

2. Principes théoriques

2.1 Nanomatériaux

Les nanomatériaux représentent une classe de matériaux ayant au moins une dimension dans le domaine nanométrique. Leur intérêt provient principalement de leur taille, à la frontière du domaine atomique, qui leur confère des propriétés différant grandement du matériau à l'état macroscopique. Le confinement des électrons dans une ou plusieurs dimensions, par exemple, procure aux nanostructures des propriétés électroniques et optiques uniques qui suscitent l'attention dans une multitude de domaines. Par ailleurs, leur grand rapport surface/volume ouvre la porte à une grande gamme de modifications de surface qui permet de créer des nanoarchitectures adaptées à de nouvelles applications.^{36,37}

2.1.1 Nanoparticules métalliques

Les nanoparticules métalliques présentent un intérêt particulier dans les technologies émergentes en raison de leurs propriétés plasmoniques. En effet, en présence d'un champ électromagnétique externe d'une certaine fréquence, les électrons de conduction des nanoparticules métalliques peuvent se mettre à osciller collectivement autour du noyau chargé positivement. Cette résonance, illustrée à la figure 2.1, porte le nom de *plasmon de surface localisé*, en raison du confinement de la nanoparticule dans les trois dimensions.^{38,39}

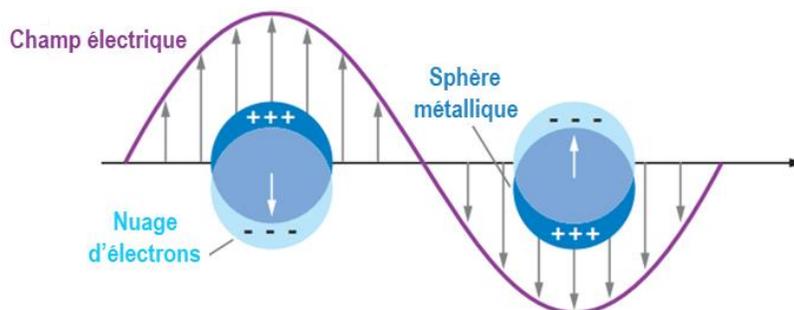


Figure 2.1 – Schéma présentant un plasmon de surface localisé pour une particule métallique soumise à un champ électromagnétique externe.³⁹

Une conséquence de ce phénomène électronique est que les nanoparticules métalliques possèdent une signature d'absorption et de diffusion de la lumière à des longueurs d'onde bien précises. Lors du processus d'absorption, la lumière incidente est convertie sous forme de chaleur par le plasmon, alors qu'elle est réémise de manière isotropique à la même fréquence au moment de la diffusion. La

combinaison de ces deux phénomènes, que l'on nomme l'*extinction*, peut d'ailleurs être mesurée par spectroscopie UV-visible.⁴⁰ La fréquence à laquelle les électrons d'une nanostructure entrent en résonance dépend toutefois de nombreux facteurs, tels que la nature du matériau la composant, sa taille, sa forme ainsi que la constante diélectrique de son milieu environnant.⁴¹ Des nanoparticules sphériques d'indium, par exemple, possèdent un maximum plasmonique dans l'ultraviolet, tandis que les nanoparticules composées d'argent et d'or ont un maximum respectivement aux environs de 400 nm et 530 nm. De plus, comme l'illustre la figure 2.2, la position de la bande plasmonique se déplace vers le rouge lorsque le diamètre des nanoparticules, ici composées d'argent, augmente.⁴²

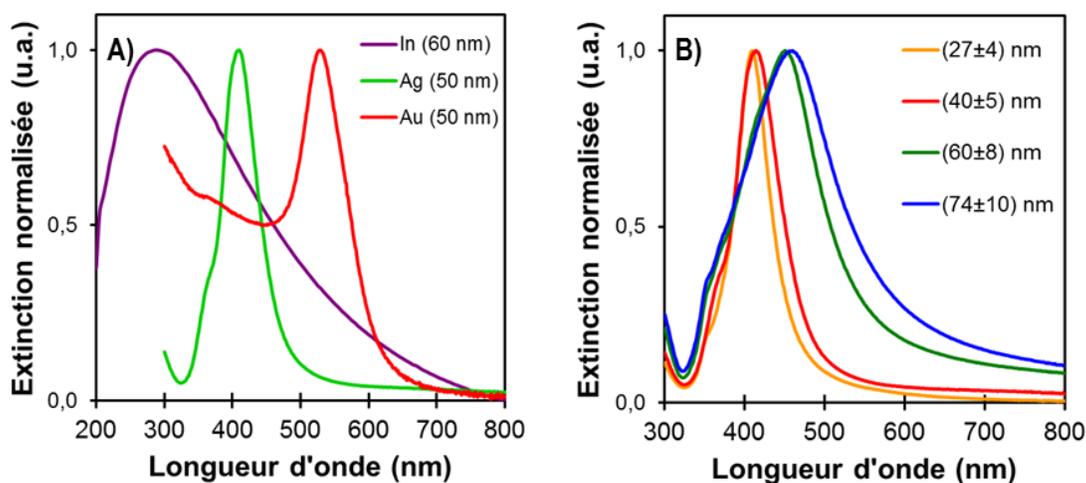


Figure 2.2 - Spectres d'extinction normalisés pour (A) des nanoparticules sphériques de différentes compositions et (B) des nanoparticules sphériques d'argent de différentes tailles.⁴²

La taille des particules influence également leur propension à absorber et à diffusion la lumière. En effet, le spectre d'extinction des particules de petite taille est dominé par la composante d'absorption, tandis que les grosses particules sont considérées comme plus diffusives.⁴³ Plusieurs paramètres doivent donc être considérés lors du choix d'une nanostructure pour une application visée.

2.1.2 Mécanisme de formation de nanoparticules

Il existe deux grands types d'approche afin de préparer des nanoparticules. L'approche descendante consiste à former des colloïdes à partir d'un matériau macroscopique, ce qui inclut entre autres les différentes techniques de lithographie et d'ablation laser. L'approche ascendante, de son côté, utilise les atomes et les molécules comme blocs de départ pour former des nanoparticules, que ce soit par exemple par dépôt chimique en phase vapeur, par procédé solution-gélification ou par émulsion.

Dans le cas des nanoparticules métalliques, la méthode de synthèse la plus courante est la réduction de complexes métalliques en solution. Ce processus ascendant suit généralement deux étapes : la nucléation et la croissance des germes. La nucléation est un processus au cours duquel des précurseurs atomiques ou moléculaires à l'état solvaté s'assemblent pour former des cristaux solides. D'un point de vue thermodynamique, cette réaction est favorisée par la diminution de l'énergie libre de volume (ΔG_v) issue de la formation des cristaux. Ce changement de phase, par contre, mène à l'apparition d'une nouvelle interface solide-liquide, ce qui fait augmenter l'énergie libre de surface du système (ΔG_s). Pour des germes très petits, la résultante ΔG de ces deux phénomènes compétitifs donne une valeur positive, puisque le rapport surface/volume est très important (voir figure 2.3 A). Un rayon critique R^* , cependant, est atteint lorsque l'énergie libre du système est à son maximum (ΔG^*). À partir de cette taille, la pente de ΔG devient négative et la diminution de l'énergie libre de volume devient la force motrice qui stabilise les germes formés.⁴⁴

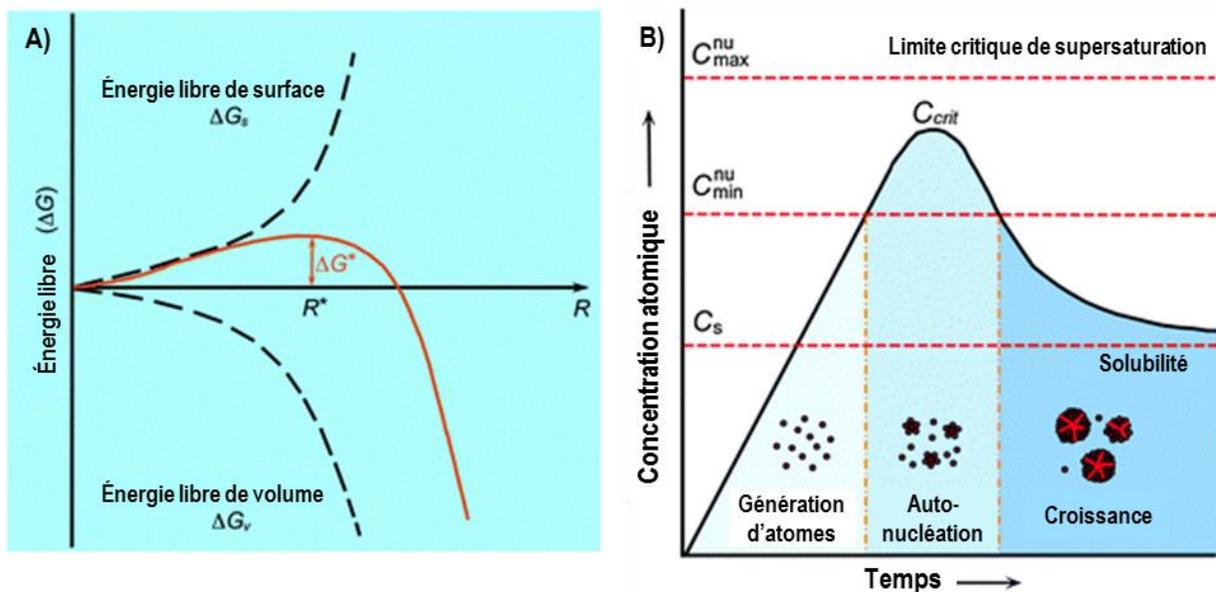


Figure 2.3 – (A) Diagramme d'énergie libre de nucléation avec, en rouge, la courbe résultante des deux phénomènes compétitifs. (B) Diagramme de LaMer illustrant la nucléation et la croissance de nanoparticules.⁴⁴

Le diagramme de LaMer à la figure 2.3 B permet d'illustrer la cinétique de nucléation et de croissance des germes en solution. Selon ce modèle, une espèce atomique est d'abord ajoutée en solution; dans le cas de nanoparticules métalliques, il s'agit souvent d'un précurseur sous forme de complexe qui est réduit par l'ajout d'un réducteur. Au début de la réaction, la concentration atomique augmente jusqu'à atteindre, dans un premier temps, la concentration de saturation (C_s). À ce point, le coût énergétique associé à la création d'une interface solide-liquide est trop grand pour permettre la formation de germes

stables. La concentration atomique continue par conséquent d'augmenter jusqu'à la concentration minimale de nucléation (C_{\min}^{nu}). Au-delà de cette valeur, la concentration critique de nucléation (C_{crit}) est atteinte, ce qui mène à la formation de germes jusqu'à ce que les réserves atomiques retombent sous la barre de C_{\min}^{nu} . Typiquement, une étape du nucléation de courte durée permet d'obtenir une population de germes de faible polydispersité. C'est pour cette raison que le réducteur ou le précurseur métallique est habituellement ajouté très rapidement dans le milieu réactionnel.

Les germes ainsi formés subissent par la suite une période de croissance lors de laquelle les réactifs sont consommés, et ce, jusqu'à ce que la concentration atomique atteigne de nouveau la concentration de solubilité. Durant cette étape, cependant, les germes ne grossissent pas au même rythme, ce qui mène à un certain régime de tailles de particules. Les plus petites particules, qui possèdent une énergie libre de surface plus élevée, sont alors susceptibles de se dissoudre en solution puis de s'agglomérer à des particules de plus grande taille afin de diminuer l'énergie de surface globale du système. Ce processus est nommé la *maturation d'Ostwald*.^{44,45}

2.2 Fluorescence

La luminescence est une émission de lumière qui se produit lorsqu'une molécule dans un état électronique excité retourne à son état fondamental. Ce processus est divisé en deux catégories distinctes, soit la fluorescence et la phosphorescence, en fonction des niveaux électroniques impliqués lors de l'émission.⁴⁶

2.2.1 Mécanismes menant à la luminescence

Les différents phénomènes qui entrent en jeu lors de la luminescence peuvent être illustrés à l'aide d'un diagramme de Jablonski schématisant les principaux niveaux énergétiques d'une molécule luminescente (voir figure 2.4). Celle-ci est considérée à l'état fondamental lorsque ses électrons se trouvent au niveau électronique singulet de plus faible énergie (S_0). En présence d'un faisceau incident d'énergie suffisante, les électrons de la molécule peuvent être excités du niveau fondamental vers un niveau singulet plus énergétique (S_1 ou S_2 , par exemple). Ce processus d'absorption est ultrarapide, soit de l'ordre de 10^{-15} seconde. Puisque que chaque niveau électronique possède plusieurs sous-niveaux vibrationnels, il existe un grand nombre de transitions électroniques possibles lors de l'excitation. C'est pour cette raison que le spectre d'absorption d'une molécule présente une bande large plutôt qu'une raie très étroite.^{46,47}

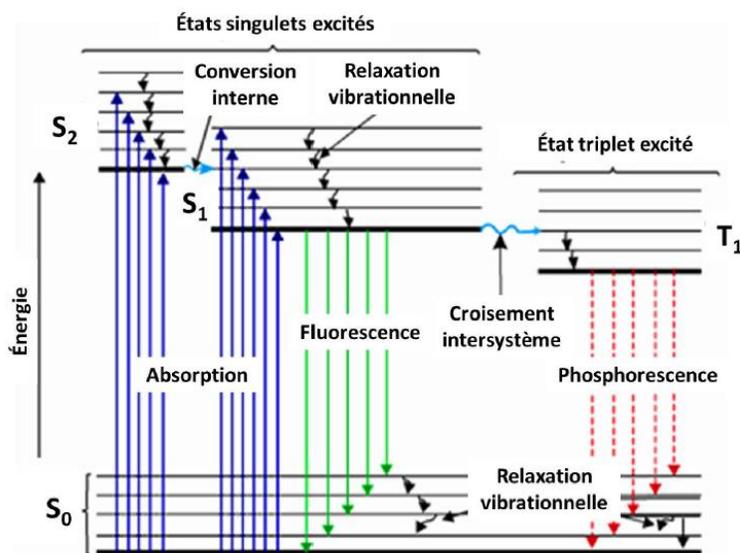


Figure 2.4 – Diagramme de Jablonski illustrant les différents types de transitions électroniques qui peuvent avoir lieu lors des processus de luminescence.⁴⁸

Une fois à l'état excité, la molécule peut retourner à l'état fondamental par l'intermédiaire de plusieurs phénomènes radiatifs ou non-radiatifs. De manière générale, les électrons des différents niveaux vibrationnels de plus haute énergie retournent rapidement (10^{-12} s) au niveau vibrationnel fondamental de S_1 ou S_2 par un processus non-radiatif appelé la relaxation vibrationnelle. Lorsque les niveaux vibrationnels de deux niveaux électroniques se chevauchent, les électrons peuvent également être transférés vers l'état de moindre énergie sans émettre de photon. Si le transfert s'effectue entre deux niveaux singulets, ce phénomène est nommé *conversion interne*. Puisqu'il y a conservation de la multiplicité, ce transfert électronique est permis par les règles de sélection. À l'inverse, un croisement inter-système (ISC) désigne un transfert d'un niveau excité singulet S_1 vers un niveau excité triplet T_1 qui est interdit par ces mêmes règles. Pour cette raison, le croisement inter-système est significativement plus lent (10^{-10} s) que la conversion interne (10^{-12} s).

Lors de la désexcitation radiative, les électrons reviennent aux différents niveaux vibrationnels de l'état fondamental S_0 en convertissant leur énergie sous forme de photons plutôt que sous forme de chaleur. Dans le cas de la fluorescence, les électrons se trouvent initialement dans un état excité singulet, tandis que la phosphorescence implique une transition à partir d'un état excité triplet. Étant donné que la phosphorescence demande un changement de la multiplicité qui est interdit, il s'agit d'un phénomène moins probable et beaucoup plus lent (10^{-5} - 10^{-7} s) que la fluorescence (10^{-8} - 10^{-9} s). Le temps de vie de fluorescence ou de phosphorescence, c'est-à-dire le temps de résidence des électrons à l'état

excité avant leur retour à l'état fondamental, est d'ailleurs caractéristique à chaque molécule luminescente et peut être mesuré à l'aide de différents montages optiques.^{46,47}

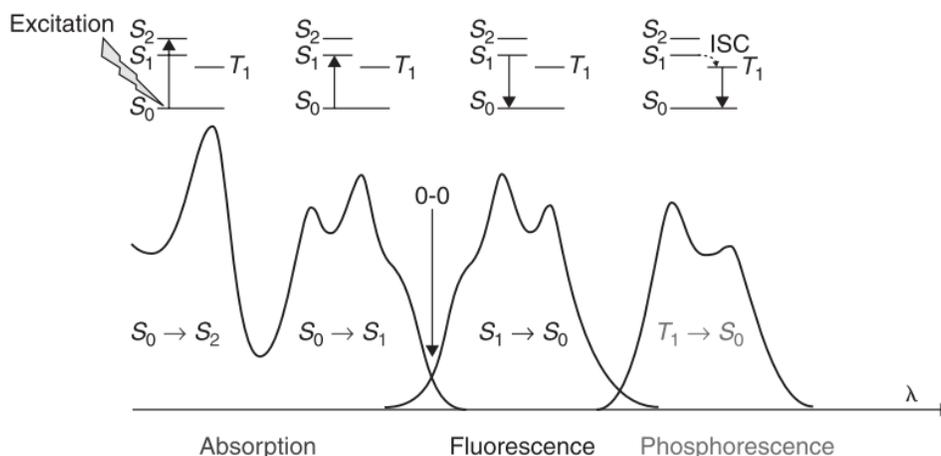


Figure 2.5 – Positions spectrales relatives des phénomènes d'absorption, de fluorescence et de phosphorescence.⁴⁷

Il est important de noter que l'énergie liée à l'excitation est généralement plus élevée que l'énergie libérée lors de l'émission de fluorescence, en raison de la vitesse des processus de relaxation non-radiatifs. C'est pourquoi, sur un spectre de fluorescence, la bande d'émission est déplacée vers les plus hautes longueurs d'onde par rapport à la bande d'excitation. Ce déplacement spectral, aussi appelé déplacement de Stokes, varie entre autres en fonction de la structure du fluorophore et de son environnement.^{46,47}

2.2.2 Extinction de fluorescence

Plusieurs phénomènes peuvent entraîner une diminution de l'intensité de fluorescence d'un échantillon. C'est le cas par exemple du photoblanchiment, un processus au cours duquel un fluorophore subit une altération irréversible de sa structure en réponse à une source d'excitation d'énergie suffisante. D'autres processus d'atténuation sont plutôt réversibles, puisqu'ils sont liés à l'environnement du fluorophore. Cette catégorie comprend entre autres l'extinction de fluorescence de type collisionnel et de type statique.

L'extinction collisionnelle se produit quand un fluorophore à l'état excité entre en contact avec une espèce chimique en lui transférant son énergie. Lors de ce mécanisme dynamique, le fluorophore retourne à son état fondamental sans émettre de photon, tandis que le désactivateur diffuse son énergie sous forme non-radiative. Les atomes lourds, l'oxygène et les halogènes sont des exemples

de désactivateurs de ce type, tout comme les molécules contenant des groupements amine ou acrylamide. Puisque l'extinction collisionnelle repose sur la diffusion des espèces, elle dépend de la concentration du désactivateur en solution. De plus, étant donné que la collision doit avoir lieu lorsque le fluorophore est à l'état excité, l'extinction dépend également du temps de vie de fluorescence de l'espèce impliquée. En effet, un fluorophore qui possède un temps de vie long risque davantage de transférer son énergie à un désactivateur qu'une molécule avec un temps de vie court.

L'extinction statique a plutôt lieu lorsqu'un fluorophore forme un complexe non-fluorescent avec un désactivateur. Dans ce cas, l'extinction se produit quand le fluorophore se trouve à l'état fondamental et ne repose pas sur la diffusion des espèces en solution. En ce sens, l'extinction ne dépend pas du temps de vie de fluorescence, mais plutôt de la fraction de fluorophore formant un complexe avec le désactivateur.⁴⁶

2.2.3 Interactions entre un fluorophore et une nanoparticule métallique

Les nanoparticules métalliques peuvent également influencer l'émission de fluorescence d'une molécule en raison de leurs propriétés plasmoniques. Plusieurs phénomènes compétitifs entrent alors en jeu et, selon la distance séparant le fluorophore de la surface métallique, l'effet ressenti se traduit soit par une augmentation ou par une diminution de l'intensité de fluorescence.

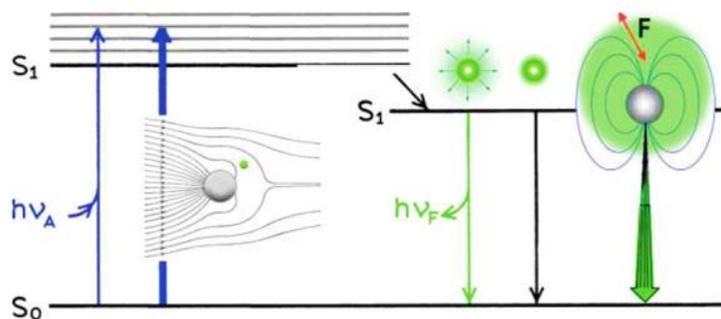


Figure 2.6 – Diagramme de Jablonski modifié pour un fluorophore à proximité d'une particule plasmonique, avec l'apparition de nouveaux chemins d'excitation et d'émission du fluorophore.⁴⁹

Tout d'abord, un fluorophore à l'état excité peut se coupler aux différents modes plasmoniques d'une particule se trouvant à proximité, lui transférant par le fait même son énergie. Dans le cas où le plasmon dissipe cette énergie sous forme de chaleur, une extinction de la fluorescence est observée. Au contraire, le plasmon peut utiliser cette énergie pour émettre lui-même de la fluorescence aux mêmes

longueurs d'onde que le fluorophore, et ce, de façon très rapide. Cette nouvelle espèce fluorescence, nommée *plasmophore*, crée un chemin supplémentaire de désexcitation radiative, ce qui contribue à une augmentation de l'intensité de fluorescence (voir figure 2.6).⁴⁹

L'exaltation plasmonique de la fluorescence peut également se produire par deux phénomènes plus indirects. En effet, un fluorophore placé dans l'environnement d'une nanoparticule métallique tire profit de son large coefficient d'extinction. Le fluorophore, qui possède alors une meilleure section efficace de capture, subit par conséquent une augmentation de son taux d'excitation. De plus, un fluorophore dans l'environnement d'une nanoparticule métallique ressent un fort champ électrique local, qui déstabilise son dipôle à l'état excité. Ceci mène à une diminution de son temps de vie ainsi qu'à une augmentation de son taux d'émission radiatif. Ce recyclage plus efficace des électrons est d'ailleurs favorisé lorsque le plasmon de la nanoparticule se superpose aux bandes d'excitation et d'émission du fluorophore.⁴⁹

Il est possible de quantifier l'effet global d'une nanoparticule sur un fluorophore à l'aide du facteur d'exaltation. Ce paramètre mathématique correspond au rapport entre l'intensité de fluorescence d'une molécule à proximité d'une particule plasmonique et l'intensité de fluorescence de la même molécule sans l'influence du métal. Tel qu'illustré à la figure 2.7, l'effet global observé résulte des composantes d'exaltation et d'extinction de fluorescence, qui sont toutes deux dépendantes de la distance entre la surface métallique et le fluorophore (d).

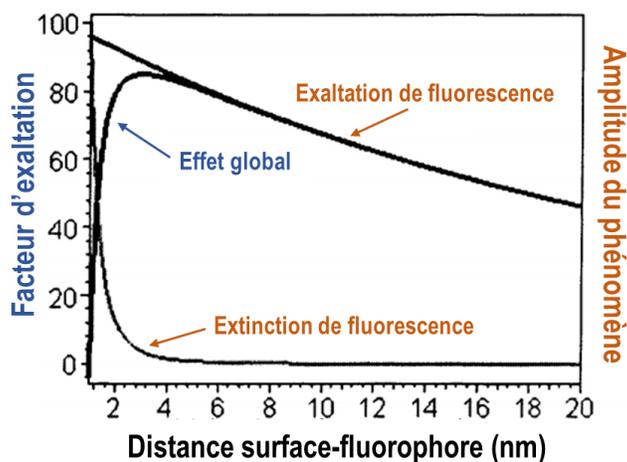


Figure 2.7 – Impact de la distance entre une nanoparticule métallique et un fluorophore sur les composantes d'extinction et d'exaltation de fluorescence.⁵⁰

Typiquement, l'extinction de fluorescence est considérée comme un phénomène à courte portée, puisque son influence diminue à raison de $1/d^3$. L'extinction se fait donc ressentir dans les premiers nanomètres à la surface d'une particule métallique. En comparaison, l'exaltation de fluorescence diminue uniquement selon $(r/r+d)$, où r correspond au rayon de la nanoparticule. À plus grande distance, c'est par conséquent le phénomène d'exaltation qui domine.⁵⁰

À titre d'exemple, la figure 2.8 présente les facteurs d'exaltation obtenus de façon expérimentale pour des fluorophores à proximité de nanoparticules sphériques d'argent et d'or de différentes tailles. La distance séparant les fluorophores de la surface métallique est modulée dans les deux cas par une couche de silice uniforme entourant les nanoparticules. Dans le cas des nanoparticules d'argent, le maximum d'exaltation pour la fluorescéine se situe environ à 7 nm de la surface, tandis qu'il est repoussé à 10 nm dans le cas du rose Bengal à proximité de nanoparticules d'or. De plus, le facteur d'exaltation augmente en fonction de la taille des particules pour les deux architectures étudiées, puisque l'intensité et la portée du plasmon sont également fonction de la taille.

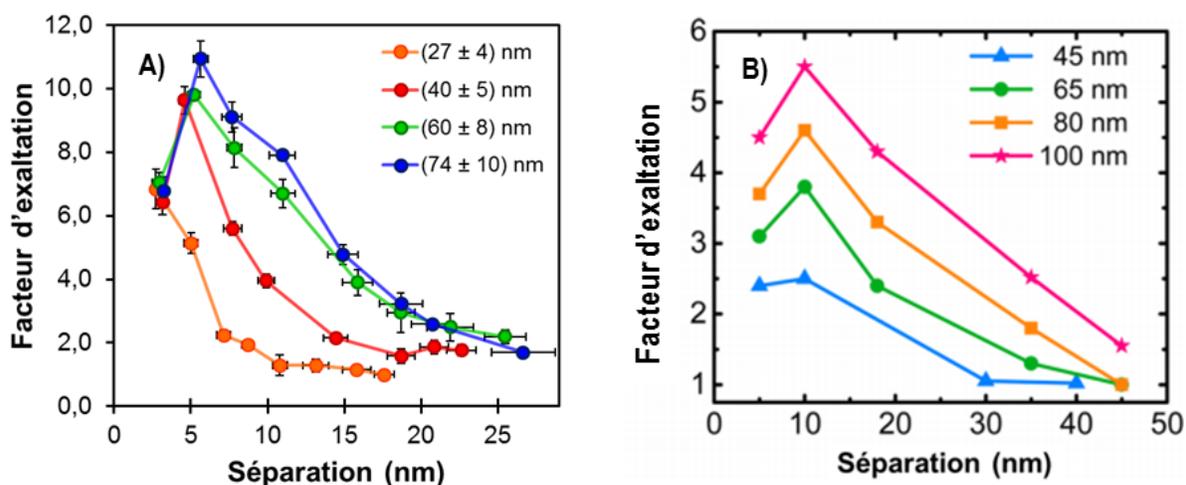


Figure 2.8 – Facteurs d'exaltation de fluorescence pour des fluorophores placés à proximité de nanoparticules (A) d'argent⁴² et (B) d'or⁵¹ de différents diamètres recouvertes d'une couche de silice modulable.

Ces résultats illustrent bien la contribution de l'extinction et de l'exaltation de fluorescence sur des systèmes plasmoniques réels. Toutefois, il est important de noter que l'allure de la courbe résultante dépend de plusieurs facteurs, dont la forme, la taille et la nature des nanoparticules impliquées ainsi que le recouvrement spectral entre le plasmon et les bandes d'émission et d'excitation du fluorophore.

2.3 Polymères thermosensibles

Les polymères thermosensibles sont des matériaux «intelligents» qui réagissent à un changement de température par une modification de phase. Cette propriété les rend particulièrement attrayants pour des applications telles que le relargage de médicaments, le transport de gènes et l'ingénierie tissulaire. Cette transition de phase est due à un changement drastique de l'état de solvation d'un polymère à une température précise. Par exemple, certains polymères deviennent insolubles à haute température et possèdent une température critique inférieure de solubilité (LCST). Au contraire, d'autres polymères deviennent insolubles à basse température et sont plutôt caractérisés par une température critique supérieure de solubilité (UCST).⁵²

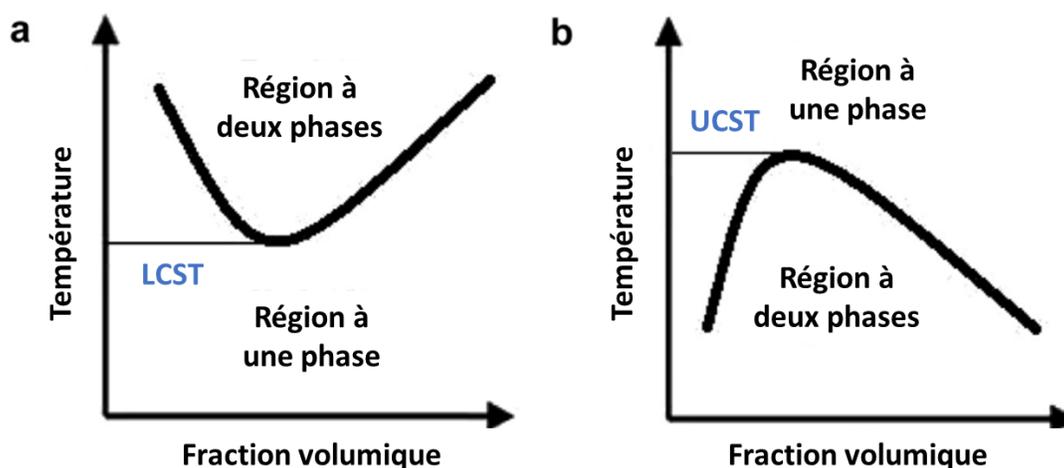


Figure 2.9 – Diagrammes de phase illustrant la température critique (A) inférieure et (B) supérieure de solubilité de polymères thermosensibles.⁵²

La figure 2.9 présente les diagrammes de phases caractéristiques de ces deux types de polymère en fonction de la fraction volumique du mélange polymère/solvant. La transition d'une phase polymérique soluble vers deux phases immiscibles est due à une modification de l'état d'hydratation du polymère. En effet, à la température critique de solubilité, les ponts hydrogène intramoléculaires et intermoléculaires du polymère deviennent plus favorables par rapport aux liaisons hydrogène avec l'eau. Ceci cause un affaissement de la couche polymérique de même que le relargage des molécules de solvant, ce qui mène à l'augmentation de l'entropie du système. Selon l'équation de Gibbs, la création de deux phases distinctes est alors favorisée thermodynamiquement.⁵³ Ce changement de volume de l'hydrogel thermosensible peut donc être exploité afin de libérer une molécule bioactive qui y serait encapsulée, tel qu'illustré à la figure 2.10.

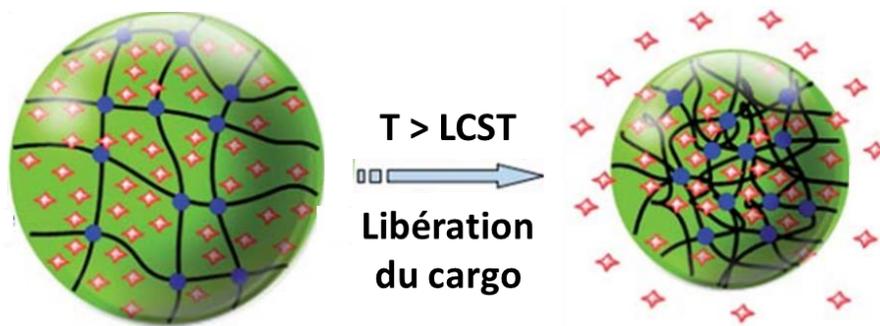


Figure 2.10 – Schéma de concept d'un hydrogel thermosensible s'affaisant sur lui-même à une température supérieure à sa LCST, libérant ainsi son cargo.⁵⁴

2.4 Aptamères d'acides nucléiques

Les aptamères d'acides nucléiques sont de courts simples brins d'ADN ou d'ARN qui ont la capacité de se lier à une espèce chimique de façon réversible. À cet égard, ils sont analogues aux anticorps qui possèdent une grande affinité pour un antigène spécifique. Les aptamères ont toutefois la particularité de changer de conformation lorsqu'ils se lient à leur molécule cible, tel qu'illustré à la figure 2.11, afin de créer une cavité adaptée pour le substrat. Cette interaction entre l'aptamère et sa molécule cible fait intervenir une combinaison de ponts hydrogène, d'interactions électrostatiques, de forces de Van der Waals et d'interactions entre des cycles aromatiques.⁵⁵

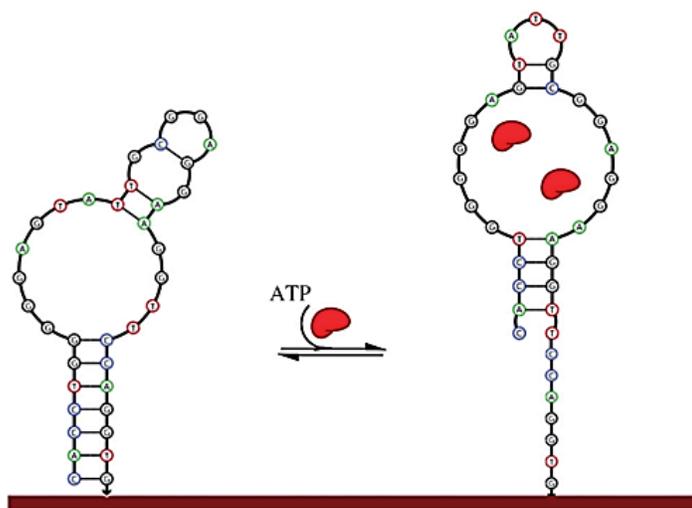


Figure 2.11 – Changement de conformation d'un aptamère en réponse à sa molécule-cible, ici l'ATP.⁵⁶

2.4.1 Avantages

Les aptamères possèdent plusieurs avantages dans le domaine de la biodétection par rapport aux anticorps. Tout d'abord, ils sont beaucoup plus polyvalents, c'est-à-dire qu'il existe une grande librairie

d'aptamères pouvant se lier à des espèces aussi diverses que des ions, des molécules, des protéines complexes et même des cellules. Les aptamères peuvent également être synthétisés en laboratoire, tandis que les anticorps doivent généralement être isolés à partir d'animaux de laboratoire immunisés avec des antigènes sélectionnés. À cet égard, les aptamères sont donc typiquement moins dispendieux et peuvent également être modifiés à l'aide de différents groupements fonctionnels pour les rendre plus adaptés à une application visée. Finalement, ces courtes séquences d'ADN ou d'ARN sont plus résistantes aux variations de pH et de température. Il est important de noter, toutefois, que les aptamères possèdent une constante d'association envers leur molécule cible qui est presque toujours inférieure à celle des anticorps.^{55,57}

2.4.2 Processus de sélection

Afin de sélectionner un ou plusieurs aptamères spécifiques à une cible désirée, un processus d'évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel, aussi nommé SELEX, est utilisé. Cette technique, développée en 1990 par les groupes de Szostak et Gold, consiste à isoler les aptamères possédant les caractéristiques souhaitées à partir d'une large librairie pouvant contenir de 10^{13} à 10^{18} séquences d'acides nucléiques aléatoires.^{55,58} Ce bassin d'aptamères est alors mis en contact avec la cible et les brins d'ADN ou d'ARN ayant réagi sont isolés du reste à l'aide de différentes méthodes de lavage.

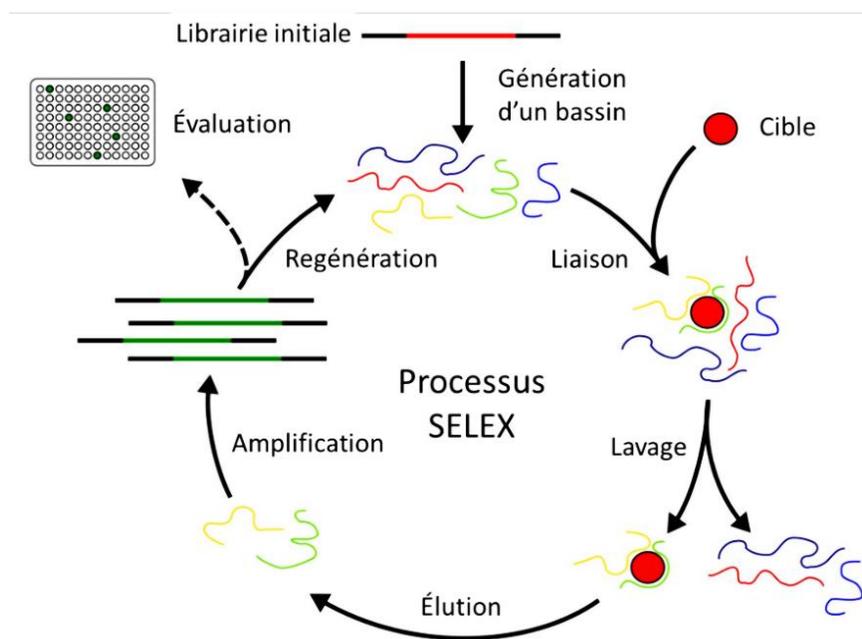


Figure 2.12 – Schéma de la méthode SELEX utilisée pour isoler les aptamères.⁵⁹

Les aptamères obtenus peuvent alors être isolés et répliqués de façon exponentielle à l'aide d'une technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR), de façon à pouvoir évaluer leur réponse individuellement. Dans un processus SELEX typique, les aptamères subissent de 8 à 15 cycles de liaison, lavage et amplification afin d'effectuer une ségrégation efficace des brins désirés. Plusieurs aptamères s'avèrent habituellement sélectifs à la même molécule cible, mais ceux-ci peuvent posséder différentes constantes d'association avec le substrat et différentes configurations 3D. Il est donc essentiel d'évaluer les propriétés intrinsèques des aptamères pour s'assurer de choisir le brin d'ADN ou d'ARN le plus approprié pour l'application visée.⁶⁰