

Table des matières

Introduction	xv
1 Propriétés physico-chimiques des groupements de nanoparticules d'or auto-assemblés	1
1.1 Repères historiques	3
1.1.1 Les origines des nanotechnologies	3
1.1.2 A travers les nanoparticules d'or	4
1.1.3 Contexte actuel	5
1.2 Propriétés physiques des nanoparticules d'or	6
1.2.1 Propriétés physiques de l'or massif	6
1.2.2 Résonance plasmon de surface de nanoparticules	9
1.2.3 Approximation quasi-statique	10
1.2.4 Approximation dipolaire	12
1.2.5 Limites de l'approximation dipolaire précédente	13
1.3 Propriétés optiques d'un dimère de nanoparticules	14
1.3.1 Discussion quasi-statique et dipolaire	14
1.3.2 Limites de l'approximation quasi-statique dipolaire	16
1.4 De la nanoparticule à la suspension colloïdale	18
1.4.1 Suspension colloïdale	19
1.4.2 Forces entre objets supramoléculaires	19
1.4.3 Énergie d'interaction - Théorie DLVO	21
1.4.4 Stabilisation d'une suspension colloïdale de nanoparticules métalliques	22
1.4.5 Chimie de surface des nanoparticules d'or	22
1.5 De la nanoparticule à un auto-assemblage programmé	24
1.5.1 Nanotechnologie ADN	24
1.5.2 Le choix de l'ADN comme matériau dynamique	25
1.5.3 Structures dynamiques - Balises moléculaires	26
1.5.4 Les assemblages or-ADN	26
1.6 Biocapteurs optiques	27
1.6.1 LSPR : résonance surface plasmon localisée	27
1.6.2 Capteurs colorimétriques	29
1.7 Objectifs de la thèse	30
1.7.1 État de l'art	30
1.7.2 Ce manuscrit	34

2 Réversibilité morphologique de dimères de nanoparticules d'or de 8 nm assemblés sur ADN	37
2.1 Stratégie utilisée	38
2.1.1 Structure des dimères	39
2.1.2 Stratégie de fabrication de dimères dynamiques	40
2.2 Protocole d'auto-assemblage des dimères	41
2.2.1 Modification de la chimie de surface	41
2.2.2 Conjugaison de brins d'ADN sur une nanoparticule d'or	42
2.2.3 Purification des monomères par électrophorèse	42
2.2.4 Formation des dimères et étude morphologique par déplacement électrophorétique	44
2.3 Caractérisation morphologique par microscopie électronique cryogénique en transmission (cryo-EM)	46
2.3.1 Principes du cryo-EM	46
2.3.2 Évaluation de la pureté des échantillons	47
2.3.3 Évaluation des diamètres des dimères	47
2.3.4 Estimation des distances interparticules	48
2.4 Étude de la structure dynamique	50
2.4.1 Réversibilité et sensibilité	50
2.4.2 Reproductibilité	52
2.5 Conclusions	54
3 Assemblage de dimères de particules d'or de diamètres supérieurs à 40 nm	55
3.1 Contexte	58
3.2 Synthèse avec contrôle du nombre de brins d'ADN	59
3.2.1 Fonctionnalisation contrôlée des nanoparticules d'or	59
3.2.2 Formation des dimères	61
3.3 Synthèse minimisant le nombre de brins liants	62
3.3.1 Principe	62
3.3.2 Conjugaison or-ADN	63
3.3.3 Fabrication des dimères	63
3.4 Optimisation de la stabilité colloïdale par la chimie de surface	66
3.4.1 Généralités	66
3.4.2 Chaîne poly(éthylène)glycol : <i>E16m</i>	68
3.4.3 Ligands amphiphiles	70
3.5 Dimères de nanoparticules d'or de 60 nm de diamètre	75
3.5.1 Accrochage d'ADN	75
3.5.2 Synthèse des dimères	77
3.6 Conclusions	78
4 Caractérisation optique des dimères dynamiques	79
4.1 Principes de mesures	82

4.1.1	Préparation de chambres microfluidiques pour l'analyse spectrale de structures individuelles	82
4.1.2	Spectroscopie de dimères uniques - Montage	83
4.1.3	Analyse et choix des dimères	87
4.2	Propriétés optiques des dimères pégylés	88
4.2.1	Influence de la force ionique	88
4.2.2	Estimation de la distance interparticule	92
4.2.3	Étude des distances en fonction de la force ionique	96
4.2.4	Stabilité cinétique des dimères	96
4.2.5	Comparaison des fréquences de résonance des structures ouvertes et fermées	98
4.3	Suivi spectral plein champ sur une caméra CCD couleur	100
4.3.1	Calibration de la caméra CCD couleur	101
4.3.2	Étude de la différence structurale de dimères ouverts et fermés avec une caméra CCD	104
4.3.3	Étude de l'orientation spatiale de dimères	106
4.3.4	Suivi optique de l'ouverture et de la fermeture des dimères	111
4.4	Conclusions	117
5	Minimisation des interactions interparticules dans des assemblages de nanoparticules d'or	119
5.1	Protocole de détermination de la stabilité d'un dimère	121
5.1.1	Chimie de surface	121
5.1.2	Protocole de mesure	122
5.2	Étude spectrale de la stabilité des dimères	124
5.2.1	Longueurs d'onde de résonance en fonction de la force ionique	124
5.2.2	Mise en évidence de deux sous-populations de dimères	125
5.2.3	Longueurs d'onde de résonance en fonction de la force ionique pour les deux sous-populations	127
5.3	Estimation de la distance interparticule selon les différentes chimies de surface	129
5.3.1	Calibration de la relation entre la longueur d'onde de résonance et la distance interparticule	129
5.3.2	Évolution en fonction de la concentration saline	129
5.4	Fermeture de dimères A11E6c	133
5.4.1	Protocole expérimental	133
5.4.2	Tri des données	133
5.4.3	Résultats	134
5.5	Conclusions	135
6	Perspectives et conclusion générale	137
6.1	Influence d'autres stimuli extérieurs : cas particulier de la température	138
6.1.1	Protocole expérimental	138
6.1.2	Spectroscopie d'objets uniques en fonction de la température	140
6.1.3	Conclusion et perspectives	142

6.2	Analyse temporelle de clignotements de dimères	143
6.2.1	Observation sur la caméra CCD couleur	143
6.2.2	Analyse spectrale	145
6.2.3	Conclusion et perspectives	146
6.3	Conclusion générale	147
A	Protocoles expérimentaux des synthèses de dimères de particules de 8, 40 et 60 nm	151
A.1	Matériel et méthodes	151
A.2	Synthèse des dimères de particules de 8 nm de diamètre	154
A.3	Synthèse des dimères de particules de 40 nm de diamètre	154
A.3.1	Synthèse avec contrôle du nombre de brins d'ADN	154
A.3.2	Synthèse minimisant le nombre de brins liants	155
A.4	Synthèse des dimères de particules de 60 nm de diamètre	156
	Références	157

Nomenclature

- BSPP : Bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphine
- PEG : Polyéthylène glycol
- λ : Longueur d'onde
- χ : Susceptibilité diélectrique
- k : Nombre d'onde
- ϵ : Constante diélectrique
- γ : Taux de collision
- ω_p : Pulsation de plasmon de volume
- C : Section efficace
- α : Polarisabilité
- ω : Pulsation
- a : Rayon d'une particule
- d : Diamètre d'une particule
- GMT : Théorie de MIE Généralisée
- DDA : Approximation dipolaire discrète
- n : Indice diélectrique
- r : Distance bord-à-bord
- R : Distance centre-à-centre
- A : Constante de Hamaker
- Φ : Potentiel électrique
- K : Longueur de Debye-Hückel
- k_B : Constante de Boltzmann
- I : Force ionique
- e : Charge élémentaire
- T : Température
- ζ : Potentiel zêta

À l'échelle du nanomètre, l'interaction entre la matière et la lumière devient très faible, rendant très difficiles l'analyse et la détection de molécules uniques. Dans le cas de molécules interagissant de manière résonante avec la lumière, moins d'un photon sur un million est typiquement absorbé. Mais pour une protéine absorbant dans l'UV, moins d'un photon visible sur 10^{12} sera diffusé, limitant drastiquement leur détection optique. Toutefois, des objets nanométriques fortement polarisables peuvent entrer en résonance avec le champ électromagnétique incident et exhiber des sections efficaces de diffusion et d'absorption suffisamment importantes pour être détectés individuellement. Rendre de telles nanostructures optiquement sensibles à des molécules permet alors de sonder et d'analyser la matière à l'échelle du nanomètre et est une approche séduisante pour le développement de biocapteurs optiques ultrasensibles.

En particulier, la résonance plasmon de surface localisée des nanoparticules métalliques les dote de propriétés remarquables largement utilisées de nos jours. D'une part, les particules d'une dizaine de nanomètres absorbent très fortement la lumière, permettant ainsi de chauffer très localement leur milieu environnant. Ces propriétés sont notamment utilisées comme source photothermique dans le traitement de cellules cancéreuses [1–4]. De plus, les sections efficaces de diffusion permettent à ces nanoparticules d'être utilisées comme agents de contraste en optique [5,6]. Ces deux utilisations démontrent leur potentiel considérable dans des applications biomédicales, mais également la nécessité de connaître et de contrôler leur stabilité physico-chimique pour pouvoir les exploiter efficacement.

Le greffage de ligands à la surface des nanoparticules est fondamental pour les applications utilisant des suspensions colloïdales. En effet, les ligands régissent les propriétés de stabilité et d'interaction des particules entre elles et également avec les biomolécules environnantes. Dans cette optique, les ligands à base de poly(éthylène) glycol sont largement utilisés car ils minimisent les interactions avec les protéines extérieures, tout en maintenant une bonne stabilité vis-à-vis de la force ionique du milieu [7].

Par ailleurs, les résonances des particules métalliques sont très sensibles à l'indice diélec-

trique du milieu dans lequel elles se trouvent. Cette propriété a permis le développement de capteurs optiques capables de suivre l'accrochage de biomolécules à leur surface [8, 9]. L'optimisation de la résonance des particules vis-à-vis de la constante diélectrique du milieu entourant la particule a d'autre part rendu possible la détection de l'accrochage de molécules uniques [10, 11]. Cependant, le faible décalage spectral mesuré et la complexité du dispositif expérimental associé à ces mesures encouragent l'utilisation de groupements de nanoparticules.

En effet, lorsque deux particules plasmoniques se rapprochent, leurs résonances se couplent entraînant une augmentation notable de la section efficace de diffusion ainsi qu'un décalage vers le rouge de la longueur d'onde de résonance [12]. Ces effets sont d'autant plus marqués que les particules sont proches et ont donné lieu au développement de capteurs colorimétriques [13, 14]. Ce sont des capteurs pour lesquels la présence de l'analyte cible entraîne l'agrégation d'une suspension colloïdale, ce qui modifie drastiquement sa couleur. En calibrant la longueur d'onde de résonance en fonction de la distance interparticule au sein d'un système composé uniquement de deux nanoparticules, il est possible de détecter des variations de distance nanométriques via un signal optique aisément mesurable. Cette propriété est à l'origine des pieds à coulisses moléculaires plasmoniques (*plasmon ruler*) [15–17].

Afin d'utiliser ces propriétés de couplage entre deux nanoparticules pour l'étude de déformations structurales de molécules ou pour leur détection, il est indispensable de pouvoir assembler ces deux particules avec un système dynamique, flexible et programmable. Pour cela, l'utilisation de brins d'ADN synthétique dont les extrémités thiolées se lient de façon très efficace aux particules d'or s'est développée depuis 1996, pour le contrôle d'auto-assemblages de nanoparticules [13, 18]. L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de contrôler le nombre de brins d'ADN attachés à la surface de chaque particule [19]. La fabrication de dimères de nanoparticules dont la distance interparticule est déterminée par l'échafaudage d'ADN a alors été établie pour des particules de diamètre allant jusqu'à 40 nm [20].

En utilisant un brin d'ADN possédant une tige-boucle dans sa séquence, il est envisageable de contrôler la distance interparticule en fonction d'une information chimique locale. Cela a initialement été démontré avec une paire de fluorophores, ce qui a donné naissance aux balises moléculaires [21]. Malheureusement, la faible photo-stabilité de ces objets limite leur performance. L'utilisation de nanoparticules semble ainsi être une bonne alternative aux fluorophores puisque celles-ci ne photoblanchissent pas. Dans cette optique, des équipes ont pu démontrer la déformation réversible de dimères assemblés par des brins d'ADN dynamiques [22] et les utiliser en tant que capteurs optiques [23]. Dans ce dernier cas, la faible pureté des échantillons ainsi que le faible signal optique mesuré limitent cependant leur utilisation.

Dans ce travail de thèse, nous allons démontrer qu'il est possible de produire de manière reproductible des dimères de nanoparticules d'or purifiés, dont les particules sont reliées

par un brin d'ADN possédant une tige-boucle qui permet de modifier réversiblement la distance interparticule. Nous présenterons le développement d'outils d'analyse quantitative de processus physico-chimiques régissant la morphologie de nanostructures auto-assemblées. Ces outils permettront le suivi de modifications morphologiques à l'échelle du nanomètre en plein champ avec des détecteurs à bas coût. Finalement, nous optimiserons les stabilités intrinsèques des dimères vis-à-vis de stimuli extérieurs via l'utilisation de chimies de surface amphiphiles. Cette introduction d'hydrophobie dans la chimie de surface permet une stabilité compatible avec des conditions physiologiques [24] pour exploiter ces nanostructures comme agents de contrastes intelligents (sensibles à leur environnement) en diffusion ou en photothermie.

Ce manuscrit est construit en 6 chapitres. Le premier est consacré aux aspects théoriques qui régissent les phénomènes physiques et physico-chimiques impliqués dans la synthèse, la stabilité et les propriétés optiques des assemblages de nanoparticules d'or. Nous verrons pourquoi le fait d'assembler des nanoparticules exalte leurs propriétés optiques comparativement à une particule seule. Nous expliquerons comment la chimie de surface contrôle les propriétés de stabilité des nanoparticules. Enfin, nous montrerons comment l'assemblage de particules par de l'ADN dynamique peut les transformer en biocapteurs optiques à l'échelle de la molécule unique.

Nous démontrerons dans le deuxième chapitre que l'ouverture et la fermeture d'une tige-boucle d'ADN dans un dimère de particules d'or de 8 nm de diamètre permet de modifier réversiblement la distance interparticule. Pour cela, nous étudierons la synthèse contrôlée et purifiée de dimères par électrophorèse, et dont la caractérisation se fait par microscopie cryogénique électronique.

Dans le troisième chapitre, nous détaillerons les méthodes de synthèse par électrophorèse de dimères dont la section efficace de diffusion est suffisamment importante pour fournir un signal optique mesurable, traduisant des changements morphologiques au sein de la nanostructure. Nous étudierons plusieurs chimies de surface différentes, notamment à base de ligands poly(éthylène) glycol ainsi que de ligands amphiphiles alkyl-poly(éthylène) glycol.

Le quatrième chapitre sera consacré à la caractérisation optique des nanostructures ouvertes et fermées, en chambre microfluidique, à l'aide d'un microscope optique à champ sombre. L'étude de ces structures sera effectuée à la fois par spectroscopie de diffusion sur objets uniques et par l'analyse d'images obtenues à l'aide d'une caméra CCD couleur. Cela permettra d'observer des comportements de sous-populations différentes avec des dimères morphologiquement libres ou contraints. Nous effectuerons par ailleurs une caractérisation plein champ parallèle de la taille et de l'orientation de dimères. Nous nous intéresserons aussi à la dépendance de la stabilité des dimères vis-à-vis de la force ionique afin de déterminer un protocole d'ouverture et de fermeture de la tige-boucle efficace.

Dans le cinquième chapitre, nous porterons notre attention sur l'optimisation de la sta-

bilité des dimères vis-à-vis de la force ionique. Nous étudierons ainsi les variations morphologiques de dimères possédant différentes chimies de surface, ce qui nous permettra de déterminer les paramètres influant sur la stabilité de nanostructures auto-assemblées.

Finalement, le sixième chapitre introduira deux études préliminaires. En effet, après avoir étudié l'influence de la force ionique sur les propriétés de stabilité des dimères, nous nous focaliserons sur l'effet de la température dans le cas de dimères de particules plus larges, pour leur utilisation potentielle en tant qu'agents de contraste photothermiques non-linéaires. La dernière étude concernera des événements transitoires observés dans diverses expériences réalisées au cours de cette thèse, portant sur le clignotement du signal optique du dimère.

Propriétés physico-chimiques des groupements de nanoparticules d'or auto-assemblés

Table des matières

1.1	Repères historiques	3
1.1.1	Les origines des nanotechnologies	3
1.1.2	A travers les nanoparticules d'or	4
1.1.3	Contexte actuel	5
1.2	Propriétés physiques des nanoparticules d'or	6
1.2.1	Propriétés physiques de l'or massif	6
	Propriétés électroniques de l'or massif	6
	Propriétés optiques de l'or massif	7
1.2.2	Résonance plasmon de surface de nanoparticules	9
	Absorption et diffusion de particules résonantes	9
1.2.3	Approximation quasi-statique	10
	Conditions de résonance	11
1.2.4	Approximation dipolaire	12
1.2.5	Limites de l'approximation dipolaire précédente	13
	Constante diélectrique du métal	13
	Forme des particules	13
	Taille des particules	14
1.3	Propriétés optiques d'un dimère de nanoparticules	14
1.3.1	Discussion quasi-statique et dipolaire	14
1.3.2	Limites de l'approximation quasi-statique dipolaire	16
	<i>Plasmon ruler</i> - une loi d'échelle universelle?	17
1.4	De la nanoparticule à la suspension colloïdale	18
1.4.1	Suspension colloïdale	19
1.4.2	Forces entre objets supramoléculaires	19

	Forces de van der Waals entre deux nanoparticules	19
	Forces répulsives : Double couche électrique	20
1.4.3	Énergie d'interaction - Théorie DLVO	21
1.4.4	Stabilisation d'une suspension colloïdale de nanoparticules métalliques	22
1.4.5	Chimie de surface des nanoparticules d'or	22
1.5	De la nanoparticule à un auto-assemblage programmé	24
1.5.1	Nanotechnologie ADN	24
	Rappel sur la structure de l'ADN	24
	Origami	25
1.5.2	Le choix de l'ADN comme matériau dynamique	25
1.5.3	Structures dynamiques - Balises moléculaires	26
1.5.4	Les assemblages or-ADN	26
1.6	Biocapteurs optiques	27
1.6.1	LSPR : résonance surface plasmon localisée	27
1.6.2	Capteurs colorimétriques	29
1.7	Objectifs de la thèse	30
1.7.1	État de l'art	30
	Plasmon ruler Au-ADN	31
	Détection de biomolécules	32
1.7.2	Ce manuscrit	34

L'objectif de cette thèse est de fabriquer une structure nanométrique capable de fournir une information optique sensible à son environnement chimique. Pour répondre à cette problématique, nous désirons utiliser des auto-assemblages de nanoparticules d'or liées par des brins d'ADN.

Ce premier chapitre servira donc à comprendre comment ces structures peuvent répondre à la problématique initiale. Nous verrons, après une brève introduction sur l'histoire des nanoparticules d'or, que celles-ci possèdent des propriétés optiques remarquables, aisément mesurables et sensibles à l'environnement, grâce à leur résonance plasmon de surface. Notamment, nous discuterons des modifications de ces propriétés optiques dues au couplage plasmon lorsque des particules sont proches l'une de l'autre.

Afin de concevoir l'assemblage de nanoparticules, nous étudierons les propriétés physico-chimiques des particules en suspension avant de montrer comment l'ADN synthétique permet de programmer leur auto-assemblage. Nous terminerons par un état de l'art des biocapteurs optiques et nous intéresserons plus particulièrement à l'utilisation de dimères dynamiques, c'est-à-dire dont la distance interparticule est modulable.

1.1 Repères historiques

Ce paragraphe consiste en un bref historique des nanotechnologies, en particulier des nanoparticules d'or, qui nous permettra de comprendre comment elles sont devenues incontournables dans les sciences d'aujourd'hui.

1.1.1 Les origines des nanotechnologies

Bien que la première utilisation du terme "nanotechnologie" par le scientifique Japonais Norio Taniguchi ne date que de 1974, leur conceptualisation est en réalité plus ancienne. Elle est généralement attribuée au discours de Richard Feynman datant de plus de cinquante ans, "*there's plenty of room at the bottom*". Il y décrit l'idéologie selon laquelle il serait possible de contrôler la matière à l'échelle moléculaire et de concevoir des robots microscopiques en utilisant des techniques d'assemblages. Il est d'ailleurs amusant de noter que son discours n'eut aucune influence pendant presque trente ans après sa première publication [25].

On attribue également le développement des nanotechnologies à l'invention d'instruments permettant d'observer et d'interagir avec la matière à l'échelle de l'atome, tels que le microscope à effet tunnel (1981) et le microscope à force atomique (1985), mais c'est réduire les nanosciences à leur échelle spatiale la plus basse. En effet, les nanoparticules sont définies comme des particules dont au moins une dimension est inférieure à 100 nm ;

leur étude est ainsi bien plus ancienne. Dans le cadre de cette définition, l'invention de l'ultramicroscopie à immersion en 1912 par Richard Zsigmondy (1865-1929), Prix Nobel en 1925, peut aussi être définie comme la naissance des nanotechnologies [26].

1.1.2 A travers les nanoparticules d'or

Pendant l'antiquité, vers le 4^{ième} ou 5^{ième} siècle de notre ère, l'or colloïdal était utilisé pour produire du rubis doré (figure 1.1a) et pour la coloration de la céramique. L'exemple le plus célèbre est la coupe de Lycurgue datant du 4^{ième} siècle, qui se trouve actuellement au British Museum de Londres [27]. La coupe apparaît vert-pâle en lumière réfléchiée (figure 1.1b) et rouge vif en lumière transmise (figure 1.1c). Cet effet est dû à des colloïdes d'un alliage or-argent emprisonné dans la matrice de verre.

Il ne reste aucune description du procédé de fabrication utilisé dans l'empire romain [26] et il a ainsi fallu attendre plus de 12 siècles avant de retrouver des publications du docteur Italien Francisci Antonii (1618) décrivant la synthèse d'or colloïdal [28].

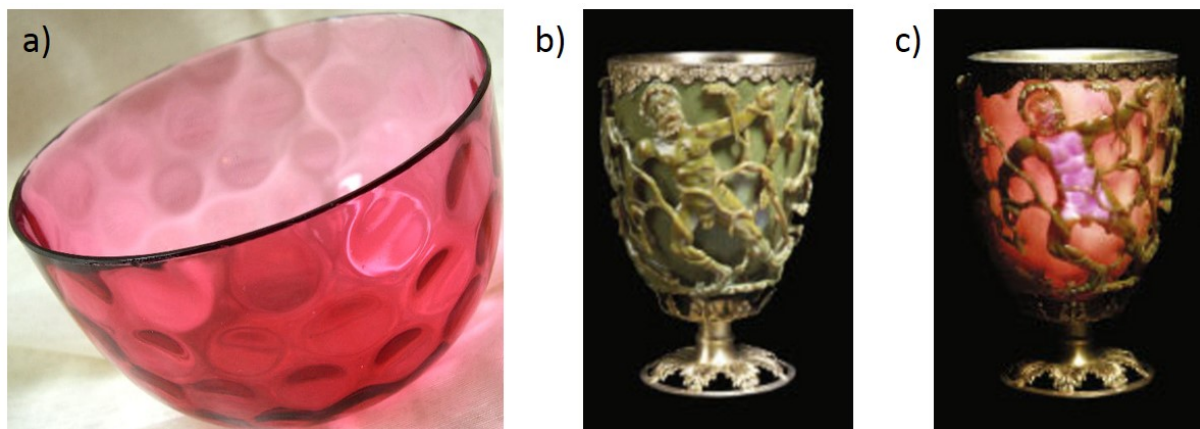


Figure 1.1 – a) Photographie d'un rubis doré (source : Wikipédia). Coupe de Lycurgue de couleur apparente verte en lumière réfléchiée (b) et rouge en lumière transmise (c) (source : The Trustees of the British Museum).

Cependant, c'est réellement la préparation du "pourpre de Cassius" par Andreas Cassius (1605-1673) qui rendit l'or colloïdal populaire au 17^{ième} siècle [26]. Il était largement utilisé comme pigment dans l'émail (couche de protection en céramique) et dans les fabriques de soie.

En 1857, soit 200 ans après, Michael Faraday (1791–1867) décrivit la formation de solutions rouges intenses d'or colloïdal par la réduction d'acide chloraurique avec du phosphore dans du CS₂ et attribua la couleur obtenue à la taille des particules métalliques. Il utilisa un microscope à projection pour démontrer le changement de couleur du fluide en bleu lorsque la solution était mélangée avec du sel. Sans pouvoir expliquer complètement ce phénomène, il l'attribua à une simple variation de la taille des particules. De plus, sans aucune connaissance de leur taille, il supposa que les ondes lumineuses étaient grandes en comparaison avec la dimension des particules [26]. Pour ces raisons, certains attribuent à sa conférence de 1857 la naissance des nanotechnologies modernes [29].

Il fallut presque un demi-siècle pour que le chimiste Richard Zsigmondy et le physicien

Henry Siedentopf (1872-1940) puissent déterminer la taille de l'or colloïdal grâce à leur invention, l'ultramicroscope, basée sur la diffusion lumineuse des particules. L'intérêt pour l'or colloïdal au début de 20^{ième} siècle était alors très important. Entre autres, Gustav Mie (1869-1957) fournit une explication théorique de sa couleur, Schulze et Hardy étudièrent sa stabilité en présence d'ions, Albert Einstein (1879-1955) développa une théorie concernant son mouvement brownien et Marian Smoluchowski (1872-1917) formula une théorie concernant ses processus de coagulation.

L'invention de l'ultramicroscope permit à Jean-Baptiste Perrin (1870-1942) de suivre le mouvement des nanoparticules, ce qui confirma expérimentalement l'existence des atomes et valida les prédictions d'Einstein et de Smoluchowski. Vingt ans après, Ernst Ruska (1906-1988) et Max Knoll (1897-1969) introduisirent le premier microscope à transmission électronique. Bien qu'ils n'étudiaient pas de milieu liquide, la résolution fut vite poussée jusqu'à une dizaine de nanomètres. Plus tard, les progrès de cette technologie permirent à Turkevich et al. d'établir que les suspensions fabriquées par Faraday étaient constituées de particules d'or de 6 ± 2 nm [30, 31].

1.1.3 Contexte actuel

Depuis plus d'un siècle, grâce aux premières études sur les suspensions colloïdales d'or, nous savons que les nanocristaux possèdent des propriétés distinctes du matériau massif.

Bien que l'on connaisse l'origine de ces différences, la possibilité d'obtenir des propriétés physiques complètement différentes avec un même matériau demeure néanmoins remarquable. La fabrication de nanostructures aux propriétés particulières peut se faire selon deux approches différentes qui ont permis le développement de deux techniques fondamentales :

- Premièrement, il est possible de contrôler et obtenir très précisément les propriétés physiques désirées d'un système en sculptant la matière à l'échelle du nanomètre. En effet, les propriétés intrinsèques des nanoparticules métalliques sont principalement dépendantes de leur taille, leur forme, leur composition, leur cristallinité et leur structure. Il est donc possible, en principe, de faire varier chacun de ces paramètres pour maîtriser précisément les propriétés de ces nanoparticules. Cette approche a permis le développement de la fabrication *top-down*, telle que dans la photolithographie, qui fait référence à la manipulation microscopique d'un petit nombre d'atomes pour modeler des formes élégantes.
- Deuxièmement, si l'état intermédiaire entre l'atome isolé et le matériau massif permet d'accéder à des propriétés physiques nouvelles, l'assemblage contrôlé de nanoparticules permet d'accroître cette gamme de propriétés physiques. De plus, un arrangement organisé de nanoparticules possède des propriétés propres à l'arrangement, qu'une particule unique ne peut avoir, peu importe sa taille et sa forme [32].

L'étude, la fabrication et la caractérisation de ces assemblages de petites particules métalliques datent d'une trentaine d'années [33–37]. Cette approche a permis le développement de la fabrication *bottom-up* qui fait référence à de l'auto-assemblage de blocs de construction de manière parallèle, selon leurs propriétés de reconnaissance. Dans cette optique, l'ADN apparaît comme le bloc de construction idéal pour la conception de nanostructures auto-assemblées [38, 39].

Alors que la communauté scientifique s'était initialement concentrée sur l'assemblage de cristaux macroscopiques denses par agrégation ou coalescence contrôlée (tels que dans les tests de grosseur [40]), des méthodes d'assemblage contrôlé de petits groupements de nanoparticules se sont ensuite développées [18]. En particulier, dans le cas des nanosphères, du fait de leur symétrie et donc de la réactivité uniforme de leur surface, la synthèse d'assemblage contrôlé était un challenge significatif.

En conclusion, l'ingénierie de matériaux et de structures à l'échelle du nanomètre offre de plus grandes possibilités en électronique et en optique que l'ingénierie de molécules seules ou de solides macroscopiques [41, 42]. Si les techniques de fabrication *top-down* étaient auparavant très en avance dans le domaine des nanotechnologies, elles atteignent désormais leur limite physique. Les techniques de fabrication *bottom-up* sont censées permettre de dépasser cette limite, bien qu'elles ne soient pas encore aussi performantes. Un des buts essentiels des nanotechnologies est donc de développer des méthodes permettant de synthétiser et d'assembler des blocs de construction, tels que des particules métalliques et plus largement des particules magnétiques et des boîtes quantiques, à l'échelle nanométrique.

1.2 Propriétés physiques des nanoparticules d'or

Dans ce chapitre, nous allons décrire l'origine des propriétés optiques des nanoparticules d'or pour comprendre comment elles peuvent servir à traduire une information locale en une mesure optique. Nous commencerons par rappeler les propriétés électroniques puis optiques des métaux massifs. Ensuite, nous analyserons les effets du confinement diélectrique sur ces propriétés. Pour cela, nous décrirons la réponse optique d'une nanosphère excitée par une onde plane électromagnétique, dans le cadre de l'approximation dipolaire.

Cela nous permettra d'introduire le phénomène de résonance de plasmon de surface. Nous pourrions alors étudier les propriétés de diffusion et d'absorption de nanoparticules et comprendre comment se manifestent les effets liés à leur taille, leur forme et leur environnement diélectrique. Nous terminerons ce chapitre par un rappel de quelques outils théoriques plus généraux (comme la théorie de Mie), pouvant être utilisés pour décrire de façon exacte les propriétés optiques d'une nanoparticule sphérique située au sein d'un milieu linéaire, homogène et isotrope.

1.2.1 Propriétés physiques de l'or massif

Propriétés électroniques de l'or massif

L'or fait partie, avec l'argent et le platine, de la catégorie des métaux nobles, qui sont par définition résistants à la corrosion ainsi qu'à l'oxydation. Sa configuration électronique, $[\text{Xe}] 4f^{14}5d^{10}6s^1$, indique que son orbitale 5d est complètement remplie et que son orbitale 6s ne comporte qu'un seul électron. Dans le cas du métal massif (*bulk* en anglais), les électrons dans l'orbitale 6s constituent un gaz d'électrons délocalisé dans le réseau cristallin, définissant la bande de conduction du métal. Par ailleurs, les métaux nobles se

distinguent des métaux alcalins par le fait que la première bande de valence (électrons d) est peu éloignée de la bande de conduction sp (hybridation des bandes s et p), comme schématisé sur la figure 1.2.

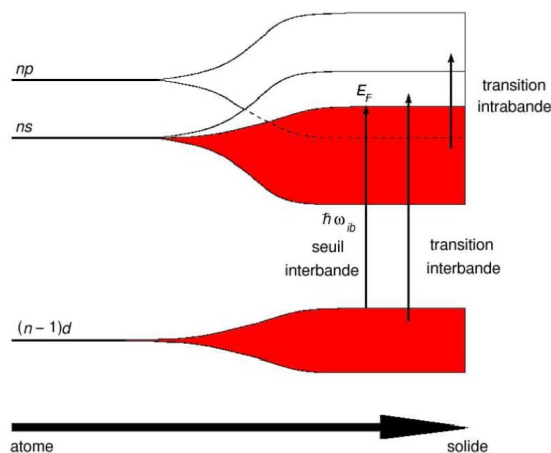


Figure 1.2 – Schéma de l'évolution des structures de bandes de l'or entre l'atome (à gauche) et le matériau solide (à droite).

Propriétés optiques de l'or massif

La réponse optique d'un métal est déterminée par sa constante diélectrique $\epsilon(\omega) = \tilde{n}^2(\omega)$ où $\tilde{n}(\omega)$ est l'indice optique complexe. En pratique, lors de l'interaction entre les photons incidents, d'énergie $\hbar\omega$, et les électrons de l'or, deux types de transition sont possibles : la transition intrabande et la transition interbande, décrites ci-après. La constante diélectrique d'un métal peut alors s'écrire :

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_{intra}(\omega) + \epsilon_{inter}(\omega) - 1 \quad \text{ou bien} \quad \chi(\omega) = \chi_{intra}(\omega) + \chi_{inter}(\omega)$$

où χ est la susceptibilité diélectrique du métal.

Les transitions interbandes. Elles correspondent aux transitions électroniques de la bande de valence vers la bande de conduction. Pour que cette transition soit possible, il faut que le photon incident ait une énergie supérieure à une valeur seuil ($E_{ib} = \hbar\omega_{ib}$ sur la figure 1.2), située dans le visible pour l'or. L'expression de $\chi_{inter}(\omega)$ est relativement complexe et consultable dans la référence [43]. Concrètement, ces transitions ont un effet observable sur la partie imaginaire de la fonction diélectrique. Il y a ainsi un accroissement de l'absorption de photons au-delà du seuil de transition.

Les transitions intrabandes. Elles correspondent aux transitions des électrons se trouvant dans la bande de conduction vers un niveau électronique supérieur dans cette même bande. Le modèle de Drude, décrit en 1900, permet de déterminer la constante diélectrique intrabande ϵ_{intra} , en considérant un modèle d'électrons quasi-libres, de masses effectives m_{eff} . Ceux-ci subissent des collisions aléatoires avec d'autres particules (telles

que les électrons, phonons et ions du réseau), collisions qui sont instantanées et accompagnées d'un changement brutal des vitesses. Cela permet de modéliser l'effet moyen par une force de frottement de coefficient d'amortissement $\gamma = 1/\tau$ (aussi appelé taux de collision). Finalement, le calcul de la polarisation du gaz d'électrons par le champ incident permet d'obtenir la valeur de la constante diélectrique intrabande :

$$\epsilon_{intra}(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i\gamma)}$$

où $\omega_p = \sqrt{\frac{ne^2}{m_{eff}\epsilon_0}}$ est appelée pulsation de plasmon de volume ou pulsation de Drude du solide massif.

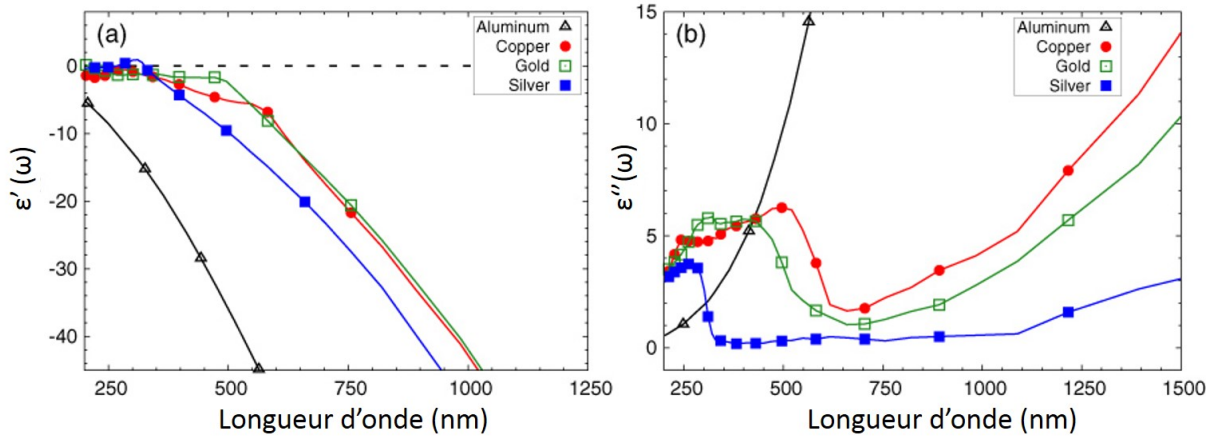


Figure 1.3 – Partie réelle (a) et partie imaginaire (b) de la constante diélectrique pour 4 métaux nobles, en fonction de la longueur d'onde.

Constante diélectrique expérimentale. En prenant en compte les deux transitions, on obtient la constante diélectrique du métal qui s'écrit :

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_{inter}(\omega) - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i\gamma)}$$

La figure 1.3 décrit l'évolution des parties réelle et imaginaire de ϵ (respectivement $\epsilon'(\omega)$ et $\epsilon''(\omega)$) pour une gamme de longueurs d'onde légèrement plus large que celle du domaine optique. On remarque que $\epsilon'(\omega)$ est négative dans cette gamme de longueurs d'onde et décroît quand la longueur d'onde augmente, comme attendu dans le modèle de Drude. L'indice de réfraction $\tilde{n} = \sqrt{\epsilon(\omega)}$ exhibe une forte composante imaginaire. La pénétration dans le métal est donc limitée à l'épaisseur de peau d_{peau} , qui vaut 21,7 nm pour l'or excité à 500 nm, expliquant la forte diffusion et la réflectivité des métaux massifs dans le visible, ainsi que leur transparence dans l'UV.

Dans le cas de $\epsilon''(\omega)$, on constate une augmentation globale avec la longueur d'onde prédite par le modèle de Drude. L'épaule observé vers 375 nm pour l'or correspond à la contribution interbande et explique sa couleur jaune.

1.2.2 Résonance plasmon de surface de nanoparticules

Ayant décrit les propriétés optiques des métaux nobles massifs, nous allons à présent étudier leur évolution lorsque l'on diminue l'échelle jusqu'au nanomètre avec l'apparition du phénomène de résonance plasmon de surface.

Absorption et diffusion de particules résonantes

Lorsque le diamètre de la nanoparticule est inférieur à la longueur d'onde d'excitation, la polarisation du nuage électronique permet d'obtenir un système de charges oscillantes de taille sub-longueur d'onde, comme schématisé sur la figure 1.4.

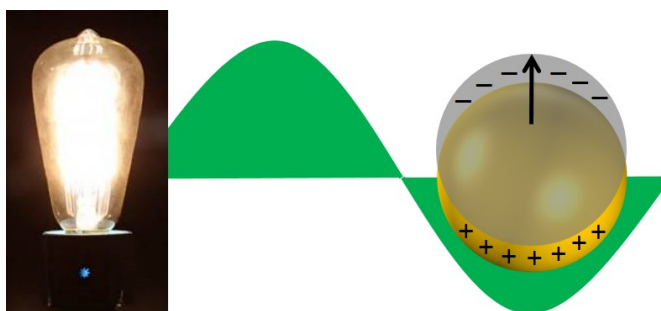


Figure 1.4 – Schéma du déplacement du nuage d'électrons de conduction d'une nanosphère d'or.

Le couplage est résonant lorsque la fréquence de l'onde électromagnétique s'accorde avec la fréquence propre des oscillations du gaz d'électrons autour de la carcasse ionique positive. Cette résonance, appelée plasmon de surface localisé, crée une amplification de l'absorption et de la diffusion de la particule, comme schématisé sur la figure 1.5.

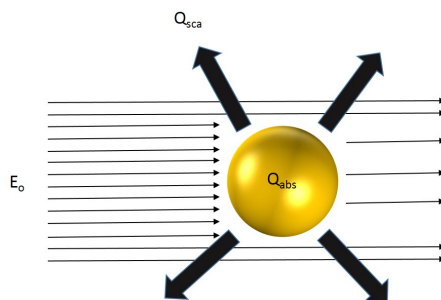


Figure 1.5 – Schéma représentant les notions d'extinction, de diffusion et d'absorption d'une nanoparticule d'or.

Ces deux phénomènes (absorption et diffusion) associés définissent l'extinction, c'est-à-dire la diminution du flux de photons pour une onde plane incidente, dans sa direction de propagation. Ces trois paramètres peuvent chacun être décrits par leur section efficace correspondante, et ces dernières sont bien entendu dépendantes de la fréquence de l'onde incidente :

$$C_{ext} = C_{abs} + C_{sca}$$

Pour des nanoparticules métalliques, du fait de la résonance plasmon, le ratio entre la diffusion et l'absorption varie drastiquement avec la taille des particules comme nous le verrons ci-dessous.

1.2.3 Approximation quasi-statique

Pour comprendre l'origine des plasmons de surface, nous allons considérer dans un premier temps le cas d'une sphère dont le diamètre est très petit devant la longueur d'onde d'excitation. Considérer la longueur d'onde infiniment plus grande que la taille de la particule permet de faire tendre la fréquence incidente vers 0 et donc de considérer un problème électrostatique (approximation quasi-statique). Le problème traité est donc celui d'une sphère soumise à un champ uniforme \vec{E}_0 , comme représenté sur la figure 1.6, qui se résout par une équation de Laplace pour le potentiel $\Delta V = 0$.

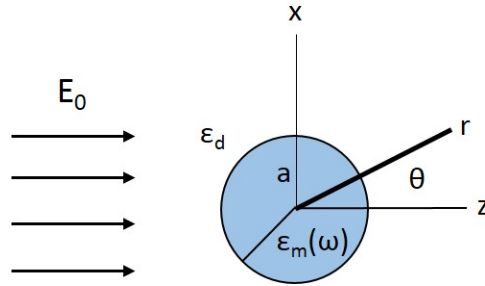


Figure 1.6 – Représentation d'une sphère métallique soumise à un champ électrostatique uniforme.

Les charges induites à la surface de la sphère par le champ appliqué agissent comme un moment dipolaire à l'intérieur de la sphère. Le champ extérieur total est donc la somme du champ appliqué \vec{E}_0 et du champ créé par la sphère polarisée qui se comporte comme un dipôle placé au centre, de moment $\vec{m}_{sphere} = \epsilon_0 \epsilon_d \alpha_0 \vec{E}_0$.

La résolution du problème conduit à :

$$\alpha_0 = 3V \frac{\epsilon_m - \epsilon_d}{\epsilon_m + 2\epsilon_d}$$

avec $V = \frac{4}{3}\pi a^3$ le volume de la sphère.

Nous allons désormais supposer que nous pouvons remplacer la sphère par un dipôle de moment $\epsilon_0 \epsilon_d \alpha_0(\omega) \vec{E}_0$, même lorsque le champ appliqué est une onde plane oscillante. Les permittivités dans les nouvelles équations sont celles correspondant à la fréquence de l'onde incidente, et non plus celles du champ statique :

$$\alpha_0(\omega) = 3V \frac{\epsilon_m(\omega) - \epsilon_d(\omega)}{\epsilon_m(\omega) + 2\epsilon_d(\omega)}$$

Dans l'approximation quasi-statique, l'hypothèse d'une longueur d'onde infinie suppose que la section efficace de diffusion est nulle et donc que la section efficace d'extinction s'écrit [44] :

$$C_{ext} = C_{abs} = k \text{Im}(\alpha_0(\omega)) = 3kV \text{Im} \left(\frac{\epsilon_m(\omega) - \epsilon_d(\omega)}{\epsilon_m(\omega) + 2\epsilon_d(\omega)} \right)$$

On voit qu'il est possible, sous certaines conditions, d'annuler le dénominateur avec une constante diélectrique négative comme celles des métaux nobles de la figure 1.3. Cette divergence de la polarisabilité, qui se traduit par une divergence de la section efficace

d'extinction, est à l'origine de la résonance plasmon de surface des particules de métaux nobles. Comme les parties imaginaires des constantes diélectriques des métaux nobles sont non nulles, cette divergence est amortie par des pertes ohmiques comme nous le verrons ci-dessous.

Conditions de résonance

En supposant que ϵ_d est constante et réelle et en écrivant $\epsilon_m = \epsilon'_m + i\epsilon''_m$, on trouve :

$$C_{abs} = 9kV \frac{\epsilon_d \epsilon''_m}{(\epsilon'_m + 2\epsilon_d)^2 + \epsilon''_m{}^2}$$

Pour qu'il y ait résonance des plasmons de surface, c'est-à-dire le cas où $\omega = \omega_{RPS}$, il faut que $(\epsilon'_m + 2\epsilon_d)^2 + \epsilon''_m{}^2$ soit nul (ou minimal). Il est donc nécessaire que la partie imaginaire de la permittivité de la particule soit nulle ou très faiblement dispersée en fonction de la longueur d'onde. La relation précédente se traduit par :

$$\epsilon'_m \approx -2\epsilon_d < 0 \quad \text{et} \quad \epsilon''_m \approx cte$$

La fréquence particulière à laquelle : $\epsilon_m = -2\epsilon_d$ et $\epsilon''_m = 0$ est appelée fréquence de Frölich [44].

On peut extraire des équations précédentes la fréquence de résonance d'une nanosphère en fonction de différents paramètres. Pour cela, il suffit de chercher le minimum de la fonction $(\epsilon'_m + 2\epsilon_d)^2 + \epsilon''_m{}^2$. On trouve, en remplaçant par la fonction diélectrique du métal massif :

$$\omega_{RPS} = \frac{\omega_p}{\sqrt{\epsilon'_{inter}(\omega_p) + 2\epsilon_d}}$$

A partir de cette équation, on peut retrouver la section efficace d'absorption sous la forme :

$$C_{abs} \propto \frac{\gamma}{4(\omega - \omega_{RPS})^2 + \gamma^2}$$

qui définit une lorentzienne. On remarque également que la position de la résonance est, dans cette approximation, indépendante de la taille de la particule. Ceci est effectivement vrai pour des particules de diamètre inférieur à 20 nm, mais un décalage spectral vers le rouge est observé pour des particules plus grandes [45–47].

De plus, on remarque que la résonance plasmon est dépendante de la constante diélectrique du milieu environnant de la particule. Ainsi, tous les paramètres augmentant la polarisabilité du milieu extérieur entourant la particule, comme une coque de diélectrique [48] ou la présence d'autres particules [49, 50], décalent la résonance vers les énergies faibles, c'est-à-dire vers le rouge dans le spectre visible. Cette propriété est à la base des capteurs LSPR que nous détaillerons plus loin dans ce chapitre.

Finalement, la nature du matériau influence également de façon importante la résonance plasmon et bien que l'or et l'argent soient les métaux les plus courants [51, 52], d'autres matériaux comme le cuivre [53] ou l'aluminium [54] sont également utilisés.

1.2.4 Approximation dipolaire

La section efficace d'extinction déterminée dans l'approximation quasi-statique ne prend pas en compte l'amortissement radiatif venant de la diffusion lumineuse. Afin de ne pas violer la loi de conservation de l'énergie et de prendre en compte les effets retards, il est nécessaire d'introduire dans l'approximation quasi-statique l'amortissement radiatif (induisant une dépolarisation dynamique), ce qui conduit à la polarisabilité corrigée α suivante, avec k le nombre d'onde [55] :

$$\alpha(\omega) = \frac{\alpha_0(\omega)}{1 - ik^3 \frac{\alpha_0(\omega)}{6\pi}}$$

On parle alors d'approximation dipolaire. On observe que dans ce cas, la condition de résonance de la polarisabilité dépend de la taille de la particule. Ceci explique que la résonance de la particule se décale vers le rouge quand sa taille augmente. De plus, cette dépolarisation dynamique amortit davantage la résonance plasmon et l'élargit spectralement.

Avec cette correction, il est possible de définir une section efficace de diffusion par :

$$C_{sca} = |\alpha|^2 \frac{k^4}{6\pi}$$

Les sections efficaces valent alors :

$$C_{ext} = kIm(\alpha) = k|\alpha|^2 \left[\frac{k^3}{6\pi} + \frac{Im(\alpha_0)}{|\alpha_0|^2} \right] \geq |\alpha|^2 \frac{k^4}{6\pi} = C_{sca}$$

La loi de conservation de l'énergie est effectivement respectée.

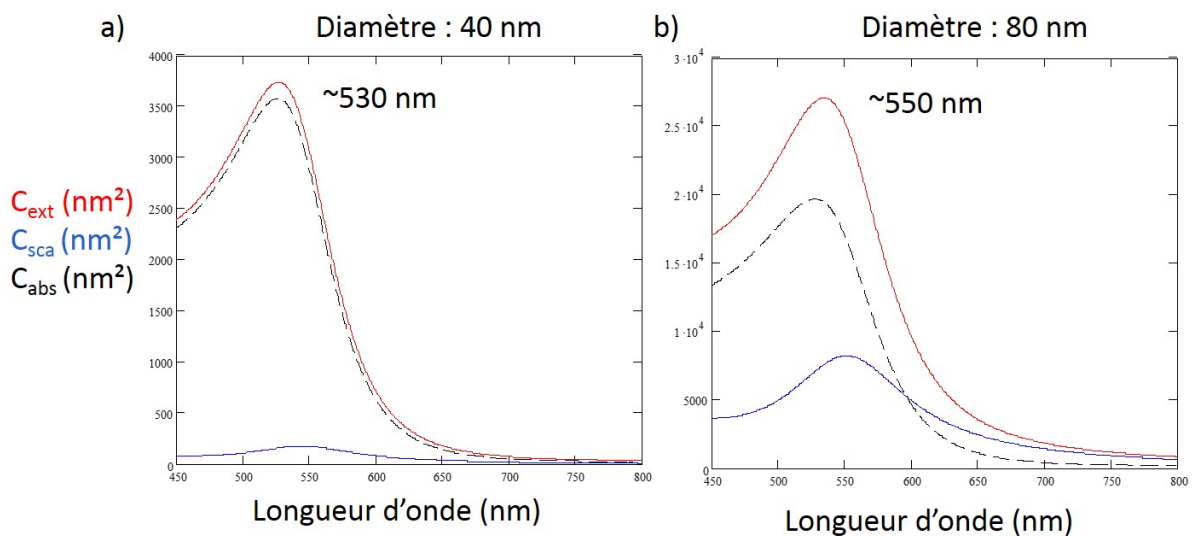


Figure 1.7 – Sections efficaces d'extinction (en rouge), de diffusion (en bleu) et d'absorption (en noir) pour des particules de 40 nm (a) ou 80 nm (b) de diamètre, calculées dans l'approximation dipolaire.

En négligeant la dépolarisation dynamique, on observe que les sections efficaces C_{sca} et C_{abs} varient en a^6 et a^3 , respectivement. En effectuant le rapport des sections efficaces de diffusion et d'extinction, on montre que, pour une même nanoparticule, celui-ci est proportionnel au volume V de la particule :

$$\frac{C_{sca}}{C_{ext}} \propto \frac{V}{\lambda^3} \propto \left(\frac{a}{\lambda}\right)^3$$

Ainsi, pour des particules telles que $a \ll \lambda$, l'extinction est largement dominée par l'absorption, comme montré sur la figure 1.7a. A l'inverse, les particules larges diffusent plus efficacement la lumière (figure 1.7b).

On remarque également que la résonance associée à la diffusion est décalée vers le rouge par rapport à celle de l'absorption, pour les deux tailles de particule. Ceci est dû aux transitions interbandes dans l'UV qui dominent l'absorption. L'approximation dipolaire est valable, dans l'eau ou dans l'air, pour des particules d'or de diamètre inférieur à 80 nm environ.

1.2.5 Limites de l'approximation dipolaire précédente

Constante diélectrique du métal

Lorsque la taille de la particule est de l'ordre de grandeur ou plus petite que le libre parcours moyen des électrons de conduction dans le métal considéré, les interactions de ces électrons avec la surface deviennent importantes. Il n'est alors plus possible de considérer la constante diélectrique du métal massif pour ces très petites nanoparticules. En effet, la fonction diélectrique dépend alors du rayon de la particule et un modèle phénoménologique introduisant un amortissement additionnel $\gamma_{surface} \propto 1/a$ peut être utilisé pour prendre en compte ce confinement quantique [56–61].

Forme des particules

Lorsque les particules ne sont plus sphériques, le confinement et le déplacement des électrons de conduction sont naturellement modifiés. Suivant la géométrie de la particule, à chaque mode d'oscillation des électrons de surface correspond une fréquence de résonance. Par conséquent, le passage d'une symétrie sphérique à une structure de même volume plus complexe, entraîne une modification de la fréquence de résonance [62]. Dans le cas d'une ellipsoïde de révolution, la résonance se décale vers le bleu pour une polarisation des électrons selon le petit axe, et vers le rouge selon le grand axe.

Il est toutefois possible d'utiliser l'approximation dipolaire en modifiant la polarisabilité quasi-statique α_0 pour prendre en compte la forme de la particule. Dans le cas de cette étude, la non-sphéricité des particules entraîne une distribution inhomogène des résonances plasmons de particules d'or de volumes identiques.

Taille des particules

Lorsque la taille des particules augmente, la forme et la distribution des charges à la surface deviennent plus complexes et on ne peut plus considérer le champ électrique excitateur comme étant constant au sein de la particule. L'approximation dipolaire n'est plus valable et il est donc nécessaire de prendre en compte les résonances multipolaires.

La solution rigoureuse de la diffusion d'une onde électromagnétique par une sphère dans un milieu homogène a été proposée par Gustave Mie en 1908. La méthode utilisée est la résolution des équations de Maxwell, en coordonnées sphériques, avec des conditions aux limites appropriées et en utilisant un développement multipolaire, indexé avec l'indice n , des champs électrique et magnétique incidents.

La théorie est valable quelle que soit la taille de la particule, et plus le diamètre est grand, plus le nombre de modes nécessaires pour décrire le champ est important. Par exemple, l'ordre 1 correspond au mode dipolaire et l'ordre 2 correspond à un mode quadrupolaire. La théorie de Mie permet de déterminer les sections efficaces d'extinction et de diffusion par une sphère. La section efficace d'absorption peut donc se déduire aisément. Le formalisme des calculs est donné par la référence [44].

Toutefois, cette théorie n'est valable que pour des environnements diélectriques homogènes et des particules sphériques. Il n'est pas possible de l'utiliser en présence de substrat ou de particules de forme quelconque. Il faut alors résoudre numériquement les équations de Maxwell. Ces méthodes numériques peuvent se classer selon deux catégories :

- les méthodes temporelles dont la méthode des différences finies dans le domaine temporel (FDTD) qui consiste à discrétiser les équations de Maxwell dans l'espace et le temps, avec des limites convenablement choisies [63],
- les méthodes monochromatiques bi- ou tridimensionnelles comme les méthodes d'éléments finis ou l'approximation dipolaire discrète (DDA) [64].

1.3 Propriétés optiques d'un dimère de nanoparticules

Nous allons détailler dans cette partie le couplage électromagnétique entre plusieurs nanoparticules métalliques. Nous montrerons que la très forte dépendance du couplage plasmon vis-à-vis de la distance interparticule permet de comprendre l'intérêt des systèmes couplés pour traduire une information de distance nanométrique en un signal optique intense.

1.3.1 Discussion quasi-statique et dipolaire

Comment comprendre le phénomène de couplage plasmon ? Nous avons vu que l'excitation d'une nanoparticule par un champ électromagnétique oscillant entraînait un déplacement de charges dans la particule. La distribution de charges oscillantes crée elle-même des champs électromagnétiques dépendant du temps, qui peuvent agir sur les électrons

de conduction de particules proches. Ces champs peuvent également affecter les électrons de conduction de la particule initiale. En sommant toutes ces interactions électromagnétiques de 'champ proche', les oscillations dans les particules individuelles ne sont plus indépendantes mais couplées.

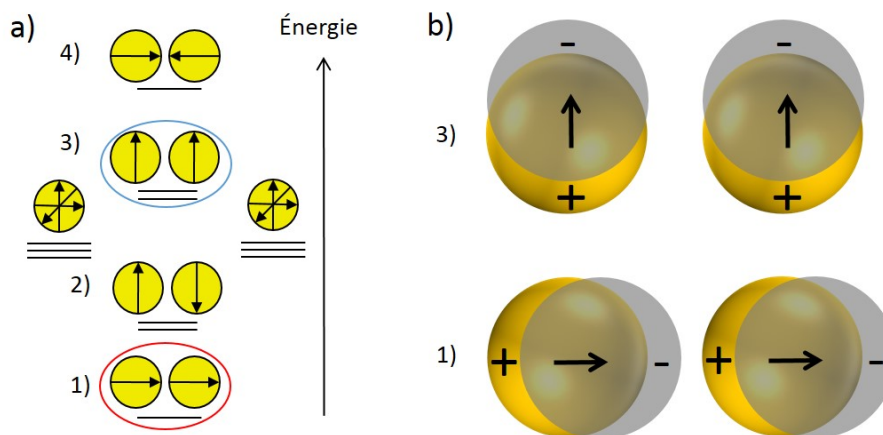


Figure 1.8 – a) Représentation orbitale des modes du couplage plasmon dans l'approximation dipolaire. b) Distribution des charges électroniques dans le cas des modes brillants longitudinal (1) et transverses (3).

Analogie orbitale. Dans le cadre d'une approximation quasi-statique dipolaire, nous pouvons traiter chacune des particules comme un dipôle et expliquer les phénomènes principaux liés au couplage plasmon [12] sans avoir à les calculer quantitativement. Dans cette approximation, il est possible de simplifier les équations de Maxwell au cas de champs scalaires et leur résolution revient aux solutions de l'équation de Schrödinger. C'est pourquoi le couplage des dipôles induits dans les particules est analogue à l'interaction de deux orbitales p : on parle alors de "modèle d'hybridation" qui peut être schématisé comme sur la figure 1.8a [65].

On observe que, dans cette représentation, les dimères de nanoparticules possèdent deux axes de symétrie suivant lesquels le couplage plasmon peut se produire. Selon la polarisation de la lumière incidente, l'oscillation des électrons peut se faire suivant l'axe du dimère (2 modes longitudinaux notés 1 et 4 sur la figure) ou perpendiculairement à l'axe (4 modes transverses, dégénérés deux à deux, notés 2 et 3).

Par ailleurs, dans un dimère, les deux dipôles qui représentent la distribution de charges peuvent être parallèles ou antiparallèles. Les modes parallèles correspondent à un dipôle équivalent non nul et donnent des modes "brillants" pour les modes longitudinaux et transverses (entourés respectivement en rouge et en bleu sur la figure 1.8a), tandis que les combinaisons antiparallèles correspondent à un dipôle équivalent nul (dans l'approximation quasi-statique) et ne peuvent pas se coupler avec la lumière incidente, donnant des modes "sombres" [55, 65].

Évolution des résonances. Dans le cas du mode longitudinal (encerclé en rouge sur la figure 1.8a), les dipôles des nanoparticules individuelles sont alignés. Il apparaît alors une

accumulation de charges de signes opposés de part et d'autre de l'espace interparticule comme schématisé sur la figure 1.8b. L'écrantage effectif des charges réduit alors la force de dépolarisation pour chacune des particules. En conséquence, la fréquence propre de la résonance plasmon du dimère est réduite relativement à chacune des particules individuellement, ce qui est équivalent à un décalage vers le rouge de la résonance plasmon. Inversement, pour le mode transverse brillant, les dipôles sont côte à côte. La distribution de charges accroît la force de dépolarisation qui se traduit par un décalage de la résonance vers le bleu.

En pratique, le mode plasmon longitudinal a une section efficace de diffusion bien plus élevée que les modes transverses et domine le spectre d'un dimère sous lumière blanche non polarisée. Pour cette raison, c'est cette résonance que nous allons étudier préférentiellement dans nos dimères auto-assemblés.

En conclusion, un dimère de nanoparticules métalliques possède une longueur d'onde de résonance décalée vers les grandes longueurs d'onde ainsi qu'une section efficace de diffusion plus élevée comparée à une particule seule. Les deux effets sont d'autant plus forts que les particules sont proches.

Expérimentalement, la quantification du couplage plasmon en fonction de la distance a été obtenue par la fabrication lithographique électronique de paires [12, 66] ou de chaînes [67] de nanodisques en faisant varier la distance interparticule. Elle a été confirmée en utilisant des sphères métalliques d'or [15, 68] et d'argent [69] auto-assemblées. Les spectres d'extinction de ces paires de nanoparticules confirment le décalage vers le rouge du maximum des spectres de résonance avec un décalage quasi-exponentiel lorsque les nanoparticules se rapprochent [17, 20, 66, 70].

1.3.2 Limites de l'approximation quasi-statique dipolaire

L'approximation quasi-statique dipolaire est valable pour des particules à la fois très petites devant λ [55] et suffisamment éloignées l'une de l'autre [71].

Pour des particules dont la distance bord-à-bord est inférieure à leur rayon, même si leur taille est très petite devant λ , il faut tenir compte des couplages entre les modes d'ordres supérieurs [71]. Par exemple, un dipôle induit dans une sphère peut induire un quadrupôle dans l'autre, et ainsi de suite, entraînant des modes hybrides. La somme de toutes ces interactions mènent à une expression analytique qui s'approxime bien avec une fonction exponentielle [72]. Le système couplé étant de petite dimension devant λ , le couplage en champ lointain peut être considéré avec une approximation dipolaire prenant en compte une correction radiative.

Comme nous l'avons dit, le modèle de couplage quasi-statique dipolaire est adéquat uniquement pour des particules de petite taille (de 20 à 60 nm). Pour des particules plus grandes, les résultats issus du modèle d'hybridation ne sont plus valables et des modes supposés sombres dans l'approximation quasi-statique dipolaire peuvent devenir brillants [73, 74]

Comment résoudre le problème hors de l'approximation quasi-statique dipolaire ? Pour les systèmes complexes, la dépendance du couplage plasmon vis-à-vis de

la distance peut être quantitativement déterminée par une analyse complète prenant en compte tous les modes d'interaction : la théorie de Mie généralisée (GMT) [75]. C'est l'extension directe de la théorie de Mie pour des systèmes multi-particules quelconques. C'est une méthode de calcul exacte basée sur une expansion des champs incidents, diffusés et internes en harmoniques sphériques, comme dans la théorie de Mie.

Comme pour les sphères seules, la GMT n'est valable que pour des sphères dans un milieu diélectrique homogène. Des méthodes numériques sont utilisables pour analyser l'interaction de particules de forme quelconque en présence de substrat. En particulier, l'approximation dipolaire discrète (DDA) [64] est utilisée dans la détermination de l'équation du *plasmon ruler*, détaillée ci-dessous.

Toutefois, compte tenu de la grande sphéricité des particules utilisées dans nos expériences et du faible contraste d'indice entre l'eau, le verre et les biomolécules dans nos échantillons, nous utiliserons la GMT pour établir une relation entre les réponses optiques des dimères considérés et la distance interparticule.

Plasmon ruler - une loi d'échelle universelle ?

Pour des particules dont le diamètre se situe entre 20 et 70 nm, il a été discuté dans la littérature que le décalage spectral $\Delta\lambda_{plasmon}$ par rapport à une particule seule était indépendant de la taille et suivait une loi d'échelle universelle [17,49], généralement appelée équation du *plasmon ruler*. Dans le cas des nanoparticules d'or, cette relation, utilisant la distance bord-à-bord entre particules r et leur diamètre d , a été établie à partir de données expérimentales couplées à des simulations utilisant la DDA sur des nanodisques d'or. Elle a également été validée par l'assemblage de nanoparticules par des brins d'ADN [16]. Elle s'écrit de la façon suivante :

$$\frac{\Delta\lambda_{plasmon}}{\lambda_0} = 0,18 \exp \frac{-r/d}{0,23}$$

En effet, en traçant le décalage spectral normalisé par la longueur d'onde d'une particule isolée en fonction de la distance interparticule normalisée par la taille des particules, les données expérimentales suivent la même tendance exponentielle montrée sur la figure 1.9. Cette courbe montre bien la grande sensibilité de la réponse optique de dimères de particules d'or vis-à-vis de la distance interparticule et justifie l'utilisation de ces nanostructures comme *règles moléculaires* ou comme capteurs optiques comme nous le détaillerons ci-dessous et au cours des chapitres expérimentaux.

La tendance exponentielle observée ne provient pas d'un modèle mais d'un ajustement empirique qui ne prend en compte ni les décalages spectraux anormalement grands associés à l'apparition de nouvelles bandes lorsque les particules sont presque au contact [17,76,77], ni les phénomènes quantiques qui peuvent apparaître entre deux particules très proches [78]. De plus, la validité de cette équation pour des particules d'or auto-assemblées n'a été vérifiée que pour un indice diélectrique environnant de $n=1,6$ [16,79] correspondant à des particules recouvertes de protéines.

En pratique, nous verrons dans les chapitres suivants que cette équation n'est pas

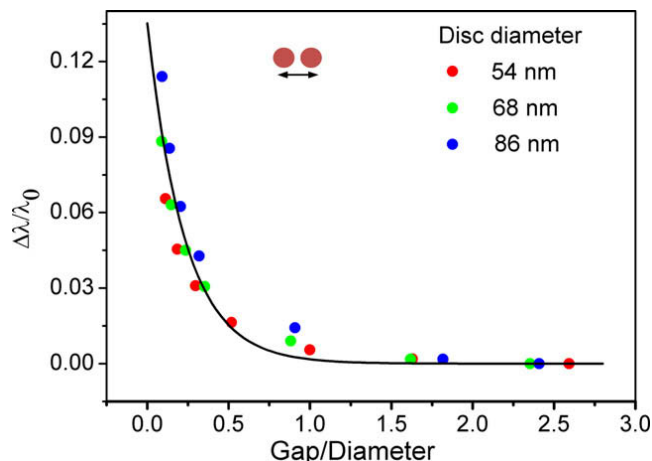


Figure 1.9 – Décalage spectral normalisé entre deux disques en fonction de la distance interparticule normalisée (extrait de [17]).

applicable à nos expériences où les distances interparticules peuvent être inférieures à $0,1d$. De plus, l'indice diélectrique que nous utiliserons en appliquant la théorie de Mie généralisée ($n=1,4$) sera choisi comme une moyenne pondérée des indices du voisinage proche [20, 80]. L'idée d'une courbe de calibration est néanmoins très intéressante dans la mesure où elle permet de comparer morphologiquement différents dimères, étudiés en parallèle, à l'aide de leur réponse optique.

En conclusion, nous avons vu qu'à travers les propriétés optiques de particules seules ou couplées, l'étude d'objets uniques permettait d'obtenir des données morphologiques sur des nanostructures. Pour comprendre comment cette morphologie peut être sensible à l'environnement chimique et à la présence de biomolécules reliant les nanoparticules, nous allons, dans un premier temps, décrire les forces qui régissent un assemblage de nanoparticules avant de détailler notre approche d'auto-assemblage utilisant des brins d'ADN.

1.4 De la nanoparticule à la suspension colloïdale

Nous avons décrit les propriétés optiques découlant du couplage plasmon entre nanoparticules d'or lorsque celles-ci sont très proches, c'est-à-dire quand la distance interparticule est inférieure à leur diamètre. De nombreuses expériences ont utilisé la lithographie pour démontrer l'évolution du couplage plasmon [81], mais seules des techniques dites *bottom-up* permettent d'envisager l'utilisation de ces structures pour mesurer des distances ou des déformations spatiales de biomolécules.

En pratique, la fabrication et la morphologie d'auto-assemblages de nanoparticules en solution sont régies par différents processus physico-chimiques spécifiques aux suspensions colloïdales. Notamment, lorsque l'on étudie la courbe du *plasmon ruler*, on voit que le fort décalage des fréquences vers le rouge se fait à des distances interparticules inférieures au rayon de la particule. A ces distances, les forces électrostatiques entre les particules sont prédominantes. Une bonne connaissance de ces phénomènes est donc nécessaire pour envisager la fabrication et l'étude de structures auto-assemblées.

1.4.1 Suspension colloïdale

Les nanoparticules d'or en solution forment une suspension colloïdale. Cela signifie qu'elles sont à la fois suffisamment petites pour être soumises au mouvement brownien causé par les chocs avec les molécules qui les entourent et rester en suspension, et suffisamment grosses pour être nettement distinguables de ces molécules. La petite taille des objets colloïdaux a une conséquence immédiate : leur rapport surface sur volume est très important. Dans ces conditions, les propriétés de surface (et d'interface) deviennent aussi importantes que celles de volume.

Il existe plusieurs techniques pour mesurer les propriétés physiques des suspensions colloïdales de nanoparticules métalliques. Les principales sont :

- la spectroscopie UV-visible qui permet de mesurer la section efficace d'extinction de la solution,
- la diffusion dynamique de lumière (DLS) [82] qui étudie la lumière diffusée de la suspension colloïdale et permet d'accéder à la taille des particules, et
- la spectroscopie résonante de lumière (RLS), assez proche de la DLS mais appliquée à des particules résonantes permettant une mesure de la section efficace de diffusion de particules [83].

1.4.2 Forces entre objets supramoléculaires

Lorsque l'on s'intéresse à des objets de natures chimiques identiques et suffisamment grands pour être considérés comme une collection d'ions ou de dipôles, on ne considère que deux catégories de force qui sont généralement les plus importantes pour ces objets supramoléculaires : d'une part les forces attractives de Van der Waals et d'autre part les forces résultant du fait que les objets portent des charges électriques. Les principales formules et notions de cette partie sont extraites de la référence [84].

Forces de van der Waals entre deux nanoparticules

Pour calculer les forces de Van der Waals d'objets supramoléculaires à partir des formules utilisées pour des molécules, l'hypothèse de base est l'additivité. On admet que l'interaction totale entre les deux objets est la somme de toutes les interactions entre les composants du premier objet et les composants du second. Les résultats de l'interaction de deux sphères sont, si R est la distance centre-à-centre et a le rayon de la sphère :

$$V_A = -\frac{A}{6} \left(\frac{2a^2}{R^2 - 4a^2} + \frac{2a^2}{R^2} + \ln \frac{R^2 - 4a^2}{R^2} \right)$$

où A est la constante de Hamaker.

Si r est la distance bord-à-bord, on trouve les situations limites suivantes :

- pour $r \ll R$, lorsque les particules sont proches, on a $V_A = -\frac{Aa}{12r}$
- pour $r \gg R$, lorsque les particules sont éloignées, on a $V_A \propto \frac{1}{r^6}$

A longue distance, leur interaction varie avec la distance comme si elles étaient des molécules. A courte distance, la décroissance de l'énergie d'interaction est beaucoup plus lente

qu'entre molécules.

Ainsi, l'interaction de Van der Waals entre deux corps de même composition au sein d'un même milieu est toujours attractive. De plus, la force d'attraction de Van der Waals de deux corps au contact n'est jamais négligeable. La notion de contact n'est pas évidente à définir du fait des aspérités surfaciques mais cela signifie typiquement que deux sphères agrégées seront très difficilement séparables.

Forces répulsives : Double couche électrique

En solution aqueuse, les particules possèdent le plus souvent une charge électrique due soit à l'ionisation de certains groupes fonctionnels à la surface de la particule, soit à un transfert d'ions à l'interface particule-solution. Cette charge est nécessairement neutralisée par des ions de signe opposé à la charge de surface, appelés contre-ions.

Cas d'une particule isolée. Le potentiel électrique Φ de la surface d'une particule en solution obéit à l'équation de Poisson : $\Delta\Phi = -\frac{\rho_q}{\epsilon}$. Dans le cas des particules d'or, la charge surfacique est négative (attribuée à des ions AuCl_2^- en surface [?]). Le potentiel électrique de surface est noté Φ_0 . Une couche d'ions positifs peut s'adsorber à la surface de la particule, on parle alors de couche de Stern, comme schématisé sur la figure 1.10a. Au-delà de la couche de Stern, on a affaire à une couche diffuse dite de Gouy-Chapman. La grandeur clé est la longueur de Debye-Hückel qui correspond à la longueur de cette double couche. Elle s'écrit :

$$K^{-1} = \left(\frac{\epsilon k_B T}{2N_A e^2 I} \right)^{\frac{1}{2}}$$

où I est la force ionique de la solution. On remarque qu'elle est d'autant plus grande que la force ionique est faible. Le potentiel zêta ζ correspond au potentiel électrostatique mesuré à une distance de la particule égale à la longueur de Debye.

Cas de deux particules proches. Lorsque deux objets chargés se rapprochent, les couches diffuses de contre-ions de chacun tendent à s'interpénétrer. De cette situation naissent deux forces :

- une force attractive, résultant de l'interaction coulombienne entre toutes les espèces chargées, et
- une force répulsive d'origine entropique.

La charge sur chaque surface maintient dans l'espace entre les objets une concentration élevée en contre-ions dans un état analogue à un état gazeux. Ce gaz d'ions, maintenu captif dans l'espace interne entre objets par les forces électrostatiques, et soumis à l'agitation thermique, génère une pression osmotique Π . Dans la très grande majorité des cas, la résultante est répulsive.

En conclusion, la force de double couche électrique est répulsive, son intensité est d'autant plus élevée que le potentiel de surface est grand et son rayon d'action est d'autant plus grand que la force ionique est faible (écranage de la solution ionique).

1.4.3 Énergie d'interaction - Théorie DLVO

La somme du potentiel attractif dispersif (Van der Waals) et répulsif de double couche électrique conduit à un potentiel d'interaction entre deux particules sphériques. Ce potentiel peut être déterminé par la théorie DLVO [85–87], nommée à partir de ses auteurs : Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek. Son allure est donnée sur la figure 1.10b. On remarque la présence d'une barrière énergétique qui gêne l'accès au minimum d'énergie, correspondant à l'état stable, c'est-à-dire agrégé. Selon la hauteur de cette barrière par rapport à l'énergie thermique, kT , elle sera franchie plus ou moins facilement (fréquemment) avec une probabilité $\exp(-\frac{E}{kT})$.

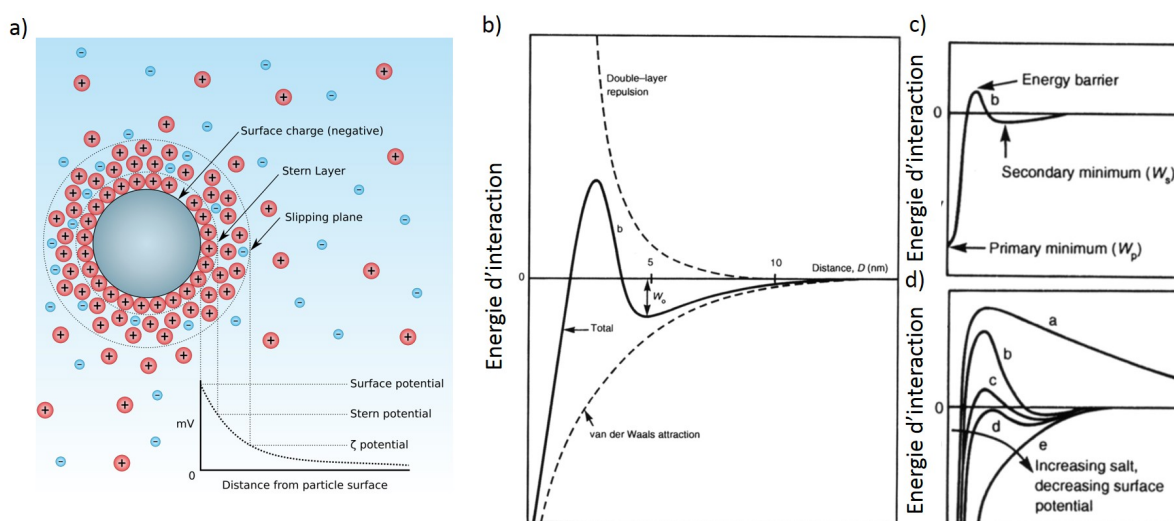


Figure 1.10 – a) Représentation schématique de la double couche répulsive autour d'une nanoparticule chargée en solution (source : Wikipédia). b) Énergie d'interaction d'un système formé de deux nanoparticules sphériques chargées, en fonction de la distance bord-à-bord, selon la théorie DLVO. c) Positions des minima énergétiques et de la barrière énergétique. d) Effet de la force ionique sur l'énergie d'interaction (extrait et modifié à partir de [84]).

Il peut également y avoir un minimum secondaire, moins profond que le minimum d'énergie principal. Selon les conditions, le système peut donc être dans des états très différents.

Si une barrière très haute existe (cas (a) de la figure 1.10d), les objets resteront sous forme de gaz d'objets séparés, sans distance caractéristique bien définie entre eux.

Si un minimum secondaire se forme, avec une barrière importante séparant ce minimum secondaire du minimum principal (figure 1.10c), les particules se positionneront en moyenne les unes par rapport aux autres à une distance correspondant au minimum secondaire.

Si la barrière est moins élevée, l'énergie thermique des objets devient alors suffisante pour franchir la barrière. En conséquence, les particules s'agrègent de façon quasi irréversible. L'existence de la barrière de potentiel et du deuxième minimum dépend de l'intensité de la force de répulsion, c'est-à-dire de la taille des particules, de la force ionique et du potentiel zêta ζ . La barrière de potentiel est grande lorsque la répulsion est forte, c'est-à-dire quand $\phi_0 (\approx \zeta)$ et R sont grands ou bien quand I , la concentration en électrolyte, est petite [84].

Depuis, la théorie DLVO a été complexifiée et l'expression du potentiel DLVO a été complétée par l'ajout de termes de volume complexes [88–90]. Toutefois, le comportement décrit dans la figure 1.10 est suffisant pour analyser qualitativement les expériences effectuées au cours de cette thèse.

1.4.4 Stabilisation d'une suspension colloïdale de nanoparticules métalliques

Pour former une solution colloïdale de nanoparticules inorganiques stable, il est important de créer artificiellement une répulsion entre les nanoparticules métalliques afin de maintenir une bonne dispersion de ces dernières.

Stabilisation électrostatique et effet de force ionique. Il s'agit d'une conséquence de la répulsion des doubles couches électriques décrite dans la théorie DLVO. Plus la longueur de Debye associée à une particule est grande, plus la suspension est stable. Ainsi, travailler à faible force ionique ou adsorber des molécules chargées à la surface des particules (augmentation du potentiel zêta) augmente la stabilité d'une solution colloïdale. Par exemple, en solution aqueuse, les ligands fortement chargés, par exemple ceux possédant un acide carboxylique, stabilisent les particules plus longuement et à des forces ioniques plus élevées [91].

Stabilisation stérique. Elle consiste à tenir les particules physiquement éloignées les unes des autres, par greffage ou adsorption de molécules à la surface des nanoparticules. L'épaisseur de la couche ainsi formée autour des particules doit être supérieure à la portée des interactions de Van der Waals pour pouvoir stabiliser la solution colloïdale. De plus, lorsque les objets se rapprochent, les chaînes s'interpénètrent et une pression osmotique proportionnelle à la densité de monomères est générée. Cela crée une répulsion d'origine entropique.

Généralement, les particules comportant des ligands qui fournissent une stabilisation stérique sont plus résistantes à forte concentration en sel que les particules stabilisées électrostatiquement [92].

1.4.5 Chimie de surface des nanoparticules d'or

En plus des propriétés de stabilisation, les ligands recouvrant des nanoparticules d'or servent dans le contrôle de la croissance des particules pendant leur synthèse et fournissent aux particules leurs propriétés de solubilité, démontrant toute leur importance. Par exemple, les particules couvertes de poly(éthylène) glycol sont plus stables à forte concentration en sel et dans les milieux biologiques. Elles montrent, de plus, moins d'accrochages non-spécifiques vis-à-vis des protéines et des cellules [7].

Afin d'augmenter la stabilité de particules données, des ligands peuvent être remplacés par d'autres qui possèdent une plus forte interaction avec la surface de la particule concernée. L'exemple le plus commun des nanoparticules d'or est celui dans lequel des

ions citrates chargés négativement sont adsorbés à la surface des nanoparticules. Elles sont donc stabilisées par répulsion électrostatique. Bien que de telles solutions colloïdales soient stables pendant plusieurs années, elles ne peuvent pas être reconcentrées efficacement par centrifugation car elles finissent par s'agréger irréversiblement. En revanche, la couche de citrate peut être remplacée par des ligands se liant de manière plus efficace à la surface de la particule, comme du Bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphine (BSPP) [19]. Cette modification permet d'augmenter suffisamment la stabilité colloïdale de la suspension afin qu'une agrégation contrôlée par centrifugation ne soit pas irréversible.

Groupement thiol. Les groupements thiols (-SH) sont considérés comme ayant la plus grande affinité avec les surfaces de métaux nobles, notamment l'or [93]. La figure 1.11a représente une nanoparticule d'or de 5 nm sur laquelle sont greffées plusieurs molécules couramment utilisées [91]. Tandis que l'on parle souvent de chimisorption ou bien de liaison covalente pour ce type de liaison, la nature microscopique et les processus d'accrochage ne sont pas précisément définis [91]. Il a d'ailleurs été démontré qu'une fois liés à la surface, les ligands sont mobiles, c'est-à-dire qu'ils peuvent diffuser sur la surface [94], démontrant le dynamisme de ces systèmes.

Cette affinité entre l'or et les groupements thiols permet des échanges de chimie de surface en remplaçant des ligands citrates ou phosphines. Cette technique est communément employée pour attacher des brins d'ADN synthétique sur des nanoparticules [19,20,95–99]. Afin d'augmenter la stabilité enthalpique de la liaison entre les brins d'ADN et les nanoparticules, le groupe de Chad Mirkin a mis au point un groupement chimique composé de trois groupements thiols (-SH) en terminaison d'un brin ADN [100], comme représenté sur la figure 1.11b. C'est ce type de groupement chimique que nous utiliserons au cours de cette thèse.

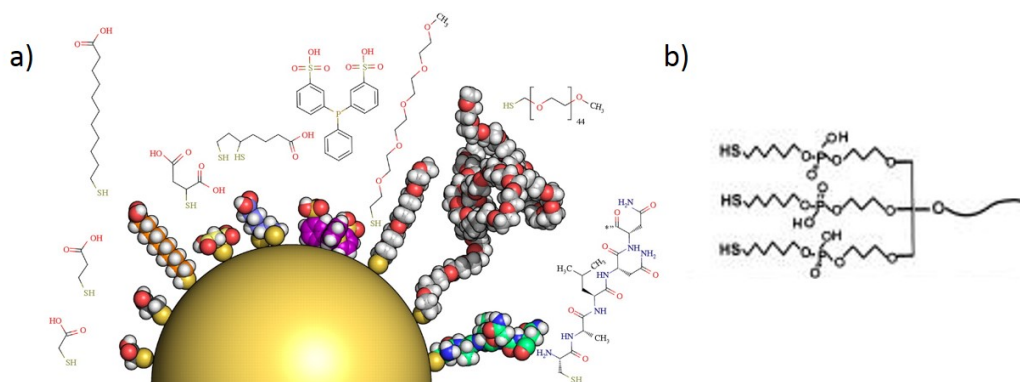


Figure 1.11 – a) Représentation d'une nanoparticule d'or de 5 nm de diamètre recouverte de différentes molécules greffées à l'aide d'un groupement thiol (extrait de [91]). b) Représentation d'un groupement trithiol "type Letsinger".

En conclusion, nous avons vu qu'il était possible de recouvrir une particule avec un ligand qui régit alors les propriétés physico-chimiques de la suspension, indépendamment du matériau composant la particule. De plus, en contrôlant le nombre de ligands que l'on désire greffer sur une particule, ou en hybridant une particule avec plusieurs ligands différents, il est possible de lui donner des fonctions particulières. Dans cette thèse, nous

utiliserons des brins d'ADN pour contrôler un auto-assemblage de nanoparticules et des ligands plus courts pour contrôler les propriétés de stabilité.

1.5 De la nanoparticule à un auto-assemblage programmé

Nous allons détailler dans ce chapitre les propriétés de l'ADN, expliquant ainsi pourquoi c'est un excellent candidat pour l'auto-assemblage de nanoparticules d'or.

1.5.1 Nanotechnologie ADN

Rappel sur la structure de l'ADN

L'ADN simple brin est un polymère composé d'une succession de nucléotides. Chaque nucléotide est composé d'une base azotée, d'un désoxyribose et d'un groupe phosphate. Il existe 4 bases différentes : adénine (A), thymine (T), guanine (G) et cytosine (C). Deux brins d'ADN de séquences complémentaires s'hybrident en respectant deux règles :

- l'adénine se lie à la thymine via deux liaisons hydrogène et la guanine se lie avec la cytosine via trois liaisons hydrogène (figure 1.12a), et
- l'hybridation se fait selon un sens spécifique : en effet, les brins d'ADN sont *orientés* dans le sens 5' vers 3' (notation liée à la géométrie du désoxyribose) et deux brins complémentaires s'assemblent de telle sorte que l'extrémité 5' de l'un soit en contact avec l'extrémité 3' de l'autre.

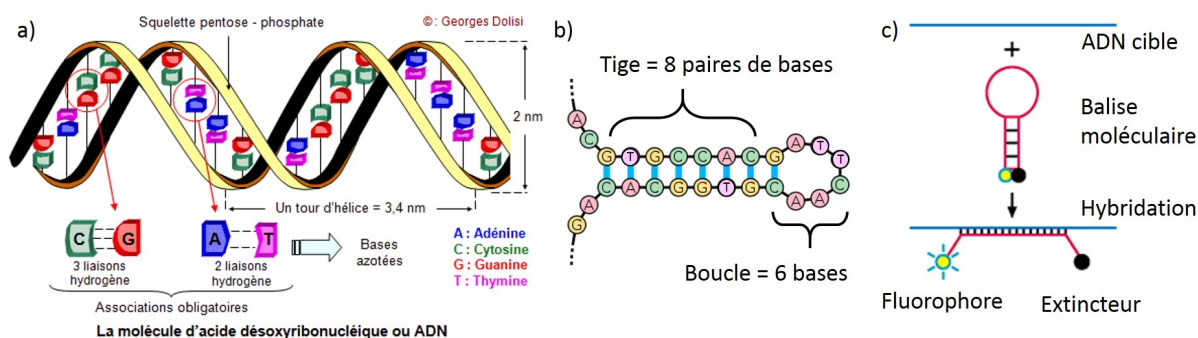


Figure 1.12 – a) Structure d'une double hélice d'ADN. b) Représentation schématique d'une structure tige-boucle d'ADN. c) Principe de fonctionnement d'une balise moléculaire.

Un double brin se forme en protégeant les bases hydrophobes et en optimisant l'hydrophilicité du squelette de pentose-phosphate. Pour faire cela, il adopte quasiment systématiquement la forme d'une hélice comme celle de la figure 1.12a. Les deux brins sont maintenus ensemble par les liaisons hydrogène entre bases complémentaires. La largeur d'un brin d'ADN est d'environ 2 nm et sa longueur dépend linéairement de sa séquence : la distance entre deux bases est d'environ 0,34 nm et 10 bases sont nécessaires pour faire un tour de l'hélice. A l'inverse, un ADN simple brin est plus flexible [101] et se met en pelote pour minimiser les interactions entre ses bases hydrophobes et la solution aqueuse dans laquelle il se trouve.

Certaines séquences peuvent se lier fortement à une molécule spécifique par reconnaissance moléculaire (force de Van der Waals, liaison hydrogène, force électrostatique) et sont dénommées séquences aptamères. En 2002, les effets du changement conformationnel de ces séquences aptamères en présence d'un analyte ont mis en évidence le potentiel de l'utilisation de ces séquences d'ADN comme biocapteurs [102].

Origami

La reconnaissance des bases de type Watson-Crick offre une grande flexibilité pour la fabrication de nanostructures puisque chaque double hélice, quelle que soit la séquence d'ADN, possède le même diamètre et la même longueur [103]. La programmabilité de l'ADN a donc permis de fabriquer des structures très complexes.

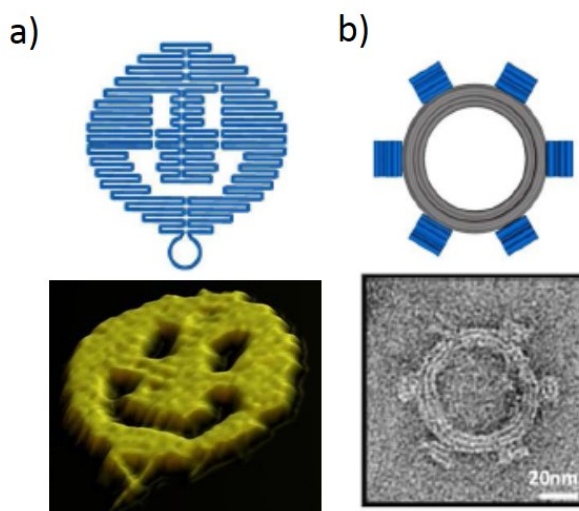


Figure 1.13 – Exemples représentatifs de structure d'origami d'ADN. a) Origami d'ADN en forme de smiley [104] et image AFM correspondante. b) Origami d'ADN en forme d'engrenage et image TEM correspondante [105].

Notamment, les origamis d'ADN représentent la dernière avancée des nanotechnologies d'ADN. Ils ont été mis en évidence pour la première fois par Rothemund en 2006 [104]. Des images de microscopie à force atomique ou de microscopie électronique cryogénique montrent la possibilité de créer à la fois des formes géométriques nanométriques simples telles qu'un smiley (figure 1.13a), et des formes plus complexes telles qu'un hémisphère de mappemonde [104]. Depuis leur apparition, la technique a été très largement utilisée et développée. Désormais, les origamis d'ADN peuvent former des structures tridimensionnelles droites [106] ou courbées (figure 1.13b) [105].

1.5.2 Le choix de l'ADN comme matériau dynamique

Énergie d'association et température de fusion. Un ADN double brin étant maintenu par des liaisons hydrogène, il possède une température de fusion pour laquelle la moitié des brins sont déshybridés. Cette température dépend principalement du nombre de liaisons hydrogène entre les bases et de la force ionique. En modulant la température

locale, il est donc possible de varier la géométrie, la stabilité et la rigidité d'une structure d'ADN.

En particulier, l'hybridation d'ADN peut se faire au sein d'un même simple brin d'ADN pour former des structures secondaires. Ainsi, un palindrome dans la séquence d'un ADN simple brin conduit à la formation d'une structure tige-boucle (ou structure en épingle à cheveux, *hairpin loop* en anglais) comme montré sur la figure 1.12b. La tige qui représente la partie double brin de la tige-boucle possède elle aussi une température de fusion. Elle sera d'autant plus élevée que la tige est grande et la boucle petite.

Dans un simple brin d'ADN, il existe obligatoirement des séquences palindromiques, même courtes, mais seules les séquences les plus stables pourront former des tiges-boucles à température ambiante. Des logiciels informatiques permettent de connaître les différentes configurations possibles d'un ADN simple brin, chacune associée à une valeur d'enthalpie libre, en fonction de la force ionique et de la température [107].

1.5.3 Structures dynamiques - Balises moléculaires

Les structures secondaires des ADN simples brins décrites précédemment ont ouvert la voie au développement de structures nanométriques dynamiques. En effet, en définissant convenablement des séquences possédant des tiges-boucles, il est possible d'ouvrir et de fermer la boucle de façon réversible, grâce à l'ajout d'un ADN cible.

Les premières utilisations de ces tiges-boucles comme capteurs optiques datent de 1996 avec l'invention des balises moléculaires (*molecular beacon*), schématisées sur la figure 1.12c [21]. Le capteur est constitué d'une tige-boucle d'ADN qui possède sur l'une de ces extrémités un fluorophore et sur l'autre un extincteur (*quencher*). Quand la sonde est refermée, l'extincteur supprime la fluorescence par transfert d'énergie de type FRET. Quand la sonde s'hybride à la source, elle change de conformation en s'ouvrant et l'extincteur s'éloigne du fluorophore. La fluorescence n'est plus inhibée et peut être détectée. Malheureusement, les techniques optiques utilisant des sondes fluorescentes souffrent de l'instabilité photophysique des colorants organiques [108]. Les particules plasmoniques peuvent être une bonne alternative, encore faut-il pouvoir associer des brins d'ADN dynamiques et des nanoparticules.

Ce concept est extensible aux nanoparticules inorganiques avec l'utilisation de clusters métalliques comme extincteur [109] et de boîtes quantiques pour optimiser la stabilité de l'émetteur fluorescent [110]. Les particules plasmoniques peuvent être une bonne alternative pour étudier des phénomènes de couplage aux échelles nanométriques sans photoblanchiment, encore faut-il pouvoir associer des brins d'ADN dynamiques et des nanoparticules d'or.

1.5.4 Les assemblages or-ADN

L'assemblage de particules d'or sur des brins d'ADN a été démontré pour la première fois en 1996 par les groupes de Chad Mirkin et Paul Alivisatos, indépendamment [13, 18, 111]. Ces travaux pionniers ont stimulé le développement rapide de nanoparticules recouvertes d'ADN, comme outils de diagnostic [112], pour la détection d'acides nucléiques [14, 113],

de protéines [114,115], d'ions métalliques [116,117], pour la spectroscopie Raman [118,119] et finalement pour exalter l'émission de fluorescence [120,121].

Des études se sont aussi concentrées sur l'accrochage d'un nombre limité de brins d'ADN. Cela a été mis en évidence par des gels d'électrophorèse [19] et a permis la fabrication d'auto-assemblages contrôlés grâce à la reconnaissance de brins d'ADN complémentaires [99].

Il faut noter qu'une difficulté dans l'optimisation de ces protocoles d'auto-assemblage est l'interaction non spécifique entre les brins d'ADN et les particules. En effet, l'adsorption d'ADN sur des nanoparticules a déjà été mis en évidence avec de l'ADN simple brin par interaction hydrophobe entre la surface de l'or et les bases de l'ADN [122] mais aussi avec un large excès d'ADN double brin [123].

En conclusion, nous avons vu que la programmabilité de l'ADN permettait d'envisager un éventail de structures possibles. En combinant la sensibilité des groupements de nanoparticules d'or à leur morphologie avec le dynamisme structural de l'ADN, il est possible de concevoir des structures dynamiques sensibles à leur environnement chimique et donc des capteurs optiques.

1.6 Biocapteurs optiques

Nous allons dans cette dernière partie décrire brièvement les principaux biocapteurs optiques basés sur la résonance plasmon afin de comprendre leurs performances et leurs limitations. Nous nous intéresserons particulièrement à la résonance plasmon de surface localisé (LSPR) et ses derniers développements permettant la détection de molécules uniques. Nous décrirons aussi les capteurs colorimétriques basés sur le couplage plasmon.

Dans le début des années 1980, les premières démonstrations de l'utilisation de la résonance de surface plasmon pour l'étude de processus chimiques à la surface de métaux [124] et la détection de gaz [125] donnèrent naissance aux capteurs à résonance plasmon de surface (SPR). Cette technique commerciale (GE Healthcare notamment) permet de suivre et de quantifier les propriétés cinétiques et thermodynamiques des interactions antigènes-anticorps. Toutefois, la SPR est peu répandue dans les essais cliniques [126] de part sa sensibilité plus faible que la plupart des tests immunologiques (tels que les tests ELISA) et à cause du contrôle précis nécessaire de la température de l'échantillon considéré. Afin de surmonter ces difficultés, des biocapteurs basés sur la résonance localisée de plasmon de surface (LSPR) ont commencé à émerger.

1.6.1 LSPR : résonance surface plasmon localisée

Nous avons vu que la forme des spectres d'extinction et de diffusion d'une nanoparticule métallique, et en particulier sa longueur d'onde de résonance, dépendaient de la composition de la particule, de sa taille, de son orientation et de l'indice diélectrique environnant [52,127]. Cela a permis de les utiliser comme agents de contraste brillants et colorés en microscopie optique [114,128,129] et dans l'imagerie cellulaire [130,131].

La plupart des molécules organiques possèdent un indice de réfraction plus grand que la solution tampon dans laquelle elles se trouvent. Lorsqu'elles s'attachent à la nanoparticule,

elles décalent vers le rouge les spectres d'extinction et d'absorption, comme schématisé sur la figure 1.14a-b. L'accrochage d'une molécule peut être suivi en temps réel et en suspension en utilisant un simple spectromètre en transmission qui mesure l'extinction [132,133], ou sur une particule unique [8,9].

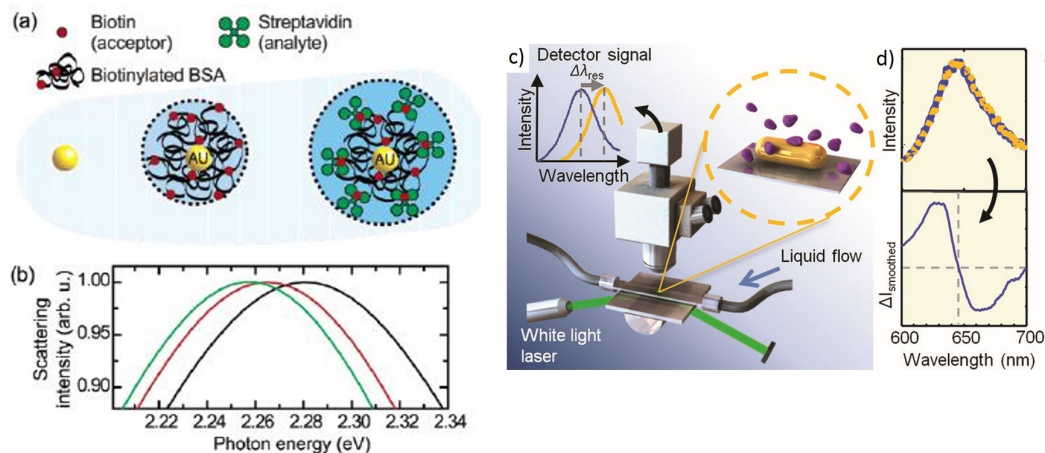


Figure 1.14 – Principe de fonctionnement d'un capteur LSPR à l'échelle de la particule unique. a) Variation de l'indice de réfraction d'une nanoparticule unique par adsorption de protéines à sa surface. b) Évolution de la fréquence de résonance plasmon associée à l'adsorption. c) Schéma d'un montage expérimental en champ sombre de spectroscopie LSPR permettant la détection de molécules uniques. d) Décalage spectral induit par l'accrochage d'une protéine sur la nanoparticule d'or (extraits de : a-b [9], c-d [11]).

Deux groupes ont récemment réussi à démontrer la possibilité de détecter des molécules uniques, non labélisées, en utilisant deux approches différentes de la spectroscopie LSPR.

Par spectroscopie en champ sombre [11]. Le montage expérimental, schématisé sur la figure 1.14c, est constitué d'un laser en lumière blanche qui éclaire un nanobâtonnet d'or en réflexion totale interne. Le microscope ne récupère alors que la lumière diffusée par la particule et des spectres de la particule sont obtenus en quelques millisecondes. À l'aide de ce dispositif, les auteurs ont pu détecter des protéines de 450 kDa en mesurant des décalages spectraux inférieurs à 0,3 nm (figure 1.14c).

Par imagerie photothermique [10]. Pour effectuer de l'imagerie photothermique, un faisceau laser pompe modulé est utilisé pour chauffer les nanoparticules, et un faisceau sonde est utilisé pour détecter la déflexion induite par le changement d'indice de réfraction causé par l'élévation de température. L'accrochage de protéines de 150 kDa a pu être détecté en utilisant cette technique.

Finalement, malgré les performances de ces dispositifs, ils restent d'une grande complexité et les signaux obtenus sont très faibles. Afin, d'obtenir des décalages spectraux plus larges, des équipes ont développé des capteurs basés sur les couplage plasmon : les capteurs colorimétriques.

1.6.2 Capteurs colorimétriques

Les premiers capteurs colorimétriques ont été développés par le groupe de Chad Mirkin en 1997 [13, 14] et se basent sur le couplage plasmon entre des particules proches. Le principe est schématisé sur la figure 1.15a. Deux groupes de nanoparticules sont fonctionnalisés avec des brins d'ADN non complémentaires (notés **a** et **b** sur la figure). En les hybridant avec des brins d'ADN complémentaires à chacune des séquences (notés **a'b'**), il se forme un complexe macroscopique d'or-ADN. Un changement de couleur du rouge au bleu est alors observé (figure 1.15b), conséquence du couplage plasmon entre les particules inorganiques assemblées. Cette technique est très sensible à la structure de l'ADN cible et permet notamment de déterminer des modifications d'une seule base de la séquence cible.

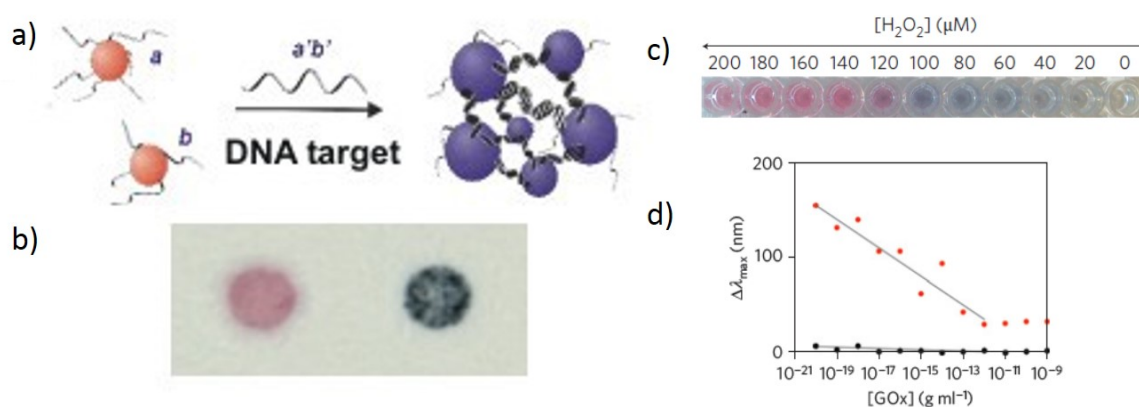


Figure 1.15 – a) Schéma du principe du capteur colorimétrique. b) Changement de couleur relatif à l'hybridation des brins **a** et **b** avec **a'b'** et à la formation d'un agrégat macroscopique (adapté de [13,14]). c) Performance d'un test ELISA plasmonique basé sur la synthèse de nanoparticules en fonction de la concentration en molécule cible de H_2O_2 (extrait de [134]). d) Performance d'un capteur colorimétrique basé sur le décalage spectral induit par la croissance d'une couche d'argent, contrôlée catalytiquement, sur un nanocristal d'or (extrait de [135]).

Cette technologie a donné lieu à de nombreuses études, notamment sur la possibilité de modifier réversiblement l'état de la structure. Ceci a pu être réalisé par des changements de pH [136], par l'addition de courtes séquences d'oligonucléotides [137] et par l'utilisation de séquences aptamères [138]. La principale limitation de cette technique réside dans la nécessité d'avoir une grande quantité de réactifs cibles pour la mesure d'une réponse optique macroscopique.

Afin d'améliorer la sensibilité de ce type de capteur, des capteurs colorimétriques basés sur la synthèse de nanoparticules catalysée par la présence d'une biomolécule cible ont récemment été développés. Ces "tests ELISA plasmoniques" [134,135] permettent d'obtenir des décalages spectraux visibles à l'œil nu pour des quantités très faibles d'analytes cibles (figure 1.15c). Toutefois, les réactions étant catalytiques, elles sont fortement non-linéaires et des effets de seuil peuvent se produire, limitant leur utilisation quantitative, avec des cinétiques très faibles à basse concentration en analyte.

1.7 Objectifs de la thèse

Comme nous l'avons dit en ouverture de chapitre, l'objectif de cette thèse est de fabriquer une structure nanométrique capable de fournir une information optique sensible à son environnement chimique. Pour faire cela, nous voulons réduire la dimension des capteurs colorimétriques à l'échelle de la nanostructure unique. Nous avons vu que les capteurs LSPR permettaient de détecter des molécules uniques, mais seulement si ces dernières étaient de taille relativement importante (>150 kDa), et les décalages spectraux mesurés étaient relativement faibles ($<0,3$ nm). Notre objectif est de détecter des molécules d'environ 25 kDa avec un fort décalage spectral. La structure que nous avons décidé de concevoir est représentée sur la figure 1.16.

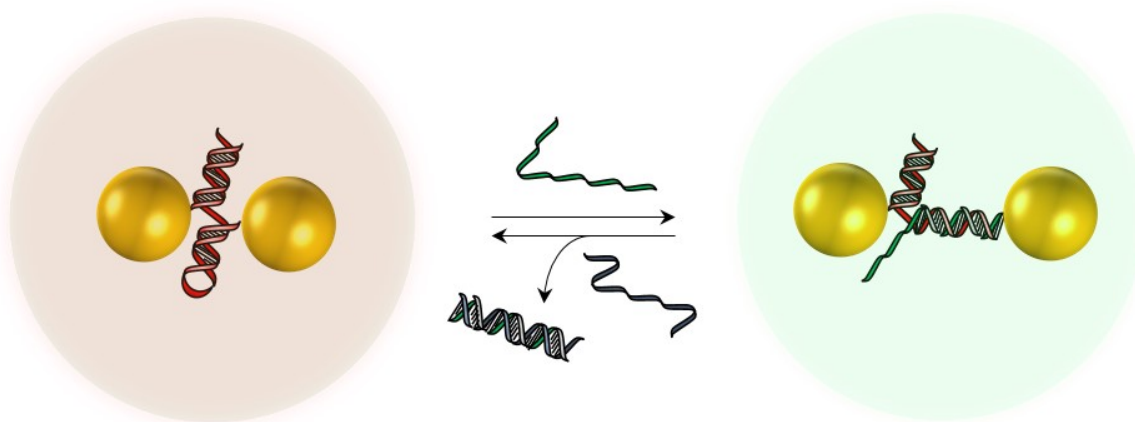


Figure 1.16 – Schéma d'un dimère de nanoparticules d'or assemblé sur un échafaudage d'ADN dynamique.

Elle représente un dimère de nanoparticules liées par un unique brin d'ADN possédant une tige-boucle. La structure est donc assez semblable à une balise moléculaire dont les fluorophores auraient été remplacés par des nanoparticules d'or. Lorsque la boucle est fermée, les particules sont proches l'une de l'autre entraînant un fort couplage plasmon et un décalage de la résonance vers le rouge. Lorsque la tige-boucle réagit avec son brin complémentaire, elle s'ouvre et forme une hélice rigide qui éloigne les particules l'une de l'autre. Il y a donc une diminution du couplage plasmon résultant en un décalage de la résonance vers le bleu. Finalement, en choisissant judicieusement l'échafaudage d'ADN, il est possible de refermer la boucle, rendant le système réversible. De plus, étudier les variations spectrales d'une telle structure permet théoriquement de fabriquer un capteur à l'échelle de la molécule unique.

1.7.1 État de l'art

Les objectifs de la thèse ayant été déterminés, voyons brièvement l'état de l'art associé à la mesure de déformations nanométriques dans des dimères de nanoparticules d'or. Nous allons voir tout d'abord les possibilités offertes par les *plasmon ruler* pour mesurer des distances interparticules ou suivre des événements moléculaires uniques avant de nous

concentrer sur les utilisations des dimères dynamiques de nanoparticules d'or pour la détection de molécules.

Plasmon ruler Au-ADN

Nous avons vu que la dépendance de la résonance d'un dimère de nanoparticules d'or vis-à-vis de la distance entre les particules [12, 52, 66, 139] avait donné lieu à une courbe de calibration universelle : le *plasmon ruler* [15, 16, 49].

Le *plasmon ruler* a d'abord été utilisé pour détecter l'hybridation de deux brins d'ADN complémentaires [15]. Pour cela, le groupe de Paul Alivisatos a utilisé des particules d'or ou d'argent de 40 nm de diamètre, fonctionnalisées avec de la streptavidine et immobilisées sur des lamelles de verre (figure 1.17a). Les nanoparticules immobilisées ont été visualisées avec un microscope en champ sombre puis exposées à des nanoparticules fonctionnalisées avec des simples brins d'ADN biotinilés, permettant l'accrochage entre deux particules afin de former des dimères (figure 1.17c).

La reconnaissance de la protéine et de la vitamine entraîne immédiatement un décalage de la fréquence de résonance vers le rouge ainsi qu'une augmentation de l'intensité de diffusion (figure 1.17b). Usuellement, l'amplitude et la direction du changement spectral dépendent de l'orientation vis-à-vis de la polarisation incidente de la lumière [12, 49]. Dans ce dispositif, avec de la lumière non polarisée, lors de la formation du dimère, un large 'red-shift' est observé, jusqu'à 75 nm pour des particules de 40 nm [16, 68, 140].

Les séquences d'ADN simples brins étant flexibles, l'hybridation du brin d'ADN avec son complémentaire forme une structure plus rigide qui éloigne les particules, entraînant ainsi un décalage spectral vers le bleu (figure 1.17c). Dans cet exemple, le décalage obtenu est de $\Delta\lambda = 2,1$ nm.

Du fait de leur très grande sensibilité à la distance entre deux particules, les *plasmon rulers* sont utilisés dans de nombreuses applications. Ils ont notamment permis d'étudier les variations de la longueur de persistance de l'ADN dans des solutions salées, la diminution de la longueur de chaîne résultant d'une activité de nucléase et la courbure et le clivage d'un brin sous l'action de l'enzyme de restriction *EcoRV* [68, 142, 143]. Ces études peuvent être effectuées en étudiant individuellement de nombreux dimères avant, pendant et après l'événement d'intérêt, permettant d'identifier plusieurs sous-populations dans un seul ensemble [142].

Par ailleurs, les fluctuations de taille et de forme des nanoparticules utilisées pour assembler ces *plasmon rulers* affectent les longueurs d'onde de résonance et induisent ainsi des erreurs dans les courbes de calibration [16]. Cependant, cet élargissement hétérogène de la relation de calibration ne nuit pas à la détection de très faibles variations de distance pour des dimères étudiés individuellement en fonction du temps.

Les *plasmon rulers* permettent également de mesurer des distances bien plus faibles que la longueur d'onde du visible. Ainsi, ils sont à présent utilisés par plusieurs groupes dans le développement de la microscopie de couplage plasmon. Cela permet d'étudier des phénomènes cellulaires en dessous de la limite de diffraction en associant à des protéines des nanoparticules métalliques [55, 144–147].

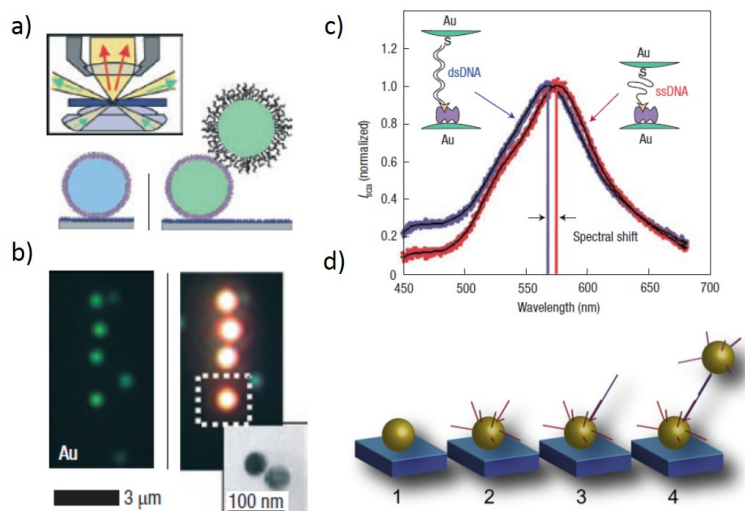


Figure 1.17 – Illustration du *plasmon ruler*. a) Représentation d’une particule immobilisée sur laquelle se greffe une deuxième particule pour former un dimère. Encadré : schéma d’un microscope en champ sombre à transmission. b) Images en champ sombre de particules seules (en vert, image de gauche) et de dimères (en orange, image de droite). Encadré : Image de microscopie électronique d’un dimère. c) Exemple de décalage spectral entre deux nanoparticules d’or reliées par un ADN simple brin (en rouge) et double brin (en bleu). d) Illustration schématique de la détection d’un brin d’ADN par des particules d’or de 80 nm lors de la formation d’un dimère (extraits de : a-b-c [15] et d [141]).

Détection de biomolécules

La capacité à suivre un événement moléculaire unique avec un dimère de particules d’or, comme le clivage d’un brin d’ADN par une protéine [68], ouvre des perspectives intéressantes pour la détection optique de molécule individuelles. Une possibilité est représentée sur la figure 1.17d : la détection de l’hybridation d’un brin d’ADN par la formation d’un dimère en présence du brin d’ADN complémentaire à ceux présents sur les deux particules [141]. Si cette géométrie permet effectivement de détecter un événement unique et de produire des capteurs sensibles, elle souffre de deux limitations. Premièrement, le besoin de greffage d’une particule en suspension signifie que seules quelques particules fixées au substrat vont former des dimères, limitant la dynamique de détection. Deuxièmement, les particules considérées présentent de nombreux brins d’ADN et donc une grande partie des séquences cibles vont se fixer sans former de dimère, limitant la sensibilité et la cinétique du capteur.

Ces limitations ont motivé l’étude de dimères présentant des structures en tige-boucle d’ADN pour détecter l’hybridation d’une séquence d’ADN. Initialement, ces travaux ont porté sur la conception de nanostructures dynamiques. En particulier, les tiges-boucles d’ADN avec des nanoparticules ont été utilisées pour la première fois par le groupe de Lazarides en 2008 [148]. Dans cette étude, les auteurs ont étudié des structures cœur-satellites constituées d’une nanoparticule d’or centrale de 50 nm de diamètre attachée à de nombreuses particules de 13 nm par un brin d’ADN possédant une tige-boucle. L’ouverture de la tige-boucle se traduit par un décalage spectral de la longueur d’onde de

résonance ainsi qu'une augmentation du volume hydrodynamique mesuré en diffusion dynamique de lumière (DLS).

En 2010, le groupe d'Oleg Gang a été le premier à démontrer la réversibilité structurelle de dimères assemblés par des brins d'ADN possédant une tige-boucle [22]. Une représentation de la structure utilisée se trouve sur la figure 1.18a. Les particules ne mesurent que 13 nm de diamètre et ne permettent donc pas de mesurer aisément les spectres de diffusion de dimères uniques. Les mesures morphologiques sont donc effectuées par DLS. De plus, les particules présentent un nombre important de brins d'ADN complémentaires à l'ADN cible qui peuvent donc se fixer sans déformer le dimère.

Par ailleurs, les propriétés optiques des dimères avec une distance interparticule modulable ont été utilisées pour la première fois par le groupe de David Ginger, également en 2010 [23]. Plus particulièrement, ce groupe a exploité le décalage spectral lié à l'ouverture d'une tige-boucle d'ADN pour la détection d'ADN cible (figure 1.18b). Toutefois, les décalages spectraux mesurés sont relativement faibles (environ 5 nm), compte tenu de la taille importante des particules du dimère (60 et 100 nm de diamètre). Surtout, seules quelques pourcents des nanostructures de l'échantillon sont des dimères (la grande majorité sont des particules seules / monomères) et la surface des particules d'or étant saturée de brins d'ADN sensibles à l'ADN cible (voir figure 1.18b), ces capteurs sont en pratique peu sensibles et lents.

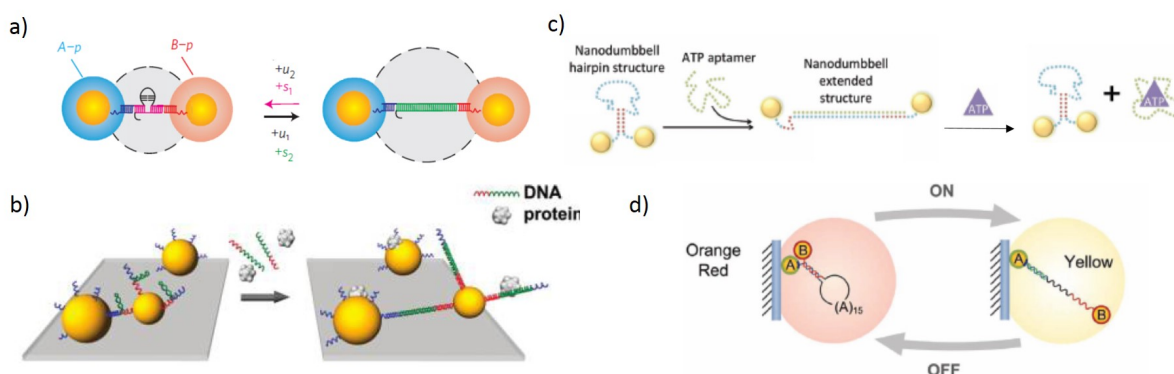


Figure 1.18 – État de l'art de l'utilisation de dimères de nanoparticules d'or assemblées par un brin d'ADN possédant une tige-boucle. a) Ouverture réversible d'une tige-boucle nécessitant deux brins d'ADN cible. b) Utilisation de la variation du couplage plasmon pour la détection d'ADN cible dans un milieu biologique. c) Utilisation d'une séquence aptamère pour l'ouverture réversible d'une tige-boucle d'ADN. d) Détection optique d'une variation de couplage plasmon réversible (extraits et modifiés à partir de : a [22], b [23], c [149] et d [150])

Au cours de cette thèse, deux articles notables portant sur l'utilisation de dimères de nanoparticules d'or ont été publiés. La première publication concerne les travaux du groupe de Jennifer Cha [149] dans lesquels ils ont utilisé un dimère dont la séquence d'ADN permettant de garder la boucle ouverte est une séquence aptamère de la protéine d'ATP. Les auteurs ont caractérisé en microscopie électronique la variation morphologique liée à la fermeture de la tige-boucle par l'ATP, comme schématisé sur la figure 1.18c. Ces travaux sont très proches de ceux décrits dans le chapitre 2 de ce manuscrit et qui ont été publiés

à la même période.

En pratique, ces deux études sont les premières montrant la conception de dimères dynamiques présentant un unique brin d'ADN contenant une tige-boucle. Il s'agit donc d'un système réellement digital où l'accrochage du brin d'ADN cible ne peut se faire que sur un site de reconnaissance qui ouvre le dimère. Toutefois, ces travaux n'ont été effectués qu'avec des particules de faibles diamètres (5-10 nm) et ne sont donc pas compatibles avec un suivi optique par couplage plasmon.

Le deuxième article très intéressant publié en 2013 [150], et représenté schématiquement sur la figure 1.18d, est une extension des travaux de l'équipe de David Ginger (figure 1.18b) décrite ci-dessus [23]. En particulier, ces travaux ont porté sur l'optimisation du décalage spectral obtenu au moment de l'ouverture du dimère qui passe de quelques nm à plusieurs dizaines de nm, en modifiant la chimie de surface des particules et la géométrie de greffage de l'ADN. Toutefois, ces travaux souffrent des mêmes limitations que précédemment : très faible pureté en dimères et nombreux brins d'ADN sur les particules reconnaissant l'ADN cible sans déformer le capteur.

1.7.2 Ce manuscrit

Pour répondre aux problèmes de pureté en dimères des échantillons et de brins d'ADN parasites en surface des particules d'or, je vais démontrer dans ce manuscrit qu'il est possible de synthétiser des suspensions purifiées de dimères de particules d'or de diamètre variant entre 8 et 60 nm, préférentiellement liées par un unique brin d'ADN comportant une tige-boucle, avec un excellent contrôle de la chimie de surface des particules. Ce travail va à la fois porter sur une optimisation des conditions de synthèse et de purification de dimères de particules mais aussi sur leur caractérisation morphologique par spectroscopie de diffusion.

Les propriétés optiques de ces nanostructures et les processus physico-chimiques qui régissent leur morphologie, décrits dans ce chapitre d'introduction, vont me permettre d'analyser la déformation mécanique de ces nanostructures quand on modifie la force ionique locale, la température ou la forme de l'échafaudage d'ADN (en ouvrant la tige-boucle). Je discuterai en particulier de l'influence de la chimie de surface des particules d'or sur la stabilité de ces groupements.

La simplicité de détection optique d'un capteur étant un élément essentiel à sa mise en pratique, je me suis particulièrement intéressé au suivi optique des dimères de particules d'or avec des détecteurs bon marché par rapport aux spectrographes à réseau typiquement utilisés. Je montrerai ainsi que le principe de capteur colorimétrique à l'échelle de la molécule individuelle est accessible sur une simple caméra CCD couleur.

En pratique, la suite de ce manuscrit est structurée en 5 chapitres :

- Je décrirai, dans un premier temps, la synthèse de dimères dynamiques de nanoparticules de 8 nm de diamètre. Cela nous permettra d'effectuer une étude morphologique directement en électrophorèse sur gel d'agarose pour démontrer que les réactions d'ouverture et de fermeture de la tige-boucle sont cinétiquement et thermodynamiquement possibles.

Une étude effectuée par microscopie électronique cryogénique permettra d'effectuer une mesure quantitative des morphologies des dimères ouverts et fermés (chapitre 2).

- Dès lors, pour traduire cette information morphologique en un signal optique mesurable, nous utilisons des particules d'or dont le diamètre est supérieur à 40 nm. Je décrirai alors les méthodes utilisées pour synthétiser de tels dimères, avec différentes chimies de surface (chapitre 3).

- Le chapitre suivant est consacré à l'étude des résonances des dimères ouverts et fermés avec un microscope en champ sombre. Pour cela, nous utilisons et comparons les performances d'un spectrographe à réseau sur des particules uniques et une simple caméra couleur plein champ. Nous déterminerons les conditions de stabilité permettant l'ouverture et la fermeture de la tige (chapitre 4).

- Ensuite, nous montrerons comment les chimies de surface influencent les propriétés de stabilité de ces nanostructures et déterminerons une approche amphiphile de stabilisation des dimères de particules d'or (chapitre 5).

- Ces travaux, et d'autres résultats préliminaires, ouvrent des perspectives passionnantes dans l'étude de processus physico-chimiques et biochimiques à l'échelle de la nanostructure individuelle que je discuterai dans le chapitre 6. En particulier, seront décrits l'évolution des résonances de dimères en fonction de la température extérieure et l'étude de phénomènes transitoires de clignotements des dimères.

Réversibilité morphologique de dimères de nanoparticules d'or de 8 nm assemblés sur ADN

Table des matières

2.1	Stratégie utilisée	38
2.1.1	Structure des dimères	39
2.1.2	Stratégie de fabrication de dimères dynamiques	40
2.2	Protocole d'auto-assemblage des dimères	41
2.2.1	Modification de la chimie de surface	41
2.2.2	Conjugaison de brins d'ADN sur une nanoparticule d'or	42
	Conjugaison d'un unique brin d'ADN sur l'or	42
	Saturation d'une particule d'or avec des brins d'ADN	42
2.2.3	Purification des monomères par électrophorèse	42
2.2.4	Formation des dimères et étude morphologique par déplacement électrophorétique	44
2.3	Caractérisation morphologique par microscopie électronique cryogénique en transmission (cryo-EM)	46
2.3.1	Principes du cryo-EM	46
	Microscopie électronique	46
	Microscopie électronique cryogénique	46
2.3.2	Évaluation de la pureté des échantillons	47
2.3.3	Évaluation des diamètres des dimères	47
2.3.4	Estimation des distances interparticules	48
	Calcul de la fonction de projection	48
	Estimation de la distance bord-à-bord	49
2.4	Étude de la structure dynamique	50
2.4.1	Réversibilité et sensibilité	50
2.4.2	Reproductibilité	52
2.5	Conclusions	54

Fabriquer des nanostructures dont la forme et les propriétés physiques sont sensibles à leur environnement chimique est essentiel dans le développement de nouvelles plateformes thérapeutiques [151–153] et de capteurs biochimiques [1, 23, 154]. Grâce à sa plasticité structurelle ainsi qu'à ses interactions réversibles, l'ADN est un très bon candidat pour fabriquer des nano-objets chimiquement sensibles, dynamiques et déformables [38, 39].

Un moyen de convertir une information chimique en un signal optique macroscopique mesurable est de fonctionnaliser l'ADN avec des entités optiquement actives. Par exemple, hybrider des paires de chromophores électromagnétiquement couplés a permis le développement de balises moléculaires [21] et le suivi de déformations bi- et tridimensionnelles de nanostructures en utilisant le couplage FRET [155, 156]. Grâce à des propriétés optiques remarquables telles que leur résonance plasmon, leur photostabilité [128] et leurs propriétés photothermiques [1, 4], les nanoparticules d'or sont une alternative intéressante aux molécules fluorescentes. Si la conception d'assemblages dynamiques entre des nanoparticules d'or et de l'ADN a déjà été démontrée dans la littérature [23, 143, 148, 155], l'inhomogénéité des échantillons associée à la non-sphéricité des particules et à l'agrégation des particules sur les substrats de microscopie électronique ont empêché une analyse quantitative des changements conformationnels.

Dans ce chapitre, nous présentons la structure dynamique la plus simple possible, c'est-à-dire un dimère de nanoparticules d'or assemblées par un unique brin d'ADN possédant une boucle en épingle à cheveux. Nous effectuons une mesure quantitative de la variation de la distance interparticule par microscopie électronique cryogénique en transmission, entre une structure boucle ouverte et une structure boucle fermée. De plus, l'échafaudage est conçu de telle sorte que la réaction soit réversible à température ambiante. Finalement, une étude cinétique démontre que le changement de conformation est asymétrique dans la mesure où la fermeture de la boucle est favorisée par rapport à l'ouverture.

2.1 Stratégie utilisée

Pour contrôler la fabrication d'une nanostructure or-ADN par auto-assemblage, plusieurs étapes successives sont nécessaires. Bien que ce chapitre se focalise sur des particules de 8 nm de diamètre, certaines descriptions faites dans la suite seront aussi valables pour des sphères d'or de 40 et 60 nm de diamètre, ce qui sera indiqué lorsque le cas se présentera. Toutes les séquences d'ADN et les protocoles expérimentaux sont détaillés dans l'annexe A.

2.1.1 Structure des dimères

Il existe plusieurs méthodes pour induire l'auto-assemblage des dimères de nanoparticules. L'approche que nous utilisons consiste à assembler deux particules portant préférentiellement à leur surface un unique brin d'ADN, l'un étant complémentaire de l'autre. Lorsque les deux particules se rencontrent, les deux brins s'hybrident pour former une double hélice qui relie ainsi les deux particules. Etant donné que les particules ne portent majoritairement qu'un seul brin d'ADN à leur surface, la synthèse fournira principalement des dimères sans se poursuivre pour former des structures plus larges.

Par ailleurs, il est possible d'orienter l'assemblage d'un dimère grâce au placement particulier de groupements thiols sur les brins d'ADN. En effet, l'hybridation de brins complémentaires d'ADN se fait selon un sens précis et la terminaison 5' d'une séquence se retrouvera face à la terminaison 3' de l'autre brin. Cela signifie que si les deux groupements thiols se situent sur les mêmes terminaisons 5' ou 3', alors le double brin d'ADN sera parallèle à l'axe du dimère, comme schématisé sur la figure 2.1a. En revanche, si les groupements thiols se situent aux extrémités opposées, un en 5' et un en 3', alors le double brin d'ADN sera perpendiculaire à l'axe du dimère (figure 2.1b).

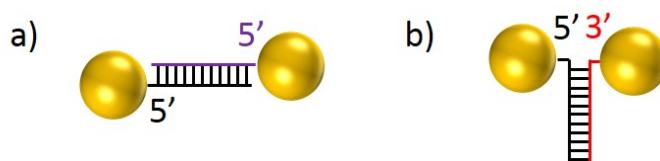


Figure 2.1 – Représentation schématique de dimères de nanoparticules reliées par différents échafaudages d'ADN possibles. Le double brin d'ADN peut être orienté parallèlement (a) ou perpendiculairement (b) à l'axe du dimère.

Dans nos expériences, afin de minimiser la distance interparticule en position fermée, nous avons opté pour la configuration dans laquelle l'échafaudage d'ADN, liant les particules, est perpendiculaire à l'axe du dimère. Par ailleurs, nous cherchons à fabriquer des dimères dynamiques, c'est-à-dire dont la distance interparticule peut varier. Pour cela, nous utilisons une séquence d'ADN qui possède une tige-boucle (*hairpin loop* ou *stem loop* en anglais) dans sa structure comme schématisé par la structure **4** de la figure 2.2. Dans ce cas de figure, la boucle est fermée et les particules sont donc proches l'une de l'autre. En revanche, si la boucle est ouverte, la distance entre les particules est plus grande (structure **5** de la figure 2.2).

Finalement, nous avons choisi dans notre séquence d'ADN d'introduire 9 bases dans la séquence du brin **S** (visible sur les structures **1** et **4** de la figure 2.2) permettant d'éloigner la tige de la surface de la particule. En effet, sans ces bases, le squelette sucre-phosphate de l'ADN double brin, chargé négativement, défavorise l'approche puis l'accrochage du brin d'ADN sur les nanoparticules d'or.

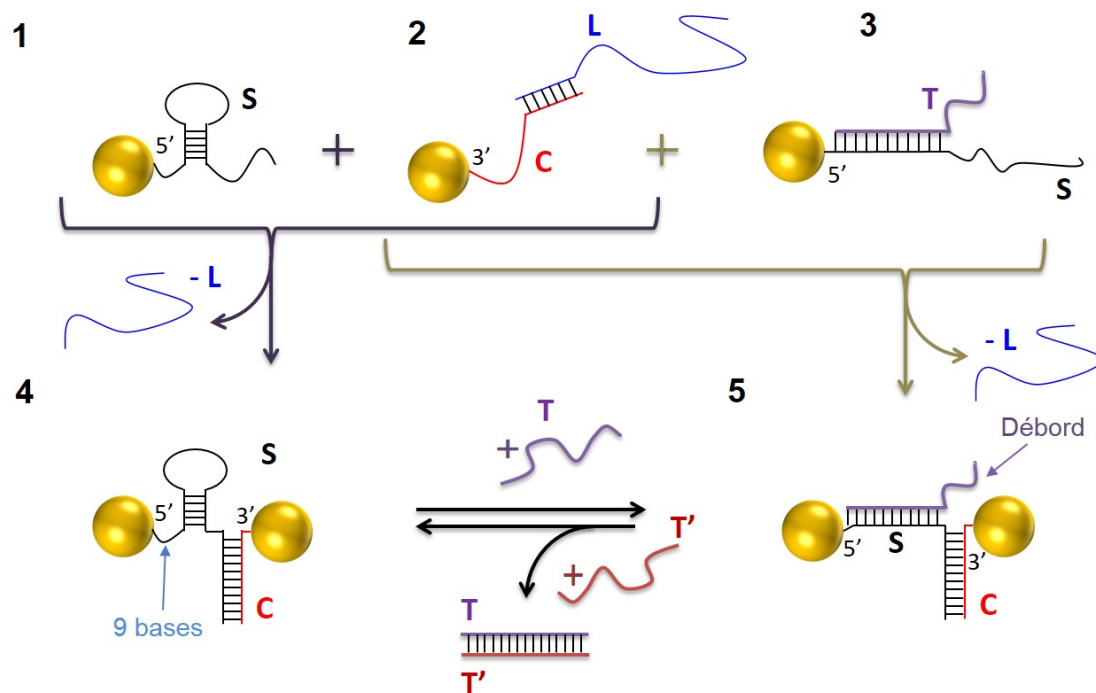


Figure 2.2 – Schéma de la stratégie de synthèse de dimères dynamiques.

2.1.2 Stratégie de fabrication de dimères dynamiques

Le schéma de la figure 2.2 résume la stratégie de fabrication des dimères composés de deux nanoparticules d'or de 8 nm de diamètre. Ils sont fabriqués dans deux conformations spatiales différentes (tige-boucle fermée (4) ou ouverte (5)) en utilisant un unique échafaudage d'ADN. Une moitié de cet échafaudage d'ADN (séquence **S**) possède une tige-boucle dont la tige mesure 10 paires de bases et la boucle 20 bases, pouvant s'ouvrir lorsqu'elle s'hybride avec le brin **T** (structures 1 et 3 sur le schéma). La séquence **S** de 100 bases peut également s'hybrider à un ADN complémentaire **C** de 50 paires de bases.

Comme démontré précédemment dans de nombreux articles [19, 20, 95–99, 155], nous utilisons l'électrophorèse pour séparer des particules de 8 nm portant un simple brin d'ADN trithiolé (**S**, **C** ou **S+T**), donnant les structures 1, 2 et 3 du schéma. Cette technique est compatible avec des particules de diamètre allant jusqu'à 40 nm tant que la longueur du brin d'ADN attaché augmente suffisamment le volume hydrodynamique pour obtenir une séparation efficace [20, 121]. Pour cette raison, avant de faire l'électrophorèse, la séquence **C** est hybridée sur 15 paires de bases à un simple brin dit "allongeur" **L** afin d'optimiser la purification des sphères monoconjuguées.

Les structures fermée (4) et ouverte (5) sont obtenues en hybridant respectivement les structures 1 et 2 d'une part et 2 et 3 d'autre part, avant la deuxième étape de purification électrophorétique. Les séquences **S** et **C** possèdent leur groupement trithiol respectivement du côté 5' et 3' afin de minimiser la distance entre les particules dans 4, avec le double brin de 50 paires de bases résultant de l'hybridation perpendiculaire à l'axe du dimère, comme annoncé auparavant [20, 99].

Afin d'ouvrir une tige-boucle d'ADN, il faut l'hybrider avec sa séquence complémen-

taire. Ainsi, la séquence double brin qui compose la boucle ouverte (50 paires de bases) est nettement plus longue que lorsque la boucle est fermée (10 paires de bases). Elle est donc aussi thermodynamiquement plus stable, la variation d'entropie due à la diminution du nombre d'éléments en solution étant négligeable devant la variation d'enthalpie. En revanche, si l'on veut que le système soit réversible, il est nécessaire d'introduire un avantage enthalpique à la fermeture de la boucle. Pour cela, dans la structure **S+T** (**3**), 30 bases du brin **T** ne sont pas hybridées. Ces 30 bases forment ce que l'on appelle un "débord" et permettent la réversibilité entre **4** et **5**, et notamment de refermer la boucle en ajoutant la séquence complémentaire à **T**, nommée **T'**. En effet, le passage de **5** à **4** implique le remplacement de 50 paires de bases (**S+T**) par 90 paires de bases (**T+T'** et tige de **S**). La réaction est donc thermodynamiquement favorisée.

2.2 Protocole d'auto-assemblage des dimères

2.2.1 Modification de la chimie de surface

Les particules commerciales que nous utilisons sont recouvertes d'une couche de ligands citrates permettant de stabiliser la solution colloïdale, comme schématisé sur la figure 2.3a. Ces ligands sont très labiles et, par conséquent, ne permettent qu'une stabilisation partielle de la suspension. En effet, la reconcentration de ces particules par centrifugation entraîne une agrégation, du moins partielle, de la suspension.

Nous modifions donc la chimie de surface en recouvrant les particules de BSPP, abréviation de bis(p-sulfonatophenyl)phénylphosphine (figure 2.3b), selon le protocole décrit dans la littérature [19,20,95–99] et dans l'annexe A. La liaison or-phosphine est plus stable thermodynamiquement que la liaison or-citrate et les deux charges négatives du BSPP conservent la forte répulsion électrostatique entre les particules favorisant leur stabilité colloïdale.

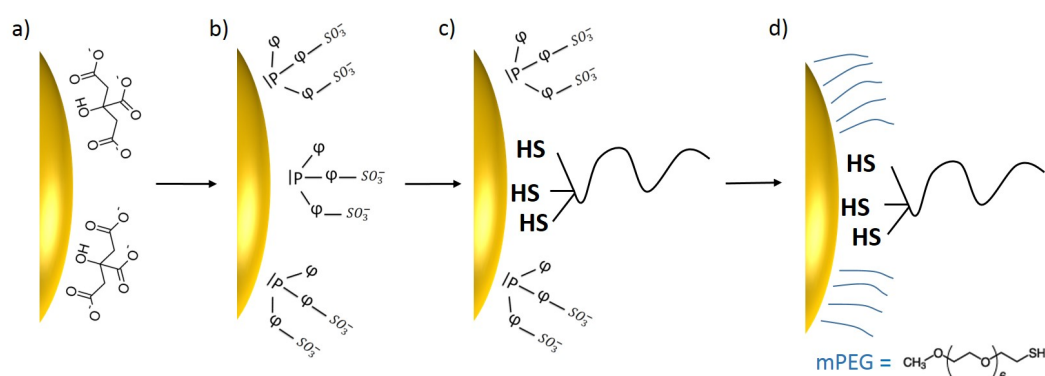


Figure 2.3 – Représentation schématique des chimies de surface successives des nanoparticules. Les particules sont d'abord couvertes de citrate (a) puis de BSPP (b), avant qu'un brin d'ADN trithiolé ne vienne s'accrocher (c) tandis que le reste de la particule est recouverte d'un court ligand de PEG (d).

2.2.2 Conjugaison de brins d'ADN sur une nanoparticule d'or

Conjugaison d'un unique brin d'ADN sur l'or

L'étape suivante de la synthèse consiste à accrocher un unique brin d'ADN trithiolé sur une particule d'or, c'est-à-dire à synthétiser les structures **1**, **2** et **3** de la figure 2.2. Le BSPP étant un réducteur, il est ajouté en excès pour éviter l'oxydation des groupements thiols en solution aqueuse. Surtout, l'ajout de cations dans la solution est primordial dans toutes les réactions entre des nanoparticules d'or stabilisées par le BSPP et des brins d'ADN. En effet, ils permettent d'écranter les charges et réduisent ainsi les répulsions électrostatiques entre les particules et les simples brins d'ADN, chargés négativement. Les étapes de fonctionnalisation, puis celles d'hybridation, seront donc toutes effectuées en présence de sel.

Cependant, choisir la concentration en sel appropriée est fondamental. Plus spécifiquement, il faut trouver un compromis entre une quantité de sel suffisamment importante pour que les particules et l'ADN puissent se rapprocher et interagir, mais suffisamment faible pour éviter l'agrégation des particules entre elles.

Saturation d'une particule d'or avec des brins d'ADN

Le phénomène précédent a une conséquence intéressante lorsque l'on cherche à recouvrir intégralement une particule d'or de brins d'ADN. En effet, lorsque l'on greffe de manière covalente des brins d'ADN à la surface d'une particule, ils agissent comme des ligands hydrophiles et chargés négativement qui stabilisent la suspension. En termes de potentiel d'interaction, cela revient à augmenter la barrière d'activation entre les différentes particules. Les brins d'ADN étant aussi chargés négativement, les répulsions électrostatiques entre particules et ADN augmentent, nécessitant plus d'écrantage de charges.

En d'autres termes, greffer des brins d'ADN sur une particule n'est pas coopératif dans le sens où cela défavorise d'autres accrochages successifs. Pour éviter ce phénomène, l'équipe de Chad Mirkin, à Northwestern University, a développé un protocole consistant à augmenter par étape la concentration saline au fur et à mesure de la réaction [13]. Cela permet d'augmenter l'écrantage au fur et à mesure de la stabilisation des particules par le greffage des ligands ADN, jusqu'à saturation de la surface d'or. A la fin de la réaction, les concentrations en sel sont largement plus élevées que la valeur limite d'agrégation des particules d'or seules [157].

2.2.3 Purification des monomères par électrophorèse

Une fois le greffage des brins d'ADN sur les nanoparticules d'or effectué, il faut pouvoir récupérer uniquement les particules possédant à leur surface un unique brin d'ADN. Pour cela, nous purifions les échantillons par électrophorèse sur gel d'agarose. De manière générale, l'électrophorèse est une des principales techniques utilisées en biologie moléculaire pour la séparation et la caractérisation de biomolécules chargées. La séparation se fait selon deux critères : la charge électrique et le volume hydrodynamique. Dans notre cas, nous souhaitons séparer des particules avec une mobilité électrophorétique donnée, des

particules ralenties par le greffage de brins d'ADN. Les particules sont visualisées dans le gel par l'extinction optique due à la résonance plasmon (visualisation d'une bande rouge).

Un gel d'agarose est une matrice composée d'un polymère de sucre baignant dans un tampon conducteur, le 'Tris, Borate, EDTA' (TBE x 0,5%) pour nos expériences. L'agarose est utilisé à des concentrations allant de 0,5 à 3% en masse, selon la taille des particules à séparer. Plus la concentration en agarose est élevée, plus les pores de l'hydrogel formé seront petits, augmentant la résolution de la chromatographie. Toutefois, dans le cas de gels trop concentrés, le ralentissement excessif de la mobilité des particules entraîne un élargissement des bandes correspondant à chaque sous-produit de la réaction, diminuant le pouvoir de séparation. Un compromis doit être trouvé entre résolution et mobilité : dans le cas de particules d'or de 8 nm de diamètre, un gel à 2,5% en masse donne des résultats satisfaisants.

Avant la purification, les particules d'or fonctionnalisées avec de l'ADN sont passivées avec un excès d'un court oligomère d'éthylène glycol (PEG) [20,68]. Ce ligand est constitué de 6 monomères d'éthylène glycol, d'un groupement thiol sur l'une de ces extrémités permettant l'accrochage à la surface des nanoparticules d'or, et d'un groupement méthyl éther sur l'autre. Il sera dénommé *E6m* dans la suite. Ce ligand permet d'augmenter la stabilité colloïdale pendant la fabrication des dimères. Toutefois, il déplace une partie des brins d'ADN greffés en surface des nanoparticules et nécessite donc d'adapter le ratio ADN/or utilisé pendant la synthèse.

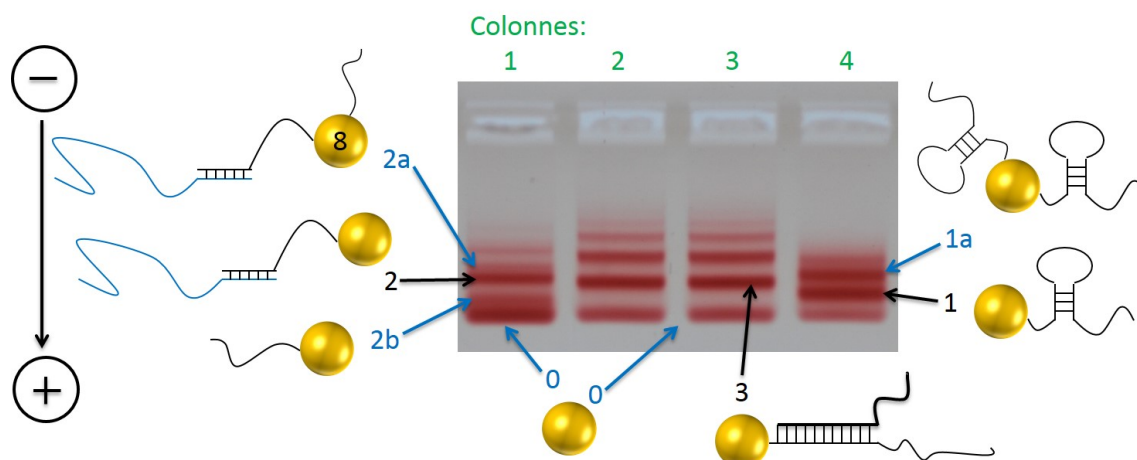


Figure 2.4 – a) Purification électrophorétique des structures **1**, **2** et **3** de la figure 2.2. La bande **0** correspond aux particules de 8 nm non-conjuguées et les bandes plus hautes correspondent aux particules multi-conjuguées.

Par ailleurs, le PEG permet de minimiser les interactions non-spécifiques des nanoparticules avec la matrice formant le gel d'agarose. Par conséquent, les bandes en électrophorèse sont beaucoup plus nettes et nous obtenons donc des puretés plus élevées que lorsque l'on utilise des particules recouvertes de BSPP. L'autre avantage du PEG est qu'il est biocompatible. Il est fréquemment utilisé pour recouvrir des nanoparticules ou des protéines actives afin de les rendre 'invisibles' au système immunitaire, donnant la possibilité de réaliser des études *in vivo* de ces nanostructures [7, 158, 159].

La figure 2.4 montre le gel de purification des mélanges de nanoparticules d'or avec les brins d'ADN **C+L** (colonne 1), **S+T** (colonnes 2 et 3) et **S** (colonne 4). On remarque des bandes distinctes qui correspondent à des structures ayant des volumes hydrodynamiques différents. Les bandes les plus basses sur l'image, c'est-à-dire les plus rapides et donc associées au volume le plus faible, correspondent aux particules non greffées avec de l'ADN (structure **0**). Les bandes au-dessus indiquées par des flèches noires correspondent aux structures voulues **2** (colonne 1), **3** (colonnes 2 et 3) et **1** (colonne 4). Les bandes situées au-delà, comme par exemple les bandes 1a et 2a, correspondent à des particules greffées avec plusieurs brins d'ADN.

La colonne 4 montre que pour des particules de 8 nm de diamètre, la différence de volume hydrodynamique entre une particule seule et une particule hybridée par un ADN simple brin d'au moins 100 bases (**S**) est suffisante pour que l'on puisse les séparer au sein d'un gel d'électrophorèse. D'après la colonne 1, les bandes des structures **0** et **2b**, correspondant à une particule greffée avec un unique brin de seulement 50 paires de bases (**C**), sont très proches. Cela signifie que la différence de volume entre ces structures est tout juste suffisante pour permettre une séparation par électrophorèse. Pour cette raison, nous avons augmenté temporairement la taille du court brin **C** en l'hybridant avec le brin d'ADN allongeur de 100 bases **L**. Ce brin est ensuite retiré par un traitement thermique doux [155,160].

L'hybridation entre **C** et **L** ne se fait que sur 15 paires de bases, ce qui est relativement faible et explique pourquoi le gel présente des bandes intermédiaires, comme 2a et 2b, correspondant à des structures greffées avec **S** uniquement et non pas **S+L**. On ne retrouve pas ce phénomène pour les colonnes 2 et 3 pour lesquelles on greffe aux particules **S+T** car le double brin formé par l'hybridation de **S** et **T** mesure 50 paires de bases, ce qui est beaucoup plus stable à température ambiante.

Finalement, nous remarquons que les bandes 1 et 3 (respectivement dans les colonnes 2-3 et 4) ne sont pas au même niveau dans le gel et, plus particulièrement, qu'une particule d'or associée à un ADN avec la boucle fermée est plus rapide que dans le cas de la boucle ouverte. Cela signifie que la différence de volume hydrodynamique introduit par **S+T**, comparé à **S** seul, est visible par électrophorèse.

En conclusion, nous avons vu qu'il était possible de synthétiser et de purifier par électrophorèse des particules de 8 nm de diamètre ayant préférentiellement sur leur surface un unique brin d'ADN. Toutefois, d'autres méthodes de séparation/purification existent, notamment la chromatographie en phase liquide à haute performance permettant une meilleure résolution mais limitée à des particules d'or de 20 nm de diamètre [160].

2.2.4 Formation des dimères et étude morphologique par déplacement électrophorétique

Une fois que les structures **1**, **2** et **3** sont récupérées et concentrées par centrifugation, elles sont mélangées dans des proportions stœchiométriques (**1** avec **2** pour former **4** et **2** avec **3** pour former **5**, voir figure 2.2). Cela permet aux brins d'ADN complémentaires de s'hybrider et de synthétiser les dimères. L'hybridation s'effectue en une nuit, en présence de sel, avec un traitement thermique doux afin d'assurer que **L** et **C** se séparent. Étant

donné que le PEG augmente la stabilité des nanoparticules et que, dans cette étape, deux particules doivent se rapprocher suffisamment, l'étape de dimérisation s'effectue à une concentration en sel plus élevée que pour celle de l'accrochage des brins d'ADN.

Les échantillons sont ensuite purifiés une ou deux fois dans un gel d'électrophorèse à 2% en masse. Un gel correspondant à une deuxième purification est montré sur la figure 2.5a. La structure fermée **4** se trouve dans la colonne de gauche et celle ouverte **5** à droite. On observe différentes bandes distinctes. Les bandes les plus rapides correspondent à des particules seules qui n'ont pas réagi. Le décalage entre ces deux bandes, pour chacune des colonnes, indique à nouveau la présence de brins d'ADN différents à la surface des particules.

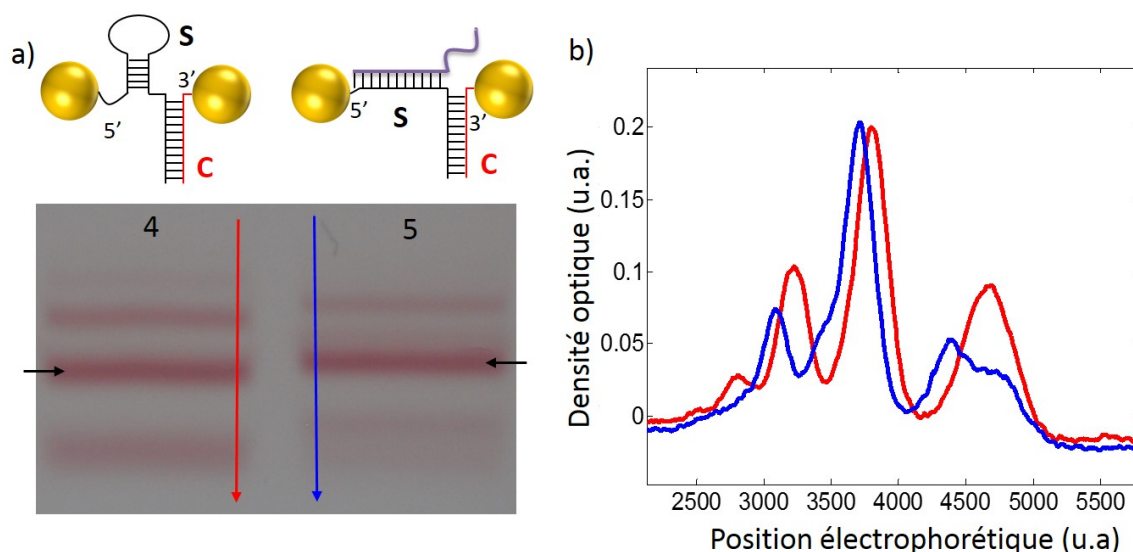


Figure 2.5 – a) Purification électrophorétique de dimères fermés (**4**) et ouverts (**5**). b) Densité optique des colonnes de a) le long de l'axe de migration des particules (courbe rouge : structure **4** ; courbe bleue : structure **5**).

L'analyse en microscopie électronique des bandes plus lentes (voir plus loin) nous permet de les associer à des dimères puis des trimères. Les bandes désignées par les flèches désignent donc les structures **4** et **5**. La différence de volume hydrodynamique entre la boucle ouverte et la boucle fermée est directement visible à travers le décalage des bandes correspondantes. Le dimère avec une boucle ouverte possède un volume hydrodynamique plus important car il comporte un brin d'ADN supplémentaire de 80 bases qui s'hybride en un double brin de 50 paires de bases, plus rigide et étiré que la boucle fermée.

La différence de position dans le gel d'agarose est néanmoins plus visible en traçant l'intensité de diffusion selon l'axe de migration électrophorétique des particules (figure 2.4b). Chaque bande du gel est représentée par un pic dont la position dépend de la taille et de la charge de la nanostructure, les objets les plus rapides étant situés sur la droite de la courbe et le pic le plus haut correspondant aux dimères. On observe que le pic de la courbe rouge qui correspond à la structure **4** (dimère fermé) est ainsi situé à droite du pic du dimère correspondant à la structure **5** (dimère ouvert), démontrant que le changement conformationnel entre les structures est visible par électrophorèse.

2.3 Caractérisation morphologique par microscopie électronique cryogénique en transmission (cryo-EM)

Afin d'obtenir une estimation quantitative de la distance interparticule des dimères, nous les imageons en microscopie électronique cryogénique (cryo-EM). Cette technique permet la caractérisation des groupements de nanoparticules tels qu'ils sont en solution, sans l'effet du séchage ou d'interactions avec le substrat [20, 161, 162]. Les mesures en condition cryogénique ont été réalisées par le Dr. Eric Larquet, du laboratoire LEBS situé à Gif-sur-Yvette, avec un microscope JEOL 2100 LaB6.

2.3.1 Principes du cryo-EM

Microscopie électronique

De manière générale, la microscopie électronique est une technique dans laquelle un faisceau d'électrons est absorbé ou diffracté par un échantillon de très faible épaisseur. L'interaction entre le faisceau et l'échantillon donne lieu à une image de très bonne résolution grâce à la longueur d'onde du faisceau d'électrons qui descend nettement sous l'ångström. Toutefois, la résolution expérimentale est essentiellement limitée par les aberrations dues aux lentilles magnétiques et descend au mieux à un demi-ångström en transmission. Le contraste sur l'image vient de l'interaction entre le faisceau d'électrons et la matière traversée. Sachant que la probabilité de subir un choc élastique augmente avec le numéro atomique de l'échantillon et son épaisseur, les nanoparticules d'or sont de très bons candidats à la microscopie électronique.

Dans notre cas, en champ clair et en transmission, l'écran est placé dans le plan image et seuls les électrons transmis forment l'image. Les zones de l'échantillon ne contenant pas de particules d'or apparaissent claires. En microscopie électronique à transmission classique ou "sec", la préparation des échantillons se fait en séchant une suspension de dimères sur un substrat de carbone posé sur une grille de cuivre. Dans ce cas, des effets de séchage surviennent (formation d'agrégats entre dimères, agrégation des particules au sein du dimère, interaction avec le substrat) et rendent impossible une étude quantitative des distances interparticules [160, 163].

Microscopie électronique cryogénique

Afin de pallier à ces inconvénients et de caractériser la morphologie de nanostructures liées par des brins d'ADN, il est possible d'utiliser la microscopie électronique cryogénique. En cryo-EM, l'échantillon est brutalement refroidi dans de l'éthane liquide. La vitesse de refroidissement extrême empêche la transformation de l'eau en glace cristalline et permet d'obtenir de la glace amorphe (vitreuse), un milieu solide et transparent. En effet, il n'y a pas de diffraction possible des électrons par de la glace vitreuse.

Historiquement, la première équipe à avoir utilisé des échantillons refroidis rapidement à la température de l'azote liquide a été celle de Taylor et Glaeser dans les années 1970 [164,

165]. Néanmoins, la découverte selon laquelle l'eau peut être vitrifiée pour être observée en microscopie électronique a été celle de Dubochet et McDowell en 1981 [161,162]. Pour éviter toute interaction entre les nanostructures et la grille de carbone susceptible d'altérer les données morphologiques, celle-ci est percée de trous dans lesquels les particules sont imagées [20].

2.3.2 Évaluation de la pureté des échantillons

Des images typiques de cryo-EM sont présentées sur la figure 2.6a-c. Les particules d'or se traduisent par des points noirs sur le fond gris correspondant à la couche d'eau vitreuse dans un trou. Les images des figures 2.6a et 2.6b montrent respectivement les structures **4** et **5**, mesurées à 50 mM en NaCl. La concentration en sel est plus faible que celle utilisée lors de la préparation des échantillons (80 mM) pour minimiser l'agrégation des particules, ce qui ne serait plus représentatif des échantillons.

De plus, tandis que les cations Na^+ sont nécessaires à la stabilité thermodynamique de la courte boucle du brin d'ADN dans la structure **4**, la structure **5** peut être étudiée à faible concentration saline (1 mM), comme montré sur la figure 2.6c. La forte densité de nanostructures par image associée au grand nombre d'images acquises permet d'évaluer la pureté des échantillons. La pureté estimée pour les dimères fermés et ouverts est respectivement de 92% et 88%.

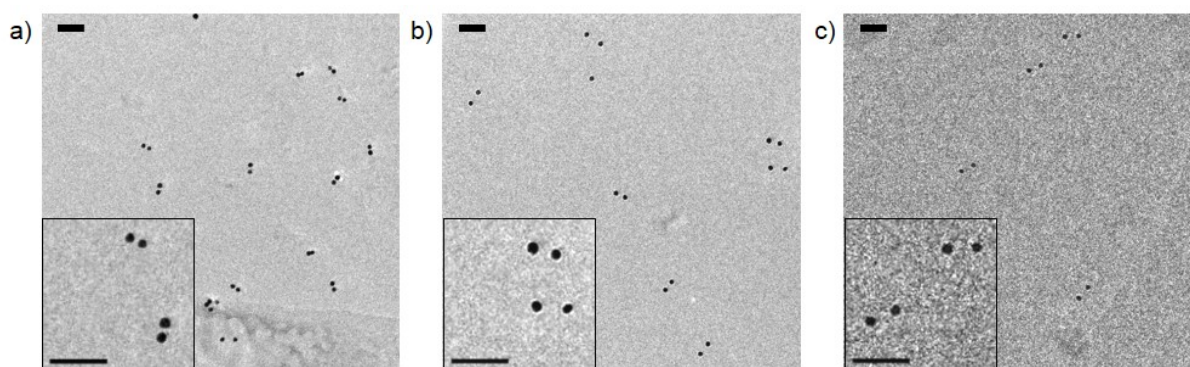


Figure 2.6 – Images cryo-EM de dimères de nanoparticules de 8 nm de diamètre à boucle (a) fermée (structure **4**) ou (b) ouverte (structure **5**) à 50 mM en NaCl. c) Image cryo-EM de la structure **5** à 1 mM en NaCl (barre d'échelle = 50 nm ; les encadrés correspondent à des agrandissements).

2.3.3 Évaluation des diamètres des dimères

Afin de faire une mesure statistique des distances bord-à-bord des dimères, il est nécessaire de connaître au préalable la distribution du diamètre des particules. Pour cela, les images sont analysées automatiquement en ajustant un cercle autour de chaque nanoparticule. Pour des particules de 8 nm de diamètre, les ajustements sont corrects car la forme des particules est souvent proche d'une sphère. Nous verrons par la suite que la distribution de la forme des particules est plus étendue pour des particules plus grandes.

La distribution basée sur 841 particules individuelles est représentée sur la figure 2.7, avec le fit gaussien de l'histogramme correspondant à un diamètre moyen de $8,5 \pm 0,6$ nm.

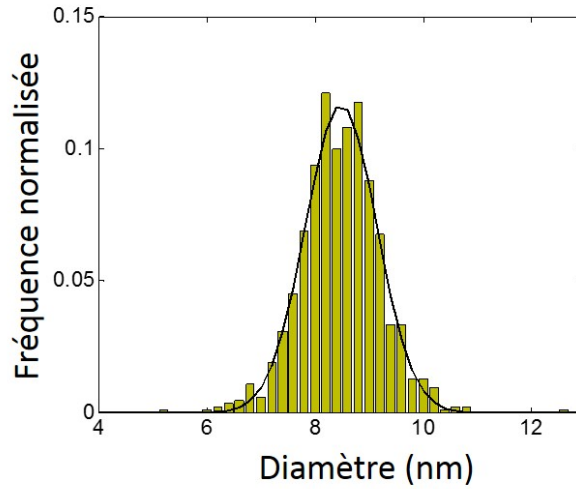


Figure 2.7 – Distribution du diamètre des nanoparticules de 8 nm estimée à partir d’images de cryo-EM.

2.3.4 Estimation des distances interparticules

Pour obtenir la variation de distance bord-à-bord entre les structures **4** et **5**, il est nécessaire de tenir compte de la distribution du diamètre des nanoparticules (vu précédemment), mais également de l’angle entre le faisceau d’électrons et l’échantillon. En effet, étant donné que le film d’eau vitrifié formé sur la grille de carbone est d’une épaisseur de quelques nanomètres [161, 162], une image de cryo-EM correspond à une image bidimensionnelle de l’échantillon tridimensionnel, comme discuté dans la référence [20].

Calcul de la fonction de projection

Une analyse statistique des distances centre-à-centre des particules est effectuée sur 432 dimères (sur 80 images de cryo-EM). Les centres sont ceux des sphères ajustées autour des particules et deux particules distantes de moins de 35 nm sont considérées comme formant un dimère. Lorsque plusieurs particules se trouvent à moins de 35 nm les unes des autres, elles ne sont pas prises en compte dans la distribution.

Les distributions sont présentées sur la figure 2.8a-c et sont estimées sur 236, 132 et 64 dimères, respectivement. La largeur des distributions vient de trois contributions : la distribution du diamètre des nanoparticules, la distribution de la distance interparticule et la projection de l’axe des dimères sur un plan perpendiculaire au faisceau d’électrons. La distribution de la distance interparticule s doit être estimée pour comprendre la géométrie de l’échafaudage d’ADN.

Si nous appelons l la distance centre-à-centre (somme de s et du diamètre des nanoparticules) et \tilde{l} la distance projetée mesurée, alors la distribution de \tilde{l} peut s’exprimer selon

la relation suivante :

$$D_{\tilde{l}}(\tilde{l}) = \int_{\tilde{l}}^{+\infty} D_l(l) D_{\theta}(l, \tilde{l}) \frac{\tilde{l}}{l} \frac{1}{\sqrt{l^2 - \tilde{l}^2}} dl \quad (2.1)$$

avec $D_l(l)$ la convolution de la distribution de la distance centre-à-centre inconnue avec la distribution du diamètre (figure 2.7). $D_{\theta}(l, \tilde{l})$ est la distribution angulaire de l'angle θ entre l'axe du dimère et le faisceau d'électrons. La forme mathématique $D_{\theta}(l, \tilde{l})$ qui reflète le mieux la géométrie des échantillons de cryo-EM et qui nous permet d'ajuster expérimentalement la distribution de \tilde{l} est $D_{\theta}(l, \tilde{l}) = \frac{2}{\pi} \left(\tilde{l}/l\right)^2$, identique à celle obtenue dans la littérature [20].

Cette distribution angulaire s'exprime en fonction de θ de la façon suivante : $D_{\theta}(\theta) = \frac{2}{\pi} \sin^2(\theta)$, et correspond à une distribution des dimères dans laquelle ces derniers ne peuvent pas être perpendiculaires à la couche d'eau vitreuse. La raison pour laquelle cette distribution reflète bien nos expériences est double : tout d'abord l'épaisseur d'eau vitreuse, de quelques dizaines de nanomètres, favorise le positionnement des dimères dans le plan de l'échantillon ; d'autre part, un dimère perpendiculaire au plan serait visualisé comme une particule unique dans nos conditions de mesure à faible grandissement.

Estimation de la distance bord-à-bord

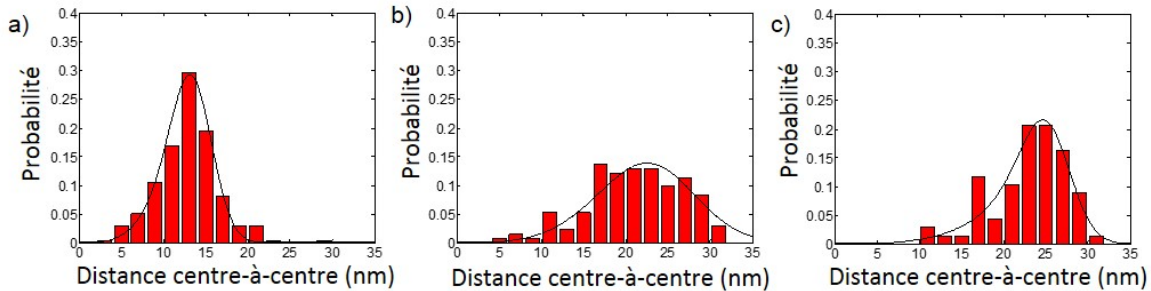


Figure 2.8 – Distributions de la distance centre-à-centre de dimères de nanoparticules de 8 nm de diamètre avec une tige-boucle (a) fermée (structure **4**) ou (b-c) ouverte (structure **5**), à 50 mM (a-b) ou 1 mM en NaCl (c).

Les distributions de distances interparticules pour les structures **4**, à 50 mM en NaCl, et **5**, à 50 mM ou 1 mM en NaCl, sont données respectivement sur les figures 2.8a, b et c. La figure 2.8 met clairement en évidence la différence structurale notable entre des dimères comportant une boucle d'ADN ouverte et ceux comportant une boucle fermée. Pourtant, cette différence n'est liée qu'à la présence ou l'absence d'un brin d'ADN de 80 bases.

La courbe noire sur les figures 2.8b-c correspond à une distribution gaussienne de la distance centre-à-centre convoluée avec la distribution du diamètre et projetée dans le plan de l'échantillon. Ces ajustements indiquent que les distances bord-à-bord sont de $5, 5 \pm 1, 2$ nm pour les dimères fermés **4** et de $15, 5 \pm 2, 6$ nm pour les dimères ouverts **5**

à 50 mM en NaCl. Ces valeurs démontrent qu'il est possible de concevoir un assemblage de nanoparticules dont la distance peut varier quasiment d'un facteur 3 lors de l'addition d'une molécule cible unique.

De plus, nous observons clairement une augmentation de l'écart-type de la distance bord-à-bord pour la structure ouverte. La rigidité d'un dimère de nanoparticules d'or assemblées par de l'ADN dépend fortement des interactions électrostatiques répulsives [23, 166], celles-ci étant très réduites lorsque l'on augmente la distance interparticule d'un facteur 3. En pratique, les dimères fermés **4** semblent très étirés par les répulsions électrostatiques. En effet, la distance bord-à-bord estimée est de 5,5 nm et donc supérieure à la longueur du brin d'ADN liant qui est approximativement de 4 nm (i.e. le double de la largeur d'une double hélice d'ADN). D'autre part, la distance mesurée dans la forme ouverte **5** (15,5 nm) est significativement plus faible que la taille de l'échafaudage d'ADN (19 nm, à savoir 17 nm pour la longueur des 50 paires de bases de **S+T** et 2 nm pour la largeur de la double hélice de **S+C**).

Toutefois, lorsque l'on étudie l'échantillon contenant la structure **5** à faible force ionique (1 mM en NaCl) (figure 2.8c), on observe une augmentation de la distance interparticule (17,5 nm) ainsi qu'une diminution de l'écart-type ($\pm 1,3\text{nm}$). La distance obtenue est alors similaire à la taille de l'échafaudage d'ADN, indiquant que les dimères ouverts sont étirés lorsque la concentration en sel diminue. La rigidité accrue des dimères provenant d'une plus forte répulsion électrostatique à faible force ionique donne une distribution de la distance interparticule plus étroite pour l'échantillon contenant la structure **5**.

2.4 Étude de la structure dynamique

2.4.1 Réversibilité et sensibilité

Nous avons vu précédemment que l'électrophorèse permettait de visualiser la topologie (ouverte ou fermée) des dimères purifiés. Elle peut donc être aisément utilisée pour tester l'efficacité et la réversibilité de l'ouverture et de la fermeture de la boucle d'ADN. La spectroscopie de résonance plasmon n'est pas applicable dans ce cas car les distances interparticules pour les structures **4** et **5** sont supérieures au rayon des particules, ce qui donnerait un couplage plasmon négligeable [20, 23, 68].

Après incubation des structures **4** et **5** avec différents excès de **T** et **T'** respectivement (allant de x 4 à x 400 par rapport au nombre de dimères) pendant une durée de 30 minutes, à température ambiante et à 80 mM en NaCl, nous caractérisons nos structures en électrophorèse.

Le gel correspondant est montré sur la figure 2.9a. On remarque des bandes uniques pour tous les échantillons, démontrant que l'ouverture et la fermeture de la boucle d'ADN n'altèrent pas les dimères préalablement synthétisés. De plus, la mobilité électrophorétique des échantillons obtenus se situe entre celles des structures de référence **4** et **5**, indiquées par des flèches sur le côté du gel (les colonnes 1 et 5 correspondant respectivement aux échantillons **5** et **4**).

La figure 2.9b fournit la section efficace verticale pour les échantillons **5** (trait plein noir), **5+400*T'** (trait pointillé noir), **4** (trait plein rouge) et **4+400*T** (trait pointillé

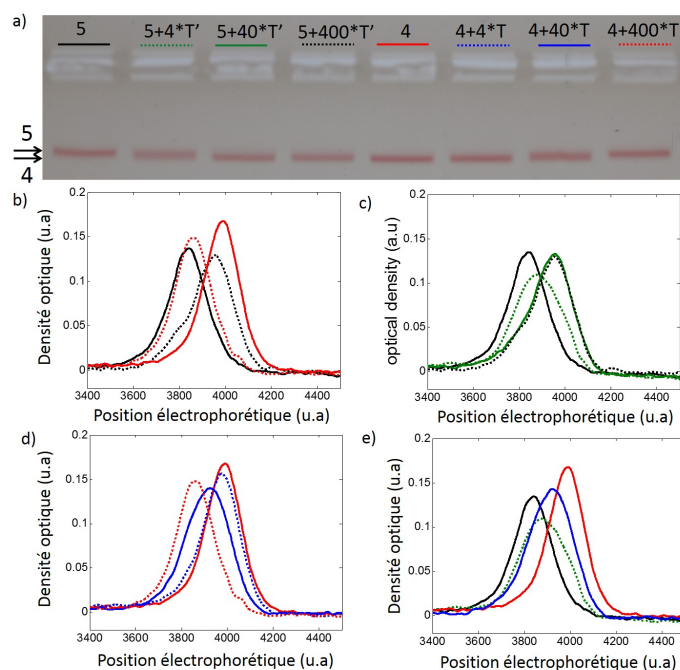


Figure 2.9 – a) Gel d'électrophorèse de dimères dynamiques de particules de 8 nm formés après incubation (30 minutes, température ambiante, 80 mM NaCl) avec différents excès de brins d'ADN **T** et **T'** par rapport au nombre de dimères. La valeur des excès est mentionnée sur la figure pour chacune des colonnes. Les flèches sur le côté indique la position des échantillons de référence **4** et **5**. b-e) Densité optique en fonction de la position des dimères sur l'axe de migration pour les huit colonnes de a), les courbes suivant le code de couleur défini en a).

rouge). Les pics correspondants à **4** et **5** sont presque superposés avec **5+400*T'** et **4+400*T** respectivement, indiquant que la réaction est complète et réversible dans les deux sens.

En réduisant l'excès d'ADN cible, nous observons que la fermeture de la boucle est plus favorable que l'ouverture. La figure 2.9c montre les mobilités électrophorétique des échantillons **5**, **5+4*T'** (trait pointillé vert), **5+40*T'** (trait plein vert) et **5+400*T'**. Tandis que la réaction est totale pour **5+40*T'**, la courbe correspondant à **5+4*T'** présente un pic plus large compatible avec une somme pondérée des pics correspondant à **4** et **5**. Ce résultat indique une population mixte de dimères fermés et ouverts.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons mélangé des quantités égales de **4** et **5** avant de faire une analyse en électrophorèse. Nous n'avons alors observé qu'une bande unique, même pour des temps de migration plus longs, suggérant que la différence de mobilité électrophorétique entre les dimères ouverts et fermés est au-delà du pouvoir de séparation de l'électrophorèse dans ces conditions expérimentales (données non présentées).

L'étude de la réaction d'ouverture de la boucle des dimères fermés dans les mêmes conditions expérimentales fournit des résultats significativement différents, présentés sur la figure 2.9d. En effet, l'échantillon **4+4*T** (trait pointillé bleu) est quasiment superposé à la référence **4** tandis que **4+40*T** (trait plein bleu) est un mélange de dimères ouverts et fermés. L'asymétrie de la réactivité est plus évidente sur la figure 2.9e sur laquelle les échantillons **5+4*T'** et **4+40*T** possèdent des mobilités équivalentes, bien qu'il ait fallu un excès dix fois plus important de l'ADN cible pour ouvrir la boucle. Ce phénomène est probablement dû à la gêne stérique dans les dimères fermés lorsque le brin **T** doit se rapprocher du centre des particules alors que celles-ci sont proches, entraînant une augmentation de l'énergie d'activation.

2.4.2 Reproductibilité

Nous venons de démontrer la possibilité d'ouvrir et de fermer la boucle tout en évaluant la sensibilité de chacune des réactions. Cette partie a pour but de démontrer la reproductibilité de chacune des réactions. Pour cela, l'ouverture et la fermeture réversibles de la boucle (passage de **4** à **5**, et de **5** à **4**) ont chacune été effectuée trois fois de suite dans des conditions expérimentales différentes, confirmant encore une fois la robustesse du procédé.

Première étape. Les suspensions purifiées de **4** et **5** sont mélangées avec un excès de **T** et **T'** (x 400 par rapport aux nombre de dimères) à 80 mM en NaCl. Elles sont chauffées à 50°C puis laissées à refroidir lentement pendant une nuit. Une partie des échantillons **4** et **5** est gardée préalablement et utilisée comme référence. Le gel électrophorétique correspondant est présenté sur la figure 2.10a-i.

Une coupe transverse de l'image est donnée sur la figure 2.10a-ii. La référence **5** (trait plein noir) est superposée avec **4+400*T** (trait pointillé rouge) et la référence **4** (trait plein rouge) est superposée avec **5+400*T'** signifiant que la réaction a effectivement eu lieu et est totale dans les deux sens.

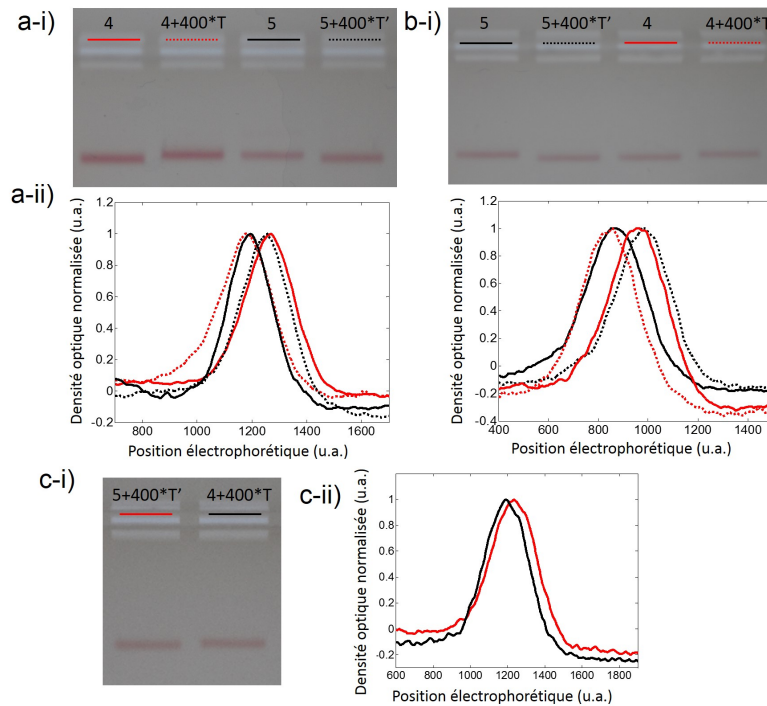


Figure 2.10 – Gel d'électrophorèse (i) et profils densitométriques correspondants (ii) de dimères dynamiques de particules de 8 nm incubés avec un excès du brin d'ADN cible ($\times 400$ par rapport au nombre de dimères). Le temps de réaction est d'une nuit pour (a-b) et d'une heure pour (c). La température de réaction est fixée à 50°C pour (a) et à température ambiante pour (b-c).

Deuxième étape. Après extraction des dimères du gel précédent, **5** et **4+400*T** sont mélangés ensemble (devenant simplement **5**) et **4** et **5+400*T'** également (devenant simplement **4**). La moitié de ces échantillons est gardée comme référence tandis que la seconde moitié est incubée pendant une nuit à température ambiante, avec un excès ($\times 400$) de l'ADN cible (**T** pour **4** et **T'** pour **5**) à 80 mM en NaCl.

La purification électrophorétique de ces échantillons (figure 2.10 b-i) fournit des résultats similaires à ceux obtenus lors de la première étape, effectuée dans les mêmes conditions mais avec un traitement thermique en plus. Les coupes transverses de l'image du gel correspondant sont données sur la figure 2.10b-ii et indiquent que **5** (trait plein noir) est superposé avec **4+400*T** (trait pointillé rouge) et **4** (trait plein rouge) est superposé avec **5+400*T'** (trait pointillé noir).

Troisième étape. Une fois de plus, après extraction des dimères du gel précédent, **5** et **4+400*T** sont mélangés ensemble (devenant **5**) et **4** et **5+400*T'** également (devenant **4**). Du fait du rendement limité de l'extraction après électrophorèse à chaque étape, on ne peut pas constituer de références pour cette dernière étape. **4** et **5** sont incubés à température ambiante pendant une heure avec un excès ($\times 400$) de **T** et **T'** respectivement, à 80 mM en NaCl avant l'analyse électrophorétique (figure 2.10c-i).

Les coupes transverses de la figure 2.10c-ii montrent que **4+400*T** (trait plein noir) a une mobilité électrophorétique plus faible que **5+400*T'**, démontrant une fois de plus que la réaction a effectivement eu lieu dans ces conditions expérimentales, pour la troisième

fois consécutive. Les données présentées dans les sections précédentes du manuscrit ont été obtenues dans les mêmes conditions mais avec un temps d'incubation plus faible, suggérant que les réactions de cette étape sont également totales.

2.5 Conclusions

En conclusion, nous avons produit des dimères de nanoparticules d'or reliées par un unique brin d'ADN dynamique. La distance bord-à-bord des particules varie d'un facteur 3 dans des conditions expérimentales douces et pour un faible excès de la molécule d'ADN cible lors de l'ouverture de la boucle en épingle à cheveux. En combinant les propriétés optiques des nanoparticules d'or à leur résonance plasmon, la variation de distance de 10 nm fournit de nombreuses opportunités pour la conception de capteurs biochimiques, à l'échelle de la molécule unique, ou d'agents photothermiques activables chimiquement.

En particulier, notre procédé de fabrication est compatible avec des nanoparticules d'or de diamètre allant jusqu'à 40 nm, ce qui pourrait fournir des sections efficaces d'absorption et de diffusion significatifs [20, 121]. De plus, la conception de l'échafaudage d'ADN est flexible dans la mesure où le débord simple brin nécessaire à une cinétique favorable de fermeture de la boucle a une séquence indépendante du reste de l'échafaudage et peut inclure une séquence aptamère pour être sensible à une large gamme d'analytes biochimiques [149, 166].

Assemblage de dimères de particules d'or de diamètres supérieurs à 40 nm

Table des matières

3.1	Contexte	58
3.2	Synthèse avec contrôle du nombre de brins d'ADN	59
3.2.1	Fonctionnalisation contrôlée des nanoparticules d'or	59
3.2.2	Formation des dimères	61
3.3	Synthèse minimisant le nombre de brins liants	62
3.3.1	Principe	62
3.3.2	Conjugaison or-ADN	63
3.3.3	Fabrication des dimères	63
3.4	Optimisation de la stabilité colloïdale par la chimie de surface	66
3.4.1	Généralités	66
	Terminologie	66
	Estimation de la longueur des ligands	67
3.4.2	Chaîne poly(éthylène)glycol : <i>E16m</i>	68
	Stabilité colloïdale	68
	Greffage de l'ADN	69
	Synthèse des dimères	70
3.4.3	Ligands amphiphiles	70
	Généralités	70
	Optimisation de la passivation	71
	Stabilité colloïdale	73
	Fabrication de dimères, terminaison en acide carboxylique	73
3.5	Dimères de nanoparticules d'or de 60 nm de diamètre	75
3.5.1	Accrochage d'ADN	75
3.5.2	Synthèse des dimères	77

3.6 Conclusions 78

L'utilisation de groupements de nanoparticules d'or sur ADN, présentant de forts couplages plasmon, a permis le développement de plusieurs applications originales telles que les capteurs colorimétriques [14,23] ou la diffusion Raman exaltée [118,119] et l'exaltation de fluorescence de molécules organiques [120,121]. L'optimisation de ces phénomènes optiques nécessite de contrôler précisément l'environnement chimique des nanostructures, que ce soit pour optimiser la sensibilité d'un capteur ou positionner de manière contrôlée une molécule dans une zone d'exaltation électromagnétique.

Une solution est de contrôler précisément le nombre de brins d'ADN greffés à la surface de chaque particule, ce que les techniques d'électrophorèse sur gel d'agarose ou de chromatographie en phase liquide rendent possible [19,160]. Cela permet, de plus, de ne pas créer de réseaux tridimensionnels [13] et d'avoir un groupement bien défini de particules [99]. Cependant, les différentes étapes de transfert de ligands nécessaires à la fonctionnalisation contrôlée de particules d'or par de l'ADN limitaient autrefois cette approche à des particules de 20 nm de diamètre pour deux raisons [19,160] :

- d'une part, la différence de volume hydrodynamique entre une particule seule (non hybridée) et une particule hybridée avec un seul brin d'ADN (d'environ 100 bases maximum), permettant de séparer ces structures directement par électrophorèse, n'est suffisante que pour des petites particules (< 20 nm) et non pas pour des particules plus larges ($d \approx 40$ nm) si l'on considère les mêmes brins d'ADN.

- d'autre part, l'augmentation du diamètre des nanoparticules rend la fabrication de nanostructures plus difficile car elle entraîne une diminution de la stabilité colloïdale en présence des contre-ions nécessaires à l'interaction entre des brins d'ADN et des particules chargées négativement.

Or, les particules d'or de diamètre inférieur à 20 nm possèdent des sections efficaces de diffusion faibles (voir chapitre 1), limitant leur utilisation à des mesures optiques d'ensemble ou à des mesures d'absorption et d'extinction (par imagerie photothermique [167] ou spectroscopie de transmission modulée spatialement [168]). De plus, comme on observe un couplage plasmon efficace uniquement à des distances interparticules inférieures au rayon des particules, les applications citées précédemment nécessitent de travailler avec des distances interparticules de quelques nanomètres seulement.

Il est donc très intéressant de pouvoir contrôler l'environnement chimique de particules d'or de diamètre supérieur à 30 nm, taille à partir de laquelle la diffusion d'une nanoparticule unique est visible à l'œil nu en microscopie à fond noir. Une solution possible est la fonctionnalisation par ADN grâce à l'utilisation de brins d'ADN allongeurs (mentionnés dans le chapitre précédent) [20,155]. En particulier, les travaux de thèse de Mickaël Busson ont démontré la possibilité de fabriquer des dimères de particules de 40 nm de diamètre en modulant la distance interparticule entre 5 et 20 nm grâce à la longueur de l'échafaudage d'ADN [20].

3.1 Contexte

Dans ce chapitre, nous nous intéressons à la fabrication de dimères de nanoparticules d'or de diamètre supérieur à 40 nm. Pour cela, nous hybridons ensemble des nanoparticules sur lesquelles sont greffés des brins d'ADN dont au moins 50 bases sont complémentaires, comme schématisé sur la figure 3.1. De la même manière que dans le chapitre précédent, le brin **C** long de 50 bases possède un groupement thiol à son extrémité 3'. Le brin **S** est constitué de 104 bases et possède un groupement thiol situé sur son extrémité 5'.

Les 50 premières bases de **S** (dans le sens 3' vers 5') sont complémentaires de **C** de telle sorte que l'hybridation entre **S** et **C** se fasse perpendiculairement à l'axe du dimère. La séquence **S** possède une boucle en épingle à cheveux dans ses 50 dernières bases. Dans ce chapitre, la taille de la tige de la boucle d'ADN incluse dans la séquence **S** est de 20 paires de bases. Les dimères peuvent être fabriqués directement ouverts si, au départ, les 50 dernières bases de **S** (où se trouve la tige-boucle) sont hybridées avec le brin **T**.

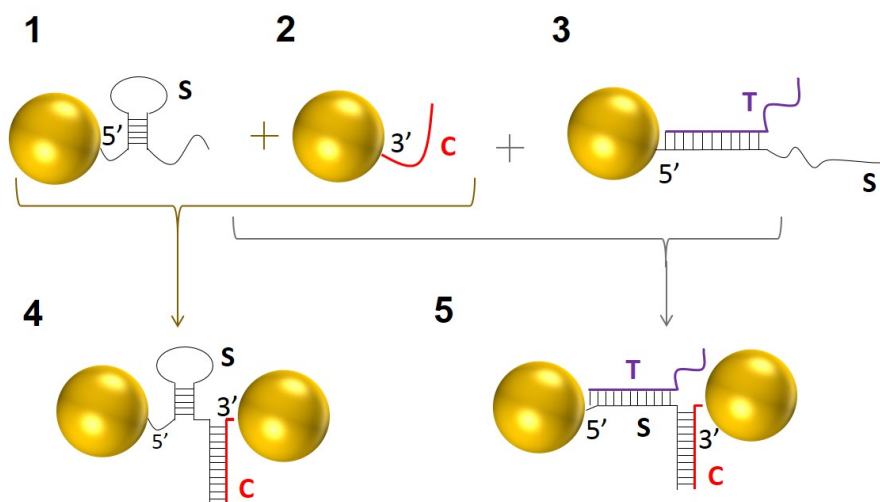


Figure 3.1 – Schéma de fabrication de dimères fermés (**4**) et ouverts (**5**), par hybridation de brins d'ADN complémentaires greffés à la surface de nanoparticules d'or (**1** avec **2** et **3** avec **2** respectivement).

Cette technique de fabrication de dimères en solution présente l'avantage de nous permettre de choisir des chimies de surface différentes sur chacune des deux particules. D'un autre côté, elle oblige à contrôler précisément le nombre de brins attachés sur chaque surface pour ne pas créer d'agrégats tridimensionnels [14]. Pour cette raison, nous étudierons dans ce chapitre deux techniques permettant de fabriquer des dimères de nanoparticules en contrôlant le nombre de brins d'ADN.

La première permet un contrôle précis du nombre de brins par particule tandis que la deuxième ne fait que minimiser le nombre de brins par particule pour fabriquer des dimères. Nous nous concentrerons sur la fabrication de dimères avec des particules mesurant respectivement 40 et 60 nm de diamètre et étudierons les effets de différentes chimies de surface sur la synthèse et la stabilité des suspensions colloïdales. Les protocoles expérimentaux décrits dans la suite, permettant de fabriquer des nanoparticules possédant un unique brin d'ADN, s'appliquent aux séquences d'ADN respectives des deux nanoparti-

cules utilisées pour former les dimères. Nous retrouverons dans ce chapitre de nombreux éléments de chimie de surface détaillés dans la partie précédente. Les protocoles expérimentaux détaillés se trouvent en annexe.

3.2 Synthèse avec contrôle du nombre de brins d'ADN

3.2.1 Fonctionnalisation contrôlée des nanoparticules d'or

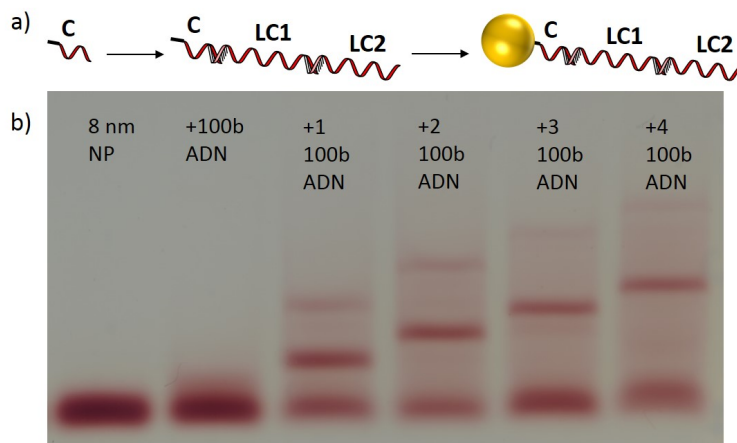


Figure 3.2 – a) Schéma d'accrochage d'un court brin d'ADN **C** hybridé avec deux brins allongeurs **LC1** et **LC2**. b) Purification électrophorétique de nanoparticules d'or de 8 nm de diamètre seules (colonne 1) et après incubation avec un ADN de 100 bases **C** hybridé avec 0 à 4 brins allongeurs **LC** (colonnes 2 à 6).

Cette section s'appuie sur les résultats des travaux de Mickaël Busson et Sébastien Bidault obtenus récemment à l'Institut Langevin. Nous allons voir comment le contrôle précis du nombre de brins d'ADN attachés à une particule a été développé [19, 155] et optimisé pour des particules de diamètre supérieur à 20 nm [20]. Tout d'abord, il est nécessaire que la différence de volume hydrodynamique entre la particule seule et la particule sur laquelle est greffé un unique brin d'ADN soit suffisamment importante pour qu'elles puissent être séparées par électrophorèse.

Dans le cas d'un ADN simple brin de 100 bases accroché sur une particule de 40 nm de diamètre, la différence de volume n'est pas suffisante. La technique consiste donc à augmenter temporairement la taille (et donc le volume) des brins **S** ou **C** en les hybridant successivement avec plusieurs autres brins appelés "allongeurs", comme schématisé sur la figure 3.2a. Les billes utilisées dans la figure ne mesurent que 8 nm de diamètre mais permettent de visualiser plus clairement l'augmentation de volume hydrodynamique induit par la présence d'allongeurs successifs. Ces différents brins allongeurs L_i sont des ADN simples brins de 100 bases. Connaissant les séquences de **S** et **C**, il est possible de composer des séquences **LS1** et **LC1**, longues de 100 bases, qui s'hybrident uniquement sur les 15 bases de **S** et **C** placées à l'opposé de la fonction trithiol.

Nous avons utilisé un logiciel commercial permettant de déterminer toutes les énergies d'interactions, spécifiques et non spécifiques, entre les différents brins considérés (Vector

NTI Advance 10). Les 15 premières bases de **LS1** sont donc déterminées par la séquence de **S** et les 15 dernières bases sont choisies pour se lier à **LS2**. Les 70 autres bases sont des thymines pour que seule l'hybridation sur les 15 bases choisies soit stable à température ambiante (température de fusion typiquement entre 40 et 50 °C). La même procédure est utilisée pour définir les séquences de **LS2** à **LS5**.

Cette technique permet ainsi d'hybrider de nombreux brins successifs afin de fabriquer une longue chaîne de plusieurs centaines de bases. Par ailleurs, les séquences de 15 bases permettant l'hybridation de deux brins successifs sont incompatibles les unes avec les autres pour maîtriser parfaitement la longueur du brin formé. Cela implique que tous les allongeurs s'hybrident dans le même ordre à chaque fois. De plus, un excès progressif est ajouté pour chaque allongeur afin d'éviter une distribution de brins d'ADN **LS1**→**LSn** de différentes longueurs dans l'échantillon. Finalement, pour minimiser le coût de la procédure et compte tenu de la position de la fonction trithiol sur **S** (en 5') et **C** (en 3'), nous avons conçu ces séquences telles que **LS3** et **LC2** soient les mêmes brins d'ADN.

Stabilisation colloïdale spécifique. La fonctionnalisation des nanoparticules d'or est obtenue, comme dans le chapitre précédent, en greffant des brins d'ADN thiolés sur des particules d'or stabilisées par la BSPP en présence de NaCl et d'un faible excès de BSPP.

Une particularité par rapport au chapitre précédent est que chaque particule est ensuite stabilisée avec une chimie de surface différente. Dans le but d'étudier les propriétés optiques de dimères individuels en chambre microfluidique, on choisit les chimies de surface telles que seulement l'une des deux particules du dimère puisse se greffer sur une surface de silice fonctionnalisée, comme détaillé dans le chapitre 4.

La particule devant rester en suspension est stabilisée, comme précédemment, avec un oligomère d'éthylène glycol thiolé et méthylé (*E6m*) dont la formule topologique est rappelée sur la figure 3.3a. L'autre particule est couverte d'un mélange de *E6m* et d'un autre court oligomère de PEG thiolé à une extrémité et possédant une biotine à l'autre extrémité, que nous nommerons biotine-PEG (figure 3.3b). Ce mélange (bio-*E6m*) est obtenu avec un excès de *E6m* (x 8,3 par rapport à la quantité de biotine-PEG). Dans toute la suite, la particule d'or sur laquelle est greffé l'ADN possédant la tige-boucle **S** sera recouverte du bio-*E6m*, tandis que l'autre, associée à **C**, sera recouverte de *E6m*.

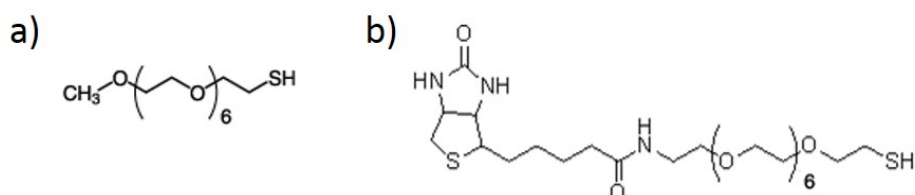


Figure 3.3 – Formules topologiques du *E6m* (a) et du biotine-PEG (b)

Stabilisation colloïdale non-spécifique. Comme indiqué dans les chapitres précédents, une certaine quantité de sel doit être présente dans la solution pour pouvoir greffer de l'ADN sur des nanoparticules d'or compte tenu de leurs charges négatives respectives.

Cependant, il a été démontré qu'un large excès d'ADN simple brin en solution augmentait la stabilité colloïdale des nanoparticules en présence de sel [100, 169]. Cette stabilisation est due à une adsorption non-spécifique des bases hydrophobes de l'ADN à la surface des particules d'or. La partie hydrophile chargée de l'ADN stabilise alors les nanoparticules.

En pratique, dans le protocole expérimental utilisé, le greffage d'ADN se fait par incubation dans une solution à 30 mM en NaCl pendant 12 heures. En l'absence d'allongeurs, des nanoparticules de 40 nm stabilisées par le BSPP ont tendance à s'agréger sur ce long temps d'incubation. Les purifications électrophorétiques donnent alors plusieurs bandes correspondant à une agrégation des nanoparticules en dimères, trimères et autres structures plus larges.

En présence des allongeurs qui stabilisent les particules, l'agrégation en présence de sel est négligeable. Par conséquent, afin d'éviter une telle agrégation, un excès d'ADN simple brin est toujours ajouté pendant l'incubation en absence d'allongeurs. Cet ADN est non hybridant, c'est-à-dire que sa séquence ne reconnaît pas celles des brins thiolés se greffant à la particule, ou celles d'autres brins s'hybridant à ces derniers (comme le brin **T**).

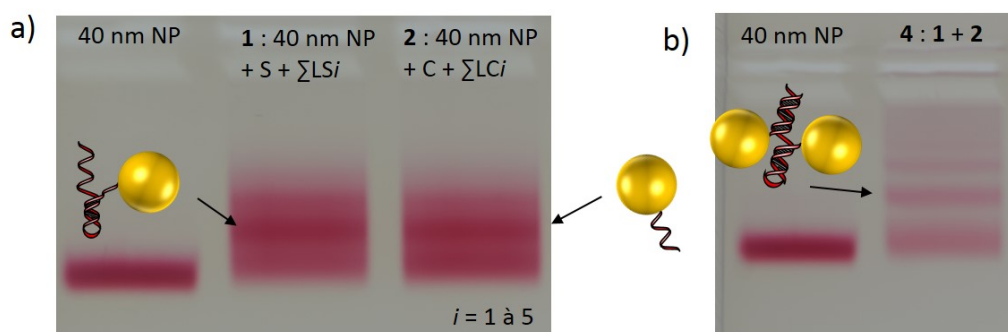


Figure 3.4 – a) Purification électrophorétique de particules de 40 nm monoconjuguées avec **S** (colonne centrale) ou **C** (colonne de droite) et leurs allongeurs respectifs. La bande centrale correspond à la référence (particules seules). b) Purification électrophorétique des dimères résultant de l'hybridation des particules montrées en a).

La figure 3.4a montre la purification électrophorétique des particules de 40 nm de diamètre monoconjuguées par un unique brin d'ADN hybridé par ses allongeurs. Dans cette image, les bandes d'intérêt, désignées par des flèches, sont repérées car elles sont plus sombres que le reste de la bande. Les particules monoconjuguées sont ensuite extraites du gel et reconcentrées par centrifugation.

3.2.2 Formation des dimères

La formation des dimères s'effectue en mélangeant des particules fonctionnalisées en surface par les brins d'ADN complémentaires **S** et **C** ou **S+T** et **C**. Ces brins s'hybrident sur 50 bases et leur formation est donc thermodynamiquement favorisée par rapport à la séparation de **S** et **C** de **LS1** et **LC1**. Il est possible de faire un traitement thermique à 50°C pour favoriser l'élimination des allongeurs. Dans les deux cas, la formation des dimères se fait suite à une incubation de 12h à 40 mM en NaCl.

Les dimères sont ensuite purifiés par électrophorèse comme montré sur la figure 3.4b. La colonne de gauche correspond à une référence de particules non hybridées, tandis que celle de droite représente les particules après incubation. La bande la plus basse correspond aux monomères, le décalage avec la référence étant sans doute causé par l'adsorption non-spécifique d'ADN non hybridant sur les particules. La bande située au-dessus, et désignée par une flèche, correspond aux dimères et les fines bandes plus lentes correspondent à des structures plus larges (trimères, quadrimères, etc) formées par des nanoparticules résiduelles possédant plusieurs brins d'ADN à leur surface.

Après extraction de la bande correspondant aux dimères, une étude par microscopie électronique cryogénique permet d'imager les dimères (figure 3.5). Une telle étude a confirmé la bonne pureté de notre synthèse, au vu des nombreux dimères imagés. Toutefois, il n'a pas été possible d'estimer précisément cette pureté à l'aide des images de cryo-EM. En effet, la densité totale de structures (monomères, dimères, trimères, etc) étant faible lors de l'expérience, nous avons préférentiellement capturé des images montrant des dimères, objet de notre étude, entraînant ainsi une surévaluation de la pureté. Toutefois, la pureté sera estimée au cours des mesures optiques en chambre microfluidique dans les chapitres 4 et 5.

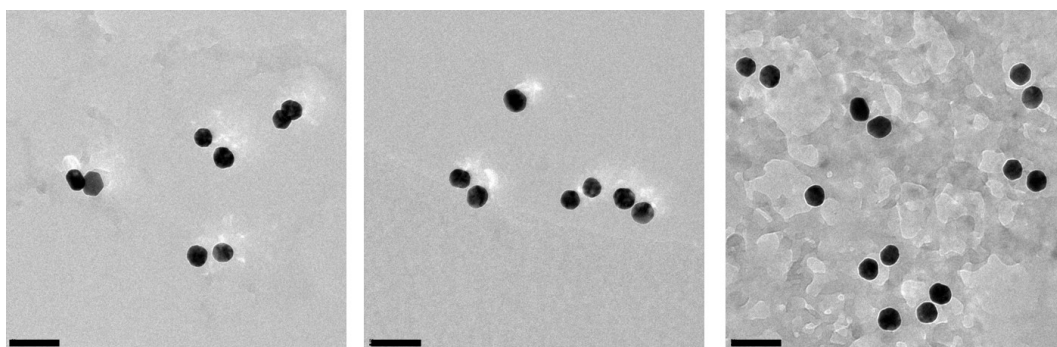


Figure 3.5 – Images cryo-EM indiquant la fabrication préférentielle de dimères de 40 nm (barre d'échelle = 100 nm).

3.3 Synthèse minimisant le nombre de brins liants

3.3.1 Principe

La méthode décrite ci-dessus permet de privilégier le nombre de brins d'ADN greffés par particule d'or. Néanmoins, elle présente quelques inconvénients. Le principal désavantage est l'importante quantité de réactifs utilisés. Cela implique, d'une part, un certain coût économique et, d'autre part, le fait que la détérioration d'un des produits est presque indétectable, compte tenu de la sensibilité de la chimie utilisée.

Une technique permettant de s'affranchir de ces contraintes est de ne pas contrôler précisément le nombre de brins par particules mais de le minimiser, en particulier pour le brin **S** comportant la boucle d'ADN. Lorsque nous mélangeons un excès donné d'ADN trithiolé avec les particules d'or, le nombre de brins greffé par particule suit une loi de Poisson : une population Au_0 où aucun brin n'est greffé par particule, une population

Au_1 correspondant à la liaison covalente d'un brin thiolé, et ainsi de suite en Au_n pour n brins par particule (la somme des Au_n valant 1).

Pour un excès faible, on obtient $Au_0 > Au_1 > \dots > Au_n$. En augmentant le ratio d'ADN par rapport aux particules d'or, on déplace le centre de la distribution. Le but est alors de minimiser l'excès d'ADN pour réduire les populations $Au_{n \geq 2}$ tout en formant une quantité de dimères purifiable par électrophorèse.

3.3.2 Conjugaison or-ADN

La première étape de cette synthèse consiste à incuber, pendant une nuit, des particules d'or avec des quantités croissantes d'ADN trithiolé, à 25 mM en NaCl et en présence de BSPP. La figure 3.6a est un résultat de purification électrophorétique des particules après stabilisation par *E6m* ou bio-*E6m*. Les colonnes 1 et 6 sont des références qui correspondent à des particules d'or de 40 nm recouvertes respectivement de bio-*E6m* et de *E6m*. On voit que les particules recouvertes de bio-*E6m* sont plus lentes que celles recouvertes de *E6m*. Cela s'explique par la différence de volume hydrodynamique entre le biotine-PEG (plus gros) et le *E6m*.

Les colonnes 2 à 5 correspondent à des particules associées à l'ADN **S** et les colonnes 7 à 10 à l'ADN **C**. Les colonnes 2 et 7 correspondent à des particules d'or incubées avec un très faible excès d'ADN (x 5 de **S** et x 12,5 de **C** par rapport aux quantités de particules d'or, respectivement). On n'observe pas de décalage notable avec les bandes de référence correspondantes. Cela signifie que les particules possèdent à leur surface une quantité faible voire nulle d'ADN.

Dans les colonnes 2 à 5 d'une part et 7 à 10 d'autre part, la concentration d'ADN est augmentée d'abord par un facteur 6 (ou 4), puis par un facteur 2, comme indiqué sur la figure 3.6a. On observe clairement l'effet de l'augmentation de la quantité d'ADN trithiolé : les bandes électrophorétiques sont de plus en plus lentes. Ce ralentissement progressif témoigne du nombre croissant de brins d'ADN trithiolé greffés sur les particules, augmentant leur volume hydrodynamique. Compte tenu des faibles quantités d'ADN utilisées, ces expériences sont effectuées avec un large excès d'ADN non hybridant pour stabiliser de manière non-spécifique la suspension colloïdale. Cet ADN non hybridant en large excès minimise également l'adsorption non-spécifique d'ADN thiolé à la surface des particules d'or.

3.3.3 Fabrication des dimères

Les particules ayant des brins complémentaires sont mélangées deux à deux (colonne 2 avec 7, 3 avec 8, 4 avec 9, et 5 avec 10), à 40 mM en sel, et laissées à incuber pendant une nuit. De plus, chacune des références est aussi extraite du gel et incubée à 40 mM en NaCl pour une nuit. La figure 3.6b montre les résultats de la purification électrophorétique effectuée après incubation sur les six suspensions précédentes. Les colonnes 1 et 2 correspondent respectivement aux références *E6m* et bio-*E6m*. L'absence de bande d'agrégation dans ces colonnes indique que les bandes de dimères dans les autres colonnes proviennent effectivement de l'hybridation des brins d'ADN complémentaires.

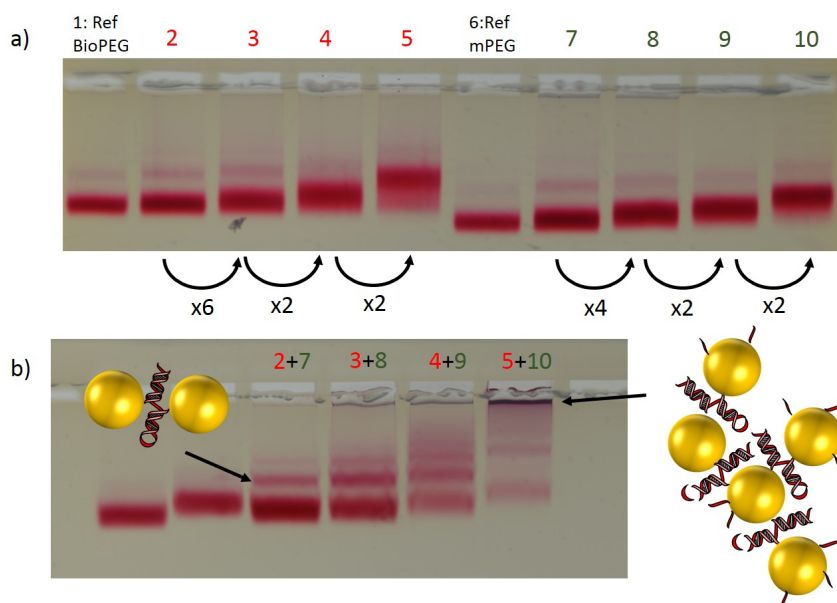


Figure 3.6 – a) Purification électrophorétique de particules de 40 nm incubées avec une concentration croissante en ADN trithiolé **C** (colonnes 2-5) ou **S** (colonnes 7-10). Les flèches indiquent le facteur de multiplication de la concentration en ADN entre chaque colonne. Les billes sont passivées en bio-*E6m* (colonnes 1-5) ou en *E6m* (colonnes 6-10). b) Purification électrophorétique de dimères obtenus par hybridation respective des particules 2 et 7, 3 et 8, 4 et 9, et 5 et 10. Les deux premières colonnes correspondent respectivement aux références passivées en bio-*E6m* et *E6m*.

Dans la colonne "2+7", qui correspond à la réaction entre les monomères présentant la quantité minimale d'ADN, on observe une large bande rapide correspondant à des monomères et une fine bande plus lente de dimères, indiquée par une flèche. Cela signifie que la majorité de l'échantillon est constituée de particules qui n'ont pas réagi, sans doute parce que peu de particules possèdent à leur surface de l'ADN greffé. La faible bande de trimères confirme la probabilité élevée que les dimères formés ne possèdent qu'un seul brin d'ADN par particule.

En étudiant les colonnes "3+8", "4+9" et "5+10", on remarque que l'intensité de la bande de monomères diminue tandis que des bandes représentant des structures plus complexes (trimères, quadrimères...) apparaissent et sont de plus en plus denses optiquement. Cela provient du fait que les particules de plus en plus recouvertes par de l'ADN forment préférentiellement de gros agrégats. Dans la colonne "5+10", on observe une coloration bleue dans le puits qui provient du couplage plasmon entre les différentes particules constituant de larges structures tridimensionnelles. La taille de ces structures est plus importante que celle des mailles du gel d'électrophorèse, les empêchant ainsi d'entrer dans le gel.

Par ailleurs, en comparant les bandes de dimères dans chacune des colonnes, on remarque qu'elles sont également de plus en plus ralenties en se déplaçant vers le côté droit du gel. Cela signifie que le volume hydrodynamique des dimères est de plus en plus important, du fait de la plus grande épaisseur de l'excès de brins d'ADN greffés sur les particules par rapport à la couche de *E6m* ou bio-*E6m*. Cette observation soulève le problème de la cinétique des réactions. En effet, si les dimères sont recouverts d'ADN, alors en incubant plus longtemps, les brins d'ADN situés à leur surface devraient continuer à s'hybrider afin

de former des structures plus larges.

On peut donc se demander comment évolue le gel si on laisse les réactions se faire pendant plusieurs jours. Une expérience a donc été menée afin de déterminer l'effet du temps d'hybridation sur la synthèse des dimères. Pour cela, le même protocole que précédemment a été effectué avec des temps d'hybridation de 12 et 120 heures. La figure 3.7 compare les gels de purification obtenus pour chacun des temps d'incubation, 12 heures pour les colonnes 7 à 10 et 120 heures pour les colonnes 3 à 6. On remarque que lorsque le temps de réaction augmente, il y a plus de structures complexes qui se forment lorsque la concentration en ADN est importante.

Par exemple, on distingue dans la colonne 4 des trimères et des quadrimères tandis que la colonne 8 (correspondant à un temps d'incubation plus court) laisse apparaître majoritairement des dimères et quelques trimères. Cela signifie qu'après 12 heures d'incubation, tous les brins d'ADN greffés sur les particules n'ont pas réagi. De même, bien que la colonne 10 montre de nombreuses structures différentes, la colonne 6 présente toute la gamme possible des structures, du monomère à l'agrégat bleuté. En effet, les particules ne possèdent à leur surface qu'un nombre discret de brins d'ADN et une fois que tous les brins sont hybridés, le système est en quelque sorte figé.

Cela confirme le fait que le greffage des brins d'ADN sur des nanoparticules d'or se fait suivant une distribution particulière, les particules possédant peu de brins à leur surface donnant des dimères et des trimères, et les autres des structures plus larges. En revanche, si l'on compare les colonnes 3 et 7 pour lesquelles la concentration en ADN est plus faible, on observe des bandes similaires avec majoritairement des monomères, quelques dimères et une bande quasi-inexistante de trimères. Cela signifie qu'au bout de 12 heures, la grande majorité des brins d'ADN présents sur la surface des particules se sont hybridés avec des séquences complémentaires. Le fait qu'il n'y ait pas plus de trimères au bout de 120 heures confirme que les dimères formés possèdent préférentiellement un brin par particule.

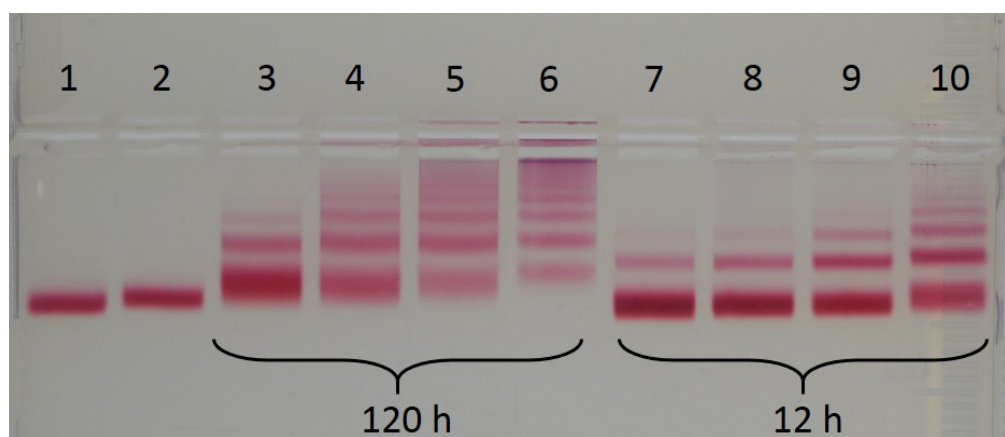


Figure 3.7 – Purification électrophorétique de nano-assemblages obtenus par hybridation de particules greffées avec de plus en plus de brins d'ADN complémentaires (colonnes 3 à 6 et 7 à 10) pendant 120 heures (colonnes 3-6) et pendant 12 heures (colonnes 7-10). Les colonnes 1 et 2 montrent les références recouvertes respectivement de *E6m* et de bio-*E6m*.

3.4 Optimisation de la stabilité colloïdale par la chimie de surface

3.4.1 Généralités

L'utilisation d'oligomères et de polymères d'éthylène glycol est très répandue dans des applications biomédicales car ce composé permet de rendre des objets (par exemple des molécules actives) quasiment invisibles au système immunitaire [7]. De plus, la possibilité de moduler la longueur des ligands, leur composition et leur chimie terminale les rend particulièrement versatiles et permet de moduler les propriétés physico-chimiques de suspensions de nanoparticules d'or [170].

Dans cette thèse, nous avons jusqu'ici utilisé comme chimie de surface un ligand composé de 6 monomères d'éthylène glycol ayant comme groupements terminaux un thiol et un méthyl éther ou une biotine. Nous allons étudier l'utilisation de différentes chimies de surface pour la fabrication de dimères de nanoparticules d'or. Nos ligands possèdent toujours une terminaison thiol permettant le greffage sur les particules d'or. En gardant une base de polyéthylène glycol, nous étudierons l'effet de la taille de la chaîne, de la chimie terminale mais aussi de la présence d'un oligomère d'alkyle se situant entre la chaîne PEG et la terminaison thiolée du ligand et rendant le ligand amphiphile. L'intérêt de ligands amphiphiles est d'augmenter la stabilité colloïdale de particules d'or [171], mais aussi de minimiser les échanges de ligands en milieu complexe, comme un milieu intracellulaire [24, 172].

Terminologie

Nous allons comparer six ligands d'intérêt qui diffèrent par leur taille, leur structure chimique et leur chimie terminale. La formule brute de ces ligands est $\text{HS}-(\text{CH}_2)_m\text{-EG}_n\text{-R}$. La formule topologique de $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}\text{-EG}_n\text{-OCH}_2\text{-COOH}$ est représentée sur la figure 3.8b.

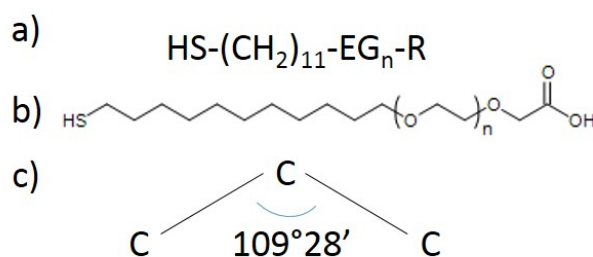


Figure 3.8 – a) Formule brute générale des ligands utilisés dans la chimie de surface des nanoparticules d'or. b) Formule topologique d'un exemple de ligand où R est un groupement carboxyle. c) Représentation de l'angle de liaison d'un groupe alkyle.

Par souci de concision, nous utiliserons la terminologie allégée suivante : $AmEnR$ où m désigne la nombre d'atomes de carbone de la chaîne Alkyle, n le nombre de monomères d'Éthylène glycol et R une abréviation de la chimie terminale : m pour **m**éthyl éther

(-OCH₃), *a* pour alcool (-OH) et *c* pour acide carboxylique (-OCH₂-COOH). La composition chimique des six ligands ainsi que leur masse moléculaire et une estimation de leur longueur sont récapitulées dans le tableau 3.1.

Dans la suite, les chimies de surface des deux particules constituant un dimère seront toujours différentes. En particulier, une seule d'entre elles possédera des biotines à sa surface, permettant son accrochage sur une surface de verre fonctionnalisée. Les biotines proviendront du même biotine-PEG (possédant six monomères d'éthylène glycol) utilisé dans l'expérience précédente.

Nous utiliserons ainsi un mélange biotine-PEG/ligand d'intérêt de ratio 1 : 8,3 pour recouvrir l'une des particules et le nommerons "bio-*AnEmR*". L'autre particule sera uniquement recouverte du ligand d'intérêt. En particulier, seules les particules greffées avec l'ADN possédant la boucle ouverte (**S+T**) seront recouvertes avec le mélange "bio-*AnEmR*". Ainsi, dans la suite, nous détaillerons uniquement la synthèse des dimères lorsque la boucle d'ADN est ouverte.

Table 3.1 – Tableau récapitulatif des propriétés des six chimies de surface étudiées : nom, terminaison chimique de la chaîne (Ac. carbox. : acide carboxylique), masse molaire (MW), longueur approximative de la chaîne et concentration saline entraînant l'agrégation C_{max} .

Nom	Terminaison	MW (u)	Longueur (nm)	C_{max}
E6m	Méthyl éther	356,5	2	50
E16m	Méthyl éther	800	4,8	75
A6E3m	Méthyl éther	280,4	1,9	75
A6E3c	Ac. carbox.	324,4	2,1	125
A6E4a	Alcool	310,5	2	75
A11E6c	Ac. carbox.	526,7	3,5	> 500

Estimation de la longueur des ligands

Pour estimer la longueur de la chaîne, nous utilisons les résultats obtenus dans la référence [173]. Dans le cas de ligands alkyl-PEG greffés sur une surface d'or, les chaînes alkyls sont inclinées de 30° par rapport à la surface d'or tandis que les groupements éthylène glycol sont dans une configuration en hélice. Dans ces conditions, les auteurs obtiennent une longueur de 1,1 ångströms pour une liaison alkyle et de 2,78 ångströms pour un groupement éthylène glycol. Les longueurs de la liaison C-S et du groupement chimique terminal sont estimées à partir des distances intermoléculaires et en prenant compte de l'inclinaison des liaisons les unes par rapport aux autres, comme schématisé sur la figure 3.8c. Nous utilisons les valeurs suivantes pour les longueurs de liaisons :

- d_{CC} =154 pm (hybridation $sp^3 - sp^3$)
- d_{CO} =143 pm (alcane)
- d_{CS} =183 pm

3.4.2 Chaîne poly(éthylène)glycol : *E16m*

Stabilité colloïdale

Nous avons vu en détail la fabrication de dimères ayant comme chimie de surface une chaîne de six monomères d'éthylène glycol terminée par un groupement méthyle. Nous allons étudier l'influence de la longueur de ce ligand en détaillant la synthèse de dimères utilisant des ligands possédant en moyenne 16 monomères avec le même groupement terminal. Lorsque l'on travaille avec une nouvelle chimie de surface, la première étape consiste à vérifier qu'elle s'accroche effectivement à la surface des nanoparticules. Pour cela, une expérience simple est de prendre une solution de nanoparticules (recouvertes de BSPP) que l'on place à la force ionique minimale entraînant l'agrégation. La solution passe lentement d'une coloration rose à bleu foncé. En ajoutant un large excès de ligand dans la solution, la solution doit redevenir rose en quelques secondes s'il fonctionne correctement.

Ensuite, nous devons estimer les nouvelles propriétés de stabilité de la solution colloïdale. Pour cela, après 30 minutes d'incubation d'un large excès de ligand avec des nanoparticules d'or (recouvertes de BSPP), nous augmentons la concentration en sel par palier de 25 mM. Après chaque nouvelle augmentation de la force ionique, nous attendons plusieurs minutes et vérifions si l'échantillon est devenu bleuté, synonyme d'agrégation. Tant que les particules ne sont pas agrégées, nous renouvelons la manipulation. Une fois la suspension agrégée, nous relevons la valeur de la force ionique qui a entraîné l'agrégation de la solution, que l'on nomme C_{max} .

Les différentes valeurs d'agrégation C_{max} sont rassemblées dans le tableau 3.1. Il est cependant nécessaire de rappeler que les valeurs données dans le tableau ne sont pas très précises, bien qu'elles soient toutes déterminées par le même protocole. En effet, une étude précise des phénomènes d'agrégation de solutions colloïdales nécessite généralement d'utiliser les variations du signal optique obtenu avec un spectromètre et prend en compte la cinétique d'agrégation de la solution. Cependant, la valeur C_{max} déterminée par notre protocole est suffisante pour nous permettre de choisir la force ionique à utiliser lors de l'étape de synthèse des dimères.

En effet, lors de cette étape, il est nécessaire de choisir une concentration en sel inférieure à C_{max} mais néanmoins suffisamment élevée pour permettre le rapprochement des particules entre elles et rendre possible l'hybridation des brins d'ADN complémentaires. Pour rappel, lors de la première étape d'accrochage des brins d'ADN sur la surface des particules, celles-ci sont encore recouvertes de BSPP et s'agrègent donc à 40 mM. Ainsi, quelle que soit la chimie de surface utilisée ultérieurement, la première étape s'effectue à 25 mM en sel.

Les valeurs de C_{max} que nous obtenons pour les ligands *E6m* et *E16m* sont respectivement 50 mM et 75 mM. Cela signifie qu'en augmentant la taille du ligand, on accroît la stabilité des particules vis-à-vis de la force ionique. Cela provient du fait que les chaînes polymériques du ligand *E16m* sont plus longues, ce qui augmente l'entropie liée à leurs entremêlements lorsque deux particules se rapprochent, favorisant ainsi la stabilité de la suspension.

Greffage de l'ADN

Nous utilisons un protocole semblable à celui décrit précédemment. Les particules sont incubées avec différentes quantités d'ADN (**C** ou **S+T**), du BSPP et à 25 mM en sel pendant une nuit. 30 minutes avant de les purifier avec un gel d'électrophorèse à 1,5%, les particules greffées avec l'ADN **C** (resp. **S+T**) sont mélangées avec un excès de *E16m* (resp. bio-*E16m*). La photographie du gel d'électrophorèse correspondant se trouve sur la figure 3.9a.

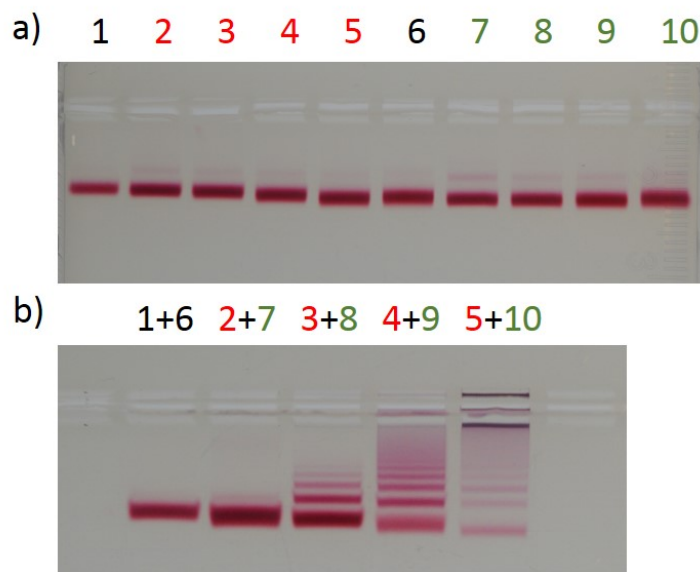


Figure 3.9 – a) Purification électrophorétique de particules de 40 nm incubées sans ADN (colonnes 1 et 6) ou avec une concentration croissante en ADN **C** (colonnes 2-5) ou **S+T** (colonnes 7-10). Les flèches indiquent le facteur de multiplication de la quantité d'ADN entre chaque colonne. Les billes sont passivées en *E16m* (colonnes 1-5) ou en bio-*E16m* (colonnes 6-10). b) Purification électrophorétique de dimères obtenus par hybridation respective des particules de 2 et 7, 3 et 8, 4 et 9, et 5 et 10. La première colonne correspond au mélange des références passivées en *E16m* et bio-*E16m*.

On observe tout d'abord que, contrairement à l'expérience menée avec du *E6m* (figure 3.6a) où l'augmentation de la quantité d'ADN ralentissait la migration électrophorétique, elle est accélérée lorsque les particules sont passivées avec du *E16m*. Comment expliquer ces différences ? Nous avons vu que la mobilité électrophorétique était déterminée par le volume hydrodynamique et la charge surface des particules. La référence est une particule recouverte exclusivement de ligands PEG (*E6m* ou *E16m*), qui n'est pas électriquement chargée. Lorsque l'on greffe des brins d'ADN sur une particule, deux effets s'opposent. Tout d'abord, le volume hydrodynamique augmente car les brins d'ADN sont plus grands que les ligands de PEG, ce qui ralentit en principe la migration dans le gel. D'autre part, les brins d'ADN étant chargés négativement, ils sont supposés accélérer la migration des particules.

Par conséquent, ce qui définit comment les vitesses de migration évoluent lorsque les particules se recouvrent progressivement d'ADN est la différence de volume entre le ligand et l'ADN. Dans le cas du *E6m*, la différence de volume est grande. Dès lors, lorsque l'on

remplace des ligands par des brins d'ADN, le ralentissement lié à l'augmentation du volume hydrodynamique est supérieur à l'accélération provenant des charges négatives de l'ADN. Dans le cas des ligands *E16m*, la différence de volume entre le ligand et l'ADN étant plus faible, c'est la contribution des charges de l'ADN qui domine l'évolution de la migration électrophorétique des particules.

Dans le cas du bio-*E16m*, la mobilité électrophorétique ne varie pas lorsque les quantités d'ADN augmentent. Si l'on compare les deux références (colonnes 1 et 6 sur la figure 3.9a), on constate que les particules recouvertes de bio-*E16m* sont plus rapides que celles recouvertes de *E16m*. Cela signifie que le volume de la chimie de surface du mélange *E16m* avec du biotine-PEG est plus faible que celui du *E16m* seul, ce qui est normal puisque les chaînes du biotine-PEG sont plus courtes que celles du *E16m*. Dans ce cas, l'accélération apportée par les charges d'ADN est égale au ralentissement lié à l'augmentation de la taille de la particule, donnant ainsi des particules possédant toute la même mobilité électrophorétique.

Synthèse des dimères

Une fois toutes les particules récupérées et reconcentrées par centrifugation, elles sont mélangées deux à deux (1 avec 6, 2 avec 7, 3 avec 8, 4 avec 9 et 5 avec 10) et incubées à 40 mM en NaCl pendant une nuit. Le gel d'électrophorèse correspondant à leur purification est présenté sur la figure 3.9b. On remarque que le mélange des références placé aussi à 40 mM en NaCl n'a pas donné de bandes de dimères agrégés, confirmant que les dimères de nos synthèses proviennent effectivement de l'hybridation de brins d'ADN. La colonne "2+7" présente peu (voire aucun) dimère, sans doute parce que trop peu de particules avaient initialement un brin d'ADN greffé à leur surface.

Les deux colonnes suivantes montrent plusieurs bandes très distinctes correspondant aux différents types de structure possibles (monomères, dimères, trimères, etc). Finalement, la bande la plus à droite, correspondant aux particules les plus recouvertes d'ADN, montre essentiellement des agrégats bleutés trop larges pour rentrer dans le gel. Dans ce cas-ci, la bande correspondant à "3+8" permet d'obtenir des dimères avec peu d'ADN à leur surface. Cependant, la présence de trimères et de quadrimères laisse supposer qu'il est possible d'abaisser davantage la concentration en ADN.

En conclusion, nous avons montré la fabrication de dimères avec une boucle ouverte présentant une stabilisation par un PEG plus long que précédemment. Ces chimies de surface ne diffèrent toutefois que par la longueur de l'oligomère d'éthylène glycol. Nous allons désormais analyser la synthèse de dimères avec une chimie de surface amphiphile.

3.4.3 Ligands amphiphiles

Généralités

Nous avons représenté la formule topologique des ligands alkyle-PEG sur la figure 3.8b. Les chaînes alkyles hydrophobes, représentées en rouge sur la figure 3.10b, se situent entre les groupements thiols et les monomères de PEG, hydrophiles, représentés en bleu. Le but de ces ligands est de stabiliser les suspensions colloïdales de manière plus efficace que les

ligands uniquement hydrophiles. En effet, dans ce cas, si deux particules se rapprochent, l'interpénétration de ses ligands hydrophiles peut être totale alors que, pour des ligands amphiphiles, la partie hydrophile de l'une ne peut pénétrer la partie hydrophobe de l'autre, comme indiqué sur la figure 3.10a-b. Ce processus explique la stabilité colloïdale supérieure de particules métalliques stabilisées par des ligands alkyle-PEG [171, 172].

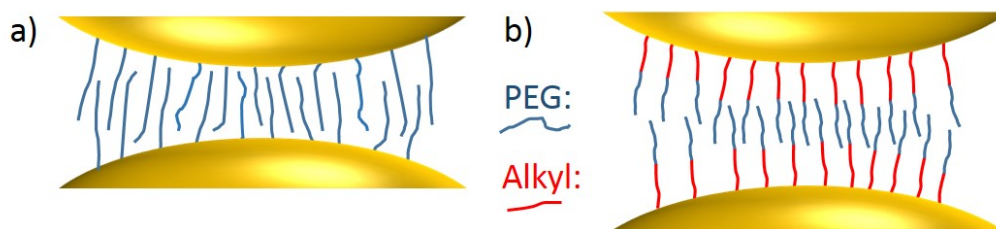


Figure 3.10 – Schéma de deux particules agrégées lorsqu'elles sont recouvertes de PEG (a) ou d'alkyle-PEG (b).

Comme nous l'avons vu, quatre ligands alkyle-PEG ont été testés, différant les uns des autres par la taille de la chaîne alkyle, le nombre de groupements éthylène glycol et le groupement chimique terminal, comme résumé dans le tableau 3.1.

En solution aqueuse, les ligands amphiphiles ont tendance à former des micelles qui emprisonnent les groupements thiols dans le centre hydrophobe. Il n'est alors pas possible de les greffer sur la surface des particules d'or. Pour éviter ce problème, il est possible de travailler dans des solutions aqueuses contenant un pourcentage plus ou moins élevé en éthanol [172]. Dans notre cas, les tests d'accrochage des ligands sur les particules, effectués en utilisant des solutions eau/éthanol dans différentes proportions, n'ont pas montré de différence avec l'eau pure. Pour cette raison, les résultats suivants ne concernent que des synthèses effectuées en solution aqueuse.

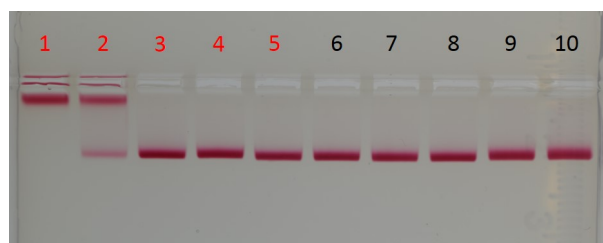
Optimisation de la passivation

L'utilisation d'une nouvelle chimie de surface nécessite de déterminer un protocole permettant de passiver efficacement les particules d'or. L'expérience suivante a deux objectifs : premièrement, déterminer l'excès de ligands alkyle-PEG nécessaire pour passiver entièrement la surface d'une particule d'or, et deuxièmement, optimiser le temps nécessaire à cette passivation. Pour ce faire, nous avons d'une part incubé pendant 30 minutes des nanoparticules d'or avec différents excès de *A6E11c*. D'autre part, nous avons mélangé un large excès donné de ligands avec des particules d'or pendant différents temps d'incubation.

Pour cette expérience, nous avons choisi d'utiliser des particules d'or recouvertes de citrate, et non pas de BSPP, car elles ne migrent pas dans un gel d'électrophorèse, ce qui permet d'identifier facilement le greffage du ligand alkyle-PEG. Les détails du protocole sont donnés dans le tableau 3.2 et le gel d'électrophorèse correspondant se trouve sur la figure 3.11.

Table 3.2 – Tableau récapitulatif des quantités de nanoparticules d’or et de ligand *A6E11c*, du ratio quantité de ligand sur quantité d’or et du temps d’incubation, pour chacune des colonnes du gel de la figure 3.11.

Colonne	n_{or} (pmol)	n_{A6E11c} (pmol)	n_{ligand}/n_{or}	Temps
1	0,02	5,85	293	30 min
2	0,02	58,5	2 925	30 min
3	0,02	585	29 250	30 min
4	0,02	5850	292 500	30 min
5	0,02	23400	1 170 000	30 min
6	0,02	5850	292 500	60 min
7	0,02	5850	292 500	2h
8	0,02	5850	292 500	3h
9	0,02	5850	292 500	4h
10	0,02	5850	292 500	5h

**Figure 3.11** – Purification électrophorétique de nanoparticules d’or incubées avec le ligand alkyle-PEG *A6E11c*. Les ratios entre les quantités d’or et de ligand ainsi que les temps d’incubation sont détaillés dans le tableau 3.2.

Les résultats de la colonne 1 montrent que, pour un excès de ligand d’environ $\times 6$ (par rapport à la quantité de particules), les particules agissent essentiellement comme des particules passivées par des citrates. On remarque que seule une partie des particules de la colonne 2 rentre dans le gel. Cela signifie qu’il n’y a qu’un échange de ligands partiel à la surface des particules. Pour les colonnes 3 à 5, on observe, au contraire, que les particules sont toutes rentrées dans le gel avec des vitesses de migration électrophorétique semblables. Cela signifie que les particules sont entièrement recouvertes de ligand. Nous choisissons donc d’utiliser un excès de $\times 30\,000$ (c’est-à-dire proche de celui fourni par la colonne 3) pour les expériences de fabrication des dimères détaillées après.

Afin de déterminer le temps d’incubation minimal nécessaire à la passivation des particules, nous les avons incubées pendant différentes périodes de temps avec un excès de $\times 292\,500$ (colonnes 6-10). Nous observons que les particules sont toutes rentrées dans le gel et que les bandes correspondantes sont à peu près au même niveau. Cela signifie que le temps de réaction nécessaire à la passivation est inférieur à 30 minutes, temps d’incubation qui sera utilisé à partir de maintenant. Nous voyons par ailleurs dans le gel que les bandes des colonnes 9 et 10 sont légèrement plus lentes que celles des bandes 6 à 8. Cela peut s’expliquer par la formation de multicouches auto-assemblées qui augmentent le volume hydrodynamique des particules par rapport à une monocouche auto-assemblée pour les colonnes 6 à 8 [174].

En conclusion, nous avons démontré la possibilité de passiver complètement les surfaces de nanoparticules d'or avec des ligands alkyle-PEG, en solution aqueuse, en 30 minutes. Nous fixerons par la suite l'excès de ligands par rapport aux particules d'or à $\times 30\,000$, valeur inférieure à celle utilisée pour les expériences avec des ligands hydrophiles (excès de $\times 700\,000$), mais suffisante d'après la figure 3.11.

Stabilité colloïdale

La stabilité colloïdale des suspensions de particules d'or associées à des ligands amphiphiles est testée avec un protocole identique au cas hydrophile. Le tableau 3.1 montre que, à longueur de ligand équivalente, les ligands alkyle-PEG permettent toujours d'atteindre des concentrations en sel plus élevées que les ligands hydrophiles. Ceci confirme l'intérêt d'une chimie de surface amphiphile pour stabiliser les nanoparticules [170, 172].

En particulier, pour les ligands courts, le ligand *A6E3m* donne une stabilité colloïdale supérieure au ligand hydrophile *E6m* malgré une longueur inférieure et un groupement chimique terminal identique. De plus, alors que *A6E3m* et *A6E4a* fournissent des C_{max} identiques, *A6E3c* permet d'augmenter la concentration en sel à longueur équivalente. La valeur de C_{max} plus élevée pour une terminaison acide carboxylique provient probablement de répulsions électrostatiques supérieures, entre particules, dues aux charges négatives surfaciques [91].

Pour ce qui est du ligand *A11E6c*, sa valeur de C_{max} est largement plus élevée que celle de *E16m*, malgré une longueur inférieure. Outre la stabilisation due à l'acide carboxylique terminal, cela signifie surtout que la chaîne hydrophobe de 11 carbones limite nettement l'agrégation entre particules.

En comparant les valeurs de C_{max} pour *A6E3c* et *A11E6c*, on observe que doubler la longueur de la chaîne hydrophobe induit une augmentation de la stabilité colloïdale bien plus élevée qu'en allongeant la chaîne hydrophile (passage de *E6m* à *E16m*). Il y a donc une très forte dépendance de la stabilité des particules vis-à-vis de la longueur de la chaîne alkyle des ligands.

Fabrication de dimères, terminaison en acide carboxylique

Dans cette expérience, nous fabriquons des dimères de nanoparticules d'or en utilisant les ligands *A11E6c* et *A6E3c*. La première étape est identique à celle des expériences précédentes : nous incubons des particules d'or (recouvertes de BSPP) à des concentrations de 25 mM en NaCl et 1,5 mM en BSPP, avec différentes quantités d'ADN trithiolé (**C** ou **S+T**) et un large excès d'ADN non hybridant. La figure 3.12a montre la purification électrophorétique des particules après 30 minutes de passivation par les ligands alkyle-PEG.

Les particules greffées avec le brin d'ADN **C** sont passivées avec *A11E6c* (colonnes 2 et 3) et *A6E3c* (colonnes 7 et 8). Les particules greffées avec le brin d'ADN **S+T** sont passivées avec les mélanges bio-*A11E6c* (colonnes 4 et 5) et bio-*A6E3c* (colonnes 9 et 10). L'excès initial d'ADN **C** (resp. **S+T**) par rapport à la quantité d'or est de 12,5 (resp. 5). L'augmentation de cet excès d'une colonne à l'autre est indiquée sur la figure. Les colonnes

1 et 6 sont des particules témoins passivées respectivement avec les ligands bio-*A11E6c* et bio-*A6E3c*.

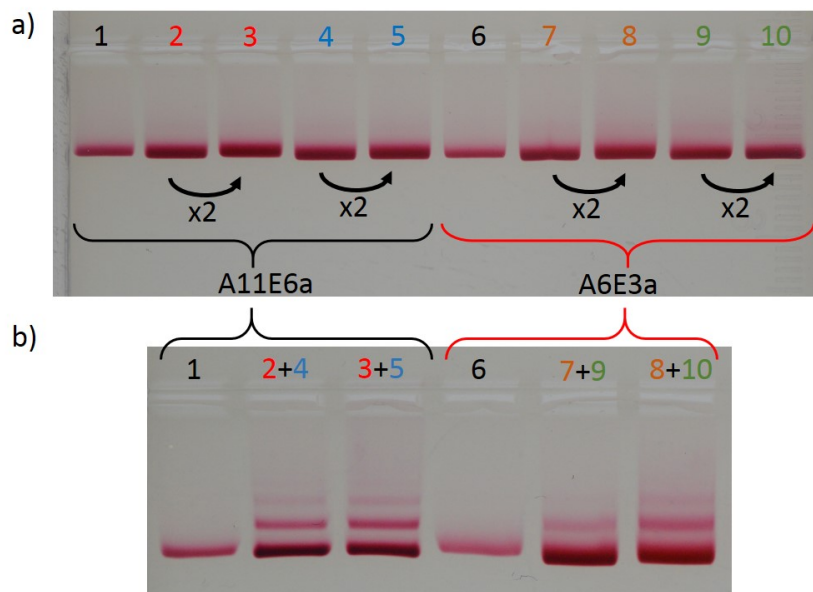


Figure 3.12 – a) Purification électrophorétique de particules de 40 nm incubées sans ADN (colonnes 1 et 6) ou avec une concentration croissante d'ADN **C** (colonnes 2-3, 6-7) ou **S+T** (colonnes 4-5, 9-10). Les flèches indiquent le facteur de multiplication de la quantité d'ADN entre chaque colonne. Les billes sont passivées en *A11E6c* (colonnes 2-3), bio-*A11E6c* (colonnes 1-4-5), *A6E3c* (colonnes 7-8) et bio-*A6E3c* (colonnes 6-9-10). b) Purification électrophorétique de dimères obtenus par hybridation respective des particules de 2 et 4, 3 et 5, 7 et 9, et 8 et 10. Les colonnes notées 1 et 6 correspondent aux références passivées avec les ligands bio-*A11E6c* et bio-*A6E3c* respectivement.

On n'observe sur la figure quasiment aucun décalage entre les différentes bandes. Cela vient du fait que les excès d'ADN sont très faibles et que nous ne comparons que deux ratios ADN/or contrairement aux expériences précédentes où nous comparions 3 ou 4 ratios différents, avec des ratios ADN/or plus grands.

Les dimères sont obtenus, après extraction des particules des différentes bandes, en mélangeant ensemble celles provenant des colonnes 2 et 4 et celles provenant de 3 et 5 à 200 mM en NaCl, mais aussi 7 et 9 d'une part et 8 et 10 d'autre part à 80 mM en NaCl. La force ionique des références est également augmentée à 200 mM (pour 1) et 80 mM (pour 6). Les incubations durent toute une nuit et le gel de purification des dimères obtenus est présenté sur la figure 3.12b.

Nous observons des dimères formés pour chacune des chimies de surface. Nous voyons également que la bande relative aux dimères est plus dense optiquement lorsqu'il y a plus de brins d'ADN greffés au départ sur les particules. Malgré les forces ioniques élevées lors de la dernière étape, il n'y a pas d'agrégats formés dans les références pour un temps d'incubation de plus de 12h.

Les synthèses des dimères de nanoparticules d'or avec un brin d'ADN possédant une tige-boucle ouverte et des chimies de surface à base de ligands *A6E3m* et *A6E4a* sont très semblables à celle utilisant le ligand *A6E6m* et ne sont pas détaillées ici. Les protocoles expérimentaux se trouvent en annexe.

En conclusion, nous avons montré la synthèse de dimères de particules d'or de 40 nm de diamètre, avec majoritairement un seul brin d'ADN greffé par particule. Les dimères récupérés ne sont pas centrifugés et sont conservés à 4 °C dans du TBE (x 0,5). Comme nous ne savons pas comment la chimie de surface des dimères conservés évolue au cours du temps, ceux-ci ne sont utilisés que quelques jours après leur synthèse. Passé ce délai, une nouvelle synthèse est effectuée. Nous allons détailler dans la suite la synthèse de dimères de particules d'or de 60 nm de diamètre.

3.5 Dimères de nanoparticules d'or de 60 nm de diamètre

De même que la synthèse de dimères de billes de 40 nm est plus complexe que celle de dimères de billes de 8 nm, la synthèse de dimères de billes de 60 nm nécessite de prendre plus de précautions que celle de dimères de billes de 40 nm. Tout d'abord, avec des particules de 60 nm de diamètre, il n'est plus possible de greffer préférentiellement un unique brin d'ADN sur la surface des particules en utilisant la technique des allongeurs. En effet, la longueur d'un brin d'ADN nécessaire à la distinction entre des particules seules et des particules hybridées avec un seul brin dans un gel d'électrophorèse devient trop importante.

Deux méthodes peuvent alors être envisagées pour réaliser cet accrochage. La première consisterait à utiliser des brins allongeurs de longueur supérieure à 100 bases. Cela n'est toutefois pas évident puisque le rendement et la pureté des synthèses d'ADN synthétique décroît lorsque leur longueur augmente. En utilisant des brins allongeurs longs de 100 bases, il faudrait hybrider successivement une dizaine de brins. La quantité d'ADN nécessaire à la fabrication du long brin deviendrait alors trop importante par rapport aux quantités usuelles, puisque pour rappel, chaque nouveau brin allongeur est introduit en excès par rapport au précédent.

De plus, les particules de 60 nm de diamètre tendent à s'agréger à une valeur de force ionique plus faible que pour les particules de 40 nm. Ces conditions salines restrictives rendent ainsi la réalisation d'un tel protocole beaucoup plus complexe. Par conséquent, la synthèse de dimères de particules de 60 nm de diamètre s'effectue uniquement selon le protocole minimisant le nombre de brins d'ADN greffés sur les particules.

3.5.1 Accrochage d'ADN

L'accrochage des brins d'ADN se fait selon le protocole suivant : les particules sont incubées pendant une nuit à 13 mM en NaCl et 1 mM en BSPP, avec différentes quantités d'ADN, comme détaillé dans le tableau 3.3, et un excès d'ADN non hybridant. 30 minutes avant la purification électrophorétique avec un gel d'agarose (1% en masse), les particules sont passivées avec un excès de ligand *E6m* ou bio-*E6m*. Les photographies des deux gels résultant des protocoles détaillés dans le tableau 3.3 sont présentées sur la figure 3.13. La synthèse est effectuée avec des brins d'ADN présentant une boucle fermée dont la tige a deux longueurs différentes : 15 et 20 paires de bases.

Table 3.3 – Tableau récapitulatif de la quantité de nanoparticules d'or (n_{or}), du type d'ADN utilisé, de la quantité d'ADN (n_{ADN}), du ratio entre les quantités d'ADN et d'or (n_{ADN}/n_{or}) et de la nature du ligand utilisé pour chacune des colonnes du gel sur la figure 3.13.

Colonne	n_{or} (pm)	ADN	n_{ADN} (pm)	n_{ADN}/n_{or}	Ligand
A	0,012	C	0,5	42	<i>E6m</i>
B	0,012	C	1	83	<i>E6m</i>
C	0,012	C	3	250	<i>E6m</i>
D	0,012	C	10	830	<i>E6m</i>
1	0,012	S 20 pb	1	83	bio- <i>E6m</i>
2	0,012	S 20 pb	2	165	bio- <i>E6m</i>
3	0,012	S 20 pb	4	333	bio- <i>E6m</i>
4	0,012	S 20 pb	12	1000	bio- <i>E6m</i>
5	0,012	S 15 pb	1	83	bio- <i>E6m</i>
6	0,012	S 15 pb	2	165	bio- <i>E6m</i>
7	0,012	S 15 pb	4	333	bio- <i>E6m</i>
8	0,012	S 15 pb	12	1000	bio- <i>E6m</i>

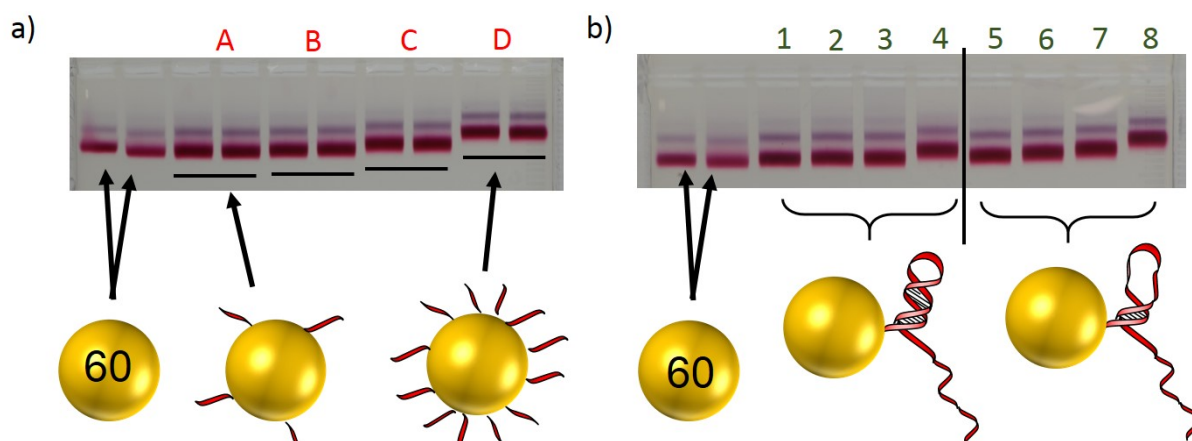


Figure 3.13 – Purification électrophorétique de particules de 60 nm incubées avec une quantité d'ADN croissante et détaillée dans le tableau 3.3. En a) comme en b), les deux colonnes tout à gauche représentent les références sans ADN et passivées avec le ligand bio-*E6m* (colonne 1) et *E6m* (colonne 2).

Une première remarque concerne la couleur des bandes. En effet, elles sont violettes tandis que celles obtenues avec des billes de 40 nm de diamètre sont roses. Les causes physiques de cette différence ont été détaillées dans le chapitre 1 : décalage spectral vers le rouge de la résonance plasmon quand le diamètre des particules augmente à cause de la dépolarisation dynamique. Par ailleurs, on observe le même phénomène qu'avec les billes de 40 nm de diamètre, à savoir un ralentissement des bandes lorsque les billes sont greffées avec de plus en plus de brins d'ADN.

Quelle que soit la colonne, on remarque également toujours la présence de deux bandes. Dans la bande plus rapide et plus épaisse se trouvent les particules greffées avec de l'ADN thiolé. La bande plus lente et fine correspond à une bande de dimères agrégés. Ces derniers se forment vraisemblablement en solution lorsque deux particules entrent en contact en franchissant la barrière d'activation décrite dans la théorie DLVO, ce qui les place dans

un état énergétique stable.

3.5.2 Synthèse des dimères

Les particules fonctionnalisées avec de l'ADN sont ensuite extraites du gel et centrifugées pour être concentrées. La moitié des particules extraites de la colonne A (tableau 3.3 et figure 3.13a) est mélangée avec les particules issues de la colonne 1, tandis que l'autre moitié est mélangée avec les particules issues de la colonne 5. De façon analogue, chaque moitié des particules de B sont respectivement mélangées avec les particules de 2 et 6, celles de C avec celles de 3 et 7, et celles de D avec celles de 4 et 8.

Les mélanges sont placés à 15 mM en NaCl et l'incubation dure une nuit. Le gel de purification à 0,75% obtenu à l'issue de l'incubation est présenté sur la figure 3.14. Les parties droite et gauche du gel, qui diffèrent en termes de longueur de la tige, ont des allures très similaires. Cela signifie que la taille de la tige-boucle n'a pas d'influence sur cette synthèse de dimères.

On remarque aussi que le gel a la même allure que celui obtenu pour les dimères de particules d'or de 40 nm de diamètre. Sur les colonnes les plus à gauche ("A+1" et "A+5"), il y a majoritairement des particules n'ayant pas réagi (large bande) et une fine bande correspondant à des dimères. Plus la quantité d'ADN greffée au départ est importante, plus on forme de dimères mais les bandes correspondantes sont aussi de plus en plus lentes signifiant que les particules formant les dimères sont associées avec plus d'un brin d'ADN thiolé.

Ainsi, pour les expériences mettant en œuvre ces dimères, nous n'avons utilisé que ceux des colonnes "A+1" et "A+5". Les colonnes "D+4" et "D+8" comportent des agrégats bleutés. En utilisant le même protocole, nous avons ensuite fabriqué des dimères avec d'autres tailles de tige-boucle, ouvertes et fermées.

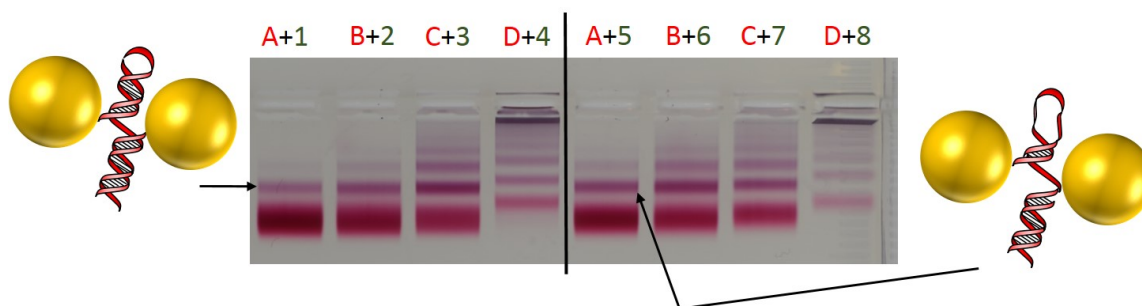


Figure 3.14 – Purification électrophorétique de dimères obtenus par hybridation de particules greffées avec des quantités croissantes d'ADN complémentaires (de 1 à 4 et de 5 à 8). Les colonnes 1 à 4 (resp. 5 à 8) correspondent à l'utilisation d'un ADN possédant une boucle fermée de 20 (resp. 15) paires de bases. Les flèches indiquent les bandes correspondant aux dimères.

3.6 Conclusions

Nous avons démontré la possibilité de synthétiser et purifier une grande variété de dimères de particules d'or de 40 et 60 nm de diamètre en faisant varier l'ADN liant (boucle ouverte ou fermée, de différentes longueurs) et la chimie de surface (hydrophile ou amphiphile, de différentes longueurs). Les techniques développées et utilisées dans ce chapitre permettent d'obtenir ces structures en solution, en milliards d'exemplaires et avec une très bonne pureté. L'utilisation de particules plus larges que 40 nm offre aux nano-objets des propriétés optiques permettant de les étudier individuellement, dans des conditions microfluidiques.

L'utilisation de brins d'ADN comme échafaudage de construction offre une grande flexibilité sur le choix des structures des dimères. En effet, la taille des brins, la position des groupements thiols et le choix des séquences d'ADN base par base sont autant de paramètres permettant d'adapter la morphologie de la structure aux besoins de l'expérience. De plus, les nombreuses possibilités de chimie de surface permettent de choisir les propriétés de stabilité selon les conditions expérimentales. Dans notre cas, nous avons synthétisé des dimères avec une boucle en épingle à cheveux au sein de la séquence du brin d'ADN afin de rendre la structure dynamique et sensible à une information chimique extérieure. Les distances mises en jeu, résultant de la taille des brins d'ADN, laissent envisager l'étude de la variation du couplage plasmon lorsque la distance entre les billes varie.

Le contrôle du nombre de brins d'ADN est très important dans cette optique car la présence d'un seul brin d'ADN greffé par particule assure la maximisation de la gamme dynamique de la distance interparticule. Cela signifie que l'on obtient la distance maximale entre les billes lorsqu'un seul brin relie les deux particules ensemble. En effet, l'équipe d'Oleg Gang a démontré que la distance entre deux particules diminuait lorsque le nombre de brins reliant les deux particules augmentait [175]. De plus, si plusieurs brins maintiennent deux particules ensemble, la fermeture ou l'ouverture de la boucle nécessite l'utilisation de plusieurs brins, ce qui réduit très certainement la sensibilité et la cinétique du capteur produit.

Caractérisation optique des dimères dynamiques

Table des matières

4.1	Principes de mesures	82
4.1.1	Préparation de chambres microfluidiques pour l'analyse spectrale de structures individuelles	82
4.1.2	Spectroscopie de dimères uniques - Montage	83
4.1.3	Analyse et choix des dimères	87
4.2	Propriétés optiques des dimères pégylés	88
4.2.1	Influence de la force ionique	88
	Protocole expérimental	88
	Résultats	89
	Discussion.	90
4.2.2	Estimation de la distance interparticule	92
4.2.3	Étude des distances en fonction de la force ionique	96
4.2.4	Stabilité cinétique des dimères	96
4.2.5	Comparaison des fréquences de résonance des structures ouvertes et fermées	98
4.3	Suivi spectral plein champ sur une caméra CCD couleur	100
4.3.1	Calibration de la caméra CCD couleur	101
4.3.2	Étude de la différence structurale de dimères ouverts et fermés avec une caméra CCD	104
	Dimères ouverts - 10 minutes d'incubation	104
	Dimères ouverts et fermés - 10 heures d'incubation	105
4.3.3	Étude de l'orientation spatiale de dimères	106
	Détermination de φ_{dim}	108
4.3.4	Suivi optique de l'ouverture et de la fermeture des dimères	111
	Détermination du protocole d'ouverture et de fermeture.	111
	Ouverture et fermeture pour 12 heures d'incubation	113

	Ouverture et fermeture pour 30 minutes d'incubation	116
4.4	Conclusions	117

L'utilisation de nanostructures métalliques pour détecter optiquement de faibles quantités de biomolécules a longtemps fait appel à des capteurs de variation d'indice de réfraction basés sur la spectroscopie de résonance plasmon (SPR) sur film mince. Plus récemment, l'utilisation de nanoparticules s'est développée pour miniaturiser les volumes de détection en SPR (*localized surface plasmon resonance* ou LSPR) ou pour concevoir des capteurs colorimétriques. En effet, la sensibilité de la résonance plasmon de nanoparticules à leur environnement diélectrique ou à la proximité d'autres nanoparticules fournit une très bonne sensibilité en LSPR [9, 176] ou par couplage plasmon [14, 177].

En optimisant des capteurs LSPR, il est d'ailleurs possible de concevoir des nanostructures sensibles à la présence de molécules individuelles. En particulier, l'accrochage de protéines uniques sur des nanobâtonnets d'or peut être suivi par imagerie photothermique [10] ou par spectroscopie de diffusion [11]. Cependant, la sensibilité de chacune de ces techniques est limitée respectivement à 150 kDa et 450 kDa (soit des protéines de 8 à 12 nm de diamètre environ) pour un décalage spectral maximum de 0,3 nm nécessitant un équipement coûteux (au minimum un spectrographe à réseau). En utilisant un dimère de nanoparticules d'or de 40 nm de diamètre, avec une structure d'ADN dynamique dont la synthèse a été décrite en détail dans le chapitre précédent, nous espérons concevoir un capteur sensible à une molécule unique d'environ 25 kDa avec un décalage spectral suffisant pour être suivi sur un détecteur à bas coût comme une caméra CCD couleur.

Deux publications récentes décrivent la réponse optique de dimères dynamiques lorsqu'un brin d'ADN cible vient ouvrir la boucle en épingle à cheveux de l'ADN reliant les particules du dimère, provoquant ainsi l'éloignement des particules [23, 150]. Ces travaux démontrent la possibilité d'utiliser ces dimères dynamiques en tant que biocapteurs optiques d'ADN, qui plus est en milieu complexe (sérum de veau fœtal) [23]. Par ailleurs, cette approche a également été appliquée à la détection de protéines uniques [178]. Les limitations principales de ces travaux sont la faible pureté des dimères synthétisés (quelques pourcents, le reste étant composé de particules seules) et l'impossibilité de contrôler le nombre de brins d'ADN attachés par particule et présentant le site de reconnaissance spécifique (la boucle d'ADN). Cela signifie que de nombreux brins cibles vont pouvoir s'hybrider sans modifier le signal optique, diminuant ainsi la sensibilité du capteur. De plus, ces capteurs sont analysés en utilisant des spectrographes à réseau, limitant leur intérêt par rapport aux capteurs LSPR.

Dans ce chapitre, nous souhaitons utiliser des dimères de particules d'or, présentant préférentiellement un unique brin d'ADN, comme un biocapteur pouvant être caractérisé sur un détecteur à bas coût. Contrairement aux travaux décrits dans la littérature où les dimères sont assemblés, en faible concentration, directement dans l'échantillon microfluidique de mesure [23, 150], nous allons synthétiser et purifier préalablement nos nanostructures. Nous verrons, dans une première partie, les principes du microscope en champ

sombre ainsi que la fabrication et la fonctionnalisation des chambres microfluidiques.

Ce montage nous permettra de caractériser optiquement la pureté, la stabilité et la longueur (distance interparticule) de nos dimères stabilisés par de courts oligomères d'éthylène glycol, vis-à-vis de la force ionique locale. Nous montrerons ainsi qu'entre des dimères ouverts et fermés, nous pouvons observer un décalage spectral allant jusqu'à 9,5 nm et une différence de distance interparticule atteignant 7,5 nm. Surtout, en calibrant quantitativement les réponses optiques mesurées sur une caméra CCD couleur par rapport à des mesures sur un spectrographe à réseau, nous montrerons que le suivi spectral de la déformation nanométrique des dimères, et la différenciation entre boucles d'ADN ouvertes et fermées, peuvent être effectués, en champ large, sur un détecteur à bas coût. Finalement, nous analyserons dans quelles conditions ces dimères autorisent la détection optique d'un ADN cible unique. Ces mesures nous indiqueront les limites actuelles de nos nanostructures en termes de réactivité et de stabilité.

4.1 Principes de mesures

4.1.1 Préparation de chambres microfluidiques pour l'analyse spectrale de structures individuelles

Comme cette étude a pour but de caractériser des capteurs à l'échelle d'une nanostructure individuelle, nous souhaitons analyser spectralement ces dimères uniques, fixés et dispersés dans l'espace. Comme la réponse optique de ce capteur est liée à la distance interparticule, il est nécessaire de ne fixer, au plus, qu'une des deux particules d'or sur le substrat optique choisi.

Chimie de surface. Afin d'accrocher uniquement une particule du dimère sur le substrat, les particules sont fonctionnalisées avec des chimies de surface différentes. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, toutes les particules sont recouvertes et stabilisées par une couche d'un court oligomère d'éthylène glycol (noté *E6m*). L'une des particules est entièrement recouverte de ce ligand tandis que l'autre est recouverte d'un mélange de ce ligand et d'un d'oligomère d'éthylène glycol (biotine-PEG), thiolé d'un côté pour l'accrochage à la particule, et présentant une biotine sur l'autre terminaison (le mélange est noté bio-*E6m*).

Chambre microfluidique. La chambre est formée par deux lamelles de verre séparées par deux fines couches de paraffine d'une centaine de micromètres d'épaisseur. Elle consiste en un carré d'environ 1 cm de côté localisé dans la paraffine et alimenté par deux fins embouts de pipettes (environ 200 μm de diamètre) placés entre les couches de paraffine et permettant le passage d'un flux de liquide. Dans la chambre, la goutte résultant du flux de liquide fait environ 20 μL de volume. La figure 4.1a est une vue de dessus d'une chambre microfluidique et la figure 4.1b est une photographie de la chambre montée sur le microscope.



Figure 4.1 – a) Vue de dessus d'une chambre microfluidique. La partie grise représente la couche de paraffine, le liquide est indiqué en rose et les traits noirs correspondent aux embouts de pipette. b) Photographie d'une chambre microfluidique montée sur le microscope. c) Représentation en coupe d'une chambre microfluidique fonctionnalisée.

Fonctionnalisation de la chambre microfluidique. La fonctionnalisation se déroule en plusieurs étapes séparées chacune par un rinçage de la chambre avec une solution tampon de pH 7. Cette solution est constituée de Tris-HCl à 10 mM et de NaCl à une concentration 'x' donnée. Elle est ainsi dénommée Tx où x est la concentration en NaCl. La première étape consiste à recouvrir la surface de verre par une couche de BSA-biotine (albumine de sérum bovin fonctionnalisée avec de la biotine) [20, 68]. Après rinçage avec une solution tampon T50, la chambre est remplie de NeutrAvidine, mutant neutre de la streptavidine, qui va se lier avec la biotine surfacique par de multiples liaisons hydrogène. Ensuite, après un nouveau rinçage au T50, la chambre est remplie de "Superblock", une solution tampon bloquante empêchant les interactions non-spécifiques entre les nanostructures et des zones de la chambre n'ayant pas reçu de dépôt de BSA-biotine. Après rinçage au T50, les dimères sont incubés plusieurs minutes et rincés dans une solution tampon dont la teneur en sel dépend de la nature des expériences qui vont suivre. Le résultat schématique de la composition de la chambre fonctionnalisée est présenté en figure 4.1c.

4.1.2 Spectroscopie de dimères uniques - Montage

Montage expérimental. Nous utilisons comme caractérisation optique la spectroscopie de diffusion en couplant un microscope en champ sombre à un spectromètre à réseau fibré (Acton SP 2300, Princeton Instruments) ou à une caméra CCD couleur (QiCam, Roper). Les microscopes en champ sombre sont très largement utilisés dans le suivi d'événements biologiques tels que l'association et la surexpression de protéines [179, 180] car ils fournissent des images avec un fort contraste en ne collectant que la lumière diffusée et en éliminant la lumière directement transmise. Dans le cas de nanostructures plasmoniques, ils autorisent la visualisation de particules d'or uniques de plus de 30 nm de diamètre à l'œil nu. Un montage optique classique d'un microscope en champ sombre est représenté schématiquement sur la figure 4.2. Plus spécifiquement, nous avons utilisé dans nos expériences un microscope classique inversé en champ sombre (IX71, Olympus).

Dans ce système, la lumière blanche incohérente non polarisée d'une lampe halogène traverse d'abord un filtre froid de longueur d'onde de coupure égale à 680 nm. Ensuite, elle est focalisée par un condenseur à huile d'ouverture numérique $NA \in [1,2-1,4]$ dans le plan de l'échantillon. Le condenseur est équipé d'un masque qui bloque les rayons centraux et

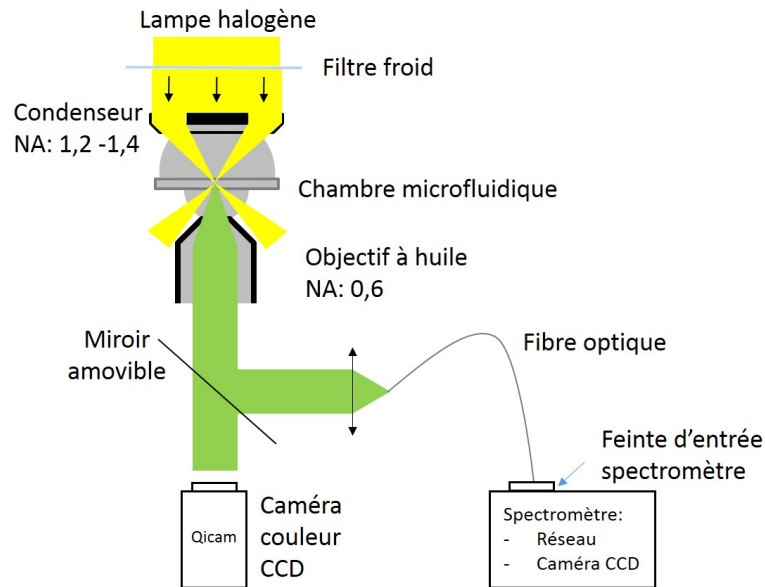


Figure 4.2 – Représentation schématique d'un microscope en champ sombre

ne laisse passer que les rayons ayant un grand angle par rapport à l'axe optique, c'est-à-dire un grand vecteur d'onde. En utilisant un condenseur dont l'ouverture numérique est plus élevée que celle de l'objectif se situant de l'autre côté de l'échantillon, la lumière directe non diffusée n'est pas collectée par l'objectif, résultant en un fond d'image sombre.

Seule la lumière diffusée par l'échantillon peut être collectée par l'objectif à huile à faible ouverture numérique ($NA=0,6$) pour produire soit une image sur une caméra CCD couleur (figure 4.3a, 1392×1040 pixels de $4,65 \mu\text{m}$ de côté), soit le spectre de diffusion d'une particule unique via un spectromètre à réseau (figure 4.3b). Celui-ci est utilisé dans le plan de sortie d'une fibre optique multimode (diamètre de 50 ou $200 \mu\text{m}$ dans nos expériences). L'entrée de la fibre fait alors office de trou de confocalité et est représenté par un cercle rouge (diamètre de $200 \mu\text{m}$) sur la figure 4.3a. Le spectromètre est constitué de plusieurs réseaux, de pas différents, permettant l'obtention de différents intervalles spectraux libres. L'image à la sortie du réseau est envoyée sur une caméra CCD rectangulaire formée de 100×1024 pixels de $20 \mu\text{m}$ de côté, refroidie à -70°C (Pixis 100, Princeton Instruments).

Choix des dimères et pureté. Une fois l'échantillon placé sur le microscope, la caméra CCD nous permet de le visualiser grâce à une image plein champ (figure 4.3a). On observe sur l'image de nombreuses taches d'Airy vertes correspondant à la diffusion de nanostructures individuelles. Une majorité des taches possède une intensité de diffusion proche de celle entourée en rouge. Elles correspondent très majoritairement à des dimères. En effet, les flèches bleues de la figure 4.3a désignent des points beaucoup moins lumineux qui correspondent à des particules seules (d'après des mesures annexes effectuées sur des échantillons de particules seules uniquement). Les taches plus brillantes, désignées par des flèches jaunes, peuvent correspondre à des structures plus larges (trimères ou autres). Il est donc possible de donner une estimation relativement précise des puretés des dimères

dans chacun des échantillons. Avec la chimie de surface utilisée dans ce chapitre, elle est de l'ordre de 80%.

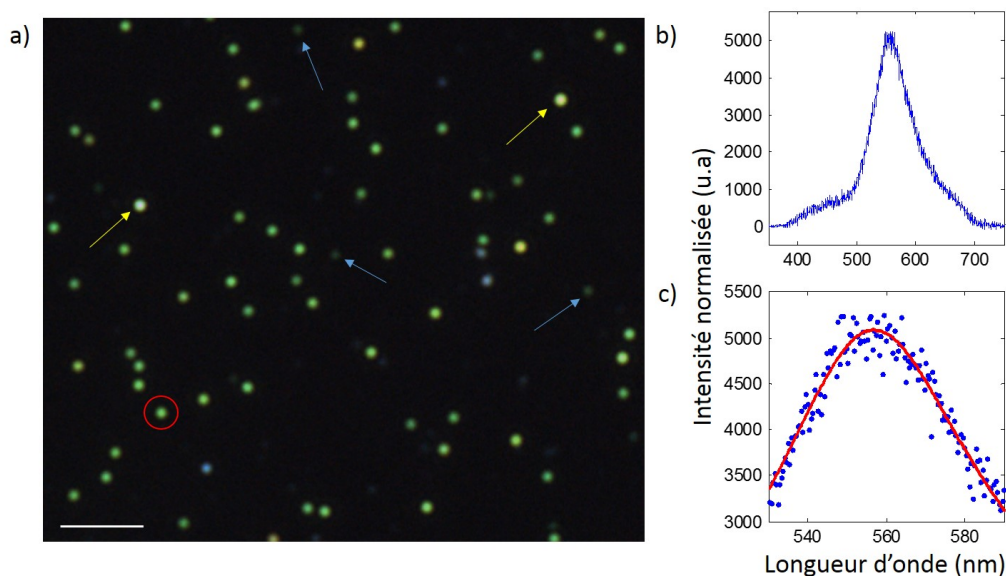


Figure 4.3 – a) Image en champ sombre de diffusion plein champ. Le cercle rouge représente les bords du trou de confocalité équivalent à une fibre optique de $200 \mu\text{m}$ de diamètre (échelle $5 \mu\text{m}$). Les flèches bleues désignent *a priori* des monomères. Les flèches jaunes désignent *a priori* des structures possédant plus de deux particules. b) Spectre normalisé de diffusion d'un dimère unique. c) Ajustement lorentzien du haut de la courbe représentée en b).

Mesure des spectres de diffusion. Le montage est réglé de telle sorte que le plan focal de la caméra couleur soit conjugué avec l'entrée de la fibre optique, qui est fixe. Cela signifie que, pour mesurer le spectre de diffusion de différents dimères, il est nécessaire de translater l'échantillon afin de placer le dimère sur l'image 'objet' de l'entrée de la fibre. Pour faire cela, l'échantillon est fixé sur une platine piézoélectrique (modèle P.I.) contrôlée par ordinateur.

Une expérience se déroule selon le protocole suivant (dont l'automatisation a été effectuée par Vincent Maillard, doctorant à l'Institut Langevin) :

- Mesure d'une image plein champ avec la caméra CCD (500 ms d'intégration) sur laquelle la position du volume focal de mesure, conjugué à l'entrée de la fibre optique, est connue.

- Sélection d'un nombre de dimères dont on souhaite mesurer le spectre : chaque dimère est numéroté virtuellement en le déplaçant à l'aide de la platine piézoélectrique sur l'entrée de la fibre, ce qui permet d'enregistrer sa position. Ceci définit un parcours programmé pour la platine afin d'aligner, successivement, chaque dimère sur le volume focal de mesure. Compte tenu des dérives mécaniques de l'échantillon dans le temps, on ne programme, en général, la mesure consécutive que d'une dizaine de dimères.

- Le spectre de diffusion brut est obtenu avec des temps d'intégration de la caméra CCD de 3 ou 5 secondes pour les fibres de 200 ou 50 μm de diamètre, respectivement. La mesure de 10 dimères uniques prend donc moins de deux minutes.

- Le spectre de la lampe et du signal de fond sont estimés, en début ou en fin d'expérience, en mesurant un spectre de diffusion correspondant à une zone ne contenant ni particule ni impureté. Le spectre obtenu est nommé S_{fond} .

Estimation du spectre de diffusion. Pour obtenir le spectre de diffusion S de la nanostructure, tel qu'il apparaît sur la figure 4.3b, il faut extraire le signal de fond noir S_{fond} du signal mesuré S_{brut} et le corriger de la réponse spectrale de la lampe d'excitation. Le spectre de diffusion normalisé est estimé selon la formule suivante :

$$S = \frac{S_{brut} - S_{fond}}{S_{fond}}$$

Le spectre de diffusion de la figure 4.3b est typique des dimères étudiés : il est dominé par une résonance correspondant au mode longitudinal du dimère. Comme discuté dans le chapitre 1, la diffusion optique des dimères de particules d'or présente deux modes transverses dégénérés et décalés vers le bleu ; et un mode longitudinal décalé vers le rouge et pour lequel la section efficace de diffusion est maximale.

Dans la grande majorité des expériences de ce chapitre, nous allons étudier l'influence de l'environnement chimique sur la fréquence de résonance longitudinale des dimères. Une fois la mesure des spectres de résonance effectuée avec le protocole précédent, nous modifions un des paramètres expérimentaux (comme la force ionique ou en ajoutant un brin d'ADN spécifique). Après un certain temps d'incubation, la mesure des spectres de résonance des dimères est de nouveau effectuée. Cela permet d'étudier à la fois une population dans des conditions données, mais aussi l'évolution de chaque spectre individuellement.

Chaque spectre de diffusion S obtenu contient des informations à la fois sur l'amplitude et sur la longueur d'onde de résonance de la section efficace de diffusion d'une structure unique. Tandis que la longueur d'onde de résonance est dépendante de la calibration du spectromètre, l'amplitude dépend de l'alignement du montage. La calibration du spectromètre, qui permet d'attribuer une longueur d'onde à un pixel, est effectuée à l'aide du spectre d'une lampe à vapeur de mercure et est très reproductible. A l'inverse, l'alignement du montage, variable d'une expérience à l'autre, rend difficile l'analyse des amplitudes de résonance. Ainsi, les travaux suivants se consacreront uniquement à la valeur de la fréquence de résonance des dimères.

Outre la possibilité de caractériser la réponse d'un nanocapteur unique, ce protocole expérimental présente plusieurs avantages vis-à-vis d'une étude optique d'ensemble. Premièrement, les particules d'or commerciales présentent une distribution de taille et de forme qui induit un élargissement inhomogène important de la section efficace d'extinc-

tion en suspension. De plus, une solution de dimères n'étant jamais parfaitement pure, elle contient aussi des monomères d'une part et des structures plus larges (trimères et agrégats plus grands) d'autre part. La réponse optique de ces différents groupements est alors intégrée dans le spectre d'une mesure d'ensemble.

Finalement, la séparation spatiale forcée dans la chambre microfluidique permet d'analyser la stabilité interne au groupement vis-à-vis du sel plutôt que la stabilité de la suspension colloïdale de nanostructures. En effet, l'agrégation des nanostructures en solution est dominée par l'agrégation des structures entre elles et non pas par l'agrégation intra-nanostructure. En pratique, travailler en conditions microfluidiques plutôt qu'en solution permet une plus grande amplitude de variation de la force ionique. Dès lors, suivre l'évolution d'un spectre de diffusion d'un dimère unique en fonction du temps, sous différentes conditions expérimentales, permet de s'affranchir de plusieurs processus dominants en suspension : élargissements spectraux inhomogènes et stabilité colloïdale inter-nanostructures.

4.1.3 Analyse et choix des dimères

Le traitement des données s'effectue avec Matlab. Nous essayons d'associer à chaque spectre de diffusion normalisé la longueur d'onde de résonance de la nanostructure. Pour cela, nous ajustons, sur une fenêtre d'au moins 50 nm, le spectre de diffusion avec une lorentzienne comme montré sur la figure 4.3c. Pour chaque expérience, plusieurs phénomènes peuvent altérer la mesure sur certains dimères, les rendant inutilisables lors du traitement des données. Les exemples les plus courants sont :

- (i) un dimère qui se détache complètement de la surface de verre entre deux mesures successives (entre 0 et 5% des dimères en fonction des temps d'incubation et de la force ionique),
- (ii) la rupture du dimère ne laissant que la particule fixe sur la surface (entre 5 et 10% des dimères),
- (iii) le dépôt de bactéries ou autres impuretés à proximité du nano-objet étudié, empêchant la mesure efficace de son spectre de diffusion (quelques %),
- (iv) puisque que certaines particules peuvent se détacher, elles peuvent migrer et se déposer plus loin sur un dimère d'intérêt (quelques %),
- (v) certains spectres ne peuvent pas être ajustés par des lorentziennes et sont exclus des statistiques. Deux cas peuvent expliquer ce problème d'ajustement : particules très anisotropes introduisant des résonances supplémentaires ou fort épaulement dans la résonance du mode longitudinal dû aux modes transverses. Ce deuxième cas est typiquement observé pour des distances interparticules de 5 à 10 nm. Pour des distances plus élevées, le mode transverse n'est pas visible sur le spectre de diffusion dominé par le mode longitudinal. Pour des distances plus courtes, la bonne séparation spectrale entre les deux modes permet de les ajuster indépendamment avec des lorentziennes.

En pratique, les problèmes d'ajustement ne touchent que quelques pourcents des dimères pour des mesures effectuées à faible (< 100 mM en NaCl) ou à forte force ionique (> 400 mM en NaCl) où les distances interparticules sont, respectivement, supérieures à 10 nm ou

inférieures à 5 nm (voir plus loin). Pour des forces ioniques intermédiaires, jusqu'à 15-20% des spectres mesurés ne peuvent être correctement ajustés. Une mesure en polarisation permettrait d'éviter ce problème de recouvrement spectral entre modes longitudinal et transverses mais il nécessiterait un temps de mesure beaucoup plus long. Pour les dimères restants, nous associons chaque spectre mesuré à l'image de la lumière diffusée sur la caméra CCD couleur (pour environ 90% des nanostructures étudiées).

4.2 Propriétés optiques des dimères pégylés

Le premier chapitre introductif a montré comment l'étude de l'évolution du couplage plasmon permet d'obtenir des informations physico-chimiques locales à travers un signal optique. Par exemple, l'étude optique d'un dimère de nanoparticules permet de mesurer la distance entre des particules sphériques, quand la taille exacte des particules et l'indice de réfraction du milieu dans le quel se trouve les particules sont connus. Dans cette partie, nous allons montrer qu'il est possible de suivre des variations nanométriques de la conformation de dimères individuels en étudiant leur force de couplage plasmon.

4.2.1 Influence de la force ionique

Les dimères que nous décrirons dans cette première partie sont composés de particules de 40 nm de diamètre, possédant une tige-boucle d'ADN ouverte et une chimie de surface à base de *E6m*. La distance maximale séparant les particules est déterminée par la longueur de l'échafaudage d'ADN. Dans le cas des séquences décrites dans le chapitre précédent, cette distance peut atteindre 20 nm au plus quand la boucle d'ADN est ouverte. A des distances de cet ordre de grandeur, les effets de charges surfaciques sont importants : nous allons donc étudier la déformation d'un dimère en fonction de la force ionique environnante.

En effet, la concentration en sel est l'un des facteurs majeurs lorsque l'on travaille avec des petites particules chargées où la répulsion coulombienne est importante [20, 23, 166]. Lorsque l'on travaille avec un assemblage or-ADN, l'effet du sel est d'autant plus important puisqu'il affecte à la fois les forces d'interaction entre les particules, la rigidité des brins d'ADN et leur température de fusion. En mesure d'ensemble, il n'est pas possible de savoir de quelle façon les deux particules interagissent au sein du dimère car la valeur du décalage plasmon interne aux dimères individuels est très faible par rapport à celle due à l'agrégation générale. En étudiant des dimères comportant l'une des deux particules greffée à la surface et l'autre en solution, on peut s'affranchir de l'agrégation générale des dimères entre eux et augmenter la concentration saline.

Protocole expérimental

La première expérience consiste à déterminer l'effet de la force ionique sur un dimère de nanoparticules d'or. Pour cela, nous mesurons les longueurs d'onde de résonance de dimères à différentes concentrations salines. Nous utilisons les dimères décrits dans le

chapitre précédent et liés par un brin d'ADN avec une tige-boucle ouverte. Dans un premier temps, les dimères sont placés dans un milieu à 25 mM en sel et des mesures sont effectuées sur 50 dimères. Une fois les mesures terminées, la concentration en sel est augmentée jusqu'à 50 mM en injectant 200 μ L de T50 (soit 10 fois le volume de la chambre). Après 10 minutes d'incubation, les spectres des 50 mêmes dimères sont de nouveau mesurés et ainsi de suite pour des concentrations en sel de 100, 200, 400 et 800 mM.

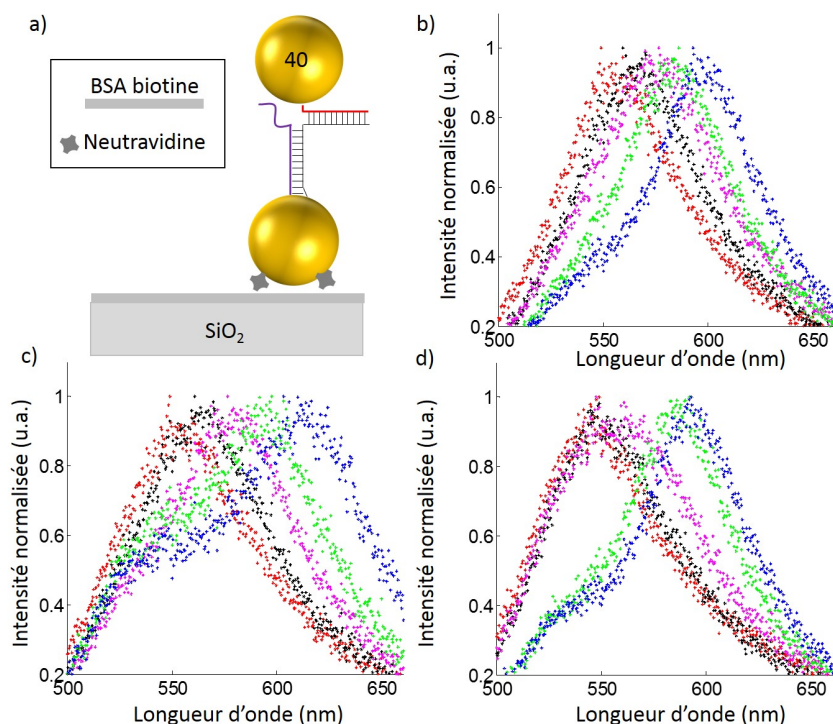


Figure 4.4 – Représentation d'un dimère ouvert en chambre microfluidique. Trois exemples typiques d'évolution d'un spectre de diffusion d'un dimère ouvert individuel à force ionique croissante. b) Le spectre se décale progressivement vers des longueurs d'ondes plus élevées quand la concentration en sel augmente, sans se déformer. c) Le spectre se déforme et on observe un début de séparation de la courbe en deux résonances. d) Le spectre demeure stable jusqu'à une concentration seuil, puis augmente soudainement et rapidement. Force ionique : rouge : 50 mM, noir : 100 mM, rose : 200 mM, vert : 400 mM et bleu : 800 mM.

Résultats

La figure 4.4 montre trois exemples différents d'évolution de spectre de diffusion de dimères pour des concentrations salines allant de 50 à 800 mM. Le spectre obtenu à 25 mM étant proche de celui à 50 mM, nous ne l'avons pas représenté pour plus de clarté. L'exemple a) représente la situation la plus fréquente (environ 60% des cas restants après le tri) où le spectre se décale progressivement vers des longueurs d'onde plus élevées quand la concentration de sel augmente, en conservant approximativement la même allure. L'exemple b) (représentant environ 15% des cas) montre la déformation d'un spectre

laissant percevoir le début d'une séparation en deux pics pouvant correspondre aux modes longitudinal et transverses lorsque les particules sont très proches (cas que nous verrons plus loin). La longueur d'onde maximale à 800 mM est plus élevée que celle dans l'exemple a); néanmoins la progression de la résonance est régulière entre 50 et 800 mM.

Cet exemple montre notamment l'impossibilité d'ajuster l'ensemble de la courbe par une lorentzienne à cause de l'épaulement lié à la présence d'un deuxième pic de résonance. L'ajustement des spectres se fait alors dans la région entourant le maximum du spectre (comme dans la figure 4.3c). L'exemple c) (20% des cas) montre le cas où le spectre demeure extrêmement stable jusqu'à une force ionique seuil (200 mM ici), puis augmente soudainement et rapidement. Bien entendu, même si ces trois exemples sont représentatifs d'un grand nombre de dimères, il existe des cas où la résonance n'est pas toujours corrélée avec l'augmentation de la force ionique. Ces cas (environ 5%) sont rares mais sont conservés dans les études statistiques qui suivent.

La figure 4.5 montre les histogrammes des longueurs d'onde de résonance de dimères ouverts à différentes concentrations en sel. Seuls les dimères dont le spectre a pu être mesuré pour toutes les concentrations ont été gardés, soit 41 dimères sur les 50 mesurés initialement à 25 mM. On observe que lorsque la concentration en sel augmente, les résonances se décalent vers le rouge, correspondant à une diminution de la distance interparticule. En effet, nous avons vu que les effets de l'augmentation de la force ionique sont l'écrantage progressif des charges surfaciques des particules et la diminution de la rigidité du double brin d'ADN. Nous tirons donc les mêmes conclusions que pour les dimères de 8 nm.

De plus, le phénomène ne peut pas être dû au changement d'indice de réfraction lié à l'augmentation de la concentration saline. En effet, à 800 mM en NaCl, la variation d'indice par rapport à l'eau pure est inférieure à 8.10^{-3} . D'après les calculs de théorie de Mie généralisée, une augmentation d'indice de $n=1,4$ à $n=1,5$ entraîne un décalage de longueur d'onde de 13 nm, pour des dimères semblables à ceux de notre étude [20]. Le décalage attendu pour l'augmentation de la concentration saline est donc de moins de 1 nm, ce qui est bien inférieur à ceux mesurés.

La figure 4.5b montre la moyenne et l'erreur-type des distributions de longueur d'onde, en fonction de la concentration en sel. Les concentrations en sel ayant été doublées à chaque nouvelle mesure, nous avons utilisé une échelle logarithmique pour l'axe des abscisses. Les points sont donc espacés de façon régulière. On observe que la croissance est progressive, allant d'environ 550 nm (à 25 mM en sel) à 595 nm (à 800 mM en sel).

Discussion.

1) Comment la force ionique régite-elle la distance interparticule au sein d'un dimère ? Le fait que la croissance soit progressive indique que la structure d'un dimère est très sensible à la concentration en sel. En effet, il semblerait qu'à chaque valeur de force ionique soit attribué un équilibre des forces au sein du dimère qui fixe la distance interparticule. Théoriquement, ceci correspond à ce que nous avons vu dans la théorie DLVO appliquée à un couple de deux particules chargées et liées entre elles : il existe à chaque concentration

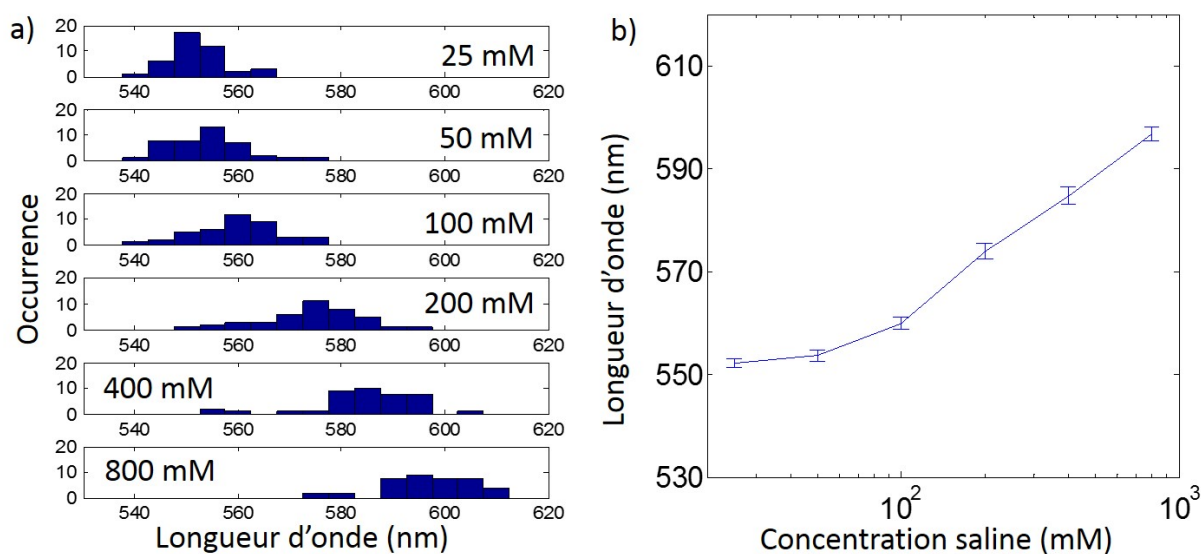


Figure 4.5 – a) Histogramme des longueurs d’onde de résonance de dimères ouverts à différentes concentrations en sel après 10 minutes d’incubation. b) Moyenne et erreur-type des longueurs d’onde des dimères ouverts en fonction de la force ionique, en échelle semi-log.

saline une distance interparticule associée à un minimum énergétique pour le système.

Expérimentalement, ceci semble être confirmé par le fait que même si la particule ‘quasi-libre’ du dimère est en permanence mobile (dû aux chocs avec les molécules d’eau) et que le spectre de diffusion de plusieurs secondes intègre ces mouvements, ceux-ci sont de faible amplitude et localisés autour d’une position d’équilibre. L’existence d’une position d’équilibre est confirmée par la grande reproductibilité des mesures effectuées consécutivement sur un même dimère (données non présentées). Du fait de la très grande sensibilité du couplage plasmon à la distance interparticule, si les mouvements étaient de grande amplitude, alors des spectres mesurés consécutivement ne seraient sans doute pas aussi reproductibles. Ils auraient sans doute des largeurs et des fréquences de résonance variables car certains intégreraient des situations où les particules sont proches, c’est-à-dire avec des résonances très décalées.

2) Par quels moyens la force ionique va-t-elle donc contrôler la structure spatiale du dimère, en dépit de la présence de l’échafaudage ?

Par effet direct. Il n’est pas possible de déterminer si la distance fournie par la théorie DLVO et la distance réelle au sein de nos dimères sont identiques ou très différentes, du fait de la présence de l’échafaudage d’ADN. Nous avons mentionné que l’augmentation de la force ionique induisait un écrantage progressif des charges surfaciques des particules et une diminution de la rigidité du double brin d’ADN. Ces deux effets sont complémentaires et devraient induire un rapprochement des particules.

Toutefois, nous ne savons pas *a priori* si l’un de ces deux effets est prépondérant dans la géométrie d’équilibre d’un dimère. Par ailleurs, la structure d’un dimère n’est pas

seulement déterminée par la distance entre les extrémités thiolées de l'échafaudage d'ADN. En effet, la liaison entre les groupements trithiolés et les particules d'or est relativement flexible, ce qui donne un mouvement de liberté spatiale à la particule libre. Les particules peuvent donc exploiter cette liberté de mouvement pour se placer dans ce minimum énergétique défini par la théorie DLVO. Par conséquent, il semble qu'augmenter la force ionique réduise la répulsion entre les particules qui se déplacent alors à la fois en 'tordant' l'ADN moins rigide, et en utilisant leur liberté de mouvement pour se placer dans un minimum énergétique.

Par effet indirect. Le substrat, la silice et la chimie d'accrochage influencent sans doute aussi la structure spatiale du dimère. Par exemple, la particule accrochée à la surface de verre ne baigne pas dans la même concentration en sel que celle en solution. En effet, lorsqu'une surface de verre est placée au contact d'un électrolyte, elle se charge négativement [181] par protonation des terminaisons silanes S-OH. Il apparaît alors une double couche de contre-ions dont la taille est d'autant plus importante que la force ionique est faible [182]. La particule accrochée à la surface se situe en partie dans cette couche. Cet effet est sans doute accentué par la couche de BSA, chargée négativement, adsorbée sur la surface de verre.

Les interactions avec le substrat en général dépendent aussi de l'orientation initiale de l'axe principal du dimère dans l'espace. Un dimère vertical comme sur la figure 4.4a est sans doute moins influencé que s'il est penché car la bille en suspension sera plus proche de la surface dans ce cas. Cette variation de greffage au substrat fonctionnalisé peut piéger le dimère dans une conformation et expliquer en partie la variabilité de l'évolution des spectres de résonance vis-à-vis de la force ionique. Cela pourrait justifier l'absence de corrélation entre la résonance de certains dimères et la force ionique (dans environ 10% des mesures avant le tri), ou encore, comme représenté sur la figure 4.4c, le fait que la résonance des dimères demeure relativement constante jusqu'à une certaine valeur avant d'augmenter brutalement.

Finalement, sachant qu'en solution la concentration saline minimale provoquant l'agrégation des dimères (pour une chimie de surface à base de *E6m*) est approximativement de 50 mM, on observe que l'agrégation des particules au sein d'un dimère en chambre microfluidique se produit à des concentrations plus élevées. En chambre microfluidique, à 800 mM, la résonance des dimères est centrée autour de 595 nm, et nous verrons plus tard que cela correspond à un état non agrégé. Cette différence vient de l'échafaudage d'ADN qui maintient la structure spatiale du dimère et empêche stériquement l'agrégation des particules.

4.2.2 Estimation de la distance interparticule

Dans cette partie, nous allons définir une courbe de calibration permettant d'estimer la distance interparticule à partir des longueurs d'onde mesurées expérimentalement. D'un point de vue électrodynamique, la polarisation de deux sphères d'or par un champ incident est un problème simple tant que les constantes diélectriques de l'or et de l'environnement

diélectrique sont connues. Ce problème peut être résolu analytiquement par un formalisme de Mie.

Toutefois, ce calcul ne permet pas de prendre en compte les variations de forme des nanoparticules et la présence du substrat de verre ou, plus généralement, d'un environnement diélectrique inhomogène. Le problème peut alors être résolu numériquement, soit par une analyse temporelle des équations de Maxwell en différences finies ("Finite-Difference Time-Domain" ou FDTD, proposée par Yee en 1966 [63]), soit par une analyse monochromatique discrétisant l'espace (comme l'approximation des dipôles discrets ou DDA [64]).

Dans notre cas, la distribution de forme 3D des particules et l'inhomogénéité de l'environnement diélectrique sont inconnues : outre le substrat, il faut considérer les protéines fonctionnalisant la surface, les ligands et l'ADN. Par conséquent, nous avons fait le choix d'approximer l'environnement diélectrique à un milieu homogène d'indice compris entre 1,33 et 1,5 et les particules à des sphères de 40 nm de diamètre.

Dans ce cas, la théorie de Mie, qui conserve une solution analytique des équations de Maxwell, permet d'étudier un plus grand nombre de configurations spatiales des dimères (différentes tailles des particules et distances) dans un temps de calcul plus court. Une comparaison entre des données expérimentales et la théorie de Mie dans une configuration similaire à ces expériences a montré une bonne concordance pour un indice moyen de 1,4 [20].

Calibration entre la longueur d'onde de résonance et la distance interparticule.

Nous avons vu dans le premier chapitre que la courbe du *plasmon ruler* fournissait une relation empirique entre les fréquences de résonance et les distances interparticules au sein de dimères de nanosphères et de nanodisques. Néanmoins, elle comporte deux limitations majeures lorsqu'on essaie de l'appliquer à nos expériences. Tout d'abord, la courbe est calculée pour un indice diélectrique de $n=1,6$, alors qu'il est estimé à $n=1,4$ dans nos expériences [20].

Par ailleurs, avec une chimie de surface en *E6m* et une très forte concentration saline, nous verrons que les particules peuvent quasiment être en contact, c'est-à-dire à une distance interparticule de l'ordre du nanomètre, soit $0,025d$, d étant le diamètre de la nanoparticule. Or, cette valeur est bien inférieure à la limite minimale du *plasmon ruler* qui est de $0,1d$ [17, 49]. Il faut noter qu'à cette distance commencent à apparaître des phénomènes quantiques (effet tunnel entre particules) qui ne sont pas pris en compte dans un modèle électrodynamique classique [78].

Afin d'obtenir une calibration représentative de nos expériences, nous utilisons les résultats obtenus à l'aide de la théorie de Mie par l'équipe de Nicolas Bonod de l'Institut Fresnel de Marseille. Les valeurs de longueur d'onde de résonance sont données pour des billes de 39 nm de diamètre avec un indice de réfraction de $n=1,4$, pour des distances interparticules allant de 1 à 25 nm (supérieures à la longueur de l'échafaudage d'ADN totalement étiré).

Résultats. Sur la figure 4.6, nous avons tracé les valeurs de la force du couplage plasmon ($\Delta\lambda/\lambda_0$), données par la théorie de Mie, en fonction de la distance interparticule normalisée par le diamètre des particules. Nous avons tout d'abord tenté d'ajuster ces

données théoriques par une courbe mono-exponentielle (courbe rouge en 4.6a) et tracé le *plasmon ruler* (courbe verte en 4.6b). Nous voyons qu'aucune de ces courbes ne permet d'ajuster correctement les données de la théorie de Mie. En revanche, les données théoriques sont bien ajustées par une courbe bi-exponentielle sur toute la gamme de distance (courbe bleue en 4.6a et b). Nous allons donc utiliser cet ajustement bi-exponentiel comme "calibration" entre la fréquence de résonance mesurée et la distance interparticule estimée.

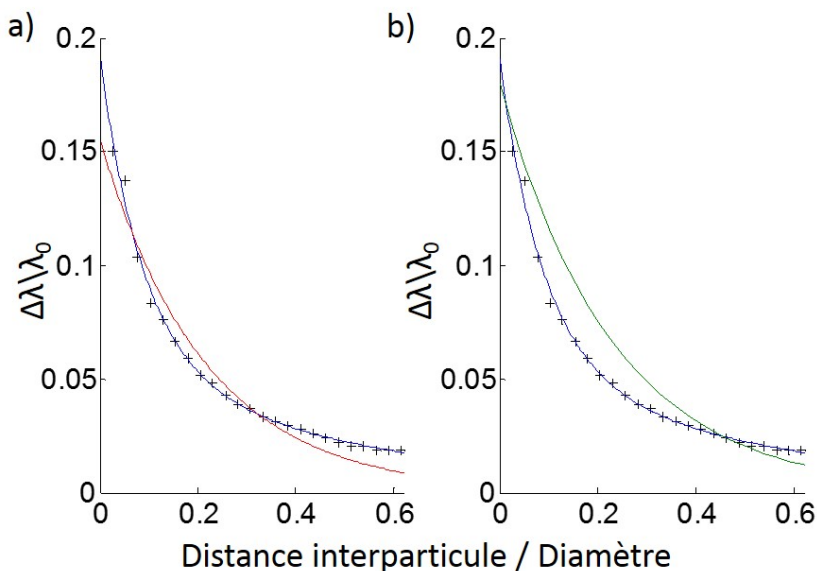


Figure 4.6 – Force du couplage plasmon calculée par la théorie de Mie en fonction de la distance interparticule normalisée par le diamètre (croix noires). Les courbes représentent des ajustements mono-exponentiel (en rouge sur la figure a), bi-exponentiel (en bleu sur les figures a et b) et le *plasmon ruler* (en vert sur la figure b).

Avant de discuter des distances fournies par la relation de calibration pour les dimères ouverts étudiés plus haut, il est nécessaire d'analyser ses limites d'applicabilité. En effet, l'utilisation d'une telle relation de calibration n'est pertinente qu'à condition de connaître préalablement toutes les caractéristiques du système (taille et forme des particules, indice de réfraction). Or, nous savons que la taille et la forme des particules varient d'une particule à l'autre, ce qui modifie la résonance et le couplage plasmon associés, introduisant ainsi une erreur sur l'estimation de D , la distance bord-à-bord. Nous allons donc voir comment estimer et quantifier cette erreur.

Considérons l'exemple d'un dimère de sphères légèrement plus petites que celles utilisées pour définir la relation de calibration. Dans ce cas, si la distance entre les particules est de 20 nm, la longueur d'onde de résonance mesurée sera légèrement plus faible que celle donnée par la relation de calibration pour cette même distance. La valeur de la distance interparticule estimée par la relation de calibration pour la longueur d'onde mesurée sera donc plus grande que la valeur réelle.

Pour généraliser cet exemple, nous avons tracé sur la figure 4.7a la distance interparticule estimée lorsque la longueur d'onde est sous-évaluée (courbe noire) ou surévaluée (courbe rouge) d'un nanomètre par rapport à la longueur d'onde associée à la courbe de calibration. Les différences entre la courbe de calibration et les courbes bleue et rouge repré-

sentent les erreurs respectives sur l'estimation de D et sont représentées sur la figure 4.7b. On voit que l'erreur sur l'estimation de la distance interparticule croît exponentiellement lorsque les longueurs d'onde se rapprochent de λ_0 .

Cela s'explique par la faible pente de la courbe de calibration lorsque $\lambda \rightarrow \lambda_0$. Quantitativement, une mesure de longueur d'onde de résonance sous-estimée de seulement 1 nm peut entraîner une erreur sur l'estimation de D d'une dizaine de nanomètres, alors que la limite physique de D est au maximum d'une vingtaine de nanomètres. Ce constat soulève le problème plus général de l'utilisation des courbes de calibration, comme le *plasmon ruler*, pour des mesures expérimentales.

De plus, la valeur de sous- ou surévaluation utilisée dans notre exemple (1 nm) est faible par rapport à la gamme de variabilité due à la forme des particules. En effet, la distribution des longueurs d'onde d'un échantillon de monomères a un écart-type de plusieurs nanomètres (4,5 nm sur une mesure effectuée sur 42 particules individuelles). Compte tenu de ce qui vient d'être établi, il n'est pas réaliste d'estimer D pour chacun des dimères individuellement.

Ainsi, l'estimation de la moyenne des distances interparticules de chaque échantillon ne sera pas obtenue en calculant la moyenne de chacune des distances interparticules estimées individuellement, mais en estimant la longueur interparticule correspondant à la moyenne des longueurs d'onde de résonance. Pour obtenir l'erreur-type sur les courbes estimant les distances interparticules, nous prendrons la mesure de distance associée aux valeurs $\lambda + \text{erreur-type}$ et $\lambda - \text{erreur-type}$.

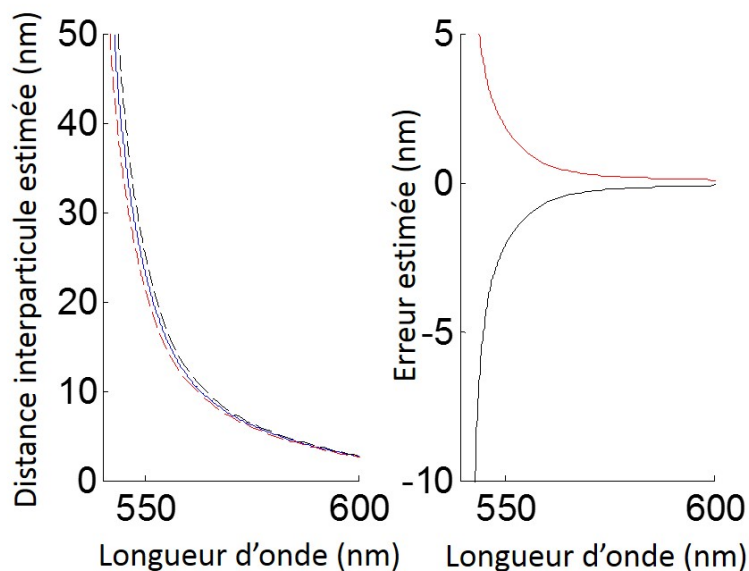


Figure 4.7 – a) Distance interparticule estimée et b) erreur associée lorsque la longueur d'onde est surévaluée (courbe rouge) ou sous-évaluée (courbe noire) de 1 nm par rapport à la courbe de calibration bi-exponentielle (courbe bleue).

4.2.3 Étude des distances en fonction de la force ionique

Ayant établi une courbe de calibration ainsi qu'un protocole permettant d'obtenir une estimation de la distance interparticule à partir des longueurs d'onde de résonance, nous pouvons tracer la courbe des distances D des dimères ouverts en fonction de la force ionique (figure 4.8). Pour une concentration saline de 25 mM, nous obtenons une distance interparticule moyenne de 18 nm, ce qui correspond bien aux distances théoriques d'une structure étirée. A 800 mM, nous trouvons une distance moyenne de 3 nm, légèrement inférieure à deux fois la taille du ligand *E6m*. Cela signifie que les particules sont au contact et légèrement interpénétrées. Les billes sont donc proches du fait de la rigidité plus faible de l'ADN ainsi que de l'écrantage des charges surfaciques.

Pour les forces ioniques intermédiaires, on trouve des distances réparties de manière assez régulière entre ces deux extrêmes. Cela démontre le rôle essentiel du sel sur la distance interparticule : en particulier, au-delà de 100 mM, les distances estimées sont bien inférieures à la longueur théorique de l'échafaudage d'ADN. Cela semble confirmer qu'à chaque valeur de force ionique, les dimères adoptent une configuration stable minimisant leur énergie.

Par ailleurs, l'erreur-type diminue quand la force ionique augmente. Cela provient uniquement de la forme de la courbe de calibration et de sa pente très élevée lorsque $D \rightarrow 0$ (figure 4.6). En conclusion, les valeurs obtenues valident la courbe de calibration utilisée et montrent la capacité de la spectroscopie de diffusion à analyser des variations nanométriques de la distance interparticule sur une nanostructure unique.

4.2.4 Stabilité cinétique des dimères

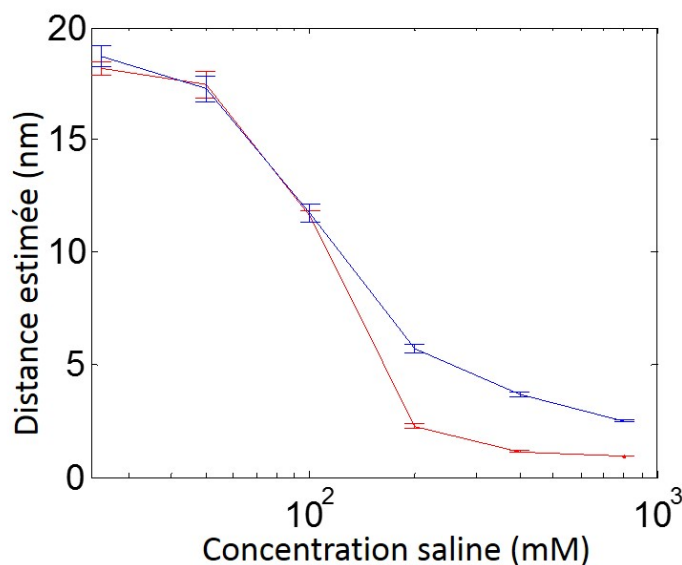


Figure 4.8 – Distance interparticule de dimères ouverts estimée par la relation de calibration en fonction de la concentration en sel, après 10 minutes (courbe bleue) ou 10 heures (courbe rouge) d'incubation.

Nous avons vu précédemment qu'il était possible de représenter de manière simplifiée un dimère par son diagramme énergétique défini par la somme des contributions de van der Waals et des répulsions électrostatiques. Cette représentation semble validée par les premiers résultats des fréquences de résonance et des distances interparticules estimées en fonction de la concentration en sel pour une population de dimères individuels. On trouve un état stable correspondant à la distance interparticule D , cette dernière diminuant lorsque la force ionique augmente.

Dans cette représentation, chaque dimère possède également un deuxième état stable (et irréversible) correspondant à l'état agrégé. En se basant sur ce modèle, le passage à l'état agrégé se fait en franchissant une barrière énergétique d'autant plus haute que la force ionique est faible. Il est ainsi nécessaire de prendre en compte l'aspect cinétique car la probabilité d'acquérir l'énergie d'activation nécessaire augmente avec le temps. De plus, le franchissement d'une barrière de potentiel est d'autant plus rapide que la barrière est faible et d'autant plus aisé que l'agitation thermique kT est grande. Pour caractériser l'applicabilité de ces dimères de nanoparticules comme capteurs, il est donc important d'estimer leur stabilité cinétique en fonction de la force ionique, i.e. le temps caractéristique pendant lequel ils restent non agrégés.

Dans la première expérience, le temps d'attente après modification de la force ionique est de 10 minutes. Cette fois-ci, nous avons mesuré les fréquences de résonance des dimères après 10 heures d'incubation. N'ayant pas pu effectuer l'expérience en une seule fois, les résultats suivants n'ont pas été obtenus à partir d'une même suspension de dimères mais sur plusieurs chambres distinctes. Le nombre de dimères est donc variable à chaque mesure. De plus, pour les expériences utilisant des valeurs de concentration en sel supérieures à 100 mM, l'état initial des dimères (juste avant d'atteindre la valeur de concentration saline souhaitée) était non agrégé, correspondant à une concentration inférieure à 100 mM.

Sur la figure 4.9, on observe qu'en dessous de 100 mM, le temps d'incubation n'a quasiment aucun effet sur les distributions de longueurs d'onde des dimères puisque les moyennes sont quasiment identiques. En revanche, au-delà de 100 mM, un temps d'incubation long a pour conséquence des dimères spectralement très décalés vers le rouge par rapport à un temps d'incubation court. En effet, on observe alors des fréquences de résonance comprises entre 600 et 650 nm, qui correspondent à des distances interparticules allant de 3 nm à des valeurs inférieures à 1 nm. Toutefois, la théorie de Mie et, *a fortiori*, notre ajustement bi-exponentiel, ne sont plus quantitatifs à des distances inférieures à 1 nm [78].

Pour des incubations longues avec une concentration en NaCl supérieure à 200 mM, on observe, d'après la figure 4.8, des dimères où la distance est inférieure à deux fois la longueur de la chimie de surface : il y a eu interpénétration des ligands PEG et agrégation irréversible des dimères. Au contraire, en dessous de 100 mM, la barrière d'activation semble trop élevée pour que les dimères puissent s'agréger, même après un long temps d'incubation.

Une concentration de 200 mM semble être un état de transition où seule une partie des dimères s'agrègent. Ceci est confirmé par l'histogramme des longueurs d'onde de résonance correspondant (figure 4.9a), très étalé. Au-delà de 200 mM, les dimères sont quasiment exclusivement agrégés et la fréquence de résonance tend vers la valeur limite

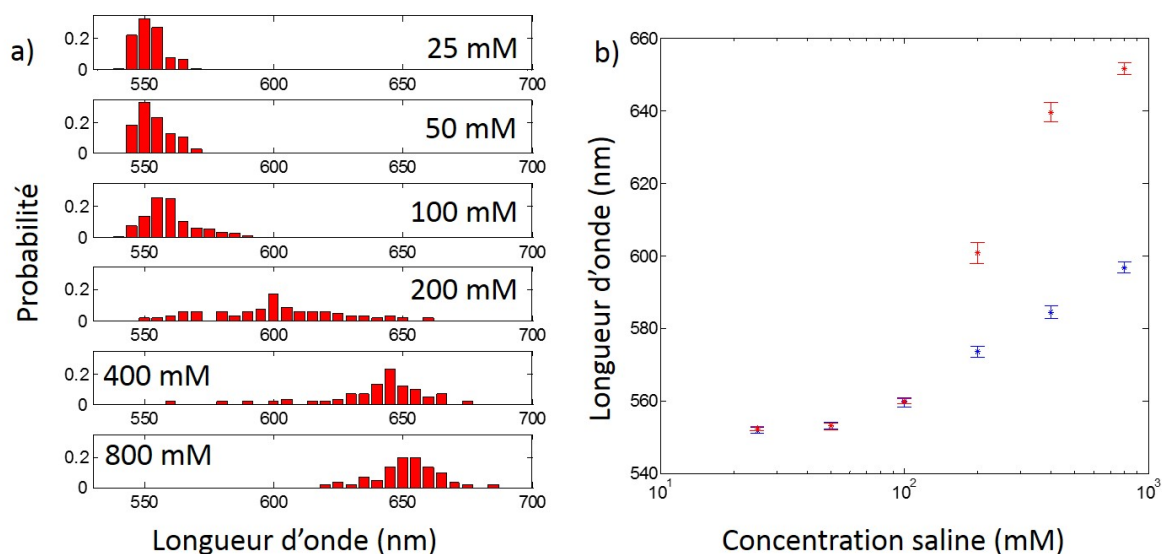


Figure 4.9 – a) Histogrammes de la longueur d'onde de résonance de dimères ouverts pour différentes concentrations salines après 10 heures d'incubation. b) Longueur d'onde de résonance moyenne (\pm erreur-type) de dimères ouverts après 10 minutes (points bleus) et 10 heures (points rouges) d'incubation.

de 650 nm, soit 100 nm de plus qu'à une concentration de 5 mM. Cette valeur maximale de 650 nm est sans doute légèrement sous-évaluée compte tenu du filtre froid qui déforme les spectres dont la résonance est proche de la longueur d'onde de coupure à 690 nm. Toutefois, l'influence de la température sur la résonance des dimères, discutée plus tard dans ce manuscrit, nous oblige à le conserver. D'autre part, il n'est pas impossible qu'une augmentation de la force ionique au-delà de 800 mM puisse rapprocher davantage les particules. Sachant qu'à ces distances, un rapprochement minime des particules induit un décalage spectral important, la longueur d'onde de résonance maximale peut être supérieure à 650 nm.

On peut également noter que ce phénomène temporel d'agrégation des nanoparticules est aussi bien valable pour un dimère unique que pour des particules en solution. En effet, lorsque l'on détermine une concentration pour laquelle les particules d'une solution colloïdale s'agrègent (par exemple 50 mM pour des particules recouvertes de *E6m*), on définit en réalité une valeur de concentration pour laquelle le système "s'agrège en quelques minutes". Une concentration légèrement plus faible pourra également entraîner l'agrégation de la solution colloïdale mais sur un temps plus long. Dans le cas des particules d'or de 40 nm, ce temps est supérieur à 24 heures à 35 mM en NaCl (conditions expérimentales pendant la dimérisation avant purification électrophorétique).

4.2.5 Comparaison des fréquences de résonance des structures ouvertes et fermées

Nous avons vu l'effet de la force ionique et du temps d'incubation sur les dimères de nanoparticules lorsque la boucle est ouverte. Nous allons voir à présent s'il est possible de

différencier les structures ouvertes et fermées par leurs spectres de résonance. La tige de la structure tige-boucle de l'ADN utilisée dans cette partie mesure 20 paires de bases tandis que la boucle simple brin est longue de 4 bases. Les mesures sur les dimères avec la boucle fermée ont été effectuées dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment, avec 10 heures d'incubation et pour des concentrations en sel de 5, 25, 50, 100, 200 et 400 mM.

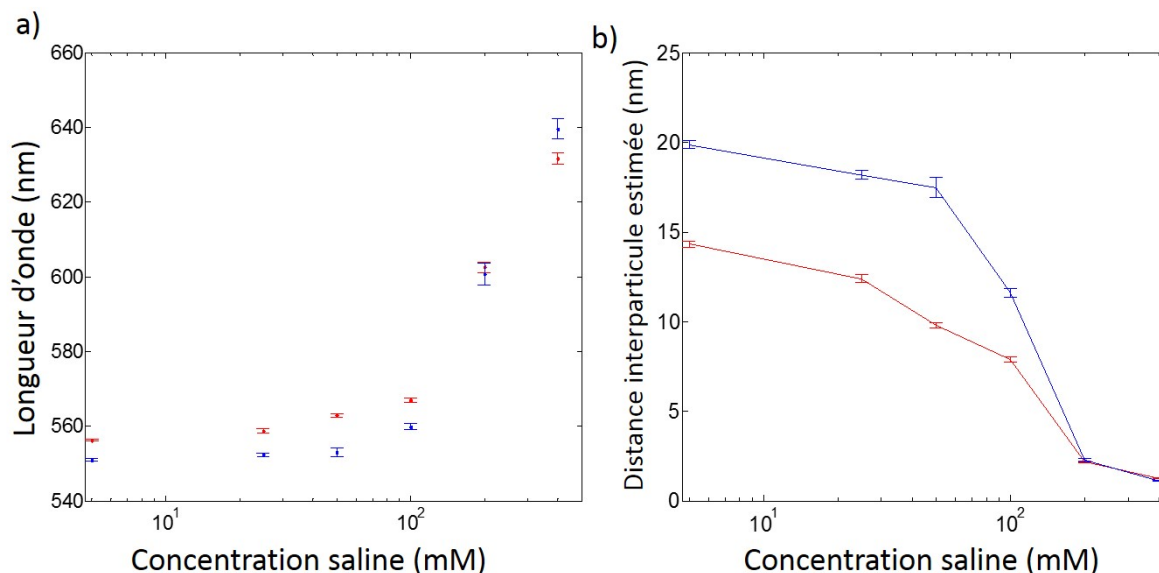


Figure 4.10 – a) Longueur d'onde de résonance moyenne (\pm erreur-type) et b) distance interparticule estimée par la relation de calibration pour des dimères ouverts (points bleus) et fermés (points rouges) en fonction de la concentration saline.

La figure 4.10a permet de comparer les longueurs d'onde de résonance moyennes pour la boucle ouverte (en bleu) et fermée (en rouge), en fonction de la force ionique. On voit que les dimères fermés présentent la même tendance que les dimères ouverts, c'est-à-dire un décalage spectral vers le rouge lorsque la force ionique augmente. Toutefois, on observe également que les longueurs d'onde de résonance moyennes des dimères fermés sont supérieures à celles des dimères ouverts pour des concentrations salines allant de 5 à 100 mM.

Au-delà, il n'est plus possible de les discriminer par leurs longueurs d'onde de résonance. Ces conclusions sont très importantes car cela signifie qu'en dessous d'une concentration en sel de 200 mM, il est possible de différencier spectralement les deux types de structure de l'échafaudage d'ADN, à savoir si la boucle est ouverte ou fermée. On retrouve également la valeur de 200 mM comme valeur de transition avec une erreur-type plus importante, ainsi qu'une longueur d'onde de résonance à 400 mM très proche de la valeur limite d'agrégation.

La figure 4.10b présente les distances interparticules estimées à partir des longueurs d'onde de résonance pour les deux configurations de boucle. A faible force ionique, on obtient des distances d'environ 20 nm pour la structure ouverte contre 14 nm pour la structure fermée. La différenciation optique entre dimères ouverts et fermés est donc nette jusqu'à des concentrations salines inférieures à 100 mM.

Le maximum de décalage spectral de 9,5 nm est observé ici à 50 mM en NaCl, correspondant à une différence de distance interparticule de 7,5 nm. Un écart de plus de 5 nm en distance est obtenu entre 5 et 50 mM de sel, montrant que cette approche expérimentale permet de différencier, de manière non-ambiguë, des dimères ouverts et fermés et, de manière plus générale, des groupements de nanoparticules d'or en fonction de la conformation de l'ADN qui les relie.

On observe également que la moyenne des résonances des dimères ouverts est plus élevée que celle des dimères fermés à 400 mM après 10 heures d'incubation. Cette différence n'est pas significative puisque l'écart entre les distances interparticules estimées est de l'ordre de 0,1 nm ($D=1,1$ nm pour les fermés et $D=1,2$ nm pour les ouverts).

Il est intéressant de noter que la distance interparticule estimée pour des dimères fermés à 50 mM en NaCl (10 nm) est supérieure à la distance d'environ 6 nm obtenue pour les dimères de 8 nm (pour rappel, la concentration en sel était également de 50 mM en cryo-EM). La distance interparticule de la structure fermée est donc plus grande que la valeur attendue. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce résultat. Tout d'abord, comme discuté auparavant, la relation de calibration est empirique et les distances interparticules estimées à partir des spectres de diffusion peuvent être surestimées dans cette gamme de distance.

Surtout, à faible force ionique, la boucle en épingle à cheveux n'est sans doute pas assez stable et solide face à la répulsion des nanoparticules. Dans ce cas, il est possible que les forces de répulsion exercées par les nanoparticules ouvrent partiellement la boucle jusqu'à ce qu'un équilibre s'établisse entre les forces exercées par les particules et la force de rappel exercée par la boucle d'ADN. Cette répulsion inter-particules n'est pas du même ordre de grandeur pour des particules de 8 nm et de 40 nm de diamètre (pour une même chimie de surface).

En conclusion, nous avons démontré qu'il était possible de distinguer des différences morphologiques, entre les dimères ouverts et fermés, de seulement quelques nanomètres à l'aide d'un dispositif de microscopie à fond noir associé à un spectromètre. La très grande pureté de nos échantillons a pour conséquence que les images de fond noir contiennent majoritairement des dimères, et en grande quantité. Nous allons dans la suite démontrer qu'il est possible d'utiliser une simple caméra couleur CCD pour faire une telle distinction.

4.3 Suivi spectral plein champ sur une caméra CCD couleur

La possibilité d'utiliser une caméra CCD pour suivre des événements moléculaires individuels a déjà été démontrée dans de précédentes études [55, 183]. Dans une étude de 2007 [68], les auteurs utilisent le couplage plasmon pour mesurer la courbure et le clivage dynamique de brins d'ADN liant deux particules d'or entre elles. Pour cela, ils suivent, en fonction du temps, l'intensité de diffusion d'un dimère sur une caméra EMCCD refroidie. De plus, ils visualisent directement le clivage sur une caméra couleur puisque le signal d'un dimère est très différent de celui d'un monomère. De la même manière, le groupe de Rob Kooyman utilise le ratio des intensités correspondant aux couleurs rouge et verte

d'une caméra CCD couleur pour détecter la formation d'un dimère par le biais de brins d'ADN ou de protéines [141, 184].

Notre but est d'étendre l'utilisation d'un détecteur à bas coût, comme une caméra couleur, au suivi de la déformation nanométrique des dimères et pas uniquement à leur formation ou leur destruction. Plutôt qu'une mesure d'intensité, nous voulons caractériser spectralement les nanostructures en analysant la "couleur" de la lumière diffusée en fonction de la distance interparticule. Pour donner un ordre de grandeur, la taille de notre capteur couleur (6,5 mm x 4,8 mm) est similaire à celle trouvée dans un appareil photo d'entrée de gamme et les pixels de $4,65 \mu\text{m}$ sont typiques des capteurs d'appareil photo de milieu de gamme (Advanced Photo System type-C).

4.3.1 Calibration de la caméra CCD couleur

Base HSV. Voici très succinctement le fonctionnement d'une caméra CCD : chaque pixel du capteur est composé de 4 photosites sensibles à trois couleurs différentes (bleu, vert et rouge), permettant de convertir la lumière reçue en une information trichromique conçue pour se rapprocher de la sensibilité de l'œil. Le grand nombre de combinaisons de ces trois couleurs permet de retranscrire une large gamme de couleurs. En codage 8-bit, chaque couleur est quantifiée par un triplet de nombres entiers compris entre 0 et 255.

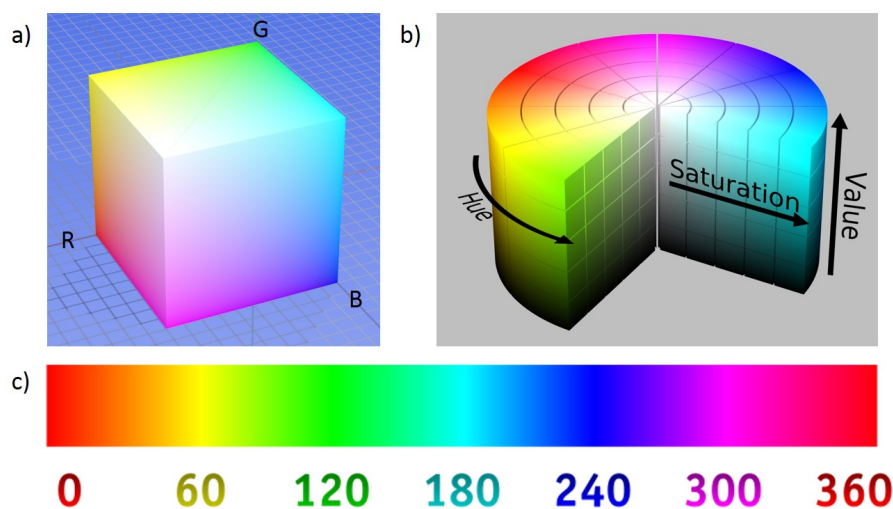


Figure 4.11 – Représentation graphique de a) la base orthogonale (R,G,B), b) la base cylindrique (H,S,V) et c) l'échelle de teinte H (source : Wikipédia).

On peut représenter l'information d'un pixel par un vecteur dans une base orthogonale (R,G,B), comme représentée sur la figure 4.11a. Ainsi, pour comparer deux couleurs, on compare leurs triplets (R, G, B) , en calculant leur produit scalaire par exemple. Toutefois, cette valeur fournit un écart relatif entre deux couleurs et n'est donc pas pratique pour suivre facilement l'évolution d'une couleur.

Afin de faciliter notre représentation des couleurs, nous avons décidé d'effectuer une transformation mathématique équivalente à un changement de base permettant de passer de (R,G,B) à (H,S,V) (figure 4.11b). La base (H,S,V) est une base cylindrique et, après changement de base, chaque couleur est codée par un nouveau triplet (H, S, V) . La valeur

H (« Hue » en anglais) code la teinte de la couleur, selon l'angle correspondant sur le cercle des couleurs représenté à plat sur la figure 4.11c. S représente la saturation, c'est-à-dire l'intensité de la couleur, tandis que V définit la brillance de la couleur.

Dans le cas des dimères de nanoparticules, l'utilisation des coordonnées S et V est peu intéressante car elles ne varient que faiblement lorsque la distance entre les particules change. Ceci est contre-intuitif car nous avons vu que l'intensité de diffusion d'un dimère augmentait lorsque les particules se rapprochaient. Cependant, lorsque deux particules se rapprochent, la couleur du dimère se déplace vers le rouge auquel les capteurs CCD de la caméra sont moins sensibles, comme pour l'œil. L'augmentation de l'intensité est alors plus faible sur la caméra CCD qu'avec un suivi à l'aide d'un spectromètre où l'on corrige la sensibilité du capteur.

Définition de la teinte. Comment définir la teinte dans nos expériences ? Lors d'une expérience de mesure des spectres de diffusion, nous avons toujours capturé l'image plein champ de l'échantillon, ce qui donne une image comme celle montrée sur la figure 4.12a. Il a donc été possible d'attribuer à chaque dimère à la fois son spectre mesuré par le spectromètre et son image sur la caméra CCD, c'est-à-dire la tache d'Airy correspondante (convoluée à la taille réelle du dimère, figure 4.12b). La taille des taches de diffraction étant quasiment identique, nous avons utilisé un masque circulaire d'une surface égale à 185 pixels pour isoler les pixels formant la tache.

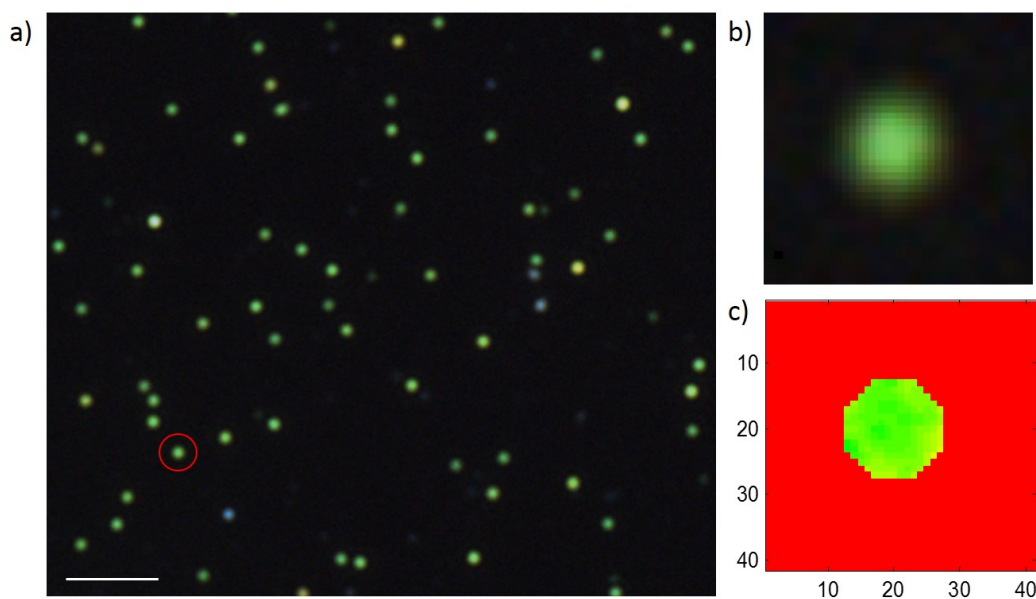


Figure 4.12 – a) Image en diffusion prise par la caméra Qicam. b) Agrandissement de la nanostructure entourée en a). c) Image en teinte de b).

La figure 4.12c représente la composante H de l'image montrée en b). La partie rouge correspond à l'extérieur du masque tandis que le centre du cercle représente la valeur H de chacun des 185 pixels. On constate que les couleurs vertes des images en b) et c) sont très proches. Par la suite, pour chaque dimère, nous avons défini la teinte H comme étant la valeur moyenne de la teinte H de chacun des 185 pixels.

Calibration teinte-longueur d'onde de résonance. Ayant mené de nombreuses expériences tout au long de cette thèse, il a été possible d'associer à de nombreux spectres de diffusion mesurés la valeur de la teinte de l'image CCD correspondante. En reportant chaque couple de points (longueur d'onde mesurée/teinte mesurée) sur un graphique, on a pu définir une relation de calibration entre les deux valeurs mesurées, comme montré sur la figure 4.13a.

Au total, 6460 couples de points ont été mesurés, mais par souci de visibilité, nous avons choisi de représenter la densité de points en échelle logarithmique. La courbe de calibration choisie pour ajuster le nuage de points est un polynôme d'ordre 5, représenté en blanc sur la figure 4.13a. La densité a été calculée en dénombrant les points situés dans des rectangles de 0,002 unité de teinte pour l'axe des abscisses et 0,8 nm sur l'axe des ordonnées.

Afin d'estimer l'erreur associée à la courbe de calibration, nous avons tracé, pour des intervalles de 0,003 unité de largeur sur l'échelle de teinte, la moyenne et l'erreur-type des longueurs d'onde obtenues (figure 4.13b). On observe une très bonne corrélation dans la gamme 0,15-0,35 en teinte, ce qui correspond à la gamme de longueurs d'onde allant de 545 à 585 nm, c'est-à-dire de distances interparticules estimées allant de 29 à 3,6 nm. La courbe de calibration fournit donc une bonne estimation de la longueur d'onde de résonance à partir de la teinte, correspondant à une large gamme de distances interparticules.

Lorsque $H < 0,15$, l'erreur sur la longueur d'onde est beaucoup plus systématique pour plusieurs raisons. Tout d'abord, théoriquement, on peut associer une longueur d'onde de résonance à une teinte lorsque le spectre de l'objet est constitué d'un unique pic fin. Dans notre cas, les pics ne sont pas très fins mais ont relativement tous la même largeur, d'où la bonne corrélation entre H et λ sur la gamme 0,15-0,35. En effet, en dessous de 585 nm, lorsque deux billes se rapprochent, le spectre de diffusion garde relativement la même forme mais se décale vers le rouge, comme dans l'exemple a) de la figure 4.4. Au-delà de 585 nm, lorsque les billes sont suffisamment proches, le spectre s'élargit et un deuxième pic apparaît, comme dans l'exemple b) de la figure 4.4. La teinte enregistrée par la caméra CCD, qui est en quelque sorte l'intégrale du spectre obtenu par le spectromètre, est donc sous-évaluée par rapport à la 'vraie' teinte qui correspond à longueur d'onde de résonance mesurée.

En conclusion, nous avons pu déterminer une relation de calibration entre les teintes enregistrées par la caméra CCD et les longueurs d'onde des spectres correspondants grâce à un très grand nombre de mesures effectuées. Étant donné que nous avons déjà défini une courbe de calibration entre la longueur d'onde de résonance et la distance interparticule, nous possédons une relation directe entre la teinte d'un dimère et la distance interparticule. Nous allons à présent vérifier qu'il est possible de suivre des déformations nanométriques de dimères uniques en utilisant uniquement des images fournies par une caméra CCD couleur.

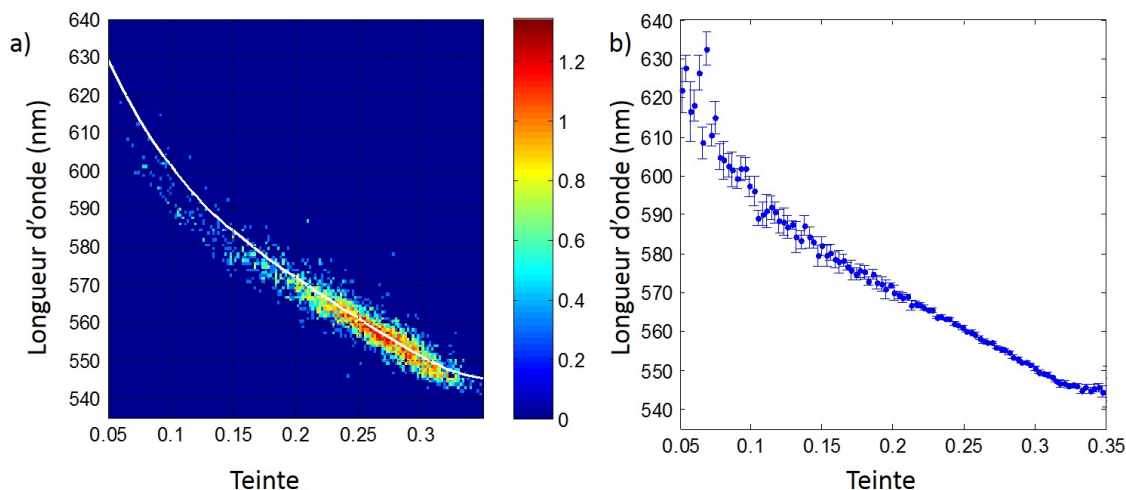


Figure 4.13 – a) Densité de points associée aux 6460 couples (teinte mesurée, longueur d’onde mesurée) en échelle logarithmique. b) Moyenne et erreur-type des longueurs d’onde mesurées pour des valeurs de teinte fixées.

4.3.2 Étude de la différence structurale de dimères ouverts et fermés avec une caméra CCD

Ayant défini la notion de teinte d’un dimère, nous pouvons étudier ses variations lors des expériences précédentes. Pour cela, nous utilisons les mêmes dimères que lors du début du chapitre, mais en ne gardant que ceux pour lesquels on peut associer l’image correspondante de la caméra CCD couleur (environ 90% des cas). Cela signifie que les moyennes et les écarts-types des longueurs d’onde de résonance dans cette partie peuvent être très légèrement différents de ceux du début du chapitre.

Dimères ouverts - 10 minutes d’incubation

Nous étudions le cas des dimères ouverts, en fonction de la concentration en sel (25, 50, 100, 200, 400 et 800 mM), avec un temps d’incubation de 10 minutes. Nous traçons pour cela la longueur d’onde estimée par les valeurs des teintes des dimères et la longueur d’onde des mêmes dimères mesurée par un spectromètre (4.14a).

Nous notons une très bonne corrélation entre la longueur d’onde estimée et celle mesurée, entre 25 et 200 mM en sel. Au-delà, la courbe d’estimation des longueurs d’onde est légèrement plus basse que celle des longueurs d’onde mesurées (écart maximal de 3 nm à 800 mM en NaCl). En terme de distance interparticule, on retrouve deux courbes très proches, montrant qu’il est possible d’estimer la distance interparticule sur une large gamme de forces ioniques (concentrations en sel allant de 25 à 800 mM) correspondant à une large gamme de distances (de 3 à 20 nm).

On observe par ailleurs une légère différence entre les distances interparticules, estimées par le spectromètre, tracées sur la figure 4.14b et sur la figure 4.8, alors qu’elles proviennent de la même expérience. Cela vient du fait qu’un nombre différent de dimères a été pris en compte lors des deux analyses. En effet, pour la figure 4.14b, seuls les dimères possédant

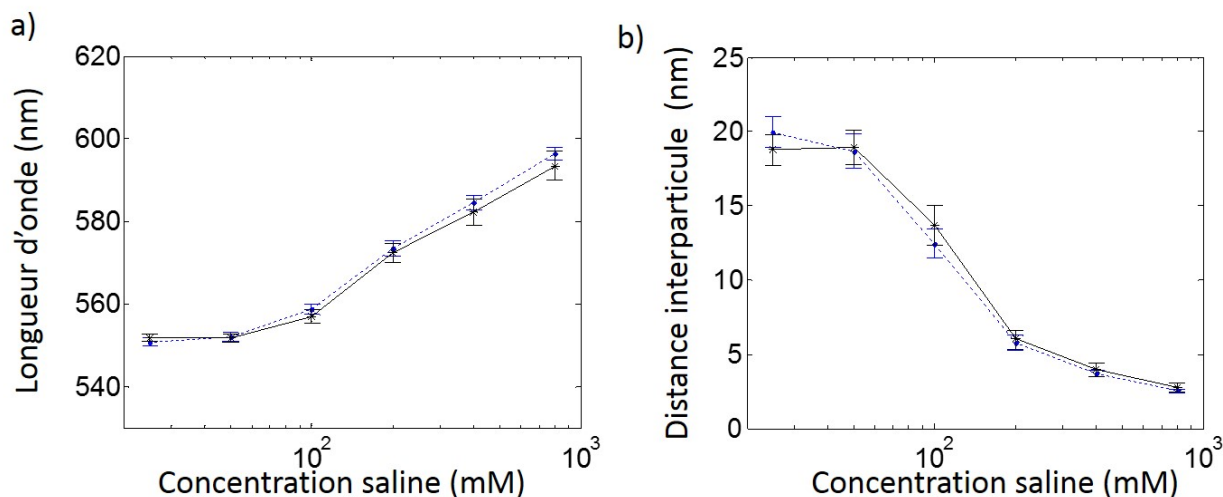


Figure 4.14 – Comparaison entre a) les longueurs d'onde et b) les distances interparticules estimées par la teinte du dimère (trait plein noir) et mesurées par le spectromètre (trait pointillé bleu), pour des dimères ouverts, en fonction de la concentration en sel, après 10 minutes d'incubation.

une valeur de teinte ont été utilisés pour la courbe.

Dimères ouverts et fermés - 10 heures d'incubation

Nous étudions dans cette partie le cas des dimères ouverts et fermés, en fonction de la concentration en sel (5, 25, 50, 100, 200 et 400 mM), avec un temps d'incubation de 10 heures. Nous traçons pour cela la longueur d'onde estimée par les valeurs des teintes des dimères et la longueur d'onde des mêmes dimères mesurée par un spectromètre (figure 4.15a).

Nous remarquons que, pour une concentration saline inférieure à 100 mM, il y a une très bonne corrélation entre la longueur d'onde estimée et celle mesurée, pour les deux configurations des dimères. Cela signifie qu'il est possible de distinguer la structure spatiale des dimères en utilisant uniquement les images d'une caméra CCD couleur et d'en estimer la longueur d'onde correctement. Au-delà de 100 mM, l'estimation de la longueur d'onde par la teinte est sous-évaluée par rapport à celle mesurée. Les raisons de ce phénomène ont été détaillées précédemment et ces observations confirment les limites de la relation entre la teinte et la longueur d'onde de résonance des dimères.

Si l'on étudie les distances interparticules correspondant à ces longueurs d'onde estimées (figure 4.15b), on observe toujours une bonne corrélation entre valeurs mesurées et estimées jusqu'à 100 mM de NaCl. Au delà, la teinte estimée sur la caméra est sensible aux modes longitudinal et transverses du dimère quand la fréquence de résonance estimée ne correspond qu'à celle du mode longitudinal. Pour obtenir une bonne correspondance entre teinte et longueur d'onde à des distances inférieures à 3 nm, il faut effectuer des mesures en polarisation pour minimiser le signal provenant du mode transverse dans l'image de diffusion sur la caméra CCD couleur.

En conclusion, l'utilisation d'une caméra couleur permet d'estimer des longueurs d'ondes

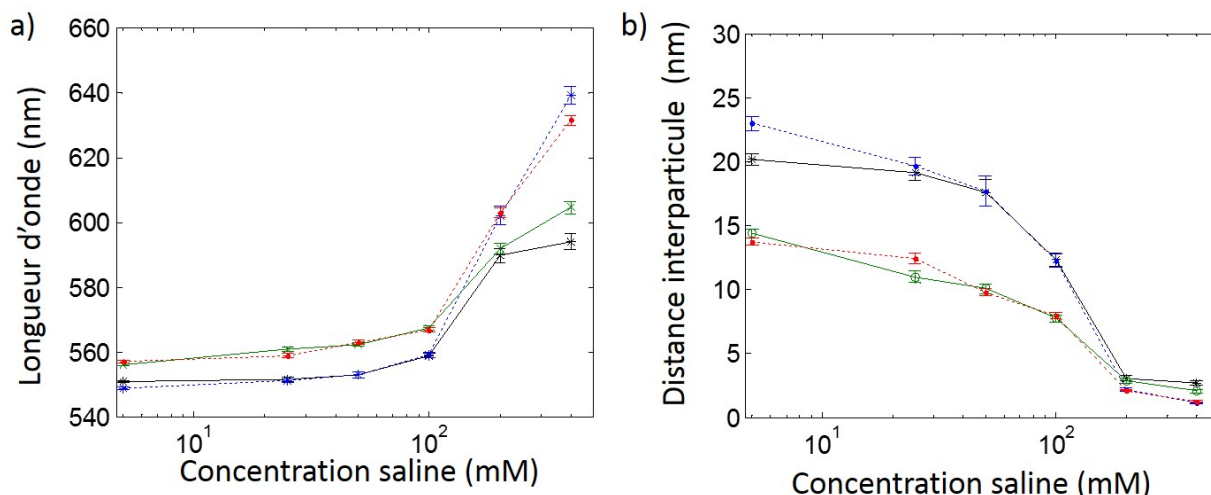


Figure 4.15 – Comparaison entre a) les longueurs d'onde et b) les distances interparticules estimées par la teinte du dimère (trait plein) et mesurées par le spectromètre (trait pointillé), pour des dimères ouverts (traits bleu et noir) et fermés (trait rouge et vert), en fonction de la concentration en sel, après 10 heures d'incubation.

de résonance de dimères uniques sur une large gamme de distances interparticules. En effet, l'estimation de distance obtenue avec la caméra CCD est quantitative sur la gamme [3 nm - 20 nm]. En revanche, pour des systèmes proches de l'agrégation, le suivi sur caméra couleur n'est que qualitatif : on observe bien une réduction de la distance interparticule quand la concentration en sel augmente au-delà de 200 mM, mais les valeurs estimées sont surévaluées. Une étude en polarisation peut résoudre cette erreur systématique en filtrant le signal de diffusion provenant des modes transverses du dimère.

Il est surtout important de noter que le suivi spectral plein champ sur caméra couleur permet de différencier, après calibration, un échantillon de dimères ouverts ou fermés.

4.3.3 Étude de l'orientation spatiale de dimères

A faible force ionique, les charges superficielles négatives du substrat ont tendance à repousser la particule libre du dimère. C'est ce qui minimise l'accrochage non-spécifique de particules d'or dans la chambre microfluidique et favorise la flexibilité des dimères. Toutefois, plusieurs études de la littérature [143,185] ont montré que les dimères n'avaient pas une orientation parfaitement perpendiculaire au plan (x,y) de l'échantillon mais y présentaient une projection non nulle. Cet effet devrait être d'autant plus important que les interactions répulsives sont écrantées à forte force ionique.

Nous nous sommes donc intéressés à la caractérisation de l'orientation des dimères dans l'échantillon à partir d'images de diffusion obtenues sur caméra CCD couleur à forte force ionique. Est-il possible d'estimer simplement l'orientation du dimère dans le plan (x,y) par une imagerie plein champ polarisée ?

Soit z l'axe optique, perpendiculaire à l'échantillon comme montré sur les figures 4.16a et b. \mathbf{p} est le vecteur reliant les deux particules du dimère et définissant son axe principal par les angles θ_{dim} et φ_{dim} . \mathbf{p}' est la projection de \mathbf{p} dans le plan (x,y).

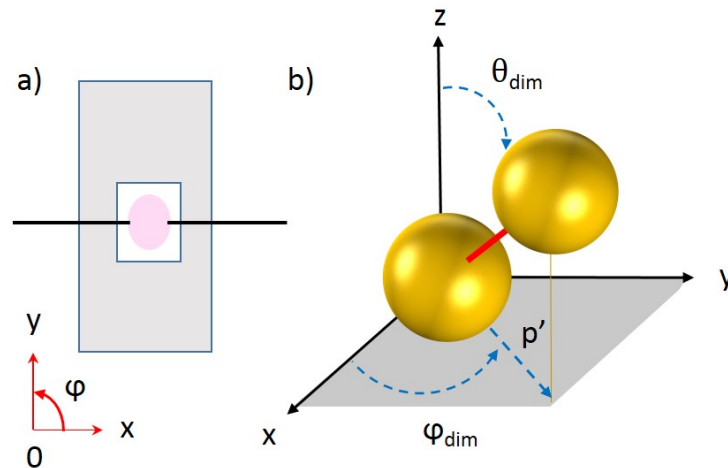


Figure 4.16 – a) Représentation schématique de la chambre microfluidique vue de dessus. b) Illustration d'un dimère légèrement incliné dans la chambre microfluidique. La partie grisée représente la surface de verre fonctionnalisée.

En suivant une approximation dipolaire pour le dimère, on peut le représenter par une polarisabilité diagonale avec des termes $\alpha_{uu} = \alpha_{vv}$ ayant la fréquence de résonance transverse du dimère et α_{ww} présentant une résonance à la fréquence longitudinale du dimère. Le repère (u, v, w) est le repère microscopique du dimère où \mathbf{p} suit l'axe w . S'il est possible de n'étudier que le mode longitudinal du dimère, il sera alors possible d'estimer l'angle φ définissant l'orientation de \mathbf{p} .

Compte tenu de l'ouverture numérique du condenseur d'excitation ($NA \in [1,2-1,4]$), moduler la polarisation en excitation modifierait la polarisation dans le plan (x, y) avec une forte composante constante selon z . Il ne serait alors pas possible de ne polariser qu'une seule composante du dimère, en particulier exciter le mode longitudinal uniquement pour estimer φ_{dim} .

Nous avons donc décidé d'analyser la polarisation du signal de diffusion en introduisant un polariseur dans le chemin de collection. Compte tenu de l'ouverture numérique raisonnable de l'objectif de collection ($NA=0,6$), le signal analysé en polarisation est proche du signal de diffusion dans le plan de l'échantillon. Cette analyse va nous permettre d'estimer l'angle φ_{dim} de chaque dimère.

Est-il possible d'estimer l'angle d'inclinaison θ_{dim} , une fois φ_{dim} estimé ?

Si tous les dimères étaient identiques (distances interparticules et diamètres des particules identiques), il serait possible d'estimer l'inclinaison relative des différents dimères en analysant l'intensité relative de la lumière diffusée par le mode longitudinal. En effet, dans l'approximation dipolaire, il est possible de calculer analytiquement la lumière diffusée par une particule anisotrope placée sur un substrat et collectée par un objectif d'ouverture finie. Toutefois, compte tenu de la variabilité des tailles des particules et des distances observées en microscopies électronique et optique, nous pensons qu'une telle analyse est impossible sur ces échantillons.

Détermination de φ_{dim}

Les figures 4.17a et b présentent les spectres de diffusion et l'image sur caméra d'un dimère de particules d'or de 40 nm, placé dans une solution à 800 mM en sel pendant une dizaine d'heures, en l'absence de polariseur d'analyse. Les modes transverses (1 sur la figure 4.17a) sont faiblement diffusants et ont une résonance autour de 540 nm. La section efficace de diffusion est plus élevée pour le mode longitudinal (2 sur la figure 4.17a).

Si l'on compare le spectre et l'image sur caméra CCD couleur, on remarque que la couleur de la tache d'Airy n'est pas dominée par le rouge alors que le pic principal du spectre est à 690 nm. La valeur de la longueur d'onde estimée par la teinte sur un tel exemple est sous-évaluée par la sensibilité de la caméra à la fréquence des modes transverses, confirmant l'impossibilité d'utiliser la caméra couleur pour des phénomènes proches de l'agrégation.

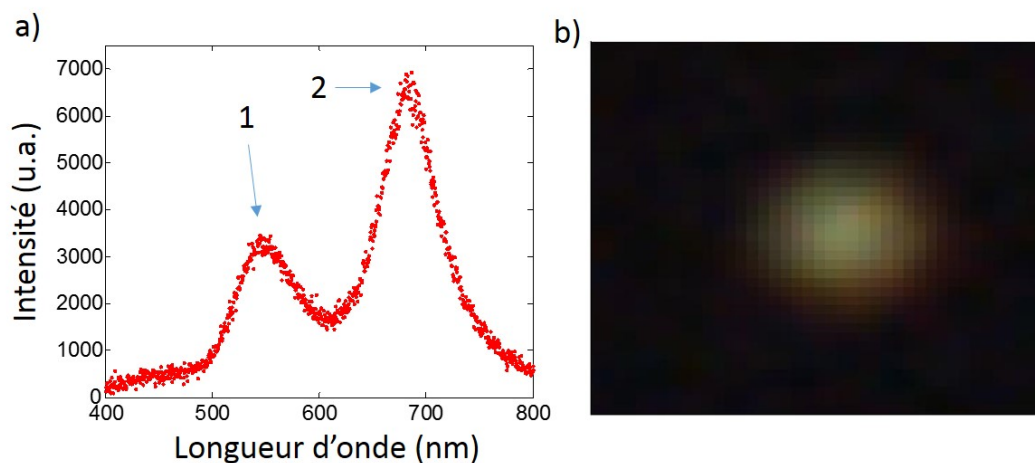


Figure 4.17 – a) Spectre de diffusion classique d'un dimère de particules de 40 nm de diamètre agrégé. La flèche 1 désigne la résonance des modes transverses et la flèche 2 désigne celle du mode longitudinal. 2) Image du même dimère obtenue avec une caméra CCD couleur.

Dans la géométrie décrite sur la figure 4.16b, la lumière diffusée à la résonance du mode longitudinal est polarisée selon l'axe du dimère projeté sur (x,y) \mathbf{p}' . Pour étudier ce phénomène, nous plaçons un polariseur linéaire devant la caméra CCD couleur et prenons des images (temps d'intégration = 3 secondes) en le tournant de 15° à chaque fois. De plus, le filtre froid est retiré afin de mesurer l'ensemble du spectre car comme le montre la figure 4.17a, les longueurs d'onde de résonance des modes longitudinaux de dimères agrégés peuvent atteindre quasiment 700 nm. Soit φ l'angle du polariseur dans le plan (x,y) . On récupère finalement 12 images, prises entre 0 et 165° (les dimères étant centrosymétriques). Les images correspondant à l'angle $\varphi = 0^\circ$ et $\varphi = 90^\circ$ sont présentées sur la figure 4.18. En observant les différents dimères, on aperçoit un changement de couleur quasi-systématique entre les deux images. Cela signifie que la très grande majorité des dimères présente une diffusion optique polarisée dans le plan (x,y) .

La figure 4.19a montre l'évolution d'un même dimère sur l'ensemble des angles mesurés. On voit clairement le changement de couleur progressif du vert (vers 45°) représentant

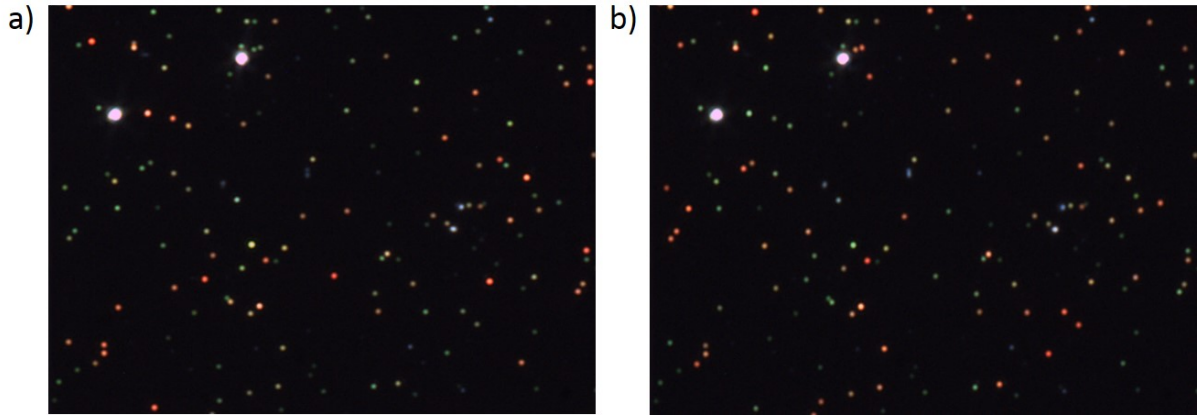


Figure 4.18 – Images polarisées à a) 0° et b) 90° d'un ensemble de dimères de particules de 40 nm de diamètre agrégés.

la résonance des modes transverses, au rouge orangé (vers 135°), correspondant au mode longitudinal. Pour chaque image, nous avons extrait la valeur de la teinte en fonction de l'angle φ que nous avons transformé en longueur d'onde correspondante en utilisant la courbe de calibration définie préalablement.

Nous avons tracé la courbe entre 0 et 345° (figure 4.19b) en dupliquant les données entre 0 et 165° afin de mieux nous représenter l'évolution de la longueur d'onde. Les points expérimentaux sont ajustés par une sinusoïde de période 180° . Pour certaines taches d'Airy, l'ajustement n'est pas possible (environ 15% des points mesurés). Cela peut correspondre à un monomère ou à un agrégat plus important (trimères et plus). Nous extrayons ensuite l'angle φ_{dim} correspondant à l'axe du dimère, c'est-à-dire l'orientation du polariseur d'analyse pour lequel le mode longitudinal est observé. Nous traçons finalement l'histogramme des angles φ_{dim} , représenté sur la figure 4.19c.

Il faut tout d'abord noter que la longueur d'onde estimée par la calibration de la caméra couleur intègre la totalité de la lumière diffusée par le dimère. Il ne s'agit donc d'une longueur d'onde de résonance du dimère que pour deux positions du polariseur : quand celui-ci est orienté selon $\varphi = \varphi_{dim}$ (mode longitudinal) et $\varphi = \varphi_{dim} + 90^\circ$ (mode transverse).

Si nous étudions les spectres de diffusion des dimères sur spectromètre, nous verrions uniquement deux résonances toujours aux deux mêmes longueurs d'onde, dont les amplitudes relatives varieraient en fonction de la polarisation. De manière empirique, nous observons que la longueur d'onde estimée varie entre ces deux extrema de manière sinusoïdale :

$$\lambda_{CCD}(\varphi) \approx \lambda_{transverse} + (\lambda_{longitudinal} - \lambda_{transverse}) * \cos^2(\varphi - \varphi_{dim})$$

De plus, nous voyons que l'histogramme est relativement homogène en fonction de l'angle. Cela signifie que l'inclinaison des dimères n'a pas d'orientation préférentielle dans la chambre. Il n'y a donc pas d'influence visible des flux de liquide lors des différentes injections.

Il est possible pour chaque dimère de tracer sur l'image initiale l'orientation de son axe principal dans le plan (x,y), comme représenté par des flèches rouges sur la figure 4.20a.

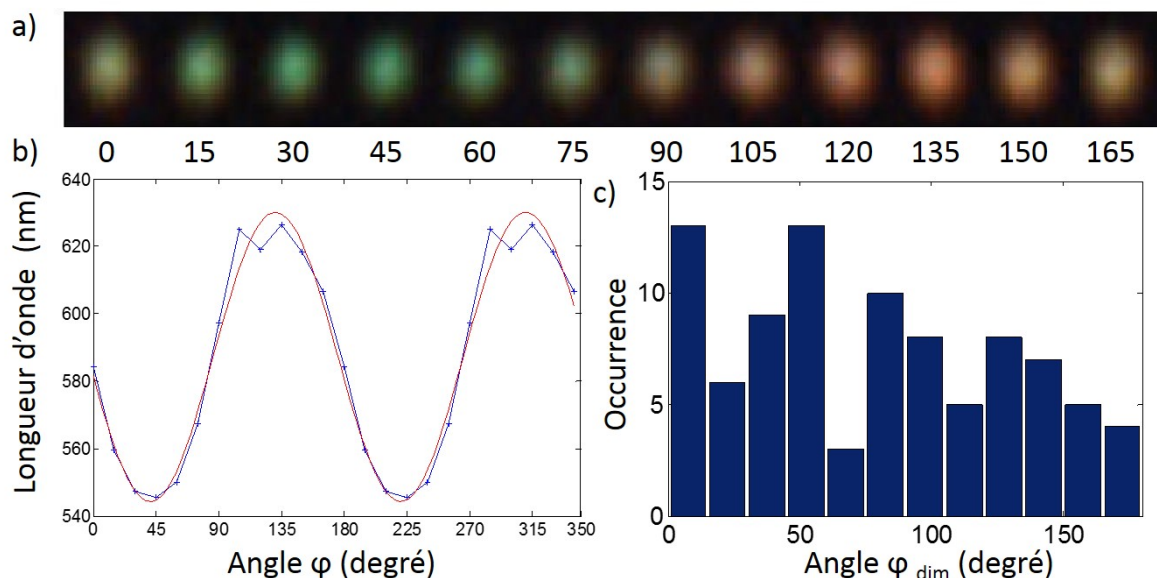


Figure 4.19 – a) Évolution de la tache d’Airy d’un dimère en fonction de l’angle φ d’un polariseur placé devant la caméra CCD couleur. b) Évolution de la longueur d’onde correspondante estimée par la teinte du dimère (courbe bleue) et son ajustement sinusoïdal (courbe rouge). c) Histogramme des angles φ_{dim} correspondant à l’orientation spatiale du dimère dans le plan (x,y).

On observe à nouveau que l’accrochage est bien isotrope puisque deux dimères voisins peuvent être inclinés parallèlement ou perpendiculairement l’un à l’autre.

Estimation de la distance interparticule. Les mesures précédentes peuvent fournir une estimation de la distance interparticule. En effet, nous avons vu que la longueur d’onde de résonance du mode longitudinal est très sensible à la distance interparticule. Lorsque le polariseur est orienté selon l’axe du dimère φ_{dim} , le spectre de diffusion présente une résonance associée au mode longitudinal. La teinte de la caméra donne dans ce cas une bonne estimation de la longueur d’onde de résonance, ce qui n’était pas le cas pour une mesure non-polarisée.

Nous avons donc estimé, pour chaque dimère dont la réponse en polarisation a pu être ajustée par une sinusoïde, la distance interparticule. Nous avons tracé sur chaque dimère de l’image initiale un point dont la couleur représente la distance interparticule estimée, selon un code couleur défini en ångströms, et indiqué sur la figure 4.20b.

Nous observons que les distances estimées sont majoritairement inférieures à 3 nm, distance correspondant au cas où les ligands *E6m* sont au contact et à la valeur limite pouvant être estimée quantitativement avec la caméra couleur sans polariseur. Ce résultat est cohérent compte tenu de la concentration saline utilisée (800 mM) et du long temps d’incubation qui a permis aux chaînes de *E6m* de s’interpénétrer. Les quelques dimères possédant des distances interparticules supérieures à 5 nm (représentant moins de 10% des mesures ici) correspondent vraisemblablement à des dimères dont la flexibilité a été réduite par une interaction non-spécifique avec le substrat.

En conclusion, nous avons montré que l’utilisation systématique d’une caméra CCD

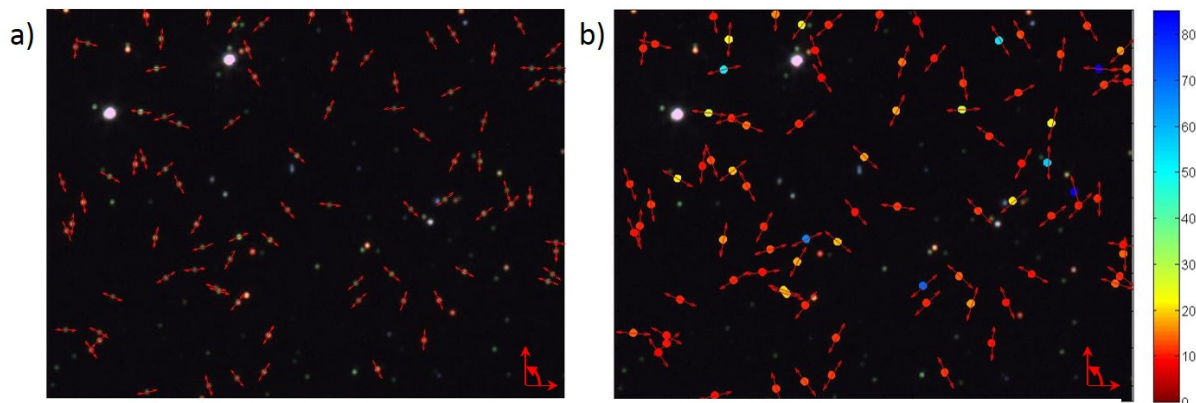


Figure 4.20 – a) Image en champ sombre sur laquelle les flèches indiquent l'orientation de chaque dimère dans le plan (x,y) de l'image. b) Image en champ sombre modifiée afin d'indiquer l'estimation de la distance interparticule. La couleur du point superposé correspond à la distance interparticule selon le code couleur (en ångströms) défini à droite de l'image.

couleur pouvait permettre de distinguer la structure ouverte ou fermée de la tige-boucle d'ADN et d'estimer des distances interparticules comprises entre 3 et 20 nm. Nous venons de voir que, combinée avec un simple polariseur, elle peut aussi fournir des informations d'orientation spatiale du dimère ainsi qu'une estimation plus précise de la distance interparticule proche de l'agrégation (< 3 nm). La figure 4.20b résume bien comment quelques images de diffusion obtenues sur une caméra couleur, correctement calibrée, peuvent fournir des informations quantitatives sur des dimères de nanoparticules d'or.

4.3.4 Suivi optique de l'ouverture et de la fermeture des dimères

Dans cette dernière partie, nous allons essayer d'utiliser nos dimères comme des capteurs optiques en démontrant la possibilité de suivre l'ouverture et la fermeture d'une tige-boucle d'ADN. Nous montrerons en parallèle les résultats obtenus en spectroscopie de diffusion, sur le spectromètre à réseau et sur une caméra CCD couleur.

Détermination du protocole d'ouverture et de fermeture.

Nous avons montré qu'il était possible de différencier les structures ouvertes et fermées à des concentrations en sel inférieures ou égales à 100 mM. Par ailleurs, dans cette gamme de concentrations, nous avons également vu que l'effet du temps d'incubation sur la morphologie des dimères était faible et l'estimation des longueurs d'onde à partir des teintes des dimères efficace.

De plus, d'après les résultats obtenus sur les particules de 8 nm et les propriétés physico-chimiques des groupements or-ADN, la réaction d'ouverture et de fermeture de la boucle ne peut se faire qu'en présence de sel. En effet, nous avons vu que l'augmentation de la force ionique diminuait la température de fusion de l'ADN, c'est-à-dire affaiblissait la liaison double brin. Thermodynamiquement, cette condition est nécessaire pour envisager l'ouverture et la fermeture de la boucle. De plus, l'ADN étant chargé négativement, ce qui

est aussi le cas pour les nanoparticules, il est nécessaire d'avoir suffisamment de contre-ions pour écranter les charges surfaciques de l'or afin que l'ADN cible puisse atteindre la boucle de l'échafaudage.

Finalement, nous avons montré que la différence structurelle entre les dimères ouverts et fermés était importante à très faible force ionique où l'agrégation est très lente. En réunissant toutes ces conditions, nous définissons le protocole d'ouverture et de fermeture de la boucle suivant :

- Mesure d'un ensemble de spectres de diffusion de dimères à 5 mM en NaCl : λ_1
- Augmentation de la force ionique à 100 mM (ajout de 200 μL de T100) puis mesure des spectres après 10 minutes d'incubation : λ_2
- Incubation des dimères avec l'ADN cible ou un ADN témoin (non hybridant) pendant 30 minutes ou au moins 12 heures
- Rinçage de la chambre avec 200 μL de T100 puis mesure des spectres : λ_3
- Diminution de la force ionique à 5 mM (ajout de 200 μL de T5) puis mesure des spectres après 10 minutes d'incubation à 5 mM : λ_4

Pour chacun des dimères, nous avons donc accès à la mesure $\frac{\lambda_4 - \lambda_1}{\lambda_1}$.

Chaque expérience est effectuée deux fois :

- Une première mesure témoin, avec un ADN ne possédant pas d'interaction avec l'échafaudage d'ADN, sert à évaluer l'influence des facteurs extérieurs (temps d'incubation, hybridation non-spécifique sur les particules...) sur la stabilité des dimères.
- Une seconde mesure avec l'ADN complémentaire de l'ADN boucle permet de définir les performances des dimères comme biocapteurs.

Tri des données. Une fois toutes les expériences effectuées (comportant chacune la mesure d'au moins une centaine de dimères), nous avons dû trier sélectivement les données. Nous avons directement retiré tous les dimères qui s'étaient détachés (cas fréquent lorsque le temps d'incubation dépasse plusieurs heures), ceux dont la présence d'impuretés a empêché l'obtention d'une mesure du spectre de diffusion et ceux dont le spectre n'était pas ajustable par une lorentzienne. Les dimères restants ont été dénommés "dimères valables". Parmi ceux-là, nous avons également retiré tous les dimères dont la variation maximale de longueur d'onde sur l'ensemble de la mesure était inférieure à 5 nm.

Ce critère a permis de retirer de la distribution les monomères et les dimères ayant une configuration spatiale les rendant insensibles à l'expérience (par exemple lorsque la particule normalement libre est liée de manière non-spécifique au substrat). En outre, pour les expériences de fermeture de la tige-boucle, nous avons retiré les dimères dont $\lambda_3 - \lambda_2 < - 5$ nm. Ce critère a permis de retirer les dimères ayant un comportement anormal suite à une incubation prolongée.

Les résultats des tris des dimères sont présentés dans le tableau 4.1, récapitulant le nombre de dimères mesurés, le nombre de dimères valables et finalement le nombre de dimères gardés dans la distribution. Le tableau indique également le pourcentage de dimères utilisés dans la distribution par rapport au nombre de dimères valables.

Table 4.1 – Tableau récapitulatif des nombres de dimères mesurés, valables et utilisés lors des expériences, ainsi que le ratio dimères utilisés/dimères valables, pour des temps d'incubation de 30 minutes et 12 heures.

Expérience - 30 minutes	Ouverture	Ouv témoin	Fermeture	Ferm témoin
Nombre de dimères mesurés	105	105	143	157
Nombre de dimères valables	85	91	114	138
Nombre de dimères utilisés	53	61	85	106
Pourcentage	62,4	67,0	74,6	76,8
Expérience - 12 heures	Ouverture	Ouv témoin	Fermeture	Fer témoin
Nombre de dimères mesurés	146	146	310	200
Nombre de dimères valables	122	118	261	160
Nombre de dimères utilisés	93	68	128	108
Pourcentage	76,2	57,6	49,0	67,5

D'après le tableau, environ 75% des dimères valables ont été utilisés dans les distributions. La majorité des dimères inutilisés présentaient une variation de longueur d'onde inférieure à 5 nm. Ces dimères particuliers peuvent être très présents dans certaines expériences, ce qui explique que le pourcentage puisse être seulement de l'ordre de 50%.

Ouverture et fermeture pour 12 heures d'incubation

ADN témoin. Le but des expériences consistant à incuber les dimères avec un ADN témoin, c'est-à-dire non hybridant, est d'étudier la stabilité des dimères dans la chambre microfluidique, dans les mêmes conditions expérimentales que les expériences visant à ouvrir ou fermer la boucle. Le paramètre spectral analysé étant défini comme $\frac{\lambda_4 - \lambda_1}{\lambda_1}$, un système stable devrait donner un paramètre égal à zéro. Les figures 4.21a et d montrent les distributions de $\Delta\lambda/\lambda$ lors des deux expériences témoins, avec des dimères ouverts en a) et fermés en d).

On remarque que l'on obtient deux distributions centrées autour de valeurs positives, témoignant d'un décalage vers le rouge des résonances des dimères. Ce décalage spectral est du même ordre de grandeur (5-10 nm) que celui entre dimères ouverts et fermés obtenu en figure 4.10a. Il y a donc un vieillissement des nanostructures qui peut survenir pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, il peut y avoir de l'adsorption non-spécifique de brins d'ADN sur les particules, augmentant l'indice diélectrique et donc la longueur d'onde de résonance des dimères. De plus, il est possible que certains ligands se détachent de la surface des particules suite aux différentes injections effectuées lors de l'expérience. Cela déstabilise alors le dimère induisant un décalage vers le rouge de la résonance. Finalement, vu que la position préférentielle des dimères correspond à la particule en suspension plus haute que celle accrochée sur le substrat, il est possible qu'une sédimentation sur cette longue échelle de temps rapproche les particules l'une vers l'autre, entraînant le décalage fréquentiel vers le rouge.

On remarque également que le décalage spectral vers le rouge est plus important en

partant de dimères fermés (test d'ouverture) que de dimères ouverts (test de fermeture) avec des distributions de formes différentes (celle de la boucle ouverte étant plus étalée et moins symétrique que celle de la boucle fermée). Ceci est lié à la distance interparticule initiale, qui est plus faible pour les dimères fermés. Dans cette configuration, une augmentation de la constante diélectrique de l'environnement ou une réduction de la distance interparticule entraîne un décalage spectral vers le rouge plus grand que pour un dimère avec une distance initiale plus élevée.

En conclusion, ces expériences démontrent que les dimères étudiés ne sont pas complètement stables dans la gamme temporelle considérée, sans doute en raison de leurs chimies de surface, et qu'une réaction témoin est nécessaire pour analyser l'effet de l'ADN cible.

ADN cible. Les figures 4.21b et e montrent les histogrammes de $\Delta\lambda/\lambda$ lorsque les dimères sont incubés avec l'ADN cible destiné à fermer la boucle (c'est-à-dire rapprocher les particules l'une de l'autre) (4.21b) ou à l'ouvrir (4.21e). On remarque que les deux histogrammes sont centrés autour de valeurs positives, celle de la fermeture étant plus élevée (moyenne : 0,0172) que celle de l'ouverture (moyenne : 0,0074).

Les distributions ont globalement les mêmes allures que celles obtenues avec l'ADN témoin, c'est-à-dire étalée et asymétrique pour la fermeture et gaussienne pour l'ouverture. Cependant, elles sont également légèrement décalées par rapport aux expériences témoins correspondantes, sur la droite pour la fermeture et sur la gauche pour l'ouverture. Afin de visualiser ce décalage, nous avons soustrait aux histogrammes correspondants à l'ADN cible ceux de l'ADN témoin (figure 4.21c pour la fermeture et 4.21f pour l'ouverture).

On observe que, pour la fermeture, il y a une sur-probabilité que les longueurs d'onde soient décalées vers le rouge, comme indiqué par le rectangle rose. Pour l'ouverture, on observe une sur-probabilité que les longueurs d'onde soient décalées vers le bleu par rapport à l'échantillon témoin, comme indiqué par le rectangle bleu. Théoriquement, l'ouverture devrait donner un histogramme centré autour d'une valeur négative. Le fait que ce ne soit pas le cas s'explique par le vieillissement des structures. Expérimentalement, les effets de vieillissement s'ajoutent à ceux d'ouverture et de fermeture de la boucle. S'ils vont dans le même sens dans le cas de la fermeture de la boucle, ils s'opposent dans le cas de l'ouverture.

Peut-on utiliser des tests statistiques pour valider les décalages spectraux ?

Pour comparer deux distributions, il existe plusieurs tests statistiques dont l'utilisation dépendra de la variable à comparer (moyenne, variance, distribution...). Dans notre cas, nous nous intéressons à des comparaisons entre deux distributions pour des échantillons indépendants. Nous utilisons donc le test de la somme des rangs de Wilcoxon [186]. L'hypothèse nulle correspond à des distributions continues et de médianes égales. L'application du test aux valeurs de $\Delta\lambda/\lambda$ pour l'ouverture et la fermeture indique que l'hypothèse nulle est rejetée avec un seuil de confiance à 0,05. Cela signifie que nous avons pu démontrer statistiquement la différence spectrale entre l'ouverture et la fermeture de la boucle.

Par ailleurs, l'application du test statistique entre les expériences d'ouverture et de fermeture d'une part et leurs témoins correspondants d'autre part montre que les différences sont également significatives, confirmant l'impression visuelle donnée par les histogrammes

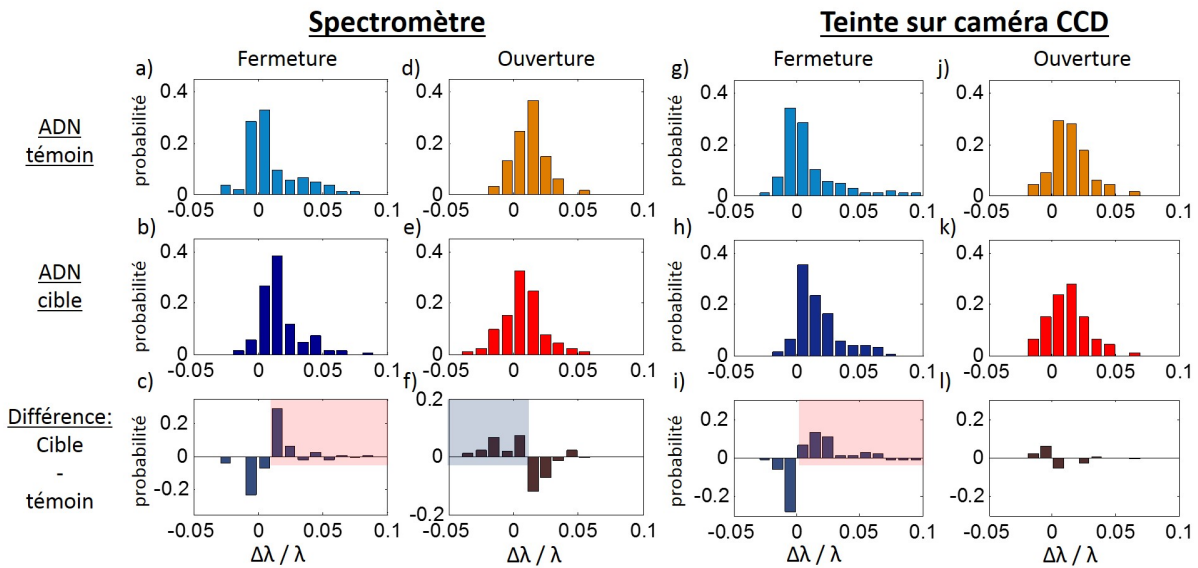


Figure 4.21 – Distributions du rapport $\Delta\lambda/\lambda$ mesuré par le spectromètre (a,b,d,e) ou estimé par la teinte de la caméra CCD (g,h,j,k) sur des dimères ouverts (a,b,g,h) ou fermés (d,e,j,k), lors d'une incubation de 12 heures avec un ADN témoin (a,d,g,j) ou avec l'ADN cible (b,e,h,k). Les histogrammes c, f, i et l représentent la différence entre les histogrammes obtenus avec l'ADN cible et les expériences témoins.

des figures 4.21c et f. En sommant les amplitudes des barres dans les zones colorées, on peut donner un aperçu de l'efficacité de chacune des expériences. On trouve donc un décalage dans le rouge par rapport à l'expérience témoin pour 34% des dimères ouverts contre un décalage dans le bleu par rapport à l'expérience témoin pour 19% des dimères fermés. Ce résultat confirme les conclusions obtenues sur les dimères de 8 nm selon lesquelles la fermeture de la boucle est cinétiquement favorisée par rapport à son ouverture.

En conclusion, nous observons que le suivi spectral de l'ouverture ou de la fermeture d'une boucle d'ADN liée à un dimère de particules d'or est difficile compte tenu des problèmes de stabilité intra-nanostructure pour un temps d'incubation aussi long. Toutefois, la comparaison entre une réaction avec un ADN témoin ou l'ADN cible, indique que quelques dizaines de pourcents des dimères analysés subissent un changement de conformation, permettant d'observer statistiquement la réaction. Pour simplifier la méthode de mesure optique, nous allons analyser cette réaction avec une simple caméra CCD couleur.

Utilisation de la caméra CCD. Toutes les expériences précédentes ont également été suivies avec une caméra CCD couleur en prenant des clichés (500 ms) à chaque étape. Nous avons donc pu, pour chaque dimère, obtenir une teinte et ainsi estimer une longueur d'onde de résonance. Nous avons tracé de la même manière que les histogrammes des figures 4.21a-f les histogrammes des figures 4.21g-l.

Les histogrammes en 4.21g, h, j, k ont les mêmes allures que les histogrammes en 4.21a, b, d, e, respectivement. Si l'on étudie uniquement la fermeture, on trouve que les distributions obtenues avec l'ADN cible d'une part et l'ADN témoin d'autre part sont statistiquement différentes. Ceci est confirmé visuellement avec l'histogramme en 4.21i. La somme des barres de la zone rose est de 0,28, ce qui est plus faible que pour les mesures

au spectromètre. On peut donc suivre grâce à une caméra CCD la réaction de fermeture par rapport à l'expérience témoin mais avec un rapport signal/bruit plus faible qu'avec un spectromètre.

Pour l'ouverture, le test statistique confirme que les deux distributions sont équivalentes, ce qui est visuellement confirmé par l'histogramme en 4.21f. En conclusion, les mesures de teinte permettent de suivre la fermeture de la boucle mais ne sont pas assez sensibles pour suivre l'ouverture.

Toutefois, l'utilisation de la caméra n'est que préliminaire dans la mesure où aucune optimisation n'a été réalisée dans le but de l'adapter à l'expérience. En effet, la mesure de teinte ne consiste qu'en une photographie de 500 ms et un traitement rapide informatique. En comparaison, la mesure spectrale nécessite de déplacer l'échantillon sur chacun des spectres, de mesurer le spectre pendant plusieurs secondes et d'effectuer un traitement informatique pour le normaliser par rapport au spectre de la lumière blanche. On peut donc aisément imaginer qu'une optimisation des mesures par une caméra CCD permettra d'obtenir des mesures expérimentales plus performantes.

Ouverture et fermeture pour 30 minutes d'incubation

En s'inspirant des résultats des expériences sur des dimères de particules de 8 nm et pour limiter les problèmes de stabilité rencontrés avec un long temps d'incubation, nous avons tenté de réaliser l'ouverture et la fermeture de la boucle en diminuant le temps de réaction des dimères de particules de 40 nm de 12 heures à seulement 30 minutes, les autres conditions demeurant inchangées par ailleurs. Le nombre de dimères étudiés lors de chaque expérience est indiqué dans le tableau 4.1. Les résultats sont présentés dans la figure 4.22.

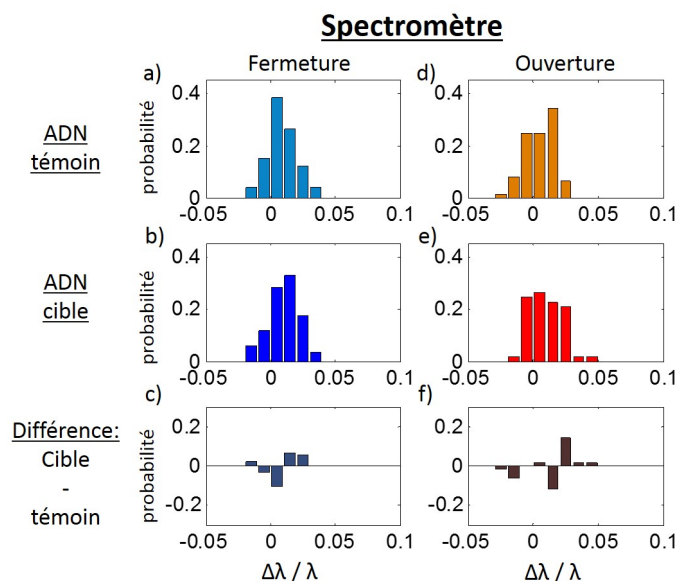


Figure 4.22 – Distributions du rapport $\Delta\lambda/\lambda$ mesuré par le spectromètre (a,b,d,e) sur des dimères ouverts (a,b) ou fermés (d,e), lors d'une incubation de 30 minutes avec un ADN témoin (a,d) ou avec l'ADN cible (b,e). Les histogrammes c, f, i et l représentent la différence entre les histogrammes obtenus avec l'ADN cible et les expériences témoins.

Les figures 4.22a et d montrent l'effet du nouveau protocole expérimental sur la stabilité des dimères. On remarque cette fois encore que les deux histogrammes sont légèrement décalés vers le rouge. Cela confirme un vieillissement, toutefois moindre, des nanostructures du fait des différentes injections et de l'hybridation non-spécifique de l'ADN sur les particules.

Les histogrammes sont également légèrement plus resserrés que ceux obtenus lors d'une incubation de 12 heures, l'élargissement venant sans doute des effets de vieillissement plus lents, comme les effets de gravité. Les figures 4.22b et d montrent les histogrammes obtenus en incubant les dimères avec des brins d'ADN cible. En utilisant encore une fois le test de la somme des rangs de Wilcoxon, on démontre que les distributions utilisant l'ADN cible et celles utilisant l'ADN témoin ne sont pas significativement différentes, dans aucun des cas. Ceci est confirmé visuellement par les figures 4.22c et f ne montrant aucune tendance particulière.

En conclusion, 30 minutes d'incubation ne sont pas suffisantes pour détecter une variation significative du couplage plasmon relative à une ouverture ou une fermeture d'un brin d'ADN. Cela signifie que la cinétique de la réaction est plus lente que pour des particules de 8 nm. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences. Tout d'abord, la gêne stérique et les forces électrostatiques étant plus faibles entre deux particules de 8 nm, l'ADN cible peut sans doute accéder plus aisément à l'espace interparticule où se trouve la boucle. De plus, il est probable que la présence du substrat et le greffage de la nanostructure limitent également la cinétique de la réaction par rapport à des dimères en suspension (cas des dimères de 8 nm).

L'applicabilité de ces dimères de particules de 40 nm comme capteurs à l'échelle de la molécule unique nécessite donc une amélioration de la stabilité intra-nanostructure et une réduction de la gêne stérique pour permettre une augmentation de la force ionique et ainsi améliorer la cinétique de la réaction sans introduire de décalage spectral non-spécifique vers le rouge.

4.4 Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons étudié les propriétés optiques de dimères de nanoparticules d'or de 40 nm de diamètre, assemblés préférentiellement autour d'un brin d'ADN, afin de suivre leur déformation à l'échelle du nanomètre lorsque l'on modifie la force ionique locale ou que l'on déforme l'échafaudage d'ADN. En calibrant la réponse spectrale vis-à-vis de la distance interparticule, nous avons analysé le rapprochement entre les deux nanoparticules en fonction de la concentration en sel pour définir les conditions de stabilité internes au dimère. De plus, nous avons observé la différence non-ambigüe entre les réponses optiques de dimères comportant une boucle ouverte ou fermée d'ADN, démontrant un écart de distance interparticule pouvant atteindre 7,5 nm. Cette différenciation n'est plus possible pour des concentrations en sel supérieures à 100 mM, pour lesquelles les interactions électrostatiques écrantées dominent la géométrie des dimères.

En calibrant la réponse spectrale estimée sur une caméra couleur par rapport à celle mesurée directement sur un spectromètre à réseau, nous avons montré que ce suivi de

déformation nanométrique, liée à la boucle d'ADN ou à la force ionique, pouvait être quantitativement analysé sur un détecteur à bas coût pour des distances interparticules comprises entre 3 et 20 nm, et jusqu'à 1 nm en utilisant un simple polariseur linéaire. Ces résultats ouvrent des perspectives nouvelles sur le développement de règles moléculaires (*molecular rulers*) pouvant être caractérisées, en champ large, avec une simple lampe halogène et du matériel photographique grand public.

Ces travaux ont aussi permis de définir un protocole de suivi de l'ouverture et de la fermeture de la boucle de l'échafaudage d'ADN et de valider l'utilisation de dimères auto-assemblés comme capteur à l'échelle du brin d'ADN individuel. Ces travaux nous ont montré les limites actuelles de nos nanostructures en termes de stabilité et de réactivité. Avec un temps de mesure long, un bruit de mesure important est observé par le décalage spectral non-spécifique vers le rouge de la résonance des dimères. Ce bruit, dû au vieillissement des dimères, est du même ordre de grandeur que le signal attendu pour passer de dimères ouverts à des dimères fermés (et vice-versa). C'est uniquement en comparant les résultats à une mesure de référence, utilisant un brin non hybridant, que nous avons pu observer que plusieurs dizaines de pourcents de dimères changeaient de conformation.

La comparaison entre des mesures sur spectromètre et sur caméra couleur montre que l'étude de la teinte introduit un bruit supplémentaire dans cette analyse conformationnelle, permettant l'étude de la fermeture des dimères mais rendant non-significatifs les résultats obtenus pour leur ouverture. Cette analyse montre l'importance d'une chimie de surface limitant la sensibilité des capteurs à la force ionique locale que nous allons analyser dans le prochain chapitre.

Avec un temps d'incubation court, nous observons que la réactivité de ces nanostructures est faible et qu'il faut donc limiter la gêne stérique pour améliorer la cinétique de réaction. Une possibilité est de délocaliser le site de reconnaissance du capteur vis-à-vis de l'interstice entre les particules. Cela nécessite un échafaudage d'ADN plus complexe (comme un origami 3D d'ADN [105, 106, 187]) et dépasse le cadre de ce travail. Toutefois les résultats obtenus dans ce chapitre montrent qu'en améliorant la réactivité et la stabilité de ces dimères de nanoparticules d'or sur ADN, il est possible d'imaginer des capteurs optiques de biomolécules individuelles fonctionnant avec du matériel de mesure peu coûteux.

Minimisation des interactions interparticules dans des assemblages de nanoparticules d'or

Table des matières

5.1	Protocole de détermination de la stabilité d'un dimère	121
5.1.1	Chimie de surface	121
	Définition des ligands utilisés	121
	Influence de la chimie de surface sur la stabilisation colloïdale	122
5.1.2	Protocole de mesure	122
	Montage optique	122
	Protocole expérimental	122
	Pureté et choix des échantillons	123
5.2	Étude spectrale de la stabilité des dimères	124
5.2.1	Longueurs d'onde de résonance en fonction de la force ionique	124
5.2.2	Mise en évidence de deux sous-populations de dimères	125
5.2.3	Longueurs d'onde de résonance en fonction de la force ionique pour les deux sous-populations	127
5.3	Estimation de la distance interparticule selon les différentes chimies de surface	129
5.3.1	Calibration de la relation entre la longueur d'onde de résonance et la distance interparticule	129
5.3.2	Évolution en fonction de la concentration saline	129
5.4	Fermeture de dimères A11E6c	133
5.4.1	Protocole expérimental	133
5.4.2	Tri des données	133
5.4.3	Résultats	134
5.5	Conclusions	135

Les propriétés optiques des groupements de nanoparticules d'or assemblés par des brins d'ADN ont été utilisées dans de nombreuses applications telles que des biocapteurs colorimétriques [14, 23, 150] ou des *molecular rulers* [16, 68]. Rendre ces nano-assemblages de particules stables dans différents environnements chimiques (variations de pH, de force ionique...) ou thermodynamiques, tout en étant spécifiquement réactifs, est une étape fondamentale pour optimiser leurs performances et étendre leur gamme d'utilisation. En particulier, leur utilisation en tant que biocapteurs dans des milieux complexes, comme du sérum animal, réduit fortement leur efficacité [23], pour deux raisons principales :

- la forte concentration en sel des milieux physiologiques (≈ 150 mM) ;
- la présence de biomolécules qui peuvent s'adsorber non spécifiquement sur les particules et modifier leurs propriétés optiques d'une part, et leur réactivité d'autre part.

En effet, nous avons démontré dans le chapitre précédent que la modification de la force ionique altérerait largement les propriétés structurales des dimères de nanoparticules d'or considérés. D'autre part, nous avons démontré que le vieillissement naturel des nanostructures empêchait leur utilisation en tant que biocapteurs à l'échelle de la molécule unique. Par conséquent, pour exploiter pleinement le potentiel de ces nanostructures en biophysique et en biochimie, il faut étendre leur gamme de fonctionnement autant que possible, c'est-à-dire rendre leur morphologie la moins dépendante possible des conditions expérimentales, tout en étant sensible à une information chimique choisie.

Pour cela, la chimie de surface des nanoparticules est un paramètre clé. En effet, comme décrit dans le chapitre 1, la chimie de surface des nanoparticules régit les interactions interparticules à longue distance via la stabilisation électrostatique, et à courte distance via la stabilisation stérique associée aux interactions entre ligands.

Dans ce chapitre, nous allons étudier les propriétés optiques de dimères de nanoparticules d'or de 40 nm de diamètre, possédant six chimies de surface différentes, à base de PEG ou d'alkyle-PEG. Nous verrons comment la force ionique modifie les propriétés optiques des dimères, avant de faire une analyse structurale via la distance interparticule. Nous déterminerons quels paramètres d'un ligand (longueur, composition chimique, groupement chimique terminal) influent sur ses propriétés de stabilisation électrostatique ou stérique. Finalement, nous tenterons de fermer la tige-boucle de l'échafaudage d'ADN d'un dimère pour la chimie de surface ayant démontré les meilleures propriétés de stabilité morphologique des structures vis-à-vis de la force ionique locale.

5.1 Protocole de détermination de la stabilité d'un dimère

Pour analyser la stabilité des dimères, nous étudions la variation du couplage plasmon en fonction de la force ionique à l'échelle de dimères uniques. Nous allons utiliser le même protocole pour les différentes chimies de surface.

5.1.1 Chimie de surface

Définition des ligands utilisés

Dans ce chapitre, nous utilisons des dimères de nanoparticules d'or de 40 nm de diamètre, dont la synthèse a été détaillée dans le chapitre 3. L'échafaudage d'ADN utilisé dans cette partie est constitué d'une structure tige-boucle ouverte comme représenté sur la figure 5.1a. Il est identique quelle que soit la chimie de surface étudiée. De la même manière que dans le chapitre précédent, les chimies de surface des particules sont légèrement différentes l'une de l'autre afin qu'une seule particule soit greffée sur la surface de verre d'une chambre microfluidique tandis que l'autre reste en solution. Les principales propriétés des chimies de surface sont récapitulées dans le tableau 5.1. Il est possible de classer les chimies de surface selon plusieurs critères afin de comparer les effets associés sur la stabilité des dimères. Voici les trois critères que nous étudierons dans ce chapitre :

- **l'hydrophobicité** : deux ligands sont composés uniquement de groupements poly(éthylène)-glycol hydrophiles tandis que les quatre autres sont des ligands amphiphiles alkyle-PEG (la chaîne alkyle étant la partie hydrophobe),
- **la longueur** : quatre ligands ont une longueur estimée de 2 nm ou moins (dénommés 'courts') et deux ligands ont une longueur supérieure à 3,5 nm ('longs'), et
- **le groupement chimique final** : trois ligands possèdent un groupement terminal en méthyl éther, deux possèdent un acide carboxylique et un se termine par un alcool. En particulier, trois ligands de chimies terminales différentes possèdent des structures comparables en ce qui concerne la taille de la chaîne alkyle et le nombre de monomères de PEG (A6E3m, A6E3c et A6E4a). L'analyse de l'influence du groupement terminal sera particulièrement pertinente dans ce cas.

Table 5.1 – Tableau récapitulatif des propriétés des six chimies de surface étudiées : nom, terminaison chimique de la chaîne (Ac. carbox. : acide carboxylique), longueur approximative de la chaîne, pureté, c'est-à-dire le pourcentage en monomères, dimères et trimères, déterminée à partir des images en champ sombre, nombre (Nb) de dimères utilisés et pourcentage correspondant par rapport au nombre de dimères initialement mesurés (130).

Nom	Terminaison	Longueur (nm)	Pureté M/D/T en (%)			Nb	% utilisé
E6m	Méthyl éther	2	30	60	10	110	84,6
E16m	Méthyl éther	4,8	25	70	5	87	66,9
A6E3m	Méthyl éther	1,9	40	50	10	91	70
A6E3c	Ac. carbox.	2,1	35	55	10	95	73,1
A6E4a	Alcool	2	35	55	10	88	67,7
A11E6c	Ac. carbox.	3,5	40	60	0	72	55,4

Influence de la chimie de surface sur la stabilisation colloïdale

Nous avons vu dans le chapitre 1 que deux critères régissaient les propriétés de stabilité d'une suspension colloïdale : la stabilisation stérique et la stabilisation électrostatique. D'après les résultats du chapitre précédent, l'interaction entre les particules d'un dimère dans la chambre microfluidique est principalement électrostatique à faible force ionique car les distances interparticules sont bien supérieures à la longueur du ligand. C'est seulement lorsque la force ionique augmente et que les chimies de surface entrent en contact que la répulsion stérique intervient. En solution, les deux stabilisations sont complémentaires car les particules se rencontrent avec le mouvement brownien.

Nous avons classé les ligands selon trois paramètres : l'hydrophobicité, la longueur et le groupement chimique final. La stabilisation stérique est directement liée à la taille et à la composition chimique des dimères tandis que la stabilisation électrostatique est liée à la charge effective négative des particules d'or (attribuée à des ions AuCl_2^- en surface [?]) et, si présentes, aux charges du ligand (charge négative sur les fonctions acide carboxylique ici).

5.1.2 Protocole de mesure

Montage optique

Les dimères sont étudiés en chambre microfluidique avec le même montage expérimental que celui décrit dans le chapitre 4. Pour rappel, nous faisons de la spectroscopie de diffusion de dimères uniques à l'aide d'un microscope à champ sombre. La grande majorité des spectres mesurés sont associés à leur image acquise avec une caméra CCD couleur. Le spectrographe à réseau est calibré en mesurant le spectre d'une lampe à mercure.

Protocole expérimental

Les différentes étapes nécessaires à l'accrochage des dimères dans la chambre microfluidique sont semblables à celles décrites dans le chapitre 4. Après la dernière étape,

c'est-à-dire 10 minutes d'incubation des dimères dans la chambre optique à 50 mM en NaCl pour permettre leur accrochage sur la surface de silice, la chambre est rincée avec 200 μL d'une solution tampon contenant 25 mM de NaCl (T25).

Une fois l'échantillon installé et prêt à être étudié optiquement, le reste du protocole se déroule selon les étapes suivantes :

- La force ionique est abaissée à 5 mM par injection de 200 μL de T5, suivie de 10 minutes d'incubation à cette force ionique.
- Pendant ce temps, 130 positions de dimères sont enregistrées en déplaçant les dimères un à un à la position correspondant au conjugué de l'entrée de la fibre optique.
- Le champ sombre est mesuré en enregistrant un spectre dans une zone ne contenant ni particule, ni impureté.
- Les 130 spectres de diffusion sont mesurés (temps d'intégration = 5 secondes).
- La force ionique est augmentée à 25 mM en NaCl par injection de 200 μL de T25, suivie de 10 minutes d'incubation à cette force ionique.
- Le fond noir et les 130 spectres de diffusion des mêmes dimères sont mesurés. L'opération est répétée avec des concentrations salines croissantes, à savoir 5, 25, 50, 100, 200, 400 et 800 mM.

L'analyse et le choix des dimères se font selon le même protocole que celui détaillé dans le chapitre 4. Le nombre de dimères utilisés pour chacune des chimies de surface est fourni dans le tableau 5.1, ainsi que le pourcentage que cela représente par rapport aux 130 dimères initialement mesurés. On remarque que pour toutes les chimies de surface, plus de 2/3 des dimères mesurés sont utilisés dans l'étude, excepté pour le ligand alkyle-PEG long *A11E6c* pour lequel seulement 55% des dimères sont utilisés. Pour cette chimie de surface, nous avons observé qu'un plus grand nombre de dimères se détachaient de la surface à faible force ionique.

Le fait de pouvoir étudier individuellement de nombreux dimères avant et après l'augmentation de la force ionique va notamment nous permettre d'identifier plusieurs sous-populations présentant des comportements morphologiques différents [142].

Pureté et choix des échantillons

Les images en champ sombre nous permettent d'estimer la pureté des échantillons d'après l'intensité des taches d'Airy associées aux structures résonantes. Nous avons classé, pour chacune des chimies de surface, les structures en trois catégories : monomères, dimères et trimères (ou structures plus larges). Les données sont regroupées dans le tableau 5.1. On voit que les puretés se situent entre 50 et 60% pour les ligands alkyle-PEG et entre 60 et 70% pour les ligands PEG.

Ces puretés sont bien supérieures à celles obtenues dans des études où la synthèse des dimères est effectuée directement dans la chambre microfluidique (de l'ordre de quelques pourcents) [23,150]. La pureté est néanmoins plus faible que celle mesurée dans le chapitre précédent (80%). Deux raisons peuvent expliquer cette différence :

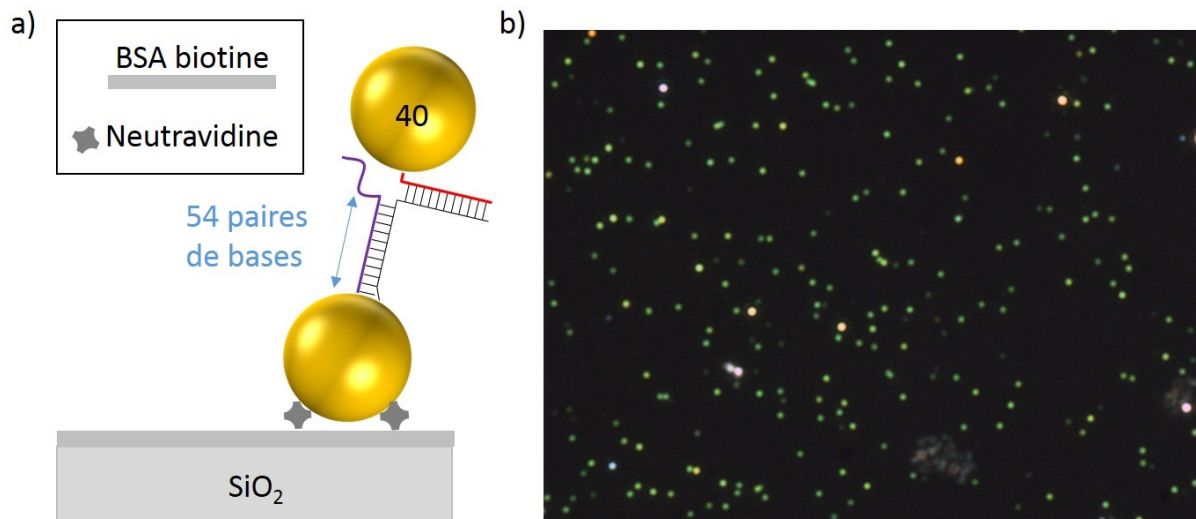


Figure 5.1 – a) Schéma d'un dimère de nanoparticules d'or de 40 nm de diamètre, dont la structure tige-boucle est ouverte, dans une chambre microfluidique. b) Image plein champ des dimères schématisés en a) avec une chimie de surface en *E16m*.

- Les échantillons dans ce chapitre n'ont été purifiés qu'une seule fois par électrophorèse, tandis que ceux du chapitre précédent ont été purifiés deux fois.
- Toutes les mesures de pureté ont été faites après incubation des nanostructures à une faible force ionique (5 mM en NaCl) pour laquelle les répulsions électrostatiques sont fortes et minimisent la stabilité des dimères qui peuvent se rompre pour donner des monomères.

5.2 Étude spectrale de la stabilité des dimères

5.2.1 Longueurs d'onde de résonance en fonction de la force ionique

Pour chacune des chimies de surface, il est possible de tracer l'évolution des longueurs d'onde de résonance en fonction de la force ionique (5, 25, 50, 100, 200, 400 et 800 mM), comme sur la figure 4.5 du chapitre précédent. Les ligands comparés sur la figure 5.2 sont les deux ligands PEG (*A6m* et *A16m*) et les deux ligands alkyle-PEG possédant une terminaison en acide carboxylique (*A11E6c* et *A6E3c*). Comme nous le verrons plus tard dans ce chapitre, les courbes associées aux autres ligands alkyle-PEG courts sont très semblables à celle du ligand *A6E3c* et ont été retirées de la figure par souci de lisibilité.

Premièrement, nous remarquons que l'augmentation de la force ionique décale les résonances des dimères de nanoparticules d'or vers le rouge, correspondant à une réduction de la distance interparticule renforçant le couplage plasmon. Cette tendance se retrouve pour toutes les chimies de surface. Cela provient de l'écrantage des charges surfaciques qui diminue la répulsion électrostatique entre les particules, ainsi que de la diminution de la rigidité de l'échafaudage d'ADN à forte force ionique.

Nous remarquons cependant que ce décalage des résonances en fonction de la force

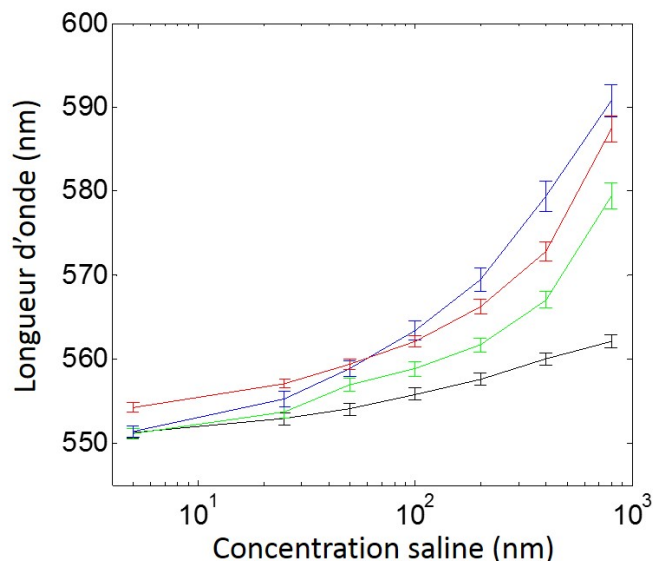


Figure 5.2 – Évolution de la moyenne et de l'erreur-type de la longueur d'onde de résonance de dimères de particules d'or de 40 nm de diamètre, avec une tige-boucle d'ADN ouverte, en fonction de la chimie de surface des particules, après 10 minutes d'incubation à différentes concentrations en NaCl (*A6m* : rouge; *A16m* : vert; *A11E6c* : noir et *A6E3c* : bleu).

ionique est fortement lié à la chimie de surface, témoignant de la grande influence de celle-ci sur les propriétés physico-chimiques des assemblages de nanoparticules. En particulier, nous voyons que la variation de longueur d'onde associée au ligand *A11E6c* est faible par rapport aux trois autres ligands. Ce résultat est particulièrement intéressant dans la conception de capteurs sensibles à une information chimique spécifique et utilisables sur une large gamme de forces ioniques.

Pour vérifier la reproductibilité de ce résultat, l'analyse de l'échantillon *A11E6c* a été effectuée à deux reprises, sur deux synthèses différentes de dimères, pour nous assurer que la faible sensibilité vis-à-vis de la force ionique en présence de ce ligand n'était pas liée à un problème de fabrication de l'échantillon ou de la chambre microfluidique.

Nous observons également que les deux ligands 'longs' possèdent des longueurs d'onde de résonance plus petites que celles associées aux ligands courts présentant une même composition hydrophile ou amphiphile, ainsi que le même groupement terminal. Il semble donc que l'allongement du ligand entraîne un étirement des dimères.

Finalement, il y a une augmentation des erreurs-types avec la force ionique. Cette inhomogénéité croissante des réponses optiques des dimères ne peut être analysée quantitativement par des mesures de longueurs d'onde moyennes. Nous utilisons notre capacité à suivre l'évolution des fréquences de résonance de chaque dimère indépendamment pour analyser différents comportements morphologiques en fonction de la force ionique locale.

5.2.2 Mise en évidence de deux sous-populations de dimères

Pour s'affranchir en partie de l'inhomogénéité des tailles des particules, ainsi que de leur non-sphéricité, nous avons tracé la variation de la longueur d'onde de résonance

entre chaque force ionique et celle à 5 mM, plutôt que la longueur d'onde de résonance absolue. Les histogrammes obtenus sont présentés sur la figure 5.3a dans le cas de la chimie de surface *A6E3c*.

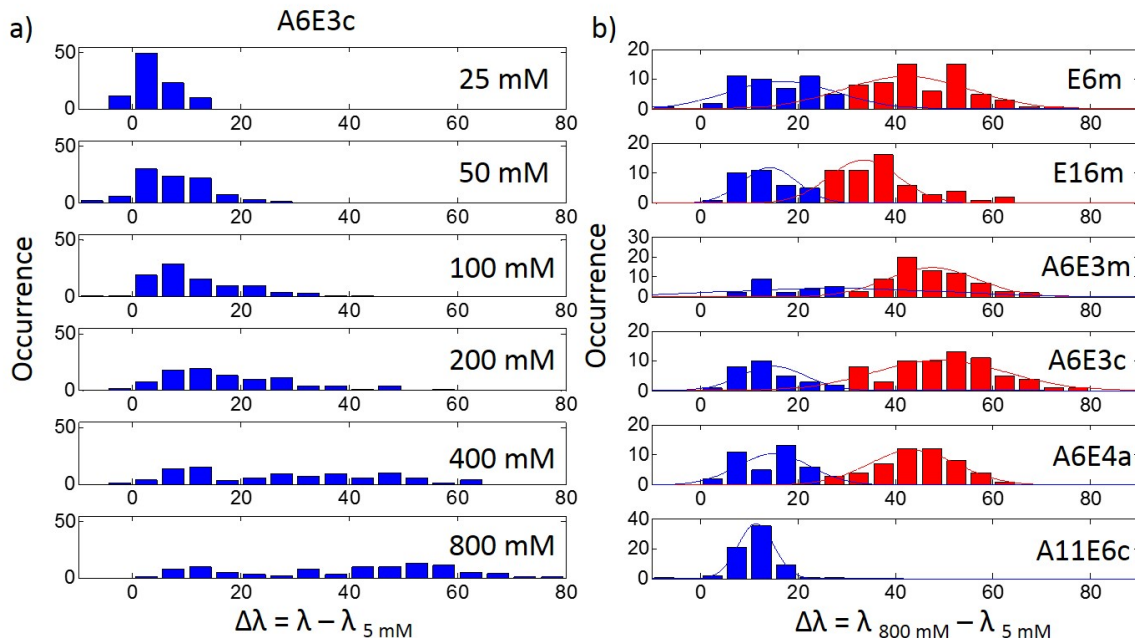


Figure 5.3 – a) Histogrammes de la différence entre la longueur d'onde de résonance à une concentration saline donnée et la longueur d'onde de résonance à 5 mM pour différentes concentrations en NaCl, pour des dimères de nanoparticules d'or de 40 nm de diamètre avec une chimie de surface en *A6E3c*. b) Histogrammes de la différence entre les longueurs d'onde de résonance à 800 et 5 mM pour différentes chimies de surface. Les histogrammes comportent deux distributions distinctes, représentées en bleu et en rouge (avec les ajustements gaussiens correspondants).

Comme attendu d'après la courbe de l'évolution des longueurs d'onde moyennes, nous observons des histogrammes centrés autour de valeurs positives de $\Delta\lambda$, de plus en plus grandes lorsque la force ionique augmente. L'élargissement des distributions, lorsque la force ionique augmente, montre une plus grande dispersion des distances interparticules allant jusqu'à la formation de deux populations distinctes. En effet, à 800 mM en NaCl, l'histogramme comporte deux distributions gaussiennes de $\Delta\lambda$ centrées autour de 10-15 nm et 50-55 nm respectivement.

Afin de confirmer cette tendance, nous avons tracé, pour chacune des chimies de surface, l'histogramme des décalages des longueurs d'onde de résonance entre 800 et 5 mM en NaCl, comme représenté sur la figure 5.3b.

Nous remarquons que cinq des six chimies de surface présentent effectivement une distribution de $\Delta\lambda$ en forme de double gaussienne centrée autour de valeurs similaires (15 et 50 nm environ). Le ligand en alkyle-PEG 'long' *A11E6c* présente quant à lui une gaussienne unique centrée autour de 10-15 nm.

Pour analyser le comportement de ces deux sous-populations de dimères, nous les avons

triées en fixant une valeur seuil de $\Delta\lambda$. Les dimères présentant un fort décalage spectral (colonnes rouges) correspondent à la "population 1", tandis que les structures présentant une plus faible variation de fréquence de résonance (colonnes bleues) sont dans la "population 2". Le tableau 5.2 récapitule la proportion de dimères appartenant à chacune de ces populations et les valeurs de seuil choisies pour chaque chimie de surface. Les dimères de la population 2, à part dans le cas particulier du *A11E6c*, sont moins nombreux que ceux de la population 1.

L'observation de deux populations dans ces mesures n'est pas contradictoire avec les résultats du chapitre précédent. En effet, l'étude du vieillissement rapide d'un dimère ouvert, en *E6m*, du chapitre précédent prenait en compte uniquement les fréquences de résonance moyennes avec un échantillon statistique plus petit qu'ici. Dans la suite, nous distinguerons et traiterons indépendamment les dimères des deux populations.

Table 5.2 – Tableau récapitulatif pour les six chimies de surface étudiées du nombre (Nb) de dimères utilisés, du pourcentage des dimères appartenant à chacune des populations 1 et 2, de la valeur du seuil définissant les deux populations et de la concentration C_{max} entraînant l'agrégation des suspensions.

Nom	Nb utilisés	Population 1 (%)	Population 2 (%)	Seuil (nm)	C_{max} (mM)
<i>E6m</i>	110	62	38	25	50
<i>E16m</i>	87	67	33	20	75
<i>A6E3m</i>	91	81	19	25	75
<i>A6E3c</i>	95	69	31	30	125
<i>A6E4a</i>	88	55	45	30	75
<i>A11E6c</i>	72	0	100	NA	> 500

5.2.3 Longueurs d'onde de résonance en fonction de la force ionique pour les deux sous-populations

Pour plus de clarté, nous ne représentons pas toutes les réponses optiques correspondant à chacune des chimies de surface sur un même graphique. Nous étudions tout d'abord les chimies de surface en PEG (*E6m* : rouge et *E16m* : vert) et celles en alkyle-PEG avec une terminaison en acide carboxylique (*A11E6c* : noir et *A6E3c* : bleu), et dans un deuxième temps, nous comparons les trois ligands en alkyle-PEG de même longueur, mais avec des chimies terminales différentes (*A6E3c* : bleu, *A6E4a* : cyan et *A6E3m* : magenta).

Nous étudions tout d'abord la moyenne et l'erreur-type de la longueur d'onde de résonance en fonction de la force ionique pour la population 1 (figure 5.4a-b) et la population 2 (figure 5.4c-d). Nous vérifions bien que, quelle que soit la chimie de surface, les résonances se décalent vers le rouge lorsque la force ionique augmente et ce de manière plus importante pour la population 1 que pour la population 2. Par exemple, les résonances à 800 mM se situent entre 585 et 600 nm pour la population 1 alors qu'elles se situent entre 562 et 571 nm pour la 2. De plus, au sein-même des groupes, les courbes ont des allures assez similaires.

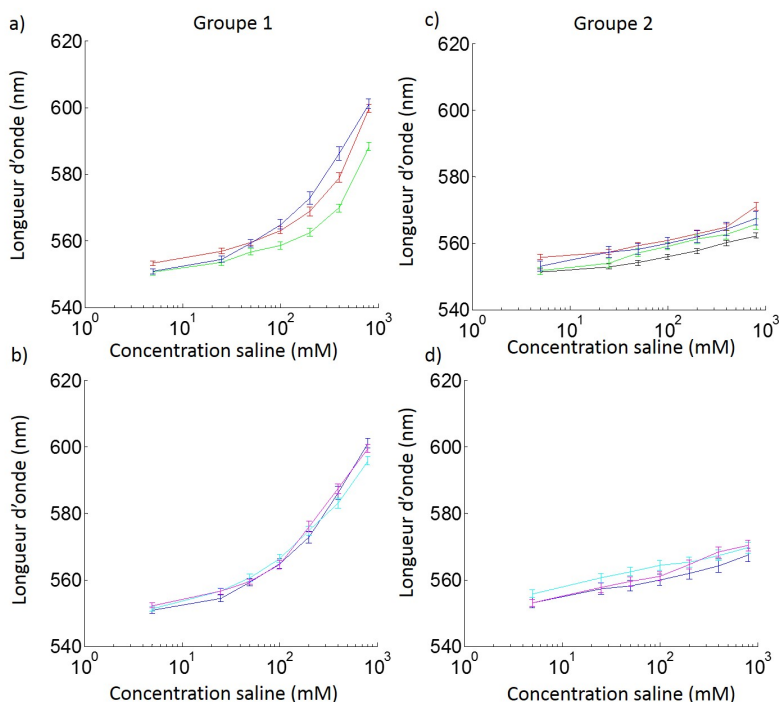


Figure 5.4 – Évolution de la moyenne et de l'erreur-type de la longueur d'onde de résonance des dimères de la population 1 (a et b) et 2 (c et d) en fonction de la force ionique, pour différentes chimies de surface. (Dans a et c : *E6m* en rouge, *E16m* en vert, *A6E3c* en bleu et *A11E6c* en noir. Dans b et d : *A6E3c* en bleu, *A6E4a* en cyan et *A6E3m* en magenta.

Cependant, on remarque à nouveau que les résonances des dimères possédant des chimies de surface longues (*E16m* et *A11E6c*) sont en-dessous de celles des dimères possédant une chimie de surface courte. Une explication possible est que les ligands plus longs ont tendance à s'aligner les uns avec les autres (comme dans les monocouches auto-assemblées), ce qui les étire et qui étire aussi le groupement trithiol (décrit dans le chapitre 1) assurant la liaison entre l'ADN et la particule. Cela entraîne alors un éloignement des particules et donc, un léger décalage vers le bleu.

Par ailleurs, la figure 5.4b montre une quasi-superposition des trois courbes pour les dimères de la population 1 stabilisés par les courts ligands alkyle-PEG, mais présentant des groupements chimiques terminaux différents. Cela signifie que ce groupement terminal n'a qu'un rôle secondaire dans la stabilité des dimères en chambre microfluidique, pour ce type de ligand. Ceci est assez étonnant car nous avons vu dans le chapitre 3, qu'en suspension, les particules recouvertes des ligands *A6E3m* et *A6E4a* s'agrégeaient vers 75 mM en NaCl, contre 125 mM pour *A6E3a* (les valeurs C_{max} sont rappelées dans le tableau 5.2) Il semble qu'à l'échelle d'un dimère unique, les répulsions électrostatiques dues aux charges négatives de la particule d'or soient dominantes par rapport à celles dues au ligand.

Nous observons donc une grande reproductibilité des réponses optiques des dimères appartenant aux deux sous-populations mises en évidence. Les différences nettes observées dans la figure 5.2 pour les fréquences de résonance moyennes en variant les chimies de surface correspondent donc principalement à l'importance relative des deux sous-populations.

Toutefois, une analyse quantitative du comportement morphologique des dimères n'est pas aisée à partir des mesures spectrales. Pour traduire ces informations en tailles des dimères, nous allons, comme dans le chapitre précédent, utiliser une courbe de calibration longueur d'onde de résonance / distance interparticule.

5.3 Estimation de la distance interparticule selon les différentes chimies de surface

5.3.1 Calibration de la relation entre la longueur d'onde de résonance et la distance interparticule

Il est nécessaire de redéfinir une courbe de calibration entre la longueur d'onde mesurée et la distance interparticule. En effet, les particules utilisées dans ce chapitre ne correspondent pas au même lot commercial que celles du chapitre précédent. Dans la relation de calibration du chapitre précédent, le diamètre choisi dans les calculs de la théorie de Mie était de 39 nm. Cette valeur permettait d'obtenir une distance interparticule comprise entre 20 et 3 nm lors d'une variation de la concentration en NaCl entre 5 et 800 mM. Elle correspondait par ailleurs à l'estimation obtenue par des mesures effectuées en cryo-EM. Des images MEB des particules utilisées dans ce chapitre ont montré qu'elles étaient légèrement plus grandes. En choisissant une taille de 40 nm dans les calculs de la théorie de Mie et en ajustant les points obtenus par une courbe bi-exponentielle, nous obtenons une estimation de la distance permettant de retrouver la gamme de distances interparticules (de 20 à 3 nm) pour le ligand *E6m*, comme montré par la courbe pointillée rouge de la figure 5.5a.

5.3.2 Évolution en fonction de la concentration saline

Avec la courbe de calibration longueur d'onde / distance interparticule, nous pouvons estimer l'évolution de la distance interparticule en fonction de la concentration saline pour les différentes chimies de surface (figure 5.5a-c). Nous avons associé les chimies de surface deux à deux (*E6m* et *E16m* en a), *A6E3c* et *A11E6c* en b) et *A6E4a* et *A6E3M* en c)), pour chacune des sous-populations (population 1 en trait pointillé et population 2 en trait plein).

Comme attendu par les mesures spectrales, la distance interparticule diminue progressivement quand on augmente la force ionique, et ce de manière beaucoup plus forte pour la sous-population 1 que pour la 2. Les deux types de dimères ont des distances interparticules correspondant à peu près à des brins d'ADN étirés à faible force ionique (autour de 20 nm). En revanche, les distances interparticules à forte force ionique sont beaucoup plus élevées pour le groupe 2 que pour le groupe 1.

Afin d'être plus quantitatif, nous avons tracé, à 800 mM en sel, les histogrammes des distances estimées, pour les différentes chimies de surface (figure 5.5d). Nous observons que

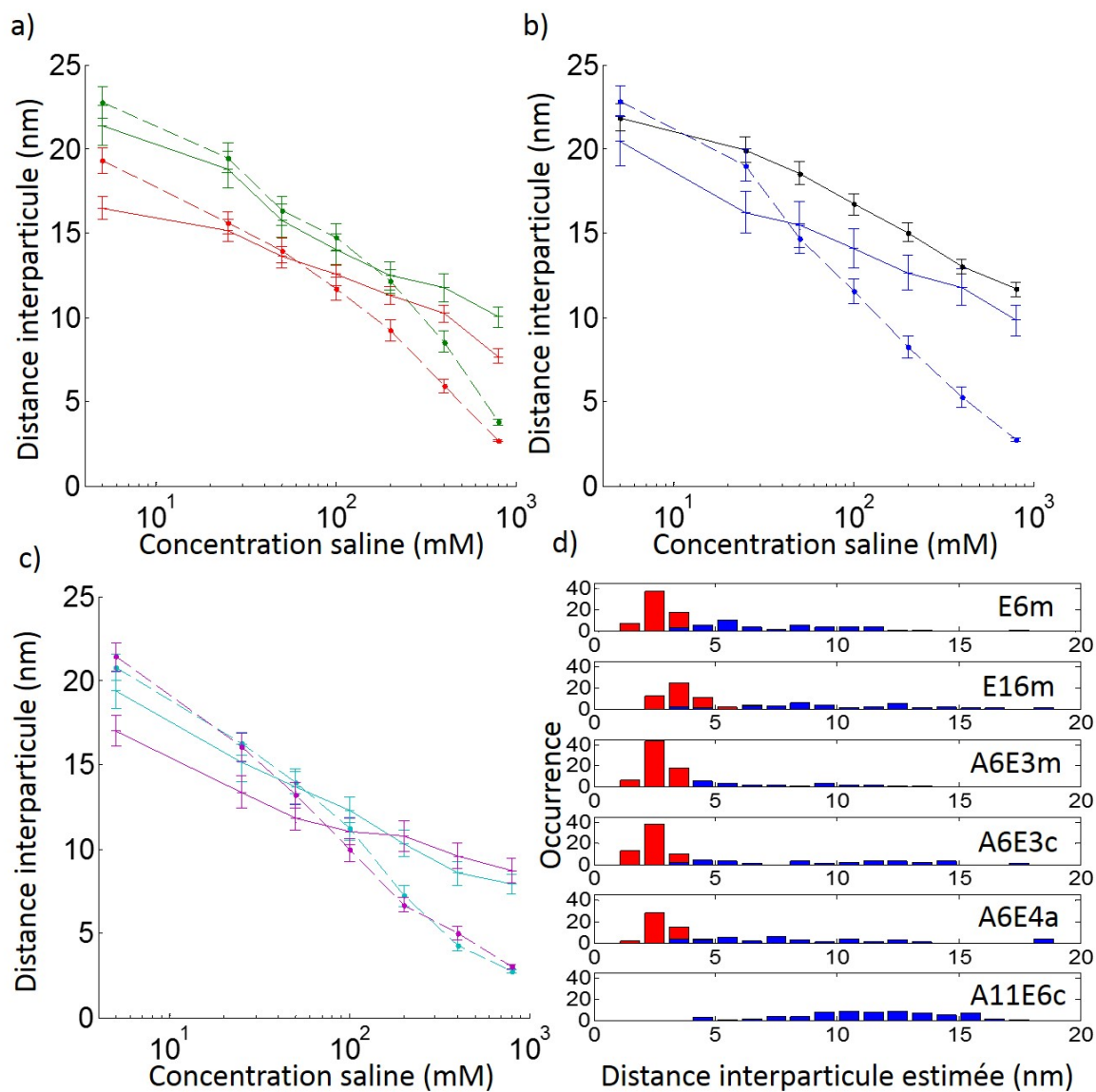


Figure 5.5 – Moyennes et erreurs-types des distances interparticulaires estimées en fonction de la force ionique, en fonction de la chimie de surface : (a) *E6m* (rouge) et *E16m* (vert), (b) *A6E3c* (bleu) et *A11E6c* (noir) et (c) *A6E4a* (cyan) et *A6E3m* (magenta). On distingue les dimères de la population 1 (trait pointillé) de ceux de la population 2 (trait plein). d) Histogrammes des distances interparticulaires estimées à 800 mM en NaCl pour les différentes chimies de surface et les deux populations de dimères (population 1 en rouge et population 2 en bleu).

les distances interparticules des dimères de la population 1 (en rouge) sont non seulement plus faibles, mais également plus faiblement dispersées que celles de la population 2 (en bleu).

Pour la population 1, les moyennes des distances interparticules à 800 mM valent 2,7 nm pour *E6m* (lui-même mesurant 2 nm), *A6E3m* (mesurant 1,9 nm) et *A6E3c* (mesurant 2,1 nm) ; 3,0 nm pour *A6E4a* (mesurant 2 nm) et 3,8 nm pour *E16m* (mesurant 4,8 nm). Pour tous les ligands, on observe que la distance interparticule finale légèrement plus faible que les deux couches de ligand au contact. Cela signifie qu'à 800 mM en NaCl et avec un temps d'incubation court, les chimies de surface sont au contact avec une interpénétration partielle des chaînes, comme observé dans le chapitre précédent.

Ainsi, pour les dimères appartenant à la population 1, les distances interparticules estimées sont dominées par des interactions électrostatiques répulsives, les interactions stériques n'interviennent que pour des distances proches du contact entre chimies de surface des particules. De plus, si la présence du brin d'ADN limite la distance interparticule maximale, il ne semble pas influencer la déformation des dimères en fonction de la force ionique.

Le comportement des dimères du groupe 2 est bien différent. En effet, à 800 mM en NaCl, les distances interparticules estimées varient de 7,7 nm (pour *E6m*) à 11,7 nm (pour *A11E6c*) et il n'y a donc pas de contact entre les chimies de surface. De plus, à faible force ionique, nous observons systématiquement que, pour une même chimie de surface, les distances interparticules des dimères de la population 2 sont plus faibles que celles de la population 1, de 1 à 5 nm selon les cas. Pourtant, la séparation des populations étant effectuée à grande force ionique, elle n'introduit aucune hypothèse sur la morphologie des dimères à faible force ionique.

En pratique, les distances moyennes s'étendent entre 19,3 nm (pour *E6m*) et 22,9 nm (pour *A3E6c*) pour la population 1 et entre 16,5 nm (pour *E6m*) et 21,9 nm (pour *A11E6c*) pour la population 2. Cela signifie qu'initialement, à 5 mM en NaCl, les dimères de la population 2 ne sont pas totalement étirés.

La morphologie de ces dimères ne semble donc pas uniquement dominée par des interactions électrostatiques puisqu'ils ne prennent pas toutes les conformations autorisées par la longueur de l'ADN et des ligands. Nous pouvons donc supposer que, pour ces nanostructures, une interaction avec l'ADN ou le substrat par exemple, influe sur leur taille. La séparation des deux sous-populations semble donc correspondre à des dimères 'libres' (population 1) et à des dimères 'contraints' (population 2).

La question soulevée par cette analyse est de comprendre pourquoi, avec le ligand amphiphile *A11E6c*, 100% des dimères sont contraints alors qu'ils sont majoritairement libres pour les autres chimies de surface. Cette différence notable de comportement explique pourquoi ces dimères sont faiblement sensibles à la force ionique. Cette grande stabilité vis-à-vis de la force ionique avait déjà été observée en suspension puisque les particules d'or stabilisées par *A11E6c* sont stables à des concentrations en sel supérieures à 500 mM tandis qu'avec les autres chimies de surface, elles s'agrègent à des concentrations comprises entre 50 et 125 mM.

Par rapport au ligand *E6m* du chapitre précédent, le ligand *A11E6c* est modifié à la fois par son caractère hydrophobe (présence d'une chaîne alkyle de 11 carbones), sa longueur (3,5 nm au lieu de 2 nm) et sa chimie terminale (acide chargé négativement au lieu d'un méthyl éther neutre).

En comparant les comportements des trois ligands alkyle-PEG courts présentant des chimies terminales différentes, nous avons observé que cette propriété avait un effet négligeable sur la stabilité interne des dimères.

L'influence de la longueur, qui affecte la gêne stérique, peut être directement étudiée en comparant les dimères *E6m* (2 nm) et *E16m* (4,8 nm). Nous observons qu'avec un ligand plus long, les distances interparticules initiales et finales sont plus élevées mais que la diminution de la distance en augmentant la force ionique est similaire (figure 5.5a). Les interactions stériques n'influent sur la stabilité colloïdale qu'au contact des chimies de surface, il n'est pas étonnant qu'elles n'influent pas efficacement sur les interactions électrostatiques qui dominent la morphologie des dimères en cinétique rapide. Il est possible que des ligands plus longs ralentissent l'agrégation des particules à forte force ionique pour de longs temps d'incubation. Mais de longs ligands hydrophiles ne sont pas la bonne solution pour minimiser l'influence de la force ionique sur la morphologie de ces dimères.

Il est donc probable que l'hydrophobie de la chaîne alkyle du ligand *A11E6c* soit le facteur principal de stabilisation des dimères considérés. En première approximation, cette conclusion peut paraître surprenante : en effet, comme la gêne stérique, l'hydrophobie partielle du ligand a été introduite pour ralentir, voire éviter, l'interpénétration des chaînes et l'agrégation irréversible des particules. Pour des particules libres, elle devrait donc n'influer qu'au contact des chimies de surface.

Pour les dimères *A11E6c*, la distance interparticule varie entre 22 nm à 5 mM en NaCl (correspondant à un échafaudage d'ADN totalement étiré) et 12 nm à forte force ionique. D'après l'histogramme de la figure 5.5d, seuls 9 dimères sur 72 seraient au contact des chimies de surface à 800 mM en NaCl. L'hydrophobie du ligand doit donc contraindre le dimère dans sa déformation. L'hypothèse la plus probable est une interaction répulsive entre le ligand amphiphile et l'échafaudage d'ADN double brin hydrophile. Le fait que la particule évite d'être en contact avec le squelette sucre-phosphate de l'ADN peut expliquer que le contact des chimies de surface ne soit jamais atteint. Cette hypothèse est renforcée par l'observation selon laquelle les dimères *A11E6c* ont beaucoup plus tendance à se détacher de la surface fonctionnalisée hydrophile de la chambre microfluidique que des dimères synthétisés avec les autres chimies de surface.

Ce caractère hydrophobe semble très sensible à la longueur de la chaîne alkyle du ligand. En effet, que ce soit en suspension ou pour un dimère unique, le ligand *A11E6c* stabilise bien plus les particules d'or que le ligand *A6E3c*. Une étude complémentaire, qui dépasse le cadre de cette thèse, permettrait de définir une longueur minimale de la chaîne alkyle pour conférer un caractère hydrophobe à la chimie de surface des particules d'or.

5.4 Fermeture de dimères A11E6c

A l'aide de l'étude précédente, nous avons trouvé que le ligand A11E6c permettait de rendre la morphologie des dimères très stable vis-à-vis de la force ionique. Il est donc probable que cette stabilité ralentisse voire supprime le vieillissement des structures, un processus qui empêche l'utilisation de ces dimères comme capteurs à l'échelle de la molécule unique. Nous allons dans cette partie tenter de fermer la tige-boucle de l'échafaudage d'ADN.

5.4.1 Protocole expérimental

Pour cela, nous nous inspirons du protocole utilisé dans le chapitre 4, mais en augmentant les forces ioniques dans les différentes étapes. Cela est possible grâce à la stabilité accrue des dimères avec cette chimie de surface. Cela permet de diminuer la température de fusion de l'ADN et d'écranter les charges surfaciques afin que l'ADN cible puisse accéder à l'échafaudage. Nous tentons dans un premier temps de réaliser la fermeture de la boucle car nous avons précédemment démontré qu'elle était favorisée par rapport à l'ouverture.

Le protocole de fermeture de la boucle est le suivant :

- Mesure d'un ensemble de spectres de diffusion de dimères à 50 mM en NaCl : λ_1
- Augmentation de la force ionique à 400 mM (ajout de 200 μL de T400) puis mesure des spectres après 10 minutes d'incubation : λ_2
- Incubation des dimères avec l'ADN cible ou un ADN témoin (non hybridant) pendant 12 heures
- Rinçage de la chambre avec 200 μL de T400 puis mesure des spectres : λ_3
- Diminution de la force ionique à 50 mM (ajout de 200 μL de T50) puis mesure des spectres après 10 minutes d'incubation à 50 mM : λ_4

Pour chacun des dimères, nous avons donc accès à la mesure $\frac{\lambda_4 - \lambda_1}{\lambda_1}$.

5.4.2 Tri des données

Nous effectuons un tri des dimères en retirant de la distribution ceux qui se sont détachés du substrat, ceux non ajustables avec une lorentzienne et finalement ceux dont la variation maximale de longueur d'onde sur l'ensemble de la mesure est inférieure à 2 nm. En comparaison, nous avons choisi une valeur seuil de 5 nm dans le chapitre précédent, mais les variations de longueurs d'onde associées au ligand A11E6c sont beaucoup plus faibles.

Les résultats des tris des dimères sont présentés dans le tableau 5.3, récapitulant le nombre de dimères mesurés, le nombre de dimères gardés dans la distribution et le pourcentage correspondant.

Table 5.3 – Tableau récapitulatif des nombres (Nb) de dimères mesurés et utilisés lors des expériences, ainsi que du pourcentage de dimères utilisés correspondant.

Expérience - 12 heures	Fermeture	Témoin
Nb dimère mesurés	121	130
Nb dimère utilisés	81	72
Pourcentage	67	55

5.4.3 Résultats

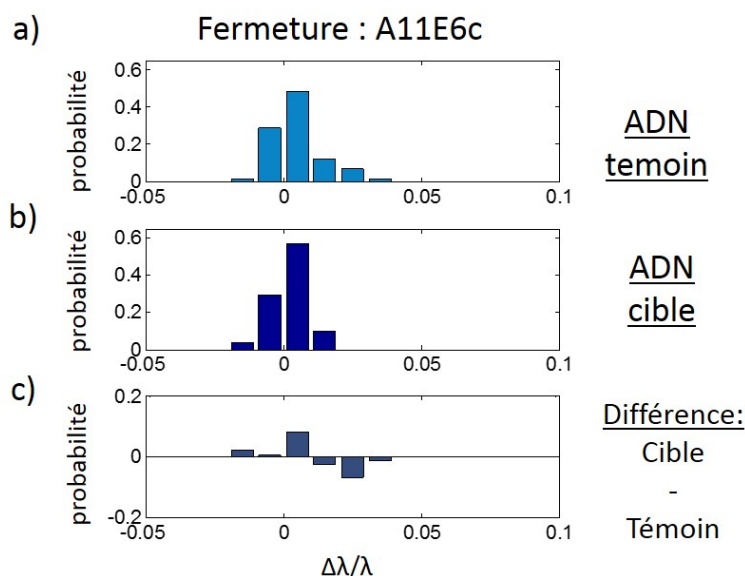


Figure 5.6 – Distribution du rapport $\Delta\lambda/\lambda$ mesuré à l'aide d'un spectromètre sur des dimères ouverts et dont la chimie de surface est à base du ligand *A6E11c*, lors d'une incubation de 12 heures avec un ADN témoin (a) ou avec l'ADN cible (b). c) Histogramme représentant la différence entre les histogrammes obtenus avec l'ADN cible et un ADN témoin.

Expérience témoin. Pour rappel, le but des expériences consistant à incuber les dimères avec un ADN témoin, c'est-à-dire non hybridant, est d'étudier la stabilité des dimères dans la chambre microfluidique, dans les mêmes conditions expérimentales que les expériences visant à fermer la boucle. Le paramètre spectral analysé étant défini comme $\frac{\lambda_4 - \lambda_1}{\lambda_1}$, un système stable devrait donner un paramètre égal à zéro. La figure 5.6a montre la distribution de $\Delta\lambda/\lambda$ lors de l'expérience témoin.

On remarque que l'on obtient une distribution quasiment centrée autour de 0, mais très légèrement décalée vers le rouge (environ 2 nm). Ce décalage est bien moins important que celui mesuré lors des expériences utilisant une chimie de surface en *E6m*, même lors d'expériences avec des temps d'incubation plus courts. De plus, l'histogramme est beaucoup moins étalé. Il n'y a donc pratiquement plus de vieillissement des nanostructures. Les deux principales raisons sont d'une part la stabilité accrue des dimères grâce à la

chimie de surface en *A11E6c*, et d'autre part l'impossibilité pour l'ADN non hybridant de s'absorber sur la surface des nanoparticules en raison de la chaîne alkyle du ligand [24].

ADN cible. La figure 5.6b montre l'histogramme de $\Delta\lambda/\lambda$ lorsque les dimères sont incubés avec l'ADN cible destiné à fermer la structure en tige-boucle. On remarque que l'histogramme ressemble fortement à celui de l'expérience témoin et est centré autour de la même valeur. L'histogramme de la figure 5.6c obtenu en soustrayant l'histogramme correspondant à l'ADN témoin à celui de l'ADN cible confirme leur très grande similitude. En utilisant le test de la somme des rangs de Wilcoxon, on démontre que les distributions utilisant l'ADN cible et celles utilisant l'ADN témoin ne sont pas significativement différentes.

En conclusion, nous avons démontré que l'utilisation d'une chimie de surface à base d'alkyle-PEG permettait de s'affranchir des phénomènes de vieillissement des dimères. Toutefois, l'absence de décalage spectral en présence de l'ADN cible indique qu'il n'est pas possible de fermer le dimère en présence du ligand *A11E6c*. Deux raisons peuvent expliquer ce phénomène :

- premièrement, la gêne stérique accrue (ligand plus long) et l'hydrophobie des chaînes alkyles peuvent empêcher l'ADN cible de s'approcher de l'échafaudage d'ADN, et ce même à 400 mM en NaCl, et
- deuxièmement, des mesures spectrales complémentaires effectuées sur des dimères présentant une boucle fermée ont donné des réponses optiques de dimères ouverts, indiquant que la tige d'ADN n'est pas stable en présence du ligand *A11E6c*.

Ainsi, même si l'ADN cible réagit avec l'échafaudage dynamique, il est peu probable que cela se traduise par un décalage spectral du dimère. Ceci conforte l'idée de délocaliser le site reconnaissance de l'analyte à quelques dizaines de nanomètres des particules d'or.

5.5 Conclusions

Nous avons étudié dans ce chapitre les propriétés optiques de dimères de nanoparticules d'or de 40 nm de diamètre, avec différentes chimies de surface, afin de suivre leur déformation à l'échelle du nanomètre lorsque l'on modifie la force ionique locale. L'échafaudage d'ADN étant identique dans les différentes structures, les différences de comportement obtenues entre les différents dimères peuvent être directement liées à la structure de la chimie de surface. Nous avons pu déterminer des comportements différents entre les différents ligands. Notamment, le ligand *A11E6c* stabilise très fortement les dimères vis-à-vis de la force ionique.

Le fait que l'étude porte sur un grand nombre de dimères nous a permis de discriminer deux populations de structures, dont une semble contrainte par son environnement (brin d'ADN ou substrat), réduisant la gamme dynamique de distances interparticules des dimères.

La stabilisation d'une suspension colloïdale de particules par greffage de ligands à leur

surface provient à la fois d'effets stériques (lorsque les particules sont au contact) et d'effets électrostatiques (quand elles ne le sont pas). L'étude de stabilité des dimères dont la distance entre les particules est maintenue par un brin d'ADN a montré que les interactions électrostatiques étaient principalement contrôlées par les charges effectives des particules d'or. Cela a également permis de mettre à jour d'autres paramètres régissant la stabilité d'une nano-structure auto-assemblée, comme les interactions hydrophobes-hydrophiles entre les ligands et l'échafaudage l'ADN.

Nous avons finalement tenté de fermer la structure tige-boucle de l'échafaudage à très forte force ionique en utilisant le ligand *A11E6m*. Cela nous a permis de nous affranchir du vieillissement des structures et des adsorptions non-spécifiques sur la surface des nanoparticules. La structure telle quelle ne permet pas à un ADN cible d'accéder à la tige-boucle d'ADN confinée entre les particules, pour des raisons à la fois stériques et d'hydrophobie.

L'utilisation de ce protocole expérimental combiné avec l'étude plein champ par caméra CCD pourrait permettre de tester de nombreuses chimies de surface afin de déterminer celle qui fournirait à la fois une bonne stabilité vis-à-vis de la force ionique et du vieillissement, et une bonne réactivité de l'échafaudage d'ADN.

Perspectives et conclusion générale

Table des matières

6.1	Influence d'autres stimuli extérieurs : cas particulier de la température	138
6.1.1	Protocole expérimental.	138
6.1.2	Spectroscopie d'objets uniques en fonction de la température .	140
	Étude de la longueur d'onde de résonance moyenne	140
	Variation de la longueur d'onde de résonance au cours du deuxième cycle	142
6.1.3	Conclusion et perspectives	142
6.2	Analyse temporelle de clignotements de dimères	143
6.2.1	Observation sur la caméra CCD couleur	143
6.2.2	Analyse spectrale	145
6.2.3	Conclusion et perspectives	146
6.3	Conclusion générale	147

Dans cette dernière partie, nous allons décrire des résultats préliminaires ouvrant des perspectives nouvelles sur l'étude de dimères dynamiques : l'influence de la température sur la morphologie et la stabilité de ces nanostructures ; mais aussi l'observation d'événements transitoires indiquant un comportement bistable. Ces données seront complétées de la conclusion générale de cette thèse et des perspectives qu'elle ouvre.

6.1 Influence d'autres stimuli extérieurs : cas particulier de la température

L'utilisation de nanoparticules dans des applications thérapeutiques est en plein essor grâce à leurs propriétés photothermiques permettant de chauffer fortement et très localement et d'induire ainsi la nécrose de tissus biologiques [1–4, 6]. Depuis peu, l'utilisation d'auto-assemblages de nanoparticules reliées par de l'ADN [188, 189] ou d'agrégats de nanoparticules contrôlés par le pH se développe pour la détection et l'élimination des cellules cancéreuses [190]. En effet, une fois les cellules cancéreuses éliminées, le désassemblage de telles structures en nanoparticules individuelles de faible diamètre, permet une meilleure élimination de celles-ci par l'organisme [188].

La connaissance de l'évolution structurale de groupements auto-assemblés lors d'un échauffement est donc primordiale pour pouvoir effectuer des études *in vivo*. Dans ce contexte, nous allons utiliser le cas canonique de dimères assemblés par ADN et étudier optiquement leur morphologie en fonction de la température locale.

6.1.1 Protocole expérimental.

Nous effectuons des mesures de spectres de diffusion de dimères de nanoparticules de 60 nm de diamètre dont la synthèse a été décrite dans le chapitre 3. Nous avons choisi cette taille de particules afin que les dimères diffusent suffisamment pour être étudiés aisément à l'aide d'un objectif à air ($x\ 60$, $NA = 0,7$) et d'un condenseur à air ($NA \in [0,8 - 0,92]$). En effet, l'huile d'immersion utilisée dans les chapitres précédents présente l'inconvénient d'avoir des propriétés physico-chimiques qui varient avec l'augmentation de température, ce qui peut nuire aux mesures expérimentales.

L'augmentation de température est effectuée de deux manières. D'une part, l'échantillon est placé sur un module Peltier circulaire, contrôlé par un générateur de tension, permettant d'élever la température à l'intérieur de la chambre jusqu'à 45°C. Pour atteindre des températures supérieures (jusqu'à 65°C), nous retirons le filtre froid placé devant la lampe blanche. Un thermocouple (Omega) placé à l'intérieur de la chambre optique au contact

de la goutte, permet de relever la température locale, comme montré sur la figure 6.1.

Nous étudions ici deux chimies de surface différentes : *E6m* et *A11E6c*. De même que dans les chapitres précédents, les chimies de surface des deux billes d'un dimère sont légèrement différentes l'une de l'autre pour permettre l'accrochage à la surface du substrat d'une seule des billes. L'autre est en suspension dans une solution tampon. Les échafaudages d'ADN utilisés pour chacune des deux chimies de surface sont très proches et sont constitués d'une tige-boucle fermée. Les tailles des tiges sont détaillées dans le tableau 6.1.

L'incubation des dimères dans la chambre microfluidique permettant leur accrochage est effectuée à 10 mM (resp. 100 mM) en NaCl pour les dimères en *E6m* (resp. *A11E6m*). La chambre est ensuite rincée avec 200 μL de T5 (resp. T100). Ces valeurs de concentration saline sont faibles compte tenu des chimies de surface utilisées et empêchent une éventuelle agrégation des dimères due à une force ionique trop élevée.

Table 6.1 – Tableau récapitulatif pour chacune des chimies de surface étudiées, de la longueur (en paire de bases) de la tige d'ADN, de sa température de fusion T_F , des nombres (Nb) de dimères mesurés et utilisés dans l'analyse ainsi que le pourcentage correspondant et de la pureté des échantillons (pourcentage de dimères).

Ligand	Tige	T_F ($^{\circ}\text{C}$)	Nb Mesurés	Nb utilisés	% correspondant	Pureté (%)
<i>E6m</i>	6	40	80	64	80	85
<i>A11E6c</i>	15	60	34	20	58	45

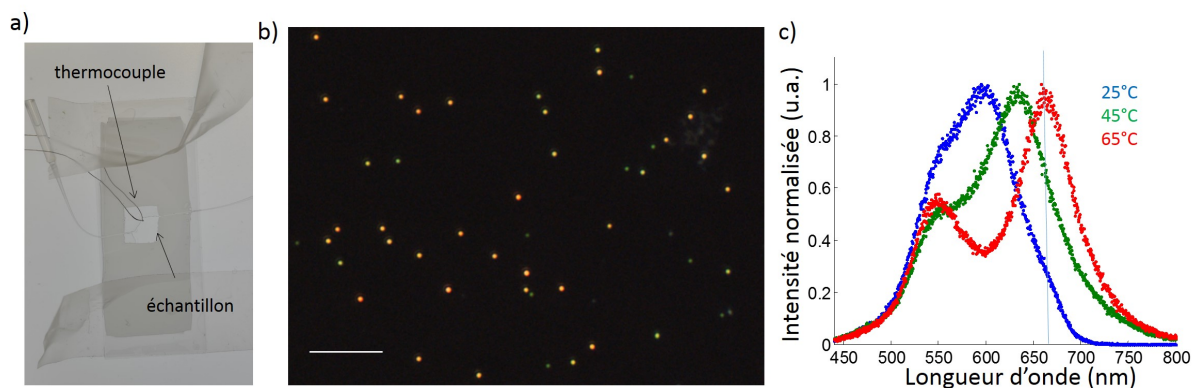


Figure 6.1 – a) Photographie d'une chambre microfluidique possédant un thermocouple. b) Image en champ sombre d'une chambre contenant des dimères de particules de 60 nm recouvertes de *E6m* (barre d'échelle = 10 μm). c) Évolution d'un spectre de diffusion d'un dimère de particules de 60 nm de diamètre recouvertes du ligand *E6m* en fonction de la température.

Le protocole de mesure se divise en deux cycles thermiques pour un total de neuf mesures des spectres de diffusion des dimères :

- Premier cycle : On augmente la température jusqu'à 35 $^{\circ}\text{C}$, avec un palier à environ 30 $^{\circ}\text{C}$, avant de l'abaisser jusqu'à température ambiante. Les mesures sont prises 10 minutes après que la température se soit stabilisée dans la chambre.

- Deuxième cycle : On augmente la température jusqu'à 65°C, avec des mesures des spectres de diffusion tous les 10°C environ. Finalement, on abaisse la température et une dernière mesure est effectuée à température ambiante.

Les nombres de dimères mesurés initialement et utilisés dans l'analyse, ainsi que la pureté des échantillons obtenue à partir des images de la caméra CCD couleur, sont fournis dans la tableau 6.1. On remarque que les échantillons des dimères recouverts du ligand *E6m* sont d'une très grande pureté (85% de dimères) et que ceux-ci sont très stables à faible force ionique. En effet, 80% des dimères mesurés sont conservés dans l'étude et parmi les inutilisés, 10% ne sont pas ajustables par une lorentzienne et 10% se détachent en ne laissant qu'un monomère.

La pureté des échantillons de dimères recouverts d'alkyle-PEG est beaucoup plus faible (45%), ce qui peut provenir du fait que les dimères aient été conservés à faible force ionique après leur synthèse, induisant ainsi une répulsion entre les particules des dimères pouvant entraîner une rupture de la liaison entre les groupements thiols et l'or. De plus, de nombreux dimères (30%) se sont décrochés du substrat lors de l'expérience, témoignant des fortes répulsions entre le substrat et les particules recouvertes du ligand alkyle-PEG.

6.1.2 Spectroscopie d'objets uniques en fonction de la température

Étude de la longueur d'onde de résonance moyenne

Nous avons tracé la courbe de la moyenne des longueurs d'onde de résonance en fonction de la chimie de surface, lors des deux cycles de température (figure 6.2a-b). La courbe rouge correspond à la phase d'augmentation de la température et la bleue correspond à la phase de diminution.

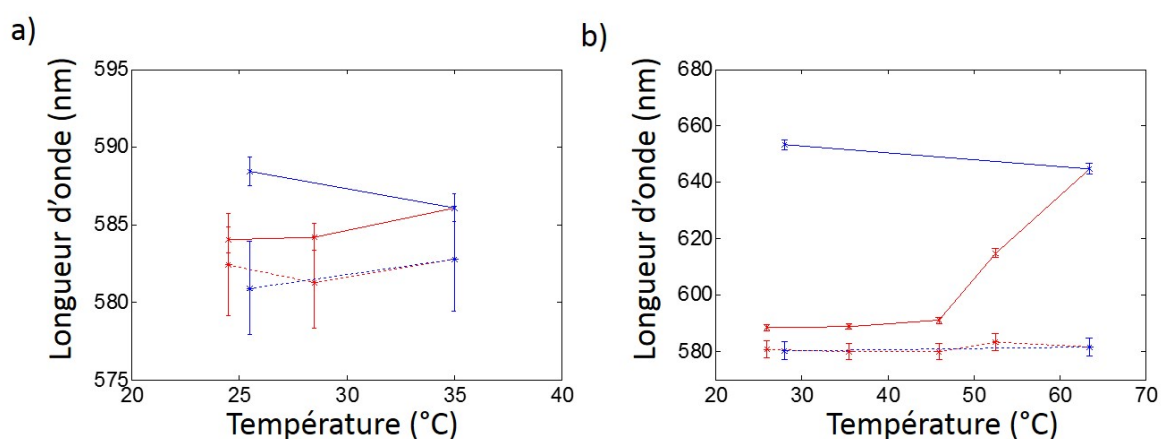


Figure 6.2 – Évolution de la longueur d'onde de résonance de dimères de particules de 60 nm de diamètre avec une tige-boucle fermée, pour une chimie de surface en *E6m* (trait plein) et en *A11E6c* (trait pointillé) lors d'un premier (a) puis d'un second (b) cycle de température.

On constate qu'au cours du premier cycle, les longueurs d'onde de résonance liées à la

chimie de surface en alkyle-PEG long (*A11E6c*) ne varient pas. En effet, à 25 ou 35°C, la moyenne de la longueur d'onde de résonance vaut toujours approximativement 583 nm. Pour les dimères recouverts de *E6m*, l'augmentation de température est associée à un léger décalage des longueurs d'onde de résonance de 3 nm vers le rouge, c'est-à-dire à une diminution de la distance interparticule et à une augmentation du couplage plasmon. On observe également un décalage vers le rouge de la résonance lorsque la température diminue, sans doute lié au laps de temps nécessaire pour revenir à la température ambiante. Le rapprochement des particules associé à l'augmentation de la température semble irréversible pour cette chimie de surface.

Par ailleurs, une température de 35°C étant en-dessous des températures de fusion de la tige-boucle des deux brins d'ADN, nous effectuons un deuxième cycle, jusqu'à 65°C cette fois-ci, afin de mesurer un éventuel effet de l'ouverture de la tige-boucle. On observe sur la figure 6.2b que la longueur d'onde moyenne des dimères recouverts de *A11E6c* est encore une fois quasiment constante lors du cycle. Cela confirme la grande stabilité des dimères possédant cette chimie de surface.

A l'inverse, les dimères recouverts du court ligand PEG exhibent un très large décalage spectral entre 45 et 53°C puis entre 53 et 65°C. Nous n'avons pas de courbe de calibration pour des billes de 60 nm permettant d'estimer la distance interparticule mais la présence des modes longitudinaux et transverses sur les spectres de diffusion (figure 6.1c) garantit que les chimies de surface des particules sont au contact. L'agrégation est irréversible car il n'y a pas de diminution de la longueur d'onde de résonance lorsque la température est abaissée jusqu'à la température ambiante.

Par ailleurs, lorsque la température est supérieure à la température de fusion des tiges-boucles d'ADN, nous n'observons aucun décalage de la résonance vers le bleu, qui correspondrait à une augmentation de la distance interparticule. Nous n'observons pas d'ouverture des tiges-boucles, contrairement au cas des balises moléculaires lorsque la température augmente [191]. Deux raisons, complémentaires, peuvent être avancées pour expliquer le décalage spectral vers le rouge observé dans le cas de *E6m* :

- La première raison est que l'énergie thermique kT fournie à la particule en suspension est suffisante pour compenser les répulsions électrostatiques et rapprocher les nanoparticules. Cette diminution de distance peut aller jusqu'à l'interpénétration des chimies de surface et donc à une agrégation irréversible à 65°C. Dans le cas des ligands alkyle-PEG, les répulsions hydrophobes-hydrophiles entre l'ADN et la nanoparticule, associées à une répulsion électrostatique légèrement plus grande du fait des fonctions acide carboxylique, augmentent la barrière énergétique. Surtout, la partie hydrophobe de la chimie de surface évite les phénomènes d'agrégation irréversible.

- Une seconde explication serait que les ligands recouvrant les nanoparticules se détachent lorsque la température augmente, déstabilisant ainsi progressivement les dimères et facilitant leur agrégation en diminuant la répulsion stérique. Ce processus peut expliquer l'irréversibilité des décalages spectraux à faible température pour le ligand *E6m* où les particules ne s'agrègent pas mais où le dimère ne retourne pas à sa taille initiale à basse température.

Variation de la longueur d'onde de résonance au cours du deuxième cycle

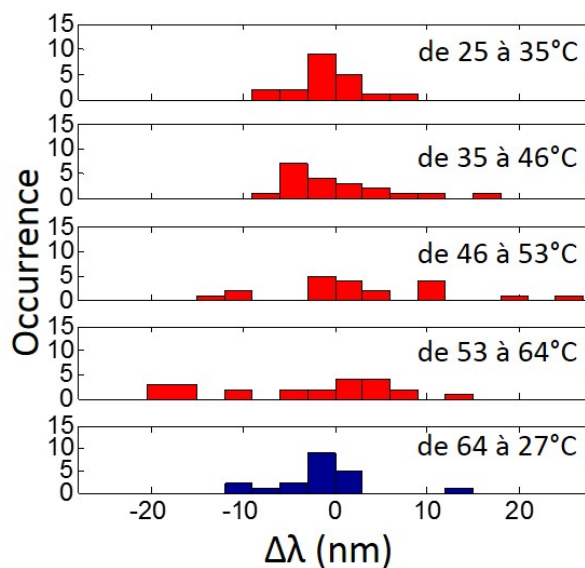


Figure 6.3 – Histogramme des variations de la longueur d'onde de résonance des dimères recouverts de *A11E6c*, entre chaque palier de température du deuxième cycle.

Afin d'analyser spécifiquement le comportement des dimères recouverts de ligands alkyle-PEG, nous avons tracé l'historgramme des variations de la longueur d'onde de résonance entre chaque palier du deuxième cycle de température (figure 6.3).

On observe que les histogrammes sont centrés autour de zéro (expliquant pourquoi la longueur d'onde moyenne indiquée sur la figure 6.2b est constante), mais qu'ils ne sont pas du tout symétriques. De plus, l'écart-type des histogrammes est de plus en plus large lorsque la température augmente (variations de longueur d'onde entre -10 et +10 nm de 25 à 35°C puis de -20 à +20 nm au-delà de 46°C).

Cela signifie que la température affecte la flexibilité des dimères mesurés individuellement. Il semble que l'agitation thermique kT associée aux particules en suspension leur permette d'explorer plus de configurations spatiales, entraînant des variations de taille et donc de longueur d'onde. Cependant, compte tenu de la forte stabilité intrinsèque du dimère avec cette chimie de surface, les réponses moyennes montrent une excellente réversibilité. Comme nous le discuterons dans le prochain paragraphe, il serait intéressant d'explorer ces nanostructures à des échelles de temps plus faibles pour voir si l'augmentation de kT se traduit par de plus grandes fluctuations morphologiques.

6.1.3 Conclusion et perspectives

En conclusion, nous avons vu dans cette partie que les ligands *A11E6c* fournissaient une grande stabilité aux dimères vis-à-vis de l'augmentation de la température ambiante. À l'inverse, les dimères recouverts du ligand *E6m* tendent à s'agréger lorsque la température augmente. Contrairement aux balises moléculaires, nous n'observons pas d'ouverture de

la tige-boucle lorsque la température est supérieure à la température de fusion de celle-ci. Les forces interparticules entre des billes aussi larges que 60 nm masquent sans doute l'influence de l'échafaudage d'ADN sur la distance interparticule.

Ce comportement des dimères recouverts d'un court ligand PEG offre la possibilité de fabriquer des agents de contraste photothermiques fortement non-linéaires. Pour expliquer cette application potentielle, nous émettons l'hypothèse que leurs spectres d'absorption sont semblables à ceux de diffusion de la figure 6.1. En illuminant des dimères à température physiologique avec un laser à 660 nm (ligne verticale bleue sur la figure 6.1c), une faible absorption de la lumière sera observée. Au fur et à mesure de l'échauffement photothermique, leur spectre d'absorption va se décaler vers le rouge (comme la courbe rouge sur la figure 6.1c) et les dimères absorberont de plus en plus efficacement jusqu'à l'agrégation des particules.

Ce processus non-linéaire permettrait des conditions de flux lumineux et de concentration de dimères en-dessous desquelles la température n'entraînerait pas la nécrose tissulaire pour minimiser la toxicité du traitement dans les zones où les particules ne se sont pas accumulées.

6.2 Analyse temporelle de clignotements de dimères

Lors de certaines mesures de spectres de résonance de dimères en fonction de la force ionique ou de la température, nous avons visualisé sur la caméra CCD couleur des clignotements du signal optique provenant de la tâche d'Airy de dimères individuels. Ces clignotements ne correspondent pas à une disparition complète du signal lumineux mais à des variations rapides de la couleur et de l'intensité du dimère. Ces clignotements ont été observés pour différentes tailles de particules (40 ou 60 nm de diamètre), différentes chimies de surface (*E6m* ou *A11E6c*), différentes forces ioniques et différentes températures.

Dans la plupart des cas, ces observations correspondent à des dimères présentant des boucles fermées mais ce clignotement est apparu à quelques reprises pour des dimères avec boucle ouverte. Il est donc difficile, avec ces données préliminaires, de connaître l'origine précise de ce phénomène. Cependant, nous avons pu enregistrer quelques-uns de ces signaux afin de les étudier plus en détail.

6.2.1 Observation sur la caméra CCD couleur

L'exemple traité ici concerne un dimère de particules de 40 nm, dont la chimie de surface est le ligand alkyle-PEG *A11E6c*. La tige-boucle de l'échafaudage d'ADN est fermée et mesure 15 paires de base. La concentration en NaCl est de 100 mM. Nous avons acquis 17 images consécutives (500 ms par acquisition) avec la caméra CCD, soit 8,5 secondes de mesure. Les 13 dernières images agrandies de la tâche d'Airy du dimère sont représentées sur la figure 6.1a. On observe clairement les changements de couleur et d'intensité du dimère entre les différentes images, relatifs à la variation du couplage plasmon entre les particules.

A partir de ces images, nous avons extrait la teinte du dimère et, à l'aide de la calibration

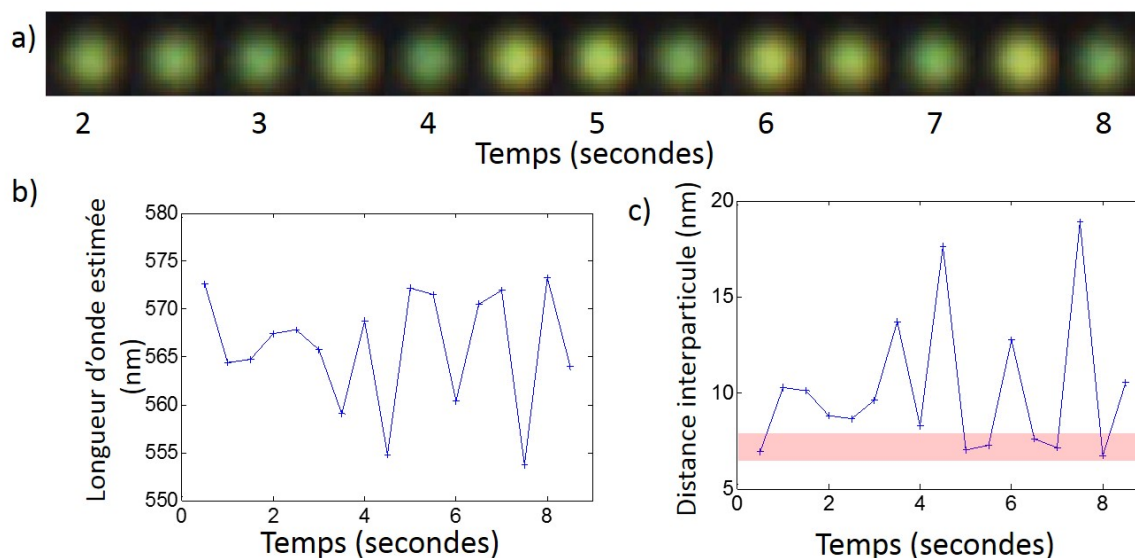


Figure 6.4 – a) Évolution temporelle de la tache d'Airy d'un dimère unique enregistrée par une caméra CCD couleur et montrant le clignotement d'un dimère de particules de 40 nm de diamètre. Estimation de la longueur d'onde de résonance (b) et de la distance interparticule (c) effectuée à partir de la teinte des images CCD de a). L'aire rose de (c) indique les distances comprises entre 6 et 8 nm.

entre la teinte et la longueur d'onde décrite dans les chapitres 4 et 5, nous avons estimé la longueur d'onde correspondante (figure 6.4b). La longueur d'onde oscille entre 553 et 574 nm. A ces valeurs de longueur d'onde, l'utilisation de la courbe de calibration est valable. Nous avons ensuite tracé la distance interparticule estimée à partir de la teinte des dimères (figure 6.4c).

La grande amplitude des oscillations de la distance interparticule (plus de 10 nm) semble indiquer que, sous certaines conditions, un dimère peut se trouver entre deux états métastables, entraînant un fort déplacement de la particule en solution du dimère. On remarque aussi que la distance minimale de 7 nm est obtenue lors de 6 des 17 mesures (comme indiqué par l'aire rose de la figure 6.4c). Cela pourrait signifier un état bistable passant d'un dimère où les particules sont proches du contact des chimies de surface (5 nm avec *A11E6c*) à une morphologie proche du dimère étiré (distance supérieure à 15 nm). De plus, on remarque que des sauts d'un état à un autre peuvent se produire lors de mesures successives, signifiant que le temps d'acquisition de 500 ms est probablement sous-échantillonné et que les distances intermédiaires peuvent être dues à des fluctuations trop rapides entre les deux longueurs extrêmes du système.

Une explication possible pour ces fluctuations est l'observation de l'ouverture et de la fermeture de la tige-boucle d'ADN. Les mesures spectrales effectuées sur des dimères avec une boucle d'ADN fermée, et avec une chimie de surface *A11E6c*, donnent généralement des distances de dimères ouverts : il semble donc que la longueur et l'hydrophobie de ce ligand déstabilise la tige d'ADN et empêche son hybridation. Il est possible que, pour certains dimères, une configuration de boucle fermée soit suffisamment stable pour observer

ces fluctuations entre deux longueurs de dimères.

Selon les cas, la durée pendant laquelle ces fluctuations sont observées peut varier de quelques secondes à plusieurs minutes. En revanche, il ne semble pas que les états finaux des dimères soient, de façon reproductible, courts ou étirés.

6.2.2 Analyse spectrale

Le deuxième exemple étudié concerne un dimère dont la chimie de surface est le ligand *A11E6c* et présentant une tige d'ADN fermée de 20 paires de bases. Les mesures sont effectuées à 800 mM en NaCl à une température de 45°C. 91 spectres de diffusion sont enregistrés consécutivement (200 ms de temps d'acquisition). La figure 6.5a montre des spectres de diffusion typiquement obtenus. Le décalage spectral et la variation d'intensité peuvent être très importants et témoignent de la forte variation du couplage plasmon entre les particules.

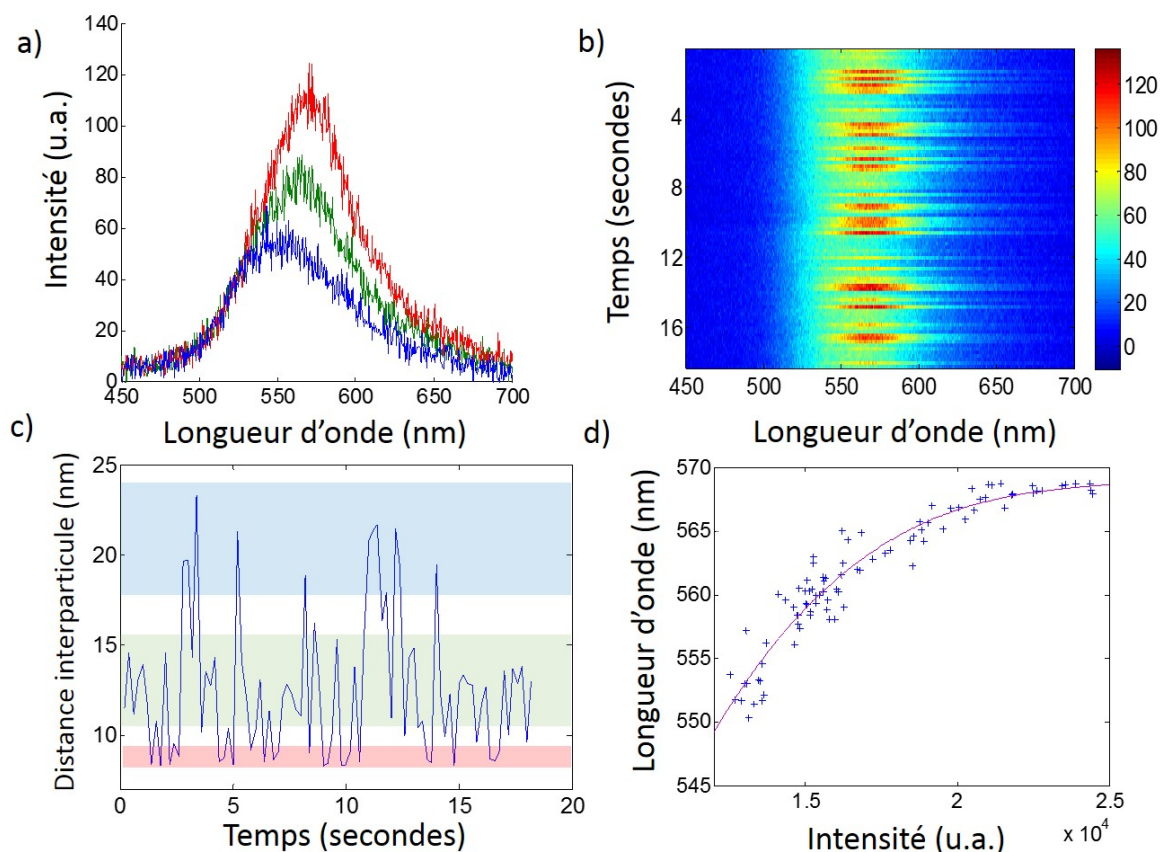


Figure 6.5 – a) Exemple de trois spectres de diffusion d'un dimère de particules de 40 nm de diamètre 'clignotant'. b) Évolution temporelle du spectre de diffusion d'un dimère clignotant. Le code couleur correspond à l'intensité diffusée (en u.a.) à chaque longueur d'onde. c) Évolution de la distance interparticule estimée en fonction du temps. Les encadrés désignent des distances de 8 à 9,5 nm (en rose), de 10,5 à 15,5 nm (en vert) et supérieur à 18 nm (en bleu). d) Relation entre la longueur d'onde de résonance mesurée et l'intensité de diffusion des spectres correspondants.

La figure 6.5b montre l'évolution temporelle à la fois de la résonance et de l'intensité de diffusion du dimère. Il apparaît des sauts entre différents états du dimère. Il y a à nouveau sous-échantillonnage temporel : la durée pendant laquelle le dimère est dans une morphologie donnée est probablement inférieure au temps d'acquisition (200 ms). On remarque toutefois des spectres consécutifs similaires, et ce pendant deux ou trois acquisitions successives. Cela semble indiquer que la particule libre du dimère explore plusieurs configurations spatiales, en restant plus ou moins longtemps dans chacun des états.

Afin d'être plus quantitatif, nous traçons les distances interparticules estimées à partir des longueurs d'onde mesurées (figure 6.5c). Nous retrouvons quelques similitudes avec l'exemple traité précédemment. En effet, il semble y avoir une distance interparticule minimale, valant 8 nm dans cet exemple (zone rose sur la figure 6.5c). Par ailleurs, on retrouve aussi une très grande amplitude d'oscillation puisque, à plusieurs reprises, la distance mesurée est supérieure à 18 nm (zone bleue).

Ces mesures peuvent donc à nouveau correspondre à un système bistable, oscillant entre un dimère court (tige-boucle fermée) et un dimère long pour lequel la partie simple brin de l'échafaudage est étirée par des répulsions électrostatiques. Le reste des mesures se situent entre 10,5 et 15 nm environ (zone verte), ce qui peut correspondre à des états intermédiaires ou à l'intégration d'un spectre durant une variation du couplage plasmon plus rapide que 200 ms.

Finalement, puisqu'une augmentation du couplage plasmon entraîne à la fois une augmentation de la section efficace de diffusion et un décalage spectral vers le rouge, nous vérifions que nos mesures fournissent effectivement une correspondance entre ces deux données. Pour cela, nous avons tracé la longueur d'onde mesurée en fonction de l'intensité, c'est-à-dire l'intégrale du spectre de diffusion (figure 6.5d). Nous observons une bonne corrélation entre les deux grandeurs, démontrant la possibilité d'utiliser l'intensité de diffusion pour l'étude de clignotements de dimères.

Ces données ouvrent donc la possibilité d'utiliser des monodétecteurs plus rapides pour descendre à des échelles de temps de l'ordre de la milliseconde. On rappelle toutefois que l'intensité est très sensible aux réglages du montage, limitant les comparaisons entre dimères et rendant difficile une analyse quantitative de l'évolution de la distance interparticule.

6.2.3 Conclusion et perspectives

En conclusion, nous avons démontré que des dimères de nanoparticules d'or assemblées par de l'ADN pouvaient présenter des réponses optiques transitoires correspondant au passage d'une géométrie courte à un système étiré. Une explication possible est la fermeture et l'ouverture de la boucle d'ADN mais la complexité des processus physico-chimiques mis en jeu et l'état préliminaire de ces mesures ne nous permet pas de conclure.

Pour le faire, il serait utile de mesurer les variations temporelles de ces signaux de diffusion beaucoup plus rapidement. Cela permettrait de savoir combien il y a d'états métastables, combien de temps le dimère reste dans chacun des états et quelle est la fréquence ty-

pique du processus. Pour cela, il est concevable de ne plus étudier la longueur d'onde de résonance mais l'intensité diffusée sur une photodiode à avalanche (APD).

Surtout, une étude quantitative, en variant la géométrie des dimères et en modulant un paramètre extérieur comme la concentration en sel ou la température, nous permettrait d'étudier leur influence sur les fréquences de clignotement et donc de mettre en évidence les processus physico-chimiques qui régissent ce phénomène.

Finalement, appliquer cette technique à des dimères considérés comme stables permettrait également de voir leurs fluctuations rapides autour de leur position d'équilibre. Ceci nous permettrait d'étudier leur potentiel comme nano-résonateur mécanique.

6.3 Conclusion générale

L'objet de cette étude était de synthétiser une structure nanométrique capable de traduire une information chimique locale en un signal optique mesurable. Pour cela, nous nous sommes concentrés sur des dimères de nanoparticules d'or assemblés par un unique brin d'ADN dynamique, c'est-à-dire possédant une tige-boucle dont la forme ouverte ou fermée peut modifier la distance interparticule. Nous avons, dans un premier temps, utilisé une méthode efficace et reproductible de synthèse et de purification de ces dimères : l'électrophorèse. Elle est aussi apparue comme une technique d'analyse permettant de distinguer des dimères de particules d'or de 8 nm de diamètre attachées avec un seul brin d'ADN dont la tige-boucle est ouverte ou fermée. La synthèse de dimères 'ouverts' ou 'fermés' a été réalisée avec des puretés de l'ordre de 90%. L'analyse d'images cryo-EM a permis d'estimer la distance interparticule dans les deux cas et de montrer qu'elle est en bon accord avec l'échafaudage d'ADN et la taille des groupements terminaux trithiolés. La caractérisation morphologique montre d'une part la variation d'un facteur 3 de la distance interparticule lors de l'ouverture de la tige-boucle et d'autre part que les dimères sont étirés à faible force ionique. Une étude complémentaire en électrophorèse a permis d'étudier la réversibilité et la réactivité des étapes d'ouverture et de fermeture de la tige-boucle démontrant que la fermeture est favorisée. Ainsi, nous montrons la possibilité de fabriquer des groupements dont la distance interparticule est sensible à la présence d'un brin d'ADN cible (chapitre 2).

Afin de traduire optiquement la déformation structurelle des dimères, nous concevons des structures possédant des sections efficaces de diffusion suffisamment grandes pour être étudiées aisément. Pour cela, nous utilisons l'électrophorèse pour la synthèse purifiée de dimères de nanoparticules d'or dont le diamètre peut atteindre 60 nm, avec un échafaudage d'ADN possédant une tige-boucle, ouverte ou fermée. Deux méthodes de synthèse différentes nous assurent que préférentiellement un seul brin d'ADN est greffé par particule. Les propriétés de stabilité de suspensions colloïdales étant régies par la chimie de surface des particules, nous avons étendu la gamme de dimères synthétisés en montrant la possibilité d'obtenir des dimères passivés par six ligands différents et classés en deux catégories : les poly(éthylène glycol) et les alkyle-poly(éthylène) glycol (chapitre 3).

Les fortes sections efficaces offertes par les dimères de nanoparticules de 40 nm de diamètre ont permis d'étudier les phénomènes de couplage plasmon d'objets uniques par microscopie confocale à champ sombre. De plus, l'utilisation de valeurs théoriques obtenues en utilisant la théorie de Mie généralisée permet d'associer une distance interparticule à la longueur d'onde de résonance moyenne de mesures individuelles. Afin de déterminer la gamme de stabilité des dimères dont la chimie de surface est composée de 6 monomères de PEG, nous avons étudié l'effet de la force ionique sur les résonances des dimères. Cette étude, nécessaire pour envisager l'utilisation des nanostructures en tant que biocapteurs de brins d'ADN, a permis d'observer un décalage spectral vers le rouge ainsi qu'une augmentation de la section efficace de diffusion lorsque la force ionique augmente. Le décalage spectral correspond à une augmentation du couplage plasmon associée à une diminution de la distance interparticule, elle-même résultant de l'écrantage progressif des charges surfaciques et de la diminution de la rigidité du brin d'ADN. En associant un grand nombre de mesures de spectres de diffusion de dimères individuels avec les images correspondantes d'une caméra CCD couleur, nous avons pu définir une courbe de calibration permettant d'étudier la résonance des dimères à partir d'images en champ large, pour une gamme de distances interparticules de 3 à 20 nm. Le suivi morphologique de déformations nanométriques a permis d'identifier des dimères avec une boucle ouverte ou fermée. L'utilisation d'un polariseur linéaire combiné avec la caméra CCD permet d'étendre l'étude morphologique à des dimères agrégés. Finalement, l'ouverture et à la fermeture de la boucle ont été démontrées pour des distributions de dimères individuels. La stabilité limitée des dimères entraînent un vieillissement des structures empêchant leur utilisation en tant que biocapteurs de brins d'ADN à l'échelle de la molécule unique (chapitre 4).

Dès lors, l'optimisation des propriétés de stabilité intrinsèque des dimères s'est fait en étudiant différentes chimies de surface et en mesurant les déformations morphologiques associées à des variations de force ionique. L'analyse de nombreux dimères a permis de distinguer deux groupes distincts selon leur comportement. Un groupe présente un large éventail de distances interparticules accessibles tandis que l'autre semble indiquer des dimères contraints spatialement. Au-delà de ces distinctions, une chimie de surface amphiphile s'est distinguée en exhibant des propriétés de stabilité remarquables, résultant de répulsions hydrophobes-hydrophiles avec l'échafaudage d'ADN. Avec cette chimie de surface, nous n'avons pas pu observer de déformations morphologiques liées à la fermeture de la boucle. Cela semble indiquer la nécessité de déplacer le site de reconnaissance du capteur afin d'éviter les répulsions entre les ligands et l'ADN, ainsi que l'encombrement stérique induit par la présence des particules (chapitre 5).

Les propriétés photothermiques des nanoparticules étant souvent utilisées pour chauffer localement autour d'elles [1–4, 6], nous avons commencé l'étude des propriétés de stabilité d'auto-assemblages de dimères de particules de 60 nm de diamètre, à différentes températures. Nous avons montré que ces propriétés étaient fortement régies par le choix de la chimie de surface (chapitre 6). Finalement, les nombreuses études effectuées au

cours de la thèse nous ont confrontés à des phénomènes transitoires de clignotement de dimères. Une étude préliminaire de ces phénomènes semble indiquer que la particule en suspension du dimère peut alterner entre deux configurations qui pourraient correspondre à la fermeture et à l'ouverture de la tige-boucle d'ADN. L'étude de l'intensité des dimères par l'utilisation d'une photodiode à avalanche ultra-rapide laisse envisager l'étude de phénomènes transitoires non-déTECTABLES actuellement avec notre montage.

Les dimères de nanoparticules d'or assemblés par un brin dynamique d'ADN étaient initialement conçus pour traduire une information chimique en un signal optique mesurable. Si l'utilisation possible de ces dimères comme biocapteurs à l'échelle de la molécule unique a été démontrée, cela passe avant tout par une amélioration de la stabilité et de la réactivité du dimère. Pour cela, délocaliser le site de reconnaissance du capteur et optimiser la chimie de surface semblent des étapes d'optimisation nécessaires. Au-delà de cette utilisation, ils nous ont permis d'étudier de nombreux phénomènes comme l'influence de stimuli extérieurs, tels que la température et la force ionique, sur la stabilité d'auto-assemblages. Il serait très intéressant d'étudier de nouvelles chimies de surface afin de comprendre exactement quels paramètres influent sur la stabilité des dimères. Pour cela, le suivi de la déformation nanométrique des dimères par l'utilisation d'une simple caméra CCD démontré pendant la thèse permettrait de mesurer la résonance de nombreux dimères en temps réel. En supposant pouvoir augmenter continûment la force ionique par un système microfluidique adapté, il serait possible d'automatiser presque entièrement l'étude.

Par ailleurs, une limitation de l'utilisation des dimères comme capteurs vient de la non-sphéricité des particules qui induit une distribution inhomogène des résonances des dimères. Dès lors, il n'est pas possible d'associer directement à une longueur d'onde de résonance d'un dimère une morphologie 'ouverte' ou 'fermée'. Depuis peu, la synthèse de particules *ultralisses* a montré la possibilité d'obtenir des particules exhibant des résonances quasi-identiques [192]. L'utilisation de ces particules dans des dimères pourrait permettre de surmonter cette limitation. De plus, comme des particules de tailles différentes possèdent des longueurs d'onde de résonance différentes, il est envisageable de concevoir des capteurs multiplexés en associant à chaque taille de particule un site de reconnaissance spécifique.

Globalement, ce travail de thèse offre une méthodologie simple et robuste pour étudier des nanostructures d'or assemblées autour de biomolécules, que ce soit pour la conception et l'optimisation de capteurs optiques ou, plus généralement, pour analyser les processus physico-chimiques qui régissent leur morphologie et leur stabilité.

Protocoles expérimentaux des synthèses de dimères de particules de 8, 40 et 60 nm

Dans cette annexe sont fournis les protocoles de la synthèse complète des dimères de particules de 8, 40 et 60 nm de diamètre.

A.1 Matériel et méthodes

Généralités

Les particules d'or stabilisées par des groupements citrates sont fabriquées industriellement par BBInternational (Royaume-Uni). Les concentrations en particules initiales de ces solutions sont données dans le tableau A.1. Le Bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphine (BSPP) est fourni par Strem Chemicals Europe (France). Les oligomères de poly(éthylène) glycol *E6m* et *E16m* proviennent respectivement de chez Polypure (Norvège) et Sigma-Aldrich (Etats-Unis). Les ligands alkyle-poly(éthylène) glycol *A6E4a*, *A6E3c*, *A6E3a* et *A11E6c* ont été achetés chez ProChimia (Pologne). La NeutrAvidine et la solution tampon de SuperBlock ont été commandées chez Thermo Scientific (Etats-Unis). Les divers solvants, la BSA biotine et les autres solutions tampons proviennent de chez Sigma-Aldrich (Etats-Unis). Aucun des produits chimiques utilisés n'a subi de purification au préalable.

ADN

Les séquences d'ADN trithiolé, purifiées en PAGE, ont été commandées chez Fidelity Systems, Inc. (Etats-Unis). Les autres séquences (purification PAGE) ont été achetées chez Integrated DNA Technologies Europe (Belgique) et Eurogentec (Belgique).

Les différentes séquences d'ADN, conçues pour minimiser les interactions non spécifiques sont les suivantes :

Chapitre 2 :

- **C** : 5'-TGCTGTTCCCATCTGATACGGAGTTGCTTAGGGGTGTCCAGGTTTCGTG
C-trithiol-3'

- **S-tige 10pb** : 5'-trithiol-GGCTTACATGAGGAGCTAGGATACTTCCTGTGAAGGTA
ACTAGCTCCTCTGCACGAAACCTGGACACCCCTAAGCAACTCCGTATCAGATGG
GAACAGCA -3'

- **LC1** : 5'-ATCCTGACATCGGCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTGTGCTGTTCCCATCTG-3'

- **T** : 5'-TACGATAGTGGTATGATCGCTAGATCCGCAAGAGGAGCTAGTTACCTTCA
CAGGAAGTATCCTAGCTCCTCATGTAAGCC-3'

Chapitre 4 :

- **S-tige 20pb** : 5'-trithio-GGCTTACATGAGGAGCTTGCTTCTGCGAGAACAACCTCGC
AGAAGCAAGCTCCTCTGCACGAAACCTGGACACCCCTAAGCAACTCCGTATCA
GATGGGAACAGCA

- **T** : 5'-TACGATAGTGGTATGATCGCTAGATCCGCAAGAGGAGCTAGTTACCTTCA
CAGGAAGTATCCTAGCTCCTCATGTAAGCC-3'

- **LC2** : 5'-TGCCGATGTCAGGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTGTAACGGTAGGCTGG-3'

- **LS1** : 5'-CAGATGGGAACAGCACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTGTAACGGTAGGCTGG-3'

- **LC3/LS2** : 5'-TCCCCAGTCTGAACATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTCCAGCCTACCGTTAC-
3'

- **LC4/LS3** : 5'-TG TTCAGACTGGGGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTGACCTCGCACTTAGT-
3'

- **LC5/LS4** : 5'-ACTGCGTTCATGGTGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTACTAAGTGCGAGGTC-
3'

- **LC6/LS5** : 5'-CACCATGAACGCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTGGAGGACAATCGCTG-
3'

- L'ADN non-hybridant n'a pas de séquence particulière. C'est un des allongeurs précé-
dents choisis afin qu'il ne possède aucune interaction avec les séquences spécifiques utilisées
dans l'expérience considérée.

Chapitre 6 :

- **S-tige 6pb** : 5'-trithio-ATACTGGACTGAGGAGACATGGAGTTATGAATTAAGAAC
AAAGCTCCTCTGCACGAAACCTGGACACCCCTAAGCAACTCCGTATCAGATGGG
AACAGCA-3'

- **S-tige 15pb** : 5'-trithio-ACTGTGGGCTTACATGAGGAGCTTGCTTCTATTAAGA
AGCAAGCTCCTCTGCACGAAACCTGGACACCCCTAAGCAACTCCGTATC
AGATGGGAACAGCA-3'

Préparation des mélanges "bioPEG" et "bio alkyle-PEG"

Une première étape consiste à préparer du biotine-PEG, schématisé sur la figure 3.3. Pour cela, un excès de BSPP est incubé avec un ligand de PEG disulfide (excès x 20 en quantité) possédant des biotines à ses extrémités afin de cliver le lien disulfide. Le mélange "bioPEG" (resp. "bio alkyle-PEG") est ensuite obtenu en mélangeant du PEG (resp. alkyle-PEG) et du biotine-PEG suivant le ratio 1 : 8,3.

Ces mélanges seront utilisés dans la synthèse minimisant le nombre de brins liants (voir plus loin) pour passiver la surface de particules d'or spécifiques.

Reconcentration des particules commerciales

Les informations fournies dans ce paragraphe sont communes aux particules de 8, 40 et 60 nm de diamètre, seules les vitesses de centrifugation diffèrent. Le changement de chimie de surface du citrate au BSPP est effectué suivant le protocole des publications [19, 20, 95–99], décrit ci-après. Les particules d'or sont incubées avec une quantité donnée de BSPP pendant une nuit (10 mg de BSPP pour 40 mL de solution d'or commerciale). La solution obtenue est ensuite centrifugée et le surnageant est retiré. Les particules sont ensuite rincées avec une solution tampon de BSPP. Le tampon est composé de 10 mg de BSPP dans 40 mL d'eau Milli-Q. Ces deux étapes successives sont répétées 3 ou 4 fois. Finalement, les particules sont redispersées en ajoutant de la solution tampon de BSPP pour atteindre une concentration finale donnée, indiquée dans le tableau A.1.

Table A.1 – Tableau récapitulatif des concentrations en particules d'or des solutions industrielles, des valeurs d'accélération lors de la première étape de centrifugation et des concentrations finales des solutions de particules d'or recouvertes de BSPP obtenues.

Diamètre (nm)	$[Au]_{ini}$ (Particules/mL)	Centrifugation (g)	$[Au]_{final}$ (pmol/ μ L)
8	$9, 0.10^{10}$	12500	1
40	$2, 6.10^{10}$	6000	0,02
60	$1, 1.10^{10}$	4000	0,006

Purification par électrophorèse

Les nombreuses étapes de purification par électrophorèse sur gel d'agarose se déroulent comme décrit ci-après. Les solutions sont chargées avec du Ficoll 400 (à hauteur de 20% du volume final) puis placées dans les puits du gel. Le gel d'agarose est ensuite placé à 8 V/cm pendant 45 à 60 minutes. La procédure d'extraction utilisée provient de la publication [99]. La bande du gel contenant les particules d'intérêt est découpée avec un scalpel. Elle est ensuite replacée dans un puits rempli de solution tampon et l'application d'un champ électrique ($\approx 20 V/cm$) permet de rediffuser directement les nanoparticules dans la solution tampon. Une étape de centrifugation finale permet de reconcentrer les particules.

A.2 Synthèse des dimères de particules de 8 nm de diamètre

Les concentrations finales des réactifs sont indiquées entre crochets.

Hybridation de l'ADN. Pour préparer les structures **2** et **3** de la figure 2.2, les brins d'ADN trithiolés **C+L** et **S+T** sont hybridés en mélangeant 16 pmol de **C** (resp. 12 pmol de **S**) avec un excès (x 2) de **L** (resp. **T**). On ajoute du NaCl de telle sorte qu'on obtienne une solution de volume final égal à 8 μL , avec une concentration en NaCl de 125 mM, soit $[\text{C}]_{\text{final}} = 2 \mu\text{M}$ et $[\text{L}]_{\text{final}} = 4 \mu\text{M}$ (resp. $[\text{S}]_{\text{final}} = 1,5 \mu\text{M}$ et $[\text{T}]_{\text{final}} = 3 \mu\text{M}$). La solution est chauffée à une température de 80°C puis laissée à refroidir pendant une nuit jusqu'à température ambiante.

Synthèse des nanoparticules monoconjuguées. Le protocole correspondant à la figure 2.4 est décrit ci-après. 3 μL de la solution de nanoparticules d'or recouvertes de BSPP de 8 nm de diamètre sont incubés à température ambiante pendant une nuit avec :

- soit (i) les 8 μL de solution de **C+L** pour synthétiser **2**,
- soit (ii) les 8 μL de solution de **S+T** pour synthétiser **3**,
- soit (iii) 10 μL de **S** (équivalent à 12 pmol) pour synthétiser **1**.

Le mélange obtenu a un volume final de 12,5 μL , c'est-à-dire $[\text{AuNP}]_{\text{final}} = 0,24 \mu\text{M}$, avec des concentrations de 80 mM en NaCl et 10 mM en BSPP. Les surfaces d'or sont passivées en incubant le mélange avec un excès de PEG *E6m* (x 50 000 par rapport à la quantité de particules) pendant 30 minutes, puis on effectue la purification par électrophorèse sur gel d'agarose dans un gel à 2,5%. Les particules monoconjuguées extraites (de la bande découpée) sont reconcentrées par centrifugation.

Synthèse des dimères. Des quantités stœchiométriques de **2** et **1** ou **2** et **3** sont mélangées à une concentration en NaCl de 80 mM, avant d'être chauffées à une température de 50°C et laissées à refroidir pendant une nuit, pour former les structures **4** et **5** respectivement. Les solutions formées ont un volume final environ égal à 10-15 μL . Elles sont ensuite purifiées par électrophorèse (gel d'agarose à 2%). Les dimères récupérés sont conservés à une température de 4°C dans la solution tampon.

A.3 Synthèse des dimères de particules de 40 nm de diamètre

A.3.1 Synthèse avec contrôle du nombre de brins d'ADN

Synthèse des particules monoconjuguées. 0,04 pmol de nanoparticules d'or recouvertes de BSPP sont mélangées avec 2 pmol (resp. 8 pmol) de **C** (resp. **S** ou **S+T**) et les brins d'ADN allongeurs, pendant au moins 12 heures. Les expériences que nous avons effectuées utilisent 5 brins allongeurs L_i en plus du brin trithiolé **S** ou **C** afin de séparer efficacement les particules seules des particules monoconjuguées. Chaque allongeur est

ajouté en excès par rapport au brin auquel il va s'hybrider (x 1,5 entre les quantités de \mathbf{L}_i et \mathbf{L}_{i+1}). Les allongeurs $\mathbf{LC1}$ et $\mathbf{LS1}$ sont en excès (x 3) par rapport aux quantités d'ADN trithiolés \mathbf{C} et \mathbf{S} . Le volume final est d'environ $10 \mu\text{L}$ avec des concentrations de 30 mM en NaCl et 1 mM en BSPP, soit $[\text{AuNP}]_{\text{final}}=4 \text{ nM}$, $[\mathbf{C}]_{\text{final}} = 0,2 \mu\text{M}$ (resp. $[\mathbf{S}]_{\text{final}} = 0,8 \mu\text{M}$ ou $[\mathbf{S} + \mathbf{T}]_{\text{final}} = 0,8 \mu\text{M}$)

La surface des particules est ensuite passivée selon la procédure décrite dans la référence [68] et présentée ci-après. Les particules sont mélangées avec un large excès (x 700 000 par rapport au nombre de particules) de PEG mono-thiolé (*E6m*). Le mélange est purifié 30 minutes après par électrophorèse (gel d'agarose à 1,5%), comme schématisé sur la figure 2.3d. Finalement, les particules ne possédant à leur surface qu'un seul brin d'ADN sont spécifiquement extraites, comme montré sur la figure 3.4a.

Synthèse des dimères. Des quantités stœchiométriques de **2** et **1** ou **2** et **3** sont mélangées à une concentration en NaCl de 40 mM, avant d'être chauffées à une température de 50°C et laissées à refroidir pendant une nuit, pour former des solutions contenant les structures **4** et **5** respectivement, de volume final environ égal à $10\text{-}15 \mu\text{L}$. Les échantillons obtenus sont ensuite purifiés par électrophorèse (gel d'agarose à 1%). Les dimères récupérés sont conservés à une température de 4°C dans la solution tampon.

A.3.2 Synthèse minimisant le nombre de brins liants

Ouverture de la tige-boucle. Pour synthétiser des dimères comportant une tige-boucle ouverte, une étape d'hybridation d'ADN entre \mathbf{S} et \mathbf{T} est nécessaire. \mathbf{S} est mélangé avec un excès (x 2) de \mathbf{T} à une concentration en NaCl de 100 mM. La solution est chauffée à une température de 80°C puis laissée à refroidir pendant une nuit jusqu'à température ambiante.

Accrochage de l'ADN sur les particules. Les différents résultats présentés dans le chapitre 3 montrent l'utilisation de ratios ADN/or croissants. Le protocole décrit ci-après ne concerne que la synthèse des dimères utilisant le ratio ADN/or minimal. Dans un volume final d'environ $10\mu\text{L}$, 0,04 pmol de nanoparticules d'or recouvertes de BSPP sont mélangées avec soit (i) 0,5 pmol de \mathbf{C} , soit (ii) 0,2 pmol de \mathbf{S} , soit (iii) 0,2 pmol de $\mathbf{S}+\mathbf{T}$, à des concentrations de 25 mM de NaCl et 1,5 mM de BSPP. Cela représente en concentration : $[\text{AuNP}]_{\text{final}}=4 \text{ nM}$, (i) $[\mathbf{C}]_{\text{final}} = 50 \text{ nM}$, (ii) $[\mathbf{S}]_{\text{final}} = 20 \text{ nM}$ ou $[\mathbf{S} + \mathbf{T}]_{\text{final}} = 20 \text{ nM}$). 50 pmol d'un brin d'ADN non hybridant sont ajoutées pour augmenter la stabilité de la solution colloïdale. Le mélange est incubé pendant au moins 12 heures.

La surface des particules est ensuite passivée en mélangeant les particules greffées avec \mathbf{C} avec un large excès de PEG mono-thiolé (x 700 000 par rapport au nombre de particules d'or) ou d'alkyle-PEG monothiolé (x 30 000). Dans le premier cas (PEG mono-thiolé), les particules greffées avec \mathbf{S} ou $\mathbf{S}+\mathbf{T}$ sont mélangées avec un même excès (x 700 000) du mélange "bioPEG". Dans le second cas (alkyle-PEG monothiolé), les particules greffées avec \mathbf{S} ou $\mathbf{S}+\mathbf{T}$ sont mélangées avec un même excès (x 30 000) du mélange "bio alkyle-PEG".

Après 30 minutes d'incubation des nanoparticules avec les ligands, elles sont purifiées par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%). La bande d'intérêt est ensuite extraite du gel.

Synthèse des dimères. Des quantités stœchiométriques de **2** et **1** ou **2** et **3** sont mélangées à une concentration saline fixée par le ligand utilisé (40 mM en NaCl pour *E6m*, *E16m*, *A6E4a* et *A6E3m*, 80 mM pour *A6E3c* et 200 mM pour *A11E6c*) puis chauffées à une température de 50°C et laissées à refroidir pendant une nuit, pour former des solutions contenant les structures **4** et **5** respectivement, de volume final environ égal à 10-15 μ L. Les échantillons obtenus sont ensuite purifiés par électrophorèse (gel d'agarose à 1%). Les dimères récupérés sont conservés à une température de 4°C dans la solution tampon.

A.4 Synthèse des dimères de particules de 60 nm de diamètre

Accrochage de l'ADN sur les particules. Ce protocole ne concerne que la synthèse de dimères dont le ratio ADN/or est minimal. Pour un volume final de 10 μ L environ, 0,012 pmol de nanoparticules d'or recouvertes de BSPP sont mélangées avec 0,5 pmol de **C** ou 1 pmol de **S**, à des concentrations de 13 mM en NaCl et 1,5 mM en BSPP, soit $[AuNP]_{final}=1,2$ nM, $[C]_{final} = 50$ nM et $[S]_{final} = 100$ nM. 50 pmol d'un brin d'ADN non hybridant sont ajoutées pour augmenter la stabilité de la solution colloïdale. Le mélange est incubé pendant au moins 12 heures.

La surface des particules est passivée en mélangeant les particules greffées avec **C** (resp. **S**) avec un large excès du ligand *E6m* (resp. bio-*E6m*) (x 2 300 000 par rapport à la quantité de particules d'or) ou du ligand *A11E6c* (resp. bio-*A11E6c*) (x 100 000).

Après 30 minutes d'incubation des nanoparticules avec les ligands, elles sont purifiées par électrophorèse sur gel d'agarose (1%). La bande d'intérêt est ensuite extraite du gel.

Synthèse des dimères. Les particules fonctionnalisées avec des brins d'ADN complémentaires sont mélangées pendant une nuit à une concentration saline fixée par le ligand utilisé (15 mM en NaCl pour *E6m*, 80 mM pour *A11E6c*) pour former une solution de volume final environ égal à 10-15 μ L. Les échantillons obtenus sont ensuite purifiés par électrophorèse (gel d'agarose à 0,75%). Les dimères récupérés sont conservés à une température de 4°C dans la solution tampon.

Références

- [1] D. Patrick O’Neal, Leon R. Hirsch, Naomi J. Halas, J. Donald Payne, and Jennifer L. West. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer Letters*, 209(2) :171–176, June 2004.
- [2] Yeonee Seol, Amanda E. Carpenter, and Thomas T. Perkins. Gold nanoparticles : enhanced optical trapping and sensitivity coupled with significant heating. *Opt. Lett.*, 31(16) :2429–2431, August 2006.
- [3] Ivan H. El-Sayed, Xiaohua Huang, and Mostafa A. El-Sayed. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer Letters*, 239(1) :129–135, July 2006.
- [4] Xiaohua Huang, Ivan H. El-Sayed, Wei Qian, and Mostafa A. El-Sayed. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(6) :2115–2120, February 2006.
- [5] A. Agarwal, S. W. Huang, M. O’Donnell, K. C. Day, M. Day, N. Kotov, and S. Ashkenazi. Targeted gold nanorod contrast agent for prostate cancer detection by photoacoustic imaging. *Journal of Applied Physics*, 102(6) :064701, September 2007.
- [6] Prashant K. Jain, Kyeong Seok Lee, Ivan H. El-Sayed, and Mostafa A. El-Sayed. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition : Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *J. Phys. Chem. B*, 110(14) :7238–7248, April 2006.
- [7] R Gref, M Lück, P Quellec, M Marchand, E Dellacherie, S Harnisch, T Blunk, and R. H Müller. ‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG) : influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 18(3–4) :301–313, October 2000.
- [8] Adam D. McFarland and Richard P. Van Duyne. Single Silver Nanoparticles as Real-Time Optical Sensors with Zeptomole Sensitivity. *Nano Lett.*, 3(8) :1057–1062, August 2003.
- [9] G. Raschke, S. Kowarik, T. Franzl, C. Sönnichsen, T. A. Klar, J. Feldmann, A. Nichtl, and K. Kürzinger. Biomolecular Recognition Based on Single Gold

- Nanoparticle Light Scattering. *Nano Lett.*, 3(7) :935–938, July 2003.
- [10] Peter Zijlstra, Pedro M. R. Paulo, and Michel Orrit. Optical detection of single non-absorbing molecules using the surface plasmon resonance of a gold nanorod. *Nat Nano*, 7(6) :379–382, June 2012.
- [11] Irene Ament, Janak Prasad, Andreas Henkel, Sebastian Schmachtel, and Carsten Sönnichsen. Single Unlabeled Protein Detection on Individual Plasmonic Nanoparticles. *Nano Lett.*, 12(2) :1092–1095, February 2012.
- [12] W. Rechberger, A. Hohenau, A. Leitner, J. R. Krenn, B. Lamprecht, and F. R. Aussenegg. Optical properties of two interacting gold nanoparticles. *Optics Communications*, 220(1–3) :137–141, May 2003.
- [13] Chad A. Mirkin, Robert L. Letsinger, Robert C. Mucic, and James J. Storhoff. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 382(6592) :607–609, August 1996.
- [14] Robert Elghanian, James J. Storhoff, Robert C. Mucic, Robert L. Letsinger, and Chad A. Mirkin. Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles. *Science*, 277(5329) :1078–1081, August 1997.
- [15] Carsten Sönnichsen, Björn M Reinhard, Jan Liphardt, and A Paul Alivisatos. A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles. *Nature Biotechnology*, 23(6) :741–745, June 2005.
- [16] Björn M. Reinhard, Merek Siu, Harish Agarwal, A. Paul Alivisatos, and Jan Liphardt. Calibration of Dynamic Molecular Rulers Based on Plasmon Coupling between Gold Nanoparticles. *Nano Lett.*, 5(11) :2246–2252, November 2005.
- [17] Prashant K. Jain, Wenyu Huang, and Mostafa A. El-Sayed. On the Universal Scaling Behavior of the Distance Decay of Plasmon Coupling in Metal Nanoparticle Pairs : A Plasmon Ruler Equation. *Nano Lett.*, 7(7) :2080–2088, July 2007.
- [18] A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, and P. G. Schultz. Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA. *Nature*, 382(6592) :609–611, August 1996.
- [19] Daniela Zanchet, Christine M. Micheel, Wolfgang J. Parak, Daniele Gerion, and A. Paul Alivisatos. Electrophoretic Isolation of Discrete Au Nanocrystal/DNA Conjugates. *Nano Lett.*, 1(1) :32–35, January 2001.
- [20] Mickaël P. Busson, Brice Rolly, Brian Stout, Nicolas Bonod, Eric Larquet, Albert Polman, and Sébastien Bidault. Optical and Topological Characterization of Gold Nanoparticle Dimers Linked by a Single DNA Double Strand. *Nano Lett.*, 11(11) :5060–5065, November 2011.
- [21] S. Tyagi and F. R. Kramer. Molecular beacons : probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.*, 14(3) :303–308, March 1996.
- [22] Mathew M. Maye, Mudalige Thilak Kumara, Dmytro Nykypanchuk, William B. Sherman, and Oleg Gang. Switching binary states of nanoparticle superlattices and dimer clusters by DNA strands. *Nat Nano*, 5(2) :116–120, February 2010.
- [23] Jennifer I. L. Chen, Yeechi Chen, and David S. Ginger. Plasmonic Nanoparticle

- Dimers for Optical Sensing of DNA in Complex Media. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(28) :9600–9601, July 2010.
- [24] Timothy A. Larson, Pratixa P. Joshi, and Konstantin Sokolov. Preventing Protein Adsorption and Macrophage Uptake of Gold Nanoparticles via a Hydrophobic Shield. *ACS Nano*, 6(10) :9182–9190, October 2012.
- [25] Christopher P. Toumey and Philosophy Documentation Center. Reading Feynman Into Nanotechnology : A Text for a New Science. *Techné : Research in Philosophy and Technology*, 12(3) :133–168, 2008.
- [26] Timo Mappes, Norbert Jahr, Andrea Csaki, Nadine Vogler, Jürgen Popp, and Wolfgang Fritzsche. The Invention of Immersion Ultramicroscopy in 1912—The Birth of Nanotechnology? *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51(45) :11208–11212, November 2012.
- [27] Ian Freestone, Nigel Meeks, Margaret Sax, and Catherine Higgitt. The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. *Gold Bull*, 40(4) :270–277, December 2007.
- [28] Marie-Christine Daniel and Didier Astruc. Gold Nanoparticles : Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.*, 104(1) :293–346, January 2004.
- [29] David Thompson. Michael Faraday’s recognition of ruby gold : the birth of modern nanotechnology. *Gold Bull*, 40(4) :267–269, December 2007.
- [30] John Turkevich. Colloidal gold. Part II. *Gold Bull*, 18(4) :125–131, December 1985.
- [31] Peter P. Edwards and John Meurig Thomas. Gold in a Metallic Divided State—From Faraday to Present-Day Nanoscience. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(29) :5480–5486, July 2007.
- [32] Steven J. Barrow, Alison M. Funston, Daniel E. Gómez, Tim J. Davis, and Paul Mulvaney. Surface Plasmon Resonances in Strongly Coupled Gold Nanosphere Chains from Monomer to Hexamer. *Nano Lett.*, 11(10) :4180–4187, October 2011.
- [33] C. C. Lam, P. T. Leung, and K. Young. Explicit asymptotic formulas for the positions, widths, and strengths of resonances in Mie scattering. *J. Opt. Soc. Am. B*, 9(9) :1585–1592, September 1992.
- [34] A. Wokaun, J. P. Gordon, and P. F. Liao. Radiation Damping in Surface-Enhanced Raman Scattering. *Phys. Rev. Lett.*, 48(14) :957–960, April 1982.
- [35] Robert H. Doremus and Pratima Rao. Optical properties of nanosized gold particles. *Journal of Materials Research*, 11(11) :2834–2840, 1996.
- [36] U. Kreibig and L. Genzel. Optical absorption of small metallic particles. *Surface Science*, 156, Part 2 :678–700, June 1985.
- [37] M. Meier and A. Wokaun. Enhanced fields on large metal particles : dynamic depolarization. *Opt. Lett.*, 8(11) :581–583, November 1983.
- [38] Nadrian C. Seeman. DNA in a material world. *Nature*, 421(6921) :427–431, January 2003.
- [39] Nadrian C. Seeman. Nanomaterials Based on DNA. *Annu Rev Biochem*, 79 :65–87, 2010.

- [40] Charles R. Martin and David T. Mitchell. Peer Reviewed : Nanomaterials in Analytical Chemistry. *Anal. Chem.*, 70(9) :322A–327A, May 1998.
- [41] Lukas Novotny and Bert Hecht. *Principles of Nano-Optics*. Cambridge University Press, September 2012.
- [42] Stefan Alexander Maier. *Plasmonics : Fundamentals and Applications : Fundamentals and Applications*. Springer Science & Business Media, May 2007.
- [43] Prof Dr Uwe Kreibig and Prof Dr Michael Vollmer. Introduction. In *Optical Properties of Metal Clusters*, number 25 in Springer Series in Materials Science, pages 1–12. Springer Berlin Heidelberg, January 1995.
- [44] Craig F. Bohren and Donald R. Huffman. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. John Wiley & Sons, September 2008.
- [45] W. Cai, H. Hofmeister, and M. Dubiel. Importance of lattice contraction in surface plasmon resonance shift for free and embedded silver particles. *Eur. Phys. J. D*, 13(2) :245–253, January 2001.
- [46] H. Hövel, S. Fritz, A. Hilger, U. Kreibig, and M. Vollmer. Width of cluster plasmon resonances : Bulk dielectric functions and chemical interface damping. *Phys. Rev. B*, 48(24) :18178–18188, December 1993.
- [47] Josef Tiggesbäumker, Lars Köller, Karl-Heinz Meiwes-Broer, and Ansgar Liesch. Blue shift of the Mie plasma frequency in Ag clusters and particles. *Phys. Rev. A*, 48(3) :R1749–R1752, September 1993.
- [48] Cao, Rongchao Jin, and Chad A. Mirkin. DNA-Modified Core-Shell Ag/Au Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 123(32) :7961–7962, August 2001.
- [49] Prashant K. Jain and Mostafa A. El-Sayed. Universal Scaling of Plasmon Coupling in Metal Nanostructures : Extension from Particle Pairs to Nanoshells. *Nano Lett.*, 7(9) :2854–2858, September 2007.
- [50] U. Håkanson, M. Agio, S. Kühn, L. Rogobete, T. Kalkbrenner, and V. Sandoghdar. Coupling of plasmonic nanoparticles to their environments in the context of van der Waals–Casimir interactions. *Phys. Rev. B*, 77(15) :155408, April 2008.
- [51] Vitaly V. Kresin. Collective resonances in silver clusters : Role of d electrons and the polarization-free surface layer. *Phys. Rev. B*, 51(3) :1844–1849, January 1995.
- [52] Traci R. Jensen, Michelle L. Duval, K. Lance Kelly, Anne A. Lazarides, George C. Schatz, and Richard P. Van Duyne. Nanosphere Lithography : Effect of the External Dielectric Medium on the Surface Plasmon Resonance Spectrum of a Periodic Array of Silver Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, 103(45) :9846–9853, November 1999.
- [53] J. Y. Bigot, J. Y. Merle, O. Cregut, and A. Daunois. Electron Dynamics in Copper Metallic Nanoparticles Probed with Femtosecond Optical Pulses. *Phys. Rev. Lett.*, 75(25) :4702–4705, December 1995.
- [54] Jérôme Martin, Mathieu Kociak, Zackaria Mahfoud, Julien Proust, Davy Gérard, and Jérôme Plain. High-Resolution Imaging and Spectroscopy of Multipolar Plasmonic Resonances in Aluminum Nanoantennas. *Nano Lett.*, 14(10) :5517–5523, October 2014.

- [55] Linxi Wu and Björn M. Reinhard. Probing subdiffraction limit separations with plasmon coupling microscopy : concepts and applications. *Chem. Soc. Rev.*, 43(11) :3884–3897, May 2014.
- [56] Jean Lermé, Hatim Baida, Christophe Bonnet, Michel Broyer, Emmanuel Cottancin, Aurélien Crut, Paolo Maioli, Natalia Del Fatti, Fabrice Vallée, and Michel Pellarin. Size Dependence of the Surface Plasmon Resonance Damping in Metal Nanospheres. *J. Phys. Chem. Lett.*, 1(19) :2922–2928, October 2010.
- [57] H. Baida, P. Billaud, S. Marhaba, D. Christofilos, E. Cottancin, A. Crut, J. Lermé, P. Maioli, M. Pellarin, M. Broyer, N. Del Fatti, F. Vallée, A. Sánchez-Iglesias, I. Pastoriza-Santos, and L. M. Liz-Marzán. Quantitative Determination of the Size Dependence of Surface Plasmon Resonance Damping in Single Ag@SiO₂ Nanoparticles. *Nano Lett.*, 9(10) :3463–3469, October 2009.
- [58] Arisato Kawabata and Ryogo Kubo. Electronic Properties of Fine Metallic Particles. II. Plasma Resonance Absorption. *J. Phys. Soc. Jpn.*, 21(9) :1765–1772, September 1966.
- [59] L. Genzel and U. Kreibig. Dielectric function and infrared absorption of small metal particles. *Z Physik B*, 37(2) :93–101, June 1980.
- [60] Christophe Voisin, Natalia Del Fatti, Dimitris Christofilos, and Fabrice Vallée. Ultrafast Electron Dynamics and Optical Nonlinearities in Metal Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, 105(12) :2264–2280, March 2001.
- [61] Jonathan A. Scholl, Ai Leen Koh, and Jennifer A. Dionne. Quantum plasmon resonances of individual metallic nanoparticles. *Nature*, 483(7390) :421–427, March 2012.
- [62] Matthew Rycenga, Claire M. Cobley, Jie Zeng, Weiyang Li, Christine H. Moran, Qiang Zhang, Dong Qin, and Younan Xia. Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications. *Chem. Rev.*, 111(6) :3669–3712, June 2011.
- [63] Kane S. Yee. Numerical solution of initial boundary value problems involving Maxwell’s equations in isotropic media. *IEEE Trans. Antennas and Propagation*, pages 302–307, 1966.
- [64] Bruce T. Draine and Piotr J. Flatau. Discrete-Dipole Approximation For Scattering Calculations. *J. Opt. Soc. Am. A*, 11(4) :1491–1499, April 1994.
- [65] P. Nordlander, C. Oubre, E. Prodan, K. Li, and M. I. Stockman. Plasmon Hybridization in Nanoparticle Dimers. *Nano Lett.*, 4(5) :899–903, May 2004.
- [66] K.-H. Su, Q.-H. Wei, X. Zhang, J. J. Mock, D. R. Smith, and S. Schultz. Interparticle Coupling Effects on Plasmon Resonances of Nanogold Particles. *Nano Lett.*, 3(8) :1087–1090, August 2003.
- [67] Stefan A. Maier, Mark L. Brongersma, Pieter G. Kik, and Harry A. Atwater. Observation of near-field coupling in metal nanoparticle chains using far-field polarization spectroscopy. *Phys. Rev. B*, 65(19) :193408, May 2002.
- [68] Björn M. Reinhard, Sassan Sheikholeslami, Alexander Mastroianni, A. Paul Alivisatos, and Jan Liphardt. Use of plasmon coupling to reveal the dynamics of DNA

- bending and cleavage by single EcoRV restriction enzymes. *PNAS*, 104(8) :2667–2672, February 2007.
- [69] Linglu Yang, Hongyun Wang, Bo Yan, and Björn M. Reinhard. Calibration of Silver Plasmon Rulers in the 1-25 nm Separation Range : Experimental Indications of Distinct Plasmon Coupling Regimes. *J. Phys. Chem. C*, 114(11) :4901–4908, March 2010.
- [70] Linda Gunnarsson, Tomas Rindzevicius, Juris Prikulis, Bengt Kasemo, Mikael Käll, Shengli Zou, and George C. Schatz. Confined Plasmons in Nanofabricated Single Silver Particle Pairs : Experimental Observations of Strong Interparticle Interactions. *J. Phys. Chem. B*, 109(3) :1079–1087, January 2005.
- [71] Prashant K. Jain and Mostafa A. El-Sayed. Plasmonic coupling in noble metal nanostructures. *Chemical Physics Letters*, 487(4–6) :153–164, March 2010.
- [72] Boris Khlebtsov, Andrei Melnikov, Vladimir Zharov, and Nikolai Khlebtsov. Absorption and scattering of light by a dimer of metal nanospheres : comparison of dipole and multipole approaches. *Nanotechnology*, 17(5) :1437, March 2006.
- [73] Brice Rolly, Brian Stout, and Nicolas Bonod. Metallic dimers : When bonding transverse modes shine light. *Phys. Rev. B*, 84(12) :125420, September 2011.
- [74] S. Y. Suck, S. Collin, N. Bardou, Y. De Wilde, and G. Tessier. Imaging the three-dimensional scattering pattern of plasmonic nanodisk chains by digital heterodyne holography. *Opt. Lett.*, 36(6) :849–851, March 2011.
- [75] Hong-Xing Xu. A new method by extending Mie theory to calculate local field in outside/inside of aggregates of arbitrary spheres. *Physics Letters A*, 312(5–6) :411–419, June 2003.
- [76] Salem Marhaba, Guillaume Bachelier, Christophe Bonnet, Michel Broyer, Emmanuel Cottancin, Nadia Grillet, Jean Lermé, Jean-Louis Vialle, and Michel Pellarin. Surface Plasmon Resonance of Single Gold Nanodimers near the Conductive Contact Limit. *J. Phys. Chem. C*, 113(11) :4349–4356, March 2009.
- [77] Alison M. Funston, Carolina Novo, Tim J. Davis, and Paul Mulvaney. Plasmon Coupling of Gold Nanorods at Short Distances and in Different Geometries. *Nano Lett.*, 9(4) :1651–1658, April 2009.
- [78] Jonathan A. Scholl, Aitzol García-Etxarri, Ai Leen Koh, and Jennifer A. Dionne. Observation of Quantum Tunneling between Two Plasmonic Nanoparticles. *Nano Lett.*, 13(2) :564–569, February 2013.
- [79] S. H. Armstrong, M. J. E. Budka, K. C. Morrison, and M. Hasson. Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XII. The Refractive Properties of the Proteins of Human Plasma and Certain Purified Fractions^{1,2}. *J. Am. Chem. Soc.*, 69(7) :1747–1753, July 1947.
- [80] A. Curry, G. Nusz, A. Chilkoti, and A. Wax. Substrate effect on refractive index dependence of plasmon resonance for individual silver nanoparticles observed using darkfield microspectroscopy. *Optics Express*, 13(7) :2668, 2005.
- [81] Wenyu Huang, Wei Qian, Prashant K. Jain, and Mostafa A. El-Sayed. The Effect of Plasmon Field on the Coherent Lattice Phonon Oscillation in Electron-Beam Fabricated Gold Nanoparticle Pairs. *Nano Lett.*, 7(10) :3227–3234, October 2007.

- [82] Bruce J. Berne and Robert Pecora. *Dynamic Light Scattering : With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. Courier Dover Publications, 2000.
- [83] Julien R. G. Navarro and Martinus H. V. Werts. Resonant light scattering spectroscopy of gold, silver and gold–silver alloy nanoparticles and optical detection in microfluidic channels. *Analyst*, 138(2) :583–592, December 2012.
- [84] Jacob N. Israelachvili. *Intermolecular and Surface Forces : Revised Third Edition*. Academic Press, July 2011.
- [85] Jianzhong Wu, Dusan Bratko, and John M. Prausnitz. Interaction between like-charged colloidal spheres in electrolyte solutions. *PNAS*, 95(26) :15169–15172, December 1998.
- [86] B Derjaguin and L Landau. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Progress in Surface Science*, 43(1–4) :30–59, May 1993.
- [87] Evert Johannes Willem Verwey, J. Th G. Overbeek, and Jan Theodoor Gerard Overbeek. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. Courier Dover Publications, 1999.
- [88] Bryan Beresford-Smith, Derek Y. C Chan, and D. John Mitchell. The electrostatic interaction in colloidal systems with low added electrolyte. *Journal of Colloid and Interface Science*, 105(1) :216–234, May 1985.
- [89] M.J. Grimson and M. Silbert. A self-consistent theory of the effective interactions in charge-stabilized colloidal dispersions. *Molecular Physics*, 74(2) :397–404, 1991.
- [90] René van Roij and Jean-Pierre Hansen. Van der Waals–Like Instability in Suspensions of Mutually Repelling Charged Colloids. *Phys. Rev. Lett.*, 79(16) :3082–3085, October 1997.
- [91] R. A. Sperling and W. J. Parak. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Phil. Trans. R. Soc. A*, 368(1915) :1333–1383, March 2010.
- [92] Takeshi Sakura, Tadahito Takahashi, Kazunori Kataoka, and Yukio Nagasaki. One-pot preparation of mono-dispersed and physiologically stabilized gold colloid. *Colloid Polym Sci*, 284(1) :97–101, October 2005.
- [93] J. Christopher Love, Lara A. Estroff, Jennah K. Kriebel, Ralph G. Nuzzo, and George M. Whitesides. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.*, 105(4) :1103–1170, April 2005.
- [94] Michael J. Hostetler, Allen C. Templeton, and Royce W. Murray. Dynamics of Place-Exchange Reactions on Monolayer-Protected Gold Cluster Molecules. *Langmuir*, 15(11) :3782–3789, May 1999.
- [95] Zhaoxiang Deng, Ye Tian, Seung-Hyun Lee, Alexander E. Ribbe, and Chengde Mao. DNA-Encoded Self-Assembly of Gold Nanoparticles into One-Dimensional Arrays. *Angewandte Chemie*, 117(23) :3648–3651, June 2005.
- [96] Kenji Suzuki, Kazuo Hosokawa, and Mizuo Maeda. Controlling the Number and Positions of Oligonucleotides on Gold Nanoparticle Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(22) :7518–7519, June 2009.

- [97] Alexander J. Mastroianni, Shelley A. Claridge, and A. Paul Alivisatos. Pyramidal and Chiral Groupings of Gold Nanocrystals Assembled Using DNA Scaffolds. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(24) :8455–8459, June 2009.
- [98] Jaswinder Sharma, Rahul Chhabra, Anchi Cheng, Jonathan Brownell, Yan Liu, and Hao Yan. Control of Self-Assembly of DNA Tubules Through Integration of Gold Nanoparticles. *Science*, 323(5910) :112–116, January 2009.
- [99] Sébastien Bidault, F. Javier García de Abajo, and Albert Polman. Plasmon-Based Nanolenses Assembled on a Well-Defined DNA Template. *J. Am. Chem. Soc.*, 130(9) :2750–2751, March 2008.
- [100] Zhi Li, Rongchao Jin, Chad A. Mirkin, and Robert L. Letsinger. Multiple thiol-anchor capped DNA–gold nanoparticle conjugates. *Nucl. Acids Res.*, 30(7) :1558–1562, April 2002.
- [101] A. B. Steel, R. L. Levicky, T. M. Herne, and M. J. Tarlov. Immobilization of Nucleic Acids at Solid Surfaces : Effect of Oligonucleotide Length on Layer Assembly. *Biophysical Journal*, 79(2) :975–981, January 2000.
- [102] Richard P. Fahlman and Dipankar Sen. DNA Conformational Switches as Sensitive Electronic Sensors of Analytes. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(17) :4610–4616, May 2002.
- [103] Nadrian C. Seeman. Biochemistry and Structural DNA Nanotechnology : An Evolving Symbiotic Relationship. *Biochemistry*, 42(24) :7259–7269, June 2003.
- [104] Paul W. K. Rothemund. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 440(7082) :297–302, March 2006.
- [105] Hendrik Dietz, Shawn M. Douglas, and William M. Shih. Folding DNA into Twisted and Curved Nanoscale Shapes. *Science*, 325(5941) :725–730, August 2009.
- [106] Shawn M. Douglas, Hendrik Dietz, Tim Liedl, Björn Högberg, Franziska Graf, and William M. Shih. Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature*, 459(7245) :414–418, May 2009.
- [107] Michael Zuker. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl. Acids Res.*, 31(13) :3406–3415, July 2003.
- [108] Ammasi Periasamy and Richard Day. *Molecular Imaging : FRET Microscopy and Spectroscopy*. Elsevier, April 2011.
- [109] Benoit Dubertret, Michel Calame, and Albert J. Libchaber. Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides. *Nat Biotech*, 19(4) :365–370, April 2001.
- [110] Zoher Gueroui and Albert Libchaber. Single-Molecule Measurements of Gold-Quenched Quantum Dots. *Phys. Rev. Lett.*, 93(16) :166108, October 2004.
- [111] James J. Storhoff and Chad A. Mirkin. Programmed Materials Synthesis with DNA. *Chem. Rev.*, 99(7) :1849–1862, July 1999.
- [112] Nathaniel L. Rosi and Chad A. Mirkin. Nanostructures in Biodiagnostics. *Chem. Rev.*, 105(4) :1547–1562, April 2005.
- [113] T. Andrew Taton, Chad A. Mirkin, and Robert L. Letsinger. Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes. *Science*, 289(5485) :1757–1760, September 2000.

- [114] Jwa-Min Nam, C. Shad Thaxton, and Chad A. Mirkin. Nanoparticle-Based Bio-Bar Codes for the ultrasensitive Detection of Proteins. *Science*, 301(5641) :1884–1886, September 2003.
- [115] Dongwoo Kim, Weston L. Daniel, and Chad A. Mirkin. Microarray-Based Multiplexed Scanometric Immunoassay for Protein Cancer Markers Using Gold Nanoparticle Probes. *Anal. Chem.*, 81(21) :9183–9187, November 2009.
- [116] Xiaoyang Xu, Weston L. Daniel, Wei Wei, and Chad A. Mirkin. Colorimetric Cu²⁺ Detection Using DNA-Modified Gold-Nanoparticle Aggregates as Probes and Click Chemistry. *Small*, 6(5) :623–626, March 2010.
- [117] Jae-Seung Lee and Chad A. Mirkin. Chip-Based Scanometric Detection of Mercuric Ion Using DNA-Functionalized Gold Nanoparticles. *Anal. Chem.*, 80(17) :6805–6808, September 2008.
- [118] Dong-Kwon Lim, Ki-Seok Jeon, Hyung Min Kim, Jwa-Min Nam, and Yung Doug Suh. Nanogap-engineerable Raman-active nanodumbbells for single-molecule detection. *Nat Mater*, 9(1) :60–67, January 2010.
- [119] Duncan Graham, David G. Thompson, W. Ewen Smith, and Karen Faulds. Control of enhanced Raman scattering using a DNA-based assembly process of dye-coded nanoparticles. *Nat Nano*, 3(9) :548–551, September 2008.
- [120] G. P. Acuna, F. M. Möller, P. Holzmeister, S. Beater, B. Lalkens, and P. Tinnefeld. Fluorescence Enhancement at Docking Sites of DNA-Directed Self-Assembled Nanoantennas. *Science*, 338(6106) :506–510, October 2012.
- [121] Mickaël P. Busson, Brice Rolly, Brian Stout, Nicolas Bonod, and Sébastien Bidault. Accelerated single photon emission from dye molecule-driven nanoantennas assembled on DNA. *Nat Commun*, 3 :962, July 2012.
- [122] James J. Storhoff, Robert Elghanian, Chad A. Mirkin, and Robert L. Letsinger. Sequence-Dependent Stability of DNA-Modified Gold Nanoparticles. *Langmuir*, 18(17) :6666–6670, August 2002.
- [123] Wolfgang J. Parak, Teresa Pellegrino, Christine M. Micheel, Daniele Gerion, Shara C. Williams, and A. Paul Alivisatos. Conformation of Oligonucleotides Attached to Gold Nanocrystals Probed by Gel Electrophoresis. *Nano Lett.*, 3(1) :33–36, January 2003.
- [124] J. G. Gordon II and S. Ernst. Surface plasmons as a probe of the electrochemical interface. *Surface Science*, 101(1–3) :499–506, December 1980.
- [125] Claes Nylander, Bo Liedberg, and Tommy Lind. Gas detection by means of surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators*, 3 :79–88, 1982.
- [126] Kathryn M. Mayer and Jason H. Hafner. Localized Surface Plasmon Resonance Sensors. *Chem. Rev.*, 111(6) :3828–3857, June 2011.
- [127] Traci R. Jensen, Michelle Duval Malinsky, Christy L. Haynes, and Richard P. Van Duyne. Nanosphere Lithography : Tunable localized Surface Plasmon Resonance Spectra of Silver Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, 104(45) :10549–10556, November 2000.
- [128] Sheldon Schultz, David R. Smith, Jack J. Mock, and David A. Schultz. Single-target

- molecule detection with nonbleaching multicolor optical immunolabels. *PNAS*, 97(3) :996–1001, February 2000.
- [129] Juan Yguerabide and Evangelina E. Yguerabide. Light-Scattering Submicroscopic Particles as Highly Fluorescent Analogs and Their Use as Tracer Labels in Clinical and Biological Applications : I. Theory. *Analytical Biochemistry*, 262(2) :137–156, September 1998.
- [130] Kerry J. Lee, Prakash D. Nallathamby, Lauren M. Browning, Christopher J. Osgood, and Xiao-Hong Nancy Xu. In Vivo Imaging of Transport and Biocompatibility of Single Silver Nanoparticles in Early Development of Zebrafish Embryos. *ACS Nano*, 1(2) :133–143, September 2007.
- [131] Xiao-Hong Nancy Xu, William J. Brownlow, Sophia V. Kyriacou, Qian Wan, and Joshua J. Viola. Real-Time Probing of Membrane Transport in Living Microbial Cells Using Single Nanoparticle Optics and Living Cell Imaging†. *Biochemistry*, 43(32) :10400–10413, August 2004.
- [132] Chanda Ranjit Yonzon, Eunhee Jeoung, Shengli Zou, George C. Schatz, Milan Mrksich, and Richard P. Van Duyne. A comparative Analysis of Localized and Propagating Surface Plasmon Resonance Sensors : The Binding of Concanavalin A to a Monosaccharide Functionalized Self-Assembled Monolayer. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(39) :12669–12676, October 2004.
- [133] Amanda J. Haes, Lei Chang, William L. Klein, and Richard P. Van Duyne. Detection of a Biomarker for Alzheimer’s Disease from Synthetic and Clinical Samples Using a Nanoscale Optical Biosensor. *J. Am. Chem. Soc.*, 127(7) :2264–2271, February 2005.
- [134] Roberto de la Rica and Molly M. Stevens. Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. *Nat Nano*, 7(12) :821–824, December 2012.
- [135] Laura Rodríguez-Lorenzo, Roberto de la Rica, Ramón A. Álvarez Puebla, Luis M. Liz-Marzán, and Molly M. Stevens. Plasmonic nanosensors with inverse sensitivity by means of enzyme-guided crystal growth. *Nat Mater*, 11(7) :604–607, July 2012.
- [136] Yi Chen and Chengde Mao. pH-Induced Reversible Expansion/Contraction of Gold Nanoparticle Aggregates. *Small*, 4(12) :2191–2194, December 2008.
- [137] Pompi Hazarika, Bülent Ceyhan, and Christof M. Niemeyer. Reversible Switching of DNA–Gold Nanoparticle Aggregation. *Angewandte Chemie*, 116(47) :6631–6633, December 2004.
- [138] Weian Zhao, William Chiu, Jeffrey C. F. Lam, Simon A. McManus, Wei Chen, Yuguo Cui, Robert Pelton, Michael A. Brook, and Yingfu Li. DNA Aptamer Folding on Gold Nanoparticles : From Colloid Chemistry to Biosensors. *J. Am. Chem. Soc.*, 130(11) :3610–3618, March 2008.
- [139] David P. Fromm, Arvind Sundaramurthy, P. James Schuck, Gordon Kino, and W. E. Moerner. Gap-Dependent Optical Coupling of Single “Bowtie” Nanoantennas Resonant in the Visible. *Nano Lett.*, 4(5) :957–961, May 2004.

- [140] Gang L. Liu, Yadong Yin, Siri Kunchakarra, Bipasha Mukherjee, Daniele Gerion, Stephen D. Jett, David G. Bear, Joe W. Gray, A. Paul Alivisatos, Luke P. Lee, and Fanqing Frank Chen. A nanoplasmonic molecular ruler for measuring nuclease activity and DNA footprinting. *Nat Nano*, 1(1) :47–52, October 2006.
- [141] Remco Verdoold, Ron Gill, Felicia Ungureanu, Robert Molenaar, and Rob P. H. Kooyman. Femtomolar DNA detection by parallel colorimetric darkfield microscopy of functionalized gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 27(1) :77–81, September 2011.
- [142] Lynell R. Skewis and Björn M. Reinhard. Spermidine Modulated Ribonuclease Activity Probed by RNA Plasmon Rulers. *Nano Lett.*, 8(1) :214–220, January 2008.
- [143] Hongyun Wang and Björn M. Reinhard. Monitoring Simultaneous Distance and Orientation Changes in Discrete Dimers of DNA Linked Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*, 113(26) :11215–11222, July 2009.
- [144] Young Kwang Lee, Sungi Kim, and Jwa-Min Nam. Dark-Field-Based Observation of Single-Nanoparticle Dynamics on a Supported Lipid Bilayer for In Situ Analysis of Interacting Molecules and Nanoparticles. *ChemPhysChem*, pages n/a–n/a, October 2014.
- [145] Jesse Aaron, Kort Travis, Nathan Harrison, and Konstantin Sokolov. Dynamic Imaging of Molecular Assemblies in Live Cells Based on Nanoparticle Plasmon Resonance Coupling. *Nano Lett.*, 9(10) :3612–3618, October 2009.
- [146] Matthew J. Crow, Kevin Seekell, Julie H. Ostrander, and Adam Wax. Monitoring of Receptor Dimerization Using Plasmonic Coupling of Gold Nanoparticles. *ACS Nano*, 5(11) :8532–8540, November 2011.
- [147] Wei Qian, Xiaohua Huang, Bin Kang, and Mostafa A. El-Sayed. Dark-field light scattering imaging of living cancer cell component from birth through division using bioconjugated gold nanoprobos. *J. Biomed. Opt.*, 15(4) :046025–046025–9, 2010.
- [148] David S. Sebba, Jack J. Mock, David R. Smith, Thomas H. LaBean, and Anne A. Lazarides. Reconfigurable Core-Satellite Nanoassemblies as Molecularly-Driven Plasmonic Switches. *Nano Lett.*, 8(7) :1803–1808, July 2008.
- [149] Phyllis F. Xu, Albert M. Hung, Hyunwoo Noh, and Jennifer N. Cha. Switchable Nanodumbbell Probes for Analyte Detection. *Small*, 9(2) :228–232, January 2013.
- [150] Longhua Guo, Abdul Rahim Ferhan, Hailan Chen, Changming Li, Guonan Chen, Seungpyo Hong, and Dong-Hwan Kim. Distance-Mediated Plasmonic Dimers for Reusable Colorimetric Switches : A Measurable Peak Shift of More than 60 nm. *Small*, 9(2) :234–240, January 2013.
- [151] Shawn M. Douglas, Ido Bachelet, and George M. Church. A Logic-Gated Nanorobot for Targeted Transport of Molecular Payloads. *Science*, 335(6070) :831–834, February 2012.
- [152] Aaron P. Esser-Kahn, Nancy R. Sottos, Scott R. White, and Jeffrey S. Moore. Programmable Microcapsules from Self-Immolative Polymers. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(30) :10266–10268, August 2010.

- [153] Eun Seong Lee, Dongin Kim, Yu Seok Youn, Kyung Taek Oh, and You Han Bae. A Virus-Mimetic Nanogel Vehicle. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(13) :2418–2421, March 2008.
- [154] Jaebeom Lee, Pedro Hernandez, Jungwoo Lee, Alexander O. Govorov, and Nicholas A. Kotov. Exciton–plasmon interactions in molecular spring assemblies of nanowires and wavelength-based protein detection. *Nat Mater*, 6(4) :291–295, April 2007.
- [155] Faisal A. Aldaye and Hanadi F. Sleiman. Dynamic DNA Templates for Discrete Gold Nanoparticle Assemblies : Control of Geometry, Modularity, Write/Erase and Structural Switching. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(14) :4130–4131, April 2007.
- [156] Russell P. Goodman, Mike Heilemann, Sören Doose, Christoph M. Erben, Achillefs N. Kapanidis, and Andrew J. Turberfield. Reconfigurable, braced, three-dimensional DNA nanostructures. *Nat Nano*, 3(2) :93–96, February 2008.
- [157] Sarah J. Hurst, Abigail K. R. Lytton-Jean, and Chad A. Mirkin. Maximizing DNA Loading on a Range of Gold Nanoparticle Sizes. *Anal. Chem.*, 78(24) :8313–8318, December 2006.
- [158] A. Abuchowski, T. van Es, N. C. Palczuk, and F. F. Davis. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *J. Biol. Chem.*, 252(11) :3578–3581, June 1977.
- [159] Francesco M. Veronese and Anna Mero. The impact of PEGylation on biological therapies. *BioDrugs*, 22(5) :315–329, 2008.
- [160] Shelley A. Claridge, Huiyang W. Liang, S. Roger Basu, Jean M. J. Fréchet, and A. Paul Alivisatos. Isolation of Discrete Nanoparticle-DNA Conjugates for Plasmonic Applications. *Nano Lett.*, 8(4) :1202–1206, April 2008.
- [161] J. Dubochet and A.w. McDowell. Vitrification of Pure Water for Electron Microscopy. *Journal of Microscopy*, 124(3) :3–4, December 1981.
- [162] J. Dubochet. Cryo-EM—the first thirty years. *Journal of Microscopy*, 245(3) :221–224, March 2012.
- [163] Angela R. Rudolph, Katherine L. Jungjohann, David R. Wheeler, and Susan M. Brozik. Drying Effect Creates False Assemblies in DNA-Coated Gold Nanoparticles as Determined Through In Situ Liquid Cell STEM. *Microscopy and Microanalysis*, 20(02) :437–444, 2014.
- [164] Kenneth A. Taylor and Robert M. Glaeser. Electron Diffraction of Frozen, Hydrated Protein Crystals. *Science*, 186(4168) :1036–1037, December 1974.
- [165] Kenneth A. Taylor and Robert M. Glaeser. Retrospective on the early development of cryoelectron microscopy of macromolecules and a prospective on opportunities for the future. *Journal of Structural Biology*, 163(3) :214–223, September 2008.
- [166] So-Jung Park, Anne A. Lazarides, James J. Storhoff, Lorenzo Pesce, and Chad A. Mirkin. The Structural Characterization of Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticle Networks Formed by DNA Hybridization. *J. Phys. Chem. B*, 108(33) :12375–12380, August 2004.
- [167] M. A. van Dijk, A. L. Tchegotareva, M. Orrit, M. Lippitz, S. Berciaud, D. Lasne,

- L. Cognet, and B. Lounis. Absorption and scattering microscopy of single metal nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8(30) :3486, 2006.
- [168] A. Arbouet, D. Christofilos, N. Del Fatti, F. Vallée, J. R. Huntzinger, L. Arnaud, P. Billaud, and M. Broyer. Direct Measurement of the Single-Metal-Cluster Optical Absorption. *Phys. Rev. Lett.*, 93(12) :127401, September 2004.
- [169] Huixiang Li and Lewis Rothberg. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *PNAS*, 101(39) :14036–14039, September 2004.
- [170] Yanli Liu, Mathew K. Shipton, Joseph Ryan, Eric D. Kaufman, Stefan Franzen, and Daniel L. Feldheim. Synthesis, Stability, and Cellular Internalization of Gold Nanoparticles Containing Mixed Peptide-Poly(ethylene glycol) Monolayers. *Anal. Chem.*, 79(6) :2221–2229, March 2007.
- [171] Antonios G. Kanaras, Fadhil S. Kamounah, Kjeld Schaumburg, Christopher J. Kiely, and Mathias Brust. Thioalkylated tetraethylene glycol : a new ligand for water soluble monolayer protected gold clusters. *Chemical Communications*, (20) :2294–2295, October 2002.
- [172] Lisa Maus, Oliver Dick, Hilmar Bading, Joachim P. Spatz, and Roberto Fiammengo. Conjugation of Peptides to the Passivation Shell of Gold Nanoparticles for Targeting of Cell-Surface Receptors. *ACS Nano*, 4(11) :6617–6628, November 2010.
- [173] P. Harder, M. Grunze, R. Dahint, G. M. Whitesides, and P. E. Laibinis. Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption. *J. Phys. Chem. B*, 102(2) :426–436, January 1998.
- [174] Ralph G. Nuzzo and David L. Allara. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, 105(13) :4481–4483, June 1983.
- [175] Cheng Chi, Fernando Vargas-Lara, Alexei V. Tkachenko, Francis W. Starr, and Oleg Gang. Internal Structure of Nanoparticle Dimers Linked by DNA. *ACS Nano*, 6(8) :6793–6802, August 2012.
- [176] Srdjan S. Aćimović, Mark P. Kreuzer, María U. González, and Romain Quidant. Plasmon Near-Field Coupling in Metal Dimers as a Step toward Single-Molecule Sensing. *ACS Nano*, 3(5) :1231–1237, May 2009.
- [177] Juewen Liu and Yi Lu. Fast Colorimetric Sensing of Adenosine and Cocaine Based on a General Sensor Design Involving Aptamers and Nanoparticles. *Angewandte Chemie*, 118(1) :96–100, January 2006.
- [178] Jennifer I. L. Chen, Heather Durkee, Beth Traxler, and David S. Ginger. Optical Detection of Protein in Complex Media with Plasmonic Nanoparticle Dimers. *Small*, 7(14) :1993–1997, July 2011.
- [179] Jing Wang, Svetlana V. Boriskina, Hongyun Wang, and Björn M. Reinhard. Illuminating Epidermal Growth Factor Receptor Densities on Filopodia through Plasmon Coupling. *ACS Nano*, 5(8) :6619–6628, August 2011.
- [180] Jing Wang, Xinwei Yu, Svetlana V. Boriskina, and Björn M. Reinhard. Quantification of Differential ErbB1 and ErbB2 Cell Surface Expression and Spatial

- Nanoclustering through Plasmon Coupling. *Nano Lett.*, 12(6) :3231–3237, June 2012.
- [181] D. Tabor and R. H. S. Winterton. The Direct Measurement of Normal and Retarded van der Waals Forces. *Proc. R. Soc. Lond. A*, 312(1511) :435–450, September 1969.
- [182] Patrick Tabeling. *Introduction to Microfluidics*. Oxford University Press, May 2010.
- [183] Felicia Ungureanu, Jan Halamek, Remco Verdoold, and Rob P. H. Kooyman. The use of a colour camera for quantitative detection of protein-binding nanoparticles. volume 7192, pages 719200–719200–10, 2009.
- [184] Felicia Ungureanu, Dorothee Wasserberg, Ni Yang, Remco Verdoold, and Rob P. H. Kooyman. Immunosensing by colorimetric darkfield microscopy of individual gold nanoparticle-conjugates. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 150(2) :529–536, October 2010.
- [185] Mickaël P. Busson and Sébastien Bidault. Selective Excitation of Single Molecules Coupled to the Bright Mode of a Plasmonic Cavity. *Nano Lett.*, 14(1) :284–288, January 2014.
- [186] Myles Hollander, Douglas A. Wolfe, and Eric Chicken. *Nonparametric Statistical Methods*. John Wiley & Sons, November 2013.
- [187] Anton Kuzyk, Robert Schreiber, Zhiyuan Fan, Günther Pardatscher, Eva-Maria Roller, Alexander Högele, Friedrich C. Simmel, Alexander O. Govorov, and Tim Liedl. DNA-based self-assembly of chiral plasmonic nanostructures with tailored optical response. *Nature*, 483(7389) :311–314, March 2012.
- [188] Hak Soo Choi. Nanoparticle assembly : Building blocks for tumour delivery. *Nat Nano*, 9(2) :93–94, February 2014.
- [189] Leo Y. T. Chou, Kyryl Zagorovsky, and Warren C. W. Chan. DNA assembly of nanoparticle superstructures for controlled biological delivery and elimination. *Nat Nano*, 9(2) :148–155, February 2014.
- [190] Jutaeck Nam, Nayoun Won, Ho Jin, Hyokyun Chung, and Sungjee Kim. pH-Induced Aggregation of Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(38) :13639–13645, September 2009.
- [191] Shiping Song, Zhiqiang Liang, Juan Zhang, Lihua Wang, Genxi Li, and Chunhai Fan. Gold-Nanoparticle-Based Multicolor Nanobeacons for Sequence-Specific DNA Analysis. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(46) :8670–8674, November 2009.
- [192] You-Jin Lee, Nicholas B. Schade, Li Sun, Jonathan A. Fan, Doo Ri Bae, Marcelo M. Mariscal, Gaehang Lee, Federico Capasso, Stefano Sacanna, Vinothan N. Manoharan, and Gi-Ra Yi. Ultrasooth, Highly Spherical Monocrystalline Gold Particles for Precision Plasmonics. *ACS Nano*, 7(12) :11064–11070, December 2013.