



Développement de nouvelles stratégies de génotypage sanguin à l'aide de nanoparticules composites super luminescentes

Mémoire

Olivier Ratelle

Maîtrise en Chimie
Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Olivier Ratelle, 2014

Résumé

Afin de veiller à la sécurité des patients lors de transfusions sanguines, les banques de sang doivent tester les donneurs et les receveurs afin de s'assurer de la compatibilité du sang. Les méthodes de génotypage sanguin utilisées à l'heure actuelle sont complexes et fastidieuses ne permettant pas la caractérisation complète de tous les dons de sangs.

Ce projet vise le développement de nouvelles stratégies de génotypage sanguin à l'aide de nanoparticules composites super luminescentes. Ce type de biocapteur pourrait être utilisé afin de faciliter ces opérations en offrant une méthode qui permettrait d'éviter l'étape d'amplification enzymatique qui limite la cadence des analyses. Ce faisant, elle serait beaucoup plus rapide et moins coûteuse que les méthodes traditionnelles. Dans ce mémoire, les différentes étapes de la synthèse de nanoparticules cœur-coquille fluorescentes, la fonctionnalisation de surface ainsi que la caractérisation des performances analytiques du système développé seront abordées.

Les nanoparticules utilisées sont formées d'un cœur d'argent afin d'exploiter leurs propriétés plasmoniques. Elles sont ensuite recouvertes d'une couche de silice qui permet de rehausser la stabilité de la suspension colloïdale et qui peut être dopée avec des fluorophores. Par la suite, des brins d'ADN sonde sont greffés à la surface des nanoparticules afin de capturer spécifiquement les cibles d'ADN complémentaires, une tâche qui sera facilitée par la surface de silice des nanoparticules qui donne accès à plusieurs stratégies de fonctionnalisation utilisant la chimie des silanes. Pour terminer, un polymère transducteur est couplé à la sonde d'ADN et permet la reconnaissance de la réaction d'hybridation par un mécanisme de transfert d'énergie résonant (FRET, «*Förster Resonant Energy Transfer*»).

Abstract

To ensure patient safety during blood transfusions, blood banks must test donors and receivers to ensure the compatibility of blood. Blood genotyping methods used presently are complex and fastidious and do not allow the complete characterization of all donated blood.

This project involves the development of new strategies for blood genotyping using super luminescent composites nanoparticles. Such biosensors could be used to facilitate these operations by providing a method that would avoid the enzymatic amplification step which limits the analysis throughput. In doing so, it would be much faster and cheaper than traditional methods. In this master's essay, the synthesis of core-shell fluorescent nanoparticles, surface functionalization and characterization of the colloids will be presented. Also, the analytical performance of the system developed will be discussed.

The nanoparticles are made of a silver core in order to exploit their plasmonic properties. Thereafter, they are covered with a silica layer doped with fluorophores by using a modified Stöber method in order to be stable and fluorescent. Subsequently, DNA single stranded probes are grafted to the surface of these nanoparticles to specifically capture the complementary DNA targets, a task that will be facilitated by the silica surface which provides access to a range of functionalization strategies using silane chemistry. Finally, a polymer transducer is complexed to the DNA probe and allows recognition of hybridization by Förster Resonant Energy Transfer (FRET).

Table des matières

Résumé	III
Abstract.....	V
Table des matières.....	VII
Liste des figures et tableaux.....	IX
Liste d'abréviations.....	XIII
Épigraphe	XV
Dédicace	XVI
Remerciements.....	XVII
Introduction	1
Chapitre 1: Partie théorique.....	3
1.1 Fluorescence[19, 20].....	3
1.1.1 Mécanisme de la fluorescence.....	4
1.1.2 Temps de vie et rendement quantique de fluorescence.....	5
1.1.3 Extinction de la fluorescence.....	6
1.2 RET (« Resonance Energy Transfer »).....	7
1.3 Plasmonique [26-28].....	8
1.3.1 Effets d'un plasmon sur les fluorophores.....	9
1.3.2 Paramètres modifiant la fréquence plasmonique.....	12
1.3.2.1 Type de métal	12
1.3.2.2 Forme et taille des nanoparticules[32, 33].....	13
1.4 Théorie sur la synthèse et la stabilité des nanoparticules	15
1.4.1 Synthèse de colloïdes métalliques.....	15
1.4.1.1 Réduction d'un sel d'argent par le citrate	17
1.4.2 Synthèse de la couche de silice	18
1.4.3 Fonctionnalisation de la surface des biocapteurs avec des silanes.....	19
1.4.4 Théorie DLVO (stabilité colloïdale).....	20
1.5 Méthodes de caractérisation du biocapteur	22
1.5.1 Spectrofluorimètre.....	22
1.5.2 Spectrofluorimètre à temps de vie.....	23
1.5.3 Spectromètre UV-Vis.....	23
1.5.4 Microscopie en champ sombre et microscopie de fluorescence.....	24
1.5.5 Potentiel Zéta	26
1.5.6 Microscopie électronique en transmission	27
1.5.7 Spectrométrie d'émission atomique par torche à plasma.....	27
1.6 L'acide désoxyribonucléique (ADN)	28
1.7 Méthode de détection de l'ADN	30
1.7.1 Réaction d'hybridation	30
1.7.2 Transducteur polymérique	31
1.7.3 Utilisation de nanoparticules Ag@SiO ₂	33
1.7.4 Cytométrie à flux.....	34

Chapitre 2: Les nanoparticules utilisées (synthèse et caractérisation)	37
2.1 Introduction sur l'architecture utilisée	37
2.1.1 Architecture plasmonique de type multicouche.....	37
2.1.2 Nouvelle architecture plasmonique.....	38
2.2 Synthèse et caractérisation du biocapteur.....	38
2.2.1 Le cœur métallique.....	38
2.2.2 La couche de silice en une étape.....	40
2.2.2.1 Couche de silice pure.....	40
2.2.2.2 Couche de silice fluorescente.....	41
2.2.3 Caractérisation physique et spectrale des colloïdes.....	44
2.2.3.1 Potentiel Zêta.....	44
2.2.3.2 Caractérisation par TEM (Microscopie électronique)	44
2.2.3.3 Caractérisation par fluorescence	46
2.2.3.4 Rendement d'incorporation de l'éosine dans la couche de silice.....	46
2.2.3.5 Dosage des nanoparticules par ICP-AES.....	47
2.2.4 Facteur d'exaltation plasmonique.....	48
2.2.4.1 Dissolution des cœurs métalliques	48
2.2.4.2 Mesure de l'exaltation plasmonique par mesures de temps de vie.....	50
2.2.4.3 Mesures de l'exaltation plasmonique par fluorescence en régime stationnaire (steady-state).....	51
2.2.5 Fonctionnalisation de surface des biocapteurs.....	51
2.2.5.1 Fonctionnalisation de la surface de silice.....	51
2.2.5.2 Dérivatisation des oligonucléotides	53
2.2.5.3 Greffage des oligonucléotides à la surface des nanoparticules	55
2.2.5.4 Préparation des nanoparticules Ag@SiO ₂ -ssADN-Polymère	56
2.3 Conclusion partielle.....	58
Chapitre 3: Détection d'ADN et résultats	59
3.1 Détection d'ADN.....	59
3.2 Résultats de détection d'oligonucléotides synthétiques	60
3.3 Résultats de détection d'ADN génomique.....	63
3.4 Conclusion partielle.....	66
Chapitre 4: Autres manipulations	67
4.1 Incorporation de fluorophores différents dans la couche de silice	67
4.2 Fonctionnalisation de surface	69
4.2.1 Greffage de groupements amine.....	69
4.2.2 Greffage de groupements acide carboxylique.....	70
4.3 Synthèse de nanoparticules d'argent faiblement polydisperses par «seed-growth».....	71
4.3.1 Synthèse des germes de départ.....	72
4.3.2 Synthèse des cœurs d'argent de 30 nm de diamètre	74
4.3.3 Synthèse des cœurs d'argent de 45 nm de diamètre	76
4.3.4 Couche de silice.....	77
4.3.5 Couche de silice fluorescente.....	80
4.4 Conclusion partielle.....	82
Conclusion	83
Bibliographie	85
Annexe	91
Liste des produits chimiques utilisés	91

Liste des figures et tableaux

Figure 1: a) Exemples de fluorophores couvrant le domaine spectral du visible. b) Spectre d'excitation et d'émission de l'anthracène avec l'exemple typique de l'effet "image miroir" entre l'excitation et l'émission[19].	3
Figure 2: Diagramme de Perrin-Jablonski représentant les différents mécanismes possibles suite à l'absorption de la lumière par un chromophore[20, 21].	4
Figure 3: Diagramme de Jablonski simplifié (gauche) et équations du rendement quantique et du temps de vie (droite)[19].	5
Figure 4: Distinction entre l'extinction de fluorescence dynamique et statique[22].	7
Figure 5: a) Critères d'obtention du FRET : a) recouvrement de la bande d'émission du donneur et de la bande d'excitation de l'accepteur; b et c) effet de la distance entre le donneur et l'accepteur [25].	8
Figure 6: Schéma d'un plasmon de surface localisé sur une nanoparticule sphérique métallique[28].	9
Tableau 1: Coefficient de diffusion calculé (C_{scat}) et diffusion relative pour des nanoparticules de 30 nm de diamètre ayant différentes compositions[29].	9
Figure 7: Représentation des vecteurs du champ électrique de la lumière autour d'un colloïde métallique pour une longueur d'onde plus grande que la longueur d'onde plasmonique (gauche) et égale à la longueur d'onde plasmonique (droite)[27].	10
Figure 8: Diagramme de Jablonski (gauche) et équations du temps de vie et du rendement quantique (droite) pour un fluorophore à proximité d'une structure plasmonique[26].	10
Figure 9 : Intensité de fluorescence d'un fluorophore à proximité d'une particule métallique en fonction de la distance (k_m : vitesse d'émission non radiative, E_m : champ électromagnétique à la surface, Γ_m : vitesse d'émission radiative due à la présence du métal.)[30].	11
Figure 10: Intensité de fluorescence en fonction de la position du plasmon (LSPR) pour différents fluorophores a) Alexa Fluor 488 b) Alexa Fluor 532 c) Rhodamine Red (les spectres d'excitation/émission sont représentés pour chaque espèce)[31].	12
Figure 11: Facteur de qualité (Q) du plasmon en fonction de la longueur d'onde pour différents métaux. Un Q élevé signifie un plasmon fort et un coefficient de diffusion élevé[32].	13
Figure 12: Spectres théoriques calculés à partir de la théorie de Mie pour des nanoparticules d'argent sphériques de a) 40 nm et b) 140 nm de diamètre. Les spectres d'extinction (noir), de diffusion (vert) et d'absorption (rouge) sont représentés[32].	14
Figure 13: Position du plasmon en fonction de la forme des nanoparticules d'argent. Spectres d'extinction (noir), de diffusion (bleu) et d'absorption (rouge) calculés[33].	14
Figure 14: Schémas des différentes étapes de formation des nanoparticules métalliques en fonction du temps (gauche) et effet de la vitesse de nucléation sur la polydispersité des particules (droite)[34, 35].	15
Figure 15: Schéma de l'effet a) d'une nucléation lente et b) rapide sur la polydispersité des nanoparticules[36].	16
Figure 16: Schéma du murissement d'Ostwald[37]	16
Figure 17: Mécanisme d'oxydation du citrate et de réduction de l'argent[32, 39].	17
Figure 18: a) Exaltation d'une molécule fluorescente de Cy5.5 sur des nanoparticules d'argent de tailles différentes (expérimentale)[40]. b) Exaltation plasmonique d'un fluorophore sur des nanoparticules d'argent de tailles différentes (théorique)[41].	18
Figure 19: Mécanisme de greffage d'un silane fonctionnel sur une surface de silice [45].	20
Figure 20: L'énergie d'interaction nette est la somme de l'attraction de Van der Waals et de la répulsion électrostatique. La barrière d'énergie représente la stabilité colloïdale[46].	21

Figure 21: Schéma représentant les deux types de stabilisation colloïdale: a) stabilisation stérique b) stabilisation électrostatique[46].....	21
Figure 22: a) Différentes sections du spectrofluorimètre Jobin-Yvon Fluorolog 3 utilisé dans ce travail. b) Schéma des différentes composantes du spectrofluorimètre[21].....	22
Figure 23: Représentation schématique du principe du TCSPC (gauche) et histogramme du nombre de photons reçus en fonction du temps ayant la forme d'une exponentielle décroissante (droite)[47].....	23
Figure 24: a) Schéma de l'appareil UV-Vis Cary-50 utilisé[48].....	24
Figure 25: Représentation schématique de l'optique d'un microscope en champ sombre.....	25
Figure 26: Représentation schématique de la microscopie de fluorescence[49].....	25
Figure 27: Représentation schématique du potentiel Zêta[50].....	26
Figure 28: Représentation schématique des différents composants de l'ADN[52].....	28
Figure 29: a) Appariation Watson-Crick (A-T, C-G) des paires de bases grâce aux ponts hydrogène. b) représentation schématique de la double hélice d'ADN[52].....	29
Figure 30: Représentation d'un gène dans l'ADN[53].....	29
Figure 31: Schéma de l'hybridation entre une séquence d'ADN sonde et une séquence d'ADN cible complémentaire par l'appariement Watson-Crick des paires de base (G-C, A-T)[52].....	30
Figure 32: a) Spectres d'absorption UV-Vis du polymère dans sa forme planaire (rouge) et non planaire (bleu). b) Schéma du changement de la conformation du polymère et effet sur sa fluorescence[16].....	32
Figure 33: Illustration du procédé de transduction de l'hybridation d'ADN à l'aide du polymère cationique[16].	32
Figure 34: Spectre d'absorption du polymère (noir) et d'extinction des nanoparticules d'argent (rouge) utilisées dans ce travail[56].	33
Figure 35: Spectre de fluorescence du polymère adsorbé sur des nanoparticules Ag@SiO ₂ (bleu), sur des nanocoquilles de silice (rouge) et sur des nanoparticules de silice (noir)[56].....	34
Figure 36: a) Cytomètre à flux Partec Cyflow ML. b) Schéma optique d'un cytomètre à flux.	35
Figure 37: Architecture plasmonique multicouche.	37
Figure 38: Architecture simplifiée utilisée dans le cadre de ce travail.	38
Figure 39: Schéma de synthèse des nanoparticules d'argent (image provenant d'un microscope électronique à balayage).	39
Figure 40: Spectres d'extinction UV-Vis de colloïdes d'argent préparés à l'aide de a) la méthode tirée de la littérature[38], et b) de la méthode inverse développée au laboratoire.....	39
Figure 41: Schéma de synthèse de la couche de silice pure.....	41
Figure 42: Spectres d'extinction UV-Vis normalisés de NPs Ag et de NPs Ag@SiO ₂ sans et avec agrégation.....	41
Figure 43: Schéma de synthèse du précurseur silane fluorescent (APTES:EtTC; 3:1).	42
Figure 44: Schéma de synthèse du précurseur silane fluorescent (APTES:EtTC; 1,2:1).....	43
Figure 45: Schéma réactionnel de la synthèse de la couche de silice fluorescente.	43
Figure 46: a) Potentiel Zêta (MES pH=6,5) pour les nanoparticules Ag@SiO ₂ -EtTC faites en une seule étape. APS-EtTC 3:1 (bleu) et APS-EtTC 1,2:1 (vert). b) Schéma d'une nanoparticule avec des groupements -NH ₂ libres entre pH 6-7.....	44
Figure 47: a) Distribution de taille des nanoparticules d'argent mesurée par TEM d'un échantillon typique. b) Épaisseur de la silice en fonction de l'ajout de précurseur silane fluorescent mesurée par TEM. c) Images TEM pour un échantillon ne contenant pas d'APS-Eitc (haut) et contenant 3,3 µM d'APS-Eitc (bas).....	45

<i>Figure 48: Image TEM d'un échantillon (4,5 μM) contenant trop de précurseur silane fluorescent. Les flèches rouges indiquent des défauts dans la silice formée.</i>	45
<i>Figure 49: a) Spectres de fluorescence typiques des nanoparticules Ag@SiO₂-Éosine b) Intensité de fluorescence de plusieurs répliques en fonction de la concentration de précurseur fluorescent ajouté.</i>	46
<i>Figure 50: Schéma d'hydrolyse de la couche de silice et dissolution du cœur métallique afin de relarguer les espèces fluorescentes.</i>	47
<i>Figure 51: Dosage des nanoparticules par ICP-AES. Concentration moyenne (bleu) et rendement moyen de la réaction (vert) pour différents ajouts d'APS-EiTC.</i>	47
<i>Figure 52: Différents mécanismes de dissolution des cœurs d'argent[66].</i>	48
<i>Figure 53: a) Spectres d'extinction UV-Vis des nanoparticules Ag@SiO₂-EiTC avant l'ajout de cyanure (bleu) et après l'ajout de cyanure (vert). Encadré : spectre d'absorption de l'éosine. b) Image TEM des nanocoquilles de silice après la dissolution du cœur d'argent.</i>	49
<i>Tableau 2: Mesures de temps de vie de fluorescence de l'éosine avant et après la dissolution du cœur par KCN 1 mM pour les nanoparticules synthétisées avec 3,3 μM d'éosine. Le temps de vie de l'éosine libre en solution dans un tampon MES pH=6,5 avec et sans KCN est aussi présenté (τ = temps de vie, χ^2=coefficient de corrélation).</i>	50
<i>Figure 54: Mesures de temps de vie de fluorescence de l'éosine avant et après la dissolution du cœur par KCN 1 mM pour un échantillon synthétisé à partir de 3,3 μM d'éosine ainsi que de l'éosine libre en solution dans un tampon MES pH=6,5 avec et sans KCN.</i>	50
<i>Figure 55: Facteur d'exaltation plasmonique (EP) mesuré par fluorimétrie en régime stationnaire pour les nanoparticules étudiées dans le cadre de ces travaux.</i>	51
<i>Figure 56: Schéma réactionnel de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules Ag@SiO₂ avec des groupements -SH.</i>	52
<i>Figure 57: Agent de couplage hétérobifonctionnel utilisé afin de greffer les sondes ADN simple brin sur les nanoparticules[73].</i>	53
<i>Figure 58: Schéma réactionnel de l'ADN avec l'agent de couplage hétérobifonctionnel SMCC.</i>	53
<i>Figure 59: a) Image de fluorescence du gel de polyacrylamide (P: réaction ADN-SMCC. N: ADN non réagi). b) intensité de fluorescence en fonction de la distance de migration.</i>	55
<i>Figure 60: Schéma réactionnel entre les nanoparticules Ag@SiO₂-SH et l'ADN-SMCC.</i>	56
<i>Figure 61: Spectre de fluorescence de l'ADN-Cy5.5 sur les nanoparticules Ag@SiO₂-Éosine.</i>	56
<i>Figure 62: Schéma réactionnel entre les nanoparticules Ag@SiO₂-ssADN et le polymère cationique.</i>	57
<i>Figure 63: Spectres d'excitation et d'émission du polymère ainsi que de l'éosine, relativement aux raies d'émission des sources laser (lignes verticales) et les bandes de transmission des canaux FL1 et FL8 (zones verte et orange).</i>	59
<i>Tableau 3: Différentes séquences d'ADN utilisées lors de ces travaux (PC: parfaitement complémentaire, SNP: une paire de base non complémentaire, NC: non complémentaire).</i>	60
<i>Figure 64: Schéma des paramètres expérimentaux pour l'hybridation des oligonucléotides synthétiques.</i>	60
<i>Figure 65: Graphiques obtenus avec l'appareil CyFlow ML a) en absence de cibles complémentaires et b) avec l'ajout de 1 μM de cibles parfaitement complémentaires (PC) au biocapteur.</i>	61
<i>Figure 66: Analyse en triplicata de brins d'oligonucléotides à une concentration de 1 nM à partir du canal de fluorescence FL8 (PC: parfaitement complémentaire, NC: non complémentaire).</i>	62
<i>Figure 67: Analyse en triplicata de brins d'oligonucléotides à une concentration de 1 nM. a) Graphiques du canal de fluorescence FL8 en fonction de la diffusion latérale. b) Données de fluorescence moyenne du canal FL8 (PC: parfaitement complémentaire, SNP: une paire de base non complémentaire).</i>	62

<i>Figure 68: Analyse en triplicata de brins d'oligonucléotides à une concentration de 100 pM en présence de 1 μM d'amplicons à partir du canal de fluorescence FL8 (PC: parfaitement complémentaire, SNP: 1 paire de base non complémentaire).....</i>	<i>63</i>
<i>Figure 69: Schéma d'extraction de l'ADN d'un échantillon sanguin à l'aide d'une trousse QIAGEN QIAamp DNA mini kit[75].....</i>	<i>63</i>
<i>Figure 70: Illustration de la procédure utilisée pour l'analyse de l'ADN génomique.</i>	<i>64</i>
<i>Figure 71: Rampe de température utilisée pour les étapes de dénaturation et d'hybridation.....</i>	<i>64</i>
<i>Figure 72: Intensité des signaux mesurés pour 4 échantillons de sang inconnus (triplicata).</i>	<i>65</i>
<i>Tableau 4: Identification des échantillons (séquence déterminée par PCR, concentration d'ADN déterminée avec un NanoDrop ThermoScientific).</i>	<i>65</i>
<i>Figure 73: a) Test statistique de Student sur les échantillons de sang réel. b) Définition d'un diagramme en boîte à moustache (box plot).....</i>	<i>66</i>
<i>Figure 74: Spectres excitation/émission de nanoparticules Ag@SiO₂ dopées avec a) la rhodamine B isothiocyanate et b) la fluorescéine isothiocyanate et dispersées dans l'éthanol. Les structures moléculaires des deux fluorophores sont montrées au bas de la figure.....</i>	<i>68</i>
<i>Figure 75: Images en champ sombre et par microscopie de fluorescence des nanoparticules Ag@SiO₂- (fluorescéine et rhodamine).</i>	<i>68</i>
<i>Figure 76: Schéma réactionnel de la fonctionnalisation amine.....</i>	<i>69</i>
<i>Figure 77: Mesure du potentiel Zêta (MES pH=6,5) pour les nanoparticules Ag@SiO₂-EiTC avant et après la fonctionnalisation amine.....</i>	<i>70</i>
<i>Figure 78: Schéma réactionnel de la synthèse de l'acide 3-(triéthoxysilylpropyl-carbamoyl)butyrique.....</i>	<i>71</i>
<i>Figure 79: Schéma réactionnel de la fonctionnalisation acide carboxylique.</i>	<i>71</i>
<i>Figure 80: a) Schéma de synthèse de nanoparticules d'argent de diamètre \approx 50 nm en une seule étape. b) Schéma de synthèse de nanoparticules d'argent \approx 50 nm en utilisant la croissance multi-étapes[81].</i>	<i>72</i>
<i>Figure 81: Schéma de synthèse des germes de départ.....</i>	<i>73</i>
<i>Figure 82: a) Spectre d'extinction UV-Vis des germes de départ. b) Image TEM de ces mêmes particules.</i>	<i>73</i>
<i>Figure 83: Schéma de synthèse des nanoparticules de 30 nm de diamètre.....</i>	<i>74</i>
<i>Figure 84: a) Spectre d'extinction UV-Vis des nanoparticules d'argent d'environ 30 nm. b) Image TEM de ces mêmes particules.</i>	<i>75</i>
<i>Figure 85: Histogramme de la distribution de taille des nanoparticules d'environ 30 nm de diamètre synthétisées par «seed-growth».....</i>	<i>75</i>
<i>Figure 86: Schéma de synthèse des nanoparticules de 45 nm de diamètre.....</i>	<i>76</i>
<i>Figure 87: Spectre d'extinction UV-Vis de la deuxième croissance des nanoparticules d'argent. b) Image TEM de ces même particules.....</i>	<i>77</i>
<i>Figure 88: Spectres d'extinction UV-Vis des différentes dilutions des nanoparticules pour la formation de la couche de silice par la méthode Stöber.....</i>	<i>78</i>
<i>Figure 89: a) Spectre d'extinction UV-Vis et b) image TEM des nanoparticules Ag@SiO₂.....</i>	<i>79</i>
<i>Figure 90: Histogrammes du diamètre des cœurs d'argent après le recouvrement de silice (a) et de l'épaisseur de la couche de silice (b).</i>	<i>79</i>
<i>Figure 91: Spectre d'extinction UV-Vis (a) et image TEM (b) des nanoparticules Ag@SiO₂-FiTC.</i>	<i>80</i>
<i>Figure 92: a) Image en champ sombre et b) par microscopie de fluorescence des nanoparticules Ag@SiO₂-FiTC.</i>	<i>81</i>

Liste d'abréviations

@	Recouverte (exemple : Ag@SiO ₂ – Nanoparticule d'argent recouverte de silice)
ADN	Acide désoxyribonucléique
APTES	Aminopropyltriéthoxysilane
ARN	Acide ribonucléique
C_{ext}	Coefficient d'extinction
C_s	Concentration de solubilité
C_{scat}	Coefficient de diffusion
C_{max}^{nu}	Concentration de nucléation maximale
C_{min}^{nu}	Concentration de nucléation minimale
DM	Déminéralisée
DMF	N,N-diméthylformamide
Do	Dombrock
E	Champ électrique local
EiTC	Éosine isothiocyanate
FL	Canal de fluorescence
FRET	« Förster resonance energy transfer »
I	Intensité de fluorescence
ICP-AES	« Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy »
IR	Infrarouge
k	Constante de Boltzmann
k_m	Vitesse d'émission non-radiative en présence d'un métal
k_{nr}	Vitesse d'émission non-radiative
LSPR	« Localized surface plasmon resonance »
MEF	« Metal-enhanced fluorescence »
MPTMS	Mercaptopropyltriéthoxysilane
NC	Non complémentaire
NIR	« Near infrared »
NPs	Nanoparticules
PC	Parfaitement complémentaire
PCR	« Polymerase chain reaction »

R₀	Rayon de Förster
RET	« Resonance energy transfer »
RPM	Rotations par minute
S	Niveau électronique singulet
SMCC	Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate
SNP	« Single nucleotide polymorphism »
ssADN	ADN simple brin
T	Niveau électronique triplet
TA	Température ambiante
TCSPC	« Time-correlated single photon counting »
TEM	« Transmission electron microscopy »
TEOS	Tétraéthylorthosilicate
T_m	Température de fusion de l'ADN
UV	Ultra-violet
UV-Vis	Ultra-violet, visible
VIS	Visible
λ	Longueur d'onde
λ_p	Longueur d'onde plasmonique
τ	Temps de vie
Φ	Rendement quantique de fluorescence
Γ	Vitesse d'émission radiative
Γ_m	Vitesse d'émission radiative en présence d'un métal

“If we knew what it was we were doing, it would not be called research, would it?”

— Albert Einstein

“Theory is when you know everything but nothing works.

Practice is when everything works but nobody knows why.

We have put together theory and practice: nothing is working... and nobody knows why!”

— Albert Einstein

“Quand ça marche, ça marche... et quand ça marche pas ... ça marche pas.”

— Homme célèbre

À mes parents qui ont cru en moi et m'ont soutenu tout au long de mes études.

Jamais je ne pourrai vous remercier assez!

À Amélie pour tous ces merveilleux moments passés et à venir.

Je t'aime!

Et... vous qui prenez le temps de me lire

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon professeur Denis Boudreau de m'avoir permis de faire partie de son groupe de recherche. Je crois pouvoir dire sans aucun doute que tu es une personne exceptionnelle qui nous laisse énormément de latitude dans nos recherches, ce qui nous permet d'être beaucoup plus débrouillards. Tu nous permets de présenter et de participer à des congrès nationaux ou internationaux déjà à la maîtrise, ce qui nous permet de développer de bonnes aptitudes de communication et nous permet d'être "up-to-date" avec ce qui se fait dans notre domaine. J'aimerais aussi remercier Mathieu Lessard Viger qui fut la personne responsable de l'intégration des nanoparticules plasmoniques cœur-coquille dans le groupe de recherche et donc, indirectement de la tournure de mon projet de recherche !

J'aimerais remercier Dr. Maryse St-Louis et Dr. Danny Brouard, respectivement chercheur sénior et stagiaire postdoctoral chez Héma-Québec, pour avoir facilité la collaboration entre nos groupes de recherche. Il ne faut pas oublier les organismes subventionnaires (Le CRSNG ainsi que le FQRNT) qui m'ont permis de vivre, manger et boire (de l'eau je parle bien...) durant mes études graduées.

J'aimerais aussi remercier tous les membres du groupe de recherche qui ont fait en sorte que mon passage dans ce laboratoire fut fort agréable. J'aimerais vous laisser un petit mot personnalisé (sans ordre particulier d'importance).

@Danny: Quoi de mieux que de parler de ta motivation contagieuse! Ce fut un plaisir de t'avoir comme coéquipier et partenaire dans ce projet. Continue comme cela, je suis certain que tu vas avoir l'occasion de te rendre loin chez Héma-Québec!

@Samuel: Sam...Sam...Sam... que dire de toi ?! Il y a juste trop de choses à dire ... Sérieux, je crois pouvoir dire sans aucun doute que durant ces années, tu as été un excellent coéquipier et un très bon ami. Je te souhaite bonne chance dans la poursuite de ta maîtrise et bonne chance pour la suite !

@Félix: Mon très cher Félix, toi aussi il ne fait aucun doute que tu as été un excellent ami pour toute la durée du bac et de la maîtrise (on n'a pas gagné le prix des inséparables pour

rien...). Je vais te souhaiter la meilleure chance du monde pour la poursuite de tes études vers le PhD et toutes ces s**** là!

@Luc: Bon Luc, merci d'avoir été mon maître de stage lors de mes étés au bac. Beaucoup de fun et de manip intéressantes. Il faut dire que l'on a aussi eu beaucoup de discussions salées très intéressantes. Très compliqué tout ça. Bonne chance toi aussi dans ta recherche d'emploi.

@François: Bon Frank, sérieux tu nous manques déjà. Je te dirais que le bureau n'est plus le même sans toi... Toi aussi bonne chance au PhD et j'espère bien avoir la chance de retourner au Costco manger une bonne poutine et un hot-dog à 6,66\$ avec toi! Et pourquoi pas aller se chercher un pti coffee !?

@Max: Hééééééééé! L'homme au rire inoubliable. Je n'oublierai jamais la fois où tu as déterminé que ton vin contenait quelque chose de plus que les autres. Et aussi ton personnage de vendeur de projet de doc qui ressort lorsque tu prends un verre de trop. Et bien bonne fin de PhD et on ira manger un petit Normandin un de ces jours !

@Marie: Sacré Marie-Cécile, tu dois être la personne la moins susceptible que je connaisse. Sérieusement, je ne sais pas comment tu fais pour nous endurer à longueur d'année !! J'ai eu beaucoup de plaisir à te côtoyer! Bonne continuation dans ta profession et bonne chance pour ta charge de cours !

J'aimerais remercier les étudiants d'été que j'ai eu l'occasion d'avoir comme stagiaires. Merci beaucoup à Véronique Goulet (a.k.a Choux), Michel Jean (pas l'animateur), Philippe Legros et bien sur l'équipe de relève: Alex, Joanie, Céril Garon et Josée (ma partenaire de café préférée (après Luc bien sûr)).

Bonne continuation à tous dans vos projets de recherche/vie respectifs.

Introduction

Seulement au Canada, les hôpitaux ont besoin de plus de 2000 unités de sang par jour afin de combler la demande en transfusions[1]. Afin d'assurer l'innocuité et l'efficacité des transfusions sanguines, les banques de sang doivent tester les donneurs et les receveurs afin de s'assurer de la compatibilité du sang administré. Cependant, vu le nombre très élevé de dons de sang et la complexité des analyses, seulement quelques groupes sanguins sont testés (ABO, Rhésus, Kell)[2] bien que plus de 30 groupes ont été répertoriés. Or, lors de la transfusion de globules rouges incompatibles, il y a risque de rejet, ce qui peut entraîner de graves complications, voire la mort.

L'hémagglutination est présentement la méthode la plus couramment utilisée pour réaliser les opérations de typage sanguin. Cette méthode a bien servi les banques de sang durant des décennies. Elle est simple, nécessite peu de matériel et possède la sensibilité et la spécificité nécessaires pour répondre aux besoins des banques de sang[3]. Typiquement, les hématies (globules rouges) sont mélangées avec un sérum contenant des anticorps connus. Il est ainsi possible de déterminer la présence d'antigènes spécifiques à la surface de ces cellules sanguines en observant leur agrégation, ce qui se traduit par un test positif. Cependant, elle est surpassée par les techniques de génétique moléculaire lorsque vient le temps de faire des diagnostics prénataux, lors de la détermination du groupe sanguin d'individus multi-transfusés[4] ou lorsque l'expression des antigènes est faible[5]. L'identification de la base moléculaire de la majeure partie des antigènes sanguins a permis aux scientifiques de développer des méthodes de détermination du groupe sanguin basées sur le séquençage de l'ADN (acide désoxyribonucléique)[6]. Il est maintenant possible de déterminer le phénotype (les gènes exprimés à la surface des hématies) d'un individu par la détection de gènes spécifiques (génotypage).

La recherche de nouvelles méthodes de détection et de quantification d'acides nucléiques est en plein essor dans divers domaines tels que les sciences médicolégales[7], le génotypage sanguin[2], la détection de mutations génétiques, le diagnostic de maladies infectieuses[8, 9], la détection d'agents de guerre biologique[10], pour ne nommer que ceux-ci. Malgré le fait que les acides nucléiques absorbent dans la région de l'UV, il est impossible de les détecter directement

par absorption moléculaire UV-Vis, puisque cette méthode n'est pas assez sensible. De plus, même s'ils sont fluorescents, leur très faible rendement quantique de fluorescence empêche l'utilisation de cette propriété intrinsèque afin de les doser et/ou les détecter [11, 12].

À parti d'un échantillon de 10 mL de sang, il est possible d'extraire $\approx 300 \mu\text{g}$ d'ADN[13]. Cela peut paraître considérable mais il est bon de savoir que le gène recherché ne représente qu'une petite fraction de la masse totale d'ADN. Pour cette raison la plupart des méthodes de génotypage sanguin nécessitent une étape d'amplification enzymatique afin de rehausser la concentration d'ADN et l'utilisation d'espèces moléculaires qui permettent de convertir la présence d'ADN en signal mesurable (optique, électrique, etc.)[5]. L'amplification enzymatique appelée PCR (« *polymerase chain reaction* ») permet de multiplier quelques copies d'ADN en milliers ou milliards de copies. Ainsi, elle permet à des techniques beaucoup moins sensibles d'être utilisées. Cependant, cette technique a certains désavantages. C'est une technique longue et fastidieuse nécessitant du personnel hautement qualifié, ce qui augmente la complexité et le coût d'une analyse[14].

La méthode proposée dans le cadre de cette maîtrise consiste à l'utilisation de nanoparticules composites super luminescentes basées sur un cœur plasmonique afin d'amplifier le signal de fluorescence du transducteur et ainsi, se départir de l'étape d'amplification de l'ADN. De plus, cette méthode ne nécessite pas l'emploi coûteux d'ADN marquée puisque la transduction s'effectue à l'aide d'un polythiophène cationique conjugué lié de façon électrostatique avec l'ADN. Cette méthode de détection est basée sur l'utilisation d'un polymère développé dans le laboratoire du Professeur Mario Leclerc[15, 16] de l'Université Laval couplé avec une architecture plasmonique nanoparticulaire développée dans notre laboratoire[17, 18]. Diverses modifications de cette architecture furent effectuées et seront abordées plus en détails dans les chapitres suivants.

Chapitre 1: Partie théorique

1.1 Fluorescence[19, 20]

La fluorescence est un type de luminescence provenant de l'excitation d'une molécule par l'absorption de photons (UV, Vis, NIR, IR). Ce phénomène est fortement utilisé dans divers domaines vu sa très grande sensibilité, et des mesures résolues spatialement ou temporellement sont également possibles. De plus, un grand avantage de la fluorescence provient du déplacement spectral qui existe entre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission (le déplacement de Stokes). De cette façon, il est possible de filtrer la longueur d'onde d'excitation et d'obtenir un très bon rapport signal sur bruit. Il existe des espèces fluorescentes spécifiques pour de nombreuses applications et il est possible de couvrir tout le domaine spectral (UV, Vis, NIR).

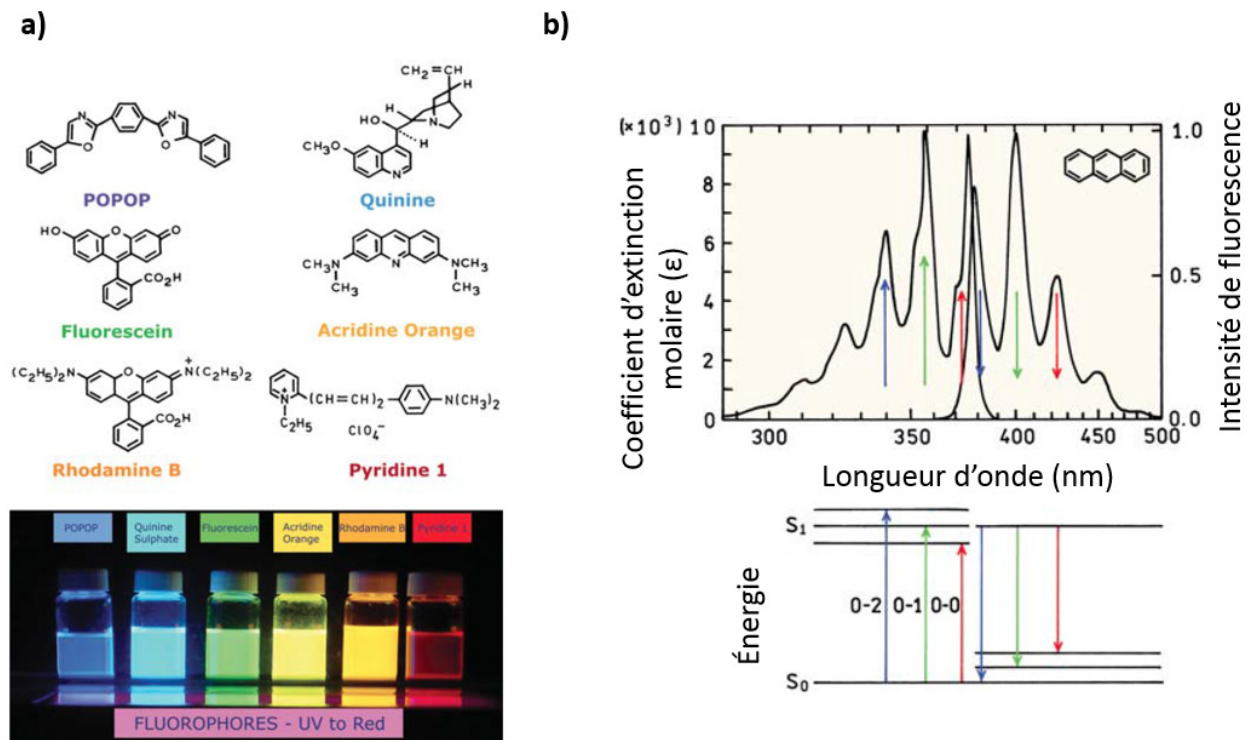


Figure 1: a) Exemples de fluorophores couvrant le domaine spectral du visible. b) Spectre d'excitation et d'émission de l'antracène avec l'exemple typique de l'effet "image miroir" entre l'excitation et l'émission[19].

1.1.1 Mécanisme de la fluorescence

Le mécanisme de la fluorescence s'initie par l'excitation lumineuse d'une molécule à un niveau d'énergie plus élevé ($h\nu_A$). Cette transition s'effectue très rapidement ($\approx 10^{-15}$ s). Tout dépendant de l'énergie utilisée pour exciter la molécule, l'électron peut atteindre le niveau S_1 ou S_2 . Normalement, la plupart des molécules vont relaxer au plus bas niveau vibrationnel de S_1 avant d'émettre de la lumière, par le biais de la conversion interne et de la relaxation vibrationnelle ($\approx 10^{-12}$ s).

Par la suite, le fluorophore retourne au niveau fondamental en émettant de la lumière. Il est possible d'y arriver en retournant à des niveaux vibrationnels excités du niveau électronique S_0 . Pour cette raison, le spectre d'émission est souvent une image miroir du spectre d'excitation ($S_0 \rightarrow S_1$). Due à la perte d'énergie sous la forme de chaleur, la réémission de lumière s'effectue à plus basse énergie. Il existe cependant divers mécanismes qui peuvent empêcher l'émission de fluorescence: la conversion interne (de S_1 vers S_0), le croisement intersystème et la phosphorescence.

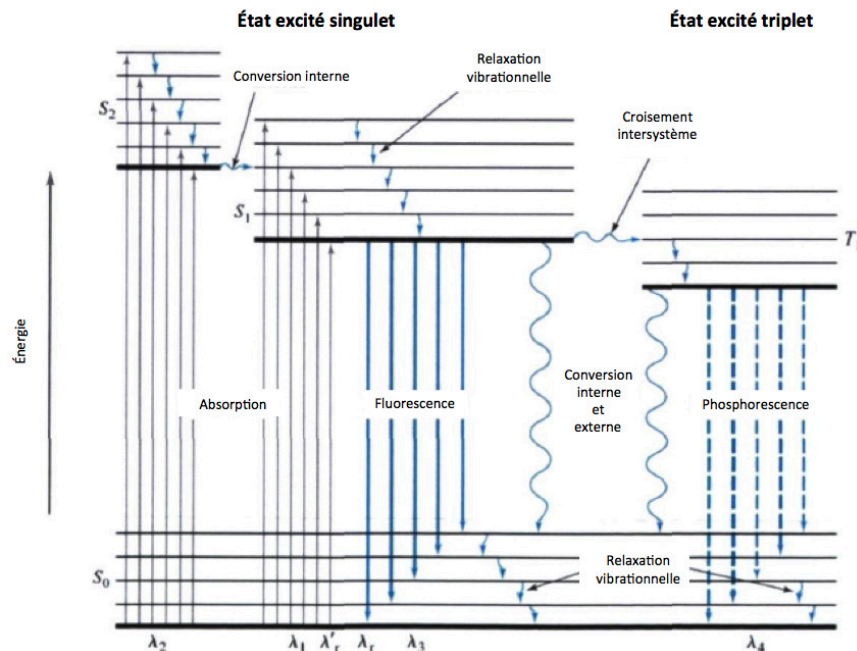


Figure 2: Diagramme de Perrin-Jablonski représentant les différents mécanismes possibles suite à l'absorption de la lumière par un chromophore[20, 21].

Le croisement intersystème est une transition non radiative entre deux niveaux vibrationnels d'énergie identique, mais appartenant à des niveaux électroniques de multiplicités différentes (singulet-triplet). Ces transitions sont normalement interdites, mais peuvent se produire sous certaines conditions (notamment par couplage spin-orbite en présence d'atomes lourds). Rendue au niveau T₁, la molécule peut revenir au niveau fondamental soit par conversion interne ou par émission de lumière (phosphorescence) ou, plus rarement, en retournant au niveau S₁ (un phénomène appelé "fluorescence retardée"). Puisque la phosphorescence est un phénomène très lent, les nombreuses collisions avec le solvant favorisent le retour au niveau S₀ par conversion interne.

1.1.2 Temps de vie et rendement quantique de fluorescence

Lors de l'analyse de systèmes fluorescents, deux caractéristiques physiques des fluorophores sont importantes à quantifier : le temps de vie à l'état excité ainsi que le rendement quantique de fluorescence. Le temps de vie à l'état excité (τ_0) correspond au temps moyen passé par un fluorophore dans son état excité. Le rendement quantique de fluorescence (Φ_0) correspond au ratio entre le taux de désexcitation radiative et le taux total de désexcitation (radiative ou non). Ainsi, les fluorophores ayant un rendement quantique proche de l'unité seront très fluorescents.

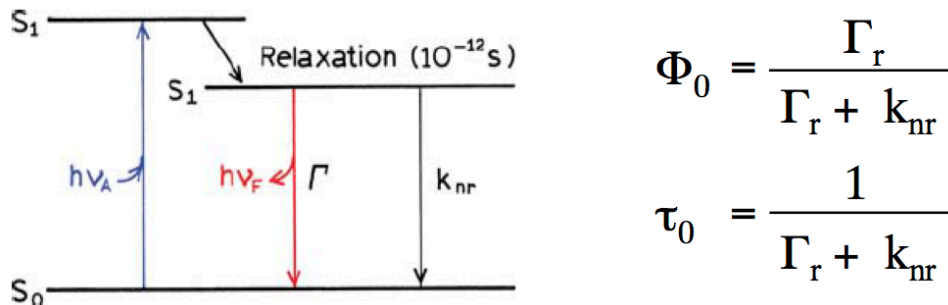


Figure 3: Diagramme de Jablonski simplifié (gauche) et équations du rendement quantique et du temps de vie (droite)[19].

On peut exprimer ces deux caractéristiques des fluorophores par les équations présentées dans la Figure 3. Dans ces formules, Γ_r représente la vitesse d'émission radiative d'un fluorophore et k_{nr} correspond à la vitesse d'émission non-radiative. Ainsi, si $\Gamma_r \gg k_{nr}$, le rendement quantique sera proche de l'unité et la fluorescence sera élevée. Si $\Gamma_r \ll k_{nr}$, au contraire, le rendement quantique

et la fluorescence seront très faibles. Il est aussi possible de concevoir le rendement quantique comme étant le ratio entre le nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés.

1.1.3 Extinction de la fluorescence

L'extinction de la fluorescence correspond aux divers mécanismes de désexcitation non radiative qui peuvent se produire. Ce phénomène entraîne une baisse de la fluorescence et deux catégories d'extinction de la fluorescence existent : l'extinction dynamique et statique[20].

L'extinction dynamique de la fluorescence est un phénomène se produisant lorsque le fluorophore est à l'état excité (par collisions avec le solvant ou avec des désactivateurs, de même que par transfert d'énergie résonant). L'extinction statique de la fluorescence se caractérise par la formation d'un complexe à l'état fondamental non excitable. Il est possible de discerner expérimentalement de quel type il s'agit en effectuant un spectre de fluorescence résolu dans le temps.

Tel que montré dans la Figure 4, le temps de vie (courbe rouge) diminue en fonction de la concentration pour une extinction de type dynamique. Cela est due au fait que les fluorophores ayant un temps de vie plus long ont plus de chance d'entrer en contact avec un désactivateur et ainsi perdre leur énergie de façon non-radiative.

Dans le cas de l'extinction de type statique, le fluorophore forme un complexe à l'état fondamental et n'est pas excitable. Ainsi, on perçoit une baisse de l'intensité lumineuse qui est proportionnelle à la concentration de désactivateurs, cependant on ne perçoit aucun changement dans le temps de vie puisque les fluorophores sous forme de complexe n'émettront pas tandis que les fluorophores non complexé ne seront pas affectés.

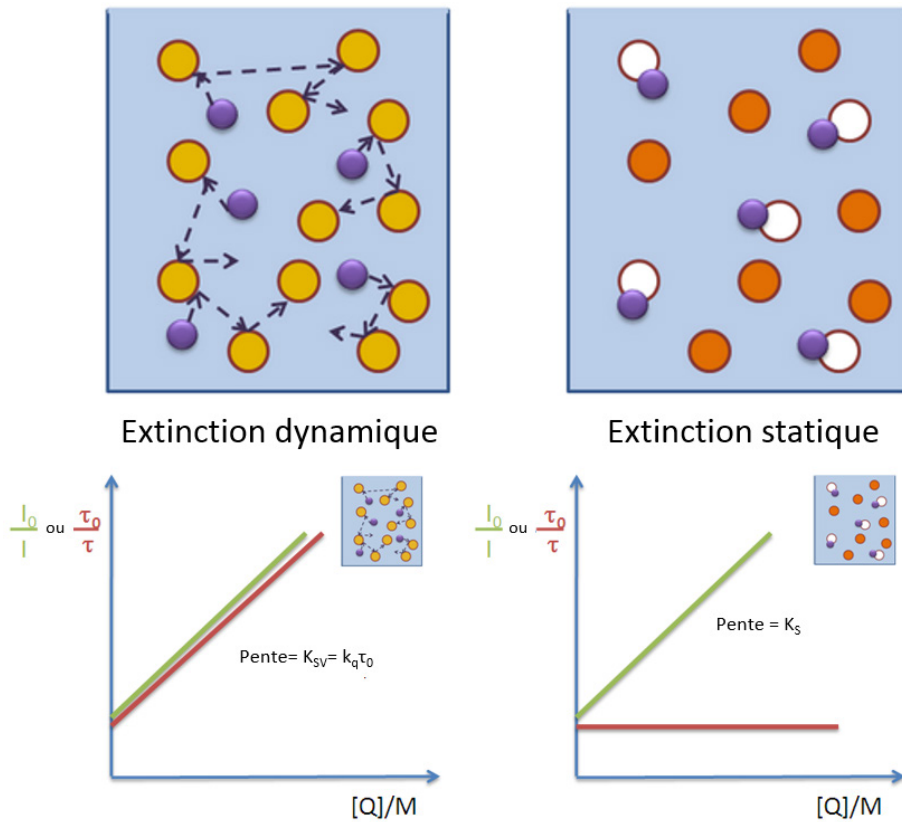


Figure 4: Distinction entre l'extinction de fluorescence dynamique et statique[22].

1.2 RET (« Resonance Energy Transfer »)

Le RET (« Resonance Energy Transfer »), souvent appelé FRET (« Förster Resonance Energy Transfer ») est un type de transfert énergétique non radiatif. C'est un mécanisme très utilisé en biologie pour étudier divers mécanismes tels que : la conformation de protéines[23] ou l'interaction entre différentes protéines[24] pour ne nommer que ceux-ci. Cela découle du fait que le FRET se produit à de très courtes distances, souvent de l'ordre de la taille d'une protéine ou de l'épaisseur d'une membrane. Ce phénomène se produit entre deux chromophores, un donneur qui est à l'état excité et un accepteur qui est au niveau fondamental. Il permet d'étudier la distance entre deux fluorophores et est considéré comme étant une « règle » nanométrique puisqu'il est très sensible à la distance entre les deux espèces (efficacité $\propto 1/r^6$). En regardant la Figure 5, il est possible de bien saisir le phénomène. Tout d'abord, afin que cela se produise, la bande d'émission du donneur doit recouvrir la bande d'excitation de l'accepteur (Figure 5a). De plus, l'efficacité de transfert diminue énormément lorsque la distance augmente entre les deux espèces (Figure 5b). Enfin, il est intéressant de parler du rayon de Förster (R_0) qui correspond à la

distance ou l'efficacité de transfert est de 50%. Typiquement, cette distance est de 1-10 nm pour la majorité des fluorophores utilisés.

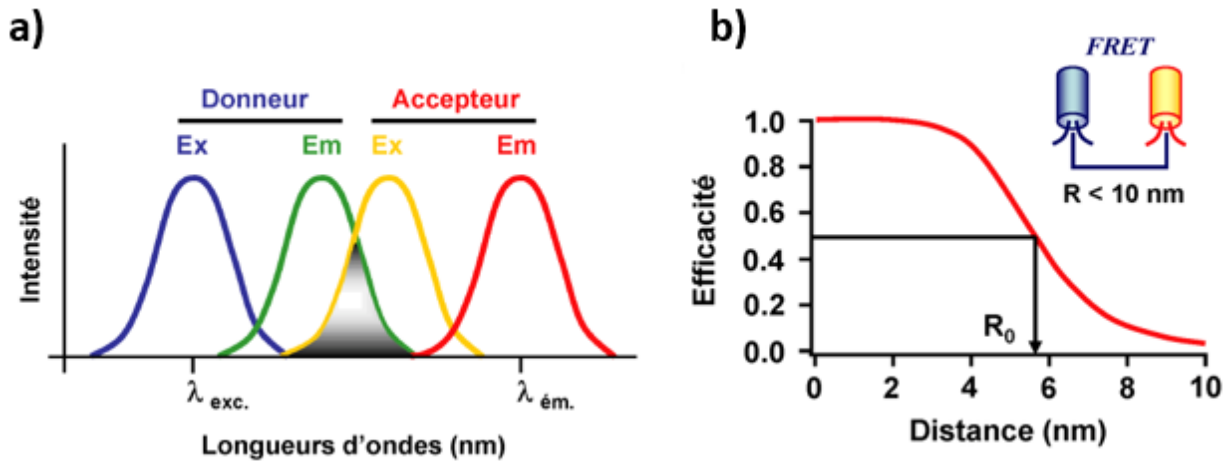


Figure 5: a) Critères d'obtention du FRET : a) recouvrement de la bande d'émission du donneur et de la bande d'excitation de l'accepteur; b et c) effet de la distance entre le donneur et l'accepteur [25].

1.3 Plasmonique [26-28]

La spectroscopie de fluorescence est très utilisée dans divers domaines scientifiques. Depuis les dernières années, il y a un intérêt de plus en plus marqué pour les interactions entre les fluorophores et les surfaces ou nanoparticules métalliques. Les propriétés spectrales de ces molécules peuvent être fortement modifiées par la présence d'un nuage électronique oscillant à la surface d'un métal. Une modification de l'intensité de fluorescence, de la photostabilité et des distances efficaces de FRET ont déjà été rapportées[28]. Lorsque la structure métallique est plus petite que la longueur d'onde, on parle de plasmons de surface localisés (LSPR, « *localized surface plasmon resonance* »). Le champ électrique oscillant de la lumière force les électrons de la bande de conduction du métal à osciller collectivement. Un dipôle est formé à la surface des nanoparticules qui oscille à la même fréquence que la lumière, créant un champ électrique autour des particules que l'on appelle plasmon (voir Figure 6).

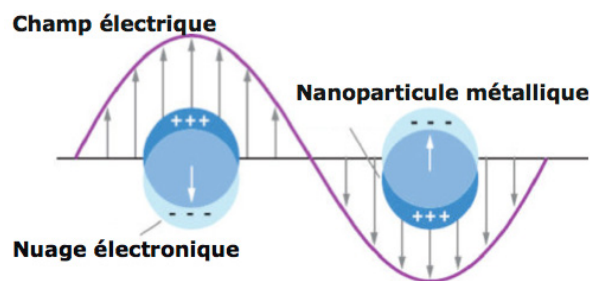


Figure 6: Schéma d'un plasmon de surface localisé sur une nanoparticule sphérique métallique[28].

Ce dipôle électrique oscillant va réémettre des ondes électromagnétiques à la même fréquence que l'oscillation. Cette lumière appelée diffusion plasmonique est l'explication de la diffusion très élevée des colloïdes métalliques par rapport à des colloïdes non plasmoniques (voir Tableau 1).

Tableau 1: Coefficient de diffusion calculé (C_{scat}) et diffusion relative pour des nanoparticules de 30 nm de diamètre ayant différentes compositions[29].

Nanoparticules	λ (nm)	C_{scat} (cm^2)	C_{scat} relative
Argent	380	8×10^{-12}	1000
Or	530	$9,02 \times 10^{-13}$	112,7
Cuivre	380	$3,74 \times 10^{-13}$	46,8
Aluminium	380	$3,73 \times 10^{-13}$	46,6
Sélénium	380	$1,85 \times 10^{-13}$	23,1
Polystyrène	380	$3,76 \times 10^{-15}$	0,47

Cependant, ces phénomènes plasmoniques ne se produisent pas à toutes les fréquences. Plusieurs paramètres viennent faire en sorte de modifier l'énergie nécessaire à ce phénomène et il en sera question plus tard dans la section 1.3.2.

1.3.1 Effets d'un plasmon sur les fluorophores

L'émission d'une particule plasmonique seule n'est pas très utile au point de vue spectral puisqu'elle se produit à la même fréquence que celle de l'excitation. Par contre, l'utilisation d'un fluorophore à proximité d'un métal donne l'opportunité d'utiliser à la fois le grand coefficient d'extinction de la particule métallique et le déplacement de Stokes de la fluorescence.

Tout d'abord, la particule plasmonique influence les propriétés d'un fluorophore à deux niveaux différents : l'absorption et l'émission de lumière. Lorsque la fréquence de la lumière coïncide avec la fréquence plasmonique, la section efficace de capture du colloïde augmente considérablement et elle peut être jusqu'à 10^5 fois celle d'un fluorophore (voir Figure 7).

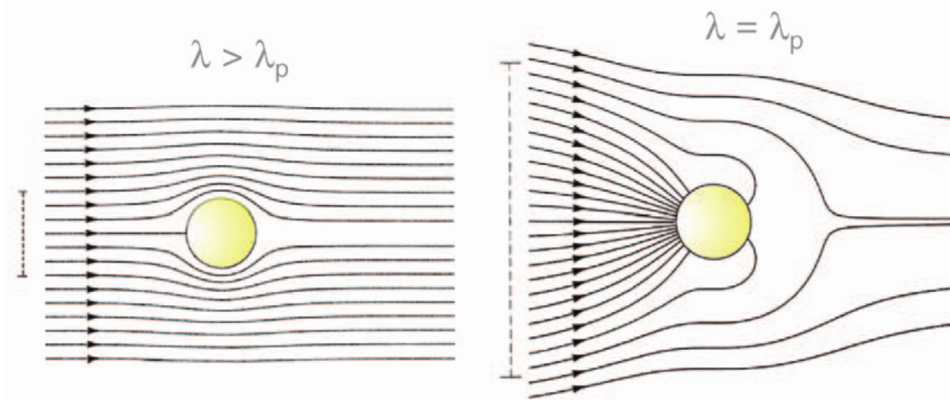


Figure 7: Représentation des vecteurs du champ électrique de la lumière autour d'un colloïde métallique pour une longueur d'onde plus grande que la longueur d'onde plasmonique (gauche) et égale à la longueur d'onde plasmonique (droite)[27].

Ainsi, un fluorophore situé proche de la particule plasmonique aura beaucoup plus de chance d'absorber un photon et par le fait même d'être excité (Figure 8, flèche bleu en gras). En second lieu, le dipôle oscillant de la nanoparticule peut entrer en résonance avec celui du fluorophore, ce qui va favoriser l'émission radiative (Figure 8, flèche verte en gras).

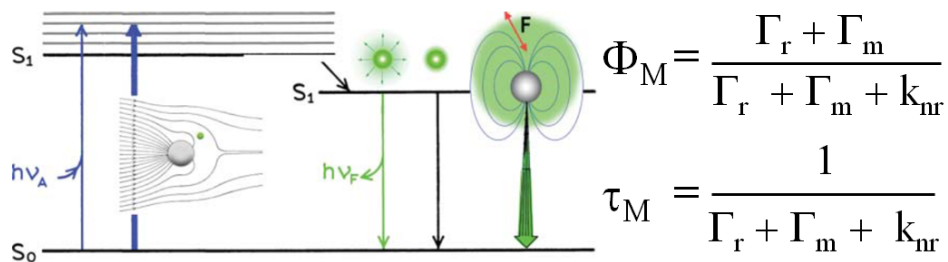


Figure 8: Diagramme de Jablonski (gauche) et équations du temps de vie et du rendement quantique (droite) pour un fluorophore à proximité d'une structure plasmonique[26].

Cela va entraîner plusieurs effets qui peuvent être mieux compris à l'aide des équations de la Figure 8. Tout d'abord, en incorporant un nouveau terme Γ_m (vitesse d'émission radiative due à la présence du métal), il est possible d'observer que le rendement quantique augmente et que le

temps de vie à l'état excité du fluorophore diminue. Ces deux effets sont très intéressants pour l'utilisation de ces structures plasmoniques dans des applications où la concentration en espèce fluorescente est faible, puisque cela va rehausser la fluorescence tout en augmentant la photostabilité des chromophores à proximité du cœur métallique.

Cependant, il y a certains cas où l'on peut percevoir une diminution de la fluorescence à proximité d'une surface métallique. Lorsque le fluorophore est situé trop près de la surface métallique, il peut y avoir extinction de la fluorescence par transfert électronique ou transfert d'énergie (FRET) vers le métal. Cependant, à partir d'une certaine distance, l'augmentation du champ électrique local (E_m) et l'augmentation de la vitesse d'émission radiative (Γ_m) font en sorte d'augmenter l'émission de lumière. En continuant à s'éloigner du métal, ces effets perdent de leur ampleur et la fluorescence finit par retourner à l'intensité du fluorophore sans interaction métallique (voir Figure 9). Ainsi, lors de la création d'un nouveau système il est important d'optimiser la distance fluorophore-métal afin d'obtenir un effet maximal.

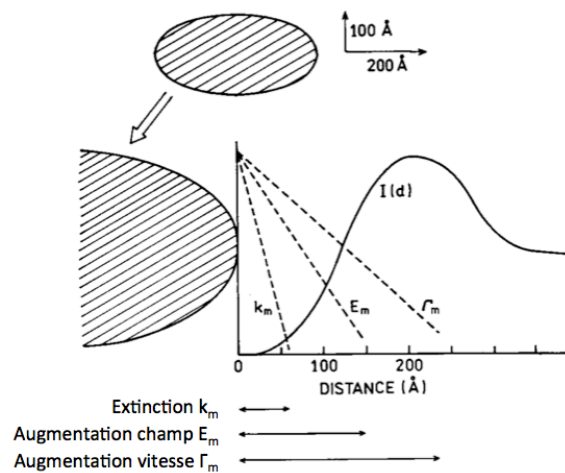


Figure 9 : Intensité de fluorescence d'un fluorophore à proximité d'une particule métallique en fonction de la distance (k_m : vitesse d'émission non radiative, E_m : champ électromagnétique à la surface, Γ_m : vitesse d'émission radiative due à la présence du métal.)[30]

Ensuite, il faut aussi prendre en considération le chevauchement spectral entre le plasmon et le fluorophore lorsque l'on veut créer un système plasmonique optimal. Chen *et al.* ont démontré de façon expérimentale que l'intensité de fluorescence d'un fluorophore dépend fortement du recouvrement spectral et qu'afin d'avoir un effet plasmonique maximal, la position du plasmon

doit se situer entre le spectre excitation/émission du fluorophore afin de pouvoir jouer un rôle à la fois sur l'excitation et l'émission du chromophore (voir Figure 10) [31].

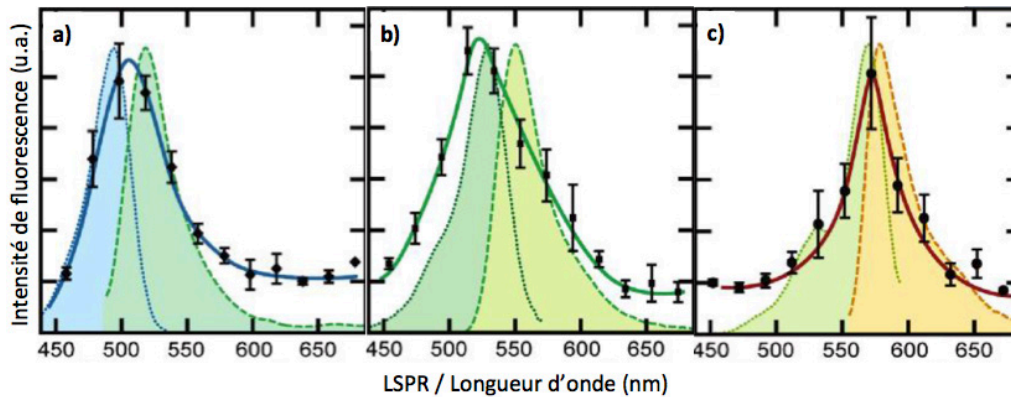


Figure 10: Intensité de fluorescence en fonction de la position du plasmon (LSPR) pour différents fluorophores a) Alexa Fluor 488 b) Alexa Fluor 532 c) Rhodamine Red (les spectres d'excitation/émission sont représentés pour chaque espèce)[31].

1.3.2 Paramètres modifiant la fréquence plasmonique

La longueur d'onde à laquelle il y a formation du plasmon dépend de plusieurs facteurs dont le type de métal, la forme et la taille des nanoparticules[32]. Ces paramètres seront abordés dans les prochaines sections.

1.3.2.1 Type de métal

Le choix de la structure plasmonique est fait en fonction de l'espèce fluorescente à exalter mais aussi du milieu dans lequel les analyses seront effectuées (*in vitro*, *in vivo*, etc.). Tout d'abord, le type de métal joue un très grand rôle sur la position du plasmon mais aussi sur la force de ce dernier. Ainsi, en regardant la Figure 11, l'on observe que l'argent est le métal ayant le plasmon le plus fort dans tout le domaine de l'UV-Visible et du proche infrarouge (~300-1200 nm). Selon cette même figure, le lithium devrait être un aussi bon candidat que l'or et le cuivre pour la force de son plasmon de surface. Cependant, il faut aussi tenir compte de la réactivité élevée du lithium métallique qui rend presque impossible l'obtention de structures plasmoniques chimiquement stables. Aussi, dans le cas d'applications *in vivo*, la biocompatibilité de l'or le rend beaucoup plus intéressant que l'argent qui tend à relarguer des ions Ag^+ reconnus pour être cytotoxiques[32].

Ainsi, la sélection du métal va aussi fortement dépendre de l'utilisation qu'on veut en faire, et pas seulement pour la force de son plasmon.

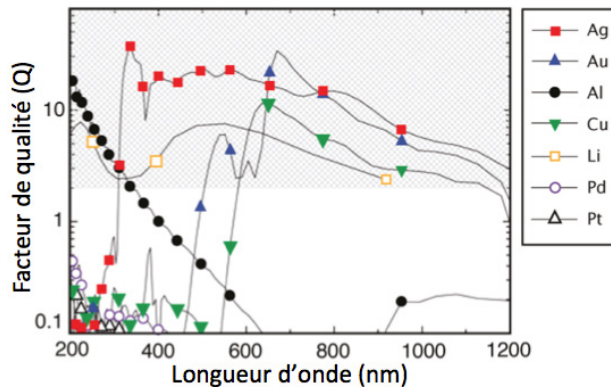


Figure 11: Facteur de qualité (Q) du plasmon en fonction de la longueur d'onde pour différents métaux. Un Q élevé signifie un plasmon fort et un coefficient de diffusion élevé[32].

1.3.2.2 Forme et taille des nanoparticules[32, 33]

La fréquence et l'intensité du plasmon dépendront également de la forme et la taille des nanoparticules. La façon la plus simple de moduler les propriétés plasmoniques consiste à modifier la taille des nanoparticules. La taille permet aussi de moduler le ratio absorption/diffusion d'un colloïde. Ainsi, en regardant la Figure 12, il est possible d'observer que pour des nanoparticules plus petites, l'absorption prend presque le dessus sur la diffusion tandis que pour des particules plus grandes, la diffusion est prédominante. De plus, le nombre et le type de dipôle changent en fonction de la taille des particules. Pour une petite particule d'argent, il existe un seul mode dipolaire centré à 400 nm tandis que pour de particules d'argent plus grosses, il y a un dipôle centré à 450 nm et un quadripôle centré à 600 nm. Ce déplacement vers le rouge de la bande plasmonique provient du fait que pour de grosses particules, la séparation de charges est meilleure, ce qui fait en sorte de diminuer la fréquence d'oscillation collective des électrons.

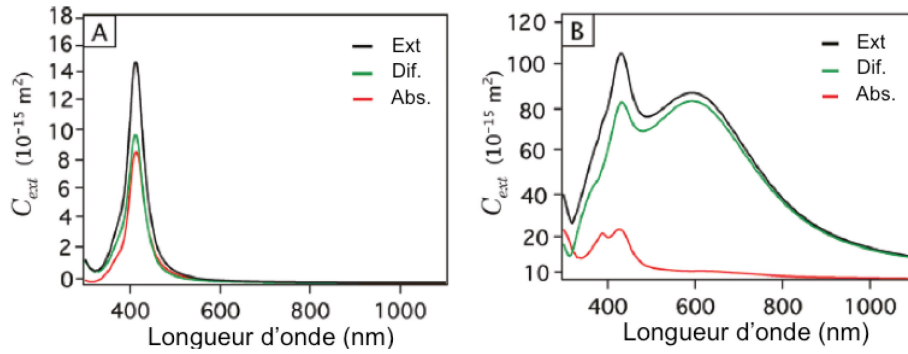


Figure 12: Spectres théoriques calculés à partir de la théorie de Mie pour des nanoparticules d'argent sphériques de a) 40 nm et b) 140 nm de diamètre. Les spectres d'extinction (noir), de diffusion (vert) et d'absorption (rouge) sont représentés[32].

Une autre façon de moduler la position plasmonique consiste à changer la forme des nanoparticules. L'effet des coins ou des côtés des nanoparticules a un impact important sur la position du plasmon. Ainsi, pour des formes possédant des coins bien définis (triangles, cubes, etc.) la position du mode principal plasmonique est déplacée vers le rouge, car cela augmente la séparation des charges et diminue l'énergie d'oscillation plasmonique. De plus, des formes asymétriques font apparaître des épaulements dus aux différents modes d'oscillation possibles des électrons (voir Figure 13).

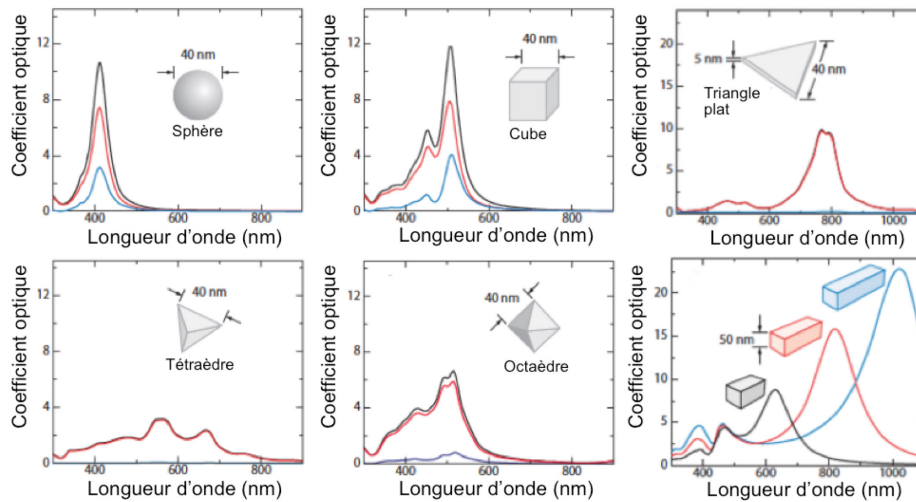


Figure 13: Position du plasmon en fonction de la forme des nanoparticules d'argent. Spectres d'extinction (noir), de diffusion (bleu) et d'absorption (rouge) calculés[33].

1.4 Théorie sur la synthèse et la stabilité des nanoparticules

Afin de bien comprendre la formation des colloïdes et le recouvrement à l'aide de la silice, la prochaine section couvrira la théorie derrière ces deux phénomènes.

1.4.1 Synthèse de colloïdes métalliques

La formation de colloïdes métalliques suit habituellement le même type de synthèse (réduction d'un sel métallique) lorsque la méthode ascendante est utilisée (« *bottom-up* », qui consiste à partir d'atomes pour former des structures de plus grande taille). Un sel métallique est dissous dans un solvant et une espèce réductrice est ajoutée afin de générer des atomes zérovalents jusqu'à atteindre la concentration de nucléation minimale. À cette concentration, l'énergie de cristallisation est suffisante pour contrebalancer l'énergie nécessaire à l'augmentation de la surface par le système. Afin d'obtenir des nanoparticules ayant une faible polydispersité, cette étape doit s'effectuer le plus rapidement possible. Par la suite, lorsque la concentration d'atomes tombe sous la concentration de nucléation minimale, les atomes neutres formés vont contribuer à augmenter la taille des noyaux existants et ne formeront plus de nouveaux noyaux (voir Figure 14).

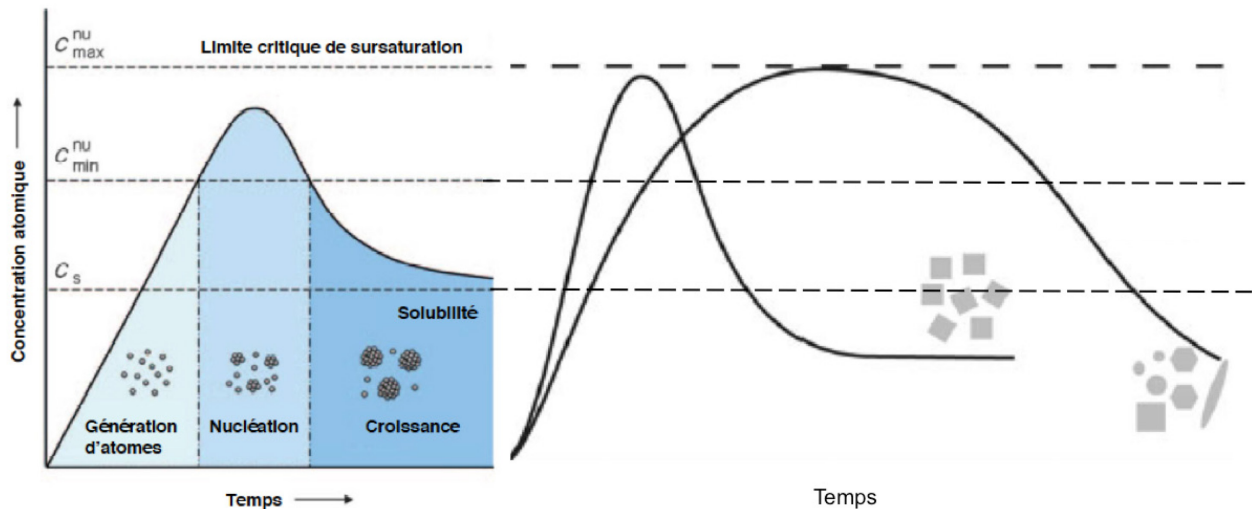


Figure 14: Schémas des différentes étapes de formation des nanoparticules métalliques en fonction du temps (gauche) et effet de la vitesse de nucléation sur la polydispersité des particules (droite)[34, 35].

En observant la Figure 15, on peut comparer l'effet d'une nucléation lente (gauche) et rapide (droite) sur la taille finale des nanoparticules. Lorsque les noyaux sont formés plus lentement, les particules n'ont pas le même temps pour croître, ce qui augmente considérablement la

polydispersité de taille des nanoparticules. Lorsque les noyaux sont formés au même moment, le temps de croissance des particules est le même et la polydispersité de taille diminue (en prenant en considération une croissance équivalente).

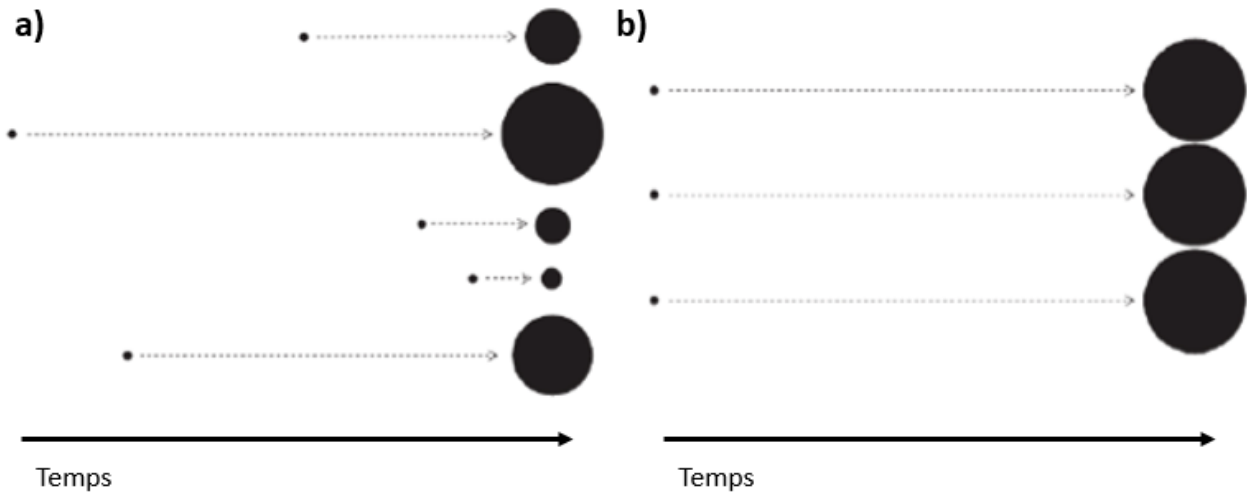


Figure 15: Schéma de l'effet a) d'une nucléation lente et b) rapide sur la polydispersité des nanoparticules[36].

Lorsque la concentration d'atomes en solution atteint la concentration de solubilité (C_s), un équilibre est atteint entre la dissolution des atomes de surface et la cristallisation des atomes en solution. Cependant, la vitesse de dissolution des atomes présents sur les petites particules est plus rapide que celle des atomes sur les grosses particules. Ainsi, la croissance des grosses particules sera favorisée au détriment des plus petites. Ce phénomène se nomme murissement d'Ostwald (voir Figure 16) et peut entraîner une augmentation de la polydispersité des nanoparticules lors d'une synthèse.

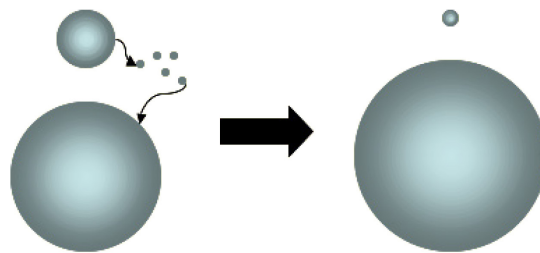


Figure 16: Schéma du murissement d'Ostwald[37]

1.4.1.1 Réduction d'un sel d'argent par le citrate

Pour la synthèse du biocapteur, la méthode très connue de réduction du nitrate d'argent par le citrate de sodium fut employée[38]. C'est une méthode avantageuse puisqu'elle est très simple, rapide, est effectuée en milieu aqueux et permet l'obtention d'une concentration élevée de colloïdes. Aussi, il est très facile par la suite d'effectuer un recouvrement de silice en surface des nanoparticules par la méthode de Stöber. Quelques modifications ont été effectuées au protocole initial et seront discutées plus en détails dans la section 2.2.1.

Dans une synthèse typique, une solution aqueuse de nitrate d'argent est portée à ébullition puis une solution de citrate de sodium y est ajoutée. La température élevée permet d'augmenter le pouvoir réducteur du citrate. Il est aussi intéressant de noter que dans cette synthèse, le citrate agit comme réducteur mais aussi comme stabilisant. Cependant, un désavantage important de cette méthode provient de grandes variations dans la forme et la taille des nanoparticules formées[32].

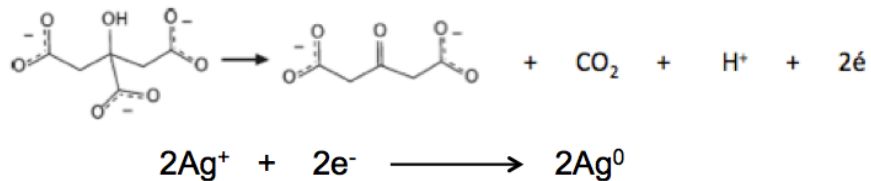


Figure 17: Mécanisme d'oxydation du citrate et de réduction de l'argent[32, 39].

Il est à noter que la polydispersité des colloïdes ne devrait pas avoir un impact majeur sur l'exaltation plasmonique pour des tailles comprises entre 40 et 70 nm, puisqu'il a été démontré de façon expérimentale et théorique que le facteur d'exaltation ne variait que très peu dans ce domaine pour des nanoparticules d'argent sphériques (voir Figure 18)[40, 41].

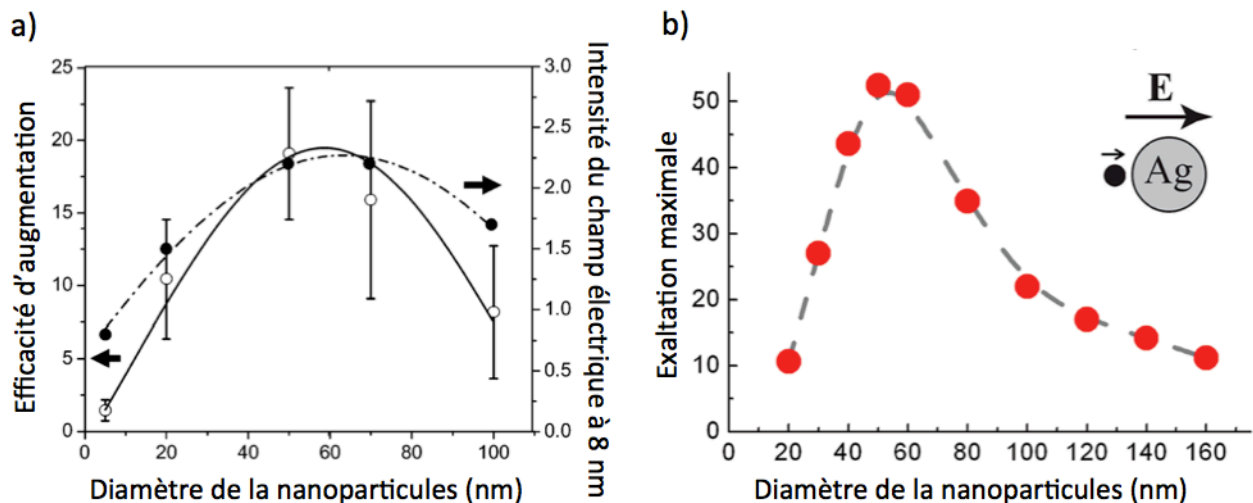


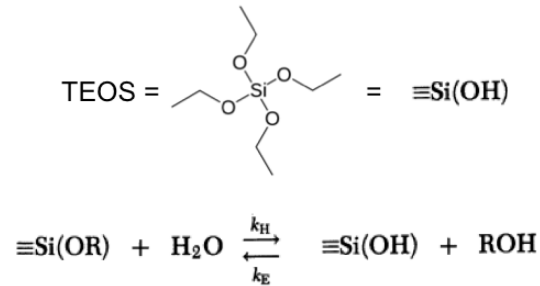
Figure 18: a) Exaltation d'une molécule fluorescente de Cy5.5 sur des nanoparticules d'argent de tailles différentes (expérimentale)[40]. b) Exaltation plasmonique d'un fluorophore sur des nanoparticules d'argent de tailles différentes (théorique)[41].

1.4.2 Synthèse de la couche de silice

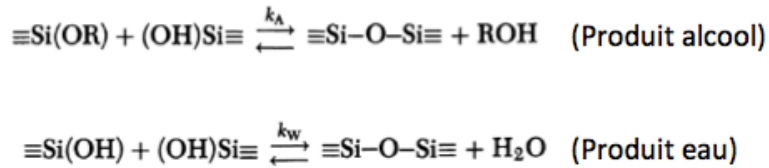
L'utilisation d'un revêtement de silice a plusieurs avantages. Tout d'abord, il permet de stabiliser les nanoparticules d'argent afin de les rendre plus robustes à l'agrégation irréversible en offrant une stabilisation stérique et électrostatique (voir section 1.4.4). Ensuite, il permet d'incorporer facilement et de façon covalente des molécules fluorescentes à proximité du cœur métallique. Enfin, la chimie des silanes est très développée et la variété de molécules qu'il est possible de se procurer est très vaste. Ainsi, il est possible d'incorporer à peu près n'importe quel groupement fonctionnel à la surface des nanoparticules comme par exemple: $-\text{COOH}$, $-\text{CHO}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NCS}$, pour n'en citer que les principaux.

La méthode de synthèse de la couche de silice utilisée repose sur une méthode de Stöber modifiée[38, 42]. Cette méthode est basée sur le procédé sol-gel et consiste à former un réseau de silice à partir de précurseurs silane organiques dans l'éthanol sous catalyse basique. Le précurseur silane organique le plus utilisé est le TEOS (tetraethylorthosilicate). Cette réaction s'effectue en deux étapes de façon simultanée[43].

Tout d'abord, il y a l'hydrolyse du TEOS en présence d'eau.



Puis il y a la condensation



Cette condensation forme des molécules de silice de plus en plus grosses (polymères). Il existe deux types de croissance de couche de silice sur des nanoparticules: nucléation de la silice directement sur la surface ou hétérocoagulation entre des petites particules de silice préformées en solution et le substrat à couvrir. Dans le dernier cas, la couche d'oxyde formée est moins homogène que dans le premier cas [44].

1.4.3 Fonctionnalisation de la surface des biocapteurs avec des silanes

Afin d'ajouter des groupements fonctionnels à la surface des nanoparticules $\text{Ag}@\text{SiO}_2$, des silanes fonctionnels sont utilisés. Un silane fonctionnel comprend différents groupements: un ou des groupements hydrolysables (souvent $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ou $-\text{OCH}_3$) permettant de se lier de façon covalente à la surface de silice ainsi qu'une chaîne alkyle terminée par le groupement fonctionnel recherché. La Figure 19 représente un exemple typique de silane fonctionnel. On peut observer la présence de trois groupements $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$ qui sont les groupements hydrolysables et la chaîne aminopropyle qui est le groupement fonctionnel. La réaction de greffage de l'APTES (aminopropyltriéthoxysilane) suit le même mécanisme que celui de l'hydrolyse et de la

condensation du TEOS (voir section 1.4.2) Ainsi, le mécanisme procède tout d'abord par l'hydrolyse des groupements $\text{Si-O-CH}_2\text{-CH}_3$ en Si-OH suivi par la condensation entre les groupements silanol (voir Figure 19).

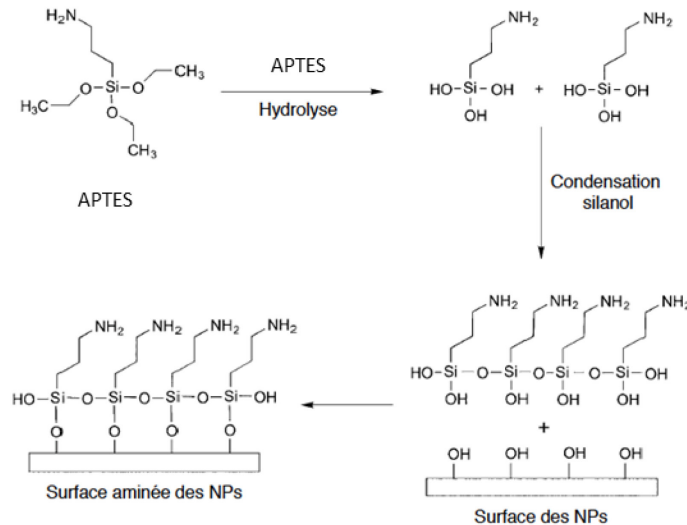


Figure 19: Mécanisme de greffage d'un silane fonctionnel sur une surface de silice [45].

La fonctionnalisation de surface est très importante lors de la synthèse des colloïdes non pas seulement à cause de la possibilité de greffer des biomolécules mais aussi parce que ces molécules présentes sur la surface peuvent être responsables de la stabilité ou de l'instabilité des colloïdes. Ce sujet sera abordé dans la prochaine section.

1.4.4 Théorie DLVO (stabilité colloïdale)

La théorie DLVO (nommée selon Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek) décrit l'interaction entre deux surfaces chargées interagissant dans un milieu liquide. Il y a deux types d'interaction entre des nanoparticules en solution: les interactions attractives, qui résultent des forces de van der Waals, et les forces répulsives qui vont dépendre de la charge à la surface des colloïdes. Afin d'avoir une bonne stabilité colloïdale, la barrière d'énergie doit être plus élevée ($\approx 10 \times kT$) que l'énergie des collisions dues au mouvement Brownien (voir Figure 20).

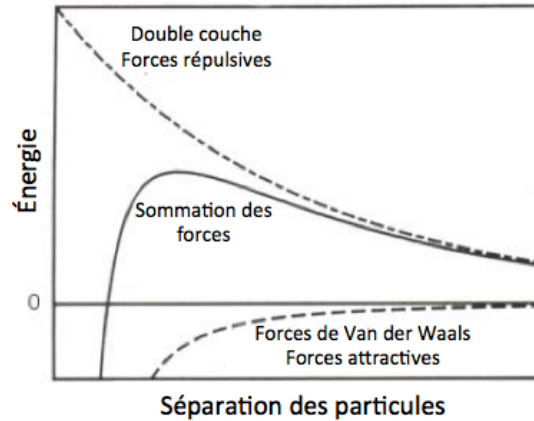


Figure 20: L'énergie d'interaction nette est la somme de l'attraction de Van der Waals et de la répulsion électrostatique. La barrière d'énergie représente la stabilité colloïdale[46].

Les forces d'attraction et de répulsion vont dépendre de la composition des particules ainsi que du milieu environnant. Plus les particules sont chargées, plus il faudra fournir de l'énergie au système afin de passer outre la barrière d'énergie. La force ionique du milieu a un impact important sur la distance à laquelle la charge se fera sentir (potentiel électrique). Plus la concentration en ions est élevée, plus les charges de surface seront écrantées et il sera beaucoup plus facile pour deux particules d'agréger. Donc, pour maintenir une certaine stabilité colloïdale, il faut que les forces répulsives soient dominantes. Il y a deux façons d'y arriver: la stabilisation stérique et/ou électrostatique (voir Figure 21). La première passe par l'utilisation de grosses molécules (souvent des polymères) qui empêchent les particules de se rapprocher suffisamment par encombrement stérique et ainsi empêchent les forces de Van der Waals de faire adhérer les particules ensemble. La stabilisation électrostatique consiste à utiliser des charges électrostatiques afin d'augmenter les forces de répulsion et ainsi empêcher encore une fois l'agrégation des particules.

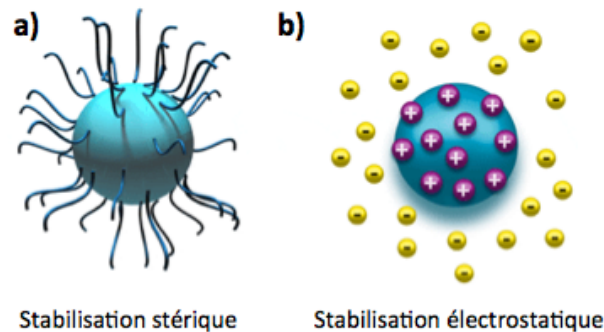


Figure 21: Schéma représentant les deux types de stabilisation colloïdale: a) stabilisation stérique b) stabilisation électrostatique[46].

1.5 Méthodes de caractérisation du biocapteur

Différentes méthodes de caractérisation furent utilisées pour la caractérisation des biocapteurs. Cette prochaine section couvrira la théorie derrière les différents appareils employés ainsi que les informations pertinentes qu'il est possible de tirer de ces analyses.

1.5.1 Spectrofluorimètre

La spectrofluorimétrie permet l'analyse de la fluorescence d'un échantillon. L'appareil, le spectrofluorimètre, permet de déterminer l'intensité de l'émission lumineuse, mais permet aussi d'obtenir des spectres d'excitation et d'émission des espèces étudiées.

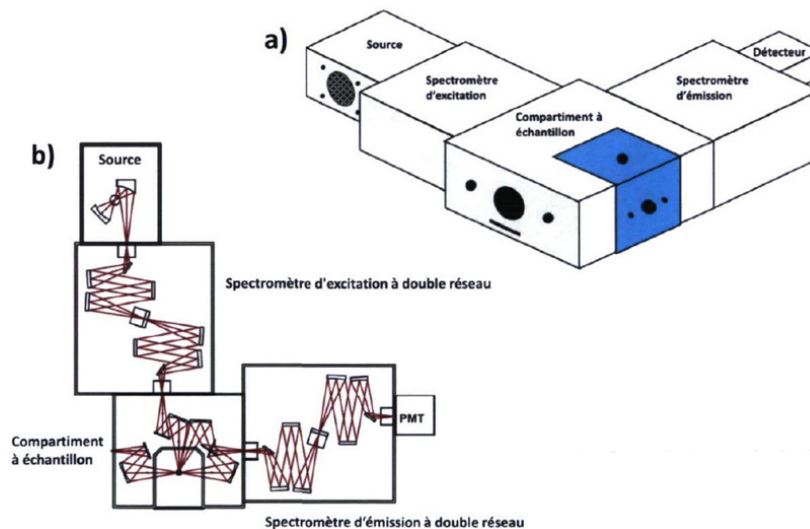


Figure 22: a) Différentes sections du spectrofluorimètre Jobin-Yvon Fluorolog 3 utilisé dans ce travail.
b) Schéma des différentes composantes du spectrofluorimètre[21].

Le spectrofluorimètre (voir Figure 22) est composé d'une source lumineuse d'excitation (lampe au xénon) et d'un spectromètre d'excitation (monochromateur) qui permet de sélectionner une gamme de longueurs d'onde se rendant à l'échantillon. Par la suite, la gamme de longueur d'onde d'émission se rendant au détecteur est sélectionnée grâce à un second spectromètre. Il est intéressant de noter que la fluorescence est récoltée à 90° afin de diminuer la lumière parasite pouvant se rendre jusqu'au détecteur. Cette méthode de caractérisation permet l'optimisation de la concentration de fluorophores au sein de la couche de silice fluorescente. De plus, elle permet de déterminer le facteur d'exaltation plasmonique.

1.5.2 Spectrofluorimètre à temps de vie

Cet appareil est utilisé pour déterminer le temps de vie à l'état excité d'espèces fluorescentes. Cette technique permet d'aller chercher de l'information supplémentaire sur les fluorophores utilisés qu'il est impossible de déterminer par fluorescence stationnaire (« *steady-state* »). Par exemple, il est possible de déterminer quel type d'extinction un fluorophore peut subir (voir section 1.1.3).

Cet appareil est très semblable à un spectrofluorimètre traditionnel. Cependant, la source continue est remplacée par une source pulsée et diverses composantes électroniques permettent de compter le temps écoulé entre la génération de l'impulsion laser d'excitation et l'arrivée au détecteur d'un photon de fluorescence (TCSPC, « *time-correlated single photon counting* »). Ainsi, en faisant des milliers d'acquisitions, il est possible d'obtenir un histogramme du nombre de photons émis en fonction du temps. Cet histogramme a la forme d'une décroissance exponentielle de laquelle il est possible d'extraire le temps de vie moyen d'un fluorophore à l'état excité (voir Figure 23). Cette méthode permet de voir l'effet du cœur plasmonique sur la fluorescence des chromophores.

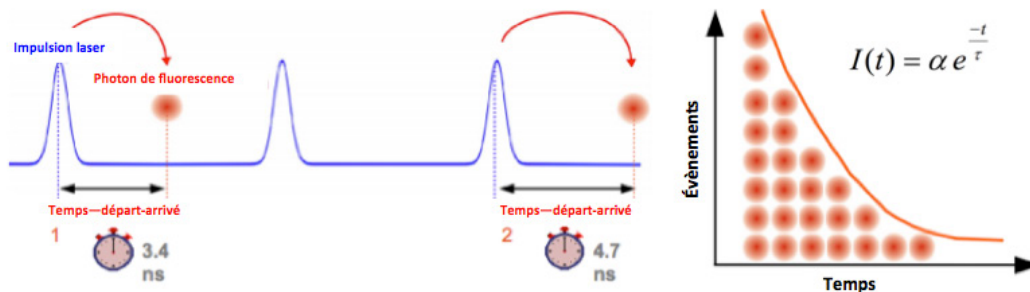


Figure 23: Représentation schématique du principe du TCSPC (gauche) et histogramme du nombre de photons reçus en fonction du temps ayant la forme d'une exponentielle décroissante (droite)[47].

1.5.3 Spectromètre UV-Vis

La spectrométrie UV-Vis permet de mesurer la transmittance de la lumière dans un échantillon en fonction de la longueur d'onde. Un spectromètre UV-Vis standard est composé d'une source lumineuse (lampe au xénon), d'un monochromateur et d'un détecteur (voir Figure 24). Lors du passage de la lumière dans l'échantillon, il peut y avoir absorption ou diffusion diminuant ainsi la lumière perçue par le détecteur. Cette technique permet de tirer des informations qualitatives sur

les nanoparticules synthétisées. Ainsi, il est possible d'avoir une idée de la taille et de la polydispersité des colloïdes puisque la diffusion et l'absorption de la lumière par un colloïde sont dictées par ces deux paramètres. Il est aussi possible de savoir si de l'agrégation s'est produite dans un échantillon.

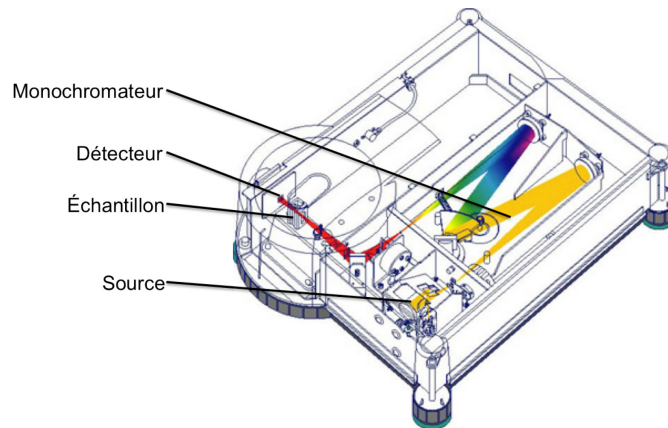


Figure 24: a) Schéma de l'appareil UV-Vis Cary-50 utilisé[48]

1.5.4 Microscopie en champ sombre et microscopie de fluorescence

Les techniques de microscopie en champ sombre et de fluorescence se démarquent par rapport aux techniques d'absorption UV-Vis et de spectrofluorimétrie du fait qu'il s'agit d'une analyse de type «particule par particule» plutôt qu'une analyse moyennée sur l'ensemble d'une population.

La microscopie en champ sombre est une technique très utilisée pour la caractérisation de nanoparticules plasmoniques puisque ces dernières diffusent énormément la lumière. Grâce à l'utilisation d'un condensateur spécial (voir Figure 25), seule la lumière diffusée peut se rendre à l'objectif. En l'absence d'un échantillon diffusant, aucune lumière n'est transmise vers les objectifs et le fond apparaît noir (d'où l'appellation "champ sombre"). Cette technique permet de caractériser les colloïdes puisque la coloration de la lumière diffusée par des nanoparticules à partir d'une source à continuum correspond à leur fréquence plasmonique. Ainsi, il est possible d'étudier de façon qualitative la forme et la taille des colloïdes en plus de la possibilité d'observer l'agrégation.

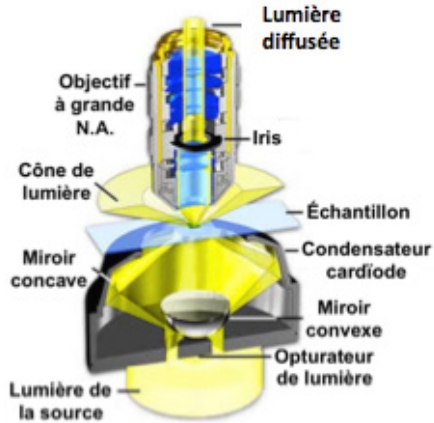


Figure 25: Représentation schématique de l'optique d'un microscope en champ sombre.

La microscopie de fluorescence suit le même principe que la spectrofluorimétrie. Cependant, les monochromateurs sont remplacés par un cube de fluorescence (un système de filtres permettant la sélection des plages de longueurs d'onde d'excitation et d'émission) et la fluorescence peut être visualisée directement dans les oculaires ou bien à l'aide d'une caméra numérique (voir Figure 26).

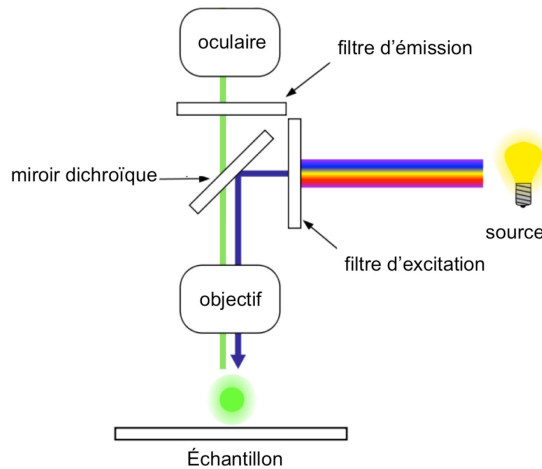


Figure 26: Représentation schématique de la microscopie de fluorescence[49].

Il est intéressant de noter qu'il est aussi possible de jumeler ces deux techniques de microscopie avec un spectromètre afin d'obtenir le spectre d'extinction et/ou de fluorescence de nanoparticules individuelles ou d'agrégats de particules.

1.5.5 Potentiel Zêta

Le potentiel Zêta (ζ) est très utilisé dans le domaine des colloïdes puisqu'il est un indicateur de la stabilité des particules en suspension. Cette valeur représente la différence de potentiel entre le milieu dans lequel se trouve la particule et la phase stationnaire qui l'entoure (voir Figure 27).

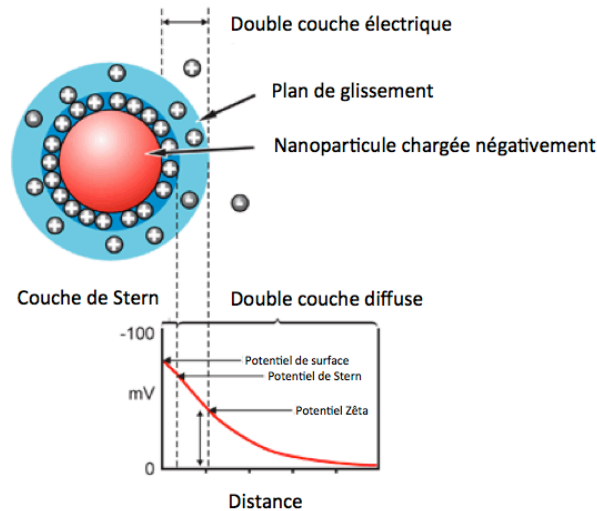


Figure 27: Représentation schématique du potentiel Zêta[50].

Cette valeur est dépendante du pH et de la force ionique du milieu. Une suspension colloïdale est considérée stable lorsque la valeur du potentiel zêta excède 25 mV (potentiel positif ou négatif). Lorsque les valeurs sont comprises entre -25 et +25 mV, elle est considérée instable puisque les particules ne sont pas assez chargées pour qu'il y ait répulsion (voir section 1.4.4). Cette méthode permet de déterminer la stabilité des colloïdes et d'avoir des indications sur le succès d'une fonctionnalisation de surface en regardant la charge présente à la surface des particules (par exemple $-\text{NH}_3^+$ vs $-\text{COO}^-$).

L'appareil utilisé dans le cadre de ces travaux est un Zêta Sizer Nano de la compagnie Malvern. Cet appareil mesure la diffusion des nanoparticules dans un liquide en appliquant un champ électrique (mobilité électrophorétique). À partir de la mesure de la mobilité électrophorétique l'on peut déterminer le potentiel Zêta par relation mathématique[50].

1.5.6 Microscopie électronique en transmission

Le microscope électronique en transmission, souvent appelé TEM («*Transmission Electron Microscopy*»), est une technique de microscopie utilisant un faisceau d'électrons. Les électrons interagissent avec l'échantillon et peuvent être absorbés ou transmis. Ces derniers sont ensuite imagés en utilisant une caméra ou une plaque phosphorescente. L'utilisation d'électrons permet d'atteindre des résolutions beaucoup plus élevées qu'en microscopie optique. Ainsi, le TEM est utilisé afin de caractériser de façon directe les particules (mesurer les cœurs d'argent, mesurer l'épaisseur et vérifier l'homogénéité de la couche de silice).

1.5.7 Spectrométrie d'émission atomique par torche à plasma

Afin de doser les nanoparticules, l'ICP-AES « *Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy* » ou, en français, "spectrométrie d'émission atomique par torche à plasma") est utilisée. C'est une méthode d'analyse élémentaire très sensible qui permet de doser très facilement la quasi-totalité des éléments présents dans le tableau périodique. La température élevée du plasma permet une atomisation complète et une excitation efficace des atomes. Lors du retour des atomes au niveau fondamental, il y a émission de lumière dont l'intensité est fonction de la concentration des éléments dans l'échantillon. Ainsi, en utilisant un étalonnage externe, il est possible de doser l'argent et de déterminer la concentration des nanoparticules.

1.6 L'acide désoxyribonucléique (ADN)

L'acide désoxyribonucléique, communément appelé ADN, contient l'information génétique complète des organismes vivants[51]. Cette molécule est un long polymère composé de séquences de quatre monomères différents (nucléotides). Chacun des nucléotides comprend un groupement phosphate, un sucre (le désoxyribose) et une base azotée. Dans l'ADN, il existe quatre types de base azotée: l'adénine (A), la thymine (T), la cytosine (C) et la guanine (G) (voir Figure 28)[52].

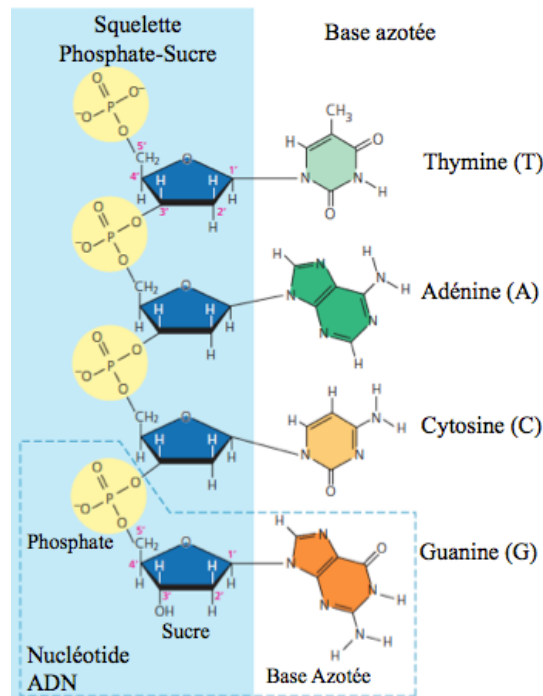


Figure 28: Représentation schématique des différents composants de l'ADN[52].

L'ADN, sous sa forme la plus stable, est composé de deux brins reliés ensemble par des ponts hydrogène entre les paires de base complémentaires. Lors de la formation de la double hélice l'ADN adopte une structure hélicoïdale dont les distances sont très précises. La stabilité de l'ADN est améliorée lorsqu'elle est sous forme de double hélice, car les nucléotides (plutôt hydrophobes) se retrouvent à l'intérieur et sont entourés de groupements très hydrophiles: les groupements phosphate.

Pour former la double hélice d'ADN, l'appariation des paires de bases se fait entre A-T (adénine-thymine) par deux ponts hydrogène et entre C-G (cytosine-guanine) par trois ponts hydrogène (voir Figure 29). Cette appariation des paires de bases est nommée « appariation Watson-Crick. Il

est intéressant de noter qu'un double brin d'ADN contenant une majorité de paires de bases cytosine et guanine sera plus stable qu'un double brin d'ADN contenant une majorité de paires de bases adénine et thymine, car les interactions hydrogène seront plus fortes.

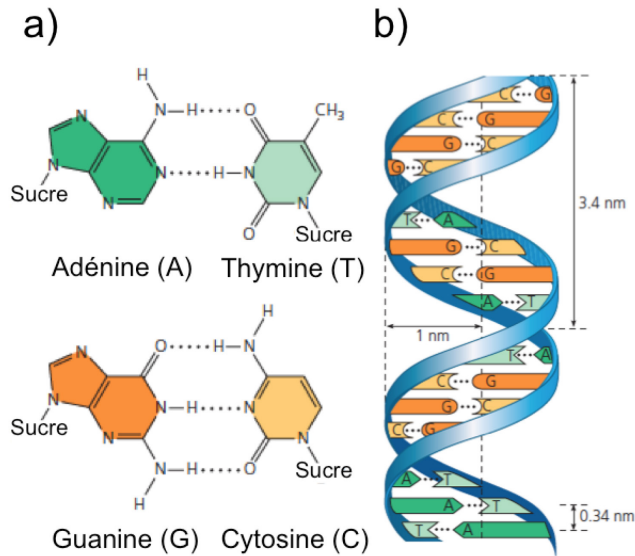


Figure 29: a) Appariation Watson-Crick (A-T, C-G) des paires de bases grâce aux ponts hydrogène. b) représentation schématique de la double hélice d'ADN[52].

Cependant, dans le cadre de ces travaux, ce n'est pas l'ADN en entier que l'on cherche à détecter, mais plus la présence de certains gènes. Un gène est une séquence d'acides nucléiques, une unité d'information génétique (voir Figure 30). Il sert de code pour la fabrication de protéines, d'ARN fonctionnels et d'enzymes. De ce fait, certains gènes sont responsables de la présence ou l'absence d'antigènes présents à la surface des hématies (globules rouges).

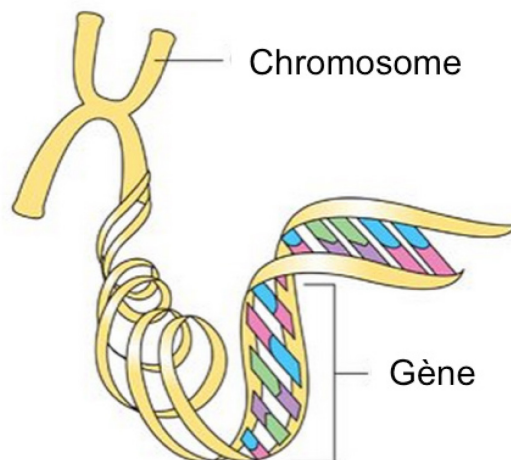


Figure 30: Représentation d'un gène dans l'ADN[53].

1.7 Méthode de détection de l'ADN

1.7.1 Réaction d'hybridation

Le fonctionnement du biocapteur développé repose sur la réaction d'hybridation entre deux brins d'ADN complémentaires: une sonde et une cible (voir Figure 31). La sonde est choisie en fonction de la séquence d'ADN cible recherchée, par exemple, une séquence spécifique à un gène d'intérêt. L'avantage de la réaction d'hybridation provient du fait qu'elle est hautement spécifique et qu'il est possible d'ajuster les conditions d'hybridation afin de parvenir à discriminer jusqu'à un seul nucléotide de différence entre deux séquences cibles. Ainsi, en jouant sur différents paramètres tels que la température d'hybridation et la concentration en sel et d'autres espèces chimiques, il est possible d'augmenter ou de diminuer la stringence de l'hybridation (une stringence élevée déstabilise la formation de double-brins désappariés).

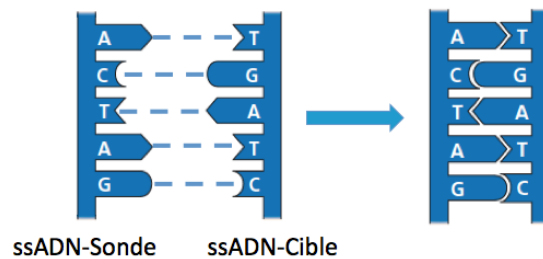


Figure 31: Schéma de l'hybridation entre une séquence d'ADN sonde et une séquence d'ADN cible complémentaire par l'appariement Watson-Crick des paires de base (G-C, A-T)[52].

Avant de parler de l'effet de la température sur la stringence de l'hybridation, il est intéressant de parler de la T_m (« *melting temperature* »: température de fusion) de l'ADN. La température de fusion d'un brin d'ADN est définie par la température à laquelle 50% des doubles hélices d'ADN redeviennent sous la forme de simples brins puisque l'énergie thermique est suffisante pour briser les interactions entre les nucléotides. Ainsi, lorsque deux brins d'ADN ne sont pas parfaitement complémentaires, l'énergie d'interaction sera plus faible que lorsque les deux brins sont parfaitement complémentaires. En modulant la température d'hybridation, il est ainsi possible d'empêcher l'hybridation de séquences non complémentaires.

Il est aussi possible de moduler la stringence de l'hybridation en modifiant la concentration d'ions monovalents en solution (surtout Na^+). Les ions vont interagir de façon électrostatique avec les

groupements phosphate de l'ADN et vont faire en sorte de diminuer les répulsions électrostatiques entre les deux brins d'ADN pour favoriser l'hybridation. Ainsi, une haute teneur en sel va stabiliser le double brin et une faible teneur va diminuer sa stabilité. Donc, pour obtenir une stringence élevée, il faut utiliser une température élevée ainsi qu'une concentration en sel faible. Au contraire, pour obtenir une stringence faible, il faut utiliser une température plus basse et une concentration en sel plus élevée. Le gros désavantage de l'utilisation de la réaction d'hybridation dans la détection d'ADN repose sur le fait qu'elle ne donne aucun signal mesurable (optique, chimique, électrique, etc.). Afin de produire un signal, il faut utiliser un transducteur externe.

Plusieurs groupes de recherche se sont penchés sur le sujet afin d'obtenir un signal mesurable. Par exemple, Elghanian *et al* ont utilisé le changement colorimétrique du plasmon lors de l'agrégation de nanoparticules d'or causé par la présence de brins d'ADN complémentaires[54]. Graham *et al* ont utilisé sensiblement la même approche, cependant en utilisant l'augmentation du signal raman d'une molécule en surface des nanoparticules lors de l'agrégation[55].

1.7.2 Transducteur polymérique

Notre approche repose sur le changement de fluorescence d'un transducteur polymérique lors de l'hybridation. Le transducteur utilisé dans le cadre de cette recherche est un polythiophène, le poly[bromure de 1H-imidazolium, 1 méthyl-3-[2-[(4-méthyl-3-thiényl)oxy]éthyle]][15]. Ce polymère possède la propriété de changer de conformation lors de l'interaction avec une double hélice d'ADN, ce qui affecte son intensité de fluorescence. Ce changement dans l'intensité d'émission du polymère vient du fait que lorsqu'il est sous sa forme planaire, l'alignement des orbitales π augmente la longueur de délocalisation des électrons et par le fait même diminue l'énergie nécessaire à son excitation. Ce déplacement bathochrome de la bande d'absorption du polymère entraîne, lorsque ce dernier est excité à une longueur d'onde correspondant à sa conformation non-planaire, une diminution de l'efficacité d'excitation et par le fait même de l'intensité du signal de fluorescence (voir Figure 32).

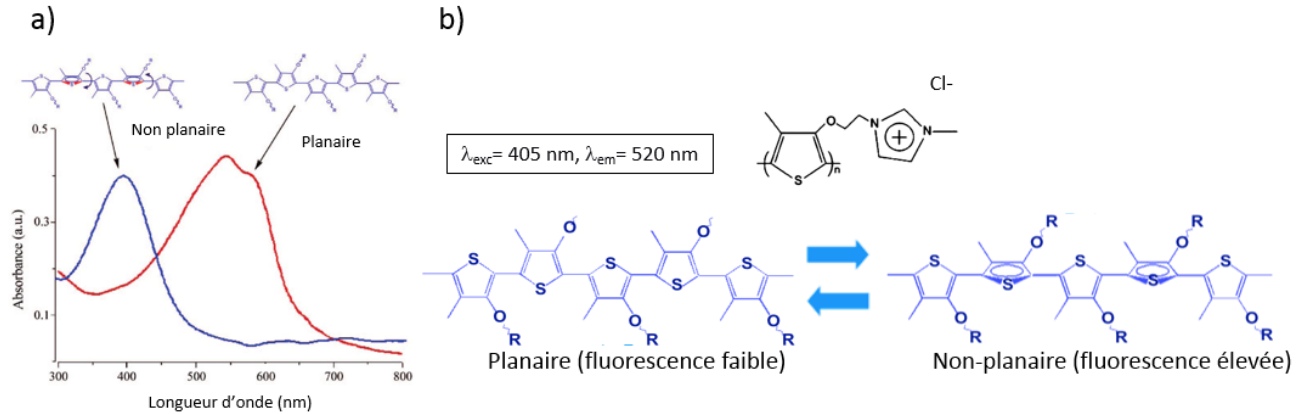


Figure 32: a) Spectres d'absorption UV-Vis du polymère dans sa forme planaire (rouge) et non planaire (bleu). b) Schéma du changement de la conformation du polymère et effet sur sa fluorescence[16].

La procédure de détection est fort simple. Tout d'abord, le polymère transducteur chargé positivement se lie de façon électrostatique avec l'ADN sonde chargé négativement. Sous cette forme appelée "duplex", le polymère adopte sa conformation planaire non fluorescente. Lors de l'ajout de l'ADN complémentaire, l'hybridation survient et le polymère adopte une conformation non planaire fluorescente que l'on nomme "triplex" (voir Figure 33).

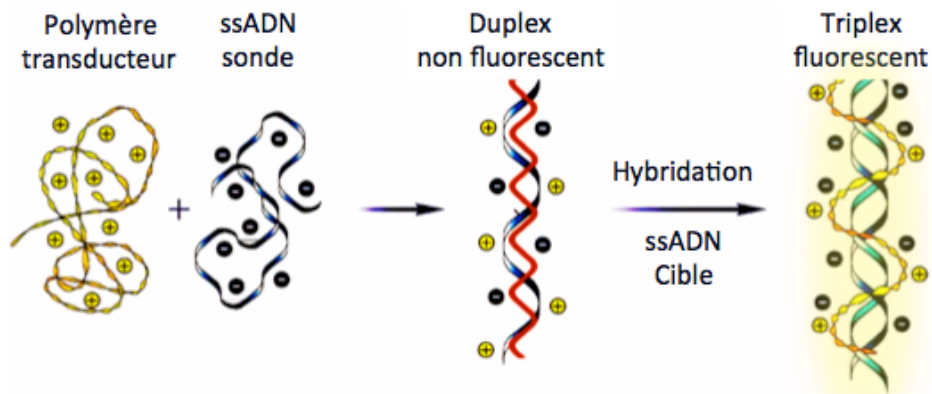


Figure 33: Illustration du procédé de transduction de l'hybridation d'ADN à l'aide du polymère cationique[16].

Le principal facteur limitant l'efficacité de cette approche de transduction est le faible rendement quantique de fluorescence (~3%) du polymère, ce qui résulte en une sensibilité de détection perfectible lorsqu'il est utilisé seul en solution. De plus, le polymère offre une robustesse relativement modeste à la photodégradation, ce qui limite la puissance de la source d'excitation

qui peut être utilisée. C'est pourquoi une structure plasmonique est utilisée afin de rehausser la fluorescence et la photostabilité de ce dernier.

1.7.3 Utilisation de nanoparticules Ag@SiO₂

Comme il est expliqué dans la section 1.3, l'argent est le métal ayant la plus grande exaltation plasmonique dans tout le domaine du visible et du proche infrarouge. L'utilisation de nanoparticules sphériques d'environ 50 nm d'argent permet d'obtenir un plasmon localisé à environ 400 nm, ce qui permet un bon recouvrement avec le spectre d'absorption du polymère (AH-35) et offre la possibilité d'un bon couplage plasmonique[31] (voir Figure 34).

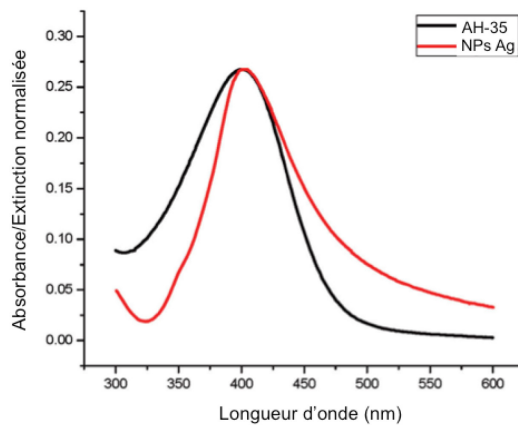


Figure 34: Spectre d'absorption du polymère (noir) et d'extinction des nanoparticules d'argent (rouge) utilisées dans ce travail[56].

En utilisant une structure similaire à celle utilisée dans le cadre de cette maîtrise, Mathieu Lessard Viger a rapporté en 2011 une augmentation de la fluorescence du polymère d'environ 30 fois lorsque qu'il était adsorbé sur des nanoparticules Ag@SiO₂ avec une couche de silice d'environ 8 nm (voir Figure 35) [56]. De plus, des travaux publiés la même année [18] ont montré que la juxtaposition du transducteur polymérique et d'une nanoparticule cœur-coquille recouverte d'un fluorophore accepteur adéquat permettait d'obtenir un effet d'amplification de type "FRET" similaire à celui démontré précédemment par Ho *et al.* avec des sondes marquées[57].

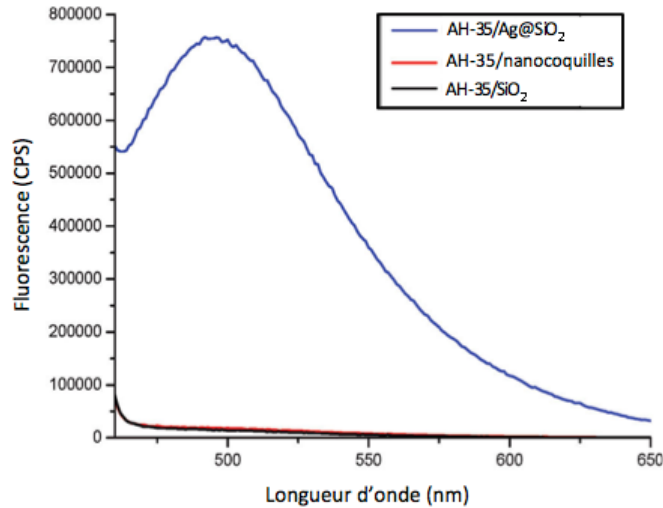


Figure 35: Spectre de fluorescence du polymère adsorbé sur des nanoparticules Ag@SiO₂ (bleu), sur des nanocoquilles de silice (rouge) et sur des nanoparticules de silice (noir)[56].

Par conséquent, pour les raisons décrites ci-dessus, la nanoparticule d'argent est un candidat de choix pour son utilisation dans le biocapteur pour le génotypage sanguin.

1.7.4 Cytométrie à flux

La cytométrie à flux, utilisée comme appareil de détection dans ce projet, est une technique de mesure déjà bien implantée dans les centres de soins de santé. Elle est principalement utilisée en biologie pour la détection et l'analyse de cellules [58]. Les cytomètres à flux peuvent extraire énormément d'informations en une seule mesure. Ainsi, il est possible d'extraire la diffusion frontale et latérale ainsi que la fluorescence d'un échantillon à plusieurs longueurs d'ondes d'excitation/émission en utilisant des sources et des filtres appropriés. Même si ces appareils sont conçus pour compter des cellules, il est possible d'y faire éluer une multitude d'échantillons.

Le principe de fonctionnement de cet appareil est plutôt simple. L'échantillon est injecté et est ensuite concentré dans un petit volume par focalisation hydrodynamique. L'échantillon intercepte ensuite un ou plusieurs faisceaux laser et la fluorescence est récoltée à 90°, tandis que la diffusion est collectée à la même longueur d'onde que le laser, de façon frontale ou latérale (90°) (voir Figure 36b).

Notre biocapteur nanoparticulaire possède plusieurs propriétés rendant aisée sa détection par un cytomètre à flux. Tout d'abord, les particules plasmoniques diffusent très fortement la lumière. Tel que démontré par Yguerabide *et al.*[29], des particules d'argent de 30 nm diffusent environ 2000 fois plus de lumière que des particules de polystyrène de même taille. Cela permet ainsi de détecter beaucoup plus facilement le passage de ces particules par diffusion. De plus, la fluorescence est exaltée par la présence d'un cœur métallique, ce qui augmente leur signal et par le fait même leur détection. L'appareil utilisé dans ce travail est un Partec Cyflow ML (voir figure suivante).

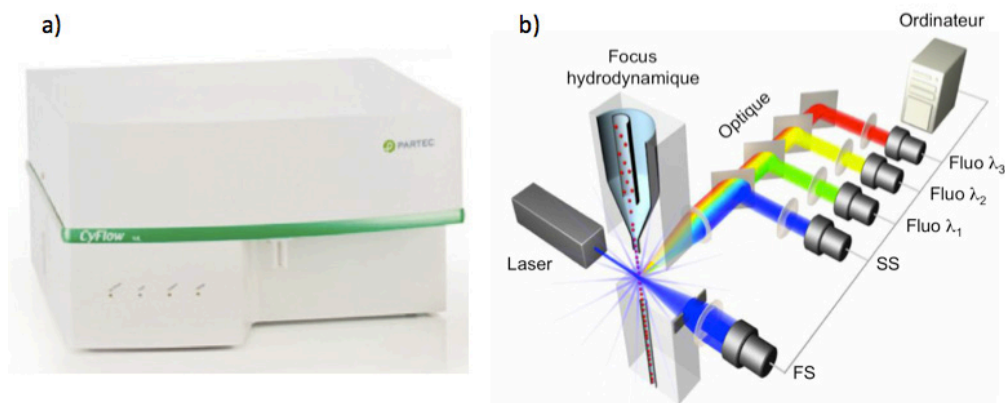


Figure 36: a) Cytomètre à flux Partec Cyflow ML. b) Schéma optique d'un cytomètre à flux.

Cet appareil a l'avantage de posséder plusieurs sources d'excitation et permet de récolter la fluorescence à 90° ainsi que la diffusion (frontale (FS) et latérale (SS)).

De plus, contrairement à un spectrofluorimètre classique, le cytomètre à flux permet d'utiliser une approche «particule par particule», ce qui permet de tirer de l'information sur chacun des événements et non pas seulement sur un signal moyen, ce qui serait le cas dans une approche par fluorescence en cuvette. Ensuite, dans ce type d'appareil, il est possible d'analyser complètement le volume de l'échantillon et ce, très rapidement, ce qui permet d'avoir une bonne cadence analytique. Pour terminer, ce type d'appareil a une bonne sensibilité, permettant ainsi de détecter de faibles concentrations de nanoparticules en solution.

Chapitre 2: Les nanoparticules utilisées (synthèse et caractérisation)

2.1 Introduction sur l'architecture utilisée

2.1.1 Architecture plasmonique de type multicouche

Le biocapteur utilisé dans le cadre de ces recherches est basé sur une architecture plasmonique développée dans le laboratoire du professeur Boudreau par Mathieu Lessard Viger [17, 18] (voir Figure 37).

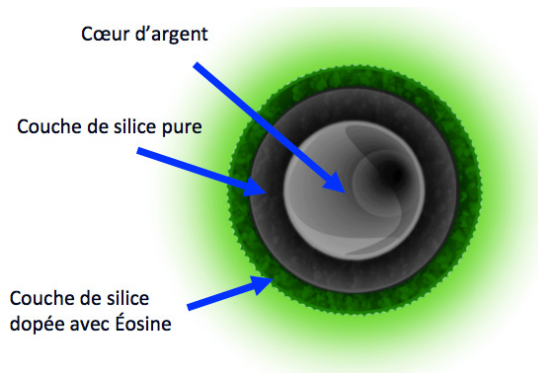


Figure 37: Architecture plasmonique multicouche.

Le cœur d'argent est recouvert d'une couche de silice pure qui permet le contrôle de la distance cœur-fluorophores. Tel qu'expliqué plus tôt, les fluorophores situés trop proche du cœur métallique vont subir une atténuation de la fluorescence tandis que ceux situés trop loin n'auront pas d'effet plasmonique. Cette couche de silice pure est recouverte d'une deuxième couche de silice plus mince dopée avec des espèces fluorescentes.

Cette architecture se prête bien à des études de caractérisation photophysiques ou lorsque de petites quantités de colloïdes suffisent à la réalisation d'une étude. Cependant, vu le nombre élevé d'étapes, il est difficile avec cette approche de produire aisément des lots de nanoparticules successifs avec des propriétés répétables puisqu'il faut optimiser indépendamment chacune des couches de silice. Le but de ce projet est le développement d'une méthode simplifiée de synthèse du nanobiocapteur pour le génotypage sanguin. Afin d'y arriver, une architecture simplifiée fut développée afin d'augmenter la répétabilité de la synthèse et diminuer le temps nécessaire à sa réalisation. Cette nouvelle architecture sera abordée dans ce chapitre.

2.1.2 Nouvelle architecture plasmonique

Afin d'augmenter la répétabilité de la synthèse, le contrôle de la distance fluorophore-métal fut sacrifié. Dans cette nouvelle architecture, la couche de silice fluorescente est formée en une seule étape, ce qui diminue le nombre d'étapes nécessaires à la synthèse des colloïdes fluorescents (voir Figure 38). Cette réduction du nombre d'étapes fait en sorte de diminuer le temps requis pour effectuer la synthèse des colloïdes fluorescents en plus de minimiser les pertes de nanoparticules lors des étapes de centrifugation, ce qui augmente la reproductibilité de la synthèse.

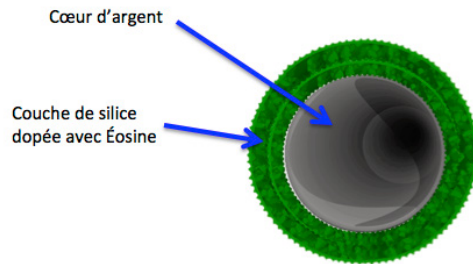


Figure 38: Architecture simplifiée utilisée dans le cadre de ce travail.

La modification semble très simple en soi, mais plusieurs optimisations ont dû être effectuées. Ces différentes étapes seront abordées dans la prochaine section.

2.2 Synthèse et caractérisation du biocapteur

2.2.1 Le cœur métallique

La synthèse du cœur métallique a été adaptée de la littérature [17, 18, 38, 56]. Typiquement, une solution de citrate de trisodium aqueuse est chauffée à ébullition et le précurseur d'argent est ajouté très rapidement (nitrate d'argent). Le mélange est laissé sous ébullition durant 50 minutes afin de permettre la réduction de l'argent et la croissance des nanoparticules. On laisse par la suite le mélange revenir à la température ambiante (voir Figure 39). Afin d'enlever les grosses particules formées lors de la synthèse, une centrifugation (500 RPM, 60 min) est effectuée. Le surnageant est conservé et le culot est jeté.

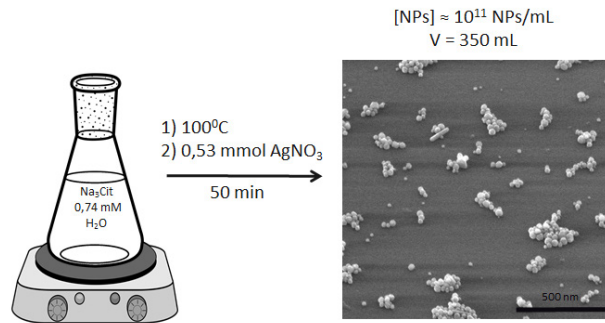


Figure 39: Schéma de synthèse des nanoparticules d'argent (image provenant d'un microscope électronique à balayage).

La principale modification apportée au protocole tiré de Liu *et al*[38] est l'ordre d'ajout des réactifs. Dans le protocole original, le citrate de sodium était ajouté à la solution d'argent qui était sous ébullition. Cependant, cela faisait en sorte que la synthèse était difficilement répétable puisque le pH initial de l'eau déminéralisée était difficile à contrôler d'une journée à l'autre (pH H₂O déminéralisée ≈ 5,5). Puisque le pouvoir réducteur du citrate de sodium diminue avec un pH plus acide, la vitesse de nucléation et la croissance changeait en fonction du pH de la solution. Afin de palier à ce problème, l'ordre d'ajout des réactifs fut inversé. Ainsi, en ajoutant d'abord le citrate de sodium à l'eau déminéralisée et en portant le mélange à ébullition, le pH se stabilise à environ 7 et la synthèse est beaucoup plus répétable, comme le montre la Figure 40, qui représente un test de répétabilité de la synthèse originale ainsi que la méthode inverse développée au laboratoire. Dans la méthode de Liu *et al* (Figure 40b), l'on peut voir l'élargissement du spectre UV-Vis, signe de polydispersité des nanoparticules lors de la synthèse. De plus, il est possible de voir que le spectre change beaucoup d'une synthèse à l'autre, signe d'une mauvaise répétabilité de la méthode. En utilisant la méthode développée (Figure 40a) l'on voit un spectre UV-Vis beaucoup plus étroit et une répétabilité beaucoup plus grande de la méthode.

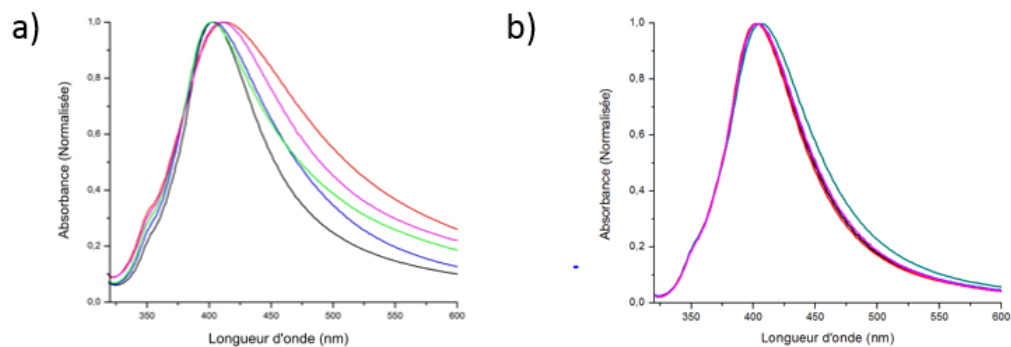


Figure 40: Spectres d'extinction UV-Vis de colloïdes d'argent préparés à l'aide de a) la méthode tirée de la littérature[38], et b) de la méthode inverse développée au laboratoire.

Protocole détaillé de synthèse des cœurs métalliques (Ag)¹

- Dans un erlenmeyer de 1 L nettoyé avec HNO₃ concentré
 - 500 mL H₂O déminéralisée (DM)
 - 114 mg de sodium citrate de trisodium dihydraté
 - Sous forte agitation, porter à ébullition
 - Lorsque la solution bout vigoureusement, ajouter 500 µL d'une solution de AgNO₃ 1,06 M dans de l'eau DM
 - Laisser bouillir sous agitation durant 50 minutes
 - Arrêter la plaque chauffante et laisser revenir à température ambiante sous agitation
 - Compléter le volume à 350 mL avec H₂O DM (le volume après ébullition varie)
 - Centrifuger (500 RPM, 60 min), et garder le surnageant

2.2.2 La couche de silice en une étape

2.2.2.1 Couche de silice pure

La méthode utilisée afin de former une couche de silice sur le cœur d'argent est une méthode de Stöber modifiée et adaptée de la littérature [38].

Protocole détaillé de recouvrement des cœurs d'argent avec de la silice (voir Figure 41)

- Dans une fiole conique de 50 mL sous agitation mécanique
 - 30 mL d'éthanol anhydre
 - 5 mL des nanoparticules d'argent de l'étape précédente ($[NPs] \approx 1 \times 10^{11}$ NPs/mL)
 - 700 µL d'une solution de TEOS 10 mM (tetraethylorthosilicate) dans l'éthanol
 - 400 µL de NH₄OH 30%
 - Réaction 20-24 h à température ambiante sous agitation
 - Centrifuger 3 fois (8000 RPM, 15 min) et redisperser dans 12 mL d'éthanol anhydre ($[NPs] \approx 6 \times 10^{10}$ NPs/mL).

¹ Pour toutes les informations sur les produits utilisés, veuillez-vous référer à la section « Liste des produits chimiques utilisés » située en annexe.

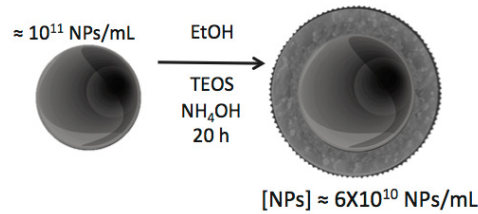


Figure 41: Schéma de synthèse de la couche de silice pure.

Des spectres d'extinction UV-Vis sont effectués avant et après l'ajout de la silice (voir Figure 42) afin de déterminer de façon qualitative l'homogénéité des colloïdes. La largeur de la bande plasmonique reflète la polydispersité des particules et la présence d'un épaulement à basse énergie est indicateur d'une agrégation (voir Figure 42). Dans ce cas précis, l'agrégation des particules provenait d'un ajout insuffisant de précurseur silane. Ainsi, lorsque la distance interparticulaire devient plus petite que le diamètre du cœur métallique, il y a un déplacement vers le rouge (bathochrome) du plasmon dû à l'interaction interparticulaire [54, 59].

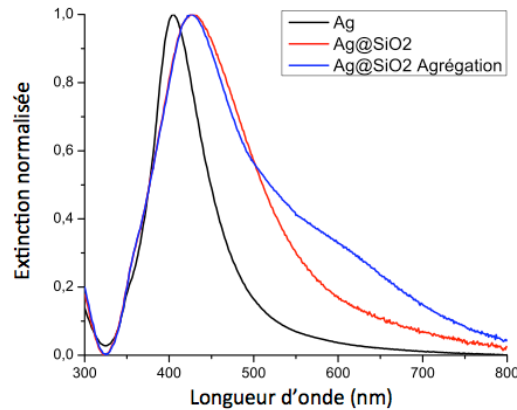


Figure 42: Spectres d'extinction UV-Vis normalisés de NPs Ag et de NPs Ag@SiO₂ sans et avec agrégation.

Lorsque les particules sont recouvertes d'une couche de silice il est normal d'observer un déplacement bathochrome du plasmon. Cet effet provient de l'augmentation de l'indice de réfraction à proximité de la nanoparticule (éthanol $n = 1,36$ / silice $n = 1,46$) [60-62].

2.2.2.2 Couche de silice fluorescente

Il est aussi possible d'incorporer un chromophore dans la silice afin de rendre les biocapteurs fluorescents. Dans ce cas, la première étape consiste à effectuer la synthèse du précurseur silane fluorescent afin de greffer de façon covalente les molécules fluorescentes à l'intérieur du réseau de silice. Deux méthodes différentes de la synthèse du précurseur silane fluorescent furent étudiées.

La première méthode consistait à utiliser la technique développée pour les nanoparticules multicouche et tenter de l'appliquer pour la synthèse de silice fluorescente en une seule étape [17, 63]. Dans cette synthèse, aucune base n'est utilisée afin d'effectuer le couplage entre l'APTES (aminopropyltriéthoxysilane) et l'EiTC (éosine isothiocyanate). Afin d'avoir un bon rendement, un excès d'APTES est utilisé ainsi qu'un temps de réaction plus long (voir Figure 43). Cependant, le nombre important d'amines en excès incorporé au sein de la silice fait en sorte que le système colloïdal devient instable puisque la charge en surface est insuffisante pour empêcher l'agrégation (voir Figure 46a).

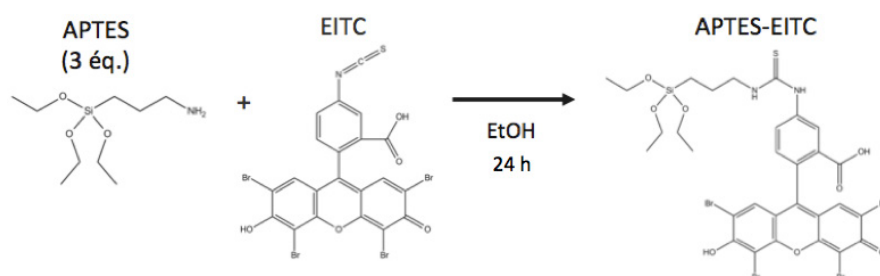


Figure 43: Schéma de synthèse du précurseur silane fluorescent (APTES:EiTC; 3:1).

Une autre méthode de synthèse du précurseur silane étant nécessaire, l'utilisation d'un léger excès d'APTES ainsi qu'une base (triéthylamine) a permis d'augmenter le couplage. Cette diminution d'APTES non réagi permet d'incorporer moins de groupements amine sur la surface de silice. De plus, cette méthode adaptée de la littérature a permis de réduire le temps de réaction à deux heures, ce qui diminue beaucoup le temps nécessaire à la synthèse [64] (voir Figure 44). Cette méthode permet aussi d'augmenter la stabilité des colloïdes synthétisés (voir Figure 46a).

Protocole détaillé de synthèse du précurseur silane fluorescent (1,2:1 APTES:EiTC)

- Dans une fiole de 2 mL
 - 4 mg EiTC (5,7 μ mol)
 - 114 μ L de N,N-diméthylformamide anhydre
 - 1,6 μ L de triéthylamine (11,5 μ mol)
 - 1,6 μ L d'APTES (6,8 μ mol)
 - Laisser réagir sous agitation mécanique 2 h
- Transférer la solution dans une fiole conique de 15 mL
 - Compléter la solution à 13,5 mL avec de l'éthanol anhydre ([Éosine] \approx 42 μ M)

Cette solution peut être conservée à -20°C à la noirceur pour plus de deux semaines et ce, sans modifier la fluorescence des colloïdes synthétisés.

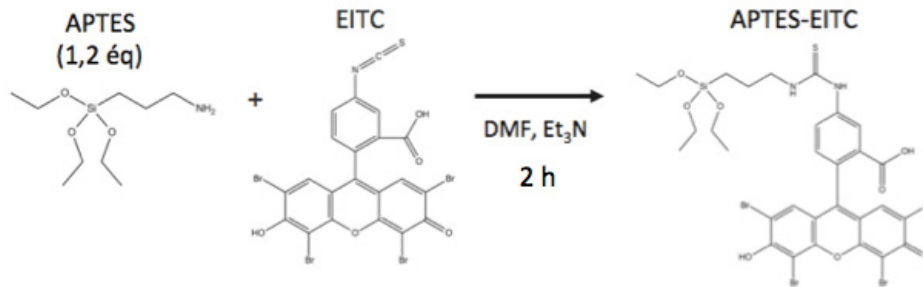


Figure 44: Schéma de synthèse du précurseur silane fluorescent (APTES:EtTC; 1,2:1).

Par la suite, la méthode de recouvrement des cœurs d'argent fut tentée en ajoutant différentes quantités de précurseur fluorescent afin de voir l'effet de la concentration de ce dernier sur la formation de la couche de silice.

Protocole détaillé de recouvrement de silice fluorescente des cœurs d'argent

- Dans une fiole conique de 50 mL sous agitation mécanique
 - 30 mL d'éthanol anhydre
 - 5 mL des nanoparticules d'argent ($[\text{NPs}] \approx 1 \times 10^{11}$ NPs/mL)
 - 700 μL d'une solution de TEOS 10 mM (tetraethylorthosilicate) dans l'éthanol
 - Entre 0 et 4,5 μM du précurseur silane fluorescent
 - 400 μL de NH_4OH 30%
 - Réaction 20-24h à température ambiante sous agitation
 - Centrifuger trois fois (8000 RPM, 15 min) et redisperser dans 12 mL d'éthanol anhydre ($[\text{NPs}] \approx 6 \times 10^{10}$ NPs/mL).

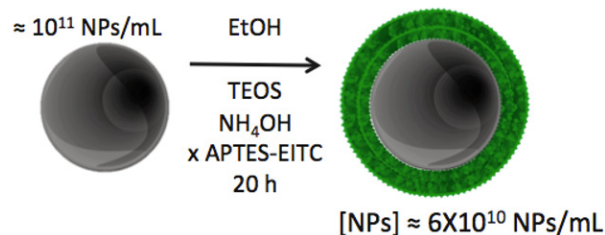


Figure 45: Schéma réactionnel de la synthèse de la couche de silice fluorescente.

Afin de vérifier si cette méthode pourrait être utilisée à plus grande échelle, une synthèse fut effectuée dans un volume 20 fois plus grand. De cette façon, il a été possible d'obtenir ~250 mL de nanoparticules fluorescentes en une synthèse et ce, sans changer les propriétés des colloïdes obtenus.

2.2.3 Caractérisation physique et spectrale des colloïdes

2.2.3.1 Potentiel Zêta

Afin de s'assurer de la stabilité colloïdale, des mesures de potentiel Zêta ont été effectuées. La Figure 46 montre la stabilité colloïdale des nanoparticules Ag@SiO₂-Éosine synthétisées avec les deux méthodes de préparation du précurseur silane fluorescent (voir section 2.2.2.2). Ainsi, pour la méthode nécessitant plus d'APTES (3:1 APTES:ÉiTC), la charge en surface des particules n'est pas suffisante pour stabiliser les colloïdes, tandis que pour la deuxième méthode (1,2:1 APTES:ÉiTC), la charge reste suffisante pour assurer une certaine stabilité colloïdale et ce même pour des ajouts importants de précurseur silane fluorescent.

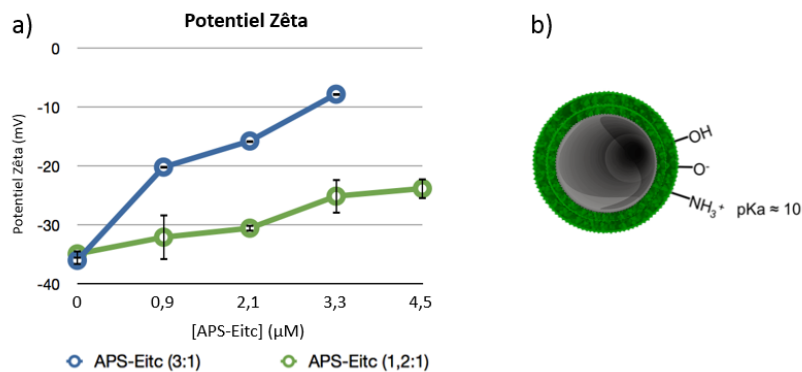


Figure 46: a) Potentiel Zêta (MES pH=6,5) pour les nanoparticules Ag@SiO₂-ÉiTC faites en une seule étape. APS-EiTC 3:1 (bleu) et APS-EiTC 1,2:1 (vert). b) Schéma d'une nanoparticule avec des groupements -NH₂ libres entre pH 6-7.

2.2.3.2 Caractérisation par TEM (Microscopie électronique)

En caractérisant les nanoparticules par TEM, il est possible de déterminer la taille et la polydispersité des cœurs d'argent ainsi que l'homogénéité et l'épaisseur de la couche de silice (voir Figure 47). Afin d'analyser les photos TEM, un logiciel de traitement d'image est utilisé (I-Solution de IMT). Ce logiciel mesure le nombre de pixels représentant une nanoparticule et peut ainsi déterminer la taille puisque l'étalonnage est effectué à l'aide de l'échelle de l'image fournie par le TEM. Pour la mesure du diamètre des cœurs, le calcul fut effectué par l'utilisation du diamètre moyen de Feret. Les nanoparticules d'argent synthétisées par cette méthode ont un

diamètre moyen de 54 ± 12 nm et une couche de silice d'environ 10 ± 1 nm d'épaisseur. Il est intéressant de noter que la taille de la couche de silice n'est que légèrement affectée par l'ajout d'APTES-EiTC. La polydispersité des cœurs peut sembler légèrement élevée, cependant, il a été démontré par plusieurs groupes de recherche que l'ampleur de l'exaltation plasmonique de la fluorescence ne variait que très peu entre 40 et 70 nm de diamètre pour des nanoparticules sphériques d'argent [40, 41]. Le plus important est de bien contrôler la distance entre le cœur métallique et le polymère afin que l'efficacité du RET et l'exaltation plasmonique soient uniformes et répétables. Pour ce faire, il est bien important d'obtenir une couche de silice homogène, ce qui est bien le cas avec la méthode Stöber modifiée utilisée.

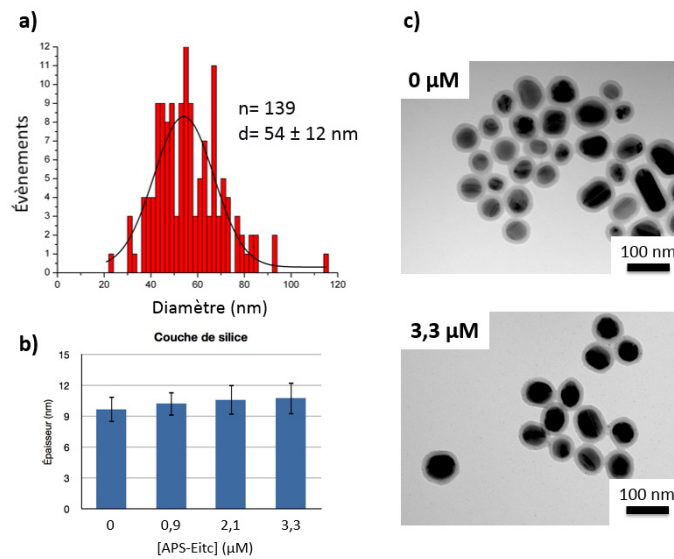


Figure 47: a) Distribution de taille des nanoparticules d'argent mesurée par TEM d'un échantillon typique. b) Épaisseur de la silice en fonction de l'ajout de précurseur silane fluorescent mesurée par TEM. c) Images TEM pour un échantillon ne contenant pas d'APS-EiTC (haut) et contenant 3,3 µM d'APS-EiTC (bas).

Il est à noter que lorsque l'ajout d'APTES-EiTC devient trop important, c'est-à-dire avec un ajout de plus de 3,5 µM, des défauts dans la couche de silice apparaissent (voir Figure 48).

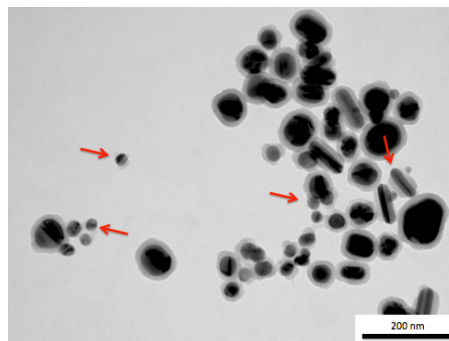


Figure 48: Image TEM d'un échantillon (4,5 µM) contenant trop de précurseur silane fluorescent. Les flèches rouges indiquent des défauts dans la silice formée.

2.2.3.3 Caractérisation par fluorescence

Par la suite, les nanoparticules ont été caractérisées par spectrofluorimétrie (voir Figure 49). Ces mesures montrent que lorsque la quantité du précurseur silane augmente, la fluorescence des nanoparticules est plus élevée. Cependant, lorsque la concentration en précurseur silane atteint $3,3 \mu\text{M}$, la fluorescence des colloïdes cesse d'augmenter. Tel que démontré dans la Figure 48, lors d'ajouts trop importants de l'espèce fluorescente la couche de silice n'est plus homogène, ce qui fait en sorte de diminuer le nombre de fluorophores qu'il est possible d'incorporer. La diminution de l'intensité de fluorescence n'est pas due à un phénomène d'homo-transfert entre les molécules fluorescentes puisque la longueur d'onde maximale de fluorescence ne subit pas un important déplacement bathochrome.

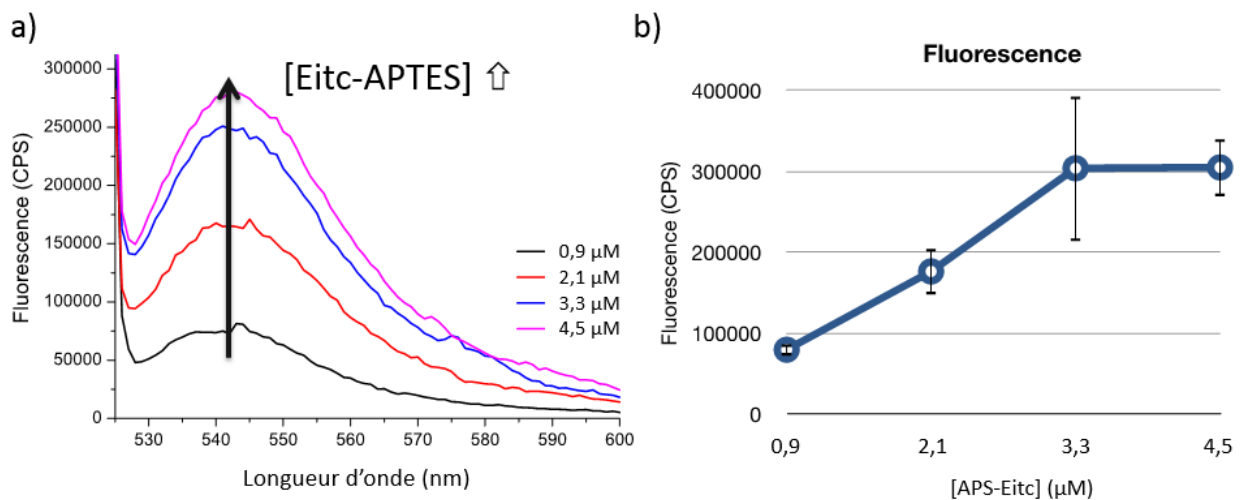


Figure 49: a) Spectres de fluorescence typiques des nanoparticules Ag@SiO₂-Éosine b) Intensité de fluorescence de plusieurs répliques en fonction de la concentration de précurseur fluorescent ajouté.

2.2.3.4 Rendement d'incorporation de l'éosine dans la couche de silice

Afin de déterminer le rendement d'incorporation de l'éosine dans la couche de silice, un protocole a été adapté de la littérature[63]. La silice est hydrolysée par un traitement dans le NaOH 0,4 M et les cœurs métalliques sont dissous en utilisant le cyanure de potassium 1mM. Cette solution est laissée sous agitation durant 24h. Les étalons sont soumis aux mêmes conditions et le dosage est effectué par fluorescence en utilisant une méthode d'étalonnage externe.

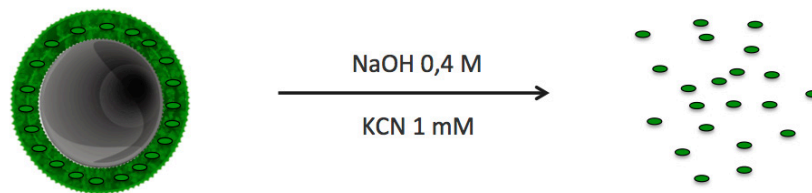


Figure 50: Schéma d'hydrolyse de la couche de silice et dissolution du cœur métallique afin de relarguer les espèces fluorescentes.

De cette façon, il a été possible de déterminer un rendement d'incorporation de l'éosine dans la couche de silice d'environ 1% (basé sur l'ajout initial de EiTC).

2.2.3.5 Dosage des nanoparticules par ICP-AES

Il était également important de déterminer le rendement de la synthèse $\text{Ag}@\text{SiO}_2$ en une étape. Pour ce faire, les nanoparticules ont été dissoutes dans du HNO_3 concentré puis le dosage a été effectué par ICP-AES (voir Figure 51). Le rendement moyen de formation des cœurs est de 65% (basé sur la quantité initiale d'argent ajoutée), ce qui correspond à une concentration moyenne de 44 mg/L. Les pertes d'argent proviennent probablement d'une réduction incomplète et de la perte de nanoparticules lors des centrifugations. Cependant, l'ajout d'APTES-EiTC n'a aucun impact sur la concentration des nanoparticules.

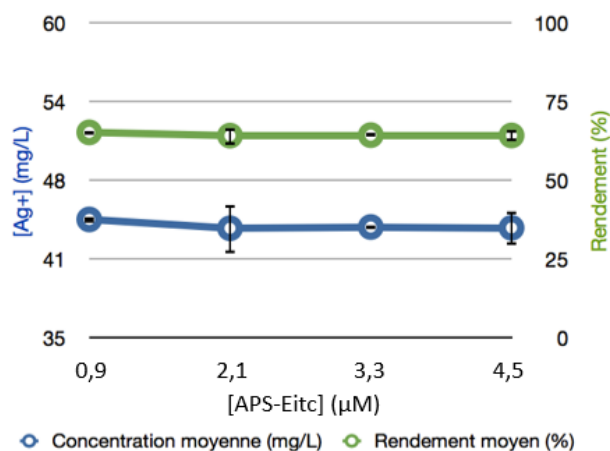


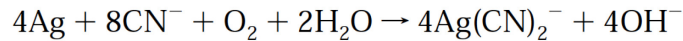
Figure 51: Dosage des nanoparticules par ICP-AES. Concentration moyenne (bleu) et rendement moyen de la réaction (vert) pour différents ajouts d'APS-EiTC.

La concentration des colloïdes a aussi été calculée à partir de la concentration d'argent élémentaire. Pour ce faire, on assume que les nanoparticules sont des sphères parfaites de 54 nm. Ainsi, il est possible de déterminer la concentration, puisque la densité de l'argent est connue. De cette façon, la concentration des nanoparticules fluorescentes fut déterminée ($[\text{NPs}] \approx 6,0 \pm 0,3 \times 10^{10}$ NPs/mL).

2.2.4 Facteur d'exaltation plasmonique

2.2.4.1 Dissolution des cœurs métalliques

Afin de déterminer l'effet de la présence du cœur métallique sur la fluorescence des nanoparticules, une méthode a été adaptée de la littérature [65]. L'argent est oxydé par l'oxygène dissous dans la solution et forme ensuite un complexe soluble avec le cyanure par la réaction suivante:



Le mécanisme est fort simple: l'argent est oxydé par l'oxygène et la couche d'oxyde est dissoute par différents mécanismes. Cela fait en sorte de remettre en contact la surface d' Ag^0 avec l'oxygène ce qui réoxyde la surface et le processus se poursuit. Lors de la présence d'électrolytes, la dissolution du cœur d'argent peut provenir de plusieurs mécanismes (voir Figure 52). Tout d'abord, il peut y avoir redistribution ou remplacement des ions Ag^+ par les électrolytes (1). Ensuite, il peut y avoir dissolution par l'eau de la couche d'oxyde formée (2). Mais la principale voie de dissolution du cœur provient du déplacement des ions d'argent par la formation d'un complexe soluble avec le cyanure $\text{Ag}[\text{CN}]_2^-$ (3).

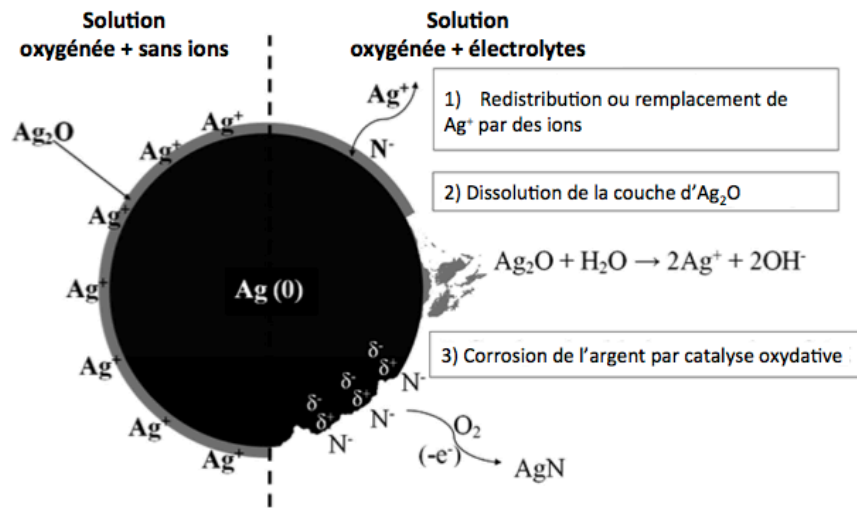


Figure 52: Différents mécanismes de dissolution des cœurs d'argent[66].

Ainsi, il est possible de dissoudre complètement les cœurs d'argent en les mettant en présence de KCN aqueux 1 mM. La seule barrière à ce processus provient de la diffusion de l'oxygène moléculaire et des ions cyanure vers la nanoparticule et la diffusion vers l'extérieur du complexe formé[65]. Or, il a été démontré que la porosité de nanoparticules de SiO_2 , est non

négligeable[67]. Afin de vérifier la dissolution du cœur métallique, un spectre d'absorption UV-Vis est effectué afin de s'assurer de la disparition du plasmon (voir Figure 53). Sur la Figure 53a, l'on voit le spectre des nanoparticules d'argent avant l'ajout du cyanure. Lors de l'ajout du cyanure, les cœurs d'argent sont détruits et le plasmon disparaît. Cependant, il est toujours possible d'observer l'absorption de l'éosine dans la couche de silice (encadré). La Figure 53b est une image TEM des nanocoquilles obtenues après dissolution des cœurs d'argent.

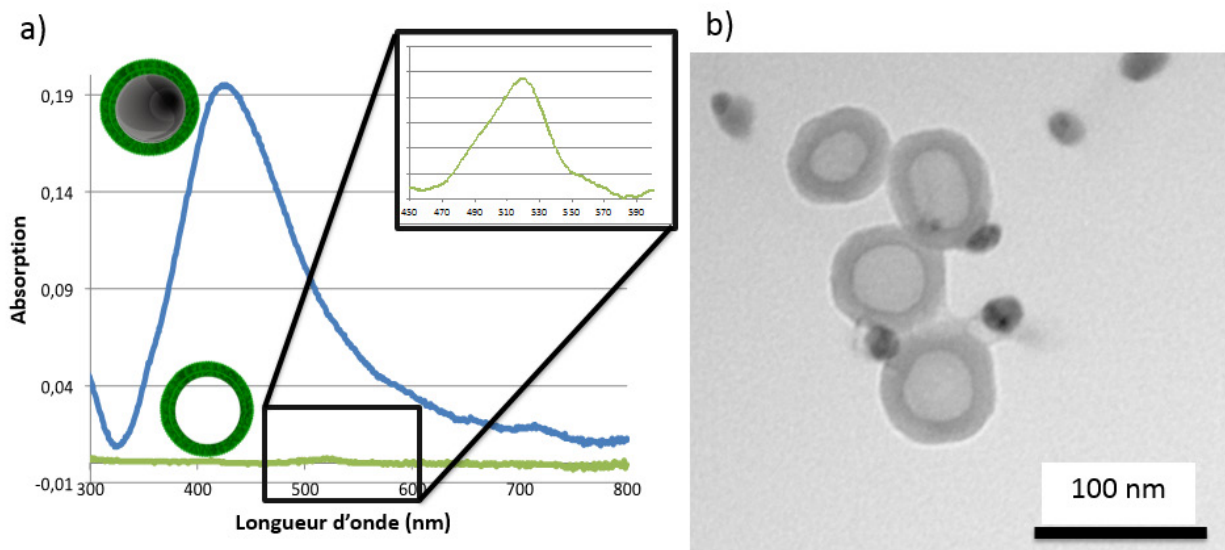


Figure 53: a) Spectres d'extinction UV-Vis des nanoparticules Ag@SiO₂-EiTC avant l'ajout de cyanure (bleu) et après l'ajout de cyanure (vert). Encadré : spectre d'absorption de l'éosine. b) Image TEM des nanocoquilles de silice après la dissolution du cœur d'argent.

Protocole détaillé de dissolution des cœurs d'argent

- Dans une fiole conique de 15 mL
 - Ajouter 4 mL d'une solution 1mM KCN dans un tampon MES 0,01M pH=6.5
 - Ajouter 75 µL de nanoparticules ($[NPs] \approx 6 \times 10^{10}$ NPs/mL)
 - Laisser agiter 72h afin de dissoudre complètement les cœurs d'argent

2.2.4.2 Mesure de l'exaltation plasmonique par mesures de temps de vie

Tel qu'expliqué dans la section 1.3, la présence d'un cœur métallique à proximité d'un fluorophore aura un effet sur son temps de vie à l'état excité. Afin de vérifier si tel est le cas dans le présent système étudié, des mesures de temps de vie ont été effectuées avant et après la dissolution du cœur métallique pour les nanoparticules synthétisées avec 3,3 μM d'éosine (voir Tableau 2 et Figure 54). Nous avons tout d'abord vérifié que le cyanure à cette concentration n'a pas d'impact significatif sur le temps de vie de l'éosine. Ce point est important car, dans le cas contraire, la mesure du temps de vie de fluorescence ne serait pas une indication fiable de l'effet du couplage plasmonique. Cette vérification faite, nous avons mesuré une diminution du temps de vie de l'éosine dans les nanoparticules cœur-coquille d'environ 2,5 fois (0,40 vs. 1,05 ns).

	Tampon MES		Tampon MES KCN 1mM	
	τ_{av} (ns)	χ^2	τ_{av} (ns)	χ^2
Éosine (10 nM)	1,11	1,02	1,12	1,08
Ag@SiO ₂ Éosine (3,3 μM)	0,40	1,00	1,05	1,00

Tableau 2: Mesures de temps de vie de fluorescence de l'éosine avant et après la dissolution du cœur par KCN 1 mM pour les nanoparticules synthétisées avec 3,3 μM d'éosine. Le temps de vie de l'éosine libre en solution dans un tampon MES pH=6,5 avec et sans KCN est aussi présenté (τ = temps de vie, χ^2 =coefficient de corrélation).

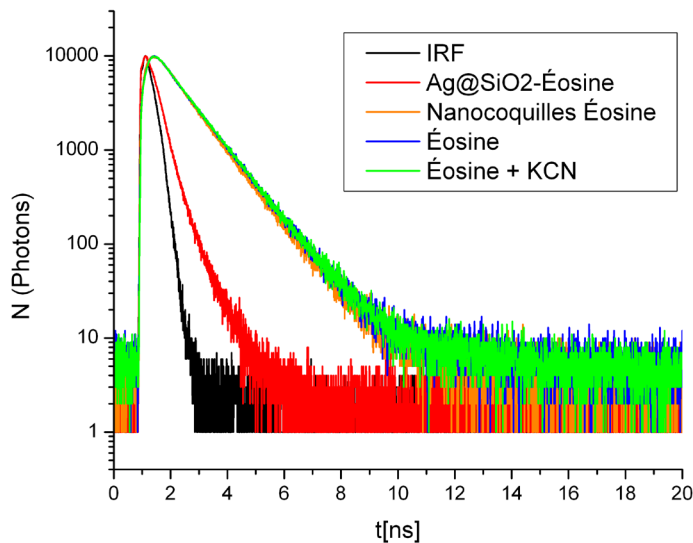


Figure 54: Mesures de temps de vie de fluorescence de l'éosine avant et après la dissolution du cœur par KCN 1 mM pour un échantillon synthétisé à partir de 3,3 μM d'éosine ainsi que de l'éosine libre en solution dans un tampon MES pH=6,5 avec et sans KCN.

2.2.4.3 Mesures de l'exaltation plasmonique par fluorescence en régime stationnaire (*steady-state*)

Il est aussi possible de mesurer l'exaltation plasmonique en utilisant la fluorescence en régime stationnaire («*steady-state*»). Pour ce faire, des mesures sont effectuées avant et après la dissolution du cœur. Il est possible de mesurer le facteur d'exaltation en effectuant le rapport entre le signal de fluorescence avec et sans la présence du métal (voir Figure 55). Ces mesures ont révélé un facteur d'exaltation plasmonique de la fluorescence de l'éosine de 5. Ainsi, en simplifiant l'architecture plasmonique et en sacrifiant le contrôle précis de la distance plasmonique, l'exaltation de la fluorescence pour l'éosine est diminuée d'environ un facteur deux par rapport à ce qui avait mesuré avec l'architecture multicouches [18].

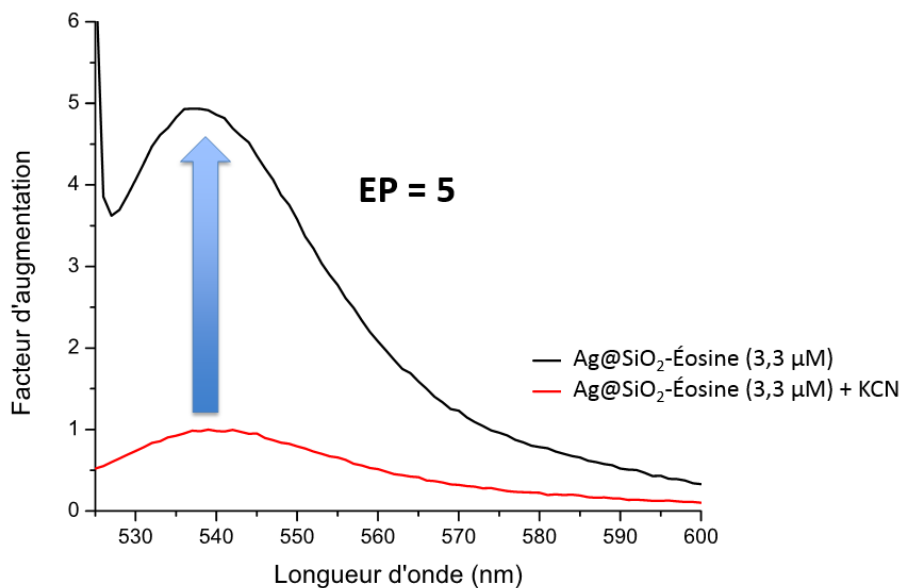


Figure 55: Facteur d'exaltation plasmonique (EP) mesuré par fluorimétrie en régime stationnaire pour les nanoparticules étudiées dans le cadre de ces travaux.

2.2.5 Fonctionnalisation de surface des biocapteurs

2.2.5.1 Fonctionnalisation de la surface de silice

La silice a une chimie de surface très bien connue et les réactifs sont très nombreux. Il est ainsi possible d'intégrer différents groupements fonctionnels sur les nanoparticules afin de faire des réactions subséquentes. L'ADN étant chargé négativement, il était primordial de ne pas incorporer de groupements chargés positivement au pH physiologique, notamment des

groupements amines ($pK_a \approx 10$)[68] souvent utilisé comme nucléophile dans un très grand nombre de réactions organiques. Pour cette raison, la chimie des thiols, qui est aussi très polyvalente, a plutôt été sélectionnée[69]. Une réaction tirée de la littérature a servi de point de départ afin de greffer des thiols à la surface des nanoparticules[70].

Protocole détaillé de greffage de groupements thiol à la surface de la couche de silice (voir Figure 56)

- Dans une fiole conique de 50 mL
 - Ajouter 10 mL de nanoparticules $Ag@SiO_2$ dispersées dans l'éthanol ($[NPs] \approx 6 \times 10^{10}$ NPs/mL)
 - Ajouter 100 μ L de MPTMS (mercaptopropyltriméthoxysilane)
 - Laisser réagir 2 h à température ambiante sous agitation
 - Laisser réagir 1 h à 50°C pour augmenter le greffage
 - Centrifuger 3 fois (8000 RPM, 15 min) et redisperser la suspension colloïdale dans 10 mL d'éthanol anhydre

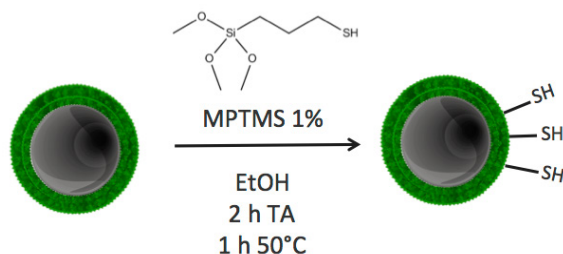


Figure 56: Schéma réactionnel de la fonctionnalisation de surface des nanoparticules $Ag@SiO_2$ avec des groupements -SH.

Il n'est pas possible de déterminer si ce greffage a réellement eu lieu par potentiel Zêta puisqu'il n'y a aucun changement observable. Cela est dû au caractère hydrophobe des alkyles thiols qui ont tendance à se replier sur la surface de silice, ce qui fait en sorte que la charge des groupements hydroxydes à la surface de la silice est dominante[71]. Il est donc très difficile de vérifier que la réaction a réellement eu lieu. Cependant, il est possible de remarquer un changement de comportement lors de la centrifugation. Les particules ne collent plus sur les parois de plastique des tubes à centrifuger et forment un culot très facilement redispersable.

2.2.5.2 Dérivatisation des oligonucléotides

Les oligonucléotides sonde utilisés lors de cette étude proviennent d'IDT (Integrated DNA Technologies) et sont déjà fonctionnalisés avec un groupement amine en 5'. Afin de les greffer sur les nanoparticules, il faut dériver ce groupement afin de le rendre réactif vis-à-vis les groupements thiols. Pour ce faire, nous avons utilisé un agent de couplage hétérobifonctionnel, le SMCC (Succinimidyl 4-(*N*-maleimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate, voir Figure 57). Cette molécule possède deux groupements différents: un ester succinimide qui réagit avec les amines primaires à pH 7,0-9,0 et un groupement maléimide qui réagit avec les thiols à pH 6,5-7,5 [72].

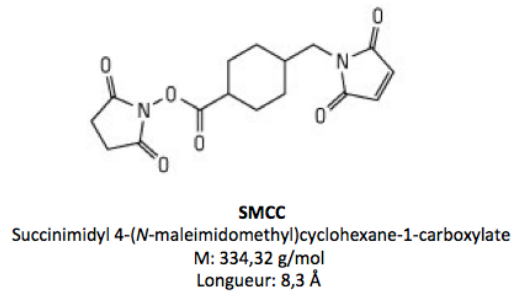


Figure 57: Agent de couplage hétérobifonctionnel utilisé afin de greffer les sondes ADN simple brin sur les nanoparticules[73].

Protocole détaillé de la dérivatisation de l'ADN-NH₂[72]

- Dans un vial de 2 mL contenant 10 nmol de sondes NH₂ (ssDNA)
 - Ajouter 600 µL de tampon phosphate pH 8,4 stérile
 - Ajouter 100 µL d'une solution 6 mM de SMCC dissous dans le DMF
 - Laisser réagir sous agitation mécanique pendant 2 h à température ambiante

Un excès de 60:1 (SMCC:ADN) ainsi qu'un temps de réaction de 2h fut utilisé. Il est important de mentionner que le temps de réaction ne peut pas être trop long vu l'hydrolyse possible du groupement maléimide en une forme non réactive (acide maléamique).

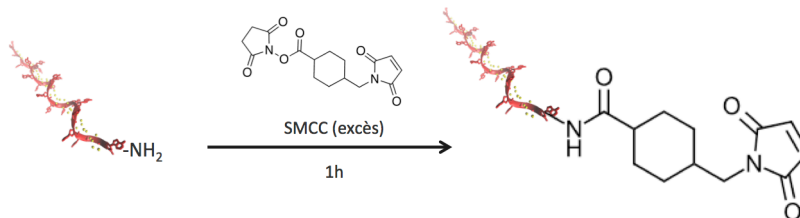


Figure 58: Schéma réactionnel de l'ADN avec l'agent de couplage hétérobifonctionnel SMCC.

Par la suite, l'ADN est purifié en utilisant une trousse QIAGEN commerciale (QIAquick Nucleotide Removal Kit)[74] et est redispersé dans 700 µL de tampon phosphate à pH 7,5.

En utilisant le tampon fourni avec la trousse, l'ADN s'adsorbe sur une colonne de silice, ce qui permet la purification par lavages. Par la suite, l'ADN est élué du support de silice en utilisant des tampons à pH >7,5). Cette procédure sert à enlever l'excédent de SMCC qui autrement viendrait réagir avec la surface des nanoparticules et diminuer le nombre de groupements accessibles pour l'ADN. Cette solution d'ADN-SMCC est utilisée immédiatement après sa préparation et n'est pas conservée.

Il est à noter que la quantité maximale d'ADN qui peut être nettoyée avec une de ces colonnes de purification est d'environ 10 µg, ou 1 nmol d'ADN sonde. Il faut donc utiliser plusieurs colonnes afin de purifier tout l'ADN-SMCC produit, ce qui se traduit par des manipulations supplémentaires qui pourraient être évitées en utilisant des colonnes de plus grande capacité. Le rendement de purification spécifié par le fabricant est 60-80%, et un rendement de récupération d'environ 70% a été déterminé par fluorescence.

Protocole détaillé de purification de l'ADN[74]

- Dans une colonne à purifier QIAGEN
 - 70 µL de la solution ADN-SMCC (1 nmol)
 - 600 µL tampon PNI* (pour adsorber l'ADN dans la colonne de silice)
 - Centrifuger (6000 RPM, 1 minute) et jeter l'éluat
 - 700 µL tampon PE* (pour enlever les réactifs)
 - Centrifuger (6000 RPM, 1 minute) et jeter l'éluat
 - Centrifuger (13 000 RPM, 1 minute) afin d'assécher la colonne
 - Mettre 100 µL de tampon phosphate pH 7,5 stérile afin d'extraire l'ADN de la colonne de silice
 - Centrifuger (13 000 RPM, 1 minute) pour récupérer l'ADN
- *La composition des tampons fournis par le fabricant n'est pas connue

Afin de déterminer le rendement de réaction, l'ADN marqué avec GelRed™ (un agent intercalant permettant de rendre l'ADN fluorescent) a été élué sur un gel de polyacrylamide et un rendement de couplage (SMCC-ADN) d'environ 50% a été déterminé (voir Figure 59).

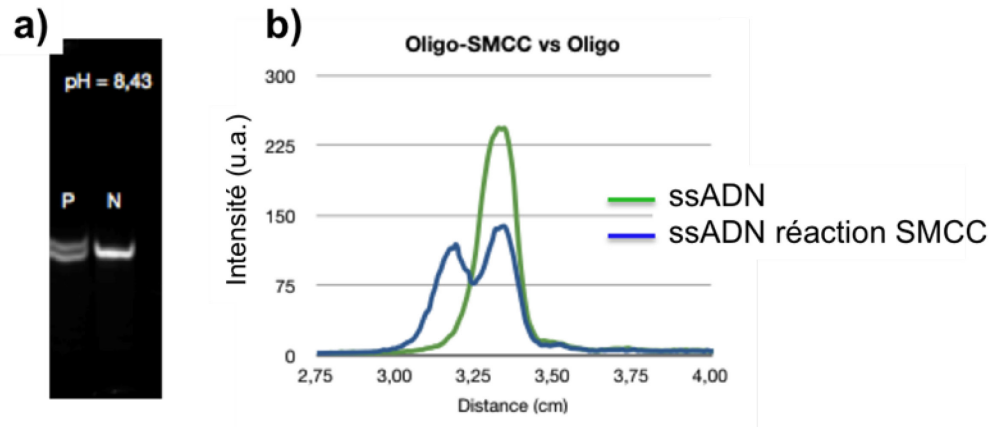


Figure 59: a) Image de fluorescence du gel de polyacrylamide (P: réaction ADN-SMCC. N: ADN non réagi). b) intensité de fluorescence en fonction de la distance de migration.

2.2.5.3 Greffage des oligonucléotides à la surface des nanoparticules

Protocole détaillé de greffage de l'ADN sur les nanoparticules Ag@SiO₂-SH (voir Figure 60)

- Dans une fiole Eppendorf stérile de 1,5 mL
 - Ajouter 1 mL de nanoparticules Ag@SiO₂-SH dispersées dans l'éthanol ([NPs] ≈ 6 × 10¹⁰ NPs/mL)
 - Centrifuger (10 000 RPM, 1 min) et redisperser dans 1 mL de tampon phosphate pH 7,5 stérile
 - Ajouter 150 µL de la solution ADN-SMCC purifiée (≈ 1 nmol ADN)
 - Laisser réagir 24 h à 4°C
 - Centrifuger 2 fois (10 000 RPM, 10 min) et redisperser dans 1 mL de tampon phosphate pH 7,4 stérile
 - Centrifuger (10 000 RPM, 10 min) et redisperser dans 1 mL d'éthanol anhydre
 - Conserver à 4°C à la noirceur

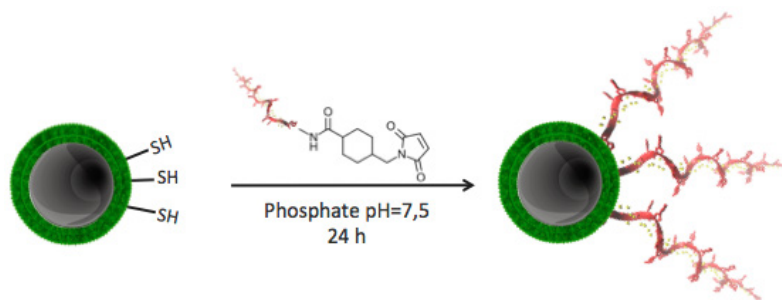


Figure 60: Schéma réactionnel entre les nanoparticules Ag@SiO₂-SH et l'ADN-SMCC.

Il est intéressant de noter qu'après la fonctionnalisation de surface avec les brins d'ADN sonde, les nanoparticules sont instables et s'agrègent dans l'éthanol (ADN non soluble dans ce solvant). Lors de l'utilisation, les nanoparticules sont centrifugées et dispersées dans l'eau stérile et redeviennent stables. L'éthanol ne sert qu'à la conservation des nanoparticules sonde.

Afin de vérifier que l'ADN est bien greffé à la surface des nanoparticules, un test a été réalisé avec des sondes d'ADN fonctionnalisées avec un fluorophore (Cy5.5). Les spectres de fluorescence montrés à la Figure 61 montrent que l'ADN est bien situé à la surface des nanoparticules, puisque la fluorescence provient des nanoparticules et non pas du surnageant.

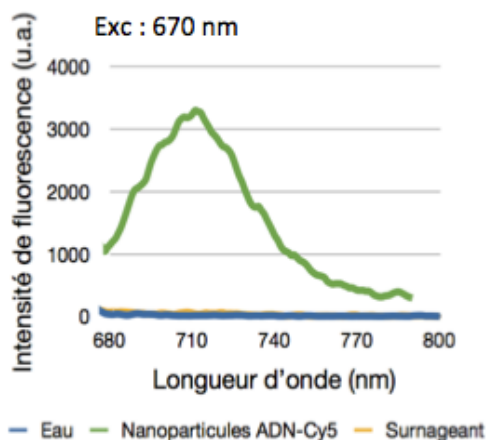


Figure 61: Spectre de fluorescence de l'ADN-Cy5.5 sur les nanoparticules Ag@SiO₂-Éosine.

2.2.5.4 Préparation des nanoparticules Ag@SiO₂-ssADN-Polymère

La dernière étape avant la détection d'ADN consiste à adsorber le polymère sur les brins d'ADN sonde afin de former le duplexe non fluorescent (voir section 1.7.2 Transducteur polymérique pour plus de détails). Cette dernière étape n'a pas encore été optimisée et présentement, un excès de polymère est utilisé afin de s'assurer de bien l'adsorber sur les brins d'ADN sonde.

Protocole détaillé de la formation des nanoparticules Ag@SiO₂-ssADN-AH35 (voir Figure 62)

- Dans un vial Eppendorf stérile de 1,5 mL
 - Ajouter 1 mL de nanoparticules Ag@SiO₂-ssADN dispersées dans l'éthanol
 - Centrifugation (10 000 RPM, 1 min) et redisperser dans 1 mL d'eau déminéralisée stérile
 - Ajouter 3 μM (base monomérique) de polymère cationique AH-35²
 - Laisser sous agitation 12 h
 - Centrifugation 3 fois (10 000 RPM, 10 min) et redisperser dans 1 mL d'eau déminéralisée stérile

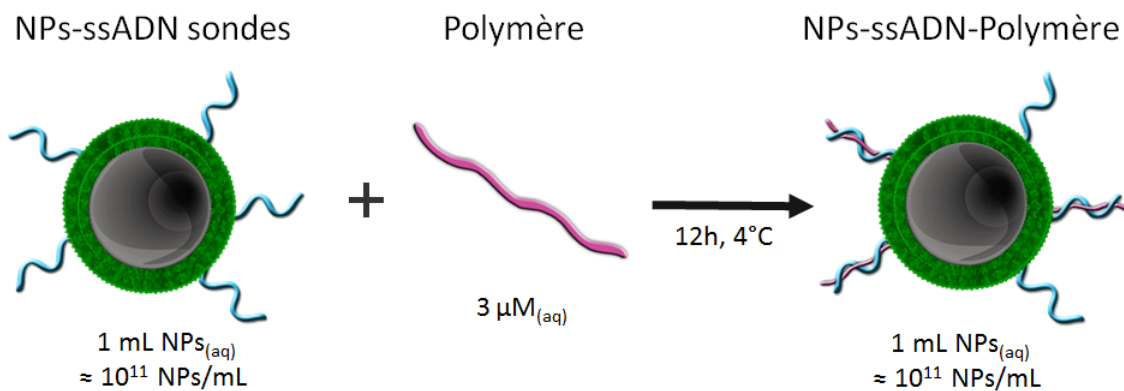


Figure 62: Schéma réactionnel entre les nanoparticules Ag@SiO₂-ssADN et le polymère cationique.

Avant d'effectuer l'étape de détection d'ADN, il faut bien nettoyer les nanoparticules par centrifugation afin d'enlever le polymère en excès qui pourrait former des duplexes avec les brins d'ADN non complémentaires en solution et des triplex avec les doubles hélices d'ADN, augmentant le signal de fond et diminuant la sensibilité de détection.

² Chlorure de poly(1H-imidazolium, 1-méthyl-3-[2-[(4-méthyl-3-thienyl)oxy]éthyl])

2.3 Conclusion partielle

Il a été possible de développer une méthode de production de nanoparticules fluorescentes «*one-pot*» très rapide (< 24 h). Pour ce faire, une méthode de formation de cœurs d'argent par la réduction au citrate fut utilisée et une coquille de silice fluorescente en une étape fut ajoutée à l'aide d'une version modifiée de la méthode Stöber. Les nanoparticules obtenues ont un cœur d'argent de 54 ± 12 nm recouvert par une couche de silice fluorescente de 10 ± 1 nm. Ces nanoparticules profitent du cœur métallique (exaltation de la fluorescence, photostabilité et diffusion plasmonique) et de l'augmentation de la stabilité et la facilité de fonctionnalisation grâce à l'utilisation de la silice. Les brins d'ADN sonde sont ensuite greffés sur les nanoparticules en utilisant la chimie des silanes afin de greffer des groupements fonctionnels à la surface des nanoparticules, et un agent de couplage hétérobifonctionnel (SMCC). Pour terminer, le polymère est lié par liaisons électrostatiques sur les brins d'ADN sonde.

Chapitre 3: Détection d'ADN et résultats

3.1 Détection d'ADN

Ces manipulations ont été réalisées en collaboration avec Danny Brouard, stagiaire postdoctoral chez Héma-Québec. Tel qu'expliqué dans la section 1.7.4, l'appareil utilisé est un Partec Cyflow ML. Cet appareil a l'avantage de posséder plusieurs sources d'excitation et permet de récolter la fluorescence ainsi que la lumière diffusée. Dans le cas présent, deux sources laser ont été utilisées afin d'exciter les nanoparticules: 410 nm (excitation du polymère) et 488 nm (excitation directe de l'éosine). De plus, une source laser à 635 nm sert à mesurer la diffusion frontale et latérale. La fluorescence est récoltée dans divers canaux de détection: un premier, désigné FL1 selon la nomenclature de l'appareil (λ_{exc} : 488 nm, λ_{em} : 512-542 nm) pour l'excitation directe de l'éosine, et un deuxième appelé FL8 (λ_{exc} : 410 nm, λ_{em} : 535-565 nm) pour l'excitation du polymère à l'origine du signal de transduction (RET entre le polymère et l'éosine). Donc, un total de trois canaux (FL1, FL8, diffusion) sont disponibles pour faire l'acquisition des données (voir Figure 63). La diffusion est utilisée afin de déclencher la mesure de la fluorescence dans les autres canaux. Le canal de fluorescence FL1 (fluorescence directe de l'éosine) n'est pas encore utilisé dans le traitement des données, mais il pourrait être utilisé afin de normaliser la fluorescence des nanoparticules d'un lot à l'autre. Pour les résultats présentés dans les prochaines sections la moyenne de fluorescence du signal de transduction fût utilisée (FL8).

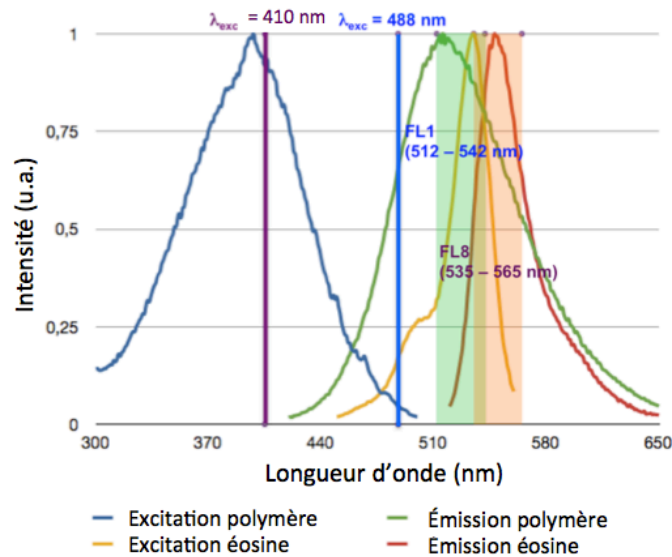


Figure 63: Spectres d'excitation et d'émission du polymère ainsi que de l'éosine, relativement aux raies d'émission des sources laser (lignes verticales) et les bandes de transmission des canaux FL1 et FL8 (zones verte et orange).

3.2 Résultats de détection d'oligonucléotides synthétiques

Avant d'effectuer des mesures sur des échantillons réels, des oligonucléotides synthétiques ont été utilisés afin de valider la méthode expérimentale. Le Tableau 3 représente les séquences des brins d'oligonucléotides utilisés. Les oligonucléotides synthétiques utilisés sont une réplique de la section d'intérêt du gène du groupe sanguin Dombrock (Do) qui sera ciblé dans l'ADN génomique, tel que décrit plus loin dans ce chapitre. La cible PC correspond à une section du gène Do^a tandis que la cible SNP correspond à la séquence du gène Do^b, qui ne diffère du gène Do^a que par une seule base. Pour terminer, la cible NC est complètement aléatoire.

Nom	Séquence
Sondes	5' NH ₂ - ACC ACC CAA GAG GAG ACT GGT TGC AGT TG 3'
Cibles PC	5' CAA CTG CAA CCA GTC TCC TCT TGG GTG GT 3'
Cibles SNP	5' CAA CTG CAA CCA GTT TCC TCT TGG GTG GT 3'
Cibles NC	5' TAC GAG TTG AGA ATC CTG AAT GCG 3'

Tableau 3: Différentes séquences d'ADN utilisées lors de ces travaux (PC: parfaitement complémentaire, SNP: une paire de base non complémentaire, NC: non complémentaire).

L'hybridation des cibles avec les nanoparticules est réalisée dans l'eau pure afin d'avoir un milieu très stringent, de façon à favoriser l'hybridation des brins parfaitement complémentaires. L'hybridation en eau pure est également une condition nécessaire au bon fonctionnement du polymère cationique, qui agit comme contre-ion en stabilisant la double hélice d'ADN. La procédure de détection est illustrée à la Figure 64.

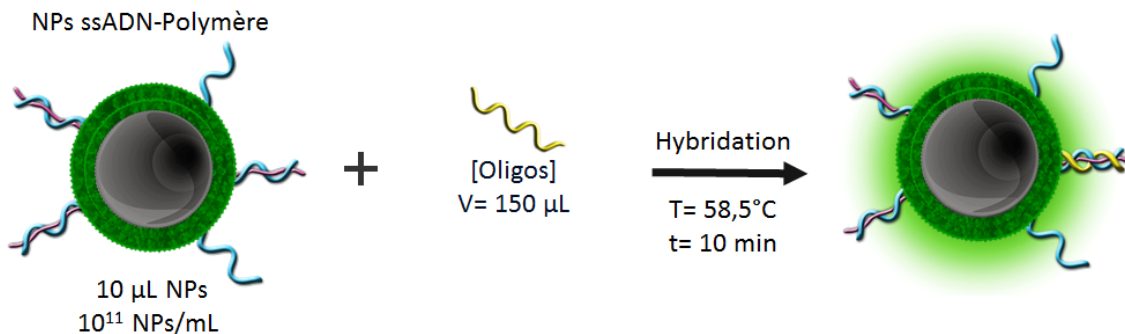


Figure 64: Schéma des paramètres expérimentaux pour l'hybridation des oligonucléotides synthétiques.

La Figure 65 est un exemple de résultats bruts produits par le cytomètre à flux. L'utilisation d'un code de couleur pour indiquer le nombre d'événements détectés avec une intensité de signal donnée permet de visualiser la variation de signal sur plusieurs canaux de détection. Par exemple, on remarque sur cette figure une augmentation marquée du signal de fluorescence dans les canaux FL1 et FL8 suite au mélange du biocapteur avec 1 μM d'oligonucléotides parfaitement complémentaires (cette haute concentration a seulement été utilisée afin de montrer de façon visuelle le changement observé lors de l'hybridation avec des cibles complémentaires). La détection d'une hausse de signal dans ces deux canaux vient du fait que les filtres d'émission de canaux FL1 et FL8 recouvrent les bandes de fluorescence du polymère et de l'éosine (voir Figure 63).

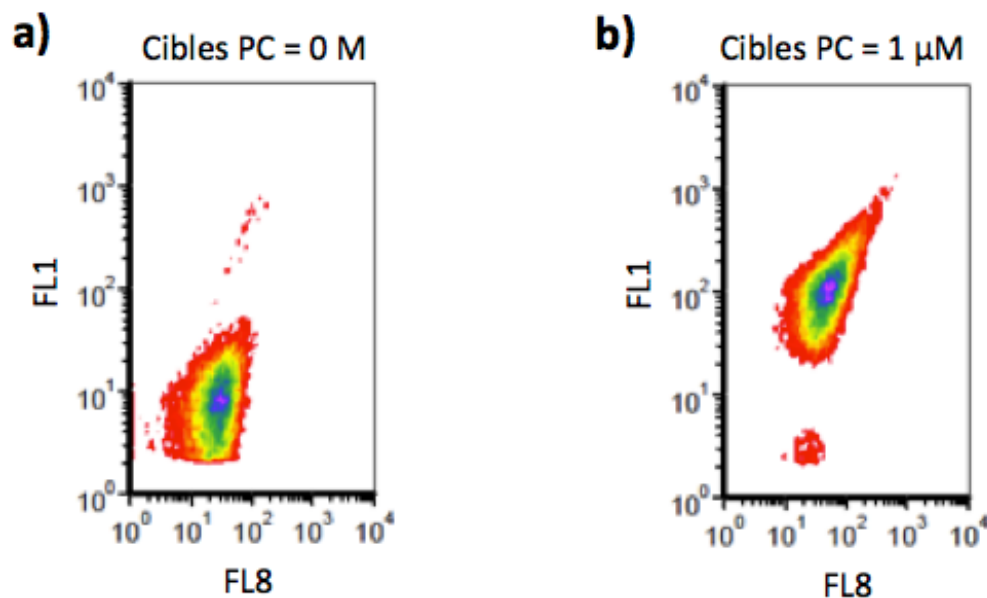


Figure 65: Graphiques obtenus avec l'appareil CyFlow ML a) en absence de cibles complémentaires et b) avec l'ajout de 1 μM de cibles parfaitement complémentaires (PC) au biocapteur.

La spécificité du biocapteur a ensuite été étudiée en comparant le signal de fluorescence (FL8) pour deux séquences cibles différentes, une parfaitement complémentaire et une seconde non complémentaire. Les résultats présentés à la Figure 66 montrent qu'une hausse de signal non négligeable est enregistrée pour les cibles non complémentaires. Ceci pourrait provenir de l'hybridation partielle de brins non complémentaires ou de leur adsorption sur la surface des nanoparticules, ce qui pourrait avoir comme effet de modifier la conformation du polymère. C'est pourquoi les paramètres d'hybridation (concentrations relatives du matériel génétique et des nanoparticules, température d'hybridation et temps de contact) et de détection (canaux de

détection) doivent être optimisés afin de maximiser la spécificité des analyses. Par ailleurs, cette hausse inévitable du signal de base signifie qu'il faudra obligatoirement, et pour chaque échantillon réel, faire l'acquisition d'un « blanc » préparé à l'aide de nanoparticules portant une sonde représentant une séquence différente de celle recherchée, afin de pouvoir relativiser toute hausse de signal par rapport à ce signal de base non spécifique.

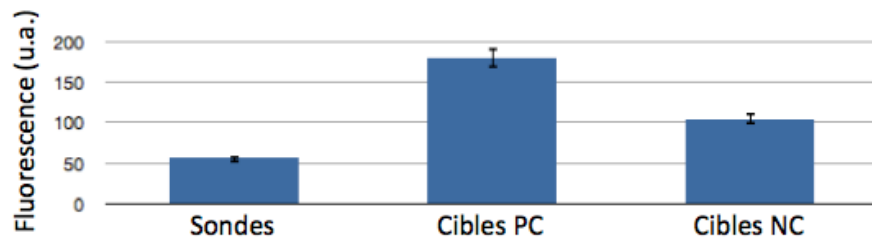


Figure 66: Analyse en triplicata de brins d'oligonucléotides à une concentration de 1 nM à partir du canal de fluorescence FL8 (PC: parfaitement complémentaire, NC: non complémentaire).

Qui plus est, puisque la majorité des différences génétiques entre les groupes sanguins proviennent, non pas de multiples différences dans la séquence d'un gène, mais de la différence d'une seule paire de base (aussi connue sous le nom de SNP, pour «*single nucleotide polymorphism*»), une méthode efficace de génotypage sanguin doit être capable de différencier du matériel génétique différant d'une seule paire de base de la séquence recherchée. La Figure 67 montre les données brutes enregistrées cette fois dans le canal FL8 et dans le signal de diffusion latérale (volet de gauche). Les signaux moyens de fluorescence du canal FL8 (droite) montrent que le signal enregistré pour les cibles parfaitement complémentaires sont statistiquement différentes du signal pour les cibles ne différant que par une paire de base.

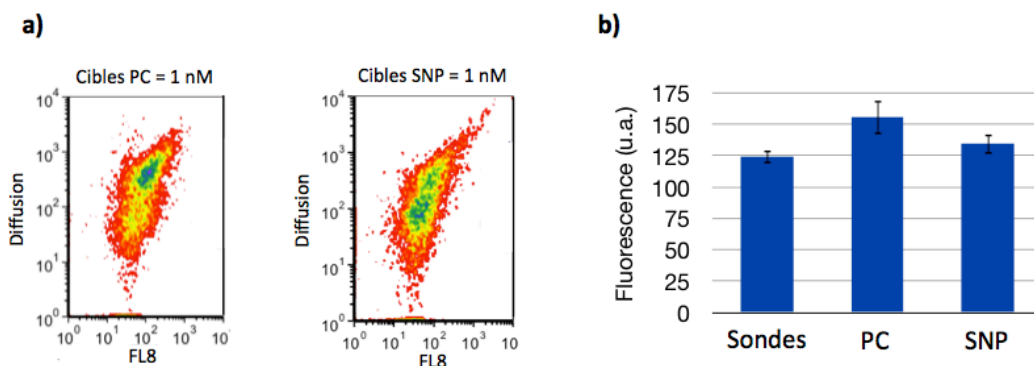


Figure 67: Analyse en triplicata de brins d'oligonucléotides à une concentration de 1 nM. a) Graphiques du canal de fluorescence FL8 en fonction de la diffusion latérale. b) Données de fluorescence moyenne du canal FL8 (PC: parfaitement complémentaire, SNP: une paire de base non complémentaire).

Il est également indispensable, avant d'envisager l'analyse d'échantillons réels (ADN extrait de sang humain), de vérifier si la méthode développée peut détecter des séquences de façon spécifique et ce, en présence d'un excès de séquences d'ADN non complémentaire. Pour ce faire, des amplicons furent ajoutés afin d'imiter un peu plus un échantillon réel. Un amplicon est un brin d'ADN qui a été amplifié par PCR (« *Polymerase Chain Reaction* »). Dans le cas de la présente étude, l'amplicon utilisé avait une longueur de plus de 1000 paires de base et était complètement aléatoire (n'avait aucun lien avec le gène Dombrock). Le résultat de cette étude (Figure 68) indique que la différenciation entre la cible parfaitement complémentaire et le SNP n'est pas affectée par la présence d'un large excès d'amplicons (100 pM vs. 1 μ M).

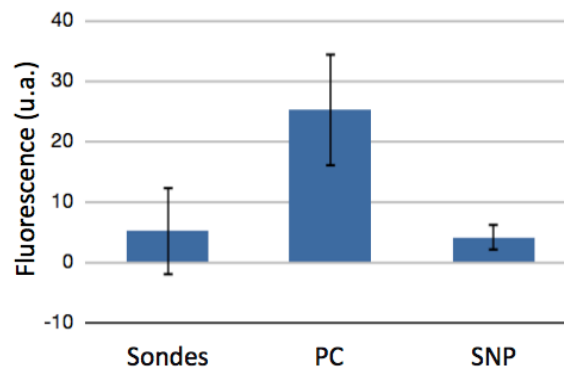


Figure 68: Analyse en triplicata de brins d'oligonucléotides à une concentration de 100 pM en présence de 1 μ M d'amplicons à partir du canal de fluorescence FL8 (PC: parfaitement complémentaire, SNP: 1 paire de base non complémentaire).

3.3 Résultats de détection d'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique à partir d'échantillons de sang humain a été faite à l'aide d'une trousse commerciale QIAGEN QIAamp DNA mini kit. Cette méthode permet d'extraire l'ADN d'un volume de 400 μ L de sang entier avec un très bon rendement (4-12 μ g d'ADN génomique) et ce, en moins d'une heure. La procédure complète d'extraction est illustrée ci-dessous (Figure 69).

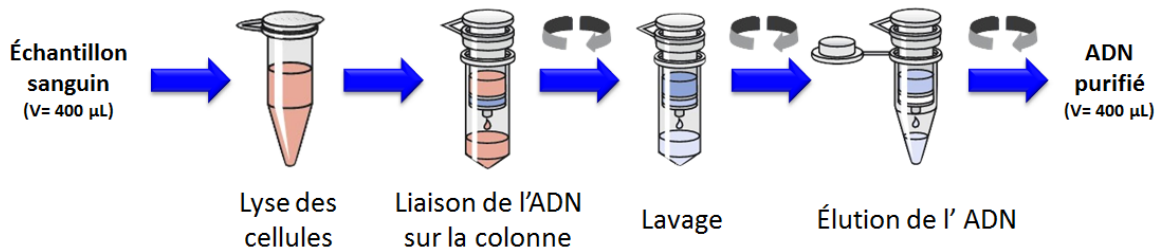


Figure 69: Schéma d'extraction de l'ADN d'un échantillon sanguin à l'aide d'une trousse QIAGEN QIAamp DNA mini kit[75].

Pour la détection d'ADN génomique, la procédure d'hybridation avec le biocapteur a été modifiée en ajoutant une étape de dénaturation, après le mélange avec le biocapteur mais avant l'étape d'hybridation, afin de séparer les double-brins d'ADN (voir Figure 70 et Figure 71). Cela a été nécessaire puisque l'ADN génomique est sous forme de double hélice (donc indisponible à l'hybridation avec les biocapteurs).

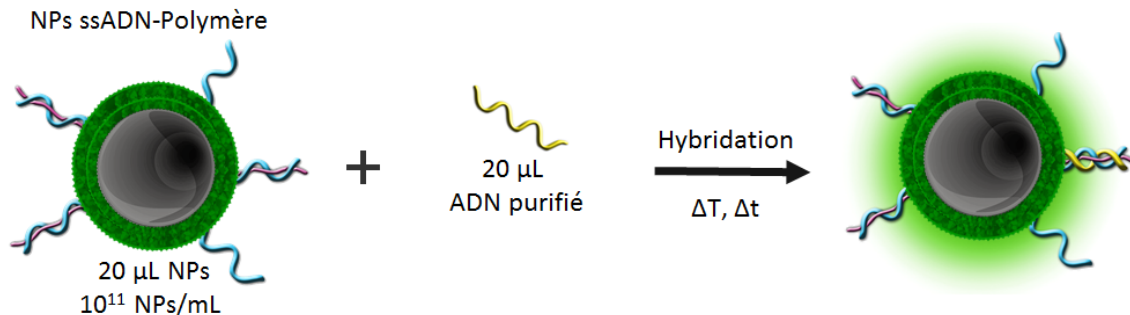


Figure 70: Illustration de la procédure utilisée pour l'analyse de l'ADN génomique.

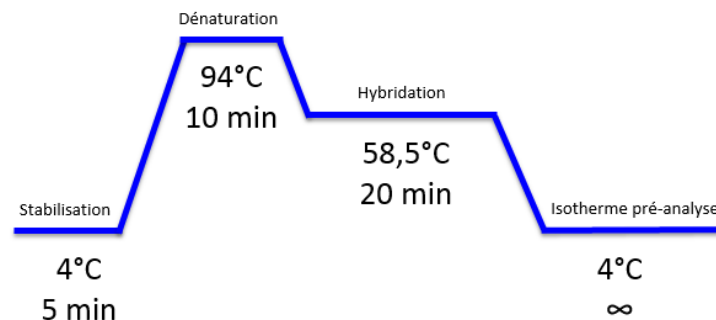


Figure 71: Rampe de température utilisée pour les étapes de dénaturation et d'hybridation.

Le groupe sanguin dont le génotype a été ciblé dans cette ultime partie du projet est le groupe Dombrock. Ce groupe sanguin est une cible particulièrement intéressante pour la mise au point d'une méthode de génotypage rapide à cause de l'indisponibilité d'antigènes spécifiques pour son identification par hémagglutination [76]. La sonde utilisée est donnée dans le Tableau 3. Cette sonde est complémentaire au gène Do^a et diffère par une base du gène Do^b . La présente étude consistait à déterminer s'il était possible de discriminer ces deux gènes à partir d'ADN génomique extrait d'échantillons sanguins réels, sans amplification enzymatique préalable. Le test a été effectué en simple aveugle (l'identité des séquences d'ADN n'était pas connue à l'avance

par l'expérimentateur). Les signaux de fluorescence du canal FL8 furent normalisés par la concentration d'ADN déterminée avec un spectromètre UV-Vis (NanoDrop Thermoscientific).

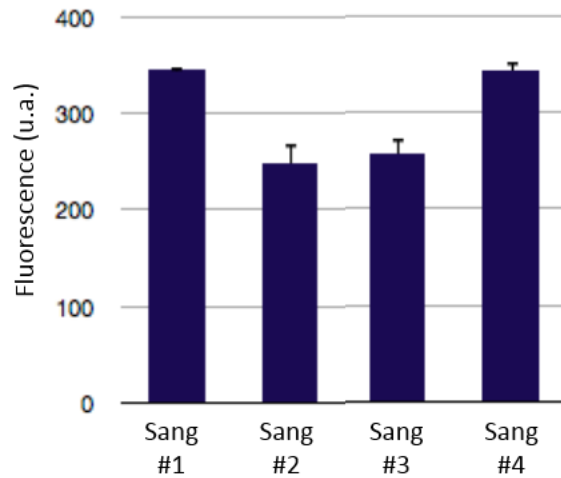


Figure 72: Intensité des signaux mesurés pour 4 échantillons de sang inconnus (triplicata).

Échantillons	Séquence	[ADN] ng/ μ L
Sang #1	PC	22,4
Sang #2	SNP	33,3
Sang #3	SNP	24,9
Sang #4	PC	27,7

Tableau 4: Identification des échantillons (séquence déterminée par PCR, concentration d'ADN déterminée avec un NanoDrop Thermoscientific).

Les résultats obtenus ont permis de déterminer correctement que les échantillons de sang #1 et #4 étaient positifs pour le gène Do^a tandis que les échantillons #2 et #3 étaient négatifs, et ont été confirmés par la suite par PCR classique (voir Tableau 4). Un test de Student ("*2-sample t-test*") a été effectué (à titre indicatif seulement, vu le petit nombre de valeurs disponibles) pour établir que les deux « populations » (chacune composée de 2 nombres) étaient différentes (voir Figure 73).

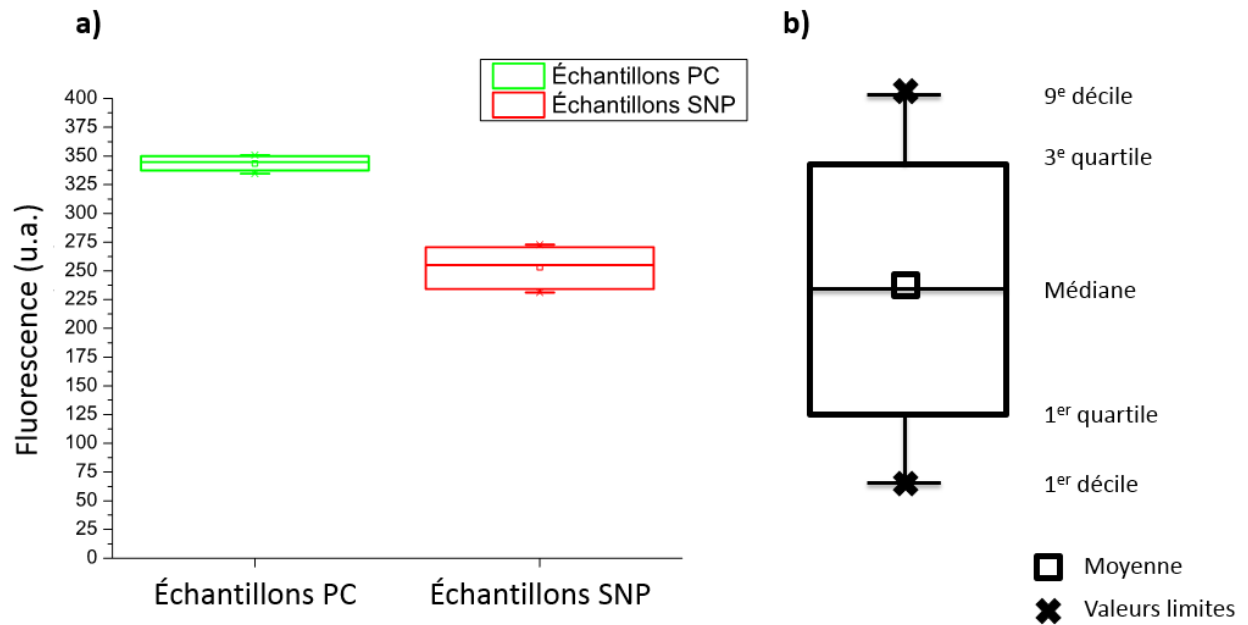


Figure 73: a) Test statistique de Student sur les échantillons de sang réel. b) Définition d'un diagramme en boîte à moustache (*box plot*)

3.4 Conclusion partielle

Il a été possible d'effectuer la détection d'oligonucléotides synthétiques et de discriminer des SNPs à des concentrations de l'ordre du picomolaire et ce, même en présence d'un grand excès de copies d'ADN non complémentaire (amplicons). Cette étude a également permis d'établir que le biocapteur est suffisamment sensible pour être mesuré sur une plateforme de cytométrie commerciale. Finalement, l'utilité du biocapteur pour l'identification d'un gène spécifique a été validée à partir d'ADN génomique extrait d'échantillons de sang humain fournis par notre collaborateur Héma-Québec. L'ADN a été extrait des échantillons de sang grâce à une trousse QIAGEN QIAamp DNA mini kit[74] et directement analysé grâce au biocapteur développé et ce, sans avoir recours à une étape d'amplification enzymatique (PCR).

Chapitre 4: Autres manipulations

D'autres manipulations ont été effectuées afin d'augmenter la polyvalence de ces nanoparticules et essayer d'améliorer ces biocapteurs. Même si ces manipulations n'ont pas été directement utilisées dans le cadre de la détection d'ADN, elles sont décrites dans cette section et différentes explications y sont données afin de démontrer en quoi ces changements pourraient être bénéfiques.

4.1 Incorporation de fluorophores différents dans la couche de silice

La première section consiste au greffage d'autres espèces fluorescentes dans la couche de silice. La possibilité d'ajouter d'autres espèces fluorescentes pourrait permettre le multiplexage et ainsi détecter plusieurs séquences d'ADN simultanément. Cette approche avait déjà été explorée par Maxime Rioux dans notre laboratoire sur la base d'un article publié sur ce sujet en 2006 [77]. Pour les présentes manipulations, la même technique que pour le couplage de l'éosine (réaction entre l'APTES et le groupement isothiocyanate des fluorophores, voir section 2.2.2.2) fut utilisée.

La Figure 74 représente les spectres d'excitation et d'émission de nanoparticules préparées avec deux fluorophores différents, la rhodamine B et la fluorescéine, et la Figure 75 est un exemple typique d'images obtenues en champ sombre et par microscopie de fluorescence pour ces nanoparticules. Les images de microscopie en champ sombre montrent la diffusion plasmonique et celles par microscopie de fluorescence montrent l'émission des fluorophores. Ces images montrent également que la fluorescence provient de la même région que la diffusion, ce qui démontre l'efficacité de greffage des différents fluorophores dans la silice.

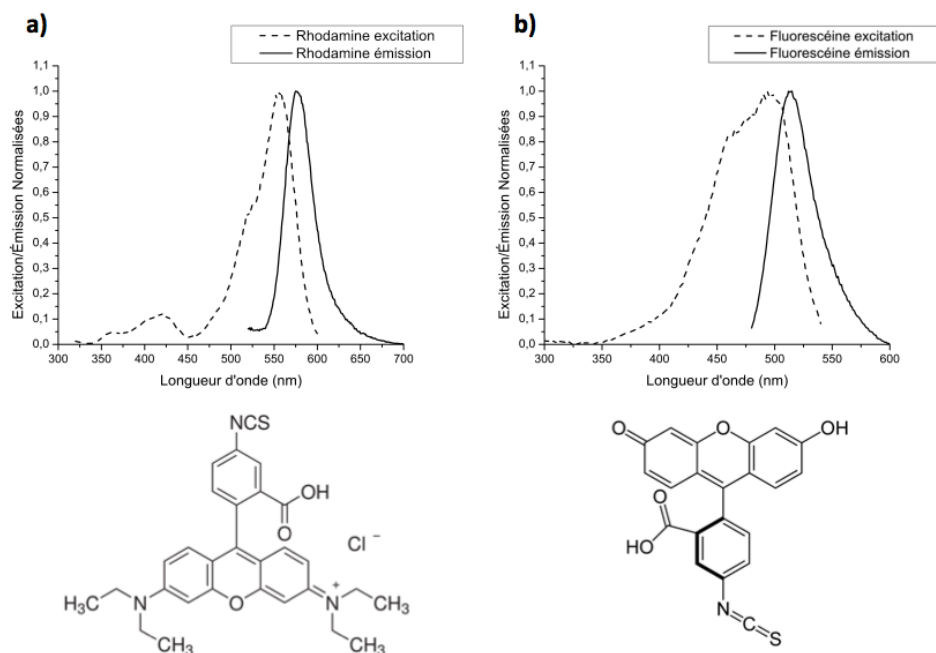


Figure 74: Spectres excitation/émission de nanoparticules Ag@SiO₂ dopées avec a) la rhodamine B isothiocyanate et b) la fluorescéine isothiocyanate et dispersées dans l'éthanol. Les structures moléculaires des deux fluorophores sont montrées au bas de la figure.

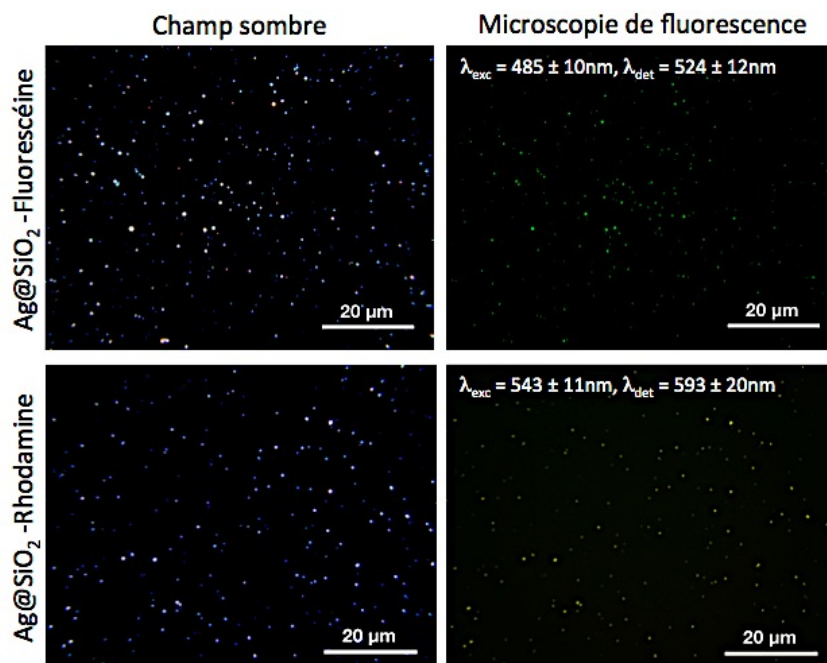


Figure 75: Images en champ sombre et par microscopie de fluorescence des nanoparticules Ag@SiO₂- (fluorescéine et rhodamine).

4.2 Fonctionnalisation de surface

Tel que décrit dans la section 1.4.2, l'utilisation de silice permet d'incorporer aisément différents groupements fonctionnels sur la surface des nanoparticules d'Ag@SiO₂ en utilisant différents silanes. Même si elles n'ont pas été utilisées directement dans le contexte de la détection d'ADN, plusieurs stratégies de fonctionnalisation ont été testées avec les nanoparticules cœur-coquille et elles seront décrites dans cette section.

4.2.1 Greffage de groupements amine

Pour d'autres applications, il serait intéressant de pouvoir greffer des groupements -NH₂ à la surface de la silice afin de pouvoir utiliser la chimie de couplage des amines. Pour ce faire, un silane fonctionnel -NH₂ fut utilisé (APTES: aminopropyltriéthoxysilane). Cette méthode a été adaptée de la littérature[78].

Protocole détaillé de greffage d'amines de la surface de la couche de silice (voir Figure 76)

- Dans une fiole conique de 50 mL, mélanger
 - 10 mL de nanoparticules Ag@SiO₂ dispersées dans l'éthanol
 - 425 µL de tampon acétate pH 4,7 (0,1 M)
 - 100 µL d'APTES (aminopropyltriéthoxysilane)
 - Agiter 2 h à température ambiante (soniquer aux 30 minutes)
 - Agiter 1 h à 50°C
 - Centrifuger 3 fois (8000 RPM, 15 min) et redisperser dans 10 mL d'éthanol anhydre.

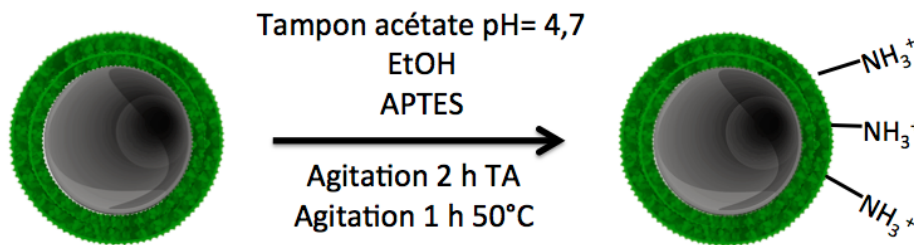


Figure 76: Schéma réactionnel de la fonctionnalisation amine.

L'observation d'un changement de charge très marqué entre les nanoparticules avant et après la fonctionnalisation amine par la mesure du potentiel Zêta sert à confirmer la réussite de cette étape (voir Figure 77).

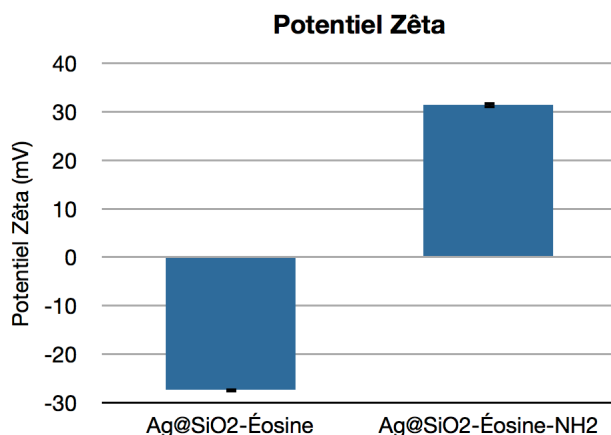


Figure 77: Mesure du potentiel Zêta (MES pH=6,5) pour les nanoparticules Ag@SiO₂-EiTC avant et après la fonctionnalisation amine.

4.2.2 Greffage de groupements acide carboxylique

Une autre fonctionnalisation intéressante et très utilisée est l'acide carboxylique. La méthode de greffage est aussi tirée de la littérature [78, 79]. À l'instar de la fonctionnalisation de groupements amine, cette méthode nécessite la synthèse du précurseur, l'acide 3-(triéthoxysilylpropyl-carbamoyl)butyrique (APTES-COOH) avant l'ajout sur les nanoparticules.

Protocole détaillé de synthèse de l'acide 3-(triéthoxysilylpropyl-carbamoyl)butyrique (voir Figure 78)

- Dans une fiole conique de 15 mL, mélanger
 - 1,0 mL d'APTES (aminopropyltriéthoxysilane)
 - 450 mg d'anhydride succinique
 - 1 mL d'éthanol anhydre
 - 0,5 mL de DMF
 - Bien agiter jusqu'à dissolution complète
 - Laisser agiter 12 h à température ambiante
 - Compléter à 5 mL avec éthanol anhydre (~0,9 M)

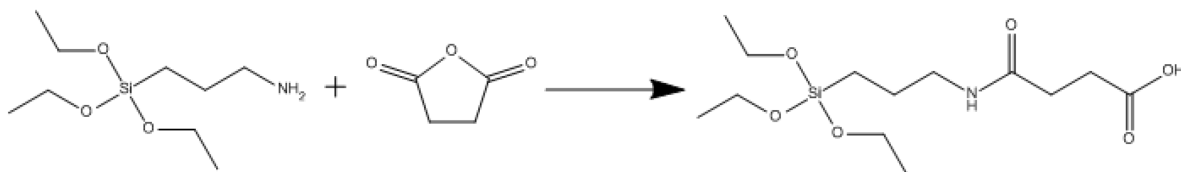


Figure 78: Schéma réactionnel de la synthèse de l'acide 3-(triéthoxysilylpropyl-carbamoyl)butyrique

Par la suite, cette molécule est utilisée afin de fonctionnaliser la surface de silice avec des groupements acide carboxylique.

Protocole détaillé de greffage d'acides carboxyliques (voir Figure 79)

- Dans une fiole conique de 50 mL, mélanger
 - 10 mL de nanoparticules Ag@SiO₂ dispersées dans l'éthanol
 - 500 µL de la solution APTES-COOH
 - Agiter 2 h à température ambiante
 - Agiter 1 h à 50°C
 - Centrifuger 3 fois (8000 RPM, 15 min) et redisperser dans 10 mL d'éthanol anhydre

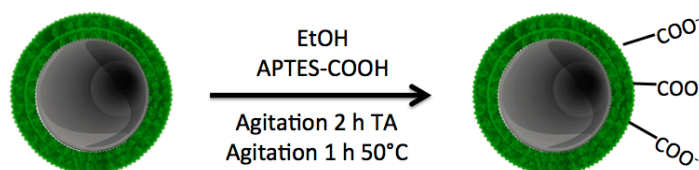


Figure 79: Schéma réactionnel de la fonctionnalisation acide carboxylique.

4.3 Synthèse de nanoparticules d'argent faiblement polydisperses par «seed-growth»

Un des désavantages de l'utilisation des nanoparticules synthétisées par la réduction au citrate est la polydispersité élevée de ces dernières. Tel qu'expliqué dans la section 1.4.1.1, l'intensité plasmonique ne varie que très peu pour des nanoparticules d'argent ayant un diamètre compris entre 40-70 nm. Cependant, la variation de la taille des nanoparticules peut avoir plusieurs effets néfastes. Par exemple, comme l'intensité de diffusion sera différente et puisque le nombre de fluorophores change d'une particule à l'autre, cela peut mener à une intensité de fluorescence différente d'une structure à l'autre.

Une synthèse idéale de nanoparticules d'argent consisterait en une méthode permettant d'obtenir une grande concentration de colloïdes très peu polydisperses. *Rainville et al.* ont démontré l'utilisation de l'acide tannique comme réducteur pour la formation de nanoparticules d'argent très uniformes[80]. Cependant, plusieurs étapes sont nécessaires afin d'obtenir une couche de silice fluorescente et la synthèse nécessite plus de quatre jours. *Wan et al.* ont quant à eux démontré l'utilisation d'une synthèse multi-étapes de croissance de nanoparticules d'argent en utilisant seulement le citrate comme réducteur rendant ainsi la surface beaucoup plus facile à couvrir avec de la silice[81].

La première étape de leur stratégie de synthèse consiste à former des germes qui serviront de point de nucléation pour les étapes de croissance subséquentes.

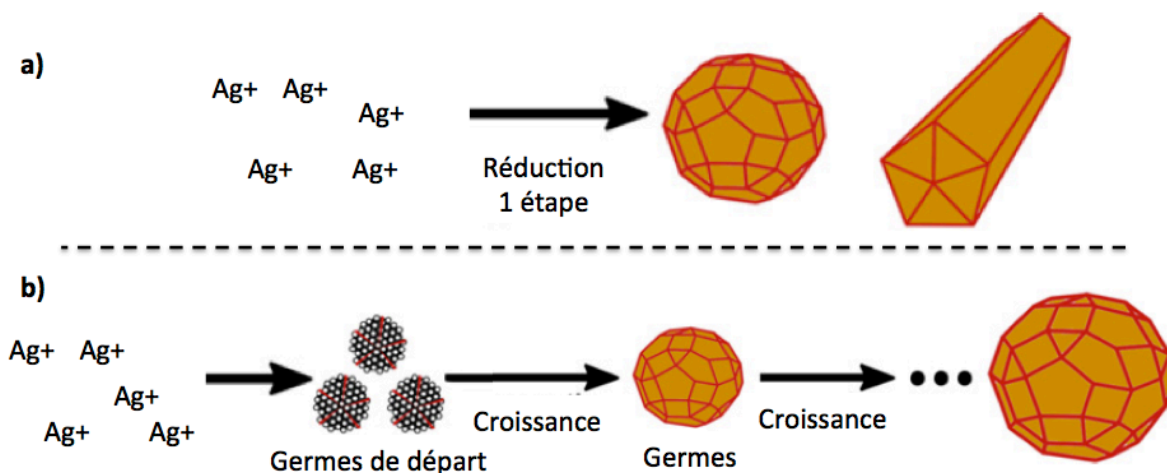


Figure 80: a) Schéma de synthèse de nanoparticules d'argent de diamètre ≈ 50 nm en une seule étape. b) Schéma de synthèse de nanoparticules d'argent ≈ 50 nm en utilisant la croissance multi-étapes[81].

4.3.1 Synthèse des germes de départ

Afin de former de petites nanoparticules ayant un faible indice de polydispersité, une méthode de réduction au borohydrure de sodium est employée en utilisant le citrate de sodium comme stabilisant. L'avantage d'utiliser le borohydrure provient de son haut pouvoir réducteur qui permet d'effectuer une nucléation très rapide.

Protocole détaillé de synthèse des germes de départ [81] (voir Figure 81)

- Dans un ballon à un col de 250 mL
 - Ajouter 75 mL de H₂O déminéralisée
 - Ajouter 20 mL d'une solution 1% m/m de citrate de trisodium dihydraté
 - Sous forte agitation, chauffer à 70°C durant 15 minutes
 - Ajouter 1,7 mL d'une solution 1% m/m de nitrate d'argent
 - Ajouter 2,0 mL d'une solution 0,1% m/m de borohydrure de sodium
 - Laisser à 70°C durant 1 h sous forte agitation
 - Compléter le volume à 100 mL avec de l'eau déminéralisée

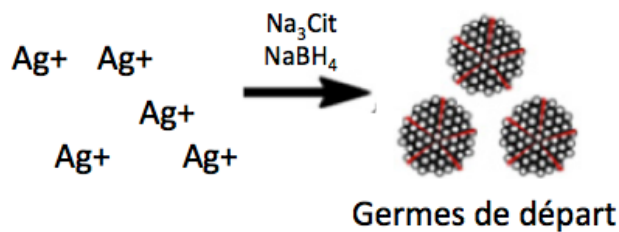


Figure 81: Schéma de synthèse des germes de départ

Par la suite, il a été possible de caractériser ces particules par spectroscopie UV-Vis ainsi que par TEM (voir Figure 82). Le spectre d'absorption UV-Vis (a) démontre une faible polydispersité, ce qui a été confirmé par microscopie électronique (b).

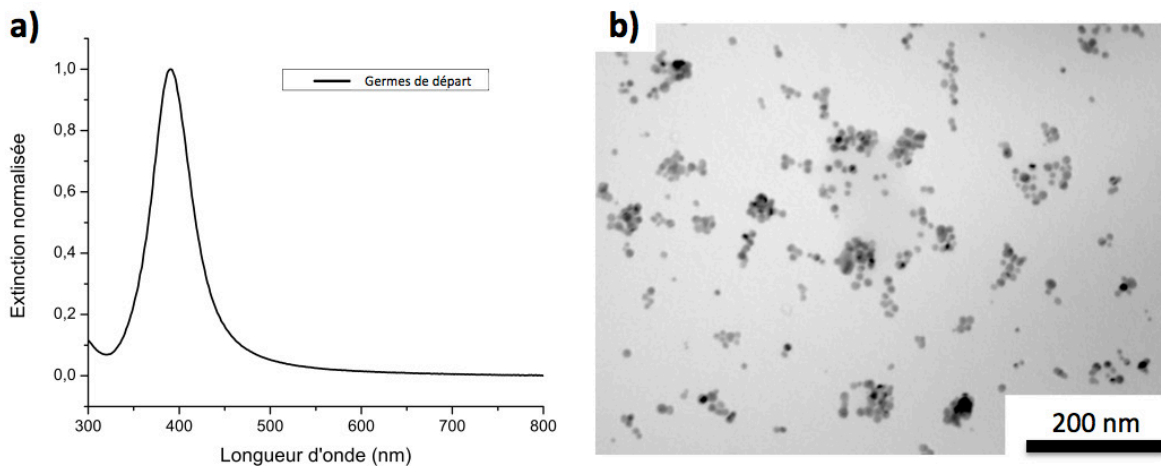


Figure 82: a) Spectre d'extinction UV-Vis des germes de départ. b) Image TEM de ces mêmes particules.

4.3.2 Synthèse des cœurs d'argent de 30 nm de diamètre

Par la suite, ces germes sont utilisés afin de former des nanoparticules d'environ 30 nm de diamètre. Cette fois-ci, le citrate est utilisé comme réducteur afin de faire croître les particules. Afin d'empêcher la formation d'une deuxième nucléation, l'argent et le citrate sont ajoutés de façon successive.

Protocole détaillé de synthèse des cœurs d'argent de 30 nm de diamètre (voir Figure 83)

- Dans un ballon tricol de 250 mL avec réfrigérant
 - Ajouter 75 mL H₂O nanopure
 - Ajouter 2 mL d'une solution 1% m/m de citrate de trisodium dihydraté
 - Chauffer à reflux sous forte agitation durant 15 minutes
 - Ajouter 10 mL de la solution de germes de départ
 - Ajouter 1,7 mL d'une solution 1% m/m de nitrate d'argent
 - Laisser sous forte agitation à reflux 1 h
 - Ajouter 2 mL d'une solution 1% m/m de citrate de trisodium dihydraté
 - Ajouter 1,7 mL d'une solution 1% m/m de nitrate d'argent
 - Laisser sous forte agitation à reflux 1 h
 - Ajouter 2 mL d'une solution 1% m/m de citrate de trisodium dihydraté
 - Ajouter 1,7 mL d'une solution 1% m/m de nitrate d'argent
 - Laisser sous forte agitation à reflux 1 h
 - Compléter le volume à 100 mL avec de l'eau nanopure

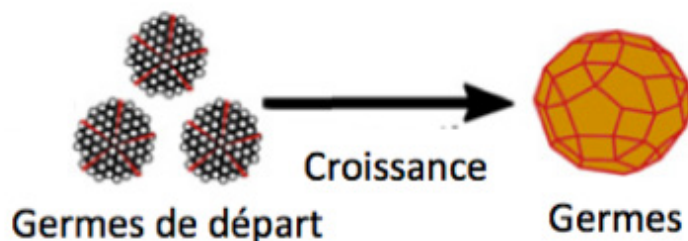


Figure 83: Schéma de synthèse des nanoparticules de 30 nm de diamètre.

Encore une fois, une caractérisation par spectroscopie UV-Vis et TEM fut effectuée (voir Figure 84). Le déplacement du plasmon vers les longueurs d'onde plus élevées confirme la croissance des colloïdes, alors que l'étroitesse du plasmon et l'absence d'épaulement démontrent une faible polydispersité (Figure 84a). La caractérisation TEM confirme la faible polydispersité des colloïdes obtenus (Figure 84b et Figure 85).

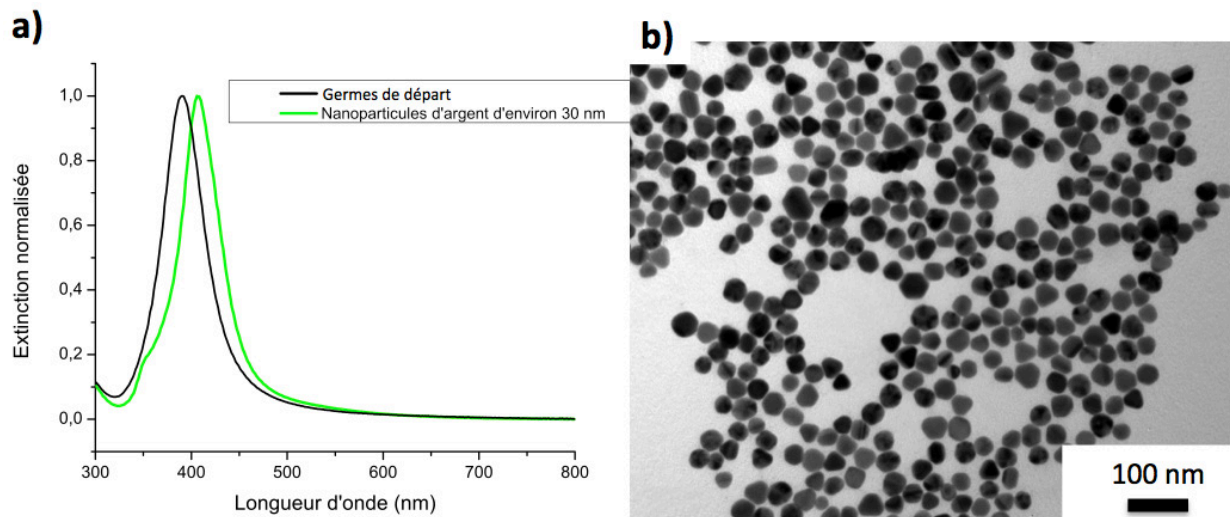


Figure 84: a) Spectre d'extinction UV-Vis des nanoparticules d'argent d'environ 30 nm. b) Image TEM de ces mêmes particules.

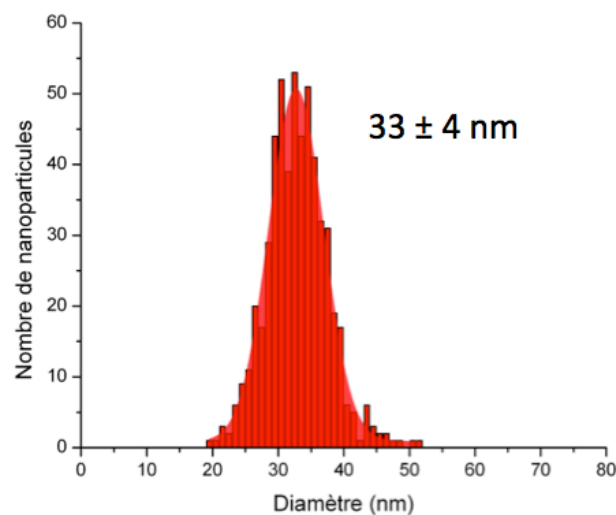


Figure 85: Histogramme de la distribution de taille des nanoparticules d'environ 30 nm de diamètre synthétisées par «seed-growth».

4.3.3 Synthèse des cœurs d'argent de 45 nm de diamètre

Par la suite, les nanoparticules de 30 nm sont utilisées comme germes afin de former des nanoparticules d'environ 45 nm de diamètre. Encore une fois, le citrate est utilisé comme réducteur afin de faire croître les particules. La température de cette étape est diminuée à 80°C afin de faire en sorte que le citrate soit faiblement réducteur afin d'empêcher une deuxième nucléation qui aurait comme désavantage de former une deuxième population de nanoparticules.

Protocole détaillé de synthèse des cœurs d'argent de 45 nm (Figure 86)

- Dans un ballon à un col de 250 mL
 - Ajouter 80 mL de H₂O nanopure
 - Ajouter 2 mL d'une solution 1% m/m de citrate de trisodium dihydraté
 - Chauffer à 80°C avec un bain-marie sous forte agitation durant 15 minutes
 - Ajouter 10 mL de la solution de nanoparticules de 30 nm (celles de l'étape précédente)
 - Ajouter 1,7 mL d'une solution 1% m/m de nitrate d'argent
 - Laisser sous forte agitation à 80°C 2 h
 - Compléter le volume à 100 mL avec de l'eau nanopure

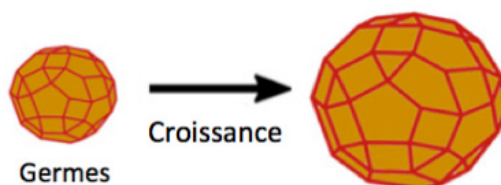


Figure 86: Schéma de synthèse des nanoparticules de 45 nm de diamètre.

La largeur du spectre d'absorption UV-Vis lors de cette étape démontre une grande polydispersité de forme (voir Figure 87a), ce qui a été aussi observé par TEM (voir Figure 87b).

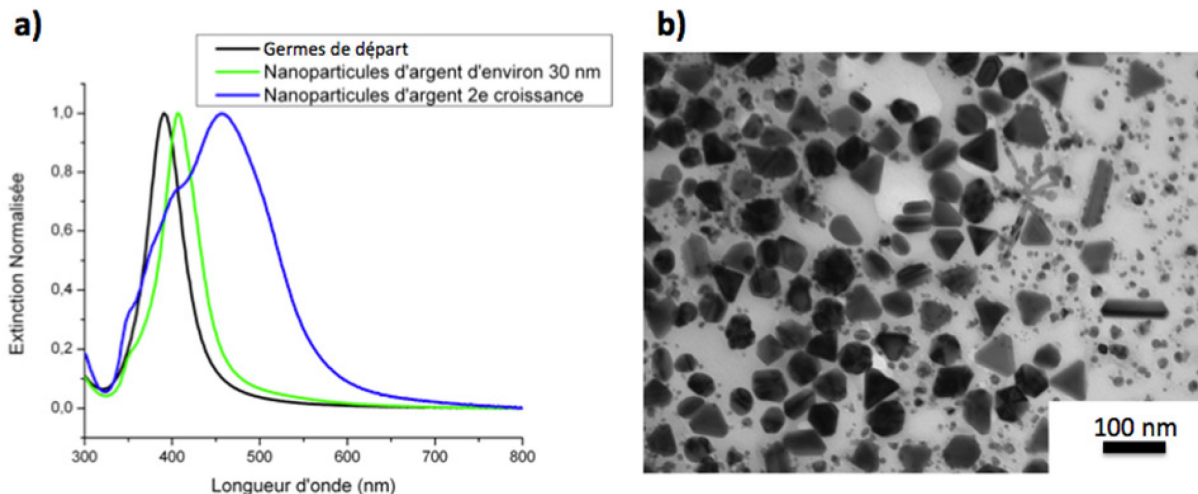


Figure 87: Spectre d'extinction UV-Vis de la deuxième croissance des nanoparticules d'argent. b) Image TEM de ces mêmes particules

À la conclusion de ce projet, la deuxième nucléation menait à la formation de formes anisotropes et à un contrôle perfectible de la distribution en taille des nanoparticules. Il est certain qu'afin d'utiliser cette méthode de synthèse, il sera impératif d'arriver à diminuer la polydispersité de cette 2^e croissance. Il sera possible, par exemple, d'essayer de modifier la concentration de germes et la température de afin de voir quels effets ces paramètres ont sur la croissance.

4.3.4 Couche de silice

Puisque la synthèse des nanoparticules de 45 nm de diamètre ne donnait pas de résultats optimaux, la couche de silice fut déposée sur les particules de 30 nm de diamètre en utilisant la méthode Stöber modifiée discutée dans la section 2.2.2. Afin d'utiliser cette méthode, la concentration des nanoparticules synthétisées par la méthode de «*seed-growth*» a dû être adaptée puisque la concentration de nanoparticules et de citrate de sodium est plus élevée que dans la méthode standard au citrate, ce qui favorise l'agrégation des nanoparticules lors du transfert dans l'éthanol. Ainsi, plusieurs dilutions ont été effectuées afin de vérifier la concentration à laquelle l'agrégation était éliminée. À partir d'une dilution de 1:2 (NPs : eau DM), l'épaulement dû à l'agrégation est presque complètement éliminé dans le spectre d'extinction UV-Vis. Ainsi, cette concentration a été utilisée afin de former des nanoparticules Ag@SiO₂ (voir Figure 88).

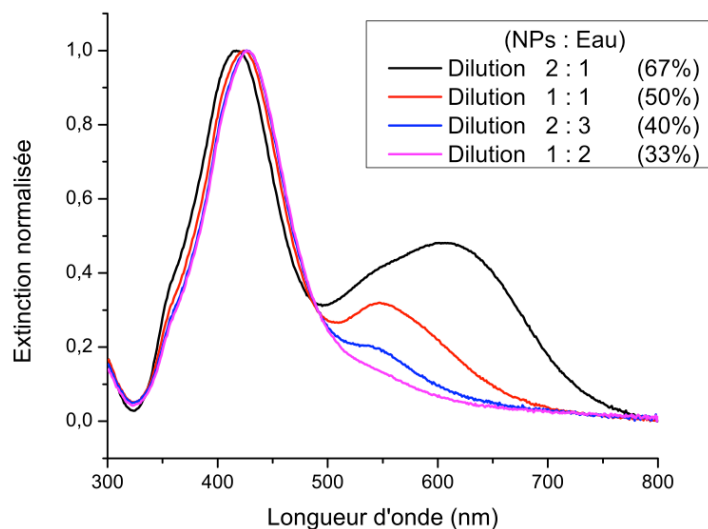


Figure 88: Spectres d'extinction UV-Vis des différentes dilutions des nanoparticules pour la formation de la couche de silice par la méthode Stöber.

Protocole détaillé de recouvrement des cœurs d'argent avec la silice

- Dans une fiole conique de 50 mL sous agitation mécanique, mélanger
 - 30 mL d'éthanol anhydre
 - 5 mL des nanoparticules d'argent diluées (5 mL NPs / 10 mL H₂O DM)
 - 700 μ L d'une solution de TEOS 10 mM (tétraéthylorthosilicate) dans l'éthanol
 - 400 μ L de NH₄OH 30%
 - Laisser 20-24 h sous agitation à température ambiante
 - Centrifuger 3 fois (8000 RPM, 20 min) et redisperser dans 12 mL d'éthanol anhydre

Par la suite, différentes caractérisations ont été effectuées. Tout d'abord, des spectres d'extinction UV-Vis et des images TEM ont été pris afin de déterminer s'il y avait de l'agrégation et afin de bien caractériser l'homogénéité et l'épaisseur de la couche de silice (voir Figure 89 et Figure 90).

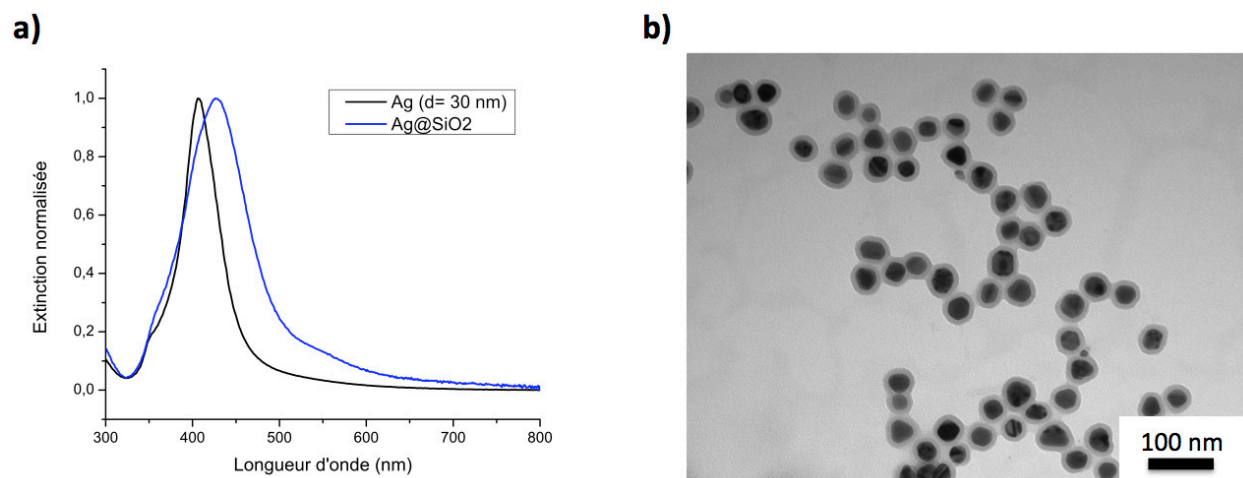


Figure 89: a) Spectre d'extinction UV-Vis et b) image TEM des nanoparticules Ag@SiO₂.

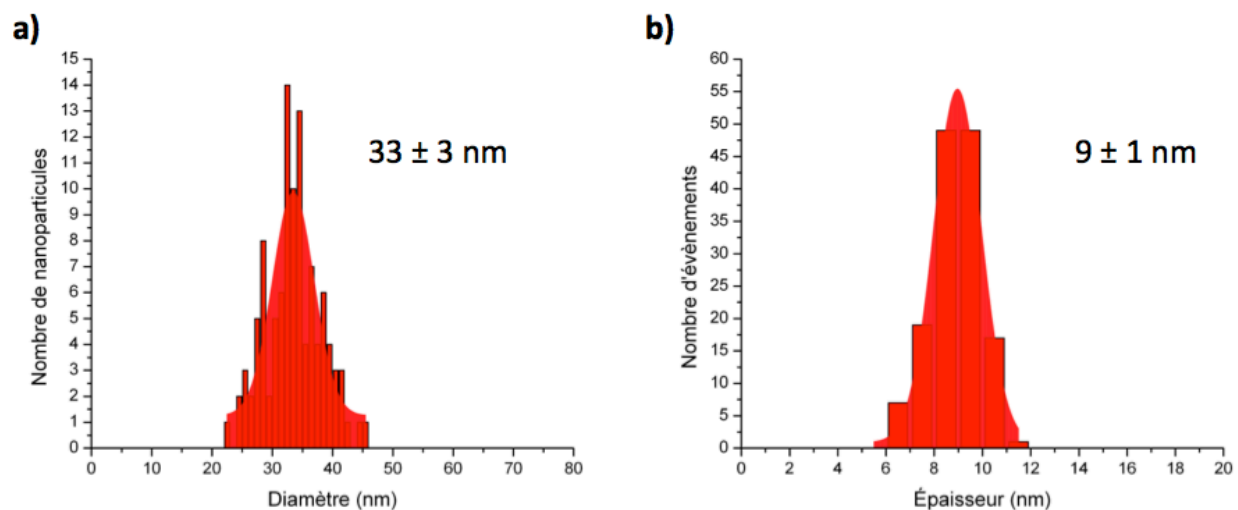


Figure 90: Histogrammes du diamètre des cœurs d'argent après le recouvrement de silice (a) et de l'épaisseur de la couche de silice (b).

Il est intéressant de noter que la couche de silice obtenue ressemble beaucoup à celle obtenue pour le recouvrement de silice discuté à la section 2.2.2. La taille des cœurs d'argent ne change pas (33 ± 3 nm) et la silice est très homogène (9 ± 1 nm).

4.3.5 Couche de silice fluorescente

Il est aussi possible de rendre ces nanoparticules fluorescentes en incorporant des fluorophores dans la silice en utilisant la méthode de recouvrement en une étape développée dans le cadre de cette maîtrise. Tout d'abord, le précurseur silane fluorescent est synthétisé. Dans ce cas-ci, la fluorescéine fut utilisée en suivant le même protocole que la section 2.2.2.2 (1,2:1 APTES:Éosine).

Protocole détaillé de recouvrement de silice fluorescente des cœurs d'argent

- Dans une fiole conique de 50 mL sous agitation mécanique
 - 30 mL d'éthanol anhydre
 - 5 mL des nanoparticules d'argent diluées (5 mL NPs / 10 mL H₂O DM)
 - 700 µL d'une solution de TEOS 10 mM (tétraéthylorthosilicate) dans l'éthanol
 - 220 µL de la solution du précurseur silane fluorescent ($\approx 8,4$ nmol)
 - 400 µL de NH₄OH 30%
 - Réaction 20-24 h à température ambiante sous agitation
 - Centrifuger trois fois (8000 RPM, 20 min) et redisperser dans 12 mL d'éthanol anhydre

Encore une fois, différentes caractérisations ont été effectuées. Des spectres d'extinction UV-Vis et des images TEM ont été prises afin de bien caractériser la couche de silice (voir Figure 91).

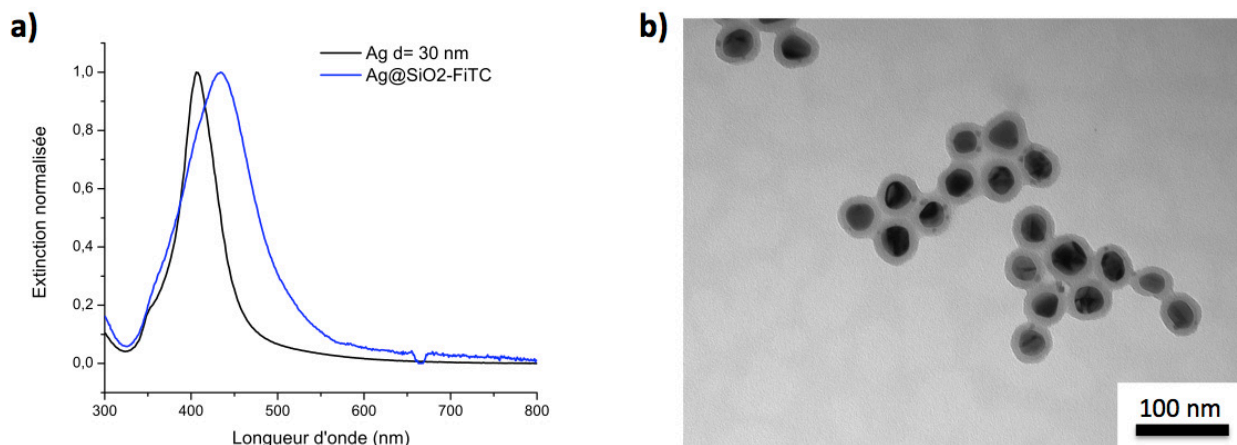


Figure 91: Spectre d'extinction UV-Vis (a) et image TEM (b) des nanoparticules Ag@SiO₂-FITC.

À cette concentration d'APTES-FiTC, la couche de silice reste très homogène et l'épaisseur ne change pas par rapport au recouvrement des cœurs d'argent par la silice pure (section 4.3.4).

Puisque ces particules sont fluorescentes, il est possible d'utiliser la microscopie optique de fluorescence afin de les observer. Ainsi, en comparant un spectre en champ sombre et un spectre en microscopie de fluorescence, il est possible de voir que la fluorescence provient des nanoparticules (voir Figure 92).

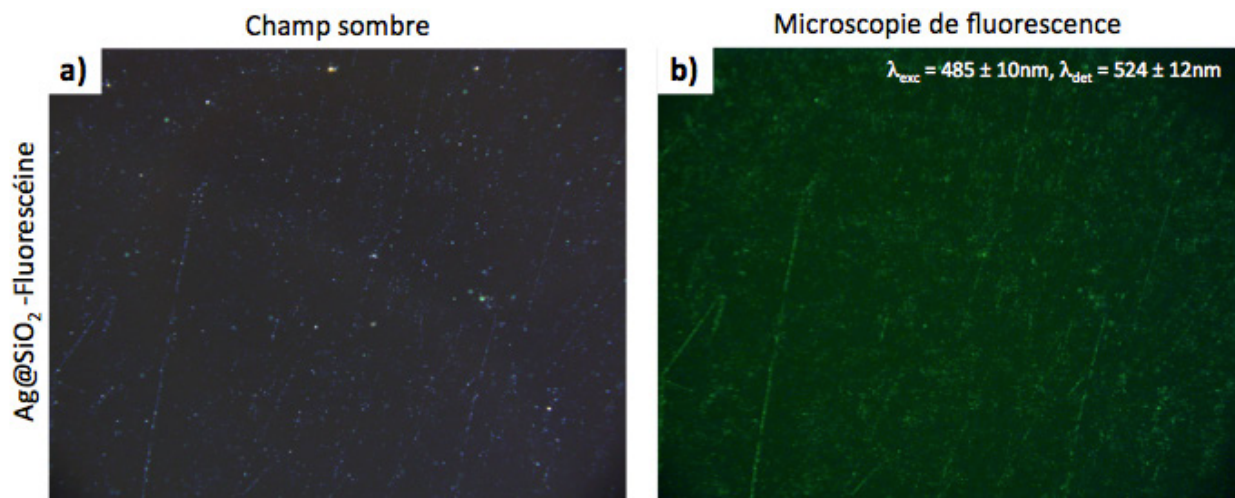


Figure 92: a) Image en champ sombre et b) par microscopie de fluorescence des nanoparticules Ag@SiO₂-FiTC.

4.4 Conclusion partielle

La méthode de recouvrement des cœurs d'argent avec de la silice fluorescente en une étape est très polyvalente. Il est ainsi possible d'incorporer différentes espèces de fluorophores (fluorescéine, rhodamine et éosine) dans la matrice de silice.

L'utilisation de la silice permet aussi l'incorporation de différents groupements fonctionnels à la surface des nanoparticules permettant ainsi d'utiliser différentes méthodes de couplage. Dans ce cas-ci, des groupements $-NH_2$ ou $-COOH$ furent incorporés sur la surface grâce à l'utilisation de silanes.

Pour terminer, une autre méthode de synthèse de cœurs métalliques fut investiguée afin de diminuer la polydispersité des nanoparticules. Cette méthode utilise le principe de «*seed-growth*» et permet la formation de nanoparticules d'environ 30 nm. Il serait possible, en principe, d'augmenter la taille de ces nanoparticules jusqu'à environ 45-50 nm ce qui serait favorable pour des utilisations en plasmonique où une intensité plus élevée de la bande plasmon est souhaitée [40, 41]. Cependant, jusqu'à maintenant la taille maximale obtenue est de 33 ± 3 nm.

Puisque la synthèse de ces particules utilise le même réducteur et le même stabilisant que la méthode au citrate classique, il a aussi été possible de recouvrir ces nanoparticules d'une couche de silice fluorescente de 9 ± 1 nm en utilisant la méthode Stöber modifiée. La caractérisation du MEF (temps de vie, facteur d'exaltation plasmonique) n'a pas été effectuée dans le cadre de ce travail.

Conclusion

En résumé, plusieurs améliorations ont été effectuées sur le biocapteur original. Tout d'abord, il est maintenant possible d'obtenir de façon reproductible et en grande quantité des colloïdes très fluorescents en moins de 24 h grâce à la synthèse de la couche fluorescente en une étape. L'utilisation des cœurs métalliques d'argent permettent l'amplification du signal de fluorescence tout en diminuant le risque de photoblanchiment grâce à la diminution du temps de vie à l'état excité des fluorophores. De plus, nous avons démontré que l'utilisation de la silice comme stabilisant des cœurs métalliques permet à la fois l'incorporation de différentes molécules fluorescentes en plus de différents groupements fonctionnels.

Les biocapteurs développés couplés avec la cytométrie à flux offrent plusieurs avantages sur les méthodes conventionnelles de génotypage. Tout d'abord, il n'est pas nécessaire d'amplifier l'ADN et le temps d'analyse d'un échantillon est très court, ce qui permettrait une cadence analytique élevée. De plus, puisqu'il n'y a pas d'étape d'amplification de l'ADN il n'est pas nécessaire d'avoir du personnel hautement qualifié afin d'effectuer les analyses et les risques de contamination sont réduits.

Pour terminer, il serait possible d'améliorer certains aspects de ces biocapteurs afin de faire en sorte d'augmenter la robustesse, la sensibilité et la performance de la méthode. Pour commencer, il serait possible d'utiliser des cœurs métalliques ayant une faible polydispersité afin que l'intensité de fluorescence de chaque particule soit identique. Pour terminer, le dosage précis du nombre de brins d'ADN sur la surface des nanoparticules serait nécessaire afin de ne pas utiliser un excès de polymère qui pourrait s'adsorber sur la surface des nanoparticules et ainsi augmenter le signal de fond.

Bibliographie

- [1.] Canadian Blood Services Futurs Donneurs. http://www.bloodservices.ca/CentreApps/Internet/UW_V502_MainEngine.nsf/page/F_Future+Donors?OpenDocument (Date de consultation 2013-06-12).
- [2.] Le Goff, G. C.; Brès, J.-C.; Rigal, D.; Blum, L. J.; Marquette, C. A., Robust, High-Throughput Solution for Blood Group Genotyping. *Analytical Chemistry* **2010**, *82* (14), 6185-6192.
- [3.] Reid, M. E., Transfusion in the age of molecular diagnostics. *ASH Education Program Book* **2009**, *2009* (1), 171-177.
- [4.] Avent, N. D., Large-scale blood group genotyping – clinical implications. *British Journal of Haematology* **2009**, *144* (1), 3-13.
- [5.] Monteiro, F.; Tavares, G.; Ferreira, M.; Amorim, A.; Bastos, P.; Rocha, C.; Araújo, F.; Cunha-Ribeiro, L. M., Technologies involved in molecular blood group genotyping. *ISBT Science Series* **2011**, *6* (1), 1-6.
- [6.] Anstee, D. J., Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. *Blood* **2009**, *114* (2), 248-256.
- [7.] Brettell, T. A.; Butler, J. M.; Almirall, J. R., Forensic Science. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (12), 4695-4711.
- [8.] Wang, J.; Cai, X.; Rivas, G.; Shiraishi, H.; Farias, P. A. M.; Dontha, N., DNA Electrochemical Biosensor for the Detection of Short DNA Sequences Related to the Human Immunodeficiency Virus. *Analytical Chemistry* **1996**, *68* (15), 2629-2634.
- [9.] Quan, P. L.; Palacios, G.; Jabado, O. J.; Conlan, S.; Hirschberg, D. L.; Pozo, F.; Jack, P. J.; Cisterna, D.; Renwick, N.; Hui, J.; Drysdale, A.; Amos-Ritchie, R.; Baumeister, E.; Savy, V.; Lager, K. M.; Richt, J. A.; Boyle, D. B.; Garcia-Sastre, A.; Casas, I.; Perez-Brena, P.; Briese, T.; Lipkin, W. I., Detection of respiratory viruses and subtype identification of influenza A viruses by GreeneChipResp oligonucleotide microarray. *J Clin Microbiol* **2007**, *45* (8), 2359-64.
- [10.] Ivnitski, D.; O'Neil, D. J.; Gattuso, A.; Schlicht, R.; Calidonna, M.; Fisher, R., Nucleic acid approaches for detection and identification of biological warfare and infectious disease agents. *BioTechniques* **2003**, *35* (4), 862-869.
- [11.] Kricka, L. J., Nucleic Acid Detection Technologies — Labels, Strategies, and Formats. *Clinical Chemistry* **1999**, *45* (4), 453-458.
- [12.] Morgan, J. P.; Daniels, M., Excited States of DNA and its Components at Room Temperature - III. Spectra Polarisation and Quantum Yields of Emission from ApA and Poly rA. *Photochemistry and Photobiology* **1980**, *31* (2), 101-113.
- [13.] Sahota, A.; Brooks, A. I.; Tischfield, J. A.; King, I. B., Preparing DNA from Blood for Genotyping. *Cold Spring Harbor Protocols* **2007**, *2007* (8), pdb.prot4830.
- [14.] Wilke, W. W.; Jones, R. N.; Sutton, L. D., Automation of polymerase chain reaction tests: Reduction of human errors leading to contamination. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **1995**, *21* (4), 181-185.

- [15.] Ho, H.-A.; Boissinot, M.; Bergeron, M. G.; Corbeil, G.; Doré, K.; Boudreau, D.; Leclerc, M., Colorimetric and Fluorometric Detection of Nucleic Acids Using Cationic Polythiophene Derivatives. *Angewandte Chemie* **2002**, *114* (9), 1618-1621.
- [16.] Ho, H.-A.; Najari, A.; Leclerc, M., Optical Detection of DNA and Proteins with Cationic Polythiophenes. *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41* (2), 168-178.
- [17.] Lessard-Viger, M.; Rioux, M.; Rainville, L.; Boudreau, D., FRET Enhancement in Multilayer Core-Shell Nanoparticles. *Nano Letters* **2009**, *9* (8), 3066-3071.
- [18.] Brouard, D.; Viger, M. L.; Bracamonte, A. G.; Boudreau, D., Label-Free Biosensing Based on Multilayer Fluorescent Nanocomposites and a Cationic Polymeric Transducer. *ACS Nano* **2011**, *5* (3), 1888-1896.
- [19.] Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edition ed.; Springer: 2006; p 954.
- [20.] Valeur, B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH: 2001; p 381.
- [21.] Rioux, M. Développement de nanoparticules luminescentes à base d'or et d'argent pour l'imagerie cellulaire. Mémoire, Université Laval, Québec, 2011.
- [22.] Seery, M. The Photochemistry Portal. <http://photochemistryportal.net/home/?cat=11> (Date de consultation 2013-04-05).
- [23.] Truong, K.; Ikura, M., The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Current Opinion in Structural Biology* **2001**, *11* (5), 573-578.
- [24.] Pollok, B. A.; Heim, R., Using GFP in FRET-based applications. *Trends in cell biology* **1999**, *9* (2), 57-60.
- [25.] Wikipedia Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes. http://fr.wikipedia.org/wiki/Transfert_d%27%C3%A9nergie_entre_mol%C3%A9cules_fluorescentes (Date de consultation 2013-04-19).
- [26.] Lakowicz, J. R.; Ray, K.; Chowdhury, M.; Szymanski, H.; Fu, Y.; Zhang, J.; Nowaczyk, K., Plasmon-controlled fluorescence: a new paradigm in fluorescence spectroscopy. *Analyst* **2008**, *133* (10), 1308-1346.
- [27.] Aslan, K.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D., Plasmon light scattering in biology and medicine: new sensing approaches, visions and perspectives. *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, *9* (5), 538-544.
- [28.] Lakowicz, J., Plasmonics in Biology and Plasmon-Controlled Fluorescence. *Plasmonics* **2006**, *1* (1), 5-33.
- [29.] Yguerabide, J.; Yguerabide, E. E., Light-Scattering Submicroscopic Particles as Highly Fluorescent Analogs and Their Use as Tracer Labels in Clinical and Biological Applications: I. Theory. *Analytical Biochemistry* **1998**, *262* (2), 137-156.
- [30.] Lakowicz, J. R., Radiative Decay Engineering: Biophysical and Biomedical Applications. *Analytical Biochemistry* **2001**, *298* (1), 1-24.

- [31.] Chen, Y.; Munechika, K.; Ginger, D. S., Dependence of Fluorescence Intensity on the Spectral Overlap between Fluorophores and Plasmon Resonant Single Silver Nanoparticles. *Nano Letters* **2007**, *7* (3), 690-696.
- [32.] Rycenga, M.; Cobley, C. M.; Zeng, J.; Li, W.; Moran, C. H.; Zhang, Q.; Qin, D.; Xia, Y., Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications. *Chemical Reviews* **2011**, *111* (6), 3669-3712.
- [33.] Lu, X.; Rycenga, M.; Skrabalak, S. E.; Wiley, B.; Xia, Y., Chemical Synthesis of Novel Plasmonic Nanoparticles. *Annual Review of Physical Chemistry* **2009**, *60* (1), 167-192.
- [34.] Xia, Y.; Xiong, Y.; Lim, B.; Skrabalak, S. E., Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics? *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48* (1), 60-103.
- [35.] Tao, A. R.; Habas, S.; Yang, P., Shape Control of Colloidal Metal Nanocrystals. *Small* **2008**, *4* (3), 310-325.
- [36.] Kwon, S. G.; Hyeon, T., Formation Mechanisms of Uniform Nanocrystals via Hot-Injection and Heat-Up Methods. *Small* **2011**, *7* (19), 2685-2702.
- [37.] Kahlweit, M., Ostwald ripening of precipitates. *Advances in Colloid and Interface Science* **1975**, *5* (1), 1-35.
- [38.] Liu, S.; Zhang, Z.; Han, M., Gram-Scale Synthesis and Biofunctionalization of Silica-Coated Silver Nanoparticles for Fast Colorimetric DNA Detection. *Analytical Chemistry* **2005**, *77* (8), 2595-2600.
- [39.] Wu, X.; Redmond, P. L.; Liu, H.; Chen, Y.; Steigerwald, M.; Brus, L., Photovoltage Mechanism for Room Light Conversion of Citrate Stabilized Silver Nanocrystal Seeds to Large Nanoprisms. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (29), 9500-9506.
- [40.] Zhang, J.; Fu, Y.; Chowdhury, M. H.; Lakowicz, J. R., Single-Molecule Studies on Fluorescently Labeled Silver Particles: Effects of Particle Size. *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *112* (1), 18-26.
- [41.] Guzatov, D. V.; Vaschenko, S. V.; Stankevich, V. V.; Lunevich, A. Y.; Glukhov, Y. F.; Gaponenko, S. V., Plasmonic Enhancement of Molecular Fluorescence near Silver Nanoparticles: Theory, Modeling, and Experiment. *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (19), 10723-10733.
- [42.] Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E., Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science* **1968**, *26* (1), 62-69.
- [43.] Coltrain Bradley, K.; Kelts Larry, W., The Chemistry of Hydrolysis and Condensation of Silica Sol-Gel Precursors. In *The Colloid Chemistry of Silica*, American Chemical Society: 1994; Vol. 234, pp 403-418.
- [44.] Ocana, M.; Hsu, W. P.; Matijevic, E., Preparation and properties of uniform-coated colloidal particles. 6. Titania on zinc oxide. *Langmuir* **1991**, *7* (12), 2911-2916.
- [45.] Lessard-Viger, M. Étude et application de l'exaltation plasmonique pour le développement de nouvelles sondes fluorescentes. Thèse, Université Laval, Québec, 2011.
- [46.] Malvern DLVO Theory. http://www.malverninstruments.fr/LabFre/industry/colloids/dlvo_theory_1.jpg (Date de consultation 2013-07-08).

- [47.] Wahl, M. Time-Correlated Single Photon Counting. http://www.picoquant.com/technotes/technote_tcspsc.pdf (Date de consultation 2013-04-23).
- [48.] UV-Vis Varian Cary 50. http://physik2.uni-goettingen.de/research/2_hofs/methods/uvvis.
- [49.] Wikipedia microscopie de fluorescence. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:FluorescenceFilters-fr.svg> (Date de consultation 2013-06-18).
- [50.] Malvern Zeta Potential An Introduction in 30 Minutes. <http://www.malvern.com/>.
- [51.] Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W., *Fundamentals of Biochemistry* 3ed.; John Wiley & Sons: 2008; p 1240.
- [52.] Reece, J. B.; Urry, L. A.; Cain, M. L.; Wasserman, S. A.; Minorsky, P. V.; Jackson, R. B., *Campbell Biology*. 9 ed.; Benjamin Cummings: 2010; p 1464.
- [53.] UK, C. R. Genes and DNA. <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/about-cancer/what-is-cancer/body/genes-and-dna> (Date de consultation 2013-04-10).
- [54.] Elghanian, R.; Storhoff, J. J.; Mucic, R. C.; Letsinger, R. L.; Mirkin, C. A., Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles. *Science* **1997**, *277* (5329), 1078-1081.
- [55.] Graham, D.; Thompson, D. G.; Smith, W. E.; Faulds, K., Control of enhanced Raman scattering using a DNA-based assembly process of dye-coded nanoparticles. *Nature nanotechnology* **2008**, *3* (9), 548-51.
- [56.] L.-Viger, M.; Brouard, D.; Boudreau, D., Plasmon-Enhanced Resonance Energy Transfer from a Conjugated Polymer to Fluorescent Multilayer Core-Shell Nanoparticles: A Photophysical Study. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115* (7), 2974-2981.
- [57.] Ho, H. A.; Doré, K.; Boissinot, M.; Bergeron, M. G.; Tanguay, R. M.; Boudreau, D.; Leclerc, M., Direct Molecular Detection of Nucleic Acids by Fluorescence Signal Amplification. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (36), 12673-12676.
- [58.] Shapiro, H. M., *Practical Flow Cytometry*. 4 ed.; Wiley: 2003; p 681.
- [59.] Ung, T.; Liz-Marzán, L. M.; Mulvaney, P., Optical Properties of Thin Films of Au@SiO₂ Particles. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105* (17), 3441-3452.
- [60.] Rodríguez-Fernández, J.; Pastoriza-Santos, I.; Pérez-Juste, J.; García de Abajo, F. J.; Liz-Marzán, L. M., The Effect of Silica Coating on the Optical Response of Sub-micrometer Gold Spheres. *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111* (36), 13361-13366.
- [61.] Mock, J. J.; Smith, D. R.; Schultz, S., Local Refractive Index Dependence of Plasmon Resonance Spectra from Individual Nanoparticles. *Nano Letters* **2003**, *3* (4), 485-491.
- [62.] Moores, A.; Goettmann, F., The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications. *New Journal of Chemistry* **2006**, *30* (8), 1121-1132.
- [63.] Cheng, D.; Xu, Q.-H., Separation distance dependent fluorescence enhancement of fluorescein isothiocyanate by silver nanoparticles. *Chemical Communications* **2007**, (3), 248-250.
- [64.] Montalti, M.; Prodi, L.; Zaccheroni, N.; Zattoni, A.; Reschiglian, P.; Falini, G., Energy Transfer in Fluorescent Silica Nanoparticles. *Langmuir* **2004**, *20* (7), 2989-2991.

- [65.] Ung, T.; Liz-Marzán, L. M.; Mulvaney, P., Controlled Method for Silica Coating of Silver Colloids. Influence of Coating on the Rate of Chemical Reactions. *Langmuir* **1998**, *14* (14), 3740-3748.
- [66.] Li, X.; Lenhart, J. J.; Walker, H. W., Aggregation Kinetics and Dissolution of Coated Silver Nanoparticles. *Langmuir* **2011**.
- [67.] van Blaaderen, A.; Vrij, A., Synthesis and Characterization of Monodisperse Colloidal Organo-silica Spheres. *Journal of Colloid and Interface Science* **1993**, *156* (1), 1-18.
- [68.] Balladur, V.; Theretz, A.; Mandrand, B., Determination of the Main Forces Driving DNA Oligonucleotide Adsorption onto Aminated Silica Wafers. *Journal of Colloid and Interface Science* **1997**, *194* (2), 408-418.
- [69.] Sapsford, K. E.; Algar, W. R.; Berti, L.; Gemmill, K. B.; Casey, B. J.; Oh, E.; Stewart, M. H.; Medintz, I. L., Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology. *Chemical Reviews* **2013**, *113* (3), 1904-2074.
- [70.] Pham, T.; Jackson, J. B.; Halas, N. J.; Lee, T. R., Preparation and Characterization of Gold Nanoshells Coated with Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **2002**, *18* (12), 4915-4920.
- [71.] Samuel, J.; Raccurt, O.; Poncelet, O.; Auger, A.; Ling, W.-L.; Cherns, P.; Grunwald, D.; Tillement, O., Surface characterizations of fluorescent-functionalized silica nanoparticles: from the macroscale to the nanoscale. *Journal of Nanoparticle Research* **2010**, *12* (6), 2255-2265.
- [72.] Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*. 2 ed.; Academic Press: 2008; p 1323.
- [73.] Scientific, T. SMCC. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=02030351> (Date de consultation 2013-04-24).
- [74.] QIAGEN QIAquick Nucleotide Removal Kit. <http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Sample-Technologies/DNA-Sample-Technologies/DNA-Cleanup/QIAquick-Nucleotide-Removal-Kit#orderinginformation> (Date de consultation 2013-05-13).
- [75.] QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit. <http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Sample-Technologies/DNA-Sample-Technologies/Genomic-DNA/QIAamp-DNA-Mini-Kit> (Date de consultation 2013-07-20).
- [76.] Reid, M. E., Complexities of the Dombrock blood group system revealed. *Transfusion* **2005**, *45*, 92S-99S.
- [77.] Wang, L.; Tan, W., Multicolor FRET Silica Nanoparticles by Single Wavelength Excitation. *Nano Letters* **2005**, *6* (1), 84-88.
- [78.] Liu, S. H.; Han, M. Y., Synthesis, Functionalization, and Bioconjugation of Monodisperse, Silica-Coated Gold Nanoparticles: Robust Bioprobes. *Advanced Functional Materials* **2005**, *15* (6), 961-967.
- [79.] Levy, L.; Sahoo, Y.; Kim, K.-S.; Bergey, E. J.; Prasad, P. N., Nanochemistry: Synthesis and Characterization of Multifunctional Nanoclinics for Biological Applications. *Chemistry of Materials* **2002**, *14* (9), 3715-3721.
- [80.] Rainville, L.; Dorais, M.-C.; Boudreau, D., Controlled synthesis of low polydispersity Ag@SiO₂ core-shell nanoparticles for use in plasmonic applications. *RSC Advances* **2013**, *3* (33), 13953.

[81.] Wan, Y.; Guo, Z.; Jiang, X.; Fang, K.; Lu, X.; Zhang, Y.; Gu, N., Quasi-spherical silver nanoparticles: Aqueous synthesis and size control by the seed-mediated Lee-Meisel method. *Journal of Colloid and Interface Science* **2013**, *394* (0), 263-268.

Annexe

Liste des produits chimiques utilisés

Le polymère chlorure de poly(1H-imidazolium, 1-méthyl-3-[2-[(4-méthyl-3-thienyl)oxy]éthyl]) nous a été fourni et synthétisé par le groupe du Prof. Mario Leclerc en utilisant la méthode déjà publiée [15].

Tous les autres réactifs ont été achetés et utilisés sans purification supplémentaire.

Nitrate d'argent (AgNO_3 , 99,9999%), citrate de sodium tribasique dihydraté ($\text{Na}_3\text{-Cit.}2\text{H}_2\text{O}$, Réactif ACS $\geq 99,0\%$), tétraéthyl orthosilicate (TEOS, Réactif plus $\geq 99\%$), hydroxyde d'ammonium (NH_4OH , 28-30%), 3-(aminopropyl)triéthoxysilane (APTES, $\geq 98\%$), anhydride succinique (99+%), N-hydroxysuccinimide (NHS, 98%), MES hydrate ($\geq 99,5\%$), chlorure de sodium (NaCl , $\geq 99\%$), rhodamine isothiocyanate (RiTC, isomères), fluorescéine isothiocyanate (FiTC, 90%), triéthylamine (99%) ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

L'éosin-5-isothiocyanate (EiTC) a été acheté chez Marker Gene Technologies, l'éthanol anhydre (EtOH) chez Commercial Alcohols et le N,N-diméthylformamide (DMF, ACS) chez EMD. Le cyanure de potassium (KCN 98%) et le mercaptopropyltriméthoxysilane (MPTMS 97%) ont été achetés chez Fluka. Le succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) et le cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) ont été achetés chez GBiosciences. L'eau stérile a été préparée à partir d'eau 18M Ω déminéralisée. Les oligonucléotides ont été achetés chez Integrated DNA Technologies, Inc. (désalinisation standard, sauf pour la sonde Cy5.5 qui a été purifiée par HPCL).