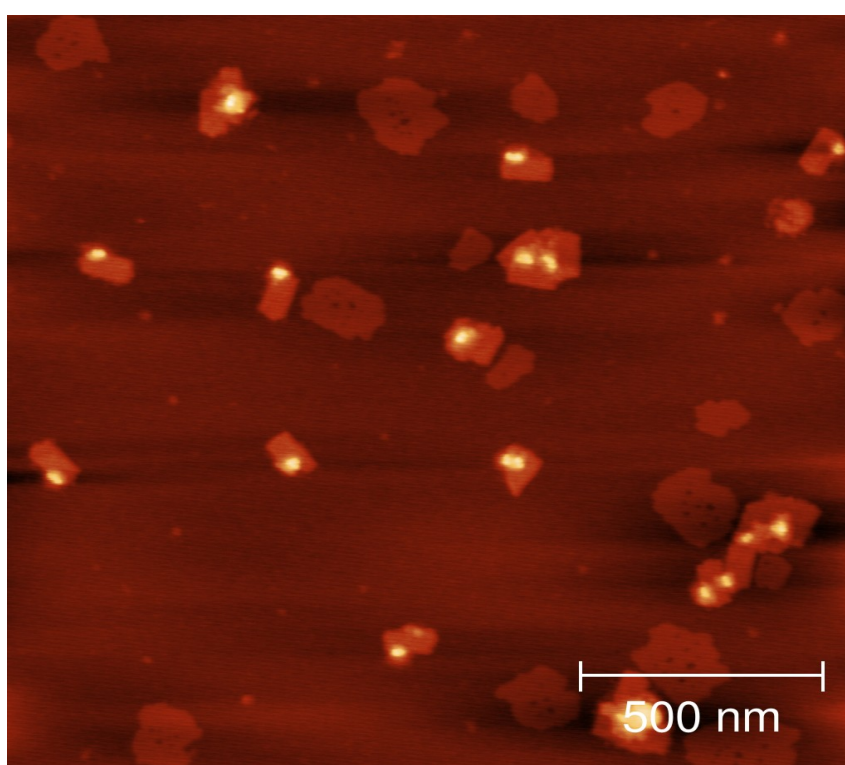


Nano-billes d'or sur un origami d'ADN : synthèse et caractérisation



Roland GOUZY

Sommaire

1 Introduction.....	3
1.A But du stage.....	3
1.B Buts et attentes du groupe de recherche.....	3
1.C Applications futures.....	3
2 Quelques considérations théoriques.....	4
2.A Généralités sur les méthodes spectroscopiques.....	4
2.B Spectroscopie Raman	5
2.C L'effet d'exaltation de surface : les sources électromagnétiques de l'effet SERS	5
3 Partie expérimentale.....	7
3.A Procédé de formation d'un origami.....	7
3.B Fixation de nano-billes d'or sur l'origami.....	8
3.C Protocole de fixation des brins thiolés sur les billes :.....	8
3.D Protocole expérimental de fixation des nano-billes d'or comportant un brin d'ADN thiolé sur l'origami.....	10
3.E Protocole expérimental de croissance des nano-billes d'or.....	10
4 Résultats expérimentaux.....	10
4.A Image AFM de formation d'origamis seuls.....	12
4.B Image AFM d'origamis fixés à des nano-billes d'or de 10nm.....	13
4.C Image AFM d'origamis fixés à des nanobilles d'or après croissance.....	14
5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	15
6 Bibliographie.....	16

1 Introduction

Les nanoparticules d'or présentent un intérêt croissant du à leur caractéristiques particulières comme leur propriétés optiques et électroniques peu communes ainsi qu'à leur grande stabilité et leur compatibilité biologique. Associées à de l'ADN ces nanoparticules ouvrent de grandes perspectives de recherche dans les applications liées à l'électronique et la plasmonique. Ici l'ADN est utilisé pour ses propriétés physiques dans le but de créer des structures nanométriques, on ne s'intéresse donc pas à ses propriétés biologiques, il est utilisé exclusivement comme support des structures étudiées. L'utilisation d'ADN présente également beaucoup d'avantages dus à son relatif bas coût d'utilisation et à la versatilité et robustesse de ses propriétés d'appariement.

1.A But du stage

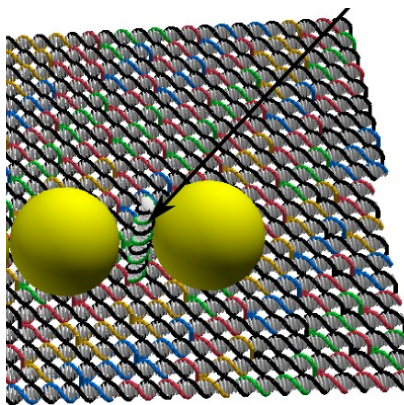
Dans le cadre de ce stage, nous allons essayer de synthétiser et de caractériser un assemblage d'ADN appelé "origami", constitué de brins d'ADN sur lequel on va attacher des nano-billes d'or . Nos manipulations vont tout d'abord s'orienter vers la fixation de nano-billes d'or sur un brin d'ADN, ensuite nous formerons des rectangles d'ADN, et ensuite nous assemblerons ces rectangles avec des nano-billes d'or que nous ferons croître et pour finir nous caractériserons cet ensemble à l'aide d'un microscope à force atomique(AFM).

Ce rapport se focalisera principalement sur l'élaboration d'un tel ensemble. Nous rappellerons premièrement quelques propriétés optiques intéressantes de nanoparticules métalliques et les techniques de spectroscopie associée à celles ci.

1.B Buts et attentes du groupe de recherche

Le but du projet en cours est la détection de très faibles concentrations de molécules, comme l'ADN, l'ARN ou plus généralement des biomolécules impliquées dans différentes pathologies. Cette détection s'effectue à l'aide de la spectroscopie Raman de type SERS (Diffusion Raman exaltée par effet de surface) qui a l'avantage d'être une technique non destructive et n'utilisant pas de marqueurs.

Les méthodes de détection sans marqueurs comme la spectroscopie Raman permettent de détecter certaines molécules grâce à leur signature optique, tel le spectre Raman.



Dans les méthodes de spectroscopie RAMAN de type SERS actuelle les nano-billes d'or sont en solution, et donc placées aléatoirement par rapport à la molécule que l'on veut détecter.

La création d'un ensemble origami et billes d'or permet d'effectuer un positionnement sélectif de la molécule à détecter. On place la molécule entre deux billes d'or, à l'endroit où le champ électrique et le plus intense, cela permet d'obtenir un signal Raman maximal.

Figure 1 : Schéma d'un structure de détection SERS avec un support ADN, composé d'un origami et de deux nano-billes d'or. La flèche pointe un brin complémentaire du brin d'ADN que l'on va détecter.

Un autre axe de recherche est la croissance de billes d'or, en effet l'effet SERS a lieu pour toutes les tailles de billes mais n'est détectable qu'à partir d'un certain diamètre de bille.

1.C Applications futures

La spectroscopie de détection par résonance plasmonique de surface est une technique pouvant être utilisée pour exploiter les propriétés optiques de nanoparticules de métal, ainsi que pour la détection de molécules ayant une signature optique dans le visible ou le proche infrarouge.

La spectroscopie de détection par résonance plasmonique de surface peut ainsi détecter la nature de mélanges.

L'assemblage d'ADN et de nano-billes d'or présentent également des intérêts dans la détection biologique et la nano-électronique.

En ce qui concerne les applications médicales, en fixant des molécules peu actives anti VIH à des nanoparticules d'or, Bowman et ses collaborateurs ont arrêté la prolifération du VIH dans les globules blancs.

Cet axe de recherche novateur est en plein développement et ouvre des perspectives dans beaucoup de domaines.

2 Quelques considérations théoriques

2.A Généralités sur les méthodes spectroscopiques

Elles consistent de façon générale à étudier et déduire des informations de la répartition en énergie ou en masse de la réponse de la matière à un stimulus donné.

On se focalisera dans ce rapport sur les techniques de spectroscopies optiques moléculaires qui présentent de nombreux avantages.

Tout d'abord leur caractère non destructif, contrairement notamment aux différents modes de spectroscopie de masse, de plus, ces méthodes ont l'intérêt de ne nécessiter qu'une faible quantité de matière.

En outre, leur champ d'application est large puisqu'il n'existe aucune restriction sur la nature des atomes constitutifs contrairement aux exigences des techniques de spectroscopies à résonance nucléaire ou électronique.

Enfin, la détection du signal ne nécessite pas de se trouver dans des conditions expérimentales sévères tel que le vide poussé indispensable aux spectroscopies d'électrons. De ce point de vue, on peut aussi mettre en avant le fait de pouvoir sonder les espèces dans leur environnement naturel, l'illumination optique bien contrôlée n'induisant que de faibles perturbations, ce qui est essentiel dans le cas d'études de structures biologiques fragiles comme par exemple l'ADN.

Les méthodes de spectroscopies optiques reposent sur l'existence dans la structure énergétique des molécules de niveaux d'énergie discrets. Dans la plupart des expériences mettant en oeuvre ces techniques, on ne mesure pas directement l'énergie de ces niveaux, mais des différences d'énergie entre niveaux.

2.B Spectroscopie Raman

Lorsqu'on irradie une molécule, une partie des photons est diffusée. Ce phénomène a lieu même avec un rayonnement exciteur non résonant, c'est-à-dire ne vérifiant pas la condition de Bohr $h\nu = E_1 - E_2$, où ν est la fréquence de l'excitation, et E_1 et E_2 correspondent à des énergies de niveaux réels de la molécule. La diffusion peut se faire de manière élastique, sans perte ou gain d'énergie, on parle alors de diffusion Rayleigh.

Malgré que l'excitation ne soit pas résonnante, la différence d'énergie entre les photons du laser et ceux de la diffusion Raman correspond quant à elle à l'écart entre deux niveaux vibrationnels réels. Pour le cas de la diffusion Raman spontanée ces niveaux vibrationnels appartiennent à un même état électronique.

On mesure grâce à cette spectroscopie la structure vibrationnelle de la molécule. Les spectroscopies dites vibrationnelles permettent d'obtenir une signature chimique très fine puisque les niveaux d'énergie vibrationnels dépendaient directement de la structure de la molécule (liaisons et type d'atomes). Grâce au spectre on peut remonter à des informations qualitatives (mise en évidence de la présence d'une espèce chimique) et quantitatives (par comparaison des intensités relatives des raies de différentes espèces) sur l'échantillon.

Le principal avantage de la spectroscopie Raman est sa capacité à fournir des informations très riches sur la structure moléculaire, et ce même à température ambiante. Les domaines de la biophysique ou de la médecine sont les premiers intéressés dans la possibilité de suivre les molécules et les interactions moléculaires dans des conditions assimilables aux conditions physiologiques.

En utilisant le signal de diffusion Raman, pour lequel il n'y a aucune restriction sur la nature de l'espèce étudiée.

Comme l'excitation ne correspond pas à la transition entre deux niveaux réels de la molécule, la section efficace du processus Raman est très faible. Ainsi, l'acquisition de spectres macroscopiques avec une bonne résolution demande des durées très importantes (de plusieurs dizaines de minutes jusqu'à plusieurs heures). Il est dans ce cas nécessaire de trouver des moyens d'exaltation du signal lui-même.

Une des solutions pour augmenter le signal Raman met en oeuvre une exaltation dite "de surface".

Cette technique porte le nom de SERS, de l'anglais "Surface Enhanced Raman Scattering" et met en jeu l'emploi de substrats de métaux nobles (Or ou Argent).

2.C L'effet d'exaltation de surface : les sources électromagnétiques de l'effet SERS

L'exaltation électromagnétique fait intervenir l'excitation de plasmons de surface sur le substrat. Les plasmons de surface sont des modes propres de vibrations des électrons du métal ; ils sont localisés à la surface du métal. Ces modes peuvent être excités par absorption d'un rayonnement de longueur d'onde adéquate. Leur excitation induit un champ électromagnétique, dont l'amplitude décroît perpendiculairement à la surface, sur une distance d'une centaine de nanomètres dans l'air

et, à l'intérieur du métal sur quelques dizaines de nanomètres : on parle d'effet de peau des métaux. Le plasmon de surface créé sur le substrat a plusieurs voies de désexcitation possibles, parmi lesquelles celle d'un transfert d'énergie, par le biais d'un champ électromagnétique, vers les molécules adsorbées. L'intensité du champ électromagnétique et sa portée, dépendent ici aussi largement de la géométrie et des dimensions de la surface ou de la particule.

Dans notre cas, on considère une sphère métallique de dimensions petites devant la longueur d'onde utilisée, les métaux nobles (or, argent, platine) à l'échelle nanométrique (particules de quelques nanomètres de diamètre) présentent des propriétés optiques particulières. Une bande d'absorption apparaît dans le spectre UV-visible de ces nanoparticules qui correspond à une résonance localisée de plasmons de surface (« Localised Surface Plasmon Resonance »). Cette dernière trouve son origine dans l'excitation collective et cohérente des électrons dans la bande de conduction et peut être perçue comme l'oscillation en phase du nuage électronique de la nanoparticule avec le champ d'excitation.

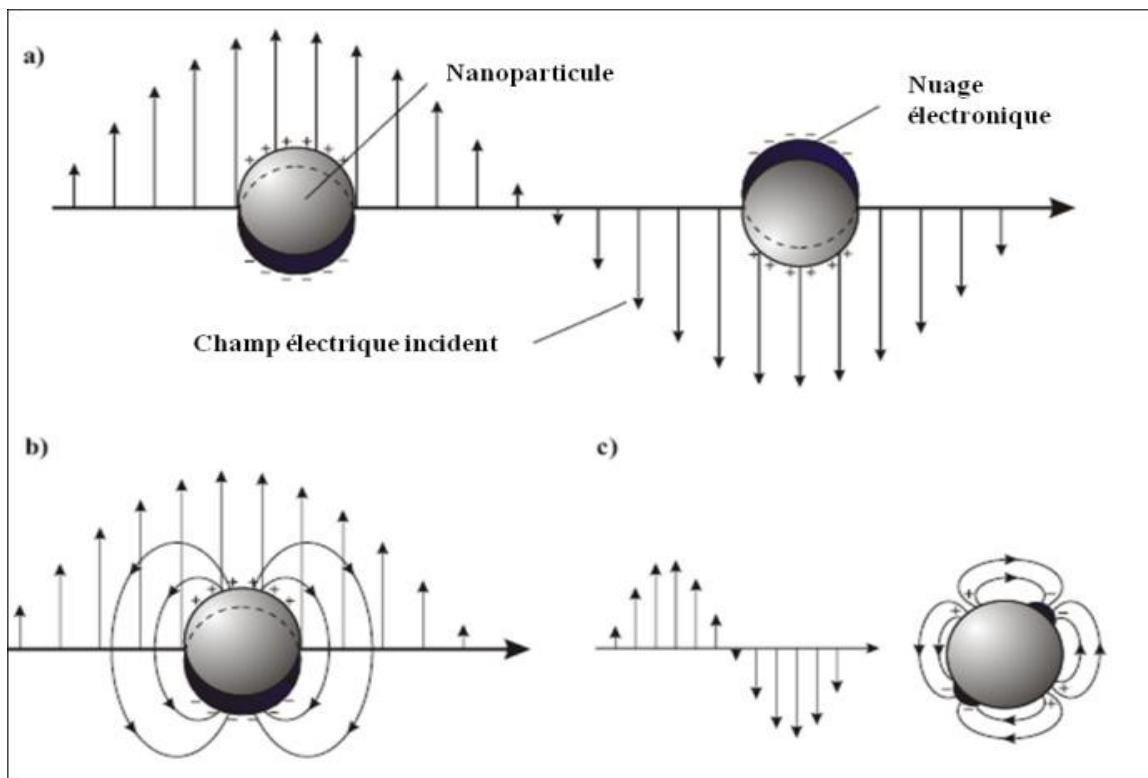


Figure 2 : Représentation schématique de l'interaction entre un champ électromagnétique et une nanoparticule sphérique et ses différents modes de résonance [1].

Cette résonance, dont la position spectrale et l'amplitude sont fonctions de la taille, de la forme et de la composition de la nanoparticule, sera accompagnée d'un confinement du champ électromagnétique au voisinage de sa surface.

3 Partie expérimentale

Cette partie décrira les étapes et méthodes qui permettent la création de formes géométriques composés d'ADN appelées origami, en partant du protocole expérimental jusqu'aux méthodes de caractérisation.

Tout d'abord, l'appellation "origami" vient du fait que cette structure est constituée d'un long simple brin d'ADN, d'environ 7000 bases, ce brin est ensuite plié jusqu'à atteindre la forme désirée à l'aide de 200 brins courts, eux aussi simple brin, la forme des origamis que nous allons synthétiser est un rectangle de 100nm sur 60nm.

3.A Procédé de formation d'un origami

Pour former un origami, il faut tout d'abord savoir quelle forme géométrique on veut former, dans notre cas, on souhaite obtenir un rectangle. Le "squelette" même d'un origami est de l'ADN. On utilise ici un simple brin d'ADN provenant d'un virus. La forme même de ce brin est circulaire, on ajoute à ce brin d'autres simples brins d'ADN appelés agrafes car ils attachent ensemble plusieurs parties du brin circulaire. Chaque agrafe est constituée de sous parties qui sont complémentaires de différentes parties du squelette qu'elles vont maintenir proches. Chacun de ces brins va se fixer à des endroits stratégiques afin d'obtenir la forme désirée. Une fois les deux extrémités de l'agrafe fixés sur l'ADN du virus on obtient alors un rectangle formé d'un double brin d'ADN.

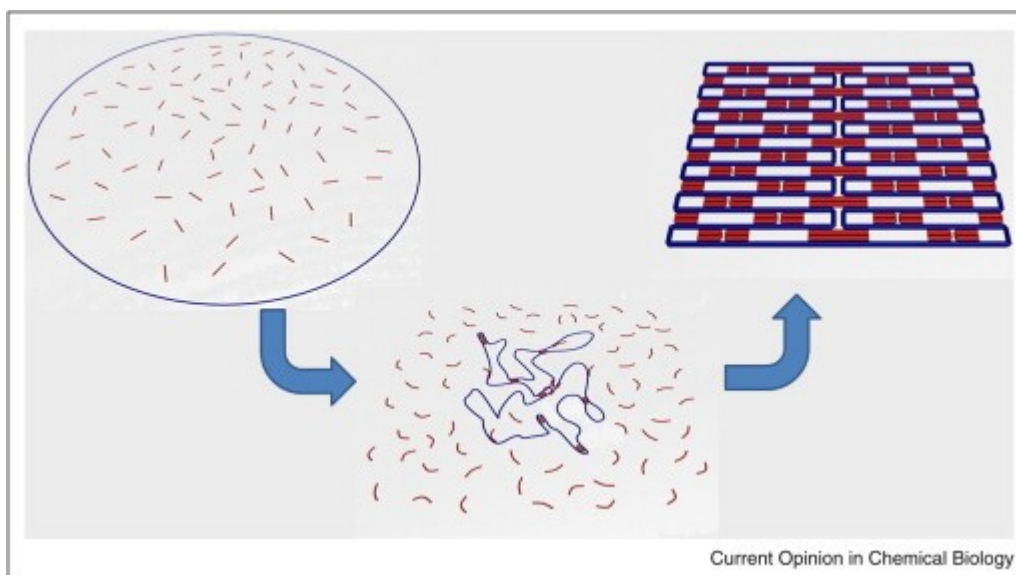


Figure 3 : [2] Formation d'un origami rectangulaire, environ 200 brins d'ADN appelés agrafes (rouge) et le grand brin d'ADN circulaire (bleu).

Chaque séquence des agrafes est choisie pour être complémentaire à un endroit choisi du brin circulaire, on obtient alors un origami.

D'un point de vue expérimental, le simple brin d'ADN du “squelette” et les agrafes sont achetés à des sociétés spécialisés. L'expérience consiste à mélanger 200 agrafes avec un excès de dix au simple brin d'ADN du “squelette” et deux agrafes dans une solution tampon contenant du magnésium. Le magnésium en solution, qui est chargé positivement permet d'avoir un équilibre de charge car l'ADN qui est constitué d'une forte concentration en phosphates qui sont eux chargés négativement. Ensuite une réaction d'hybridation de l'ADN est effectuée, elle consiste à chauffer le mélange jusqu'à une température de 90°C et de le refroidir lentement jusqu'à 20°C. Ce temps de refroidissement dépend de la complexité de la structure voulue. Dans notre cas, pour un simple rectangle le refroidissement est de 6 heures.

Les produits mélangés sont les suivant :

Produits	Quantités	Concentrations
MR (200 agrafes)	20µL	50nM
Brin 155 (sert à attacher les billes d'or)	20µL	50nM
Brin 157 (sert à attacher les billes d'or)	20µL	50nM
V16 (grand brin circulaire)	5µL	20nM
TAE(Tampon)	35µL	

3.B Fixation de nano-billes d'or sur l'origami

Cette partie décrira le procédé de fixation des nano-billes d'or sur l'origami. Il faut tout d'abord choisir à quel(s) endroit(s) sur l'origami on souhaite fixer une nano-bille et prolonger à cet endroit une agrafe d'origami avec une séquence d'ADN d'au moins 15 bases : il s'agira d'un point de fixation. Ensuite un brin thiolé complémentaire de cette séquence sera fixé à la nano-bille d'or. Et enfin cet origami et les nano-billes munies de leur brin sont mélangés ensemble.

On utilise un composé thiolé car avec l'or ils ont une affinité mutuelle. Dans notre cas nous n'utilisons pas de thiol mais du trithiol car sa force d'interaction est supérieure et donc la fixation des nano-billes d'or est supérieure.

3.C Protocole de fixation des brins thiolés sur les billes :

Tout d'abord, on procède à la concentration de billes d'or que l'on achète en solution dans laquelle elles sont faiblement concentrées(0.01nM). Pour cela on effectue deux ou trois centrifugations de 30min de cette solution à vitesse maximale de la centrifugeuse (voir image ci-contre), dans notre cas 13400 tr/min. Après chaque centrifugation on récupère les billes concentrées au fond du tube et on les remet dans un tube avec du BSPP de façon à changer le tampon du fabricant. Le BSPP est un tampon servant à stabiliser les nano-billes



d'or, en effet arrivé à une certaine concentration les nano-billes d'or ont tendance à s'agréger. Après ces centrifugations on obtient une solution de billes à une concentration d'environ 100nM.

Ensuite on mélange cette solution de billes concentrées aux brins d'ADN comportant un trithiol et on attend toute une nuit. Pour éviter de détecter le signal Raman des simple brins thiolés, il convient de ne conserver que les billes d'or avec un seul brin thiolé. Après hybridation avec l'agrafe, ce brin n'aura pas de signature Raman (ou bien, elle sera très faible). Par la suite on effectue une électrophorèse sur gel d'agarose, les fragments d'ADN sont chargés négativement. Placés dans un champ électrique, ils vont se déplacer vers l'anode, mais leurs charges respectives étant à peu près équivalentes, c'est leur masse moléculaire qui va régler leur vitesse de déplacement à travers les mailles du gel dans lequel ils ont été placés. Plus les fragments sont petits, plus ils vont migrer rapidement et donc loin de leur point de départ.

Produit	Quantité	Concentration
Billes d'or 10nm	2.2µL	1.36µM
Trithiol(dilué 2 fois)	0.6µL	50µM
NaCl	1µL	1M
BSPP	1.5µL	90mM
Eau	7µL	

On mélange préalablement la solution de billes dans une solution de PEG (**polyéthylène glycol** : revêtement lubrifiant à la surface des billes d'or en solution aqueuse), le PEG prévient l'agrégation des nano-billes d'or dans le tampon utilisé pour les origamis. Ensuite on prépare le gel d'agorose à 2% avec la solution tampon TBE.

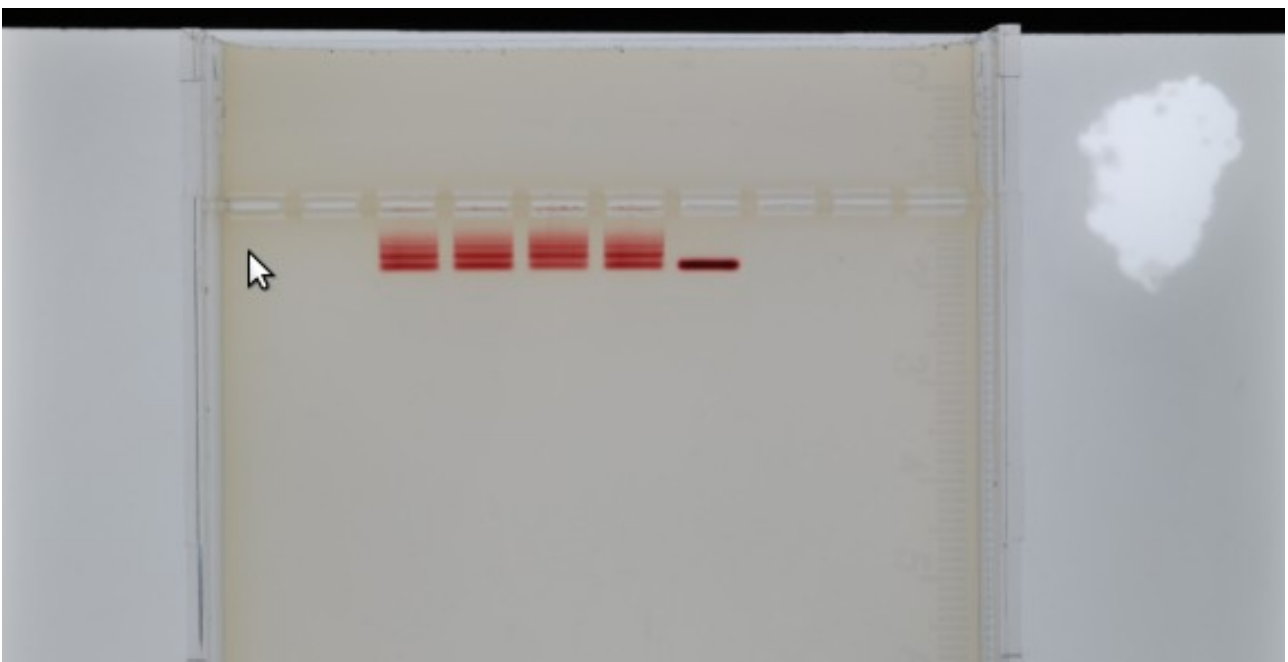


Figure 3 : Voici une image du résultat que nous aurions dû observer, mais nous n'y sommes pas arrivé, les 4 premières migrations sont des billes mélangées au brins et la dernière tout à droite correspond aux billes non mélangées aux brins.

On observe plusieurs bandes sur les migrations des billes mélangées aux brins, la bande la plus avancée correspond aux nano-billes seules et les autres bandes qui ont moins migrées sont les billes avec un ou plusieurs brins d'ADN comportant un trithiol.

Par la suite, on va ignorer cette étape de séparation des billes thiolées, et travailler avec un nombre quelconque de thiols.

3.D Protocole expérimental de fixation des nano-billes d'or comportant un brin d'ADN thiolé sur l'origami

Après avoir créé des nano-billes d'or fixées à un brin d'ADN thiolé, le but est maintenant d'accrocher cet ensemble à l'origami. Les agrafes de l'origami qui ont été rallongées vont maintenant accueillir le brin comportant la séquence complémentaire fixé sur la nano-billes d'or. On effectue alors une réaction d'hybridation, on chauffe le mélange jusqu'à une température de 40°C et on le refroidit lentement jusqu'à 20°C pendant 2 heures.

Produit	Quantité
Billes d'or avec trithiol	2.4µL
Origami	10µL

3.E Protocole expérimental de croissance des nano-billes d'or

Après avoir fixé les nano-billes d'or sur l'origami, on souhaite faire croître ces billes. Pour cela on mélange un agent de croissance acheté dans le commerce avec les origamis qui comportent les billes d'or. Cet agent de croissance est composé de trois produits différents que l'on mélange avant de les mettre avec les billes d'or : l'initiateur, l'agent de croissance et l'activateur.

On effectue le mélange suivant :

Produit	Quantité
Origamis avec billes d'or	3µL
Initiateur	2µL
Agent de croissance	2µL
Activateur	2µL

4 Résultats expérimentaux

Après avoir suivi les protocoles expérimentaux décrits auparavant, chaque échantillon a été étudié au microscope à force atomique (AFM). Le principe du microscope à force atomique est basé sur l'interaction avec une surface d'une pointe sonde, idéalement atomique, fixée à un micro-levier flexible. La pointe balaye la surface, et les forces d'interaction, proportionnelles à la déflexion, sont suivies par un système de détection de la déflexion du micro-levier. Un asservissement permet d'éloigner ou de rapprocher la surface de la pointe pour contrôler la force exercée par la pointe sur l'échantillon, et donc d'imager la topographie de la surface: il est possible de fonctionner avec des forces répulsives (contact) ou attractives (non-contact). Dans notre cas on utilise un mode appelé «peakforce» qui fonctionne avec des forces répulsives.

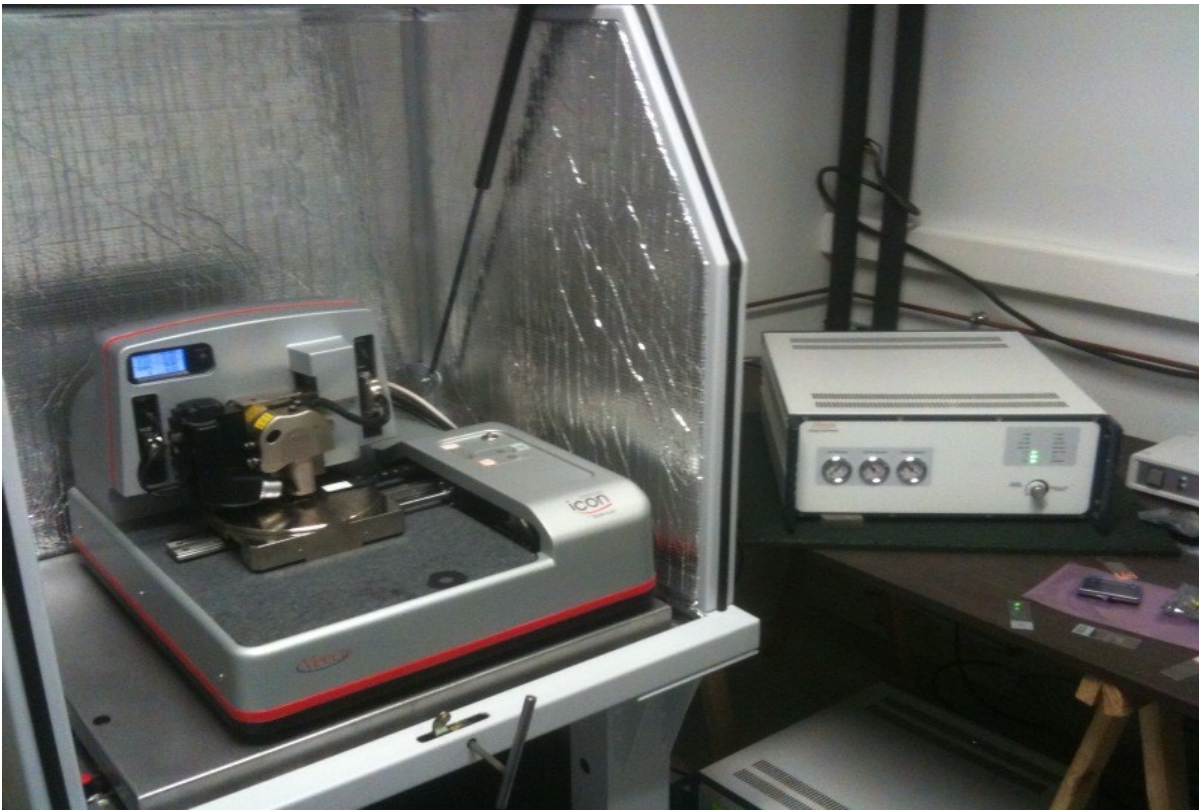
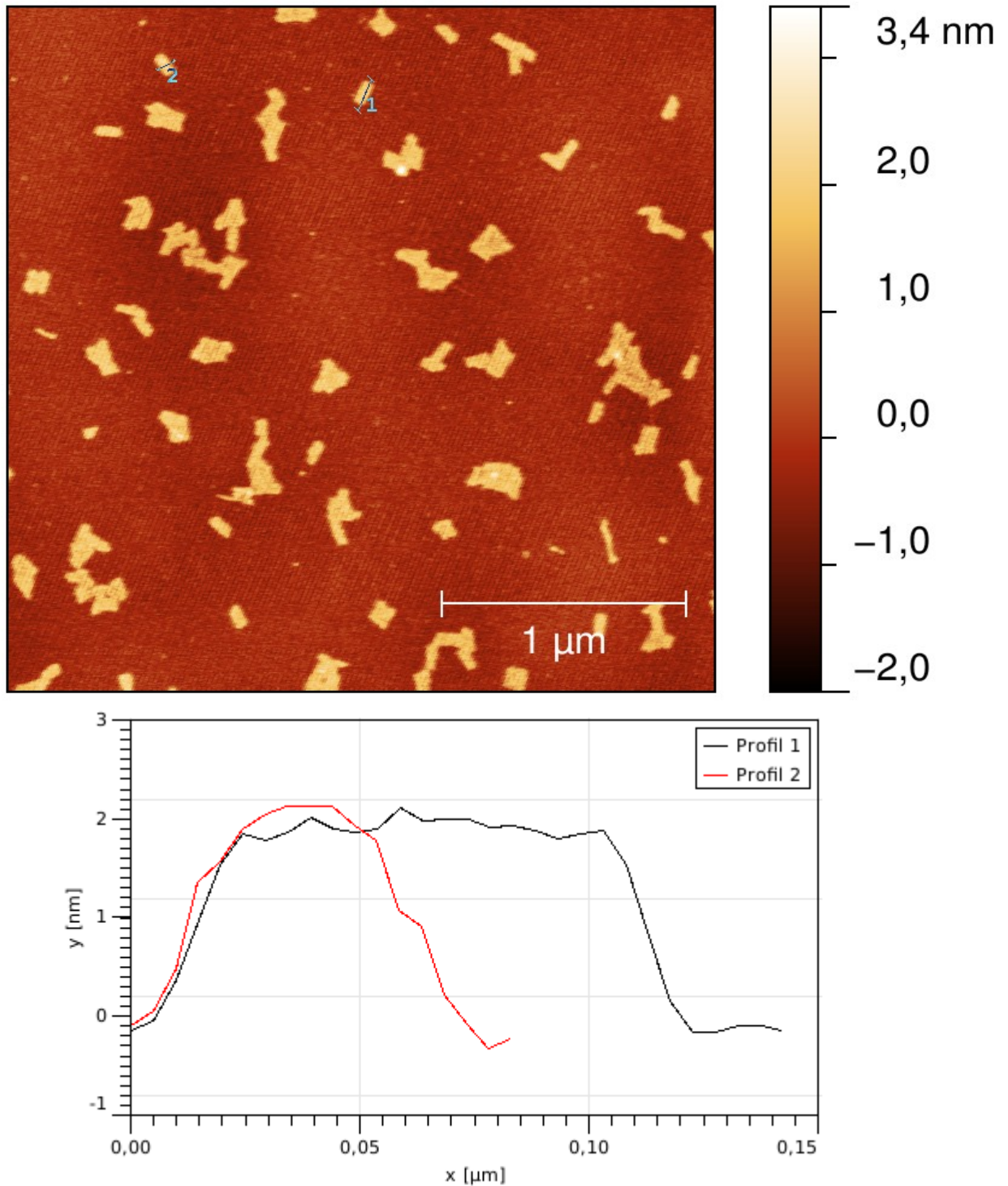


Photo de l'AFM utilisé pour l'analyse des différents échantillons

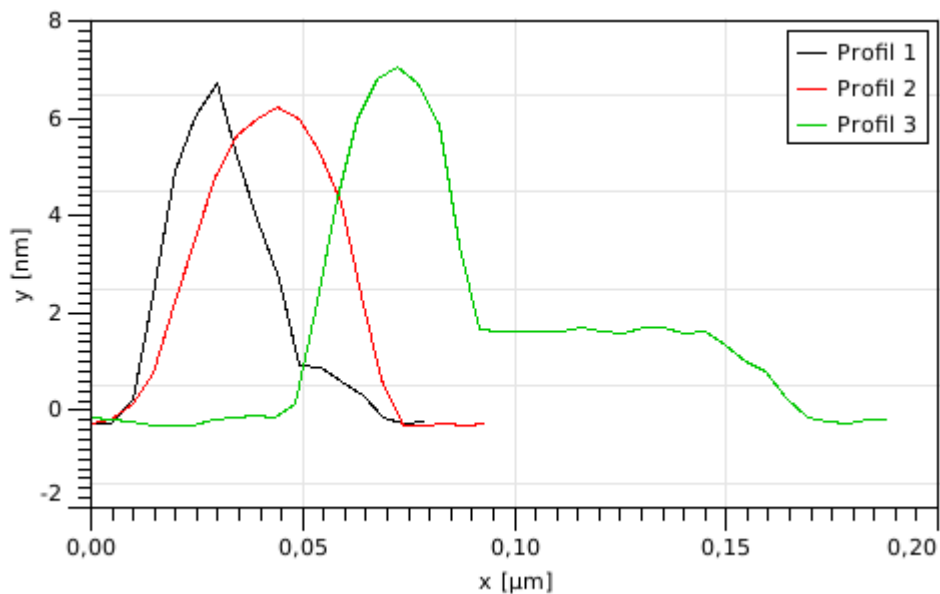
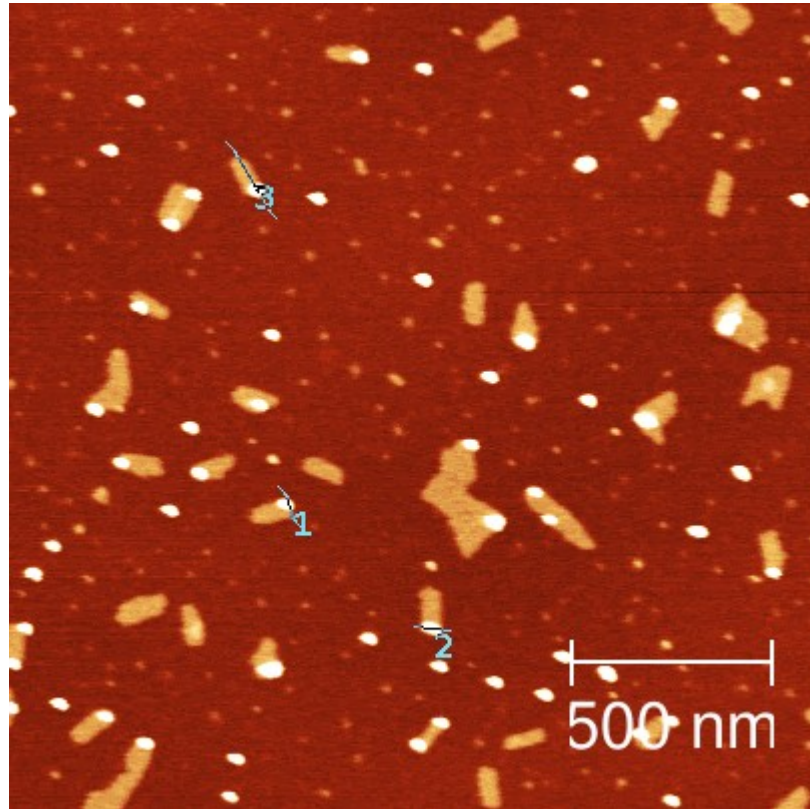
Tous les échantillons présentés ci-dessous ont été déposés sur des couches de mica après clivage de sa surface. Après le dépôt et plusieurs minutes d'attente, ils sont rincés avec le tampon TAE utilisé pour les origamis et puis séchés avec des essuyeurs de précision.

4.A Image AFM de formation d'origamis seuls



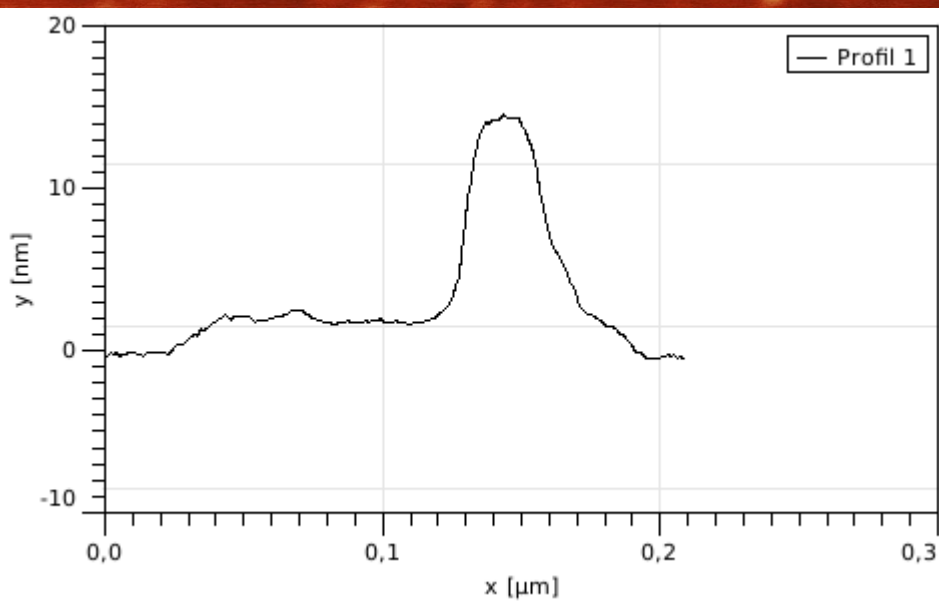
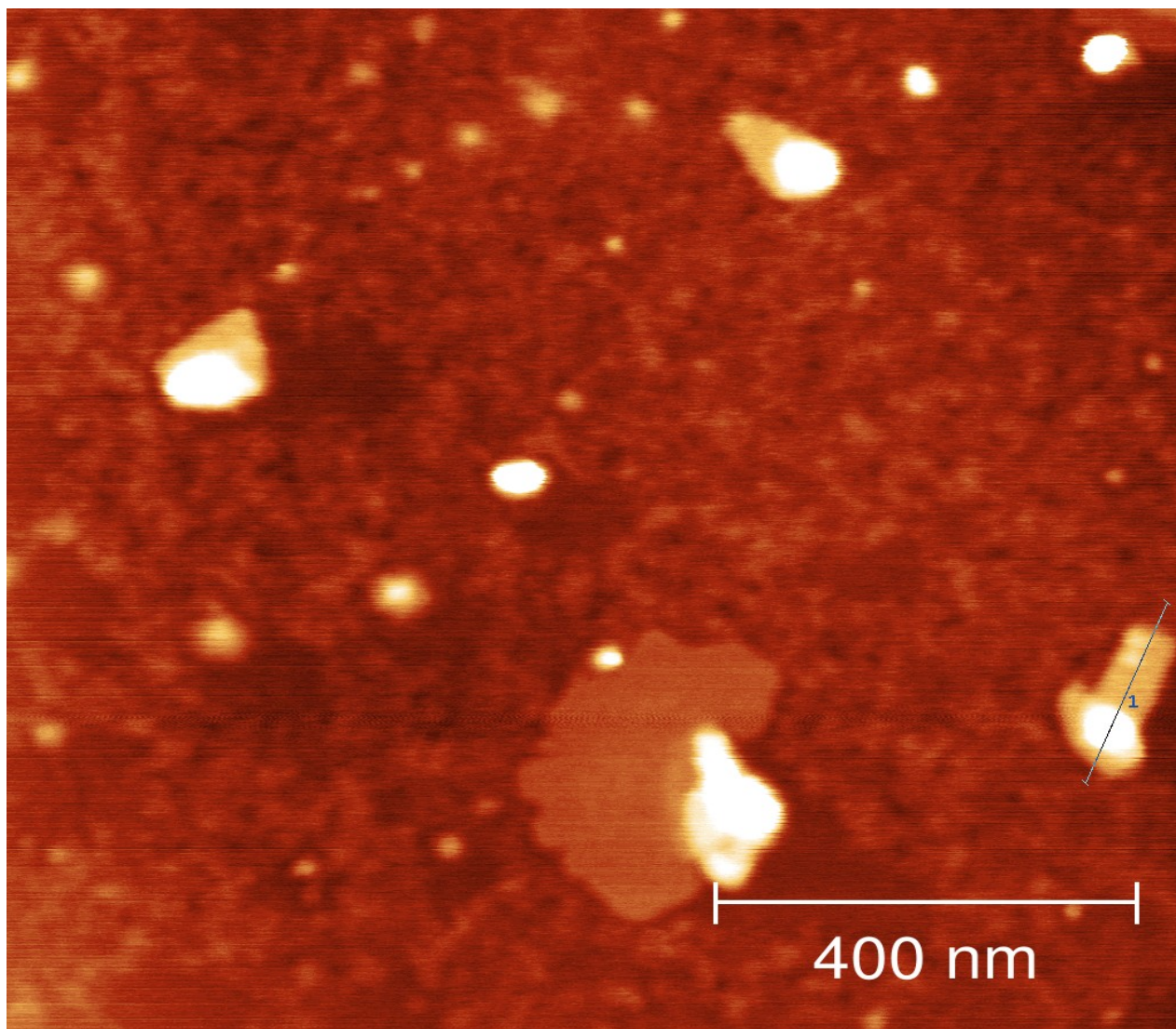
On observe sur cette image AFM la formation d'origami. Tous n'ont pas la forme attendue, cela peut être due à des pollutions dans l'échantillon ou bien aux conditions de dépôt, par exemple l'essuyage peut déformer certaines structures. On voit aussi plusieurs origamis fixés les uns aux autres. Les origamis bien formés sont les rectangles comme sur le profil 1 et 2 où l'on voit qu'ils mesurent bien 100nm de longueur sur 60 nm de largeur.

4.B Image AFM d'origamis fixés à des nano-billes d'or de 10nm



Sur cette image AFM on voit bien la fixation des nano-billes d'or sur les origamis, on observe aussi toujours plusieurs origamis fixés les uns aux autres. Par ailleurs les profils 1, 2 et 3 nous révèlent que le diamètre des nano-billes d'or est inférieurs à celui annoncé par le fabricant (10nm). Le taux de fixation des billes sur les origamis est d'environ 65 %. Sur le profil 2, on peut voir que la plateforme SERS recherchée constituée de deux billes est présente sur un des origamis.

4.C Image AFM d'origamis fixés à des nanobilles d'or après croissance



Il s'agit ici d'une image AFM d'origamis avec nano-billes d'or auxquels on a rajouté les agents de

croissance. On voit bien que la croissance a eu lieu, comme sur le profil 1 fait sur un des origamis, on voit que le diamètre après croissance est en moyenne de 15nm.

5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons vu dans ce rapport les étapes permettant de synthétiser un arrangement rectangulaire d'ADN, les origamis, sur lesquels on fixe des nano-billes d'or.

Nous avons décrit en particulier les étapes qui consistent à fixer les nano-billes d'or et à les faire croître. Quelques échantillons ont ensuite été caractérisés par AFM, faisant apparaître les origamis avec les billes et la croissance de celles-ci.

Du fait de la courte durée de ce stage, nous n'avons pu toutefois les utiliser ces échantillons pour effectuer une spectroscopie Raman envisagés au début de ce stage.

Au cours de ce stage nous avons réalisé la première étape qui consistait à former cette structure d'ADN et de billes d'or. A terme, ces structures pourraient être utilisées pour une détection SERS.

Pour espérer faire l'objet d'applications à grande échelle ces structures nécessitent une grande qualité et reproductibilité.

6 Bibliographie

- [1] D.Blasquez Sanchez, The surface Plasmon Resonance of Supported Noble Metal Nanoparticles : Characterisation, Laser Tailoring, and SERS Application, Dissertation, Universitat Kassel (2007).
- [2] Jeannette Nangreave, Dongran Han, Yan Liu, Hao Yan, DNA origami: a history and current perspective, Volume 14, Issue 5, October 2010, Pages 608–615, Nanotechnology and Miniaturization/Mechanisms.
- Thèse, Fluorescence et Diffusion Raman exaltée de surface (SERS) de molécules individuelles, Carine Julien.
- Paul W. K. Rothmund, Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns, *Nature* **440**, 297-302 (16 March 2006).
- S. Bidault, Local enhanced fields in DNA templated gold nanoparticle groupings, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130 (9), pp 2750–2751.