

5. Développement d'une sonde micrométrique pour la détection d'ATP dans l'environnement des cellules

5.1 Aptamère spécifique à l'ATP

5.1.1 Choix de l'aptamère

Plusieurs aptamères sensibles à l'ATP ont été rapportées dans la littérature.¹¹⁹ Chacun de ces aptamères possède une certaine séquence d'acides nucléiques qui vient dicter sa constante d'association avec l'ATP de même que sa conformation 3D en présence et en absence de sa cible. Grâce à cette large banque d'aptamères, il est possible de sélectionner un brin d'ADN possédant les caractéristiques désirées pour une application particulière. Pour le présent projet, l'aptamère choisi doit posséder deux caractéristiques importantes : 1) une gamme de détection d'ATP dans le domaine physiologique et 2) un changement de conformation important permettant de mesurer une grande variation de signal entre la position allumée et éteinte.

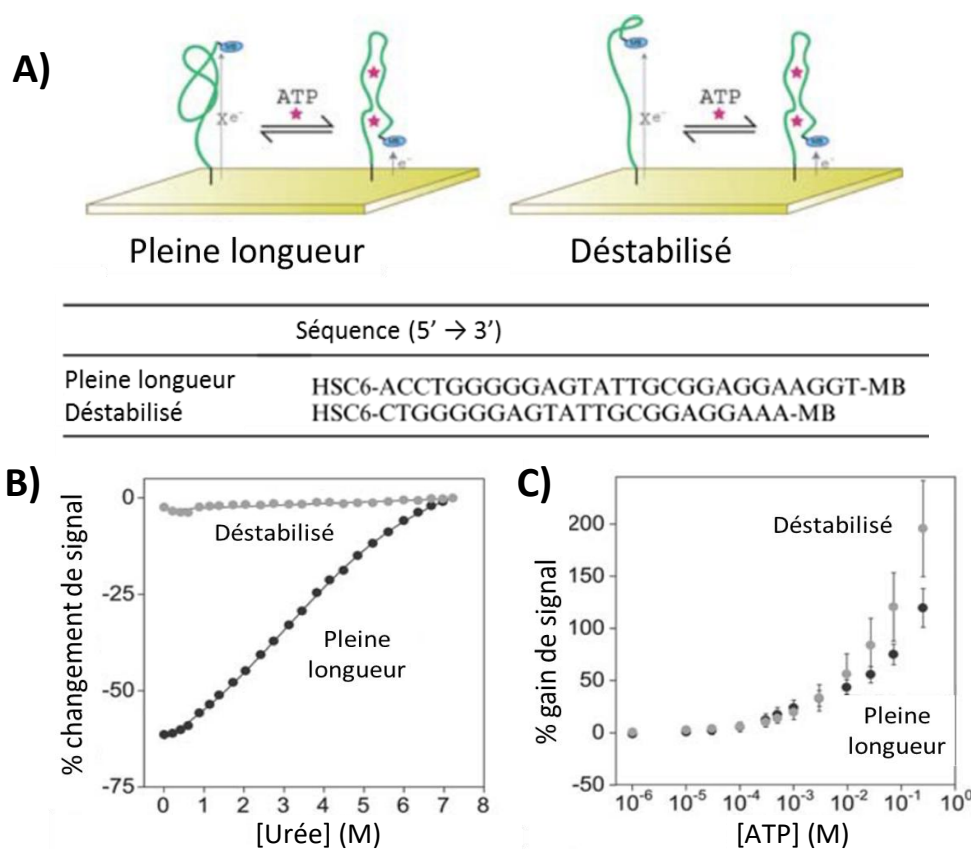


Figure 5.1 – (A) Schéma présentant le changement de conformation attendu pour deux aptamères spécifiques à l'ATP possédant une séquence d'acides nucléiques légèrement différente. (B) Courbes de dénaturation des deux aptamères en présence d'urée mesurées par électrochimie. (C) Courbes de réponse des aptamères à l'ATP mesurées par électrochimie.¹²⁰

Un aptamère répondant à ces deux critères a été développé par le groupe de Kevin W. Plaxco.¹²⁰ Tel qu'illustré à la figure 5.1, ces chercheurs ont modifié la séquence d'acides nucléiques d'un simple brin d'ADN sensible à l'ATP connu dans la littérature¹²¹ afin de le déstabiliser et ainsi d'augmenter son changement de conformation. En effet, l'aptamère original, illustré à la figure 5.2, forme préférentiellement une boucle en l'absence d'ATP et demeure sous une conformation repliée en captant jusqu'à deux molécules d'ATP dans son site de liaison.

La stratégie employée pour modifier cet aptamère est de retirer quatre bases azotées –deux à chacune des extrémités du simple brin d'ADN –dans le but de diminuer le nombre de bases complémentaires stabilisant la conformation repliée (voir figure 5.2). En théorie, cette altération force le dépliement du brin d'ADN en l'absence d'ATP sans toutefois affecter le site de liaison, permettant ainsi à l'aptamère déstabilisé de capté lui aussi deux molécules d'ATP.

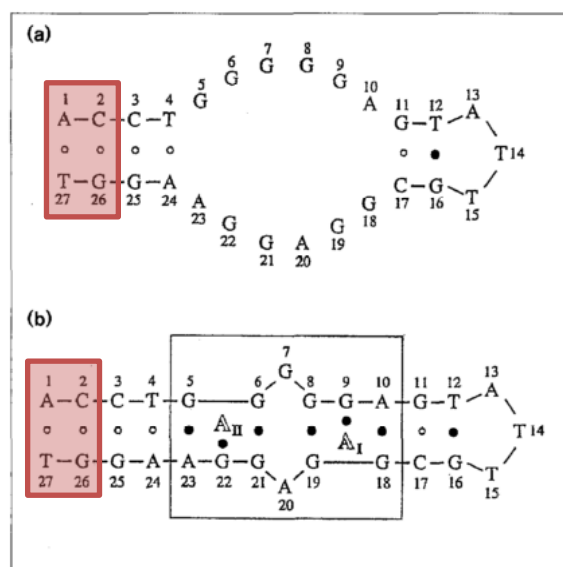


Figure 5.2 – Schéma du repliement de l'aptamère pleine longueur (27 bases azotées) (A) en absence d'ATP et (B) en présence d'ATP avec l'alignement des paires de bases. L'encadré noir présente le site de liaison des deux molécules d'ATP.¹²¹ En rouge, les bases nucléiques absentes dans la séquence de l'aptamère déstabilisé sont mises en évidence.¹²⁰

Dans cette étude, les aptamères sont modifiés à une extrémité avec un groupement thiol qui leur permet d'être greffés sur une surface d'or, et à l'autre extrémité avec un indicateur d'oxydoréduction, le bleu de méthylène, qui peut être réduit par la surface d'or. Le signal mesuré par électrochimie pour ce capteur varie en fonction de la position du bleu de méthylène dans l'espace, donc en fonction du degré de repliement de l'aptamère.

Afin d'étudier la conformation la plus stable en absence de la cible, les aptamère greffés à la surface d'or ont été placés dans un milieu exempt d'ATP, puis une concentration croissante d'urée a été ajoutée (voir figure 5.1 B). En effet, l'urée s'avère être un agent de dénaturation de l'ADN qui déplace l'équilibre vers la conformation totalement dépliée de l'aptamère. Comme le montrent les courbes de dénaturation, le capteur utilisant l'aptamère pleine longueur subit un changement de signal important lorsque la concentration d'urée en solution passe de 0 à 8 M, tandis que celui faisant usage de l'aptamère déstabilisé présente un signal constant peu importe le milieu. Ceci suggère donc que la modification de la séquence d'ADN a eu l'effet espéré : l'aptamère ayant 27 bases se retrouve majoritairement sous forme repliée en l'absence d'ATP, alors que l'aptamère plus court est plutôt sous forme dépliée.

La réponse de ces deux aptamères à différents étalons d'ATP a également été investiguée. La figure 5.1 C montre les courbes d'étalonnage obtenues par électrochimie pour les deux capteurs. Tel qu'attendu, l'aptamère déstabilisé présente un plus grand changement de signal à une même concentration d'ATP que l'aptamère original, étant donné qu'il change plus drastiquement de conformation. Toutefois, le domaine de réponse du capteur reste le même pour les deux aptamères, ce qui indique que les modifications apportées à la séquence de bases azotées n'ont pas eu d'impact marqué sur le site de liaison de l'ATP.

5.1.2 Modifications apportées à l'aptamère

L'aptamère déstabilisé du groupe de Plaxco a été sélectionné pour le projet. Ce simple brin d'ADN a été synthétisé par la compagnie Biosearch Technologies, qui offre l'option de modifier les extrémités avec différents groupements fonctionnels. À l'extrémité 5' de l'ADN, un groupement thiol a donc été ajouté afin de permettre le greffage de l'aptamère sur la surface des nanoparticules d'or. Toutefois, puisque les groupements thiol libres possèdent une stabilité limitée, la compagnie préfère expédier l'ADN avec un lien disulfide, tel qu'illustré à la figure 5.3 A. Ce lien disulfide doit par conséquent être réduit avant d'effectuer le greffage sur le métal. De façon complémentaire, un fluorophore portant le nom de Quasar 670 (Q670) a été ajouté de façon covalente à l'extrémité 3'. Celui-ci est un analogue de la cyanine 5 (Cy5) et possède un spectre d'excitation et d'émission situé dans le rouge, c'est-à-dire dans la fenêtre de transparence biologique. Dans l'eau, sa longueur d'onde d'excitation maximale est située à 647 nm et sa longueur d'onde d'émission se trouve à 668 nm.

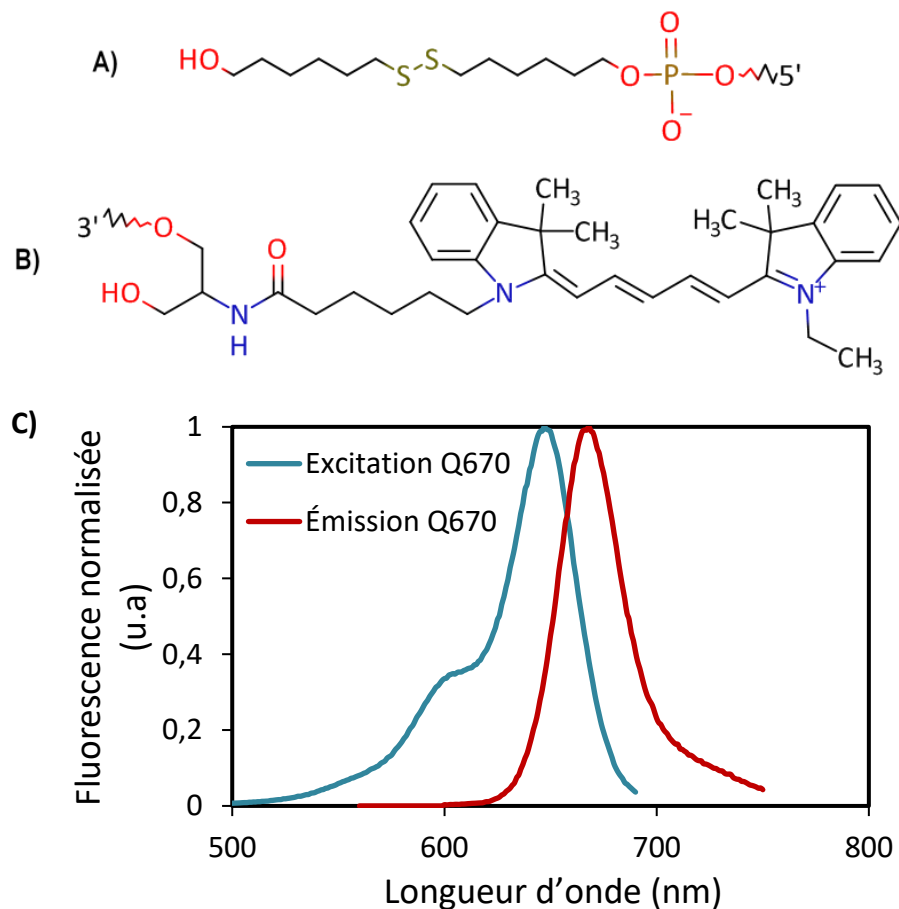


Figure 5.3 – Modifications apportées aux extrémités de l'aptamère sensible à l'ATP. (A) Ajout à l'extrémité 5' d'une chaîne alcane possédant un lien disulfide. (B) Ajout à l'extrémité 3' d'un fluorophore, le Quasar 670, avec (C) ses spectres d'excitation et d'émission dans l'eau.

L'aptamère synthétisé et modifié est ensuite purifié par la compagnie par chromatographie en phase liquide à haute performance en phase inverse. Une fois reçu, l'aptamère est alors séparé en aliquots de 0,5 à 1 nmol par des collaborateurs au Centre de recherche en infectiologie du Centre hospitalier de l'Université Laval, dans le but de faciliter la manipulation de l'ADN durant la préparation du biocapteur. L'aptamère est par la suite conservé à l'abri de la lumière à -20°C pendant une période maximale de 1 an, tel que recommandé par la compagnie.

5.2 Synthèse des nanoparticules d'or

5.2.1 Protocole de synthèse

Les nanoparticules d'or ont été préparées par croissance contrôlée de germes (voir le protocole détaillé de synthèse à l'annexe 7). Pour ce faire, des AuNPs possédant un diamètre de 12 nm ont d'abord été

synthétisés à l'aide d'une méthode inspirée de la synthèse de Turkevich. Plus précisément, une solution de citrate de sodium tribasique est portée à ébullition, température suffisante pour transformer cette espèce en un réducteur fort. Une solution concentrée d'acide chloraurique est ensuite ajoutée très rapidement au milieu réactionnel, une étape critique pour assurer une période de nucléation courte et donc une faible polydispersité des nanoparticules résultantes. Le citrate de sodium permet de réduire directement l'Au(III) en Au(0) en plus de stabiliser les germes formés en agissant en tant que ligand de surface.

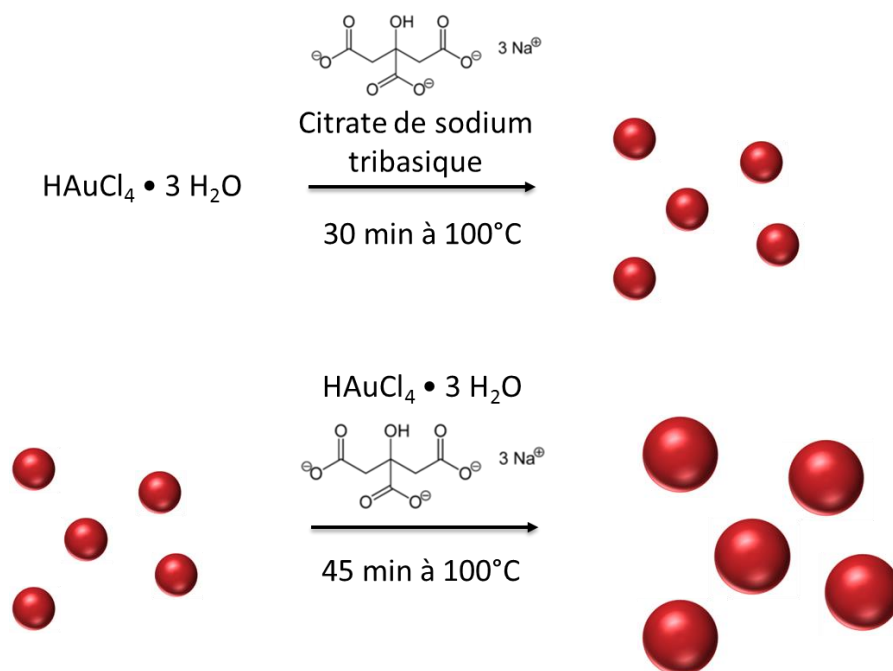


Figure 5.4 – Schéma de synthèse des nanoparticules d'or sphériques par croissance contrôlée de germes.

La seconde étape de synthèse consiste à faire croître les germes en ajoutant de façon répétée de faibles quantités de réactifs, afin de limiter la seconde nucléation. Dans un premier temps, les germes sont dilués dans une solution de citrate de sodium, puis portés à ébullition sous reflux. Une solution d'Au(III) est alors ajoutée au milieu réactionnel sous haute agitation, dans le but de distribuer rapidement les réactifs de façon uniforme dans l'environnement des nanoparticules d'or. Après 45 minutes, de faibles quantités d'acide chloraurique et de citrate de sodium sont ajoutées de nouveau en solution pour poursuivre la croissance. Ce processus peut être répété à plusieurs reprises afin d'atteindre la taille de nanoparticules désirée.

5.2.2 Caractérisation

Les AuNPs ont été caractérisées à différentes étapes de la synthèse par TEM afin de déterminer leur taille et leur niveau de polydispersité. Pour plus de deux cents particules analysées, un diamètre moyen des germes de (12 ± 1) nm a été déterminé. Au cours de la période de croissance, la taille des AuNPs atteint (29 ± 5) nm après un seul ajout de réactifs, puis (47 ± 4) nm après un total de 5 ajouts. Comme l'illustre le tableau 5.1, la période de croissance des germes permet donc de moduler avec précision la taille des nanoparticules d'or obtenues.

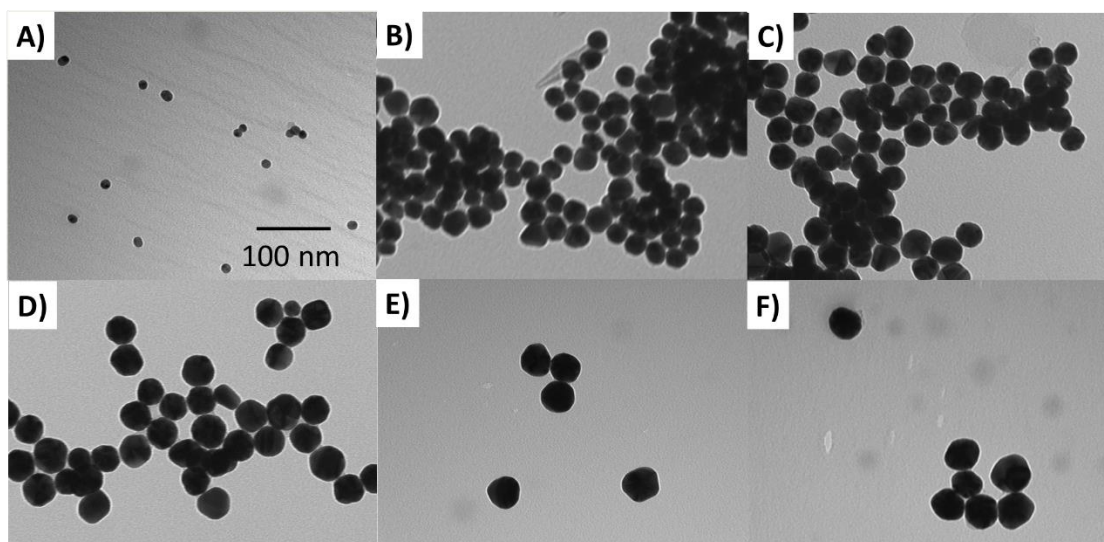


Figure 5.5 – (A) Image TEM des germes d'or. (B) à (F) Images TEM des nanoparticules d'or obtenues lors de la croissance après chacun des 5 ajouts de réactifs.

Tableau 5.1 – Évolution des propriétés des nanoparticules d'or au cours de la synthèse. Données extraites des analyses au TEM, en NTA et en spectroscopie UV-visible.

| Solution | Diamètre des particules (nm) | | Nombre de particules analysées au TEM | Concentration (par NTA) x 10 ¹¹ NPs/mL | λ d'extinction maximale nm |
|----------|------------------------------|------------|---------------------------------------|--|-------------------------------|
| | TEM | NTA | | | |
| Germes | 12 ± 1 | - | 241 | - | 519 |
| 1 ajout | 29 ± 5 | 31,3 ± 0,7 | 95 | 2,1 ± 0,2 | 523 |
| 2 ajouts | 35 ± 4 | 37,6 ± 0,7 | 108 | 2,2 ± 0,1 | 523 |
| 3 ajouts | 40 ± 4 | 40,5 ± 0,4 | 99 | 2,8 ± 0,3 | 526 |
| 4 ajouts | 43 ± 4 | 42,7 ± 0,5 | 103 | 2,3 ± 0,1 | 526 |
| 5 ajouts | 47 ± 4 | 47,7 ± 0,2 | 103 | 2,7 ± 0,2 | 528 |

Les nanoparticules d'or ont également été caractérisées par NTA afin d'obtenir des informations sur la distribution de taille des colloïdes en solution. La solution de germes n'a toutefois pas été analysée, étant donné que les particules doivent posséder un diamètre minimal de 20 nm pour assurer une diffusion suffisante du faisceau laser. Tel qu'attendu, la taille des AuNPs déterminée par cette technique semble être légèrement plus élevée que celle mesurée par TEM, bien qu'à l'intérieur de l'incertitude de cette dernière, puisque la NTA fait le calcul du diamètre hydrodynamique des particules. Les données présentées à la figure 5.6 montrent bien que la taille des nanoparticules d'or augmente en fonction du nombre d'ajouts de réactifs au cours de l'étape de croissance. De plus, ces courbes de distribution de taille sont très étroites, ce qui signifie que chaque échantillon présente une faible polydispersité et qu'il y a absence d'agrégats en solution.

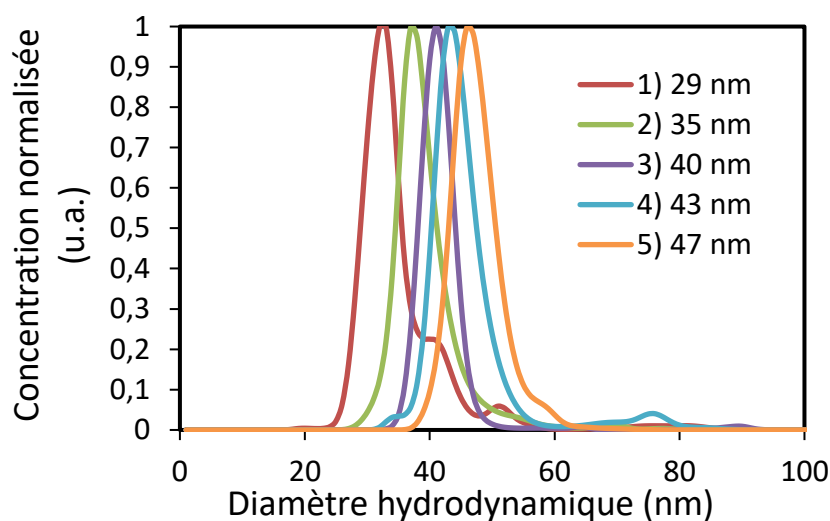


Figure 5.6 – Distributions de tailles normalisées de nanoparticules d'or en solution, tel que déterminé par analyse du suivi individuel des particules.

La technique de NTA a également été utilisée pour déterminer la concentration de nanoparticules dans ces 5 aliquots de synthèse. Comme le montre tableau 5.1, la concentration mesurée varie légèrement d'un échantillon à l'autre, passant de $(2,1 \pm 0,2) \times 10^{11}$ NPs/mL à $(2,8 \pm 0,3) \times 10^{11}$ NPs/mL. Cette variation ne semble pas être due à de la seconde nucléation au cours de la période de croissance, puisque la concentration de nanoparticules d'or n'augmente pas graduellement en fonction du nombre d'ajouts. De plus, une seule population de nanoparticules a été observée au TEM. Il semblerait donc que la variation observée soit plutôt reliée aux dilutions effectuées pour que les échantillons analysés soient dans la gamme de concentration idéale à l'analyse en NTA.

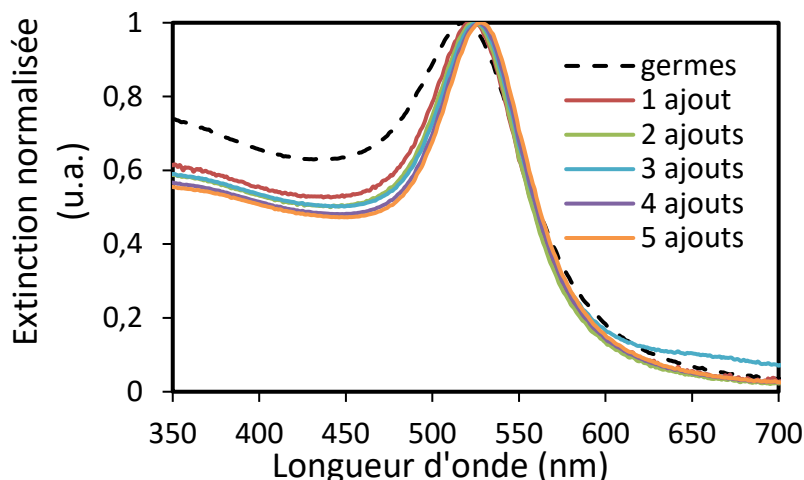


Figure 5.7 – Évolution du spectre d’extinction des nanoparticules d’or au cours de la croissance.

Finalement, l’analyse par spectroscopie UV-visible a permis de mesurer l’évolution du spectre d’extinction des nanoparticules d’or au cours de la synthèse. Tel que prédit par la théorie de Mie,⁴³ le plasmon des AuNPs se déplace légèrement vers le rouge à mesure que leur taille augmente, passant d’un maximum à 518 nm pour les germes à 528 nm pour les nanoparticules finales de 47 nm. De plus, la bande plasmonique devient plus étroite au cours de la croissance, ce qui pourrait être attribuable à la diminution de la polydispersité des particules, tel qu’observé en TEM de même qu’en NTA.

5.3 Préparation du substrat plasmonique

5.3.1 Protocole de préparation

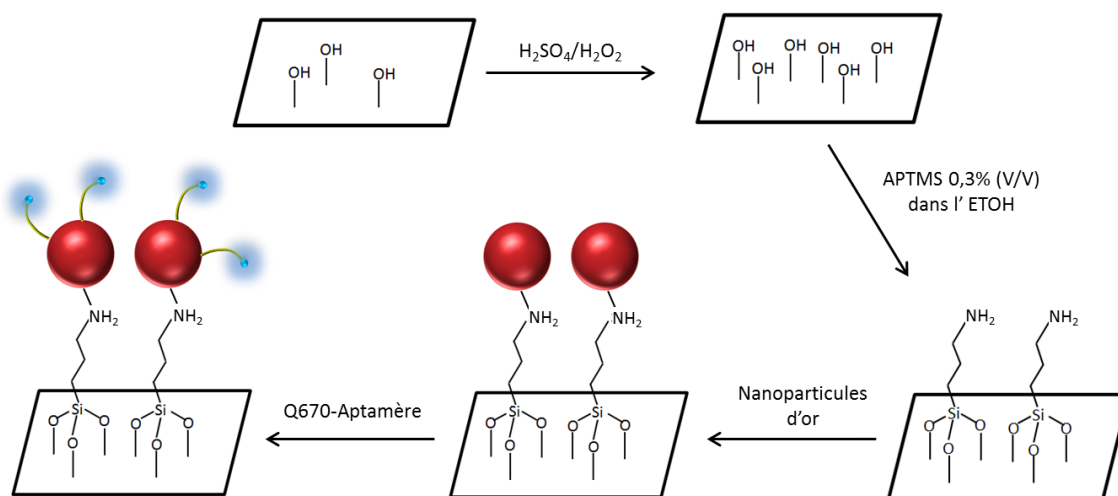


Figure 5.8 – Schéma de la fonctionnalisation des micropipettes de verre lors de la fabrication du biocaptor.

La préparation du biocapteur se fait en plusieurs étapes,¹²² qui sont décrites en détail à l'annexe 8. Les micropipettes de verre sont préparées par l'équipe du professeur Jean-François Masson à l'aide d'une technique de déformation mécanique.³⁵ De manière générale, la pointe de capillaires de verre disponibles commercialement est chauffée puis étirée, jusqu'à ce qu'elle atteigne le diamètre désiré, à l'aide d'un appareil permettant de préparer de pipettes en série. Par la suite, la surface des micropipettes de verre est nettoyée avec une solution de piranha, un mélange 3 H₂SO₄ : 1 HNO₃ à la fois acide et oxydant qui permet de dissoudre entre autres les contaminants organiques.¹²³ Ce traitement permet également d'augmenter le nombre de groupements hydroxyle à la surface du verre, augmentant ainsi sa réactivité pour la fonctionnalisation subséquente avec un silane.¹²⁴

La prochaine étape consiste à incuber les pipettes dans un solution 0,3% (V/V) de (3-aminopropyl)triméthoxysilane (APTMS), dans le but d'ajouter des fonctions amine libres à la surface (voir figure 5.8). Cette réaction se produit dans l'éthanol anhydre, puisque la présence d'eau favoriserait l'hydrolyse suivie de la polycondensation du silane en solution. En s'assurant de demeurer en milieu anhydre, l'APTMS réagit uniquement à la surface de la micropipette de verre où une mince couche d'eau demeure adsorbée après le traitement au piranha.¹²⁵

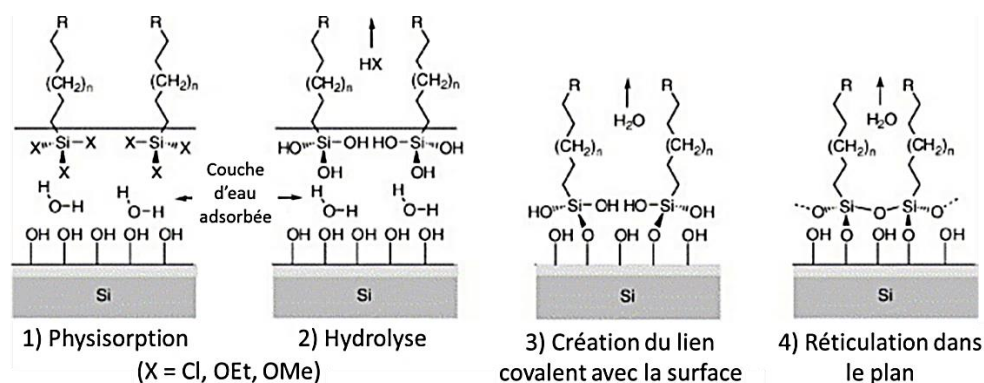


Figure 5.9 – Mécanisme en quatre étapes proposé pour la polycondensation d'un silane tel que l'APTMS à la surface d'un substrat de verre.¹²⁵

Après un rinçage à l'éthanol, puis à l'eau pour éliminer l'APTMS résiduel, les micropipettes sont incubées dans une solution aqueuse de nanoparticules d'or d'un diamètre de 47 nm. Tel que rapporté dans la littérature, les nanoparticules d'or peuvent se lier à des groupements amine par un lien datif entre le doublet de l'azote et les orbitales libres du métal.¹²⁶ Cette technique permet d'immobiliser uniformément des nanoparticules d'or sur un substrat après une incubation de quelques heures.

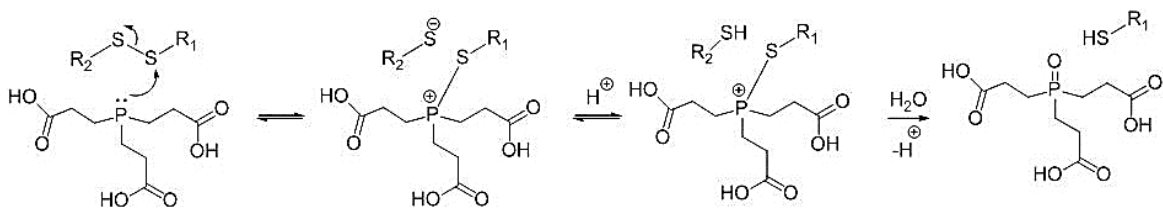


Figure 5.10 – Mécanisme de réduction d'un lien disulfide à l'aide du TCEP.¹²⁷

Une fois que le substrat plasmonique est prêt, la prochaine étape consiste à effectuer le greffage de l'aptamère à la surface d'or. Toutefois, le brin d'ADN doit préalablement subir un traitement afin de réduire le lien disulfide à son extrémité 5' pour générer un groupement thiol. Pour ce faire, l'aptamère réagit avec la tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP), un réducteur possédant une grande sélectivité pour les groupements disulfides, selon le mécanisme illustré à la figure 5.10. À des fins pratiques, le réducteur est ajouté à la solution sous la forme d'un sel d'hydrochlorure (TCEP•HCl), une espèce à la fois non-volatile et soluble dans l'eau qui est plus simple à manipuler comparativement à la TCEP en phase liquide.¹²⁸

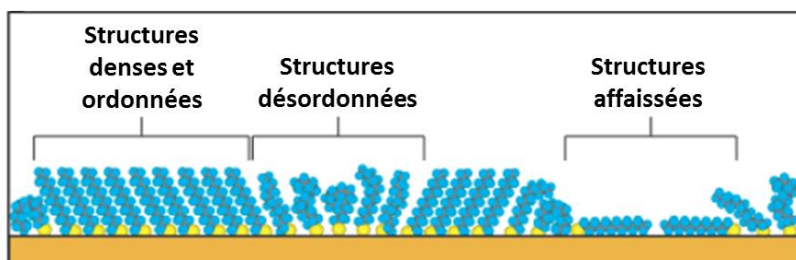


Figure 5.11 – Schéma d'une monocouche de molécules thiolées sur une surface d'or, les sphères jaunes représentant les atomes de soufre, avec les défauts de surface possibles.¹²⁹

Par la suite, le greffage est accompli en incubant la pointe des micropipettes dans la solution d'aptamère thiolé. Le but est de former une monocouche auto-assemblée d'ADN à la surface des nanoparticules d'or. À cet égard, la fonction thiol est particulièrement utile, puisque les atomes de soufre peuvent se lier avec trois atomes d'or de surface pour former trois liens Au-S. La nature semi-covalente de ces liens rend l'interaction entre le soufre et l'or dynamique, ce qui signifie que les défauts de surface de la monocouche auto-assemblée peuvent être corrigés en partie par désorption des molécules du substrat.¹²⁹ Habituellement, une monocouche d'alcanethiol peut être densément organisée à la surface de l'or. Toutefois, dans le cas de simples brins d'ADN, le squelette phosphate chargé négativement limite le rapprochement des chaînes lors de l'assemblage. Pour limiter la formation de structures désordonnées ou affaissées, le greffage est donc effectué dans un tampon phosphate salin (PBS). Les

ions sodium et potassium chargés positivement peuvent alors se lier au squelette de phosphate et diminuer les répulsions électrostatiques entre les chaînes d'ADN. En théorie, ceci permet d'augmenter la densité de greffage de l'aptamère sur la surface d'or.

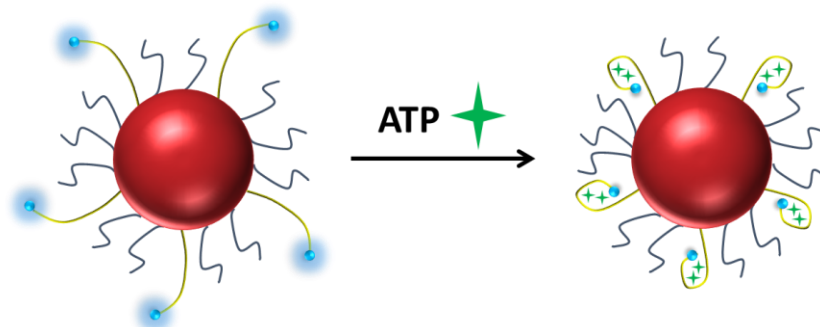


Figure 5.12 – Schéma de greffage de l'aptamère (en jaune) et du 6-mercaptophexanol (en mauve foncé) à la surface d'une nanoparticule d'or.

La dernière étape de préparation consiste à tremper la pointe des pipettes dans une solution de 6-mercaptophexanol pendant quelques heures. Comme le montre la figure 5.12, le 6-mercaptophexanol a pour rôle de combler les espaces libres à la surface des nanoparticules d'or pour favoriser le dépliement de l'aptamère en absence d'ATP. De cette manière, le brin d'ADN présente un plus grand changement de conformation entre la position allumée et éteinte, augmentant ainsi la différence de signal observable en microscopie de fluorescence.

5.3.2 Caractérisation

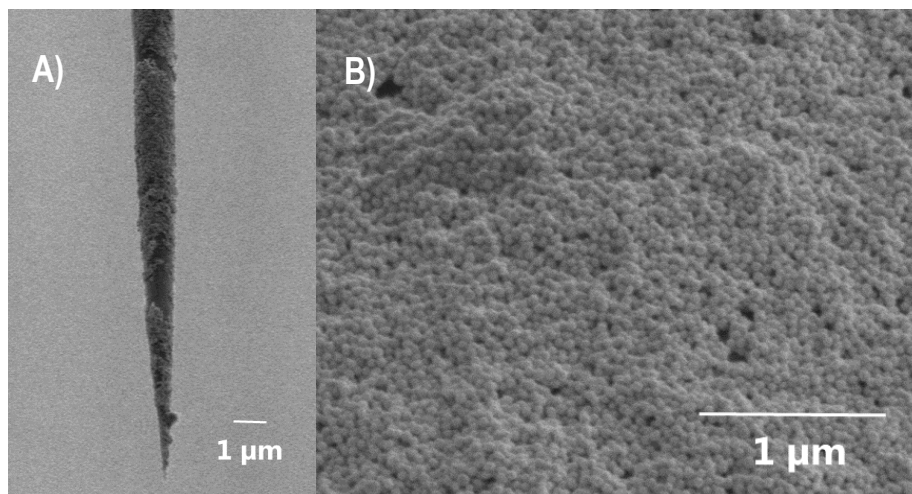


Figure 5.13 – Images SEM d'une micropipette recouvertes de nanoparticules d'or de 47 nm. (A) Vue d'ensemble de la pointe et (B) vue rapprochée de la surface permettant de distinguer les nanoparticules individuellement.

Les micropipettes plasmoniques ont d'abord été caractérisées par microscopie électronique à balayage afin d'évaluer l'efficacité du greffage sur la surface de verre. Tel qu'illustré à la figure 5.13, les nanoparticules d'or de 47 nm recouvrent en grande partie la pointe effilée des micropipettes, dont le diamètre peut être estimé à quelques centaines de nanomètres à l'extrémité. Bien que le verre soit visible sur certaines zones en raison d'une couverture partielle, la majeure partie de la pointe est fonctionnalisée d'une couche dense de nanoparticules d'or sphériques.

Il est important de noter que l'immobilisation des AuNPs sur une surface devrait en théorie modifier leur spectre d'extinction, par rapport à celui mesuré en solution. Le groupe de Schmid, entre autres, a démontré l'effet de la densité de greffage de nanoparticules d'or sur leur plasmon, en utilisant comme substrat une lamelle de verre.¹³⁰ Comme le montre la figure 5.14, le spectre d'extinction des nanoparticules d'or déposées sur une surface avec une faible densité se rapproche de celui de nanoparticules suspendues en solution, étant donné qu'elles sont trop éloignées les unes des autres pour interagir. Toutefois, lorsque la densité de greffage est plus élevée, les nanoparticules d'or se mettent à coupler entre elles, ce qui mène à un élargissement de la bande plasmonique de même qu'à un déplacement vers le rouge.¹³¹

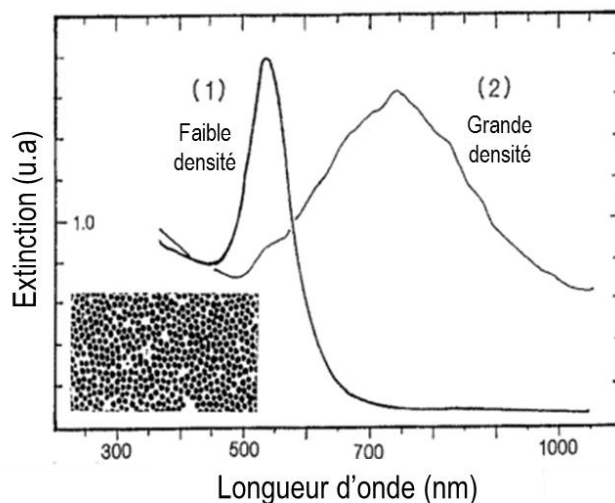


Figure 5.14 – Spectres d'extinction de nanoparticules d'or déposées sur une surface de verre avec une faible densité et une grande densité.¹³⁰

De manière à caractériser davantage la surface des micropipettes, le spectre de diffusion des nanoparticules sur la pointe a été mesuré à l'aide d'un montage optique maison. Pour ce faire, la pointe de la pipette a d'abord été imagée en microscopie en champ sombre grâce à un microscope IX71 de Olympus et un objectif 60x, puis la lumière de la source diffusée par les nanoparticules d'or a été

récoltée par un spectromètre UV-visible *Ocean Optics USB 2000+*. Un sténopé de 5 μm a également été placé au niveau du plan image intermédiaire du microscope dans le but de collecter uniquement les photons provenant de la fenêtre imagée. La figure 5.15 permet de comparer le spectre d'extinction des nanoparticules d'or de 47 nm en solution avec le spectre de diffusion de ces mêmes particules immobilisées sur la pointe d'une micropipette. Tel que prévu, le spectre des AuNPs est déplacé vers les hautes longueurs d'onde et est plus large lors qu'elles sont immobilisées de façon dense sur le substrat.

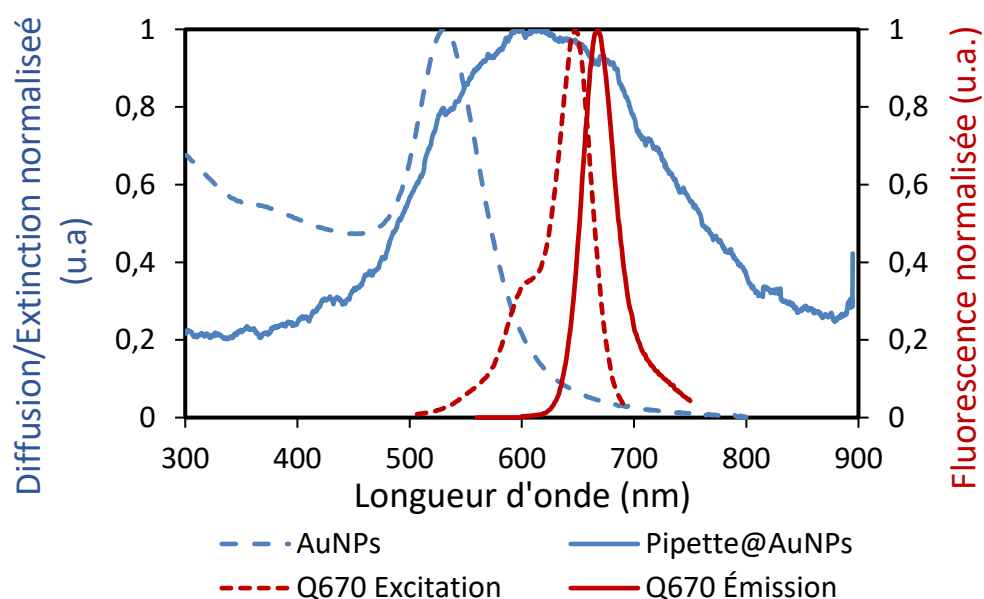


Figure 5.15 – Comparaison du spectre d'extinction des nanoparticules d'or en solution et du spectre de diffusion des nanoparticules d'or sur la pointe de la micropipette, mesurés en microscopie à champ sombre à l'aide d'un sténopé de 5 μm et d'un spectromètre UV-visible *Ocean Optics USB 2000+*. Superposition des spectres des nanoparticules avec les spectres d'excitation et d'émission du Quasar 670.

Cette modification de la bande plasmonique permet également d'obtenir une meilleure superposition avec les spectres d'excitation et d'émission du Quasar 670. Ce haut degré de recouvrement, lorsque les nanoparticules d'or sont greffées sur une surface, favorise l'interaction entre le plasmon et le fluorophore. Ceci est particulièrement avantageux dans le cadre de ce projet, où la variation de signal observé en raison du changement de conformation de l'aptamère dépend de l'efficacité des processus d'extinction et d'exaltation de fluorescence.

Il aurait été possible d'améliorer le recouvrement de surface en déposant un film d'or continu sur la pointe de la pipette, par dépôt chimique en phase vapeur par exemple. En effet, un film d'or possède un plasmon de surface, tout comme les nanoparticules d'or, à la différence qu'il n'est pas localisé.

Toutefois, la technique de greffage des AuNPs permet d'obtenir une plus grande surface disponible pour la fonctionnalisation des aptamères, en raison de l'importante rugosité de surface. De plus, comme en témoignent les images SEM et le spectre de diffusion de la micropipette, les AuNPs sur la pointe sont suffisamment rapprochées pour qu'il y ait apparition de « points chauds » entre des nanoparticules adjacentes. À ces points de contact ou de grande proximité, le couplage plasmonique est si important que les phénomènes reliés aux propriétés plasmoniques des nanoparticules, comme l'exaltation de fluorescence, sont beaucoup plus intenses qu'à proximité de nanoparticules isolées.¹³¹ Par conséquent, l'utilisation d'une couche de nanoparticules d'or devrait permettre, en théorie, de greffer davantage de brins d'ADN et d'augmenter la différence de signal mesurée en microscopie de fluorescence entre les deux conformations de l'aptamère, bien que cette hypothèse n'ait pas été confirmée expérimentalement dans le cadre de ce projet.

5.4 Détection d'ATP dans un milieu tampon contrôlé

5.4.1 Montage de microscopie de fluorescence

Afin d'étudier la réponse du biocapteur à l'ATP, des mesures en microscopie de fluorescence ont été réalisées à l'aide d'un montage optique décrit au tableau 5.2. Le montage repose sur un microscope inversé modèle IX71 d'Olympus, un instrument adapté à l'imagerie de cultures cellulaires en raison de l'objectif placé en-dessous de l'échantillon qui permet de positionner le plan objet sur les composantes biologiques se trouvant au fond du récipient, sans avoir à observer à travers toute son épaisseur.

Tableau 5.2 – Liste des composantes du premier montage de microscopie de fluorescence.

| Composante | Modèle | Compagnie |
|---------------------|---------------------------------------|------------------------|
| Microscope inversé | IX71 | Olympus |
| Objectif | UPlanFI 20x | Olympus |
| Source | 05-LHR-991 Laser HeNe 633 nm, 8 mW | Melles Griot |
| Obturateur | VS25 et VMM-T1 | Uniblitz |
| Filtre d'excitation | HQ615/40x | Chroma |
| Miroir dichroïque | FF640-Di01 | Semrock |
| Filtre d'émission | FF01-685/40-25 | Semrock |
| Caméra CCD | ALTA-U32 | Apogee Imaging Systems |

Le cube de fluorescence sélectionné est adapté aux spectres d'excitation et d'émission du Quasar 670, comme le montre la figure 5.16. Le filtre d'excitation transmet les photons ayant une longueur d'onde entre 590 et 640 nm qui sont ensuite réfléchis par le miroir dichroïque (< 640 nm) vers l'échantillon. Les photons émis par l'échantillon sont alors transmis à travers le miroir dichroïque (> 640 nm) puis le filtre d'émission (650-700 nm) jusqu'à une caméra CCD de la compagnie Apogee Imaging Systems. Un obturateur est placé dans le parcours du laser et est relié à la caméra; de cette façon, la source éclaire l'échantillon uniquement lorsque le détecteur est activé, ce qui permet de réduire le photoblanchiment des fluorophores.

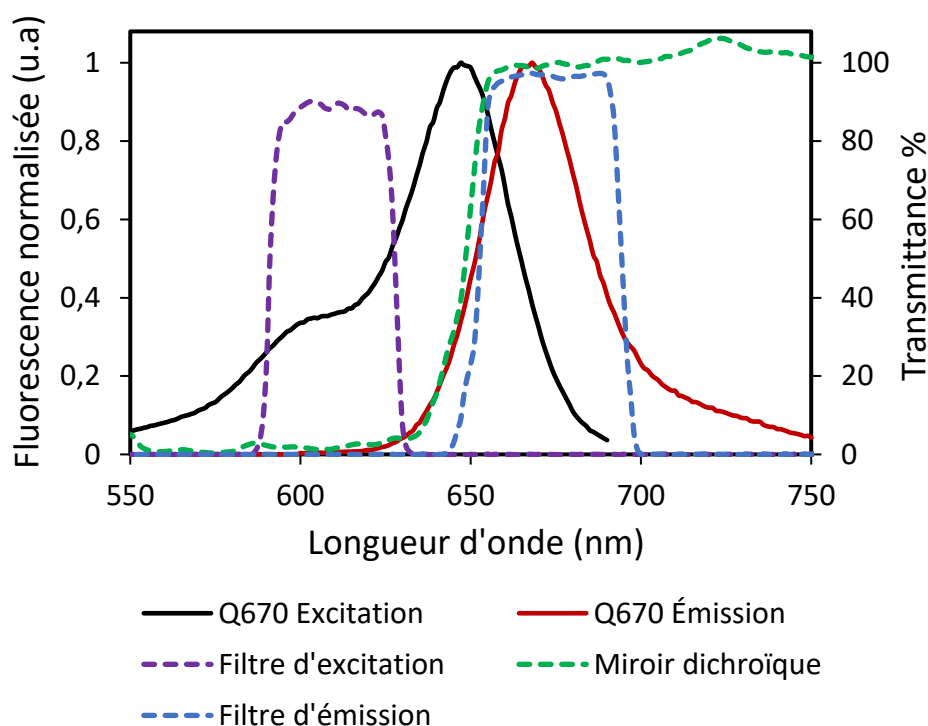


Figure 5.16 – Concordance entre les spectres d'excitation et d'émission du Quasar 670 et les spectres de transmittance des composants du cube de fluorescence utilisés dans le montage optique.

Dans la première série de mesures, une source laser à 633 nm a été utilisée plutôt qu'une lampe à incandescence halogène conventionnelle, puisque les micropipettes de verre recouvertes de nanoparticules d'or s'avèrent être fortement diffusantes. En utilisant une source polychromatique, il est donc possible que le biocapteur diffuse la lumière provenant de la source et, comme les filtres et le miroir dichroïque ne sont pas efficaces à 100%, cette lumière incidente peut se rendre jusqu'à la caméra. Le but d'utiliser une source monochromatique est alors de limiter le signal parasite de diffusion mesuré par le détecteur.

Une cellule d'élution a également été installée sur la platine du microscope, afin de faciliter les mesures de microscopie de fluorescence sur les biocapteurs en présence de différentes solutions d'ATP (voir figure 5.17). En effet, la pointe des micropipettes est d'abord sectionnée, puis immobilisée sur une lamelle de verre. Cette étape a pour but de rapprocher la pointe de l'objectif 20x en plus de limiter ses mouvements au cours de l'élution pour maintenir le focus au même endroit.

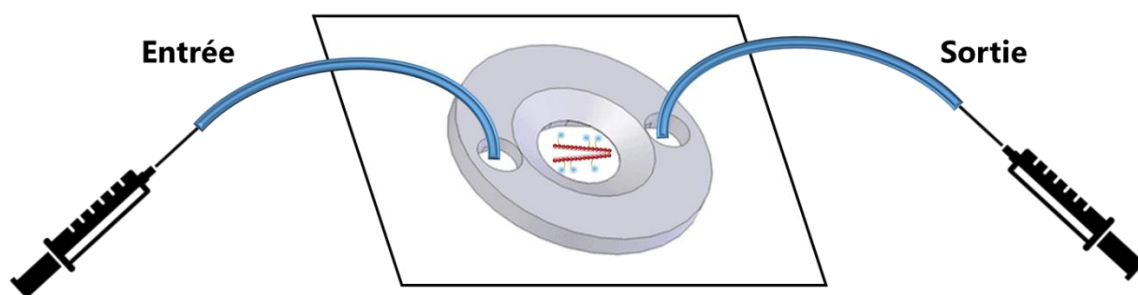


Figure 5.17 – Schéma du montage d'élution placé sur la platine du microscope, composé d'une lamelle de verre sur laquelle est immobilisée une pointe de micropipette surmontée d'une cellule de polydiméthylsiloxane permettant l'insertion de solutions aqueuses.

Par la suite, un moule de polydiméthylsiloxane possédant des orifices d'entrée et de sortie est collé sur la lamelle de verre, créant ainsi une cellule de perfusion d'un volume approximatif de 100 μL . Grâce à des pousse-seringue, il est alors possible d'injecter des solutions dans l'environnement du biocapteur à un rythme constant de 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ qui favorise un renouvellement rapide dans la cellule.

5.4.2 Résultats en microscopie de fluorescence

Afin de simuler l'environnement biologique dans une matrice simple, des étalons d'ATP de 1 à 20 mM ont été préparés dans du tampon phosphate à pH 7,4. Ces solutions ont été injectées dans la cellule à perfusion à tour de rôle, avec une étape de lavage au PBS entre chaque étalon, dans le but de quantifier la variation de signal de fluorescence du biocapteur. L'aptamère fluorescent est théoriquement sous sa conformation dépliée en absence d'ATP. Le fluorophore greffé à l'extrémité 3' devrait donc se trouver à environ 7 nm de la surface plasmonique, longueur approximative d'un simple brin d'ADN de 23 bases. En présence d'ATP, l'aptamère se replie sur lui-même, rapprochant ainsi le Quasar 670 à environ 1 nm de la surface des nanoparticules d'or, considérant la longueur de l'espaceur à l'extrémité 5' du brin d'ADN. Le fluorophore passe donc d'un environnement éloigné à un environnement dominé par l'extinction de fluorescence, ce qui devrait se traduire par une perte de signal lors du suivi en microscopie.

Au cours de l'expérience, la réponse du capteur a été mesurée à raison d'une image à chaque 20 secondes. La lampe a été ajustée à 12,5% de puissance avec un temps d'exposition de 100 ms et une segmentation d'image permettant de combiner des pixels, afin de minimiser le photoblanchiment du fluorophore. Les images acquises au cours de l'expérience sont par la suite traitées à l'aide du logiciel ImageJ. La première étape de traitement consiste à corriger tout défaut de superposition entre les images qui pourrait résulter d'un déplacement de la pipette au cours de l'acquisition. Pour ce faire, les images de la série sont alignées grâce à une extension portant le nom de *StackReg*, qui considère la pointe de la pipette comme un corps rigide capable de mouvements de translation et de rotation. Par la suite, la série d'images corrigées est analysée à l'aide d'une extension nommée *Time Series Analysis* qui permet de calculer la moyenne d'intensité des pixels dans une région d'intérêt sélectionnée sur l'image (voir figure 5.18). La moyenne des niveaux de gris de la pipette est par la suite corrigée pour chaque image en soustrayant le signal provenant du bruit de fond.

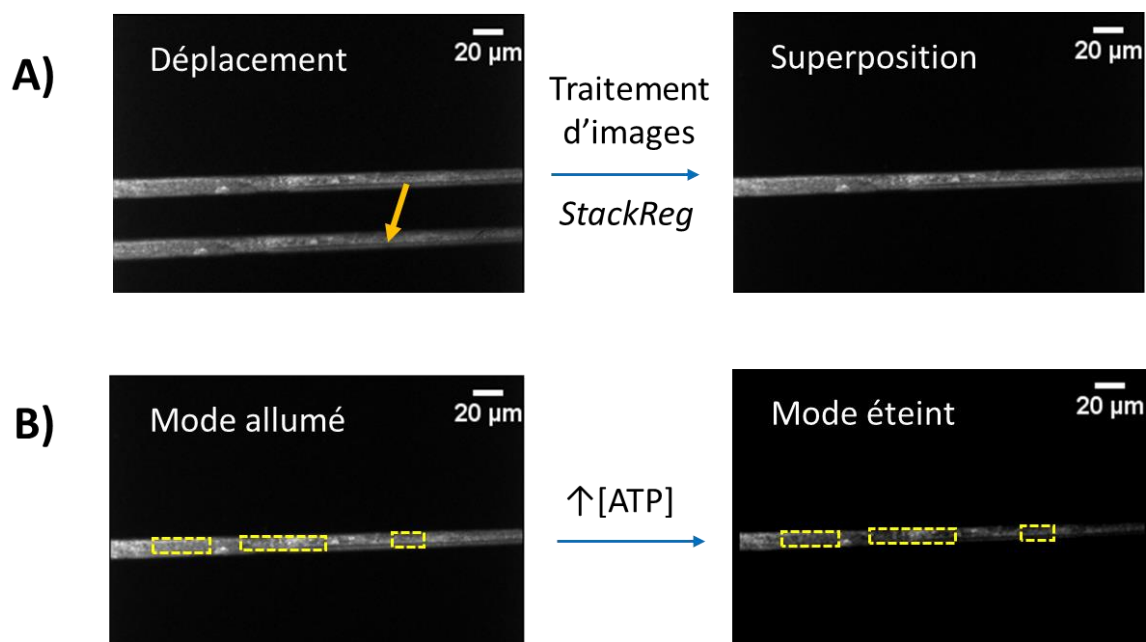


Figure 5.18 – (A) Correction du déplacement de la pointe lors de l'expérience par un traitement d'image sur le logiciel ImageJ grâce à l'extension *StackReg*. (B) Mesure de la moyenne des niveaux de gris de différentes régions d'intérêt (en pointillé) sur la pointe du biocapteur à l'aide du logiciel de traitement d'images.

Comme l'illustre la figure 5.19, ce traitement d'images permet d'obtenir un graphique de la moyenne des niveaux de gris corrigée en fonction du temps écoulé lors de l'expérience. Tel qu'attendu, l'intensité du signal de fluorescence du biocapteur diminue significativement en présence de solutions contenant une concentration croissante d'ATP. De plus, la moyenne des niveaux de gris augmente de nouveau

lorsque la cellule est lavée avec du PBS. Ces résultats sont très encourageants, puisqu'ils témoignent du mouvement de repliement et de dépliement de l'aptamère en fonction de son environnement, un facteur central pour le développement d'un biocapteur sensible pour l'ATP.

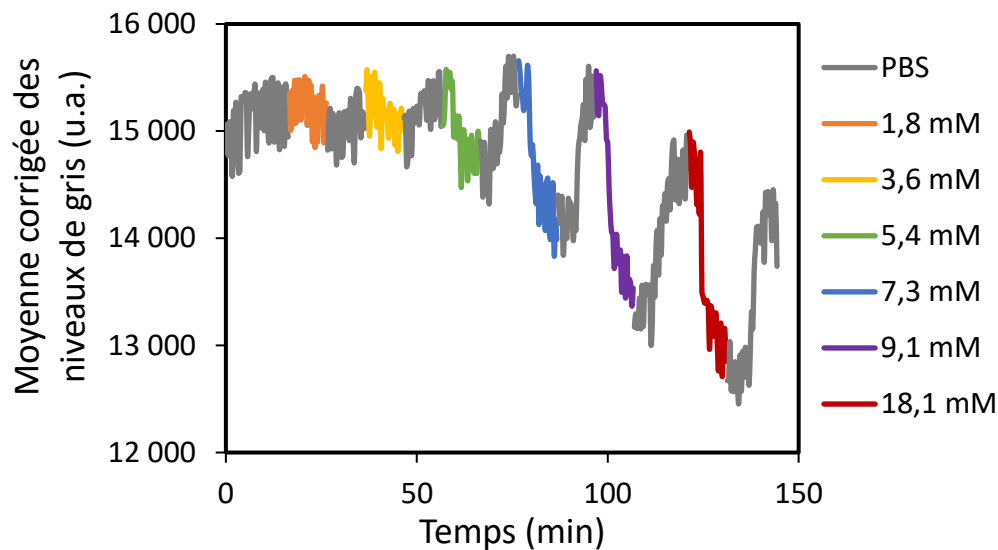


Figure 5.19 – Variation du signal de fluorescence de la pointe de la pipette en fonction de la concentration d'ATP présente dans la cellule à perfusion. Les mesures sont effectuées sur le premier montage de microscopie de fluorescence et la cellule est lavée à l'aide de tampon PBS entre chaque étalon d'ATP analysé.

Cependant, ces premières données ont permis de soulever certains problèmes avec le montage de microscopie de fluorescence utilisé. Tout d'abord, il est difficile de calculer avec précision le pourcentage de perte de signal observé en fonction de la concentration d'ATP en solution, puisque le rapport signal sur bruit des données traitées est très faible. Un moyen simple de corriger ce problème est de diminuer le bruit en refroidissant la caméra CCD plutôt que de l'utiliser à température pièce. Le second problème observé est la perte de signal graduelle observée après 75 minutes de suivi. Trois hypothèses permettent d'expliquer cette tendance. D'une part, il est possible que la diminution de signal du biocapteur soit due à du photoblanchiment du fluorophore greffé à l'aptamère, en raison d'une surexposition à la source laser. D'un autre côté, il se peut qu'une fraction des brins d'ADN demeure en position repliée malgré les lavages au PBS, témoignant ainsi d'un manque de réversibilité de l'aptamère causant une perte de signal progressif. Finalement, la diminution du signal peut être attribuée à une perte de focus sur la pointe de la pipette au cours de l'expérience, menant à l'acquisition d'images plus diffuses et dont l'intensité des pixels est moins élevée. Le dernier problème observé avec ce montage est que la source laser n'éclaire pas uniformément l'échantillon, mais forme plutôt des patrons de diffraction au plan objet. Ceci est particulièrement problématique en raison des

mouvements de translation et de rotation de la pipette au cours de l'expérience. L'extension StackReg permet de corriger ces mouvements, mais ne prend pas en compte la variation d'intensité de la source d'un point à l'autre de l'image.

Tableau 5.3 – Liste des composantes du second montage de microscopie de fluorescence.

| Composante | Modèle | Compagnie |
|------------------------|----------------|------------------------|
| Microscope inversé | IX71 | Olympus |
| Objectif | UPlanFI 20x | Olympus |
| Source | X-Cite 200 DC | Lumen Dynamics |
| Préfiltre d'excitation | FF01-624/40 | Semrock |
| Filtre d'excitation | HQ615/40x | Chroma |
| Miroir dichroïque | FF640-Di01 | Semrock |
| Filtre d'émission | FF01-685/40-25 | Semrock |
| Caméra CCD | ALTA-U32 | Apogee Imaging Systems |

Afin de corriger ces problèmes, certains changements ont été effectués au montage de microscopie. Tout d'abord, la caméra a été refroidie jusqu'à environ -30°C dans le but diminuer le bruit mesuré. De plus, la platine du microscope a été stabilisée de manière à éviter de perdre la mise au point sur la pipette. La source laser a également été changée pour une lampe halogène beaucoup plus uniforme au plan objet et possédant un obturateur intégré. Puisque les micropipettes recouvertes de nanoparticules d'or sont très diffusantes et que la source à halogène est polychromatique, un préfiltre d'excitation a été ajouté avant le cube de fluorescence afin de limiter le nombre de photons diffusés vers la caméra.

La figure 5.20 présente les données obtenues après le traitement des images acquises à l'aide de ce second montage de microscopie. Ce graphique démontre une nette amélioration du rapport signal sur bruit au cours de l'expérience, qui facilite grandement la quantification de la perte de signal observée. De plus, après chaque lavage de la cellule à perfusion à l'aide d'une solution de PBS, la moyenne des niveaux de gris du biocapteur retourne à sa valeur originale. Ceci suggère que la diminution de signal observée précédemment n'était pas due à un manque de réversibilité du capteur, ni au photoblanchiment du fluorophore, mais plutôt à une perte de focus sur la pipette. Bref, les modifications apportées au montage de microscopie semblent avoir porté fruit.

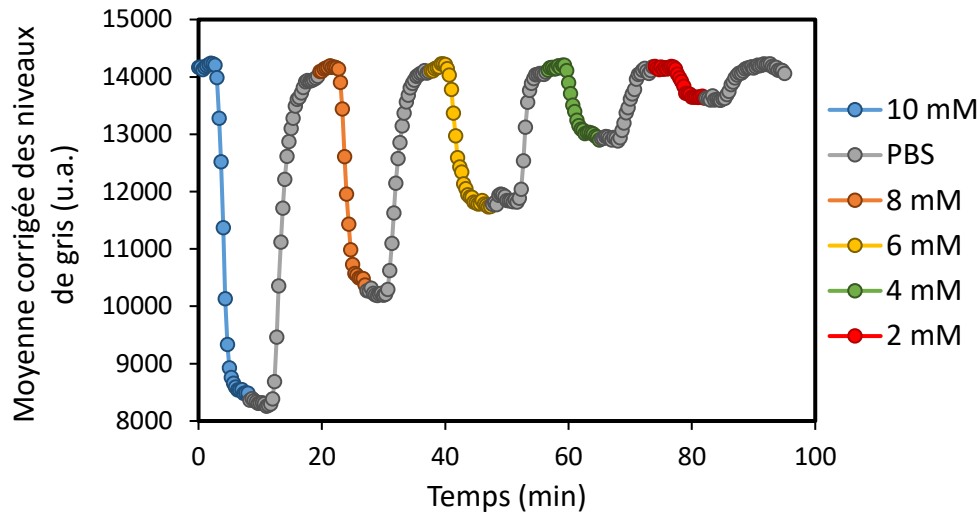


Figure 5.20 - Variation du signal de fluorescence de la pointe de la pipette en fonction de la concentration d'ATP présente dans la cellule à perfusion. Les mesures sont effectuées sur le second montage de microscopie de fluorescence et la cellule est lavée à l'aide de tampon PBS entre chaque étalon d'ATP analysé.

Il est possible d'extraire plusieurs informations à partir de ces nouvelles données expérimentales. Tout d'abord, la vitesse de réponse du capteur a été estimée à 2 minutes 30 secondes, ce qui correspond au temps nécessaire pour que l'intensité de fluorescence de la sonde atteigne un plateau. Ce genre de temps de réponse, typique des aptamères, est généralement limité par la vitesse à laquelle le brin d'ADN ou d'ARN passe d'une conformation à une autre. Cette caractéristique peut s'avérer limitante pour la mesure de variations rapides de concentration d'ATP en milieu biologique. Toutefois, plusieurs phénomènes cellulaires associés à des changements de concentration d'ATP se produisent sur une durée de plusieurs minutes, voire plusieurs heures, et pourraient être étudiés à l'aide de ce biocapteur.

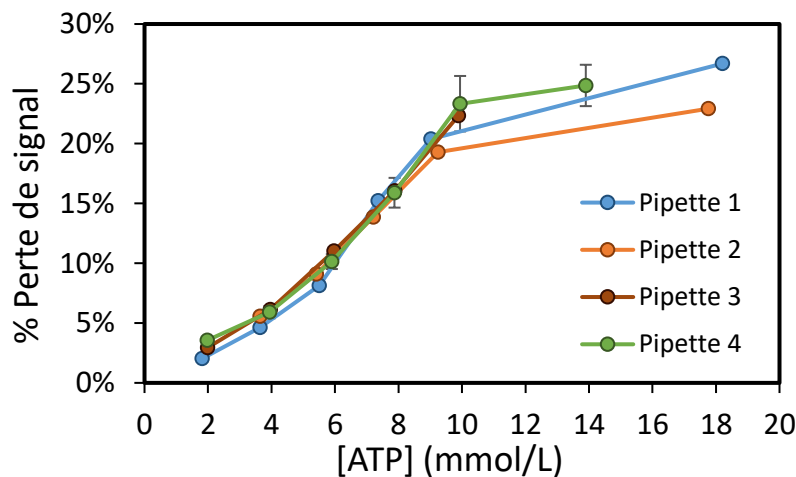


Figure 5.21 – Courbes d'étalonnage obtenues pour quatre pipettes préparées sur une échelle de plusieurs mois avec différents lots de réactifs et différents lots d'aptamère. Les barres d'erreur sur les courbes des pipettes 3 et 4 correspondent à l'écart-type sur des données provenant de trois régions d'intérêt sur chaque pipette.

À partir de ces données, il est également possible de calculer le pourcentage de perte de signal du biocapteur en fonction de la concentration d'ATP présente dans le milieu. La figure 5.21 présente les courbes d'étalonnages obtenues pour quatre pipettes distinctes préparées à partir de différents lots de réactifs et différents lots d'aptamère. Dans le cas des pipettes 3 et 4, les barres d'erreur proviennent de mesures effectuées sur trois régions d'intérêt sur la pointe de chaque pipette. Ces données témoignent de la répétabilité et de la reproductibilité du biocapteur dans une gamme de linéarité allant d'environ 1 à 10 mM avec un coefficient de corrélation variant entre 0,98 et 0,99. Il est intéressant de noter que cette gamme de linéarité correspond aux concentrations d'ATP retrouvées à l'intérieur des cellules, ce qui rend ces biocapteurs adaptés aux mesures en milieu intracellulaire. Une perte de signal significative de 25% est observée à une concentration de 10 mM d'ATP, ce qui indique qu'une partie de la population d'aptamères passe d'une conformation dépliée à une conformation repliée dans ce milieu, tel qu'attendu.

Suite à cette évaluation initiale des performances du biocapteur, l'influence de deux paramètres de synthèse a été étudiée, soit la taille des nanoparticules d'or utilisées et l'importance du recouvrement de 6-mercaptophexanol. Pour ce faire, trois biocapteurs ont été comparés : le premier est recouvert de nanoparticules d'or de 50 nm avec de l'aptamère et du 6-mercaptophexanol, le second est identique mais sans mercaptophexanol et le troisième est recouvert de AuNPs de 90 nm avec de l'aptamère et du mercaptophexanol.

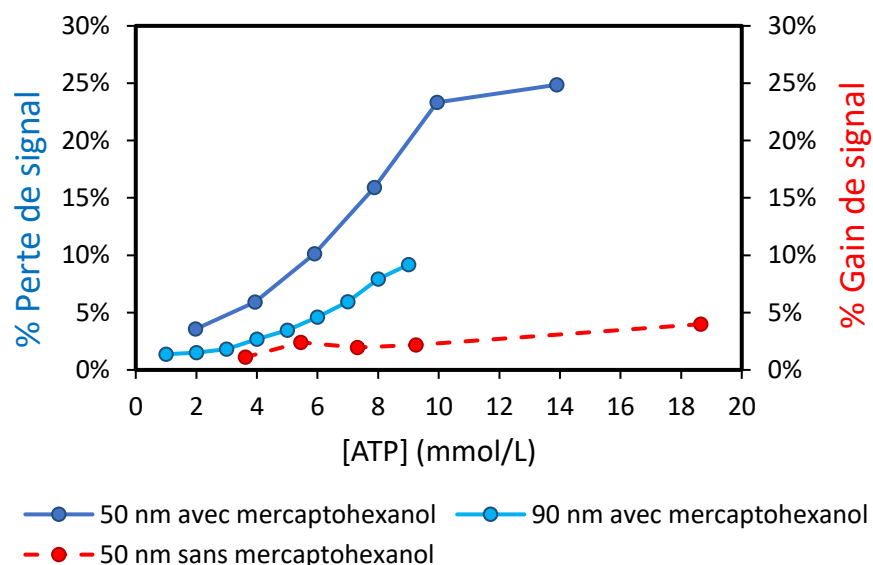


Figure 5.22 – Comparaison des courbes d'étalonnage obtenues pour des pipettes recouvertes de nanoparticules d'or de 90 nm et de 50 nm et pour des biocapteurs avec et sans 6-mercaptophexanol.

Tel qu'illustré à la figure 5.22, chaque biocapteur a été analysé en microscopie de fluorescence avec différents étalons d'ATP, selon la méthode décrite précédemment. Au premier abord, la taille des nanoparticules d'or semble avoir un impact important sur l'efficacité du capteur. En effet, en passant de nanoparticules d'un diamètre de 50 nm à 90 nm, la sensibilité de la micropipette chute d'un facteur d'environ 2,5 dans la gamme de 1 à 10 mM. Ceci peut sembler contradictoire, puisqu'en théorie le plasmon de surface localisé est plus intense pour des nanoparticules de grande taille, en plus de posséder une plus grande portée.⁴² La différence de signal observée entre la position allumée et éteinte devrait donc être plus importante avec les AuNPs de plus grande taille.

Toutefois, il s'avère que les nanoparticules de 90 nm sont beaucoup plus diffusantes que celles de 50 nm. Par conséquent, en microscopie, les pipettes recouvertes de nanoparticules de 90 nm diffusent théoriquement un nombre plus important de photons provenant de la source vers la caméra. La diffusion du capteur vient donc créer un signal parasite qui masque le signal de fluorescence provenant de l'aptamère, diminuant ainsi le pourcentage de perte d'intensité observé. Pour valider cette hypothèse, des micropipettes recouvertes de AuNPs de 50 nm et de 90 nm sans aptamère fluorescent ont été analysées sur le montage de microscopie. Dans le cas des plus petites nanoparticules, aucun signal de diffusion n'a été mesuré par la caméra CCD pour le temps d'intégration typique de 100 ms. Au contraire, la micropipette recouvertes de nanoparticules de 90 nm était clairement visible sur la caméra, et ce, malgré les deux filtres d'excitation utilisés sur ce montage. La taille des AuNPs utilisées dans la préparation du biocapteur est donc limitée par leur facteur de diffusion.

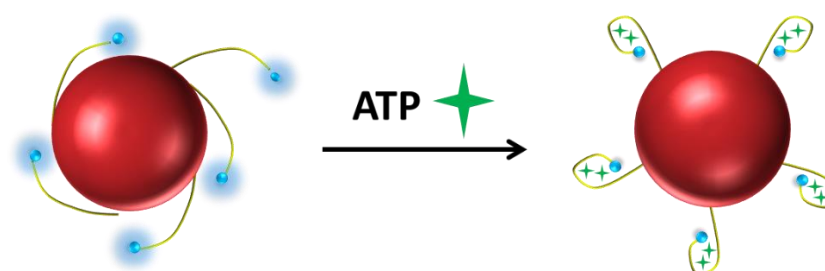


Figure 5.23 - Schéma de greffage de l'aptamère (en jaune) en l'absence de 6-mercaptohexanol à la surface d'une nanoparticule d'or.

Un changement encore plus drastique de la sensibilité est observé en absence de 6-mercaptohexanol à la surface du biocapteur. En effet, un gain de signal variant de 1 à 4 % est observé avec ce nouveau système dans une gamme de 3 à 19 mM d'ATP, ce qui s'oppose à la perte de signal mesurée en présence de 6-mercaptohexanol. Pour expliquer ces résultats, il faut se rappeler du rôle de

l'alcanethiol, qui consiste à redresser les brins d'aptamère en comblant les espaces libres à la surface des nanoparticules d'or. En absence de cette molécule, les simples brins d'ADN auraient donc davantage tendance à s'affaisser sur le substrat plasmonique, tel qu'illustré à la figure 5.23. Par conséquent, le Quasar 670 serait très près de la surface d'or en absence d'ATP et s'éloignerait légèrement en se repliant autour de sa molécule cible, menant ainsi à une faible augmentation de l'intensité de fluorescence du capteur. Selon ces résultats, il semble donc que l'utilisation de nanoparticules d'or de 50 nm et la présence de 6-mercaptophexanol en surface soient les paramètres optimaux pour les performances du biocapteur.