires ($\sim 10^{15}$ brins différents) qui seront exposés à la cible voulue. L'utilisation d'une chromatographie d'affinité permet l'élimination des brins non liés tout en sélectionnant les séquences liantes qui peuvent ensuite être amplifiées par PCR pour les prochaines rondes de sélection. Le processus peut être répété en ajoutant des conditions de plus en plus contraignantes lors de la chromatographie d'affinité. Ce faisant, chaque ronde de sélection et

d'amplification produit des aptamères liant la cible avec une plus grande affinité. De manière générale, 6 à 20 rondes de SELEX sont nécessaires pour obtenir une séquence d'ADN avec une haute affinité pour la cible de l'ordre du nanomolaire. Après caractérisation, l'aptamère sélectionné peut être utilisé tel quel pour des applications thérapeutiques ou bien modifié avec les techniques présentées ci-haut dans le but de créer un biosenseur. Cependant, cette tâche peut être difficile pour différentes raisons. Premièrement, les aptamères sélectionnés peuvent être très longs (50-100 nucléotides)⁹⁶ ce qui complique la synthèse automatisée. Deuxièmement, étant donné que la structure du complexe aptamère-cible est inconnue, certaines stratégies de modulation de K_d sont impossibles. Ainsi, dans le cas de la mutation de paires A-T pour des paires G-C, il peut être difficile de garder intacte le site de liaison de la cible. La stratégie d'inhibition allostérique est aussi problématique pour la même raison i.e. que si l'inhibiteur s'hybride aux nucléotides qui participent à la liaison à la cible, l'aptamère pourrait perdre ses propriétés de liaison.

Une autre façon de créer de nouveaux biosenseurs d'ADN fonctionnels est de combiner la dynamique du changement conformationnel de l'ADN à la chimie simple de fonctionnalisation qui permet d'y attacher des éléments de reconnaissance qui ne soient pas à base de nucléotides. En effet, il est possible de fonctionnaliser de façon stratégique un brin d'ADN avec des épitopes peptidiques de manière à créer un interrupteur moléculaire qui s'active suivant la liaison avec un anticorps. Un exemple illustrant cette approche est l'interrupteur moléculaire électrochimique développé par le laboratoire de Kevin Plaxco.⁹⁷ Ce brin d'ADN est modifié avec une fonction thiol et une molécule rédox, le premier permettant une immobilisation du brin sur une surface d'or alors que le second permet l'échange d'électrons avec l'électrode à un certain potentiel. La liaison de l'anticorps aux épitopes

présents sur l'interrupteur moléculaire résulte en un étirement de la construction d'ADN de manière à éloigner le marqueur électrochimique de l'électrode d'or (Figure 1.13). De cette façon, il est possible de corrélérer une diminution de courant à une concentration d'anticorps sur une plage dynamique d'environ un ordre de grandeur aux alentours de 6 nM.

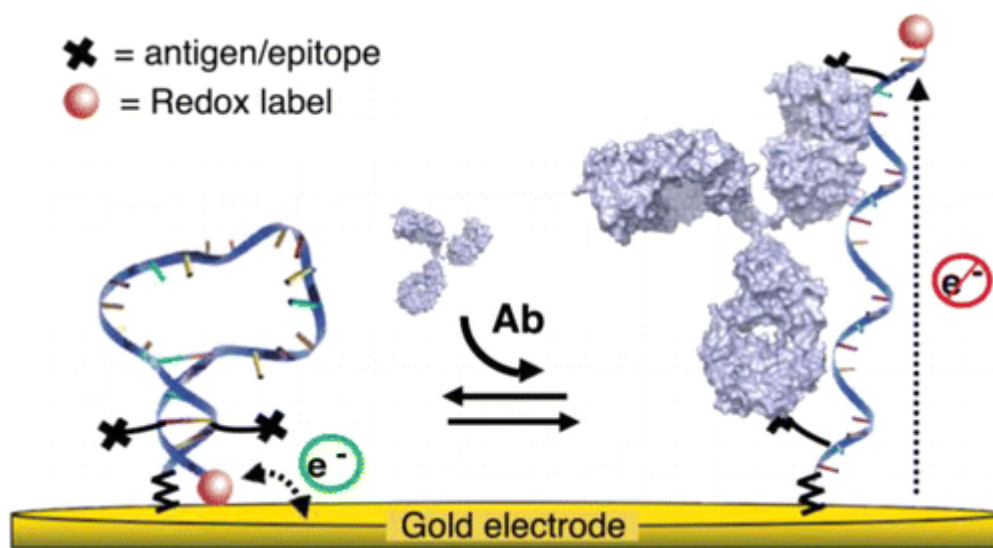


Figure 1.13: Un interrupteur électrochimique à base d'ADN pour la détection d'anticorps.⁹⁷

En somme, la dynamique d'assemblage des brins peut être exploitée de manière à mettre au point des interrupteurs moléculaires qui permettent de détecter une multitude d'analytes à des concentrations modulables. De plus, une fonctionnalisation rationnelle de ces brins permet de traduire la liaison d'un analyte en un signal optique ou électrique. Ces stratégies peuvent également être utilisées pour détecter des propriétés physiques. En effet, le groupe Ricci a récemment développé un capteur de pH à base d'ADN qui exploite la sensibilité des interactions Høogsteen à l'acidité du milieu.⁹⁸ Ces travaux ont montré que la réponse de ces interrupteurs moléculaires au pH peut être modulée ou étendue aisément tout en conservant une excellente réversibilité et vitesse de réponse. Un objectif similaire à ces

travaux sera au centre de ce mémoire mais portera plutôt sur la mise au point d'un biosenseur de température à l'échelle nanométrique. En utilisant les stratégies introduites durant ce chapitre, la section Résultats présentera comment concevoir une variété de nanothermomètres d'ADN avec des plages dynamiques modulables.

2. Résultats

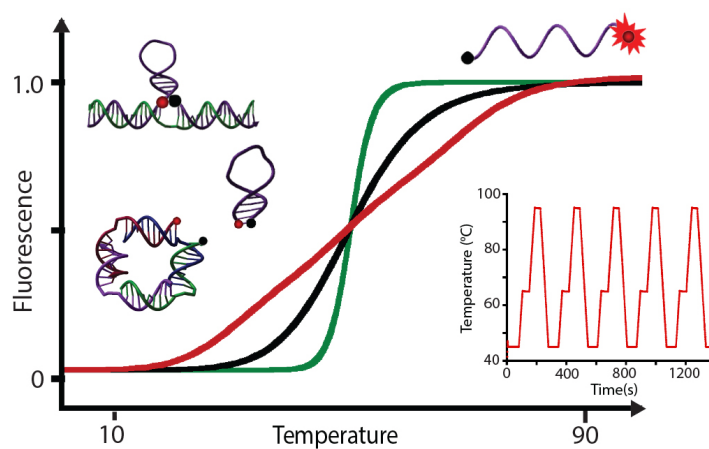
Ce chapitre comporte le manuscrit «*Programmable, quantitative DNA nanothermometers*» soumis pour publication au journal Nano Letters en date du 14 Janvier 2016. Les auteurs de ce papier sont David Gareau et l'auteur correspondant est le Prof. Alexis Vallée-Bélisle. Les expériences ont été effectuées par David Gareau et Arnaud Desrosiers (stagiaire d'été). La totalité de la conception des expériences et leurs résultats ont été générés par David Gareau à l'exception des valeurs brutes de la figure 2.3a qui ont été fournis par Arnaud Desrosiers. Les figures ont été créés par David Gareau à l'aide du logiciel Synergy Kaleidagraph et Adobe illustrator. L'écriture du manuscrit a été effectuée en conjoint entre le Prof. Alexis Vallée-Bélisle et David Gareau. Toute propriété intellectuelle issue de ce manuscrit appartient au Laboratoire de Biosenseurs et Nanomachines et à l'Université de Montréal.

Programmable, quantitative, DNA nanothermometers

David Gareau¹, Arnaud Desrosiers¹, Alexis Vallée-Bélisle^{1,*}

Laboratory of Biosensors & Nanomachines, Département de Chimie; Université de Montréal;
C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

TOC graphic:



2.1. Abstract:

Developing molecules, switches, probes or nanomaterials that are able to respond to specific temperature changes should prove of utility for several applications in various fields of nanotechnology. Here, we describe various bio-inspired strategies to design DNA thermoswitches with programmable linear response ranges that can provide either precise ultrasensitive response over a desired, small temperature interval ($\pm 0.05^\circ\text{C}$) or an extended linear response over a wide temperature range (from 20°C to 85°C). Using structural modifications or inexpensive DNA stabilizers, we show that we can tune the transition mid-points of DNA thermometers from 30°C to 85°C . Using multimeric switch architectures, we are able to create ultrasensitive thermometers that display large quantitative fluorescence gains within small temperature variation (e.g. $>700\%$ over 10°C). Using a combination of thermoswitches of different stabilities, or a mix of stabilizers of various strengths, we can create extended thermometers that respond linearly up to 50°C in temperature range. Here we test the response rate and reversibility of these programmable DNA thermometers by monitoring temperature inside individual wells during PCR reactions. We discuss the potential applications of these programmable DNA thermoswitches in various nanotechnology fields including cell imaging, nanofluidics, nanomedicine, nanoelectronics, nanomaterial and synthetic biology.

KEYWORDS: Nanothermometry, molecular switches, DNA nanotechnology, biosensors, PCR, fluorescence,

Temperature is a key parameter, which controls the dynamics of all chemical, physical and biological systems. With the advance of nanotechnology, it becomes imperative to develop tools that can precisely measure local temperature at the nanoscale. Such nanothermometers would prove useful in fields such as nanoelectronics,⁹⁹ nanophotonics,¹⁰⁰ microfluidics¹⁰¹ and nanomedicine.¹⁰² A handful of these nanothermometers have been developed over the last decade. These include thermometers that take advantage of the temperature-dependent properties of quantum dots, nanoparticle assemblies,¹⁰³⁻¹⁰⁵ nanogels,^{106,48} nanodiamonds,¹⁰⁷ polymers,^{108,109} proteins¹¹⁰ and DNA.¹¹¹⁻¹¹³ These nanothermometers were applied to measure, for example, temperature variations in microfluidic devices¹⁰⁵ and inside living cells.^{107,109} Despite these recent advances in nanothermometry, many drawbacks still limit the practicability and thus the usefulness of these approaches. These limitations include poor biocompatibility, low temperature resolution, slow response time, complex synthesis, expensive instrumentation, low level of programmability, and complex non-linear responses.

30,37

Among the various nanothermometers described above, those working via a structure-switching mechanism¹⁰⁸⁻¹¹³ represent a promising avenue. This is due to the fact that these thermostiches can potentially be adapted to provide different signal readouts¹¹⁴ and can serve as building blocks to engineer thermo-responsive smart materials for applications such as drug delivery.¹¹⁵ Most specifically, switch-based nucleic acid thermometers¹¹¹⁻¹¹³ display a high potential for nanothermometry, as exemplified by living organisms, which employ finely thermo-regulated RNA switches to modulate and tune a number of biological activities such as gene expression.¹¹⁶

Yang,¹¹¹ Andersen,¹¹² and Rinnan¹¹³ have recently proposed to use “stem-loop” molecular beacons³ as fluorescent nanothermometers. These DNA thermoswitches exploit the melting transition of their double helix stem that can unfold at increasingly high temperatures depending on stem stability (Figure 2.1a). When a fluorophore (6-Fluorescein) and a quencher (Black Hole Quencher- 1) are attached at both extremities of this stem-loop (Fig. 2.1a), the fluorophore-quencher pair separates upon switch unfolding giving rise to a typical 20- to 40-fold increase in fluorescence signal that is linear over a 12°-15°C interval (Fig. 2.S1). Despite the promising features of these stem-loop thermometers, which include fast response times and sustained efficiency over several cycles,¹¹¹ a main drawback affects their performance: their linear range is fixed between 12-15°C. This fixed dynamic range creates three main complications. First, a new thermoswitch must be synthesized for each new specific application thus rendering this approach expensive and labour-intensive. Second, stem-loop thermometers only produce weak signal gains when measuring small temperature variations (*e.g.* 80%,¹¹¹ and 35%,¹¹² fluorescence gain over a 10°C interval) since the fluorescence variation of the thermometer takes place over a 12-15°C temperature range. This weak sensitivity precludes, for example, precise temperature sensing when only small temperature changes take place ($\pm 1^\circ\text{C}$). Finally, DNA stem-loop thermometers only respond over a fixed temperature window that typically spans 12-15°C. This fixed dynamic range limits their capacity to measure temperature variations spanning more than 15°C. In response to these limitations, we describe here various bio-inspired strategies to engineer DNA thermoswitches with programmable sensitivities and dynamic ranges (Fig. 2.1).

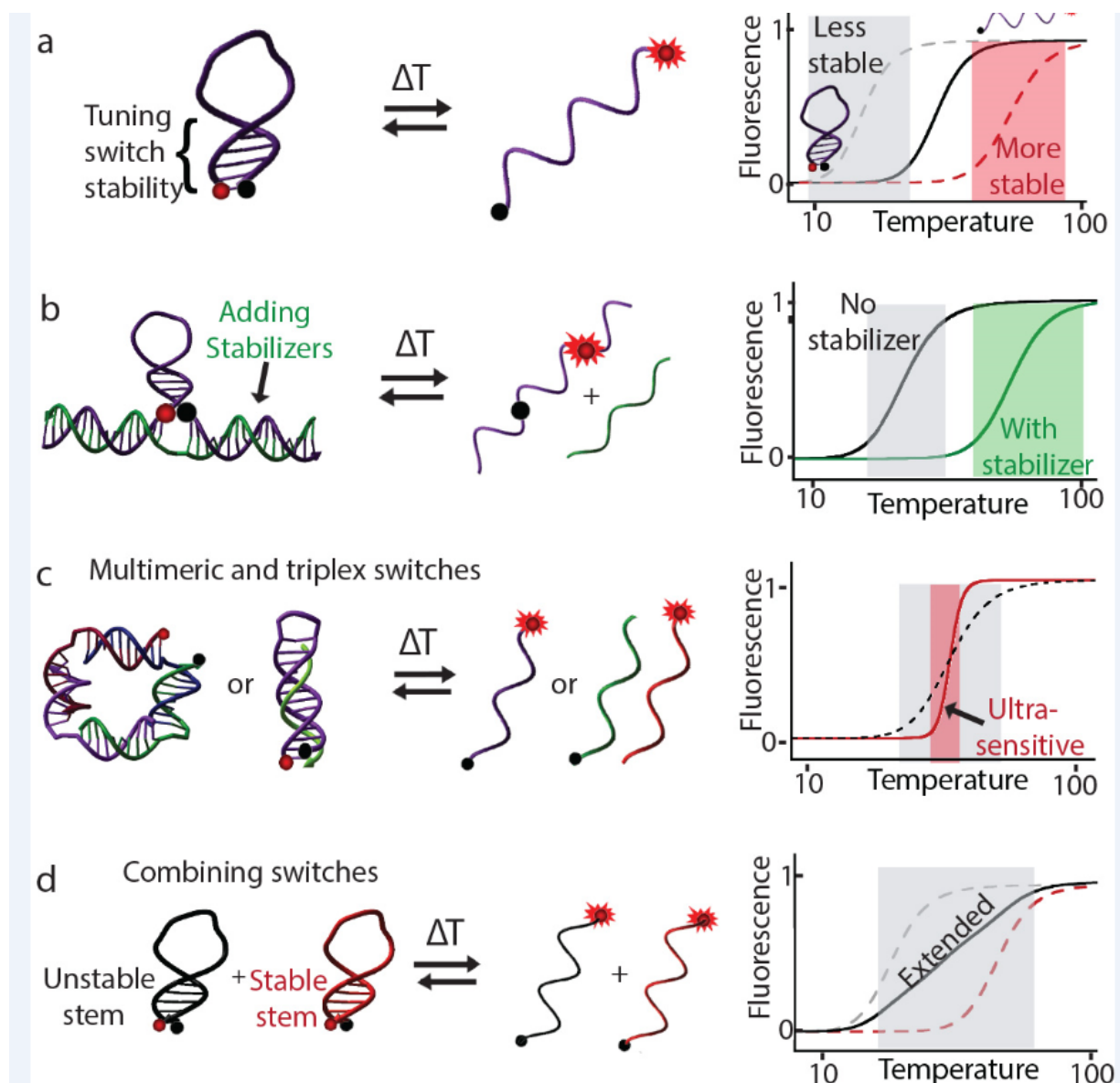


Figure 2.1: Bio-inspired strategies to engineer programmable DNA-based

nanothermometers. a) Tuning the dynamic range of the nanothermometer by modifying the stability of the switch; b) Tuning the dynamic range of the nanothermometer by adding an inexpensive, unlabeled allosteric DNA stabilizer strand; c) Enhancing the signal gain (sensitivity) of the nanothermometer by engineering multimeric switch architectures; d) Extending the dynamic range of the nanothermometer by combining switches (or stabilizers) of different stabilities.

2.2. Results

In order to shift the dynamic range of a DNA stem-loop so that it responds to different specific temperature variations, Andersen *et al.* have proposed to modulate the thermoswitch stability by changing either the buffer ionic strength or the GC content of the stem (Fig. 2.2a).¹¹² By varying salt concentration (NaCl), we can tune the melting temperature (and thus the dynamic range) of the same 5 base pair stem-loop switch by up to 30°C (Fig. 2.S1). However, changing the ionic strength may not be an option for various applications including, for example, *in vivo* temperature monitoring. In response, DNA switch stability can also be modulated by substituting one AT base pair to a more stable GC base pair. For example, the melting transition of a 5-base pair stem-loop thermoswitch can be increased by roughly 10°C per AT to GC substitutions, going from 45°C to 85°C (Fig. 2.2a).

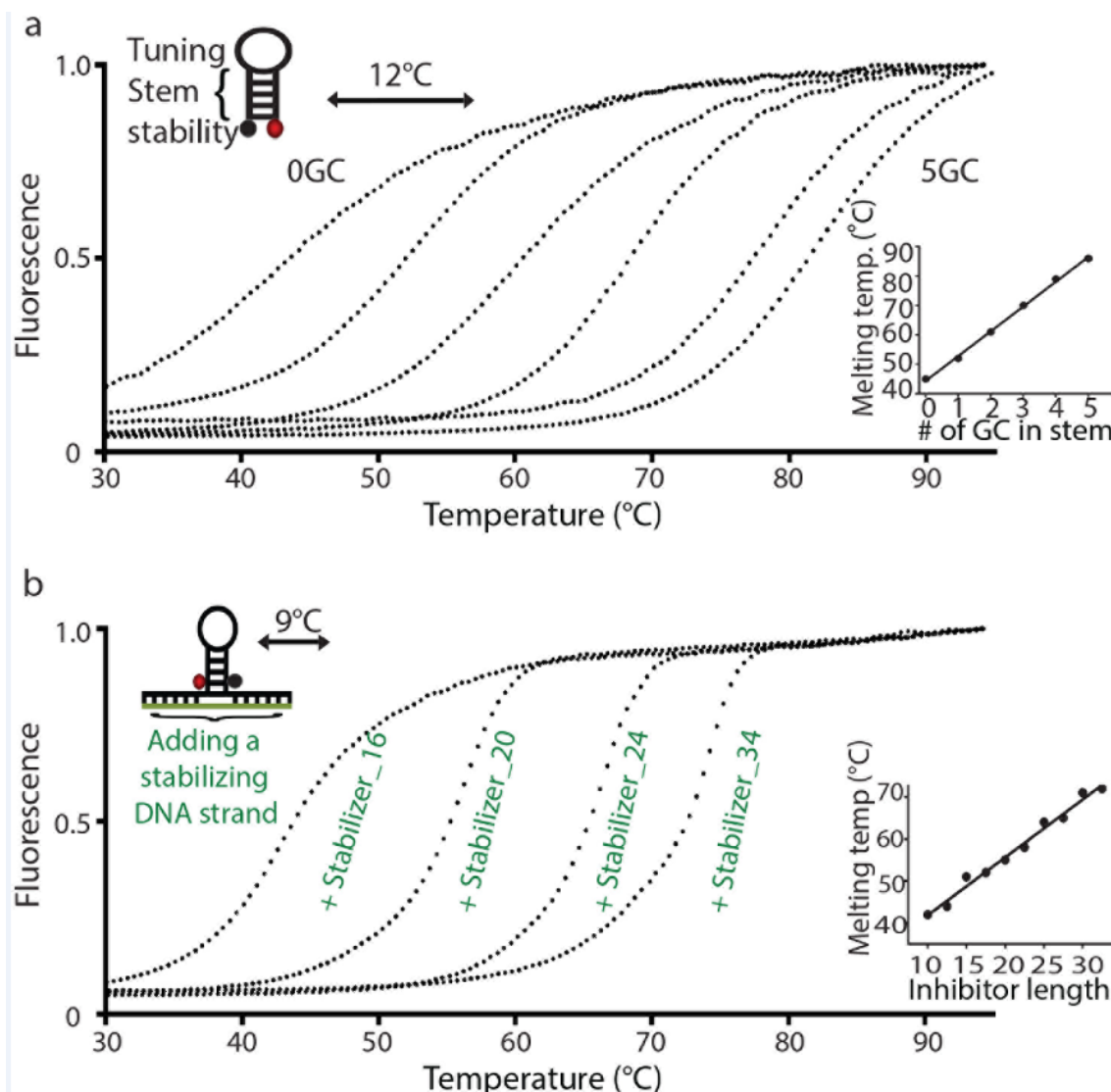


Figure 2.2: Tuning the dynamic range of DNA nanothermometers by a) Tuning the dynamic range of DNA nanothermometer by varying the AT and GC content in stem; b) Tuning the dynamic range of a nanothermometer by adding inexpensive, unlabeled allosteric DNA stabilizers of various lengths. This stabilizer, for example, can stabilize the DNA stem by hybridizing to DNA overhangs at the extremity of the switch (for clarity, only four stabilizers are shown in the figure). Of note, these bi-molecular thermoswitches now display a more cooperative melting transition exhibiting a significantly steeper slope than the unimolecular stem-loop (9°C versus 12°C). All experiments were conducted in 50 mM NaPO₄ with 150 mM NaCl at pH 7.0 containing 25nM of nanothermometer and 100nM of stabilizer strand.

A main limitation of DNA stem-loop thermometers is that a single switch cannot be tuned to respond to different temperature ranges. A different DNA thermometer must therefore be synthesized for each new application thus rendering this approach expensive and labour-intensive. For example, the price of a typical dual-labelled DNA ranges from 250\$-400\$, depending on the fluorophore/quencher pair used and their location within the strand. To overcome this limitation we propose here to use a classic allosteric regulation mechanism and re-engineer our DNA thermoswitch so that it can be programmed to respond to many desired temperature windows via the addition of a simple, inexpensive DNA stabilizer (Fig 2.1c, 2.2b).¹¹⁷ For a DNA stem-loop switch, this is easily achieved by adding overhang DNA sequences at both extremities of the stem. A stabilizer can then be easily designed to bind these overhangs, which will stabilise the stem and shift the melting transition of the switch to higher temperatures (Fig. 2.2b). Using DNA stabilizers of various lengths, we can tune the melting temperature and dynamic range of a single overhang stem-loop switch by up to 30°C ($\sim 3.6^\circ\text{C}$ on average per additional base on each side of the stabilizer) (Fig. 2.2b inset). Moreover, this stabilizer strategy may also enable to tune “on-the-fly” the stability of various thermosensitive DNA switches or material via the simple addition of inexpensive DNA strands.

One promising feature of DNA-based thermometers is their fast response times, which is linked to the folding unfolding rates of the DNA structures. In order to characterise the temporal resolution of the unimolecular (Fig. 2.2a) and bi-molecular (Fig. 2.2b) stem-loops, we determined the folding and unfolding rates of these structures. Using rapid [NaCl]-jump experiments, we show that the unimolecular stemloop folds and unfolds faster than the dead time of our mixing instrument (3.2 ms) as has been previously observed for other similar DNA

stem-loops (Fig. 2.S2).¹¹⁸ Although being significantly slower than its unimolecular counterpart, the bi-molecular tunable stem-loop still provides a relatively rapid response time of a few seconds ($t_{1/2} = 2.2$ sec at 45°C) (Fig. 2.S2).

For some applications the 12°C-15°C unfolding dynamic range of the unimolecular stem-loop thermoswitch is too broad, thus limiting the ability to achieve sufficiently high signal gain when measuring small temperature changes. For example, stem-loop thermometers explored by Yang,¹¹¹ Andersen,¹¹² and Rinnan¹¹³ produce only 35%,¹¹² 80%,¹¹¹ and 250%¹¹³ fluorescence gain over a 10°C interval. This weak sensitivity reduces their usefulness, for example, in applications where only small temperature changes generally take place ($\pm 1^\circ\text{C}$) (for example for *in vivo* imaging applications¹¹³). In order to develop switches with higher signal gain, we explored the unfolding transition of alternative DNA folds that may well display more cooperative melting transition: a DNA triplex helix, and a DNA G-quadruplex structure^{119,120} (Fig. 2.S3). Both these DNA folds display a convenient single unfolding transition albeit with a sharper (triplex: 10°C) and a more extended dynamic range (quadruplex: 20°C).

Inspired by the more cooperative melting behaviours of the DNA triplex fold (Fig. 2.S3) and by the convenient properties of the tunable stem-loop (Fig. 2.2b), we decided to combine both features into a single design in order to create a ultrasensitive, tunable, DNA thermometer. To do so, we exploited a DNA-clamp architecture¹²¹ in which a poly-purine DNA strand is stabilized in a clamp conformation following its hybridization to a second poly-pyrimidine DNA strand via the formation of Watson-Crick and Hoogsteen interactions (see Material and Methods and ref. ¹²¹). We find that the melting transition of this bi-molecular DNA clamp displays a much more cooperative transition, with a linear dynamic

range spanning less than 7°C (Fig. 2.3a). Notably, the clamp switch displays a relatively low background fluorescence (<10%) at low temperature thus enabling a unprecedented high signal gain over small temperature windows. For example, the 0GC stem-loop thermoswitch typically shows a gain of 135% of its fluorescence within the 30°C -40°C interval (Fig.2.3a) while the tunable clamp switch display a 710% signal gain in the same interval. This enables the DNA-clamp switch to generate twice as much light as the stem-loop switch, with typical precisions of 0.05°C compared to 0.1°C, respectively (Fig. 2.S4). Furthermore, we find that the melting transition of the DNA clamp can also be finely tuned from a 30°C melting midpoint to higher temperatures through roughly 3°C increments by simply adding extra triplex-forming nucleotides in the stabilizer (Fig. 2.3a). This highly sensitive DNA clamp switch, albeit with a limited dynamic range (7°C), would therefore represent an ideal nanothermometer to measure small temperature changes near biologically relevant temperatures.

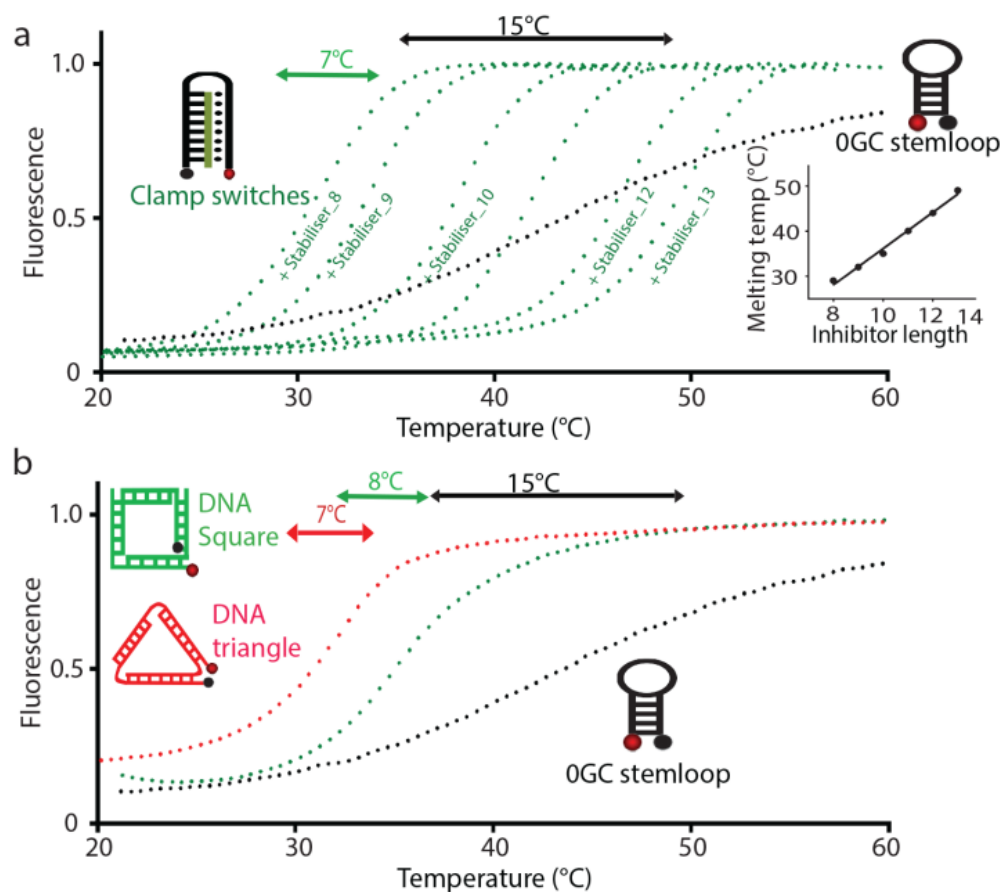


Figure 2.3: High gain, ultrasensitive multimeric DNA thermoswitches. a) Tunable DNA triplex-clamp switch. The highly cooperative melting transition of such switches can be readily tuned by adding unlabeled DNA strands of various lengths (8-13 bases) that allow formation of both Watson-Crick and Hoogsteen interactions of increasing stability. b) Melting of triangle-like and square-like DNA structures that use edges made of double helices (10 base pair helices containing 5GC and 5AT). These multiplexed DNA structures showed enhanced melting cooperativity at lower temperatures compared to the monomeric stem-loop architecture (OGC). Experiments in panel a) were conducted using 25 nM of switches in 50 mM Na_2HPO_4 with 100 mM NaCl at pH 7.0. Experiments in panel b) used identical DNA concentrations in a 50 mM HEPES with 300 mM NaCl and 10 mM MgCl_2 pH 7.0 buffer.

Encouraged by the ability of bi-molecular switches (and other highly complex DNA structures) to provide steeper melting transitions¹²⁰ (see also ref.¹²²) we further explored the ability of multimeric DNA switches to display higher cooperative melting behaviour (Fig. 2.1c). We tested this idea by engineering a trimeric “triangle-like” DNA structure as well as a

tetrameric “square-like” DNA structure (Fig. 2.3b). As expected, both these multimeric switches display a steeper melting transition compared to the unimolecular stem-loop thermoswitch with a dynamic range spanning only 7°C (triangle) and 8°C (square). Similarly to the clamp switch, they also enable precise temperature measurement down to 28 °C. Unfortunately, however, these tri-molecular and tetra-molecular thermoswitches also possess a higher fluorescent background at low temperature (>15%), which reduces their gain and the amplitude of the fluorescence signal available in their linear dynamic range. Of note, these trimeric and tetra-meric switches could prove useful to build thermo-sensitive switches where multiple elements could be associated or dissociated in function of a small temperature variation.¹²³

Another important limitation of DNA stem-loop thermometers is that their melting transitions do not span a dynamic range larger than 12°C-15°C (Fig. 2.2a). This fixed dynamic range limits their capacity to measure temperature variations spanning more than 15°C. In order to extend the linear dynamic range of DNA thermometers so that they respond to greater temperature variations, we set out to combine individual thermoswitches, each displaying varying melting temperatures (Fig. 2.1d, 2.4a) (see refs ^{124,98}). For example, by combining six stem-loops with increasing GC contents in the stem (from 0GC to 5GC), we are able to create a thermometer that displays a linear dynamic range spanning up to 45°C (Fig 2.4a). Alternatively, by using our tunable stem-loop thermoswitch in combination with 4 unlabelled stabilizers of various lengths (16, 20, 24, and 34 bases), we are also able to create a thermometer that displays a similarly wide dynamic range as the extended thermometer made from a combination of 6 stem-loops (Fig. 2.4b).¹²⁵ Of note, this “stabilizer” strategy significantly reduces the price of the extended thermometer from ~1500\$ to roughly 300\$.

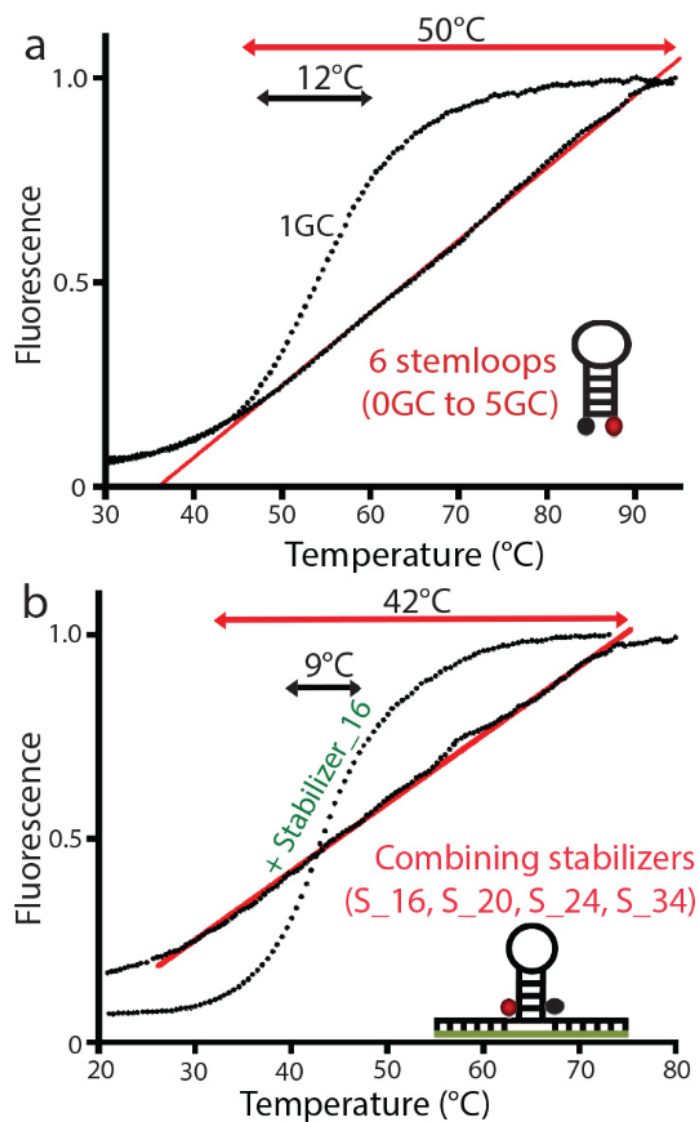


Figure 2.4: Extending the dynamic range of DNA nanothermometers by combining thermoswitches or by adding a mix of DNA stabilizers. a) Extending the dynamic range of DNA nanothermometers by combining switches with different stabilities; b) Extending the dynamic range of a single DNA thermoswitch by adding a collection of DNA stabilizers of different lengths. All experiments were conducted in 50 mM NaPO₄ with 150 mM NaCl at pH 7.0

In order to illustrate the practicability and versatility of our programmable DNA thermometers, we employ them to monitor, for the first time, the temperature inside individual PCR wells during several PCR cycles. To do so, we created a DNA thermometer that responds

linearly within the temperature range of typical PCR experiments (45°C to 95°C) (Fig. 2.S5). We first tested the reversibility of this fluorescent DNA thermometer by performing multiple, rapid temperature cycles over time (Fig.2.5a). The DNA thermometer shows high reversibility over multiple cycles and displays high accuracy for temperature measurement when sufficient time is allowed for temperature equilibration. Interestingly, the thermometer also highlights a significant discrepancy between the block heater temperature and the temperature measured inside individual wells following rapid temperature jumps (Fig. 2.5b). Since the stem-loop thermometer folds and unfolds faster than the millisecond time range (Fig. 2.S2), this observed equilibration time suggests that the sample inside each well may take several seconds before reaching the temperature indicated by the block heater (> 10 s). In order to precisely measure this equilibration time, we performed rapid 10°C temperature jumps (*i.e.* 60° C to 70° C and 70°C to 60° C in 7.4 seconds) while monitoring sample temperature using two different thermometers with optimal sensitivity for this temperature range (a 3GC stem-loop and a tunable stem-loop) (Fig. 2.5c and 2.5d). Temperature equilibration rates inside PCR wells were found to be 0.14 s⁻¹ and 0.13 s⁻¹ while heating, and 0.17 s⁻¹ and 0.19 s⁻¹ while cooling when using the unimolecular 3GC and the stabilizer-tuned stem-loops thermometers, respectively. These results suggest that the sample temperature inside a PCR well only reaches the block heater temperature ($\pm 1^\circ\text{C}$) 15 s after the block heater has reached it. Of note, a similar trend is observed throughout all sample volumes. Meaning a well containing a 20ul sample shows the same temperature delay as a 100uL sample. Overall these results suggest that sufficient equilibration time should be taken when using PCR instruments in a quantitative mode that requires, for example, precise sample temperature measurements. For instance, DSF experiments,¹²⁶ which are employed to determine the strength of molecule-

protein interactions will over-estimate the affinity if PCR melting transitions are performed too rapidly.

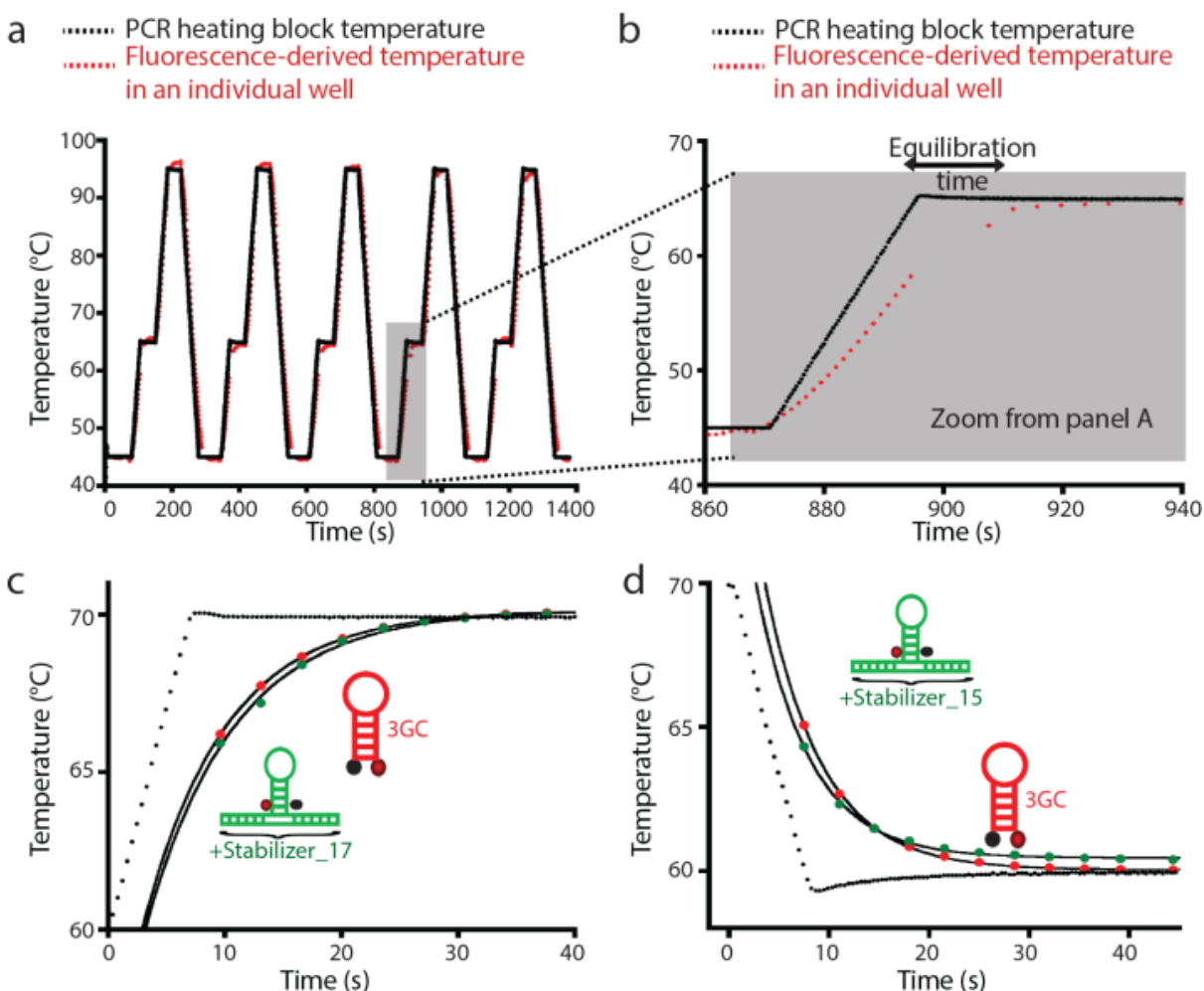


Figure 2.5 Real-time temperature monitoring in individual PCR wells using fluorescent DNA nanothermometers. a) PCR cycles monitored using an “extended-range” thermometer that uses a combination of stem-loop thermoswitches (same stem-loop mix used in Fig. 2.2b); b) Deviation between the PCR heating block temperature and the temperature measured inside individual wells using the fluorescent DNA nanothermometer (zoom from panel a); c, d) Temperature equilibration rates inside a PCR well following rapid temperature jumps (1.35°C/s) as monitored using two different DNA thermoswitches. In red, a 3GC stem-loop, in green a stem-loop stabilized with a 34-nucleotide stabilizer (panel c) or a 30-nucleotide stabilizer (panel d). The small upward deviation (0.5°C) observed for the stem-loop-inhibitor thermometer in panel d is attributable to the limited linear dynamic range of this thermometer. Experiments were performed using 150 nM of mixed thermoswitches (panel a-b) in 50 mM Na_2HPO_4 and 300mM NaCl at pH 7.0 or 50 nM of stem-loop (panel c-d) with 200 nM of stabilizer for the stabilizer-tuned stem-loop thermometer in 50 mM Na_2HPO_4 with 100 mM NaCl at pH 7.0.

2.3. Conclusion

Here, we have engineered several DNA-based thermometers with programmable quantitative, linear dynamic ranges for optimal temperature monitoring. More specifically, we have introduced various design strategies to tune “on-the-fly” their melting transition temperature and the cooperativity of folding-unfolding transitions of these thermoswitches. Through structural modifications of the thermoswitches or via addition of inexpensive DNA stabilizers, we demonstrated that we can tune the transition mid-point from 30°C to 85°C. Through multimeric and triplex clamp switch architectures, we increased the thermoswitch sensitivity and created high gain thermoswitches that displays ~3-fold higher signal gain than stem-loop thermometers. Through a combination of thermoswitches or via addition of a combination of inexpensive DNA stabilizers, we demonstrated that we can extend the linear, quantitative, dynamic range of the nanothermometer up to 45°C. These programmable thermometers display two main advantages in comparison with previously published stem-loop based thermometers.^{111,112,113} Firstly, a single switch (e.g. the tunable stem-loop switch or the tunable triplex clamp switch) can now be re-programmed and used for several applications including either precise temperature measurements within a small selected temperature window (e.g. see Fig.2.3b, Fig.2.5c-d), or for temperature measurement over wide temperatures ranges (see Fig.2.5 a-b). Another novel feature of these tunable switches is that they may be reprogrammed “on-the-fly” within minutes in a specific experimental setup via the simple addition of inexpensive DNA strands.

In addition to their nanosize, fast response time (ms-s), high reversibility, and high programmability, the simple chemistry of DNA thermostiches enables their adoption in multiple signaling format. Using FRET fluorescent pairs, for example, and a ratiometric readout, these switches appear particularly suitable for real-time temperature monitoring in the vicinity of enzymes¹²⁷ (e.g. single molecule experiments), *in vivo*^{110, 45,128} or in nano- or microfluidic devices where local temperature at nanoscale may be of crucial importance.³⁴ These switches could also be attached to various nanoparticles in order to accurately sense small temperature variations during laser-based nanosurgery¹²⁹ or magnetic hyperthermia treatments¹³⁰, where precise temperature monitoring and control would optimize treatment. The DNA thermostiches could also be adapted in an electrochemical format¹³¹ and find applications in microfluidic devices such as point-of-care PCR instruments³³ where different parts of the device need to be fixed at different precise temperatures despite temperature variations in external conditions. Electrochemical DNA thermostiches may also find applications in nanoelectronics to detect hotspots caused by defects in nanometric circuits.²⁹ Finally, these programmable thermostiches could be used to build thermosensitive structures that may find applications in the field of DNA nanomachines,¹³² drug delivery systems¹³³ and macromolecular assemblies.¹³⁴ For example, thermostiches could be incorporated into larger, drug carrying DNA devices¹³⁵⁻¹³⁷ in order to create thermally responsive systems that deliver their cargo via local temperature changes using either bodily temperature gradients or laser induced heating.^{31,138} Finally, these thermosensitive structures could also inspire the design of thermally responsive RNA strands that could be genetically encoded in mRNA to reprogram gene expression so that it is induced at various specific temperatures.^{139,140}

SUPPLEMENTARY FIGURES

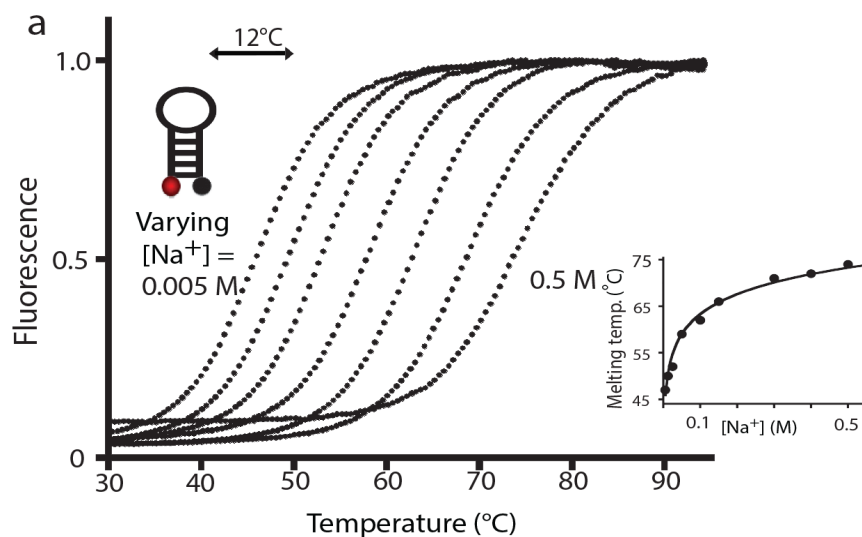


Figure 2.S1: Tuning the dynamic range of DNA nanothermometers by modifying the stability of the thermoswitches. Tuning the stability of a DNA stem-loop thermoswitch by: a) Varying salt concentration; Experiments were performed using 25 nM of 3GC stemloop in 50 mM Na₂HPO₄ and varying amounts of NaCl at pH 7.0. Inset: Variation of the transition midpoint of the 3GC stemloop with increasing sodium concentration.

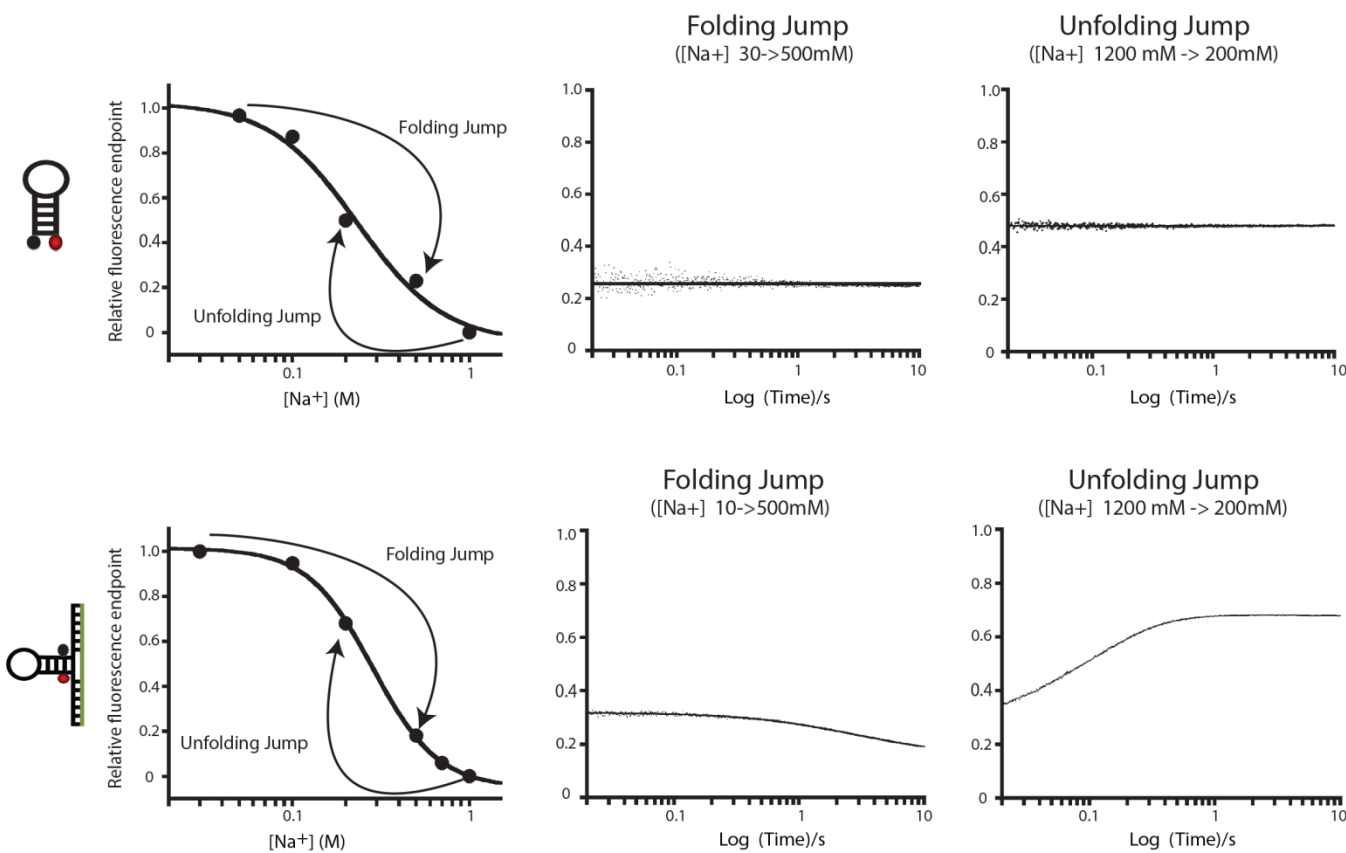


Figure 2.S2: Folding and unfolding kinetics of DNA nanothermometers. Rapid folding and unfolding jumps were obtained by rapidly (< 3 ms) changing the NaCl concentration and using a stopped-flow spectrofluorometer. Top: unimolecular 0GC stem-loop; Bottom: bimolecular tunable stemloop with a 16 base stabilizer. Unfolding was performed by rapidly diluting DNA-containing samples originally in 50 mM Na_2HPO_4 and 1.1 M NaCl phosphate to a final Na^+ concentration of 200 mM and by observing the fluorescent signal over time. Folding was performed by rapidly mixing a DNA-containing samples originally in 10 mM Na_2HPO_4 and 0.03 M NaCl phosphate to a final Na^+ concentration of 200 mM and by observing the fluorescent signal over time. The deadtime of our stopped-flow instrument was determined at around 3.2 ms.

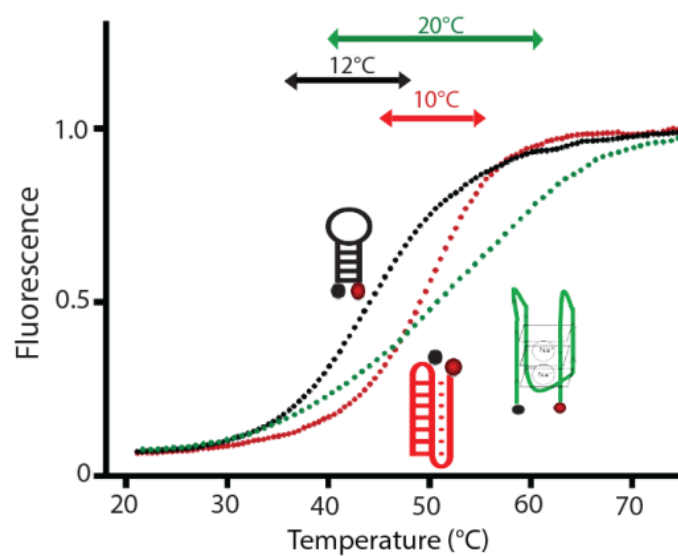


Figure 2.S3: Melting transitions of DNA duplex, triplex, and G-quadruplex thermoswitches and their dynamic ranges. See Material and Methods (Thermometer characterisation) for details about how the dynamic range is determined. Melting curves were obtained in a 50 mM Na_2HPO_4 buffer at pH 7.0 with 100 mM NaCl.

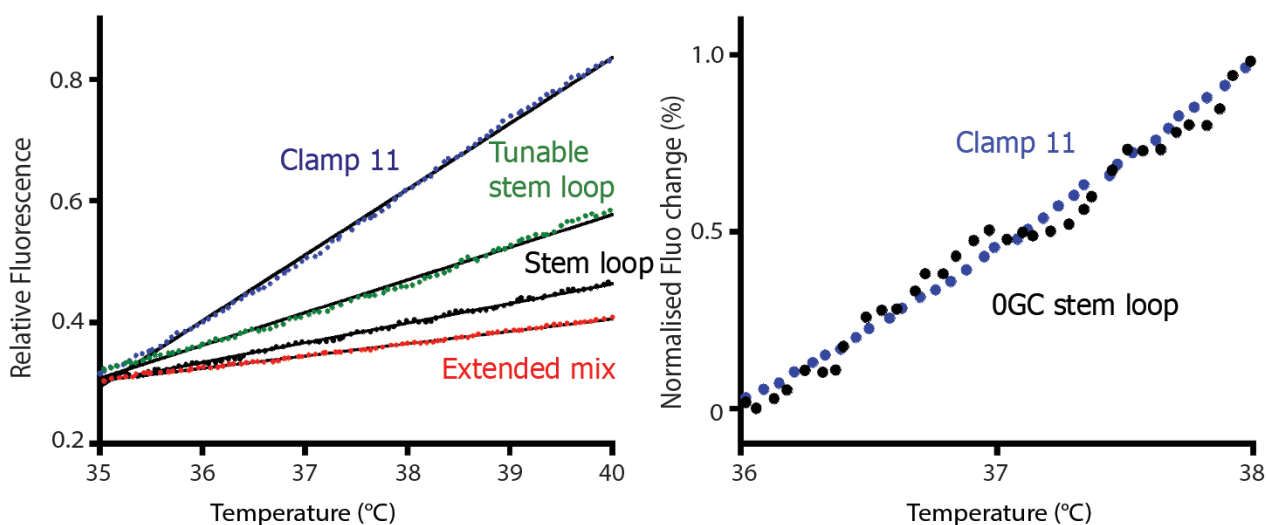


Figure 2.S4: Comparing the sensitivity of our different DNA thermometers. The ultrasensitive tunable clamp switch (blue) emits 50% of its fluorescence signal between 35-40 °C. In comparison, the tunable stem-loop (green), the OGC stem-loop (black) and the extended stemloop mix (red) emit 25%, 14%, and 8% of their total fluorescence within the same interval, respectively. For clarity, the fluorescence of the extended stem-loop mix was set equal that of the 3 other thermometers at 35 °C (reduced by 10%). The clamp switch is twice as precise as the OGC stem-loop within the 36-38° C interval ($\pm 0.05^{\circ}\text{C}$ versus $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$, respectively –see section “thermometer calibration” in Materials and Methods for precision determination). The triplex clamp switch was stabilized using the 11 base long clamp stabilizer (Clamp stabilizer 11) while the tunable stem-loop was stabilized using the 16 base long stabilizer strand (2 x 8 bases on each side with a two nucleotide spacer for a total of 16 hybridized nucleotides).

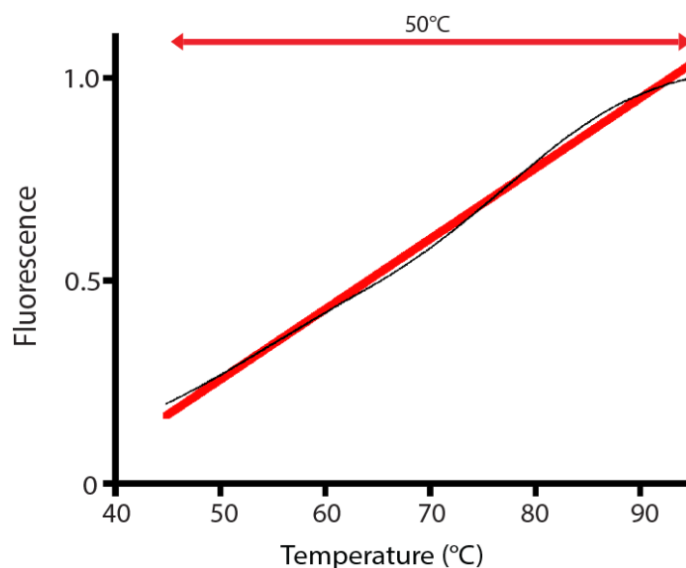


Figure 2.S5: DNA thermometer mix that responds linearly within the temperature range of typical PCR experiment (45°-95° C) (see Fig. 2.4). This DNA thermometer was engineered by using a combination of various DNA stem-loops with different stabilities (see extended thermometer Fig. 2.3a). In order to calibrate this thermometer we first performed a very slow melting experiment (1 °C/min) to make sure that the temperature inside each individual well was at the specific temperature indicated on the PCR heating block. To calibrate the thermometer within the 45°-95° C dynamic range, we used a linear fit to relate the fluorescence values inside individual wells to specific absolute temperatures. PCR experiments were performed in a 50 mM Na₂HPO₄ buffer at pH 7.0 with 300 mM NaCl.

ASSOCIATED CONTENT

Material and Methods and supplementary figures are shown in supporting information section. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Alexis Vallée-Bélisle. Laboratory of Biosensors & Nanomachines, Département de Chimie; Université de Montréal; C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada Present Addresses

†If an author's address is different than the one given in the affiliation line, this information may be included here.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. Experiments were conducted by DG.

FUNDING SOURCES

This work was supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada through Grant No. 436381-2013 (NSERC) (AVB). AVB holds the Canada Research Chair in Bioengineering & Bio-nanotechnology, Tier II. D.G. is a CREATE NSERC fellow, A.D. is a NSERC intern fellow.

2.4. Supplementary Information and experimental section

Programmable, quantitative, DNA nanothermometers

David Gareau, Arnaud Desrosiers, Alexis Vallée-Bélisle

2.4.1. DNA synthesis

Labeled and unlabeled oligonucleotide sequences were synthesized in house using a K&A Laborgeraete GbR H-8 solid support DNA synthesizer using standard phosphoramidite chemistry. Standard phosphoramidite nucleotides and the modified fluorescein (FAM) and Blackhole Quencher (BHQ-1) nucleotides were ordered from Biosearch technologies, Novato. Unlabeled DNA was purified using a reverse phase cartridge while labeled oligonucleotides were purified using a HPLC system equipped with a XBridge Oligonucleotide BEH C18, 130Å, 2.5µm, 4.6mmX50mm, 1/pkg column. The DNA thermoswitches were strategically labeled with fluorescein (FAM) and blackhole quencher (BHQ1) in either 5', 3', or internally (in the case of the triplex clamp structure and the tunable stem-loop). The internal labeling was achieved by inserting a BHQ1-modified thymine phosphoramidite at the desired nucleotide location.

All oligo sequences are indicated from 5' ->3'. INV represents a frame inversion in the DNA sequence; following this tag, the sequence adopt a 3' ->5' frame.

2.4.2. DNA sequences

Stem-loops:

0GC:FAM-TTATTGATCGGCGTTTTAAATAA-BHQ1

1GC:FAM-CTATTGATCGGCGTTTTAAATAG-BHQ1

2GC:FAM-CTCTTGATCGGCGTTTTAAAGAG-BHQ1

3GC:FAM-CTCTCGATCGGCGTTTTAGAGAG-BHQ1

4GC:FAM-CTCGGATCGGCGTTTTAGCGAG-BHQ1

5GC:FAM-CGCGGATCGGCGTTTTAGCGCG-BHQ1

Tunable stem-loop and stabilizers:

Tunable stem-loop: GGA ACC TCC CAC CTC G-(TFAM)-C TTC CTT TTT TTT TTT TTG
GAA G-(T-BHQ)-G TCC ATC GCA CGC GTG

Stabilizer 17: CACGCGT GCGATGGACATTACGAGGTGGGAGGTTCC

Stabilizer 16: ACGCGT GCGATGGACATTACGAGGTGGGAGGTTCC

Stabilizer 15: CGCGT GCGATGGACATTACGAGGTGGGAGGTT

Stabilizer 14: GCGT GCGATGGACATTACGAGGTGGGAGGT

Stabilizer 13: CGT GCGATGGACATTACGAGGTGGGAGG

Stabilizer 12: GTGCGATGGACATTACGAGGTGGGAG

Stabilizer 11: TGCGATGGACATTACGAGGTGGGA

Stabilizer 10: GCGATGGACATTACGAGGTGGG

Stabilizer 9: CGATGGACATTACGAGGTGG

Stabilizer 8: GATGGACATTACGAGGTG

Stabilizer 7: ATGGACATTACGAGGT

DNA clamp-switch with stabilizers:

Clamp switch: FAM-ATTTTCTTTTCCCCCAGTTATTATCCCCCCTTTTCTTTTG-
BHQ1

Clamp stabilizer 15: AAAAGAAAAGGGGGG

Clamp stabilizer 14: AAAAGAAAAGGGGG

Clamp stabilizer 13: AAAAGAAAAGGGG

Clamp stabilizer 12: AAAAGAAAAGGG

Clamp stabilizer 11: AAAAGAAAAGG

Clamp stabilizer 10: AAAAGAAAAG

Clamp stabilizer 9: AAAAGAAA

Clamp stabilizer 8: AAAAGAAA

Multimeric constructions:

DNA triangle part 1 (FAM-labeled): FAM-GGACTACATGTTGAACTGCAT G

DNA triangle part 2 (BHQ-labeled): BHQ-CAGGTAGATGTTTCATGCAGTTC

DNA triangle part 3: CATCTACCTGTT-INV-CCTGATGTAC

DNA square part 1 (FAM-labeled): FAM-GGACTACATGTTGAACTGCATG

DNA square part 2 (BHQ-labeled): GCATCGAGTTTTGTAGATGGAC-BHQ1

DNA square part 3 (BHQ-labeled): AACTCGATGCTTCATGCAGTTC-BHQ1

DNA square part 4: CATGTAGTCCTTGTCCATCTAC

Other sequences:

100% TAT triplex: AAAAAATT-(T-BHQ1)-ATTTTTTCTTTGTTTTTT-FAM

G-Quadruplex:FAM-TTGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT-BHQ

2.4.3. Extended thermometer mix

Extended thermometer using a mixture of stem-loops: The extended nanothermometer created using a mixture of stem-loop beacons was obtained by combining six stem-loop beacons with increasingly high melting temperature (see Fig. 2.2b for individual stem-loop behaviour). The concentration of each individual beacon in the mix was determined in order to optimise the linearity of the fluorescence output in function of temperature. The 47-92°C stem-loop beacon mix(Fig. 2.3a) is composed of 12% of 0GC, 12% 1GC, 12% of 2GC, 8% 3GC, 8% 4GC and 48% 5GC. This mix was optimised for a buffer containing 50mM of Na₂HPO₄ at pH 7.0 and 100 mM NaCl. For example, typical mix contains 25nM of 0GC, 1GC, 2GC, 17 nM of 3GC, 4GC and 100 nM of 5GC.

Extended thermometer using the tunable stem-loop and a mixture of stabilizers: The extended thermometer using a stabilizer mix and a single tunable stem-loop was optimised in the same manner as the extended stem-loop mix. However, the concentration of the different stabilizers was optimised instead of that of the thermoswitches. For example, a typical experiment to produce a extended linearly responsive tunable stem-loop mix (28-70°C) contains 25nM of tunable stem-loop along with 1.5 nM of stabilizer 9, 3.1 nM of stabilizer 11, 2.1 nM of stabilizer 12, 6.25 nM of stabilizer 14 and 12.5 nM of stabilizer 17. Experiments were done in 50mM of Na₂HPO₄at pH 7.0 and 100mM NaCl.

2.4.4. Thermometer characterization

Instruments and methods: All equilibrium experiments (Fig. 2.2-2.3) we performed using a Cary Eclipse spectrophotometer equipped with a temperature controller. Sample was typically 1 mL and contains 25 nM of the analysed DNA thermometer. Unfolding transitions were monitored using fluorescence at every 0.5 °C at a rate of 1°C/minute using $\lambda_{\text{ex.}} = 480$ nm and $\lambda_{\text{em.}} = 520$ nm. All samples were annealed prior to analysis by heating to 90°C and being cooled slowly at room temperature.

Thermometer calibration: We define the dynamic range interval of our nanothermometer as the interval of temperature during which unfolding takes place and the fluorescence signal varies linearly with the temperature. This interval is determined using a linear fit and by identifying temperature limits where the fluorescence signal deviates by more than the intrinsic precision of the thermometer (typically $\pm 0.1^\circ\text{C}$). The difference in temperature between the lowest and highest temperature points inside the linear range therefore define the dynamic range. The precision of each thermometer is determined by first calculating the average fluorescence deviation between the experimental data and the fit (or using the residual standard deviation, S_y , see eq. 1). The precision of the thermometer can then be obtained by dividing S_y by the slope of the fit (m) and by multiplying it with the corresponding T-student value for a 95% degree of confidence (see eq.2):

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum(y_{\text{obt}} - y_{\text{fit}})^2}{n-2}} \text{ (eq. 1)}$$

$$\text{Precision} = \frac{S_y}{m} t_{\text{student}} \text{ (eq. 2)}$$

Response time determination: Folding/unfolding kinetic experiments were carried out using a SX-19 stopped-flow spectrofluorometer from Applied Photophysics, UK. Folding experiments were performed by mixing 1 part of a 120nMnanothermometer solution at low ionic strength (10 mM Na^+) with 5 parts of buffer at high ionic strength (1200 mM Na^+). Unfolding experiments were performed by mixing 1 part of a 120 nM nanothermometer solution at high ionic strength (1200 mM Na^+) with 5 parts of water. Data acquisition started

3.2 ms after mixing (deadtime of the instrument) by using exciting at $\lambda_{\text{ex}}=480$ nm (± 5 nm) and by monitoring fluorescence emission at wavelength above 495 nm using a cut-off filter.

2.4.5. PCR experiments

Single PCR well temperature monitoring: PCR experiments were carried out on a Lightcycler 480 qPCR instrument by Roche. Temperature inside individual wells was determined by monitoring the relative fluorescence of a calibrated extended stem-loop mix (see extended thermometer mix) in 50 mM Na_2HPO_4 buffer at pH 7.0 with 300 mM NaCl (See Fig S4). Sample volume was 100 μL , tests showed smaller volumes had similar response times. PCR well plates used were thin walled polycarbonate plastic plates supplied by Roche. Typical PCR experiment (Fig 4a-b) consisted of five cycles of the following temperature ramps: a 60 s hold at 45°C, a ramp from 45-65°C at 0.8°C/s, a 45 s hold at 65°C, a ramp from 65-95°C at 0.8°C/s and a cooling from 95-45°C at 0.8°C/s. Temperature-jump experiments from 60 to 70°C (Fig 4c) or 70-60°C (Fig 4d) were performed by ramping the temperature of the PCR block at a rate of 1.35°C/s. Data acquisition started as soon as the PCR heating block has reached its final temperature. Fluorescence measurements were taken using $\lambda_{\text{ex}}=483$ nm $\lambda_{\text{em}}=533$ nm. Heating and cooling rates are determined by fitting the data points using an exponential decay function.

3. Conclusion

Cette section comporte deux objectifs. Dans un premier temps, elle sert à mettre en valeur les multiples avantages associés à l'utilisation de nanothermomètres à base d'ADN programmables développés en laboratoire pour le domaine de la nanothermométrie. De plus, les inconvénients de ces nanothermomètres seront également présentés afin de clarifier leur usage par rapport à d'autres nanothermomètres couramment employés. Dans un deuxième temps, une perspective personnelle conclura ce mémoire et présentera des applications potentielles pour ces nanothermomètres ainsi que les améliorations qui pourraient être apportées pour accroître leur performance dans un avenir rapproché.

3.1. Avancées induites par nos travaux

Les travaux entrepris lors de mes études de maîtrise mettent à profit le concept simple d'utiliser les transitions de phases de l'ADN en tant que nanothermomètre. Plus précisément, ils ont permis de démontrer qu'il est possible de mettre au point des séquences d'ADN marquées dont la transition de phase peut être modulée i.e. dont la plage dynamique peut être étendue ou restreinte selon le besoin. Ainsi, le manuscrit présenté ne constitue pas seulement une étude d'analyse des transitions de phase de l'ADN mais sert plutôt de guide portant sur la conception de nanothermomètres

3.1.1. Modulation rationnelle de la transition de phase

La zone de température à laquelle un nanothermomètre génère un signal variant linéairement avec la température est considérée comme la plage dynamique d'un nanothermomètre. Il avait déjà été rapporté que l'augmentation de la concentration en cations du tampon pouvait déplacer la plage dynamique d'un brin duplex vers des températures plus élevées.⁵² Nos travaux ont permis d'observer un effet similaire sur les architectures tiges-boucles (Figure 2.S1). Cependant, bien que cette approche puisse moduler la plage dynamique d'un brin d'ADN, il s'agit d'une approche indirecte qui peut même devenir problématique si l'activité ionique du milieu avoisinant varie considérablement. Une autre approche "modulatrice" documentée dans la littérature et également observée lors de nos travaux est celle de l'effet stabilisant de la substitution de bases AT par des bases GC (Figure 2.2). Comme expliqué précédemment, cette stratégie est non seulement dispendieuse, mais aussi incompatible avec certains aptamères ou biosenseurs.

Ce qui distingue nos travaux de ce qui a été rapporté auparavant est notre approche innovatrice pour moduler un ADN thermosensible à l'aide de stabiliseurs allostériques. La figure 2.2b démontre clairement qu'on peut moduler la transition d'une tige-boucle pourvue d'extrémités simples brins à l'aide de stabiliseurs de longueur variable s'hybridant à ces extrémités. Ce faisant, le stabiliseur allostérique encourage la conformation fermée de la pseudo tige-boucle. Cette stratégie de stabiliseur allostérique permet ainsi de programmer la plage dynamique d'un seul et même nanothermomètre d'ADN marqué afin qu'il présente une sensibilité optimale à différentes plages de températures. Non seulement cette stratégie est versatile mais elle est aussi abordable car le prix de synthèse d'un stabiliseur allostérique s'élève à environ 15\$ alors que la synthèse du nanothermomètre marqué peut s'élever à environ 300\$.

3.1.2. Modulation de la coopérativité et du bruit de fond d'un nanothermomètre d'ADN

Les nanothermomètres d'ADN rapportés dans la littérature utilisent tous une architecture de duplex simple¹⁴¹ ou de tige-boucle.^{63,64} Une des limitations de ce type de construction est leur coopérativité limitée i.e. que leur transition de phase s'effectue sur une plage dynamique limitée (~12°C). Cependant, si l'on désire discriminer avec précision de faibles variations de température, nous devons utiliser un thermomètre qui offre un gain de signal élevé sur des variations de température minimales, ou en d'autres termes un nanothermomètre ayant une coopérativité de transition élevée. Dans cette optique, nous avons développé une stratégie "d'agglomération" locale de charges pour améliorer la coopérativité de nos senseurs. Une étude avait déjà été publiée à propos de la haute coopérativité de transition des systèmes agglomérés d'ADN formés de plusieurs duplexes d'ADN qui relient

différentes nanoparticules d'or ensembles.¹⁴² L'agglomération de tous ces duplexes forme un réseau très dense en charges négatives qui peut entièrement se dissocier à l'intérieur d'une variation de température de 1°C. (Figure 3.1)

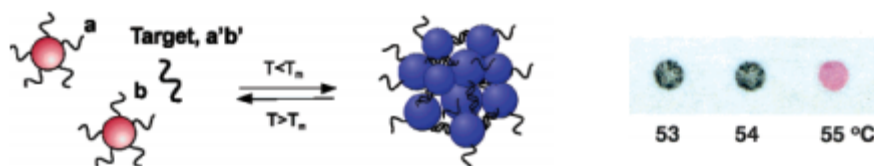


Figure 3.1 : Transition de phase extrêmement coopérative d'une agglomération d'ADN et de nanoparticules d'or¹⁴²

Selon les auteurs de cette étude, cette transition fortement coopérative serait attribuable à une réduction concomitante de la concentration de sel locale. Selon ce modèle, la dissociation d'une seule paire de bases déclenche une cascade de dissociations puisque la concentration de cations diminue localement à chaque dissociation, déstabilisant la paire de bases avoisinante. En s'inspirant de ce modèle, nous avons conçu des nanothermomètres à l'aide de deux structures d'ADN densément chargées, soit le triplex Høogstein de type «*clamp*» et les structures multimériques compactes. La construction «*triplex clamp*» consiste en un duplex unimoléculaire de 10 bases qui possède un autre brin stabilisateur d'ADN intercalé dans le sillon majeur du duplex. Le fait de rapprocher 4 brins d'ADN chargé négativement crée une structure compacte et négative qui doit être stabilisée par une grande quantité de cations. Comme démontré dans la figure 2.3, ces complexes bimoléculaires révèlent des transitions de phase de l'ordre de 7-9°C comparativement à 12-15°C pour une structure tige-boucle, en plus d'être facilement modulables à l'aide de stabilisateurs de longueur variable. Par

ailleurs, cette architecture affiche aussi un très faible bruit de fond, soit environ 8% comparativement à 12-20% pour une structure tige-boucle. Ce bruit de fond ou «*background*» résulte de la fluorescence native du couple fluorophore/extincteur (l'effet bloquant de l'extincteur n'étant efficace qu'à ~95%) et de la fluorescence provenant des nanothermomètres ayant adopté une conformation aléatoire. Ce bruit de fond peut être problématique en imagerie de fluorescence puisqu'il diminue le gain de signal et qu'il procure l'illusion d'un signal faussement positif, d'où l'importance d'utiliser des contrôles négatifs adéquats. Une transition de phase abrupte avec un signal de fond minimal, le tout joint à la capacité d'être modulé font de l'architecture «*triplex clamp*» un nanothermomètre d'ADN hautement performant et hautement versatile.

3.1.3. Conception de nanothermomètres ayant des plages dynamiques étendues

Une notion simple, non exploitée jusqu'ici dans la littérature, est celle d'utiliser les nanothermomètres d'ADN pour étudier de larges écarts de température. La plus large transition documentée pour un système d'ADN est celle des brins marqués attachés à une nanoparticule d'or du groupe Rinan, transition qui s'élève à ~17°C.¹⁴¹ Dans notre manuscrit, nous avons présenté deux stratégies pour élargir la plage dynamique des nanothermomètres d'ADN. La première approche consiste à combiner l'apport en fluorescence de plusieurs thermomètres tiges-boucles de différentes stabilités (i.e. dont le contenu en GC de la tige varie) pour créer une tendance linéaire pour couvrir une large gamme de températures (Figure 2.4). En jouant sur la concentration de chaque thermomètre, il est possible d'aligner plusieurs transitions de phase de façon à créer une émission de fluorescence linéaire sur une grande plage de température. Ainsi, la luminescence de chaque thermomètre ouvert s'additionne au prochain brin plus stable de façon séquentielle au fur et à mesure que la température

augmente. Étant donné que tous les nanothermomètres s'ouvrent de façon réversible à une température précise, une solution stock constituée de nanothermomètres à stabilité variable peut être préparée et utilisée multiples fois.

La deuxième stratégie exploite le concept de stabiliseurs allostériques pour étirer la plage dynamique du nanothermomètre. En utilisant une combinaison de brins stabiliseurs d'ADN à des concentrations spécifiques, il est possible de former des populations distinctes de nanothermomètres possédant des énergies de stabilisation différentes. Ces stabiliseurs allostériques, aussi appelés inhibiteurs, sont utilisés à faible concentration pour former une certaine population de nanothermomètres repliés, mais non hybridés à un stabiliseur. C'est cette dernière population qui permet d'observer une augmentation du signal de fluorescence à basse température. Une autre population de ces tiges-boucles, celles-ci liées à des stabiliseurs de différentes longueurs, permet quant à elle de moduler le signal de fluorescence à plus haute température. Il est à noter que cette solution constituée de plusieurs brins d'ADN est un équilibre précaire de plusieurs formes hybridées. Ainsi, il est important d'effectuer un recuit très lent avant la calibration du nanothermomètre à large étendue afin qu'il retrouve une tendance linéaire. L'avantage majeur de cette stratégie pour étendre la plage dynamique d'un nanothermomètre est son coût relativement faible puisqu'elle nécessite la synthèse d'un seul ADN doublement marqué alors que les brins allostériques sont non marqués et donc considérablement moins dispendieux.

3.2. Perspectives

Nos travaux ont permis de mettre en lumière l'utilité de l'ADN triplex et de stabiliseurs allostériques dans la nanothermométrie. En effet, les nouvelles constructions d'ADN

thermosensibles présentées dans ce mémoire sont définitivement parmi les plus performantes et les plus versatiles jamais rapportées dans la littérature. Cependant, il reste à démontrer leur utilité dans des contextes autres qu'un appareil de PCR ou un spectrophotomètre. Chaque nouvelle application implique de nouveaux paramètres à optimiser. De ce fait, certaines applications restent encore incompatibles avec les techniques présentées. Cette dernière section présente une opinion honnête du projet, ses limitations et ce qui pourrait permettre de pousser davantage l'utilité de cette nouvelle nanotechnologie.

3.2.1. Améliorations à apporter

La première contrainte majeure des nanothermomètres d'ADN est leur dépendance aux conditions ioniques et stériques. Comme présenté dans le manuscrit, la stabilité de l'ADN est grandement affectée par la concentration de cations avoisinants. Il en est de même pour l'encombrement du milieu i.e. qu'un milieu riche en protéines ou en d'autres macromolécules déstabilise le brin duplex. Effectivement, la présence de nombreuses macromolécules inhibera l'activité de solvatation de l'eau dans l'environnement local du duplex pour le déstabiliser significativement.¹⁴³ Ces contraintes ioniques et stériques deviennent une limitation majeure lors de l'application de ces thermomètres *in vivo* où il y a présence d'une grande quantité de grandes macromolécules, cations (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , etc...) et même des enzymes de désoxyribonucléase qui dégrade une séquence d'ADN en ses monomères respectifs. Une solution serait de protéger l'ADN des conditions ioniques par encapsulation. Cependant, une telle capsule devrait posséder quelques attributs essentiels: (1) isoler le nanothermomètre et lui procurer un environnement ionique constant et contrôlé, (2) ne pas se dégrader et résister aux variations de température et (3) transmettre les longueurs d'onde émises par le fluorophore. Ainsi, l'encapsulation d'ADN dans des nanoparticules de silice pourrait répondre à tous ces

critères.¹⁴⁴ Cependant, la dynamique des transitions de phases de l'ADN à l'intérieur de telles capsules pourrait varier significativement.¹⁴⁵ Récemment, certaines micelles ont été conçues pour encapsuler des molécules organiques thermosensibles et pourraient être compatibles avec nos nanothermomètres.¹⁴⁶ Ces micelles représentent une alternative intéressante puisqu'elles sont imperméables aux ions et ne se désassemblent pas à hautes températures. En somme, une méthode permettant de protéger les nanothermomètres des conditions externes, autres que la température, serait indispensable dans des applications *in vivo*.

Les nanothermomètres d'ADN souffrent d'un autre problème lors de leur mise en application en imagerie thermique. En effet, un problème courant lorsque l'on mesure l'intensité absolue dans une expérience d'imagerie de fluorescence est que la concentration de la sonde n'est pas toujours homogène. Par exemple, si les brins d'ADN s'agglomèrent ou se concentrent dans une certaine partie de l'image, l'intensité de fluorescence s'en trouvera augmentée sans être en lien avec la température locale. Il serait possible de corriger de telles erreurs en développant des nanothermomètres d'ADN qui utilisent un couple FRET au lieu d'un fluorophore/ extincteur.¹⁴⁷ Les rayons de Förster étant similaires, il faudrait simplement substituer le couple fluorophore/extincteur dans la séquence par un couple FRET. Le ratio de la fluorescence du couple permettrait ainsi d'éliminer les effets de concentration locale. L'imagerie par FRET ne date pas d'hier. En effet, elle est largement documentée dans la littérature et il existe une panoplie de travaux relatant l'utilisation de telles techniques pour détecter les interactions entre différentes protéines.¹⁴⁷ Ainsi, il serait relativement facile d'adapter ces couples FRET à nos nanothermomètres.

3.2.2. Applications potentielles et projets futurs.

Malgré les limitations citées précédemment, les nanothermomètres d'ADN montrent un certain potentiel dans les domaines de spectroscopie de molécules uniques, de PCR miniaturisé, en fluorométrie différentielle à balayage et en chimie macromoléculaire. Ces applications pourraient tirer profit de trois avantages majeurs de l'ADN : sa vitesse de réponse, sa capacité de fonctionnalisation et sa capacité à être fixé de façon covalente à une surface métallique, protéique ou autre. Par exemple, si l'on observe les dynamiques de la génération de produits par une enzyme exothermique par spectroscopie moléculaire, il serait utile d'avoir un senseur local capable de mesurer la température près de cette enzyme.¹⁴⁸ Un nanothermomètre d'ADN pourrait être fonctionnalisé et fixé sur cette enzyme (ou alternativement sur une surface près de l'enzyme immobilisée) liant la protéine d'intérêt. Il serait alors possible de suivre les fluctuations de température locales en temps réel étant donné la vitesse de réponse rapide de l'ADN. En utilisant cette stratégie, une enzyme exothermique comme la phosphatase alcaline pourrait être fonctionnalisée avec un nanothermomètre d'ADN ce qui permettrait de quantifier la libération de chaleur à l'échelle nanoscopique. Ce genre d'expérience pourrait ainsi être utilisée pour des études dynamiques de repliement protéique ou même tenter d'élucider la position du site actif de l'enzyme en effectuant une «cartographie thermique» de la structure.

Deux autres avantages de l'ADN qui peuvent être exploités sont sa stabilité et sa solubilité dans un milieu aqueux. Grâce à des caractéristiques physiques robustes, les nanothermomètres d'ADN demeurent particulièrement utiles pour caractériser la température dans des appareils de PCR. Comme mentionné dans le manuscrit, les thermomètres d'ADN sont capables de suivre des cycles de température extrêmement rapides (1.3°C/s). Évidemment, cette

méthodologie peut être transférée aux puces de PCR microfluidique comme outil de calibration, mais aussi à d'autres applications utilisant les cycles thermiques des appareils PCR à des fins analytiques. Par exemple, la fluorimétrie différentielle à balayage (DSF) a pour but d'estimer l'affinité d'une molécule pour une protéine par sa stabilité thermique.¹⁴⁹ Ceci est fait en comparant les transitions de phase des protéines avec et sans la présence de la molécule cible pour estimer si il y a présence du complexe protéine-cible. Un aspect important de cette technique est que la température doit être à l'équilibre durant chaque point de la transition pour qu'elle soit mesurée de façon exacte. Si la température à l'intérieur des puits PCR n'est pas équilibrée lors des mesures de fluorescence, la courbe pourrait être déplacée artificiellement vers de plus hautes températures et suggérer la présence d'un faux positif. Un nanothermomètre pourrait être incorporé dans un des puits pour s'assurer de la température exacte du liquide plutôt que d'utiliser la température du bloc chauffant comme référence.

Évidemment, toutes les constructions présentées précédemment pourraient potentiellement être adaptées en format électrochimique. Ces interrupteurs thermosensibles électrochimiques pourraient être incorporés à des systèmes microfluidiques ou nanoélectroniques comportant des électrodes. Il suffirait de calibrer le courant observé à un certain voltage et de le corrélérer à une augmentation de température. Cependant, il faudrait s'assurer que le solvant utilisé est compatible avec l'ADN en plus de connaître l'effet de la température sur les propriétés électrochimiques de l'échangeur oxydoréductif utilisé.

Finalement, la structure et la dynamique intrinsèque des séquences d'ADN représentent un potentiel intéressant pour la création d'interrupteurs moléculaires hautement sophistiqués. Plus précisément, les repliements d'ADN qui s'assemblent et se désassemblent de façon précise à des températures fixes pourraient potentiellement être incorporés dans des systèmes

macromoléculaires. L'assemblage deviendrait alors dynamique et pourrait accomplir une tâche précise en réponse à une température locale. On peut penser par exemple à un relargage de drogue contrôlé par la température, à un contrôleur d'ADN thermosensible assemblant deux parties d'un catalyseur qui active ou désactive le complexe à une température donnée et même à des interrupteurs pouvant ouvrir ou fermer un microcircuit électrique selon la température. Il semble que les possibilités d'utilisation des nanothermomètres d'ADN soient seulement limitées par notre imagination. Il apparaît évident que la vitesse de réponse, les fonctionnalisations diverses et la robustesse des polymères thermosensibles d'ADN seront mis à profit dans un futur rapproché pour mettre au point des nanosystèmes incorporant plusieurs autres molécules. Ainsi, nous croyons que le véritable potentiel des nanomachines d'ADN se trouve dans des applications multidisciplinaires où l'assemblage et la dynamique nanométrique programmable de l'ADN permettront de créer de nouveaux systèmes thermosensibles précédemment impossibles à concevoir.

4. Références

- 1 Hellinga, H. Rational protein design: combining theory and experiment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 10015-10017, (1997).
- 2 Mandal, S., Moudgil, M. n. & Mandal, S. K. Rational drug design. *European journal of pharmacology* 625, 90-100, (2009).
- 3 Santamaria, A. in *Nanotoxicity* 1-12 (Springer, 2012).
- 4 Toumey, C. Plenty of room, plenty of history. *Nature nanotechnology* 4, 783-784, (2009).
- 5 Drexler, K. E. Nanotechnology: from Feynman to funding. *Bulletin of Science, Technology & Society* 24, 21-27, (2004).
- 6 Feynman, R. P. There's plenty of room at the bottom. *Engineering and science* 23, 22-36, (1960).
- 7 Drexler, K. E. *Engines of creation*. (Doubleday, 1986).
- 8 Drexler, E. in *Eric Drexler's blog: Metamodern* Vol. 2015 (2009).

- 9 Corlan, A. D. Medline trend: automated yearly statistics of PubMed results for any query. *Web resource at URL: <http://dan.corlan.net/medline-trend.html>*, (2004).
- 10 Havancsak, K. in *Materials Science Forum*. 85-94 (Trans Tech Publ).
- 11 Dunphy Guzman, K. A., Taylor, M. R. & Banfield, J. F. Environmental risks of nanotechnology: National nanotechnology initiative funding, 2000-2004. *Environmental Science & Technology* 40, 1401-1407, (2006).
- 12 Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354, 56-58, (1991).
- 13 Drexler, K. E. *Nanosystems: molecular machinery, manufacturing, and computation*. (John Wiley & Sons, Inc., 1992).
- 14 Faure, B. *et al.* Dispersion and surface functionalization of oxide nanoparticles for transparent photocatalytic and UV-protecting coatings and sunscreens. *Science and Technology of Advanced Materials* 14, 023001, (2013).
- 15 Siegel, R. W. *Nanostructure Science and Technology: R & D Status and Trends in Nanoparticles, Nanostructured Materials and Nanodevices*. (Springer Science & Business Media, 1999).
- 16 Jianrong, C., Yuqing, M., Nongyue, H., Xiaohua, W. & Sijiao, L. Nanotechnology and biosensors. *Biotechnology advances* 22, 505-518, (2004).
- 17 Dastjerdi, R. & Montazer, M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: focus on anti-microbial properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 79, 5-18, (2010).
- 18 Hussain, F., Hojjati, M., Okamoto, M. & Gorga, R. E. Review article: polymer-matrix nanocomposites, processing, manufacturing, and application: an overview. *Journal of composite materials* 40, 1511-1575, (2006).
- 19 Ferrari, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer* 5, 161-171, (2005).
- 20 Nie, S., Xing, Y., Kim, G. J. & Simons, J. W. Nanotechnology applications in cancer. *Annual Review Biomedical Engineering* 9, 257-288, (2007).
- 21 Zhang, L. & Webster, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: promises for improved tissue regeneration. *Nano Today* 4, 66-80, (2009).
- 22 Seidlits, S. K., Lee, J. Y. & Schmidt, C. E. Nanostructured scaffolds for neural applications. *Nanomedicine* 3, 183-199 (2008).
- 23 Link, S. & El-Sayed, M. A. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B* 103, 4212-4217, (1999).
- 24 Frantsuzov, P. A. & Marcus, R. Explanation of quantum dot blinking without the long-lived trap hypothesis. *Physical Review B* 72, 155321, (2005).
- 25 Young, A. F. & Kim, P. Quantum interference and Klein tunnelling in graphene heterojunctions. *Nature Physics* 5, 222-226, (2009).
- 26 SantaLucia Jr, J. & Hicks, D. The thermodynamics of DNA structural motifs. *Annual Review Biophysical Biomolecular Structures*. 33, 415-440, (2004).
- 27 Rothemund, P. W. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* 440, 297-302, (2006).
- 28 Rosei, F. Nanostructured surfaces: challenges and frontiers in nanotechnology. *Journal of Physics: Condensed Matter* 16, S1373, (2004).
- 29 Shakouri, A. Nanoscale thermal transport and microrefrigerators on a chip. *Proceedings of the IEEE* 94, 1613-1638, (2006).

- 30 Jaque, D. & Vetrone, F. Luminescence nanothermometry. *Nanoscale* 4, 4301-4326, (2012).
- 31 Bergueiro, J. & Calderón, M. Thermo-responsive nanodevices in biomedical applications. *Macromolecular bioscience* 15, 183-199, (2015).
- 32 Grosse, K. L., Bae, M.-H., Lian, F., Pop, E. & King, W. P. Nanoscale Joule heating, Peltier cooling and current crowding at graphene-metal contacts. *Nature nanotechnology* 6, 287-290, (2011).
- 33 Fang, T. H. *et al.* Real-time PCR microfluidic devices with concurrent electrochemical detection. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 2131-2136, (2009).
- 34 Ellahi, R. The effects of MHD and temperature dependent viscosity on the flow of non-Newtonian nanofluid in a pipe: analytical solutions. *Applied Mathematical Modelling* 37, 1451-1467, (2013).
- 35 Wang, L., Dong, J., Ouyang, W., Wang, X. & Tang, J. Anticancer effect and feasibility study of hyperthermia treatment of pancreatic cancer using magnetic nanoparticles. *Oncology reports* 27, 719-726, (2012).
- 36 Wust, P. *et al.* Hyperthermia in combined treatment of cancer. *The lancet oncology* 3, 487-497, (2002).
- 37 Brites, C. D. *et al.* Thermometry at the nanoscale. *Nanoscale* 4, 4799-4829, (2012).
- 38 Shi, L. & Majumdar, A. Recent developments in micro and nanoscale thermometry. *Microscale Thermophysical Engineering* 5, 251-265, (2001).
- 39 Dai, Z., King, W. & Park, K. A 100 nanometer scale resistive heater-thermometer on a silicon cantilever. *Nanotechnology* 20, 095301, (2009).
- 40 Gao, Y., Bando, Y., Liu, Z., Golberg, D. & Nakanishi, H. Temperature measurement using a gallium-filled carbon nanotube nanothermometer. *Applied physics letters* 83, 2913-2915, (2003).
- 41 Su, J., Sun, M., Zhang, X., Huang, Y. & Gao, Y. Ga filled nanothermometers with high sensitivity and wide measuring range. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 12, 6397-6400, (2012).
- 42 Okabe, K. *et al.* Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nature communications* 3, 705, (2012).
- 43 Ghosh, P. & Patra, A. Understanding the influence of nanoenvironment on luminescence of rare-earth ions. *Pramana* 65, 901-907, (2005).
- 44 Kucsko, G. *et al.* Nanometre-scale thermometry in a living cell. *Nature* 500, 54-58, (2013).
- 45 Maestro, L. M. *et al.* CdSe quantum dots for two-photon fluorescence thermal imaging. *Nano letters* 10, 5109-5115, (2010).
- 46 Yang, J.-M., Yang, H. & Lin, L. Quantum dot nano thermometers reveal heterogeneous local thermogenesis in living cells. *ACS nano* 5, 5067-5071, (2011).
- 47 Hao, S., Chen, G. & Yang, C. Sensing using rare-earth-doped upconversion nanoparticles. *Theranostics* 3, 331, (2013).
- 48 Fischer, L. H., Harms, G. S. & Wolfbeis, O. S. Upconverting nanoparticles for nanoscale thermometry. *Angewandte Chemie International Edition* 50, 4546-4551, (2011).
- 49 Cadiau, A. *et al.* Ratiometric nanothermometer based on an emissive Ln³⁺-organic framework. *ACS nano* 7, 7213-7218, (2013).

- 50 Freier, S. M. & Altmann, K.-H. The ups and downs of nucleic acid duplex stability: structure-stability studies on chemically-modified DNA: RNA duplexes. *Nucleic acids research* 25, 4429-4443, (1997).
- 51 Nayak, R. K., Peersen, O. B., Hall, K. B. & Van Orden, A. Millisecond time-scale folding and unfolding of DNA hairpins using rapid-mixing stopped-flow kinetics. *Journal of the American Chemical Society* 134, 2453-2456, (2012).
- 52 Jonstrup, A. T., Fredsøe, J. & Andersen, A. H. DNA hairpins as temperature switches, thermometers and ionic detectors. *Sensors* 13, 5937-5944, (2013).
- 53 Ke, G. *et al.* L-DNA molecular beacon: A safe, stable, and accurate intracellular nanothermometer for temperature sensing in living cells. *Journal of the American Chemical Society* 134, 18908-18911, (2012).
- 54 Tyagi, S. & Kramer, F. R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature biotechnology* 14, 303-308, (1996).
- 55 Dahm, R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology* 278, 274-288, (2005).
- 56 Lodish, H. *et al.* Structure of nucleic acids. (2000).
- 57 Franklin, R. E. G., R. *Nature* 171, 740, (1953).
- 58 Drew, H., Takano, T., Tanaka, S., Itakura, K. & Dickerson, R. E. High-salt d(CpGpCpG), a left-handed Z[prime] DNA double helix. *Nature* 286, 567-573, (1980).
- 59 Vargason, J. M., Eichman, B. F. & Ho, P. S. The extended and eccentric E-DNA structure induced by cytosine methylation or bromination. *Nature Structural Biology* 7, 758-761, (2000).
- 60 Gubler, U. & Hoffman, B. J. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25, 263-269, (1983).
- 61 Williams, K. P. *et al.* Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 11285-11290, (1997).
- 62 Lu, X. J. & Olson, W. K. 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures. *Nucleic acids research* 31, 5108-5121, (2003).
- 63 Arcella, A. *et al.* Structure of triplex DNA in the gas phase. *Journal of the American Chemical Society* 134, 6596-6606, (2012).
- 64 Biffi, G., Tannahill, D., McCafferty, J. & Balasubramanian, S. Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. *Nature chemistry* 5, 182-186, (2013).
- 65 Phan, A. T. & Mergny, J. L. Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson-Crick double helix. *Nucleic Acids Research* 30, 4618-4625, (2002).
- 66 Bochman, M. L., Paeschke, K. & Zakian, V. A. DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nature Reviews Genetics* 13, 770-780, (2012).
- 67 Gehring, K., Leroy, J. L. & Gueron, M. A tetrameric DNA structure with protonated cytosine-cytosine base pairs. *Nature* 363, 561-565, (1993).
- 68 Li, T., Wang, E. & Dong, S. Potassium-lead-switched G-quadruplexes: a new class of DNA logic gates. *Journal of the American Chemical Society* 131, 15082-15083, (2009).

- 69 Forman, S. L., Fetting, J. C., Pieraccini, S., Gottarelli, G. & Davis, J. T. Toward artificial ion channels: a lipophilic G-quadruplex. *Journal of the American Chemical Society* 122, 4060-4067, (2000).
- 70 Nagatoishi, S., Nojima, T., Juskowiak, B. & Takenaka, S. A Pyrene-Labeled G-Quadruplex Oligonucleotide as a Fluorescent Probe for Potassium Ion Detection in Biological Applications. *Angewandte Chemie* 117, 5195-5198, (2005).
- 71 Elbaz, J., Wang, Z.-G., Orbach, R. & Willner, I. pH-stimulated concurrent mechanical activation of two DNA “tweezers”. A “SET– RESET” logic gate system. *Nano letters* 9, 4510-4514, (2009).
- 72 Collie, G. W. & Parkinson, G. N. The application of DNA and RNA G-quadruplexes to therapeutic medicines. *Chemical Society Reviews* 40, 5867-5892, (2011).
- 73 Seeman, N. C. Nucleic acid junctions and lattices. *Journal of theoretical biology* 99, 237-247, (1982).
- 74 Winfree, E., Liu, F., Wenzler, L. A. & Seeman, N. C. Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals. *Nature* 394, 539-544, (1998).
- 75 McMillan, R. A. Biomolecular templates: nanoparticles align. *Nature materials* 2, 214-215, (2003).
- 76 Roweis, S. *et al.* A sticker-based model for DNA computation. *Journal of Computational Biology* 5, 615-629, (1998).
- 77 Zhang, F., Nangreave, J., Liu, Y. & Yan, H. Structural DNA nanotechnology: state of the art and future perspective. *Journal of the American Chemical Society* 136, 11198-11211, (2014).
- 78 Andersen, E. S. *et al.* DNA origami design of dolphin-shaped structures with flexible tails. *ACS Nano* 2, 1213-1218, (2008).
- 79 Benson, E. *et al.* DNA rendering of polyhedral meshes at the nanoscale. *Nature* 523, 441-444, (2015).
- 80 Pinheiro, A. V., Han, D., Shih, W. M. & Yan, H. Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology. *Nature nanotechnology* 6, 763-772, (2011).
- 81 Aldaye, F. A. *et al.* Modular construction of DNA nanotubes of tunable geometry and single-or double-stranded character. *Nature nanotechnology* 4, 349-352, (2009).
- 82 McLaughlin, C. K. *et al.* Three-dimensional organization of block copolymers on “DNA-minimal” scaffolds. *Journal of the American Chemical Society* 134, 4280-4286, (2012).
- 83 Michelson, A. M. & Todd, A. R. Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3': 5'-internucleotidic linkage. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 2632, (1955).
- 84 Khorana, H. G. Total synthesis of a gene. *Science* 203, 614-625, (1979).
- 85 Matteucci, M. D. & Caruthers, M. H. Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support. *Journal of the American Chemical Society* 103, 3185-3191, (1981).
- 86 Merrifield, B. Solid phase synthesis. *Biosci Rep* 5, 353-376, (1985).
- 87 Hogrefe, R. & BioTechnologies, T. A short history of oligonucleotide synthesis. *Trilink Biotechnologies*, (2006).
- 88 Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* 31, 3406-3415, (2003).
- 89 Tyagi, S. & Kramer, F. R. Molecular beacons in diagnostics. *F1000 medicine reports* 4, (2012).

- 90 Wu, C. S. *et al.* Engineering molecular beacons for intracellular imaging. *International journal of molecular imaging* 2012, (2012).
- 91 Sauer, P. Graduate Biochemistry (PDF). (2007).
- 92 Lineweaver, H. & Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society* 56, 658-666, (1934).
- 93 Ma, B., Shatsky, M., Wolfson, H. J. & Nussinov, R. Multiple diverse ligands binding at a single protein site: A matter of pre-existing populations. *Protein science* 11, 184-197, (2002).
- 94 Vallée-Bélisle, A., Ricci, F. & Plaxco, K. W. Thermodynamic basis for the optimization of binding-induced biomolecular switches and structure-switching biosensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 13802-13807, (2009).
- 95 Porchetta, A., Vallée-Bélisle, A., Plaxco, K. W. & Ricci, F. Allosterically tunable, DNA-based switches triggered by heavy metals. *Journal of the American Chemical Society* 135, 13238-13241, (2013).
- 96 Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B. SELEX—a (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular engineering* 24, 381-403, (2007).
- 97 Vallée-Bélisle, A., Ricci, F., Uzawa, T., Xia, F. & Plaxco, K. W. Bioelectrochemical switches for the quantitative detection of antibodies directly in whole blood. *Journal of the American Chemical Society* 134, 15197-15200, (2012).
- 98 Idili, A., Vallée-Bélisle, A. & Ricci, F. Programmable pH-triggered DNA nanoswitches. *Journal of the American Chemical Society* 136, 5836-5839, (2014).
- 99 Shakouri, B. A. Nanoscale Thermal Transport on a chip, *Proceedings of the IEEE*, 94, 1613-1638 (2006)
- 100 Nenna, G. *et al.* A Study on Thermal Degradation of Organic LEDs Using IR Imaging. *Macromolecular Symposia* 247, 326-332, (2007).
- 101 Zhang, C. & Xing, D. Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends. *Nucleic acids research* 35, 4223-4237, (2007).
- 102 Schroeder, A. *et al.* Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nature reviews. Cancer* 12, 39-50, (2012).
- 103 Vetrone, F. *et al.* Temperature sensing using fluorescent nanothermometers. *ACS nano* 4, 3254-3258, (2010).
- 104 Fischer, L. H., Harms, G. S. & Wolfbeis, O. S. Upconverting nanoparticles for nanoscale thermometry. *Angewandte Chemie International Edition English* 50, 4546-4551, (2011).
- 105 Brites, C. D. *et al.* Ratiometric highly sensitive luminescent nanothermometers working in the room temperature range. Applications to heat propagation in nanofluids. *Nanoscale* 5, 7572-7580, (2013).
- 106 Zhu, H. *et al.* Responsive fluorescent Bi(2)O(3)@PVA hybrid nanogels for temperature-sensing, dual-modal imaging, and drug delivery. *Biomaterials* 33, 3058-3069, (2012).
- 107 Kucsko, G. *et al.* Nanometre-scale thermometry in a living cell. *Nature* 500, 54-58, (2013).

- 108 Ye, F. *et al.* Ratiometric temperature sensing with semiconducting polymer dots. *Journal of the American Chemical Society* 133, 8146-8149, (2011).
- 109 Okabe, K. *et al.* Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nature communications* 3, 705, (2012).
- 110 Donner, J. S., Thompson, S. A., Kreuzer, M. P., Baffou, G. & Quidant, R. Mapping intracellular temperature using green fluorescent protein. *Nano letters* 12, 2107-2111, (2012).
- 111 Ke, G. *et al.* L-DNA molecular beacon: a safe, stable, and accurate intracellular nano-thermometer for temperature sensing in living cells. *Journal of the American Chemical Society* 134, 18908-18911, (2012).
- 112 Jonstrup, A. T., Fredsoe, J. & Andersen, A. H. DNA hairpins as temperature switches, thermometers and ionic detectors. *Sensors* 13, 5937-5944, (2013).
- 113 Gao, J., Liu, H. & Kool, E. T. Assembly of the complete eight-base artificial genetic helix, xDNA, and its interaction with the natural genetic system. *Angewandte Chemie International Edition English* 44, 3118-3122, (2005).
- 114 Vallee-Belisle, A. & Plaxco, K. W. Structure-switching biosensors: inspired by Nature. *Current opinion in structural biology* 20, 518-526, (2010).
- 115 Mura, S., Nicolas, J. & Couvreur, P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature materials* 12, 991-1003, (2013).
- 116 Kortmann, J. & Narberhaus, F. Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nature reviews. Microbiology* 10, 255-265, (2012).
- 117 Ricci, F., Vallee-Belisle, A., Porchetta, A. & Plaxco, K. W. Rational design of allosteric inhibitors and activators using the population-shift model: in vitro validation and application to an artificial biosensor. *Journal of the American Chemical Society* 134, 15177-15180, (2012).
- 118 Nayak, R. K., Peersen, O. B., Hall, K. B. & Van Orden, A. Millisecond time-scale folding and unfolding of DNA hairpins using rapid-mixing stopped-flow kinetics. *Journal of the American Chemical Society* 134, 2453-2456, (2012).
- 119 Doluca, O., Withers, J. M. & Filichev, V. V. Molecular engineering of guanine-rich sequences: Z-DNA, DNA triplexes, and G-quadruplexes. *Chemical reviews* 113, 3044-3083, (2013).
- 120 Rachwal, P. A. & Fox, K. R. Quadruplex melting. *Methods* 43, 291-301, (2007).
- 121 Idili, A., Vallee-Belisle, A. & Ricci, F. Programmable pH-triggered DNA nanoswitches. *Journal of the American Chemical Society* 136, 5836-5839, (2014).
- 122 Greschner, A. A., Toader, V. & Sleiman, H. F. The role of organic linkers in directing DNA self-assembly and significantly stabilizing DNA duplexes. *Journal of the American Chemical Society* 134, 14382-14389, (2012).
- 123 Bergueiro, J. & Calderon, M. Thermoresponsive Nanodevices in Biomedical Applications. *Macromolecular bioscience*, (2014).
- 124 Vallée-Bélisle, A., Ricci, F. & Plaxco, K. W. Engineering biosensors with extended, narrowed, or arbitrarily edited dynamic range. *Journal of the American Chemical Society* 134, 2876-2879, (2012).
- 125 Porchetta, A., Vallée-Bélisle, A., Plaxco, K. W. & Ricci, F. Using distal-site mutations and allosteric inhibition to tune, extend, and narrow the useful dynamic range of

- aptamer-based sensors. *Journal of the American Chemical Society* 134, 20601-20604, (2012).
- 126 Niesen, F. H., Berglund, H. & Vedadi, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature protocols* 2, 2212-2221, (2007).
- 127 Riedel, C. *et al.* The heat released during catalytic turnover enhances the diffusion of an enzyme. *Nature* 517, 227-230, (2015).
- 128 Kiyonaka, S. *et al.* Validating subcellular thermal changes revealed by fluorescent thermosensors. *Nature methods* 12, 801-802, (2015).
- 129 Boulais, E., Lachaine, R., Hatef, A. & Meunier, M. Plasmonics for pulsed-laser cell nanosurgery: Fundamentals and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 17, 26-49, (2013).
- 130 Martinez-Boubeta, C. *et al.* Learning from nature to improve the heat generation of iron-oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia applications. *Scientific reports* 3, 1652, (2013).
- 131 Fan, C., Plaxco, K. W. & Heeger, A. J. Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 9134-9137, (2003).
- 132 Bath, J. & Turberfield, A. J. DNA nanomachines. *Nature nanotechnology* 2, 275-284, (2007).
- 133 Okano, T., Bae, Y., Jacobs, H. & Kim, S. Thermally on-off switching polymers for drug permeation and release. *Journal of Controlled Release* 11, 255-265, (1990).
- 134 Zhuang, J., Gordon, M. R., Ventura, J., Li, L. & Thayumanavan, S. Multi-stimuli responsive macromolecules and their assemblies. *Chemical Society Reviews* 42, 7421-7435, (2013).
- 135 Andersen, E. S. *et al.* Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature* 459, 73-76, (2009).
- 136 Edwardson, T. G., Carneiro, K. M., McLaughlin, C. K., Serpell, C. J. & Sleiman, H. F. Site-specific positioning of dendritic alkyl chains on DNA cages enables their geometry-dependent self-assembly. *Nature chemistry* 5, 868-875, (2013).
- 137 Douglas, S. M., Bachelet, I. & Church, G. M. A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. *Science* 335, 831-834, (2012).
- 138 Schmaljohann, D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* 58, 1655-1670, (2006).
- 139 Neupert, J., Karcher, D. & Bock, R. Design of simple synthetic RNA thermometers for temperature-controlled gene expression in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* 36, e124, (2008).
- 140 Chang, A. L., Wolf, J. J. & Smolke, C. D. Synthetic RNA switches as a tool for temporal and spatial control over gene expression. *Current opinion in biotechnology* 23, 679-688, (2012).
- 141 Ebrahimi, S., Akhlaghi, Y., Kompany-Zareh, M. & Rinnan, Å. Nucleic acid based fluorescent nanothermometers. *ACS nano* 8, 10372-10382, (2014).
- 142 Jin, R., Wu, G., Li, Z., Mirkin, C. A. & Schatz, G. C. What controls the melting properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies? *Journal of the American Chemical Society* 125, 1643-1654, (2003).

- 143 Nakano, S.-i., Karimata, H., Ohmichi, T., Kawakami, J. & Sugimoto, N. The effect of
molecular crowding with nucleotide length and cosolute structure on DNA duplex
stability. *Journal of the American Chemical Society* 126, 14330-14331, (2004).
- 144 Kapusuz, D. & Durucan, C. Synthesis of DNA-encapsulated silica elaborated by sol-
gel routes. *Journal of Materials Research* 28, 175-184, (2013).
- 145 Knowles, D., LaCroix, A. S., Deines, N. F., Shkel, I. & Record, M. T. Separation of
preferential interaction and excluded volume effects on DNA duplex and hairpin
stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 12699-12704, (2011).
- 146 Zhegalova, N. G., Dergunov, S. A., Wang, S. T., Pinkhassik, E. & Berezin, M. Y.
Design of Fluorescent Nanocapsules as Ratiometric Nanothermometers. *Chemistry-A
European Journal* 20, 10292-10297, (2014).
- 147 Jares-Erijman, E. A. & Jovin, T. M. FRET imaging. *Nature biotechnology* 21, 1387-
1395, (2003).
- 148 Schuler, B. & Hofmann, H. Single-molecule spectroscopy of protein folding
dynamics—expanding scope and timescales. *Current opinion in structural biology* 23,
36-47, (2013).
- 149 Johnson, C. M. Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and
stability. *Archives of biochemistry and biophysics* 531, 100-109, (2013).

