

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ASSEMBLAGE DE MONOCOUCHE DES GLYCODENDRIMÈRES  
SUR L'OR ET SUR DES NANOPARTICULES D'OR : DÉTECTION  
DE LECTINES ET BACTÉRIES

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR  
MILENA BOZOUKOVA

AOÛT 2006

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche Pr. Mario Morin pour son aide, sa grande disponibilité et son support. Je remercie également Dr. Charles Dozois d'INRS-Santé pour la souche d'*Escherichia coli* et D. Flipo pour les mesures de la microscopie confocale.

Un merci à toute l'équipe : Christelle Médard, Fabrice Courtel, Catherine Pilon et particulièrement à Nicoleta Bogdan pour son aide et assistance tout au long du projet.

Je voudrais remercier aussi ma famille spécialement, mon mari adoré Georgi Lazarov pour sa compréhension et son support moral.

# TABLE DES MATIÈRES

LISTE DE FIGURES.....	viii
LISTE DE TABLEAUX.....	xii
LISTE D'ABRÉVIATIONS.....	xiii
LISTE DES SYMBOLES.....	xv
RÉSUMÉ.....	xvi

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

1.1. Introduction.....	1
1.2. Revue de la littérature et problématique.....	1
1.3. Objectifs.....	9
1.4. Méthodologie.....	10
1.5. Plan du mémoire.....	10
1.6. Références.....	11

## CHAPITRE II

### MÉTHODES ET MATÉRIEL

2.1 Introduction.....	16
2.2 Contenu du chapitre.....	18
2.3 Produits chimiques.....	19
2.4. Synthèse.....	20
2.4.1. Synthèse de Au-PAMAM(G <sub>0</sub> ).....	20
2.4.2. Synthèse p-Isothiocyanate phényle β-D-galactopyranoside et de p-Isothiocyanate phényle α-D mannopyranoside.....	22
2.4.3. Synthèse Au-PAMAM(G <sub>0</sub> )-galactose (mannose).....	23
2.4.4. Synthèse de Au-PAMAM(G <sub>0</sub> )-mannose-FITC proportion de mannose : FITC 99 :1.....	25

2.4.5 Synthèse de Au-PAMAM( $G_0$ )-galactose-TRITC, proportion galactose :TRITC de 99:1.....	26
2.4.6. Synthèse de Au-PAMAM( $G_0$ )-galactose-TRITC, proportion galactose : TRITC 99.5 : 0.5.....	26
2.4.7. Synthèse de PAMAM( $G_0$ )-mannose sur un monocristal d'or(111).....	26
2.4.8. Synthèse de PAMAM(SH).....	27
2.5 Caractérisation des nanoparticules et tests d'affinité.....	28
2.5.1. IR.....	28
2.5.2. UV-visible.....	28
2.5.3. Analyse thermogravimétrique (TGA).....	28
2.5.4. Quantification des amines primaires par l'acide 2,4,6-trinitrobenzène-1- sulfonique (TNBS).....	29
2.5.5. Titrage en retour – détermination du pKa des amines terminales.....	30
2.5.6. Taille de particules d'or recouvertes de dendrimères.....	31
2.5.7. Potentiel zeta.....	32
2.5.8. Fluorescence.....	32
2.5.8.1. Atténuation de la fluorescence de Con A-fluorescéine par les nanoparticules d'or.....	33
2.5.8.2 Atténuation de la fluorescence de Con A-TMR par les nanoparticules d'or...34	
2.5.8.3. Mesure de la fluorescence de Au-PAMAM( $G_0$ )-mannose-FITC (99:1).....	34
2.5.8.4. Préparation des échantillons de ConA et Au-PAMAM( $G_0$ )-mannose-FITC (99:1).....	34
2.5.9 Immunoprécipitation.....	34
2.5.9.1 Immunoprécipitation de Con A (Con A- fluorophore) par Au-PAMAM-mannose.....	34
2.5.9.2 Immunoprécipitation de Con A par Au-PAMAM-mannose-fluorophore.....	35
2.5.10. Modélisation moléculaire.....	35
2.5.11. Microscopie confocale.....	36
2.5.12. Préparation des échantillons de bactérie E. coli.....	36
2.5.13. Préparation des échantillons de bactéries et particules d'or sur des plaques de verre.....	36

2.5.14. Préparation de bouillon de culture (LB Broth).....	37
2.5.15. Préparation de gel de bouillon de culture (LB Agar).....	37
2.6. Electrochimie.....	38
2.6.1. Cellule électrochimique et électrodes.....	38
2.6.2. Voltampérométrie cyclique.....	40
2.6.3. Dépôt oxydative de PAMAM ou PAMAM(SH) sur Au(111).....	40
2.6.4. Spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE).....	40
2.6.5. Microbalance de cristal de quartz (QCM).....	41
2.6.6. Dépôt chrono-ampérométrique de PAMAM.....	43
2.7. Références.....	43

### CHAPITRE III

#### CARACTÉRISATION DE NANOPARTICULES D'OR RÉCOUVERTES DES DENDRIMÈRES

3.1. Introduction.....	45
3.2. Résultats et discussion.....	46
3.2.1. Caractérisation.....	46
3.2.1.1 Spectroscopie infrarouge.....	46
3.2.1.2 Analyse thermogravimétrique.....	47
3.2.1.3 Quantification des amines primaires.....	48
3.2.1.4 Spectroscopie UV-Visible.....	48
3.2.1.5 Détermination du pKa des amines terminales.....	50
3.2.2. Agrégation de particules d'or recouvertes de dendrimères.....	51
3.2.2.1 Diamètre moyen du PAMAM (Go) par rapport au pH.....	51
3.2.2.2 Diamètre moyen de l'Au-PAMAM (Go) en fonction du pH.....	52
3.2.2.3 Diamètre moyen de l'Au-PAMAM (Go) par rapport à la force ionique au pH 12.....	54
3.2.2.4 Diamètre moyen de l'Au-PAMAM (Go) par rapport à la force ionique au pH 2,7.....	55
3.2.2.5 Mesure du potentiel zeta.....	56

3.3. Conclusion.....	57
3.4. Références.....	58

## CHAPITRE IV

### NANOPARTICULES RECOUVERTES DE GLYCODENDRIMÈRES

4.1. Introduction.....	60
4.2. Résultats et discussion.....	62
4.2.1. Immunoprécipitation .....	62
4.2.2. Atténuation de la fluorescence par les nanoparticules d'or .....	63
4.2.2.1 Atténuation de la fluorescence de Con A-fluorescéine par les nanoparticules d'or.....	63
4.2.2.2 Atténuation de la fluorescence de Con A-TMR par les nanoparticules d'or.....	68
4.3. Conclusion.....	69
4.4. Références.....	70

## CHAPITRE V

### MODÉLISATION MOLÉCULAIRE DE DENDRIMÈRES DE POLY(AMIDO AMINES)

5.1. Introduction.....	71
5.2. Résultats.....	72
5.2.1. PAMAM( $G_0$ ).....	73
5.2.2. PAMAM( $G_0$ )-mannose.....	74
5.2.3 PAMAM( $G_0$ )-mannose-FTIC.....	75
5.3. Discussion.....	76
5.3.1. Dimension des trois structures.....	76
5.3.2. Spectroscopie infrarouge.....	77
5.4. Conclusion.....	78
5.5. Références.....	79

## CHAPITRE VI

## NANOPARTICULES FLUORESCENTES UTILISÉES COMME BIOCAPTEUR

6.1. Introduction.....	80
6.2. Résultats et discussion.....	81
6.2.1. Caractérisation de Au-PAMAM-mannose-FITC (99:1).....	81
6.2.2. Détection de la bactérie E. coli à l'aide de Au-PAMAM-mannose-FITC.....	83
6.2.3. Détection de Con A en suspension à l'aide de Au-PAMAM-mannose-FITC.....	86
6.3. Conclusion.....	88
6.4. Références.....	89

## CHAPITRE VII

ÉLECTRO - ASSEMBLAGE DE MONOCOUCHE DES DENDRIMÈRES MODIFIÉS  
AVEC DES SUCRES SUR LA SURFACE D'UN MONOCRISTAL D'OR (111) POUR LA  
DÉTECTION DES LECTINES

7.1. Introduction.....	91
7.2. Résultats et discussion.....	93
7.3. Conclusion.....	103
7.4. Références.....	104

## CHAPITRE VIII

## MICROBALANCE À CRISTAL DE QUARTZ POUR LA DÉTECTION DE LECTINES

8.1. Introduction.....	106
8.2. Résultats et discussion.....	107
8.3. Conclusion.....	111
8.4. Références.....	112

## CHAPITRE IX

CONCLUSION.....	114
-----------------	-----

## LISTE DE FIGURES

Figure	Page
1.1. Méthodes divergente (a) et convergente (b) de construction de dendrimère. (Copié par Kajnert, 2001).....	3
2.1. Synthèse de poly(amido amine).....	17
2.2. Synthèse de nanoparticules d'or recouvertes de PAMAM.....	21
2.3. Synthèse de <i>p</i> -Isothiocyanat phényle $\alpha$ -D mannopyranoside.....	22
2.4. Synthèse de Au-PAMAM(G <sub>0</sub> )-mannose.....	24
2.5. Synthèse de Au-PAMAM(G <sub>0</sub> )-mannose-FITC(99 :1).....	25
2.6. Synthèse de PAMAM(SH) à partir de PAMAM.....	27
2.7. Quantification des amines primaires par réaction avec le TNBS.....	29
2.8. Courbe d'étalonnage pour la quantification des amines primaires.....	30
2.9. Titrage en retour pour la détermination du pKa des amines terminales.....	30
2.10. Photo de la cellule électrochimique à trois électrodes utilisée pour effectuer les mesures électrochimiques.....	39
2.11. Voltampérogramme cyclique du monocristal d'or(111) dans KOH 0.1 M, vitesse de balayage de 20 mV s <sup>-1</sup> .....	39
2.12. Microbalance de cristal de quartz (QCM922) reliée à une cellule de trois électrodes. Copié de Princeton Applied Research, <a href="http://www.princetonappliedresearch.com">www.princetonappliedresearch.com</a> .....	42
3.1. Spectre infrarouge de l'Au-PAMAM.....	47
3.2. Analyse thermogravimétrique (TGA).....	48
3.3. Spectre UV-visible de l'Au-PAMAM.....	49
3.4. Courbe de titrage en retour de l'Au-PAMAM.....	50
3.5. Diamètre moyen du PAMAM par rapport au pH.....	52

3.6	Diamètre moyen de l'Au-PAMAM par rapport au pH.....	53
3.7	Exemple de distribution de taille de l'Au-PAMAM obtenue par l'option MSD.....	53
3.8.	Diamètre moyen de l'Au-PAMAM par rapport à la force ionique au pH 12.....	55
3.9.	Diamètre moyen de l'Au-PAMAM par rapport à la force ionique au pH 2,7.....	56
4.1	Atténuation de la fluorescence de Con A-fluorophore par l'Au-PAMAM-mannose .....	61
4.2.	Fluorescence à 523 nm, mesurée pendant 6 jours d'une solution de Au-PAMAM- mannose : Con A-fluorescéine en proportion 2 :1 qui a été conservée à une température de (a) 4°C ou (b) 25°C; excitation à 494 nm, résolution de 4 nm, concentration de Con A-fluorescéine dans la solution est de 16.7 µg/ml.....	64
4.3.	Mesure de la fluorescence à 523 nm pendant 2 heures (a) d'une solution de Au- PAMAM-mannose : Con A-fluorescéine en proportion 2 :1 et (b) de la référence Con A-fluorescéine à une température de 25°C; excitation à 494 nm, résolution de 5 nm. La concentration de Con A-fluorescéine dans les solutions est de 2.5 µg/ml.....	65
4.4.	Mesure de la fluorescence à 523 nm pendant 2 heures (a) d'une solution de Au- PAMAM-mannose : Con A-fluorescéine en proportion 2 :1 et (b) de la référence Con A-fluorescéine à une température de 4°C; excitation à 494 nm, résolution de 5 nm. La concentration de Con A-fluorescéine est de 2.5 µg/ml.....	66
4.5.	Mesure de la fluorescence à 523 nm (a) d'une solution de Au-PAMAM-mannose : Con A-fluorescéine en proportion 5 :1 et (b) de la référence Con A-fluorescéine à 4°C; excitation à 494 nm, résolution de 5 nm. La concentration de Con A-fluorescéine est de 12.5 µg/ml.....	67
5.1.	Structure du PAMAM( $G_0$ ) après la minimisation de l'énergie par la méthode semi- empirique MOPAC-PM3.....	73
5.2.	Structure du PAMAM( $G_0$ ) dans l'eau après la minimisation de l'énergie par la méthode semi- empirique MOPAC-PM3.....	73
5.3.	Structure du PAMAM( $G_0$ )-mannose après la minimisation de l'énergie par la méthode semi- empirique MOPAC-PM3.....	74
5.4.	Structure du PAMAM( $G_0$ )-mannose dans l'eau après la minimisation de l'énergie par la méthode semi- empirique MOPAC-PM3.....	74

5.5.	Structure du PAMAM( $G_0$ )-mannose-FITC après la minimisation de l'énergie par la méthode semi- empirique MOPAC-PM3.....	75
5.6.	Structure du PAMAM( $G_0$ )-mannose-FITC dans l'eau après la minimisation de l'énergie par la méthode semi- empirique MOPAC-PM3.....	75
6.1.	Spectre (a) d'excitation et (b) d'émission de l'Au-PAMAM-mannose-FITC (99:1), concentration 0.1 mg/ml dans le PBS.....	82
6.2.	Spectre d'émission (a) d'Au-PAMAM-mannose-FITC (99:1), concentration 0.1 mg/ml dans PBS et (b) d'Au-PAMAM-mannose-FITC (99:1) 0.1 mg/ml + Con A...83	83
6.3.	CSLM, détection par réflectance, de l'Au-PAMAM-mannose-FITC + E. coli.....	84
6.4.	CSLM, détection par fluorescence, de l'Au-PAMAM-mannose-FITC + E. coli.....	84
6.5.	CSLM, détection par fluorescence, de l'Au-PAMAM-galactose-TRITC + E. coli.....	85
6.6.	CSLM, détection par réflectance, de l'Au-PAMAM-galactose-TRITC + E. coli.....	86
6.7.	Détection de Con A (0,5 mg/ml) en suspension à l'aide de l'Au-PAMAM -mannose-FITC (0,075 mg/ml), excitation à 494 nm, résolution de 5 nm.....	87
6.8.	Détection de E. coli en suspension à l'aide de l'Au-PAMAM-mannose-FITC, excitation à 494 nm, résolution de 5 nm.....	88
7.1.	Les voltampérogrammes cycliques du PAMAM-SH déposé sur un monocristal d'or(111) dans KOH 0.1 M et une vitesse de balayage de 20 mV/s, concentrations du PAMAM de (a) $2 \times 10^{-5}$ M, (b) $4.3 \times 10^{-5}$ M, (c) $2 \times 10^{-4}$ M, (d) $2 \times 10^{-3}$ M.....	94
7.2.	Taux de recouvrement en fonction du temps de déposition du PAMAM. Potentiel de la déposition potentiostatiques de $-0.5V$ , vitesse de 20 mV/s, concentration du PAMAM-S <sup>-</sup> de $2 \times 10^{-5}$ M dans KOH 0.1 M.....	98
7.3.	Taux de recouvrement en fonction du temps de déposition du PAMAM-SH. Potentiel de la déposition potentiostatiques de $-0.5V$ , vitesse de 20 mV/s, concentration du PAMAM-S <sup>-</sup> de $2 \times 10^{-5}$ M dans KOH 0.1 M.....	98
7.4.	Détection de Con A. Capacité mesurée à $-0.4 V$ vs référence (SCE) dans le PBS (pH = 7,4) à la température de la pièce. Fréquence de 20 Hz, amplitude de 10 mV, vitesse de 5 mV/s.....	100

7.5	Détection de Con A. Résistance mesurée à -0.4 V vs référence (SCE) dans le PBS (pH = 7,4) à la température de la pièce. Fréquence de 20 Hz, amplitude de 10 mV, vitesse de 5 mV/s.....	100
7.6	Essai avec TV. Capacité mesurée à -0.4 V vs référence (SCE) dans le PBS (pH = 7,4) à la température de la pièce. Fréquence de 20 Hz, amplitude de 10 mV, vitesse de 5 mV/s.....	101
7.7	Essai avec TV. Résistance mesurée à -0.4 V vs référence (SCE) dans le PBS (pH = 7,4) à la température de la pièce. Fréquence de 20 Hz, amplitude de 10 mV, vitesse de 5 mV/s.....	101
7.8	Test sur l'Au (111) non modifié. Capacité mesurée à -0.4 V vs référence (SCE) dans le PBS (pH = 7,4) à la température de la pièce. Fréquence de 20 Hz, amplitude de 10 mV, vitesse de 5 mV/s.....	102
7.9	Test sur l'Au (111) non modifié. Résistance mesurée à -0.4 V vs référence (SCE) dans le PBS (pH = 7,4) à la température de la pièce. Fréquence de 20 Hz, amplitude de 10 mV, vitesse de 5 mV/s.....	103
8.1.	Voltampérogramme cyclique correspondant à la déposition oxydative et la désorption réductive du PAMAM $2 \times 10^{-5}$ M dans le KOH 0,5 M; Vitesse de balayage de 20 mV/s.....	108
8.2.	Changement de la fréquence, converti en masse au cours de la déposition oxydative, désorption réductive du PAMAM $2 \times 10^{-5}$ M dans le KOH 0,5 M; vitesse de balayage de 20 mV/s.....	109
8.3.	Changement de la fréquence converti en masse au cours de la déposition chrono-ampérométrique de PAMAM $2 \times 10^{-5}$ M dans le KOH 0,5 M; $E_1 = -1,3$ V vs ECS de 0 à 300 s; $E_2 = -0,5$ V vs ECS de 300 à 600 s.....	110
8.4.	Changement de la fréquence converti en masse au cours de la détection de (a) Con A et (b) WGA ( $0,8 \text{ mg ml}^{-1}$ ) dans le PBS.....	111

## LISTE DE TABLEAUX

Tableau	Page
3.1. Potentiel zeta de l'Au-PAMAM.....	57
4.1. Atténuation de la fluorescence de fluorescéine par l'Au-PAMAM-mannose. Longueur d'onde d'excitation 494 nm, émission à 523 nm, température 4°C.....	68
5.1. Comparaison entre les dimensions des trois structures : PAMAM (G <sub>0</sub> ), PAMAM (G <sub>0</sub> )-mannose, PAMAM (G <sub>0</sub> )-mannose-FITC, calculées avec la méthode semi-empirique MOPAC en utilisant des paramètres PM3.....	77
5.2. Comparaison entre les spectres vibrationnels du PAMAM (G <sub>0</sub> ), PAMAM (G <sub>0</sub> )-mannose, PAMAM (G <sub>0</sub> )-mannose-FITC.....	78

## LISTE D'ABRÉVIATION

Au(111)	Monocristal d'or ayant une orientation (111) de la surface
Au-G <sub>0</sub> , Au-PAMAM(G <sub>0</sub> )	Nanoparticule d'or recouvertes dans poly(amido amine) de génération 0
Con A	Concanavalin A, extrait de <i>Canavalia ensiformis</i>
CV V	Voltampérogramme cyclique
CSLM	Confocal Scanning Light Microscopy
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECS	Électrode de calomel saturé
EQCM	Microbalance électrochimique de cristal de quartz
FITC	Fluorescéine-5(6)-isothiocyanate
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier
G <sub>0</sub>	Poly(amido amine) génération 0
G <sub>1</sub>	Poly(amido amine) génération 1
G <sub>2</sub>	Poly(amido amine) génération 2
PAMAM	Poly(amido amine) avec un coeur de cystamine
PAMAM(SH)	½ PAMAM modifié en thiol
PBS P	Phosphate buffered saline
QCM	Microbalance de cristal de quartz
SIE	Spectroscopie d'impédance électrochimique
TMR (TMRITC)	Tetraméthylrhodamine isothiocyanate
TNBS	2,4,6-trinitrobenzène-1- acide sulfonique
WGA	Agglutinine de germe de blé de <i>Triticum vulgaris</i>

UV-Vis	Ultraviolet – Visible
IR	Infrarouge
TGA	Analyse thermogravimétrique
MSD	Multimodal Size Distribution

## LISTE DES SYMBOLES

A	Surface active ( $\text{cm}^2$ )
A	Absorbance
R	Résistance (en Ohm ( $\Omega$ ))
C	Capacité (en Farad (F))
$\Gamma$	Taux de recouvrement (en $\text{mol}/\text{cm}^2$ )
E	Potentiel (en Volt (V))
Q	Charge (en Coulomb (c))
f	Fréquence de résonance du cristal de quartz en Hz
$f_0$	Fréquence du cristal de quartz avant le changement de la masse
F	Constant de Faraday ( $96\,485\text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
T	Température (en Kelvin (K))
I	Intensité
m	Masse (en gramme (g))
t	Temps (en secondes (s))
d	Distance entre deux atomes (en Angstrom ( $\text{Å}$ ))
$\rho_q$	Densité du cristal

## RÉSUMÉ

L'affinité entre les sucres et les cellules, protéines et bactéries est utilisée dans le développement de biocapteurs pour différentes maladies telle que la fibrose kystique. Dans cette étude un biocapteur plurifonctionnel est réalisé en combinant des dendrimères et des nanoparticules d'or ou surface d'or. Ce biocapteur a été utilisé pour la reconnaissance spécifique de la lectine Con A et de la bactérie *E. coli* qui a des récepteurs pour le mannose.

La synthèse consiste en l'adsorption de dendrimères de poly(amido amine) (PAMAM) ayant un cœur de cystamine à la surface des nanoparticules d'or. Ensuite, les amines terminales des dendrimères sont modifiées avec des sucres (mannose ou galactose) et des molécules fluorescentes (fluorescéine ou tétraméthylrhodamine). La caractérisation par IR, UV-Vis et TGA a été effectuée pour confirmer la composition des dendrimères et pour déduire la taille des nanoparticules d'or inférieure à 2 nm. La dispersion angulaire de la lumière a été utilisée pour mesurer l'aggrégation des particules en milieu aqueux. Il a été vu que l'agglomération de poly(amido amines) est 2 à 4 fois plus importante de l'agglomération des nanoparticules d'or recouvertes de poly(amido amines).

Les nanoparticules plurifonctionnelles Au-PAMAM-mannose-fluorescéine synthétisées dans cette étude ont permis la détection de la bactérie *E. coli* par microscopie confocale. Les particules modifiées avec du mannose forment avec les bactéries des agglomérats fluorescents. La reconnaissance de la lectine Concanavaleine A a aussi été possible. Peu après le mélange de Au-PAMAM-mannose-fluorescéine avec cette lectine, des complexes insolubles colorés et fluorescents sont formés. La réversibilité de cette interaction a été démontrée en additionnant des excès de D-mannose qui dissout le précipité. Par contre, les particules modifiées avec du galactose ne reconnaissent ni les bactéries *E. coli*, ni Con A, ce qui démontre la spécificité du biocapteur.

Dans une deuxième approche, l'adsorption oxydative des dendrimères sur un monocristal d'or (111) est effectuée. Les amines terminales sont modifiées avec du mannose et la détection spécifique de Con A est démontrée en utilisant la spectroscopie d'impédance électrochimique. La capacité diminue et la résistance augmente après que le monocristal modifié avec le PAMAM et mannose soit immergé dans une solution 0,1 M de Con A. La réversibilité de la réaction entre le mannose et Con A est utilisée ici pour déplacer la lectine de la surface du capteur et le rendre réutilisable.

Le dernier travail porte sur l'utilisation de la microbalance de quartz dans le but d'augmenter la sensibilité du biocapteur en détectant le changement de masse suite à l'adsorption de protéines sur la surface modifiée. Cette méthode a permis la détection de Con A et WGA (agglutinine de germe de blé de *Triticum vulgare*).

Mots-clés : biocapteur, dendrimères, PAMAM, nanoparticules d'or, *E. coli*, lectines

# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

### 1.1 Introduction

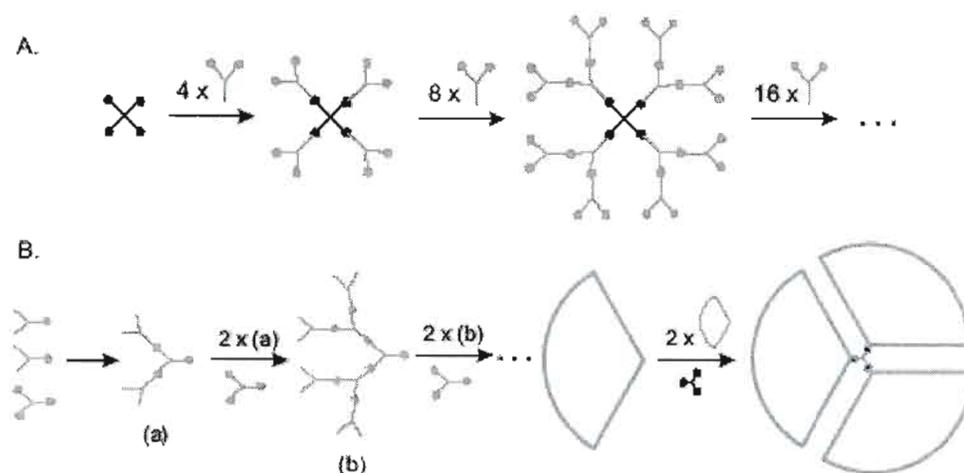
Ce mémoire décrit la synthèse d'un biocapteur en adsorbant des glycodendrimères sur des nanoparticules d'or ou sur des surfaces d'or et la détection de lectines et bactéries par fluorescence, électrochimie et microbalance de quartz. Dans ce premier chapitre une revue de la littérature sur la synthèse et l'utilisation des dendrimères est présentée. Des nanoparticules ou des surfaces métalliques sur lesquelles de monocouches multifonctionnalisées sont déposées, ainsi que leur utilisation pour la détection de lectines et bactéries sont également présentées. Par la suite, la problématique, les objectifs, la méthodologie et la structure du mémoire sont détaillés.

### 1.2 Revue de la littérature et problématique

Le combat des infections causées par les bactéries et les virus, surtout quand ils sont résistants aux médicaments constitue un défi. La compréhension des processus d'interaction avec les cellules sert à trouver des outils de ce combat. Par exemple, les bactéries disposent des récepteurs capables de reconnaître certains sucres se trouvant à la surface de la paroi cellulaire. Une fois accrochée sur la surface, la bactérie perce la membrane et infecte la cellule. Le travail actuel porte sur le développement des nanobiocapteurs qui imitent les glycoprotéines se trouvant sur les parois cellulaires afin de capter les bactéries. Il faut que la bactérie préfère se lier plus tôt avec le biocapteur qu'avec la cellule. Une stratégie utilisée

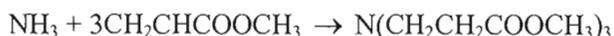
consiste à recouvrir la surface du biocapteur avec des sucres afin d'obtenir une concentration plus élevée que sur la cellule. Il est aussi essentiel que le biocapteur soit soluble dans le milieu naturel où les bactéries et les cellules existent. Des méthodes éprouvées telle que la fluorescence peuvent être utilisées pour la détection. Les dendrimères permettent une augmentation de la concentration des sucres à la surface du capteur et pour cette raison ils sont utilisés dans cette étude.

Les dendrimères sont une nouvelle classe de molécules multivalentes ayant des structures bien définies. Ils ont été développés par Donald Tomalia et ses coéquipiers (1985) et son nom provient du mot "dendron" qui signifie arbre en grec. Ces macromolécules, constituées de monomères associés autour d'un cœur central, possèdent une structure ramifiée qui détermine leurs propriétés particulières (Tomalia, 1993; Dvoriac et Tomalia, 1996; Tomalia et al, 1986, 1987, 1990, 2000; Tomalia et Fréchet, 2002). Elles sont généralement préparées en utilisant deux méthodes dites divergente ou convergente. Dans la méthode divergente, la molécule croît du centre vers l'extérieur (Tomalia, 1993; Tomalia et al, 1986, 1987, 1990, 2000). La construction arborescente s'effectue par la répétition d'une même séquence de réactions jusqu'à l'obtention à la fin de chaque cycle réactionnel d'une nouvelle génération (G) et d'un nombre croissant de branches identiques (Ramzi, 2002). Dans la méthode convergente les branches sont d'abord synthétisées et après attachées à la molécule centrale qui est multifonctionnelle (Hawker et Fréchet, 1990; Miller et Neenan, 1990; Miller et al, 1992; Wooley et al, 1991; Simanek et al, 2002). Les deux méthodes sont présentées sur la figure 1.1. La méthode convergente présente quelques avantages comme une purification facile et peu de défauts structuraux.



**Figure 1.1** Méthode divergente (A) et convergente (B) de construction de dendrimère (Copié de Kajnert, 2001).

Le dendrimère de poly(amido amine) (PAMAM) a été parmi les premières structures synthétisées (Tomalia et al, 1985, 1990). L'ammoniaque est utilisée comme molécule centrale à laquelle est attaché l'acrylate de méthyle par une addition de Michael. Ensuite l'amidation avec éthylène diamine est faite :



À la fin de chaque branche il y a un groupe amine qui peut réagir avec deux monomères d'acrylate de méthyle puis avec deux molécules d'éthylène diamine. À la fin de chaque réaction complète, on a une nouvelle génération. Après quelques générations, le dendrimère prend généralement une forme sphérique, hautement ramifiée et plurifonctionnalisée grâce aux nombreuses fonctions amines terminales présentes en périphérie. Sa dimension augmente linéairement et le nombre de groupes fonctionnels à la surface augmente de  $2^n$  avec la génération. La présence de nombreux groupes fonctionnels en périphérie est responsable de la grande réactivité et de la solubilité des dendrimères. La solubilité est influencée par la nature de ces groupes. Les dendrimères PAMAM terminés par des groupes hydrophiles sont

solubles dans des solvants polaires comme l'eau. Entre les branches, proche du cœur central on trouve des cavités internes disponibles pour insérer des molécules hydrophobes (Watkins et al, 1997).

Les applications potentielles des dendrimères sont basées sur l'uniformité moléculaire, la multifonctionnalité de la surface et la présence de cavités internes. Les dendrimères qui ont une construction similaire à celle des protéines peuvent interagir avec les systèmes biologiques et être utilisées pour diagnostiquer certaines maladies.

L'effet d'un médicament est relié à sa solubilité dans l'environnement aqueux du corps humain. Il y a beaucoup de médicaments avec une forte activité thérapeutique qui ne peuvent pas être utilisés à cause de leur insolubilité. L'utilisation de dendrimères solubles dans l'eau pourrait permettre le transport de médicament. Le médicament peut être attaché à la surface du dendrimère ou bien capté dans la cavité interne.

Une grande partie des médicaments sont fortement toxiques. Les dendrimères peuvent être utilisés pour envelopper et protéger ces médicaments, ainsi que pour leur livraison jusqu'à une cible spécifique dans le corps humain. Par exemple le 5-Fluorouracil (5FU) est bien connu comme agent anti-cancérigène mais il est toxique. Le PAMAM après acétylation peut se lier avec 5FU pour former un dendrimère-5FU (Zhuo, Du, et Lu, 1999). Le dendrimère est soluble dans l'eau et l'hydrolyse du dendrimère-5FU libère lentement le 5FU en réduisant de telle façon sa toxicité.

Les dendrimères PAMAM ont été aussi testés comme livreur de matériel génétique (Beilinska et al, 1996; Kukowska – Latallo et al, 2000) grâce aux groupes amines terminaux qui réagissent avec les groupements phosphate des acides nucléiques. La combinaison de leur grande surface et leur solubilité fait que les dendrimères sont aussi utiles en catalyse (Haensler et Szoka, 1993).

Vu leur large domaine d'utilisation, multifonctionnalité et solubilité dans l'eau, les dendrimères de poly(amido amine) sont utilisés dans cette étude pour la construction du biocapteur. À la place d'ammoniac, le cystamine est employée comme molécule centrale.

Dans le but d'utiliser les dendrimères pour des analyses biologiques, il est nécessaire de modifier les groupes fonctionnels périphériques de telle façon qu'elles entrent en réaction avec les bactéries. Un exemple de telles modifications est l'étude de Pagé et Roy (1997) qui ont obtenu des glycodendrimères à partir de PAMAM de différentes générations et de

p-isothiocyanate phényle  $\alpha$ -D-mannopyranoside. Dans cette étude, la reconnaissance de la lectine Concanavalin A (Con A) par les glycodendrimères a été aussi démontrée.

Les dendrimères appartenant aux générations plus grandes demandent des réactions plus lentes et leur purification est difficile. En plus, la probabilité d'avoir des défauts dans la structure augmente avec la génération (Pagé et Roy, 1997). Donc, il est plus avantageux d'utiliser des dendrimères avec des branches courtes mais il est essentiel d'augmenter le nombre de branches accrochées au cœur central. Les branches de dendrimères peuvent être adsorbées sur la surface d'une nanoparticule métallique, comme par exemple du Cu (Balogh et Tomalia, 1998), de l'Au (Gopidas, Whitesell et Fox, 2003; Choi et al, 2005), de l'Ag, Pd ou Pt (Goodson et al, 2004).

L'utilisation d'une nanoparticule métallique apporte plusieurs avantages. Les nanoparticules possèdent des propriétés différentes des propriétés macroscopiques des métaux. Par exemple, elles sont semi-conductrices. Leurs propriétés optiques, électroniques et magnétiques dépendent de leur taille (Gopidas, Whitesell et Fox, 2003; Hosteler et al, 1998). Le nombre de branches du dendrimère adsorbées sur une nanoparticule diminue avec la génération du dendrimère, laissant une large fraction de la surface sur la particule disponible pour la catalyse, des transferts d'énergie et d'électrons, ainsi que pour des réactions avec d'autres molécules plus petites.

Les nanoparticules de Cu et Ag ne démontrent pas une grande stabilité. Elles s'oxydent facilement et demandent des conditions privées d'oxygène pour le stockage. L'or est peu réactif, en plus il a une grande affinité envers le soufre à cause des nuages électroniques diffus des deux éléments. Les thiols s'adsorbent aussi bien sur des nanoparticules d'or (Brust, 1994) que sur des surfaces d'or (Qu, D. et M. Morin. 2001, 2004). Les dendrimères de poly(amido amine) utilisées dans cette étude comportent la cystamine comme molécule centrale. La liaison S-S de la cystamine peut être réduite en thiol pour que les branches s'adsorbent sur l'or.

Plusieurs exemples d'adsorption des dendrimères sur des particules d'or par une liaison Au-S sont connus (Gopidas, Whitesell et Fox, 2003; Choi et al, 2005). Les nanoparticules sont obtenues à partir d' $\text{AuCl}_4^-$  par réduction avec  $\text{NaBH}_4$ . L'attachement des thiols s'effectue spontanément et en même temps que la formation des particules, ce qui limite leur croissance à quelques nanomètres. L'interaction entre l'or et le soufre est forte et stabilise

l'agrégat d'or (Sato et al, 2002). Cette synthèse des nanoparticules recouvertes de dendrimères va être utilisée pour la construction du biocapteur dans cette étude.

Une solution colloïdale de nanoparticules d'or a une couleur intense qui est absente pour le métal ou pour les atomes individuels. Cette couleur permet la détection des nanoparticules par la spectroscopie UV-Visible et change dépendamment de l'environnement chimique (Silverstein, Basler et Morill 1998). L'origine de cette couleur est attribuée à l'oscillation collective des électrons de conduction à la surface, induite par le champ électromagnétique (Link et El-Sayed, 1999). Cette résonance est appelée plasmon de surface. La bande d'absorption du plasmon de surface de nanoparticules d'or se situe entre 500 et 550 nm. La position exacte et l'intensité de cette bande dépend de la taille de la nanoparticule (Gopidas, Whitesell, et Fox, 2003). Si la taille est plus petite que 2 nm la bande devient indétectable (Hosteler et al, 1998). Le plasmon de surface peut être utilisé pour déduire le diamètre des nanoparticules synthétisées.

L'utilisation des nanoparticules d'or de taille supérieure à 2 nm pour la construction des biocapteurs est préférable pour une détection par spectroscopie UV-Visible. D'autre part, les nanoparticules d'or peuvent être nocives pour l'organisme humain. De plus, la taille joue un rôle important sur la solubilité des nanoparticules. Finalement, les plus petites particules semblent être plus avantageuses, mais l'utilisation d'une autre méthode de détection est nécessaire.

La fluorescence est une méthode sensible de détection. Il a été démontré (Rojas et al, 2002; Raja, Wang et Finn, 2003; Klopfer et Nadeau, 2003) que les molécules fluorescentes peuvent être utilisées comme marqueurs pour identifier des cellules. Attachées à un oligonucléotide, les fluorophores servent d'indicateurs pour diagnostiquer rapidement et spécifiquement différentes maladies.

La fluorescéine est un des fluorophores les plus utilisés. La fluorescence et l'absorbance de la fluorescéine sont très sensibles du pH. Il est préférable que les mesures s'exercent aux pH entre 8 et 9. Dans l'eau à pH = 8, fluorescéine émet à 518 nm si excitée à 494 nm. Le tétraméthylrhodamine (TMR) est un autre choix possible. L'excitation est faite à 555 nm et l'émission est à 580 nm. L'avantage de TMR est qu'il est moins sensible au pH.

Le fluorophore peut être attaché à différents supports. Par exemple, Raja, Wang et Finn (2003) ont utilisé le CPMV (cowpea mosaic virus) comme support pour un nouveau type de

biosenseur. Ce virus sert de squelette sur lequel une vaste gamme de structures chimiques et biologiques peut être accrochée. Le CPMV a été modifié avec p-nitrophenyle  $\alpha$ -D-mannopyranoside et avec la fluorescéine isothiocyanate (FITC) en proportion 100 :1. Le virus modifié de cette façon reconnaît le Con-A qui possède une grande affinité avec le  $\alpha$ -D-mannose et forme des agglomérats. Cette agglomération est détectable par spectroscopie UV-Visible, car elle cause une augmentation de l'absorbance. Les agrégats peuvent aussi être détectés par fluorescence et TEM. Un excès de  $\alpha$ -D-mannopyranoside ajouté au mélange Virus + Con A fait disparaître les agrégats. Une telle réversibilité de la réaction n'est pas observée si un excès de galactose est ajouté.

Rojas, Fuente et ses coéquipiers (2002) ont synthétisé des nanoparticules d'or de 2 nm enrobées d'une monocouche de 11-thioacetateundecanol conjugué (95 %) avec des oligosaccharides et avec FITC (5 %). Ces glyconanoparticules, stables et solubles dans l'eau, peuvent être caractérisées par les spectroscopies de fluorescence, UV-Visible et FTIR. Elles sont capables d'identifier des interactions spécifiques carbohydate-carbohydate. Un inconvénient majeur est que la fluorescéine diminue la solubilité de la nanoparticule dans l'eau.

Dans ce projet, la modification des nanoparticules-PAMAM avec p-isothiocyanate phényle  $\alpha$ -D-mannopyranoside et FITC est envisagé, dans le but de pouvoir détecter la lectine Con A par fluorescence. La réversibilité de la réaction va aussi être examinée.

La combinaison entre une nanoparticule d'or, avec ses propriétés spécifiques optiques et un fluorophore peut être utilisée dans la reconnaissance des molécules organiques. Beaucoup d'exemples basés sur le rôle de la nanoparticule d'or comme atténuateur de la fluorescence sont connus. Maxwell, Taylor et Nie (2002) ont développé des nanocapteurs pouvant détecter les biomolécules. Ils ont utilisé des nanoparticules d'or de 2.5 nm auxquelles sont attachés des oligonucléotides, finissant par un groupe thiol à une extrémité et par un fluorophore (fluorescéine ou tétraméthylrhodamine (TMR)) à l'autre extrémité. Sur chaque nanoparticule il y a 1 ou 2 oligonucléotides attachés par une liaison covalente Au-S. Les oligonucléotides sont flexibles et permettent que le fluorophore s'adsorbe sur la surface de la même nanoparticule. Le résultat est une atténuation de 100% de la fluorescence de la fluorescéine (TMR) par un transfert non-radiatif de l'énergie vers l'or. L'oligonucléotide est

disponible pour une hybridation spécifique, qui amène à une structure ouverte quand le fluorophore n'est pas adsorbé sur la surface de la nanoparticule. Dans ce cas, une atténuation de 55% est obtenue. Pour les nanoparticules d'or petites (2 – 3 nm de diamètre) le transfert non-radiatif de l'énergie de la molécule excitée vers la nanoparticule demande des distances relativement courtes (1 – 2 nm) (Pineda, Ronis, 1985). Pour les nanoparticules d'or de 10 – 50 nm de diamètre cette distance augmente à 10 – 20 nm (Maxwell, Taylor et Nie, 2002).

Dubertret, Calame et Libchaber (2001), dans une étude semblable à celle décrite ci-dessus, ont combiné des nanoparticules d'or de 1,4 nm, de l'ADN simple brin et des fluorophores comme la fluorescéine, la rhodamine 6G, le *Texas red* et la cyanine-5. Le même effet d'atténuation a été observé. Ils ont constaté que l'atténuation des fluorophores par la nanoparticule dépend de la distance entre eux. Les meilleurs résultats sont obtenus avec la fluorescéine et la rhodamine (plus de 98 % d'atténuation). La longueur d'onde de 520 nm (la longueur d'onde d'absorption de la nanoparticule d'or) est un canal pour le transfert non radiatif de l'énergie et cause une atténuation maximale. L'atténuation dépend aussi du diamètre de la nanoparticule. En remplaçant les nanoparticules de 1,4 nm avec de plus petite de 0,8 nm l'atténuation devient impossible.

La méthode de détection par atténuation de la fluorescence va aussi être exploitée dans cette étude. Les nanoparticules recouvertes de glycodendrimères vont réagir avec des lectines conjuguées avec des fluorophores, dont la détection par atténuation de la fluorescence va être étudiée.

Dans une deuxième approche, la construction d'un biocapteur basé sur la formation des monocouches sur une surface métallique va être élaborée. C'est une autre possibilité d'augmenter la multifonctionnalité des dendrimères de générations petites. Les films organiques déposés sur une surface métallique sont largement utilisés comme couche antioxydante pour les surfaces métalliques et comme capteurs chimiques. Beaucoup d'études ont été faites sur les surfaces d'or sur lesquelles des molécules organiques contenant des fonctions thiol sont adsorbées (Qu et Morin, 2004; 2001; Weisshaar, Lamp et Porter, 1992; Calvente et al, 1999; Wackerbarth et al, 2004). La formation des couches auto-assemblées d'alkyls disulfures (Ulman, 1991) et d'oligonucléotides fonctionnalisés avec des disulfures (Wackerbarth et al, 2004) est aussi connue. L'or est peu réactif et un bon conducteur. La réaction avec les thiols s'effectue spontanément mais la formation d'une couche complète

demande du temps. La méthode basée sur l'électrodéposition (Qu et Morin, 2004; 2001; Weisshaar, Lamp et Porter, 1992; Calvente et al, 1999) présente certains avantages comparé à la déposition chimique (Ulman, 1996; Trung et Rowntree, 1996; Bain et Whitesides, 1988). C'est une méthode sûre, simple et sensible, assurant une vitesse de déposition plus grande et permettant un meilleur contrôle du recouvrement de la surface.

Les thiols déposés sur une surface d'or présentent une stabilité chimique et thermique élevée (Hubbard, Silin et Plant, 1998; Sandhyarani et Pradeep, 1998). Les thiols peuvent être fonctionnalisés avant ou après la déposition sur la surface d'or, pour être utilisé par la suite comme biocapteurs. Par exemple, les alkylthiols avec des groupes terminaux carboxyliques ou alcools se lient à la surface d'or par les extrémités thiols, laissant l'autre extrémité exposée à la surface (Bain et Whitesides, 1988).

Le nombre de groupes fonctionnels à la surface d'une monocouche d'alkyl thiols est limité. Svobodova et al (2004) et Yoon et Kim (2000) proposent l'utilisation des dendrimères pour augmenter la multifonctionnalité de la monocouche. Ces monocouches sont modifiées et utilisées comme des biocapteurs. Des monocouches mixtes de dendrimères et thiols sont aussi employées (Svobodova et al, 2004). La sensibilité du biocapteur augmente avec l'augmentation de la quantité de dendrimère à la surface.

Le dernier travail consiste la réalisation d'un biocapteur électrochimique ainsi que l'élaboration des méthodes de détection par spectroscopie d'impédance électrochimique et microbalance à cristal de quartz.

### **1.3 Objectifs**

Les objectifs de ce mémoire consistent à adsorber des dendrimères de poly(amido amine) sur des nanoparticules d'or ou sur une surface d'or et de greffer des sucres sur les amines terminales pour permettre la reconnaissance spécifique de la bactérie *E. coli* et la lectine Con A. Un deuxième objectif est d'élaborer différentes méthodes de détection dont la fluorescence et la microscopie confocale pour les glyconanoparticules et la voltampérométrie

cyclique, spectroscopie d'impédance électrochimique et microbalance à cristal de quartz pour les monocouches de glycodendrimères.

#### **1.4 Méthodologie**

La synthèse du biocapteur plurifonctionnel consiste en l'adsorption de dendrimères de poly(amido amine)s (PAMAM) ayant un cœur de cystamine à la surface des nanoparticules d'or ou sur des surfaces d'or suivi par la modification des amines terminales des dendrimères avec des sucres et des molécules fluorescentes.

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour caractériser les nanoparticules: IR, UV-visible, TGA, la dispersion angulaire de la lumière pour la mesure de la taille des particules. Un titrage en retour est effectué pour déterminer le pKa des amines terminales, ainsi que une quantification des amines primaires par 2,4,6-trinitrobenzène-1- acide sulfonique.

Plusieurs méthodes de détection de la bactérie *E. coli* et de la lectine Con A sont employées : fluorescence, microscopie confocale et immunoprécipitation pour les nanoparticules d'or enrobées de glycodendrimères, voltampérométrie cyclique, spectroscopie d'impédance électrochimique et microbalance à cristal de quartz pour les monocouches de glycodendrimères.

#### **1.5 Plan du mémoire**

Le chapitre suivant contient les méthodes, le matériel et les appareils utilisés dans cette étude. Toutes les synthèses sont également présentées dans ce chapitre. La caractérisation des nanoparticules d'or recouvertes de dendrimères de PAMAM, ainsi que l'étude de l'agglomération sont présentées dans le chapitre III. Dans le chapitre IV la modification des amines terminales des dendrimères avec des sucres et les tests d'immunoprécipitation de Con A et *E. coli* sont développés. Les études sur l'atténuation, par la nanoparticule de la fluorescence de Con A conjugué avec des molécules fluorescentes sont présentées ici. Une description des glycodendrimères fluorescents par la modélisation moléculaire est présentée

dans le chapitre V. Le Chapitre VI présente la synthèse des nanoparticules fluorescentes et leur utilisation comme biocapteurs. Le Chapitre VII porte sur l'électro-assemblage de monocouches des glycodendrimères sur la surface d'un monocristal d'or (111), ainsi que la détection de Con A par la spectroscopie d'impédance électrochimique. L'utilisation de la microbalance de cristal de quartz comme méthode de détection des lectines est présentée dans le chapitre VIII. Le dernier chapitre contient les conclusions générales de ce travail.

### 1.6 Références

Bain, C., et G. Whitesides. 1988. «Formation of two-component surfaces by the spontaneous assembly of monolayers on gold from solutions containing mixtures of organic thiols». *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 110, p. 6560-6561.

Balogh, L. et D. Tomalia. 1998. «Poly(amido amine) dendrimer-templated nanocomposites. Synthesis of zerovalent copper nanoclusters». *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120, p. 7355-7356.

Bielinska, A., J. Kukowska-Latallo, J. Johnson, D. Tomalia, J. Baker Jr. 1996. «Regulation of in vitro gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers». *Nucleic Acids Res*, vol. 24, p. 2176 - 2182.

Brust, M., M. Walker, D. Bethell, D. Schiffrin et R. Whyman. 1994. «Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system». *J. Chem. Soc. Chem. Commun*, p. 801-802.

Calvente, J., M. Gil, R. Andreu, E. Rolan et M. Dominguez. 1999. «Influence of adsorption/diffusion coupling on surface voltammetric waves. First stages of 2-mercaptoethanesulfonate oxidative adsorption on gold ». *Langmuir*, vol. 15, p. 1842-1852.

Choi, D., L. Chinn et Y. Shon «Convergent synthesis of dendron-functionalized gold nanoparticles». 2005. *Polymeric Materials: Science & Engineering*, vol. 93, p. 739-740.

Dvoriac, P. et D. Tomalia. 1996. «Recent advances in dendritic polymers». *Curr. Opin. Colloid Interface Sci*, vol. 1, p. 221-235

Dubertret, B., M. Calame et A. Libchaber. 2001. «Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides». *Nature Biotechnolog*, vol. 19, p. 365-370.

Goodson, T., O. Varnavski, Y. Wang. 2004. «Optical properties and applications of dendrimer-metal nanocomposites». *International Reviews in Physical Chemistry*, vol. 23, p. 109-150.

- Gopidas, K., J. Whitesell et M. Fox. 2003. «Nanoparticle-cored dendrimers: synthesis and characterization». *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, p. 6491-6502.
- Haensler, J. et J. Szoka. 1993. « Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture». *Bioconjug. Chem.*, vol. 4, p. 372 – 379
- Hawker, C. et J. Fréchet. 1990. «A new convergent approach to monodisperse dendritic macromolecules». *J. J Chem Soc Chem Commun*, p. 1010–1013.
- Hawker, C. et J. Fréchet. 1990. «Preparation of polymers with controlled molecular architecture: A new convergent approach to dendritic macromolecules ». *J. J Am Chem Soc*, vol. 112, p. 7638-7647.
- Hosteler, M., J. Wingate, C. Zhong, J. Harris, R. Vachet, M. Clark, J. Londono, S Green, J. Stokes, G. Wignall, G. Glish, M. Porter, N. Evans et R. Murray. 1998. «Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: core and monolayer properties as a function of core size». *Langmuir*, vol. 14, p. 17 – 30.
- Hubbard, J., V. Silin et A. Plant. 1998. «Self assembly driven by hydrophobic interactions at alkanethiol monolayers». *Biophys. Chem.*, vol. 75, p. 163-176.
- Kajnert, B. et M. Bryszewska. 2001. «Dendrimers : properties and applications». *Acta Biochimica Polonica*, vol. 48, p. 199 – 208.
- Klopper, J. , R. Mielke, M. Wong, K. Neelson, G. Stucky, et J. Nadeau. 2003. «Quantum dots as strain – and metabolism-specific microbiological labels». *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, p. 4205 – 4213.
- Kukowska-Latallo, J., E. Raczka, A. Quintana, C. Chen, M. Rymaszewski, J. Baker Jr. 2000. «Intravascular and endobronchial DNA delivery to murine lung tissue using a novel, nonviral vector». *Hum. Gene Ther.*, vol. 11, p. 1385-1395.
- Link, S., et M. El-Sayed. 1999. «Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold». *J. Phys. Chem. B.*, vol. 103, p. 4212-4217.
- Miller, T., Kwock, E. et T. Neenan. 1992. « Synthesis of four generations of monodisperse aryl ester dendrimers based on 1,3,5-benzenetricarboxylic acid» *Chem Mater*, vol. 25, p. 3143-3148.
- Maxwell, D., J. Taylor et Shuming N. 2002. «Self-assembled nanoparticle probes for recognition and detection of biomolecules». *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, p. 9606 – 9612.
- Miller, T. et T. Neenan. 1990. «Convergent synthesis of monodisperse dendrimers based upon 1,3,5-trisubstituted benzenes». *Chem Mater*, vol. 2, p. 346–349.

- Pagé, D. et R. Roy. 1997. «Synthesis and biological properties of mannosylated starburst poly(amidoamine) dendrimers». *Bioconjugate Chem.*, vol. 8, No. 5, p. 714 – 723.
- Pineda, A. et D. Ronis. 1985. «Fluorescence quenching in molecules near rough metal surfaces». *J. Chem. Phys.*, vol. 83, p. 5330.
- Qu, D. et M. Morin. 2001. «An EQCM study of the oxidative deposition of alkylthiolates on gold». *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 517, 45–53.
- Qu, D. et M. Morin. 2004. «The effect of concentration on the oxidative deposition of a monolayer of alkylthiolate on gold: from island formation to random adsorption». *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 565, p. 235–242.
- Raja, K., Qian Wang et M. Finn. 2003. «Icosahedral virus particles as polyvalent carbohydrate display platforms». *ChenBioChem*, vol. 4, p. 1348 – 1351.
- Ramzi, A, R. Scherrenberg, J. Joosten, P. Lamstra, et K. Mortensen. 2002. «Structure-property relations in dendritic polyelectrolyte solution at different ionic strength». *Macromolecules*, vol. 35, No. 3, p. 827-833.
- Rojas, T., J. de la Fuente, A. G. Barrientos, S. Penadés, L. Ponsonnet, et A. Fernández. 2002. «Gold glyconanoparticles as building blocks for nanomaterials design». *Adv. Mater*, vol. 8, p. 585 – 588.
- Sandhyarani, N. et T. Pradeep. 1998. «Characteristic of alkanthiol self assembled monolayers prepared on sputtered gold films». *Vacuum*, vol. 49, p. 279-284.
- Satoh, K., T. Yoshimura, et K. Esumi. 2002. «Effects of various thiol molecules added on morphology of dendrimer–gold nanocomposites». *Journal of Colloid and Interface Science*, 255, 312 – 322.
- Silverstein, R., G. Basler et T. Morill. 1998. «Identification spectrométrique de composés organiques». Trad. De l'anglais par E. Larue, révision scientifique par A. Schanck. 5<sup>e</sup> éd. américain. Paris (France) : De Boeck et Larcier, p. 91 – 142, 289 - 315.
- Simanek, E. et S. Gonzalez. 2002. «Dendrimers: branching out of polymer chemistry». *Journal of Chemical Education*, vol. 79, p. 1222 – 1231.
- Svobodova, L., M. Snejdarkova, K. Toth, R. Gyrcsanyi et T. Hianik. 2004. «Properties of mixed alkanthiol-dendrimer layers and their applications in biosensing». *Bioelectrochemistry*, vol. 63, 285-289.
- Tomalia, D., A. Naylor et W. Goddard III. 1990. «Starburst dendrimers: molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter». *Angew. Chem. Int. Edn.*, 29, 138 – 175.

Tomalia, D., V. Berry, M. Hall, D. M. Hedstrand. 1987. «Starburst dendrimers. 4. Covalently fixed unimolecular assemblages reminiscent of spheroidal micelles». *Macromolecules*, vol. 20, p. 1164-1167.

Tomalia, D., H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Rocck, J. Ryder et P. Smith. 1985. «A new class of polymers: Starburst-dendritic macromolecules». *Polym. J.*, vol. 17, p. 117.

Tomalia, D. 1993. «Starburst/cascade dendrimers: fundamental building blocks for a new nanoscopic chemistry set». *Aldrichim. Acta*, vol. 26, p. 91-101

Tomalia, D., S. Uppuluri, D. Swanson et J. Li. 2000. «Dendrimers as reactive modules for the synthesis of new structure-controlled, higher-complexity megamers». *Pure Appl. Chem.*, vol. 72, p. 2343-2358

Tomalia, D., J. Fréchet. 2002. «Discovery of dendrimers and dendritic polymers: A brief historical perspective». *J. Polym. Sci. Part A : Polym. Chem.*, vol. 40, p. 2719-2728.

Tomalia, D., H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith. 1986. «Dendritic macromolecules: Synthesis of starburst dendrimers ». *Macromolecules.*, vol. 19, p. 2466-2468.

Tomalia, D., M. Hall, D. Hedstrand. 1987. «Starburst dendrimers. The importance of branch junction symmetry in the development of topological shell molecules». *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 109, p. 1601-1603.

Trung K. et P. Rowntree. 1996. «Formation of self-assembled butanethiol monolayers on Au substrates: Spectroscopic evidence for highly ordered island formation in sub-monolayer films». *J. Phys. Chem.*, 100, 19917 -19926.

Ulman, A. 1991. «An introduction to ultrathin organic films», *Academic Press*, London.

Ulman, A. 1996. «Formation and structure of self-sssembled monolayers». *Chem. Rev.*, vol. 96, p. 1533.

Wackerbarth, H., R. Marie, M. Grubb, J. Zhang, A. Hansen, I. Chorkendorff, C. Christensen, A. Boisen et J. Ulstrup. 2004. «Thiol- and disulfide-modified oligonucleotide monolayer structures on polycrystalline and single-crystal Au(111) surfaces». *Journal of Solid State Electrochemistry*, vol. 8, 474-481.

Watkins, D., Sayed-Sweet, .Y., Klimash, J., Turro, N. et Tomalia D. 1997. «Dendrimers with hydrophobic cores and the formation of supramolecular dendrimer-surfactant assemblies». *Langmuir*, vol. 13, p. 3136-3141.

Weisshaar, D., B. Lamp et M. Porter. 1992. «Thermodynamically controlled electrochemical formation of thiolate monolayers at gold: characterization and comparison to self-assembled analogs». *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 114, p. 5860-5862.

Wooley, K., C. Hawker, et J. Fréchet. 1991. «Polymers with controlled molecular architecture: Control of surface functionality in the synthesis of dendritic hyperbranched macromolecules using the convergent approach». *J Chem Soc Perkin Trans 1*, p. 1059–1076.

Yoon H. et H. Kim. 2000. «Multilayered assembly of dendrimers with enzymes on gold - thickness-controlled biosensing interface». *Kim. Anal. Chem.*, vol. 72(5), 922-926.

Zheng, J., M. Stevenson, R. Hikida, et P. Van Patten. 2002. «Influence of pH on dendrimer-protected nanoparticles». *J. Phys. Chem.*, vol. 106, p. 1252 – 1255.

Zhuo, R., B. Du et Z. Lu. 1999. «In vitro release of 5-flurouracil with cyclic core dendritic polymer». *J. Control. Release*, vol. 57, p. 249–257.

## CHAPITRE II

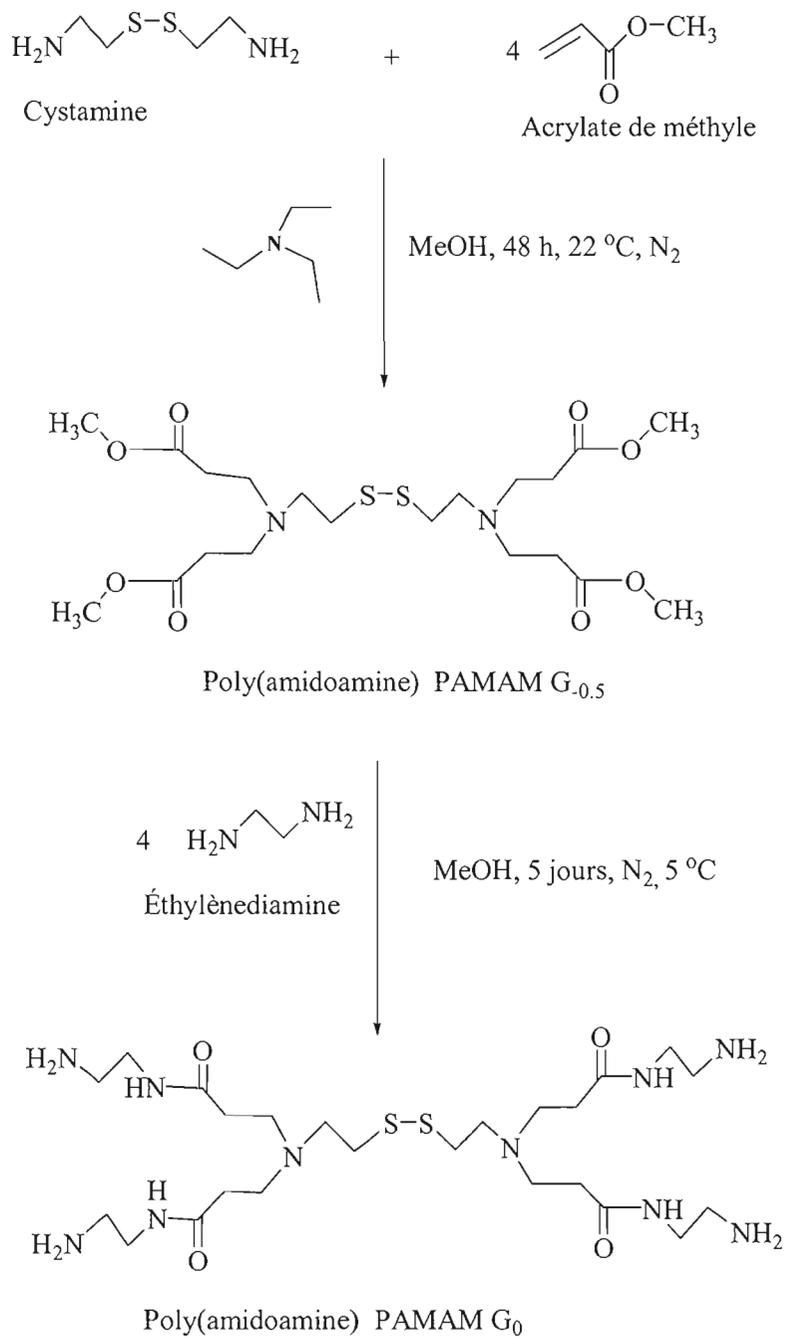
### MÉTHODES ET MATÉRIEL

#### 2.1 Introduction

Dans ce chapitre, les méthodes de synthèse des glyconanoparticules sont décrites. Les dendrimères utilisés dans ce projet sont des poly(amido amine)s de génération 0 ( $G_0$ ), dont la cystamine est utilisée comme molécule centrale. La synthèse a été effectuée par N. Bogdan du laboratoire de M. Morin (figure 2.1) en utilisant la méthode divergente développée par Tomalia (Tomalia et al, 1985). L'acrylate de méthyle est attaché à la cystamine par une addition de Michael pour former la génération -0,5 des esters. L'étape suivante est une amidation avec l'éthylène diamine pour former la génération 0 du dendrimère couronnée par des amines primaires. Les dendrimères sont purifiés par chromatographie liquide et caractérisés par RMN et IR.

La génération 0 contient seulement quatre groupes amine aux extrémités des branches. Pour augmenter la multifonctionnalité les branches du dendrimère sont concentrées sur une nanoparticule d'or. Pour ce faire on a utilisé la méthode de Brust et al (1994) développée pour la synthèse de nanoparticules d'or sur lesquelles sont adsorbé des thiols. Les nanoparticules sont obtenues par réduction d' $\text{AuCl}_4^-$  avec  $\text{NaBH}_4$ .

La surface des nanoparticules entourées de dendrimères a été modifiée avec des sucres et des tests d'immunoprécipitation ont été faits. Cette synthèse a été inspirée par l'étude de Pagé et Roy (1997) qui ont obtenu des glycodendrimères à partir de PAMAM et de p-isothiocyanate phényle  $\alpha$ -D-mannopyranoside.



**Figure 2.1** Synthèse de poly(amido amine).

La caractérisation par TGA, FTIR, XPS, UV-Vis, ICP-AES et SEM des glyconanoparticules est effectuée par Bogdan et al (soumis 2006). Un titrage des amines terminales par TNBS (acide 2,4,6-trinitrobenzène-1-sulfonique) avant et après le greffage des carbohydrates démontre que  $87 \pm 1$  % des amines ont été modifiées. Ces résultats sont confirmés par la spectroscopie IR. Les mesures de XPS ont démontré que la composition élémentaire des glyconanoparticules est telle que prédite. Les deux bandes reliées à l'or à 83.2 et 86.9 eV indiquent que l'or dans la particule a une valence de 0. Le rapport N : S calculé par cette méthode ( $2,0 \pm 0,1 : 1$ ) est très près du rapport prédit pour les glyconanoparticules (2,3 : 1). La fraction organique de  $59 \pm 3$  % (v/v) de glyconanoparticules a été obtenue par TGA. La fraction de l'or dans les glyconanoparticules obtenue par ICP-AES est de  $25,0 \pm 2,6$  % (v/v).

## 2.2 Contenu du chapitre

Premièrement la synthèse de nanoparticules d'or recouvertes de dendrimères de poly(amido amine)s (PAMAM) est présentée (Bogdan et al, soumis 2006). Le cœur du dendrimère contient une liaison S – S qui est facilement brisée lors de l'adsorption et les deux branches de chaque dendrimère s'adsorbent sur la nanoparticule par une liaison S-Au. L'attachement des dendrimères aux nanoparticules se fait spontanément lors de la formation de la nanoparticule. Les nanoparticules-PAMAM (Au-PAMAM) sont caractérisées par IR (Silverstein, Basler et Morill, 1998), UV-visible (Hosteler et al, 1998), TGA et modélisation moléculaire. La quantification des amines primaires a été faite à l'aide du TNBS (Cayot et Tainturier, 1997). Le pKa des amines terminales a été déterminé par un titrage en retour. La taille et le potentiel zeta des Au-PAMAM sont également mesurés. Les méthodes et l'appareillage sont présentés ci-dessous.

La modification des amines terminales de PAMAM avec *p*-isothiocyanate phényle  $\beta$ -D-galactopyranoside et avec *p*-isothiocyanate phényle  $\alpha$ -D mannopyranoside est également démontrée (Pagé et Roy, 1997). Deux méthodes de détection de Con A et de la bactérie *E. coli* sont élaborées : la fluorescence (Klopfer et Nadeau, 2003) et la microscopie confocale (Barkenhoff et al, 1979; Valkenburg et al, 1984).

L'adsorption des PAMAM sur des surfaces d'or et la caractérisation des monocouches sont effectuées suivant la procédure décrite dans le recherche de Qu et Morin (2001, 2004). La modification de la monocouche de PAMAM avec des sucres (Pagé et Roy, 1997) ainsi que la méthode de détection de Con A et *Triticum vulgare* (WGA) par spectroscopie d'impédance électrochimique et microbalance de cristal de quartz (Qu et Morin, 2001, 2004) sont également décrites.

### 2.3 Produits chimiques, lectines et bactérie

Le dendrimère de poly(amidoamine) de génération 0 a été synthétisé par Bogdan. Les réactifs nécessaires pour la synthèse et la caractérisation de Au-PAMAM :  $\text{HAuCl}_4$  99 %,  $\text{NaBH}_4$  99 %, méthanol (HPLC), acétone (HPLC), KOH 99,99 %,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , TNBS sont obtenus de la compagnie Aldrich Chemical Company, Inc. L'eau déionisée a été obtenue d'un système Millipore Milli-Q.

Les réactifs nécessaires pour la synthèse de glyconanoparticules fluorescentes *p*-Isothiocyanate phényle  $\beta$ -D-galactopyranoside et *p*-Isothiocyanate phényle  $\alpha$ -D-mannopyranoside sont synthétisés. Les réactifs nécessaires pour cette synthèse *p*-Nitrophényle  $\alpha$ -D-mannopyranoside 98 %, *p*-Nitrophényle  $\beta$ -D-galactopyranoside 98 %, Pd sur carbone activé 10%, Thiophosgene, ainsi que le Fluorescéine-5(6)-isothiocyanate (FITC), cystamine dihydrochloride 98 %, NaOH, HCl 37 %(v/v) sont en provenance de la compagnie Sigma-Aldrich, Inc, Canada. Le tétraméthylrhodamine-5(6)-isothiocyanate (TRITC) est fabriqué par la compagnie Molecular Probes, Inc.

Les lectines Concanavalin A de *Conavalia ensiformis* (Con A) et l'agglutinine de germe de blé de *Triticum vulgare* (WGA) ainsi que le D-mannose et la poly-L-lysine proviennent de la compagnie Aldrich. Les lectines conjugués Con A-fluorescéine, Con A-TMR sont fabriqués par la compagnie Molecular Probes, Inc, USA.

La bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) CFT073 de fibrilles de type-1 est obtenue d'INRS-Santé du Dr. Charles Dozois, Laval, Qc.

## 2.4 Synthèse

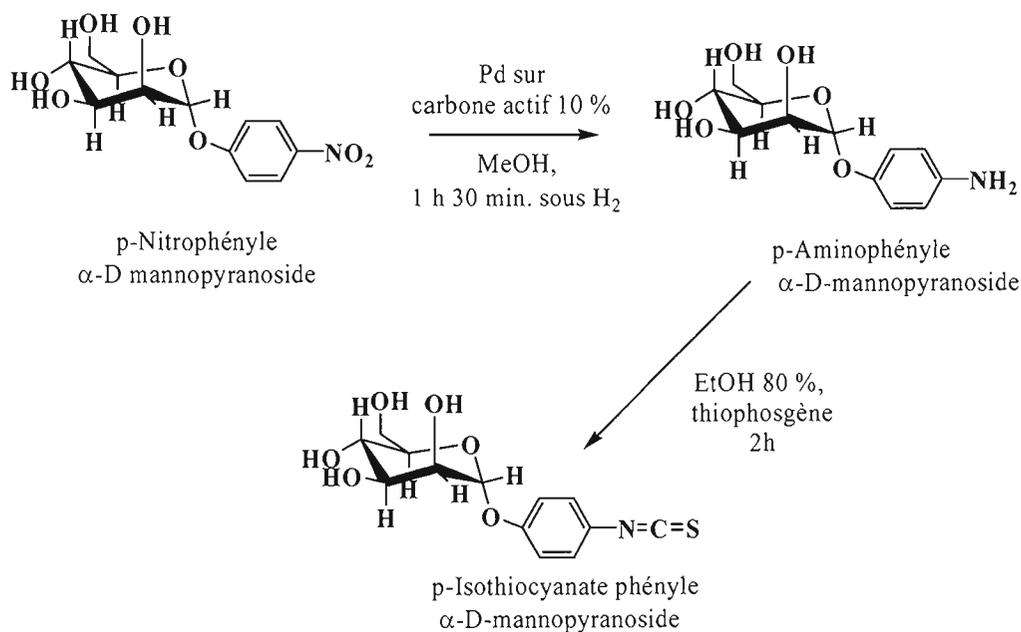
### 2.4.1. Synthèse de Au-PAMAM(G<sub>0</sub>)

Une quantité de 170 mg H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub> (0,5 mmol) et 609 mg PAMAM G<sub>0</sub> (1mmol) sont dissous chacun dans 50 mL de méthanol. Les deux solutions (H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub>/méthanol – jaune foncée et PAMAM/méthanol – jaune pâle) sont mélangées sous agitation pendant 15 minutes à la température de la pièce. La solution résultante a une couleur orange. Le réducteur NaBH<sub>4</sub> (283,5 mg dans 50 mL de méthanol) est ajouté goutte à goutte en mélangeant. Le réducteur NaBH<sub>4</sub> en excès (10 : 1 BH<sub>4</sub><sup>-</sup> : AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>), selon la recommandation de Brust et al. (1994) réduit Au (3+) en Au (0) qui forme des agrégats. La liaison –S-S- au milieu du dendrimère se brise. Une liaison covalente entre les atomes d'or se trouvant à la surface de l'agrégat, et le soufre se forme (voir figure 2.2). La couleur devient brun – noir. La solution est agitée pendant 1 h. La plus grande partie du méthanol est ensuite évaporée à 45 °C à l'aide d'un rotavap. Les nanoparticules d'or recouvertes de dendrimères sont précipitées en ajoutant de l'acétone et sont filtrées sur un filtre de nylon de 0,45 µm. Le produit est séché pendant 3 h à 50 °C. La masse obtenue est de 342,6 mg. Le produit est soluble dans l'eau.



### 2.4.2 Synthèse *p*-isothiocyanate phényle β-D-galactopyranoside et de *p*-isothiocyanate phényle α-D mannopyranoside

La synthèse de *p*-isothiocyanate phényle α-D mannopyranoside est présentée sur la figure 2.3. Pour l'effectuer, 473 mg de *p*-nitrophényle β-D-galactopyranoside (ou *p*-nitrophényle α-D mannopyranoside) sont dissous dans 50 mL méthanol, puis 50 mg de palladium sur carbone actif 10 % est additionné comme catalyseur. Le mélange est agité pendant 1 h 30 min sous H<sub>2</sub>. Ensuite, le catalyseur est enlevé par filtration et le solvant est évaporé par rotavap à 50 °C. Le *p*-aminophényle β-D-galactopyranoside obtenue (500 mg) est dissous dans 62 mL éthanol 80 % et 0,13 mL thiophosgène sont ajoutées goutte à goutte à cette solution. Après 2 h de mélange l'éthanol est évaporé par rotavap. Le produit *p*-isothiocyanate phényle β-D-galactopyranoside (ou *p*-isothiocyanate phényle α-D mannopyranoside) qui précipite dans l'eau est filtré et séché sous vide. Une quantité de 178 mg est obtenue pour *p*-isothiocyanate phényle α-D mannopyranoside, et de 363 mg pour *p*-isothiocyanate phényle β-D-galactopyranoside.

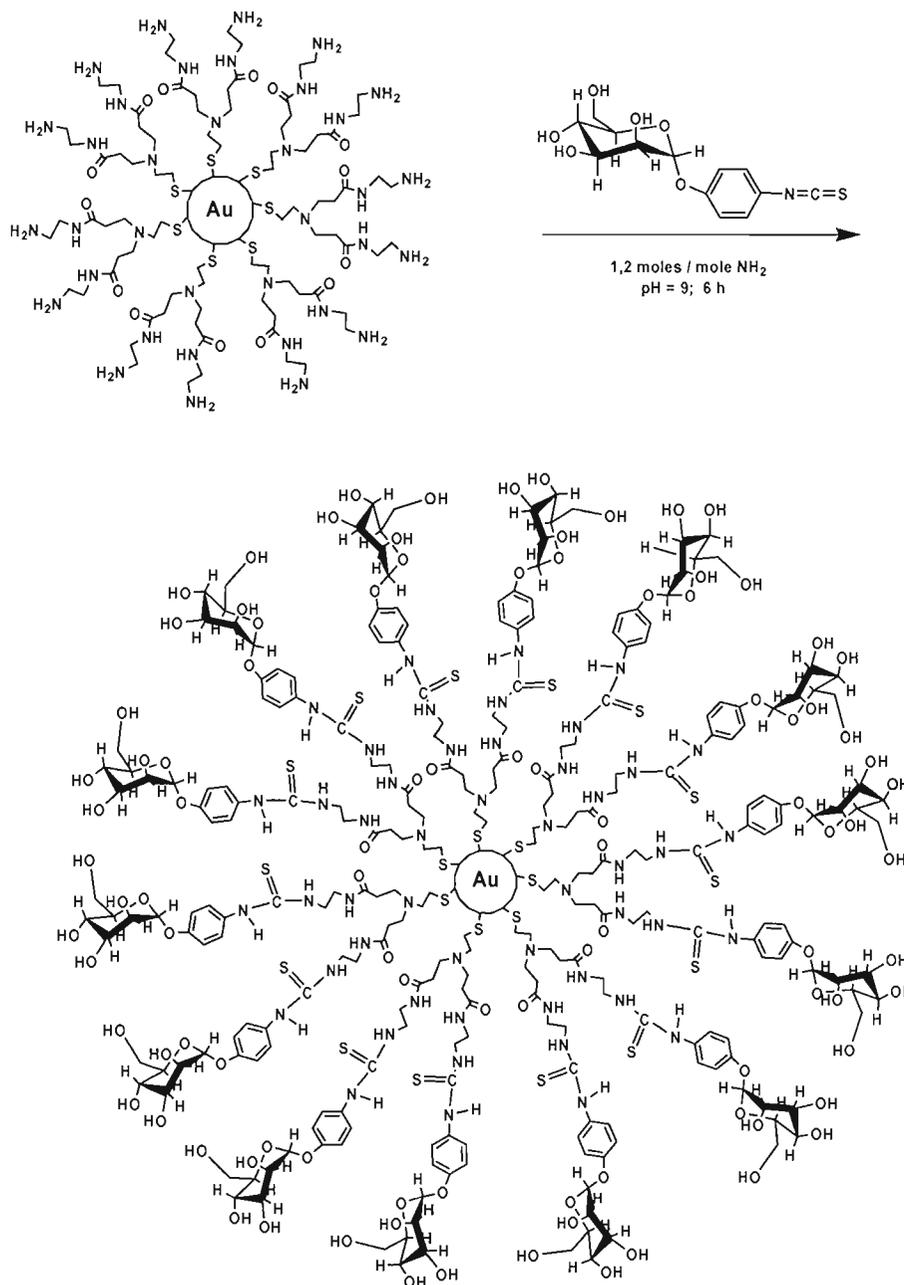


**Figure 2.3** Synthèse de *p*-Isothiocyanate phényle α-D mannopyranoside.

### 2.4.3 Synthèse Au-PAMAM(G<sub>0</sub>)-galactose (mannose)

Une quantité de 8,5 mg *p*-isothiocyanate phényle β-D-galactopyranoside (0,027 mmol, PM 313,3 g/mol) et 15 mg Au-PAMAM(G<sub>0</sub>) (0,0225 mmol) sont dissous chacun dans 5 mL d'eau. Le pH de la solution de Au-PAMAM(G<sub>0</sub>) a été ajusté à 9 en ajoutant quelques gouttes de NaOH 0,1 M. Les deux solutions ont été mélangées lentement sous agitation à la température de la pièce. Une précipitation temporaire est remarquée. Après quelques heures de réaction, le précipité disparaît et donne place à une solution marron. La solution a été agitée pendant 6 h à la température de la pièce en maintenant le pH à 9. Ensuite la solution est entreposée pendant 12 h à 4 °C. Après l'ajustement du pH à 7 avec HCl 0,1 M, 100 mL d'acétone ont été ajoutés. La solution a été laissée à précipiter pendant 4 h à 4 °C, puis filtrée sur un filtre de nylon de 0,45 μm, et séchée.

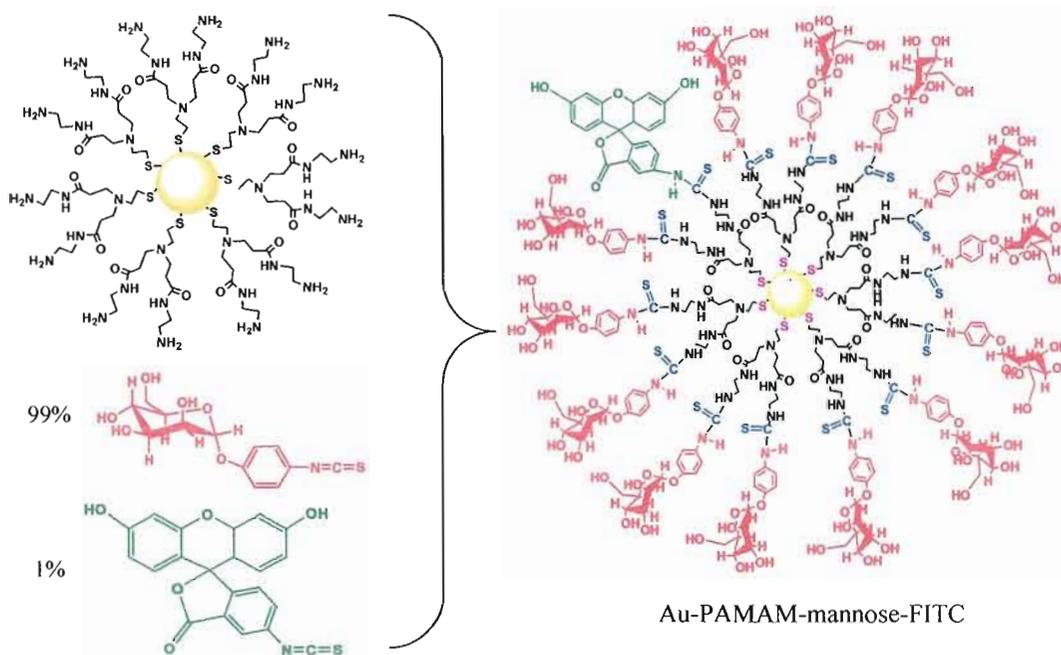
La synthèse de Au-PAMAM(G<sub>0</sub>)-mannose a été effectuée en utilisant le *p*-isothiocyanate phényle α-D mannopyranoside. La réaction est présentée sur la figure 2.4. Les nanoparticules modifiées avec les sucres sont solubles dans l'eau.



**Figure 2.4** Synthèse de Au-PAMAM(G<sub>0</sub>)-mannose.

#### 2.4.4. Synthèse du Au-PAMAM( $G_0$ )-mannose-FITC proportion de mannose : FITC de 99 : 1.

Cette synthèse requiert la préparation d'une solution de p-isothiocyanate phényle  $\alpha$ -D-mannopyranoside (20 mg dans 25 mL d'eau nanopure), d'une solution de Au-PAMAM( $G_0$ ) (31 mg dans 10 mL d'eau nanopure) et d'une solution de FITC (0,2 mg dans 5 mL d'eau nanopure). Le pH de la solution de Au-PAMAM( $G_0$ ) est ajusté à 9 en ajoutant quelques gouttes de NaOH 0,1 M. Les solutions de p-isothiocyanate phényle  $\alpha$ -D-mannopyranoside et de FITC sont mélangées puis ajoutées lentement, sous agitation, à la solution de Au-PAMAM( $G_0$ ). À partir de ce moment la synthèse se déroule comme indiqué dans 2.4.3 (voir figure 2.5). Le produit final (9,4 mg) est très soluble dans l'eau et fortement fluorescent. Le stockage se fait à 4 °C dans le noir. Les nanoparticules peuvent être entreposées pour plusieurs mois sans avoir un changement de la solubilité ou de la fluorescence.



**Figure 2.5** Synthèse de Au-PAMAM( $G_0$ )-mannose-FITC(99 : 1)

#### **2.4.5 Synthèse du Au-PAMAM(G<sub>0</sub>)-galactose-TRITC, proportion galactose :TRITC de 99 : 1**

Cette synthèse a été effectuée en utilisant la même méthode que pour Au-PAMAM(G<sub>0</sub>)-mannose-FITC(99 : 1) (voir 2.4.4) mais en utilisant de *p*-isothiocyanate phényle β-D-galactopyranoside. Le produit final est non soluble dans l'eau.

#### **2.4.6 Synthèse de Au-PAMAM(G<sub>0</sub>)-galactose-TRITC, proportion galactose : TRITC de 99,5 : 0,5**

Pour obtenir des particules solubles pour Au-PAMAM(G<sub>0</sub>)-galactose-TRITC il a fallu diminuer la quantité du fluorophore par rapport au sucre. Les Au-PAMAM(G<sub>0</sub>)-galactose-TRITC(99,5 : 0,5) sont solubles et fluorescentes, mais leurs propriétés disparaissent dans quelques semaines.

La synthèse de Au-PAMAM(G<sub>0</sub>)-galactose-TRITC a été effectuée en utilisant la même méthode que pour Au-PAMAM(G<sub>0</sub>)-mannose-FITC(99 : 1) (voir 2.4.4). Les solutions utilisées sont : *p*-isothiocyanate phényle β-D-galactopyranoside (110 mg dans 55 mL d'eau nanopure), Au-PAMAM(G<sub>0</sub>) (170 mg dans 50 mL d'eau nanopure) et TRITC (0,5 mg dans 5 mL d'eau nanopure).

Un autre facteur jouant un rôle important sur la solubilité c'est le séchage des nanoparticules après leur lavage avec l'acétone. Les nanoparticules séchées à 50 °C et plus perdent plus facilement leur solubilité. Il est préférable que le séchage s'effectue sous vide à la température ambiante.

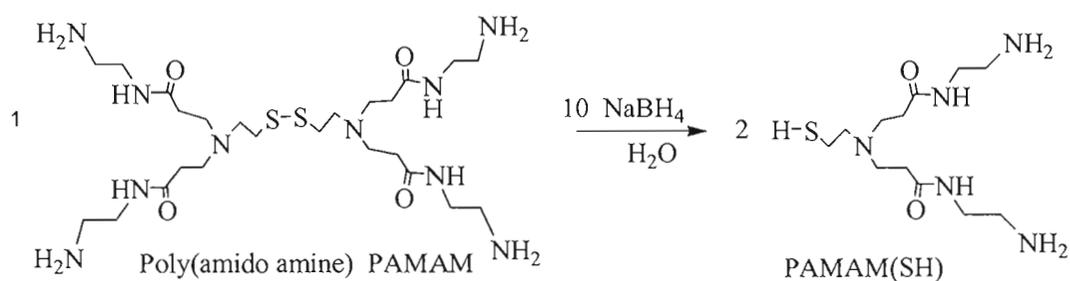
#### **2.4.7 Synthèse de PAMAM(G<sub>0</sub>)-mannose sur un monocristal d'or (111)**

Le *p*-isothiocyanate phényle β-D-galactopyranoside (6.6 mg) est dissous dans 2 mL d'eau. Le pH de la solution est ajusté à 9 avec du NaOH 0,1 M. L'électrode d'or (111) avec la couche de PAMAM est trempé dans cette solution sous agitation à la température de la pièce

pendant 1 h. Le pH est maintenu à 9. Ensuite, la solution contenant l'électrode est mise à 4 °C pendant 19 h. Pour arrêter la réaction, le pH est ajusté à 7 avec HCl 0,1 M. L'électrode est lavé avec de l'acétone et de l'eau nanopure.

#### 2.4.8 Synthèse de PAMAM-SH

Pour réduire la liaison S-S de la molécule de PAMAM et pour obtenir deux molécules de thiol (PAMAM-SH), les solutions suivantes ont été préparées : 609 mg PAMAM dans 50 mL de méthanol et 142 mg NaBH<sub>4</sub> dans 25 mL de méthanol. Le réducteur a été ajouté goutte à goutte tout en mélangeant à la solution de PAMAM. La solution a été agitée pendant 1h. Le méthanol a été ensuite évaporé à 45 °C à l'aide d'un rotavap. La réaction est présentée sur la figure 2.6.



**Figure 2.6** Synthèse de PAMAM-SH à partir de PAMAM

## **2.5 Caractérisation des nanoparticules et tests d'affinité**

### **2.5.1. IR**

Le spectre de Au-PAMAM( $G_0$ ) dissous dans le méthanol (référence méthanol) a été mesuré avec un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) Nicolet AVATAR 370 Csl, de Thermo Electron Corporation. Le logiciel d'acquisition est OMNIC<sup>TM</sup>.

Les conditions expérimentales sont : 16 balayages; correction de ligne de la base; résolution de  $2\text{ cm}^{-1}$ .

### **2.5.2. UV-Vis**

La taille des nanoparticules d'or a été déduite par la mesure du spectre d'adsorption UV-Vis (Hosteler et al, 1998). L'appareil utilisé est un spectromètre UV-Vis de type séquentiel Cary 100 Bio UV-Vis de Varian, avec un logiciel CARY WinUV. Les conditions expérimentales sont : double faisceau; correction de la ligne de base; changement de filtre à 300 nm; 16 balayages; fente de  $2\text{ cm}^{-1}$ ; cellule de quartz.

Les spectres UV-Vis de Au-PAMAM 0,15 mM dans l'eau (référence eau) et dans le méthanol (référence méthanol) ont été mesurés de 200 à 900 nm.

### **2.5.3. Analyse thermogravimétrique (TGA)**

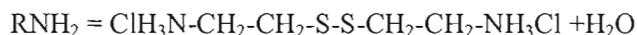
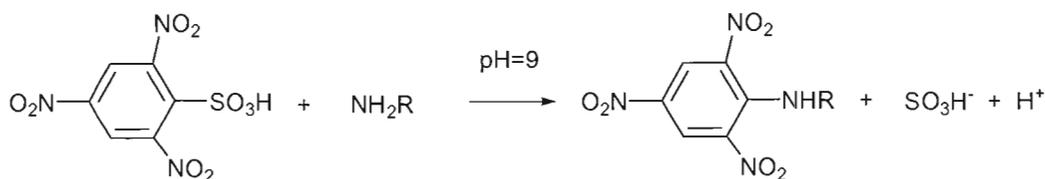
L'analyse thermogravimétrique consiste en un chauffage progressif pour volatiliser la fraction organique de la nanoparticule recouverte de dendrimères. Le pourcentage de la partie organique est calculé en comparant la masse de l'échantillon avant et après le chauffage.

L'appareil utilisé est le TG/DTAG200, EXTAR 6000 Thermal Instrument de Seiko. L'alumine est utilisée comme référence. L'échantillon est d'abord chauffée progressivement de  $30\text{ °C}$  à  $100\text{ °C}$  ( $5\text{ °C}$  par minute) et laissé 10 minutes à  $100\text{ °C}$  dans le but d'éliminer

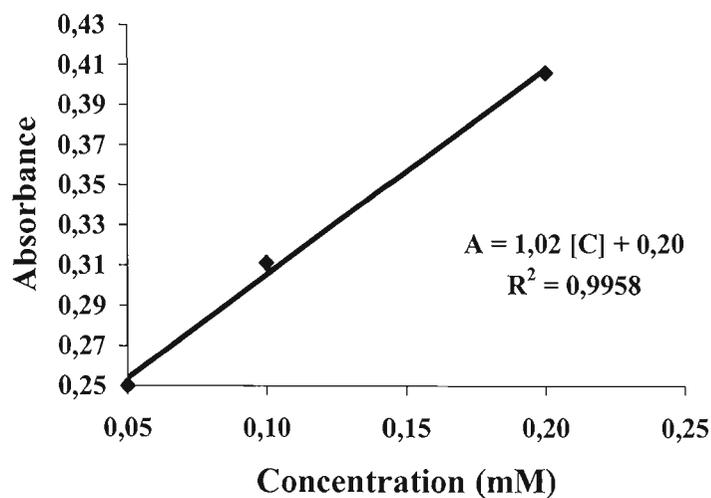
l'eau. Ensuite, le chauffage de 100 ° C à 600 ° C (10 ° C par minute) a permis de déterminer la fraction organique.

#### 2.5.4 Quantification des amines primaires par l'acide 2,4,6-trinitrobenzène-1-sulfonique (TNBS)

La quantification des amines primaires a été faite avec l'acide 2,4,6-trinitrobenzène-1-sulfonique qui réagit spécifiquement avec les amines primaires (Cayot et Tainturier, 1997; Kim, Oh et Crooks, 2004). Une solution aqueuse de 1 mL Au-PAMAM (0,1 mM) a été mélangée avec 1 mL solution tampon ( $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,1 M + KOH 0,5 M, pH = 9) et 1 mL TNBS 0,1 %. Cette solution a été chauffée à 70 ° C pendant 2 h. La réaction correspondante est présentée à la figure 2.7. Pour arrêter la réaction, 0,5 ml de HCl 1 M est ajouté. La courbe de calibration est obtenue à partir de solutions de dihydrochlorure de cystamine de 0,05 mM à 0,2 mM. Le spectre UV-Vis a été mesuré dans la région de 300 à 500 nm. Comme blanc un mélange de 1 mL solution tampon, 1 mL TNBS 0,1 % et 1 mL  $\text{H}_2\text{O}$  nanopure a été utilisé. La courbe de calibration est présentée à la figure 2.8.



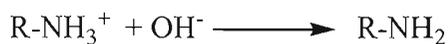
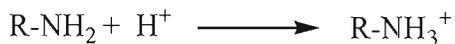
**Figure 2.7** Quantification des amines primaires par réaction avec le TNBS.



**Figure 2.8** Courbe d'étalonnage pour la quantification des amines primaires.

### 2.5.5 Titrage en retour – détermination du pKa des amines terminales

Pour déterminer le pKa des amines terminales de Au-PAMAM, une solution de Au-PAMAM 0,272 mM dans HCl 40 mM a été titrée avec KOH 40 mM. La réaction est présentée sur la figure 2.9.



**Figure 2.9.** Titrage en retour pour la détermination du pKa des amines terminales.

### 2.5.6. Taille de particules d'or recouvertes de dendrimères

La mesure de la taille des particules est basée sur la dispersion angulaire de la lumière par des particules se trouvant en solution. Le détecteur est placé à une distance fixe de l'échantillon. Toutes les molécules sont animées d'un mouvement brownien. Les petites molécules se déplacent plus rapidement que les plus grandes. La distance que la lumière diffractée doit parcourir jusqu'à détecteur varie en fonction du temps et de la taille de particule. En mesurant cette variation l'appareil est capable de déduire le diamètre des particules (Instruction Manual for 90Plus/BI-MAS).

Les mesures du diamètre de particules pour chaque solution sont faites en triplicata avec l'appareil 90Plus/BI-MAS, Multi Angle Particle Option, Brookhaven Instruments Corporation. Chaque mesure est une moyenne de 10 mesures que l'appareil calcule automatiquement. L'option MSD (Multimodal Size Distribution) est utilisée afin d'avoir une représentation plus sophistiquée de taille des particules (Grabowski et Morrison, 1983). Il est possible d'avoir plus qu'une distribution de la taille pour un échantillon contenant des particules de taille non uniforme.

Dans le but de mesurer la variation du diamètre des particules Au-PAMAM et du dendrimère PAMAM par rapport au pH, six solutions de Au-PAMAM et quatre solutions de PAMAM ont été préparées comme suit:

- 10 mL Au-PAMAM (G<sub>0</sub>) 0,34 mM + 40 mL HCl 0,05 M (pH = 1,6)
- 10 mL Au-PAMAM (G<sub>0</sub>) 0,34 mM + 2 mL HCl 0,05 M + 38 ml H<sub>2</sub>O (pH = 2,7)
- 10 mL Au-PAMAM 0,34 mM + 40 mL tampon CH<sub>3</sub>COONa / CH<sub>3</sub>COOH (pH = 5)
- 10 mL Au-PAMAM (G<sub>0</sub>) 0,34 mM + 40 mL KCl 0,01 M (pH = 8,5)
- 10 mL Au-PAMAM (G<sub>0</sub>) 0,34 mM + 40 mL tampon H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> / NaOH (pH = 10)
- 10 mL Au-PAMAM (G<sub>0</sub>) 0,34 mM + 40 mL KOH 0,052 M (pH = 12,6)
- 10 mL PAMAM 0,34 mM + 40 mL HCl 0,05 M (pH = 1,6)
- 10 mL PAMAM 0,34 mM + 40 mL KCl 0,01 M (pH = 8,5)
- 10 mL PAMAM 0,34 mM + 40 mL tampon H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> / NaOH (pH = 10)
- 10 mL PAMAM 0,34 mM + 40 mL KOH 0,052 M (pH = 12,6)

Toutes les solutions ont été faites dans l'eau déionisée.

Pour mesurer la variation du diamètre des particules Au-PAMAM par rapport à la force ionique au pH = 12, des solutions de Au-PAMAM de forces ionique différentes ont été préparées. Les forces ioniques ont été ajustées à l'aide de KOH 0,052 M, KCl 0,1 M et H<sub>2</sub>O nanopure.

Pour mesurer la variation du diamètre de particules Au-PAMAM par rapport à la force ionique au pH = 2,7 des solutions de Au-PAMAM de forces ionique différentes ont été préparées à l'aide de HCl 0,05 M, KCl 0,1 M et H<sub>2</sub>O nanopure.

### 2.5.7. Potentiel zeta

Le potentiel zeta donne la charge portée par la molécule. Les mesures sont faites sur le même appareil et en utilisant le même principe (dispersion angulaire de la lumière par des particules) que pour la mesure de la taille des particules (2.5.6). Deux électrodes sont placées dans la cellule contenant l'échantillon (Instruction Manual for 90Plus/BI-MAS). Le potentiel zeta est obtenu par la mesure de la vitesse de déplacement des particules lorsqu'elles sont soumises à l'action d'un champ électrique (les molécules plus chargées se déplacent plus vite vers les électrodes). La cellule utilisée est en plastique, les électrodes en Pt, le logiciel utilisé est Zeta Plus Analyzer. Le potentiel zeta de Au-PAMAM(G<sub>0</sub>) a été mesuré pour les solutions de pH 1,6; 8,5 et 12,6.

### 2.5.8. Fluorescence

L'appareil utilisé est un spectromètre de fluorescence Luminescence Spectrometer LS50B, Perkin Elmer, Wellesley, USA simple faisceau avec un logiciel Flwinlab. Les conditions expérimentales sont : fente de 3 à 5 nm; température 4 °C ou 25 °C. Comme blanc un solution tampon phosphate (PBS) de pH 7,4 est utilisé (1.03 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O; 0.16 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O et 4.5 g NaCl 0.9 %).

L'atténuation de la fluorescence de Con A conjugué avec fluorescéine ou TMR par les nanoparticules d'or a été étudiée en utilisant les longueurs d'onde d'excitation indiquées dans la littérature (Maxwell, Taylor et Nie, 2002; Dubertret, Calame et Libchaber, 2001; Product

Information, Molecular Probes, 2002); pour la fluorescéine : excitation à 494 nm, émission à 523 nm et pour TMR : excitation à 555 nm, émission à 580 nm.

#### **2.5.8.1. Atténuation de la fluorescence de Con A-fluorescéine par les nanoparticules d'or**

Pour ajuster les conditions afin d'étudier la stabilité des solutions la mesure de la fluorescence a été faite à 523 nm pendant 6 jours d'une solution de Au-PAMAM-mannose : Con A-fluorescéine en proportions 2 : 1 qui a été conservée à une température de 25 °C ou à 4 °C (excitation à 494 nm, fente utilisée de 4 nm). Les spectres UV-visible ont été également pris.

Le phénomène d'atténuation de la fluorescence par les nanoparticules d'or par rapport à la température et le temps a été étudié. La fluorescence d'une solution de Au-PAMAM-mannose : Con A-fluorescéine en proportions 2 : 1 à une température de 25 °C et de 4 °C (fente de 5 nm) a été mesurée pendant 2 heures. Les solutions sont préparées dans le PBS. La concentration de Con A-fluorescéine est de 2,5 µg/mL. Comme référence une solution de Con A-fluorescéine 2,5 µg/mL a été utilisée. Pour toutes les mesures de fluorescence, la solution de PBS a été utilisée comme blanc.

Les mesures de fluorescence de solutions ayant différents rapports Au : fluorescéine (1 : 1; 2 : 1; 10 : 1 et 50 : 1) ont été faites. La concentration de Con A-fluorescéine dans les solutions été de 2,5 µg/mL.

Les mesures de fluorescence de solutions ayant les concentrations en nanoparticules et en fluorophores plus élevées (12,5 µg/mL et 25 µg/mL) ont été faites. Les rapports Au : fluorescéine étaient de 5 : 1 et 10 : 1.

#### **2.5.8.2 Atténuation de la fluorescence de Con A-TMR par les nanoparticules d'or**

Les mesures de fluorescence ont été effectuées en excitant à une longueur d'onde de 555 nm et en mesurant l'émission à 580 nm, à 4 °C avec une fente de 5 nm. Les rapports Au-PAMAM(G<sub>0</sub>)-mannose : Con A-TMR employés sont de 5 : 1 et 10 : 1. La concentration de

Con A-TMR dans les solutions a été de 12,5 µg/mL. La référence est une solution de Con A-TMR de 12,5 µg/mL.

#### **2.5.8.3. Mesure de la fluorescence de Au-PAMAM(G<sub>0</sub>)-mannose-FITC (99 : 1)**

La fluorescence d'une solution de Au-PAMAM(G<sub>0</sub>)-mannose-FITC(99 : 1) et d'un mélange de Au-PAMAM-mannose-FITC(99 : 1) 0,1 mg/mL et Con A 0,1 mg/mL a été mesurée à 523 nm suite à une excitation fixée à 494 nm (fente utilisée de 5 nm, à 25 °C).

#### **2.5.8.4. Préparation des échantillons de Con A (*E.coli*) et Au-PAMAM(G<sub>0</sub>)-mannose-FITC (99 : 1)**

Les nanoparticules Au-PAMAM(G<sub>0</sub>)-mannose-FITC (1,5 mL; 0,1 mg/mL) sont mis en présence de Con A (0,5 mL; 2 mg/mL) ou *E.coli* (solution concentrée). Le précipité est rincé 3 fois avec de l'eau nanopure et centrifugé pendant 20 - 30 min, ensuite il est mis en suspension dans de l'eau nanopure. La fluorescence est mesurée avec un spectromètre LS50B. La fluorescence du surnageant après chaque lavage est également mesurée.

### **2.5.9 Immunoprécipitation**

Les tests d'immunoprécipitation consistent à précipiter des lectines ayant une spécificité pour le mannose en les mettant en présence de nanoparticules modifiées avec du mannose (Pagé et Roy, 1997).

#### **2.5.9.1 Immunoprécipitation de Con A (Con A-fluorophore) par Au-PAMAM-mannose**

Tous les tests d'immunoprécipitation sont faits en mélangeant 1 mL de Con A (Con A-fluorescéine, Con A-TMR) (1 mg/mL) avec 1 mL Au-PAMAM-mannose (Au-PAMAM-

galactose) (1 mg/mL). Un test de réversibilité de la précipitation a été également fait en ajoutant un excès de D-mannose.

#### **2.5.9.2 Immunoprécipitation de Con A ou *E.coli* par Au-PAMAM-mannose-fluorophore**

Le test d'immunoprécipitation est fait en mélangeant 1 mL Con A (1 mg/mL) ou *E.coli* (solution concentrée) avec 1 mL Au-PAMAM( $G_0$ )-mannose-FITC (1 mg/mL). La réaction est réversible si D-mannose en excès est ajouté.

#### **2.5.10. Modélisation moléculaire**

Les nanoparticules modifiées avec des sucres et des fluorophores vont être utilisées comme marqueurs pour les bactéries ayant des récepteurs pour le mannose. Leur emploi demande une bonne solubilité dans l'eau. En plus, pour une bonne reconnaissance avec les bactéries, il est important que les branches des dendrimères aient une structure ouverte. Pour vérifier si c'est le cas, la structure la plus plausible des dendrimères PAMAM( $G_0$ ), PAMAM( $G_0$ )-mannose et PAMAM( $G_0$ )-mannose-FITC est visualisée par la méthode de modélisation moléculaire. Les structures hydratées et les spectres IR correspondants sont aussi calculés.

Le logiciel CAChe Work System 6.1 (Fujitsu Limited) est un outil de la modélisation moléculaire assisté par ordinateur. Il permet le calcul de la structure de molécules et de propriétés moléculaires. Le programme aide à la compréhension de la structure et de la réactivité moléculaire. Dans un premier temps l'optimisation de la structure des dendrimères est effectuée. La méthode semi-empirique MOPAC est employée. L'optimisation implique la recherche de la géométrie la plus stable ou la structure d'énergie minimale d'une molécule. Le calcul de la géométrie de la molécule est basé sur l'équation de Schrödinger ou des méthodes semi-empiriques. Le logiciel calcule l'énergie liée à la chaleur de formation pour les différentes structures de la molécule, jusqu'il trouve l'énergie minimum.

La distance entre les atomes ainsi que différentes propriétés moléculaires de PAMAM, PAMAM-mannose et PAMAM-mannose-FITC sont calculées avec la méthode MOPAC en

utilisant des paramètres PM3. Le spectre vibrationnel est aussi obtenu avec la méthode MOPAC PM3 en utilisant la géométrie optimisée avec PM3. Les structures les moins énergétiques de PAMAM, PAMAM-mannose et PAMAM-mannose-FITC dans l'eau sont obtenues avec «*MOPAC - PM3 in water*».

#### **2.5.11. Microscopie confocale**

*CSLM (Confocal Scanning Light Microscopy) modèle MRC 1024ES, Bio RAD.* Les conditions expérimentales sont: longueur d'onde d'émission de 523 nm pour les capteurs contenant de FITC; longueur d'onde d'émission de 580 nm pour les capteurs contenant de TRITC. La technique est décrite dans Barkenhoff et al (1979) et Valkenburg et al (1984).

#### **2.5.12. Préparation des échantillons de bactérie *E. coli***

Une goutte de la souche d'*Escherichia coli* (*E. coli*) CFT073 ayant des fibrilles de type-1 est diluée dans 5 mL de bouillon de culture. Le mélange est laissé 48 h à 37 °C sous agitation. Une petite quantité de ce mélange est prélevée et déposée dans un vase de pétrie recouvert de gel nutritif. Le vase de pétrie est maintenu à 37 °C pendant 12 h. De cette façon la première colonie de la bactérie est obtenue. Pour arriver aux colonies suivantes la même procédure est suivie avec un temps d'incubation dans le bouillon de culture de 24 h et dans le vase de pétrie de 12 h.

#### **2.5.13 Préparation des échantillons de bactéries et particules d'or sur des plaques de verre**

Des plaques de verre sont trempées dans une solution de poly-L-lysine pendant une journée pour s'assurer de l'adhésion des bactéries, puis lavées en PBS (ou l'eau nanopure) et séchées. Cent  $\mu\text{L}$  du bouillon contenant la bactérie en suspension et 100  $\mu\text{L}$  d'une solution de

Au-PAMAM-mannose-FITC (99 : 1) (1 mg/mL) sont mélangés pendant 10 min, puis disposés sur la plaque préparée précédemment. La plaque est maintenue à 37 °C 1 h, ensuite lavée avec une solution de PBS pendant 10 minutes, immergée dans le paraformaldéhyde 4 % pendant 20 minutes pour fixer les bactéries et lavée de nouveau avec PBS (Karlsson et al, 1995; Stoimenov et al, 2002). La conservation des plaques se fait dans le PBS à 4 °C.

Pour s'assurer que les bactéries ne fluorescent pas, une plaque avec 200 µL de bouillon contenant la bactérie est préparée et mesurée en utilisant la méthode mentionnée précédemment.

#### **2.5.14 Préparation de bouillon de culture (LB Broth)**

Pour la préparation d'un litre de bouillon de culture; 10 g de NaCl, 10 g de trypton et 10 g de levure sont nécessaires. Le bouillon est fait dans l'eau nanopure. Le pH est ajusté à 7 à l'aide de NaOH 5 N. Le bouillon est passé à l'autoclave à 120 °C pour 60 minutes. Le bouillon est conservé à 4 °C.

#### **2.5.15 Préparation de gel de bouillon de culture (LB Agar)**

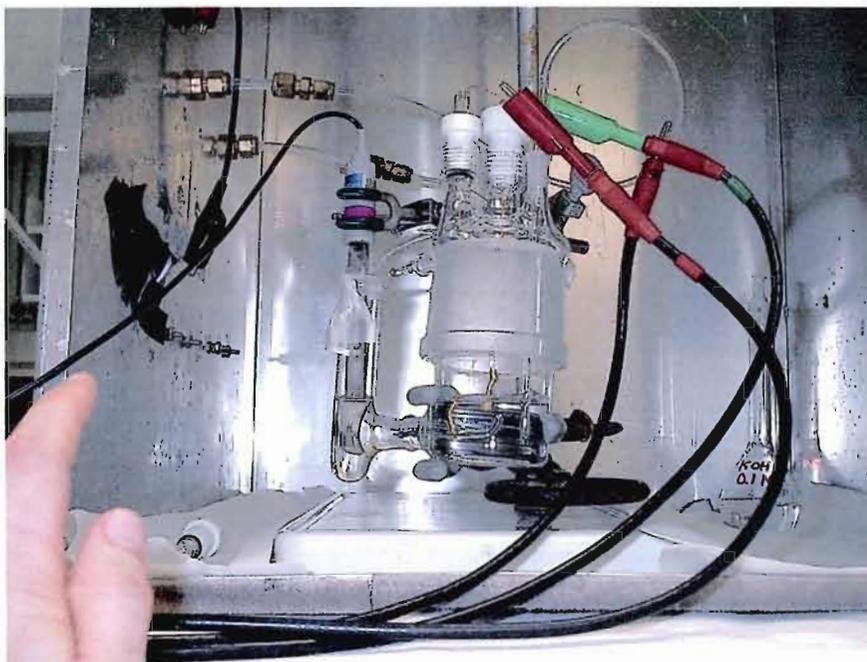
La préparation d'un litre de gel de bouillon requiert la solubilisation de 10 g de NaCl, 10 g de trypton, 10 g de levure et 20 g d'agar dans l'eau nanopure. Le pH est ajusté à 7 à l'aide de NaOH 5 N. Le bouillon est passé à l'autoclave à 120 °C pour 60 minutes, ensuite déposé dans les vases de pétries (25 mL/100 mm<sup>2</sup>). Les pétries sont conservées à 4 °C.

## 2.6 Electrochimie

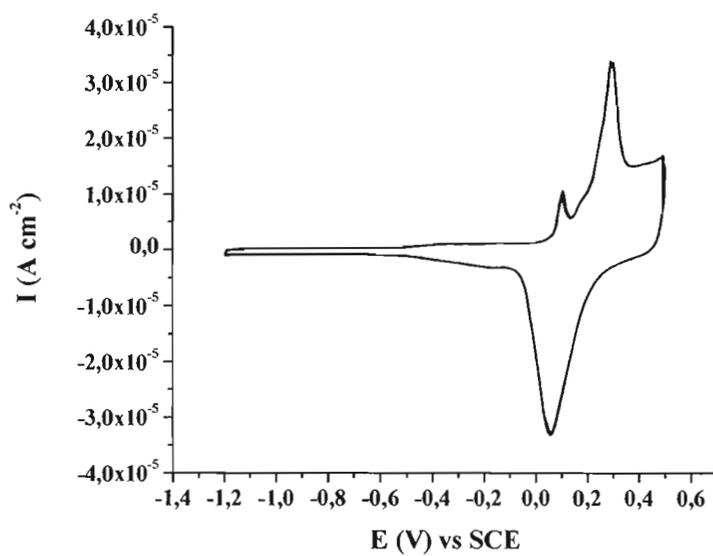
### 2.6.1 Cellule électrochimique et électrodes

Un monocristal d'or (111) a été utilisé pour la voltampérométrie cyclique et la spectroscopie d'impédance électrochimique. La cellule à trois électrodes utilisée pour faire les mesures électrochimiques (figure 2.10) est immergée dans l'acide sulfurique concentré chaud pendant une heure et rincée avec de l'eau nanopure. L'électrode de calomel saturé (SCE) est l'électrode de référence et l'électrode de travail est l'Or (111) ayant une surface de  $0,195 \text{ cm}^2$ . La contre électrode est un fil d'or ayant une surface beaucoup plus grande que celle de l'électrode de travail. L'orientation (111) de la surface d'or est utilisée à cause de sa stabilité et sa densité. La structure de l'or cristallin est cubique à faces centrées. Le plan (111) coupe le cube selon sa diagonale. Une telle surface (111) est obtenue par un polissage mécanique suivi d'un polissage électrochimique. La surface d'or peut contenir des défauts (en général autour de 5 %).

La déposition électrochimique de PAMAM( $G_0$ ) sur l'or (111) a été faite dans des solutions aqueuses de 0,1 M KOH après un barbotage dans l'argon ultra pur pendant 20 minutes. Un flux d'argon continu est utilisé pour empêcher la contamination de l'électrolyte avec de l'oxygène. La contre électrode et l'électrode de travail sont recuites à la flamme (gaz naturel-air) avant chaque utilisation afin de nettoyer la surface du réseau cristallin. Trente secondes après le recuit les électrodes sont rincées avec de l'eau nanopure. La vérification de la qualité du monocristal et la pureté de l'électrolyte se font en effectuant la voltampérogramme cyclique dans une solution de KOH 0,1 M (voir figure 2.11) et en comparant avec la littérature (Hamelin et al, 1990).



**Figure 2.10** Photo de la cellule électrochimique à trois électrodes utilisée pour effectuer les mesures électrochimiques.



**Figure 2.11** Voltampérogramme cyclique du monocristal d'or (111) dans KOH 0,1 M, vitesse de balayage de  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .

### 2.6.2 Voltampérométrie cyclique

Cette méthode consiste la mesure du courant en fonction du potentiel. Un potentiel variant linéairement dans le temps est appliqué sur l'électrode de travail où les réactions se déroulent. Pour se faire un potentiostat est utilisé où les trois électrodes sont connectées. Un ménisque est formé entre la solution et le monocristal de telle façon que les mesures impliquent seulement la surface du monocristal. Le courant varie dépendamment de la présence d'espèces oxydable ou réductible près de l'électrode pour un potentiel donné. L'appareil utilisé est un Solartron SI 1287 et les logiciels sont CorrWare™ et CorrView™.

### 2.6.3 Déposition oxydative de PAMAM ou PAMAM-SH sur Au(111)

La déposition potentiostatique est effectuée à partir d'une solution de PAMAM (PAMAM-SH) de concentration de  $2 \times 10^{-5}$  M dans KOH 0,1 M, à un potentiel de -0,5 V vs référence (ECS) pendant 10 minutes. Vitesse de balayage du potentiel de 20 mV/s.

### 2.6.4 Spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)

Cette technique permet d'estimer la capacité de la double couche formée à l'interface entre l'électrode et la solution. Les mesures sont faites entre -0,3 V à -0,5 V vs ECS, où il n'y a pas de courant faradique. Quand la surface de l'électrode est propre, la charge accumulée à l'interface électrode/solution est grande, donc la capacité est grande. Avec le blocage de la surface de l'électrode par les molécules de PAMAM, l'accumulation des charges à l'interface électrode/solution devient difficile et la capacité diminue. Le circuit électrique peut être présenté par une séquence de résistance et capacité. Si la résistance augmente (le blocage de la surface de l'électrode augmente) la capacité diminue. Les appareils utilisés sont des Solartron SI 1287 et SI 1280. Les logiciels employés sont CorrWare™ pour prendre les mesures et CorrView™ pour la visualisation et l'analyse.

Les mesures de capacité et de résistance sont prises dans le PBS (pH = 7,4) à la température de la pièce. Les conditions expérimentales sont: fréquence de 20 Hz, amplitude de 10 mV, vitesse de balayage de 5 mV/s. Les mesures sont faites en triplicata avec l'appareil Schlumberger SI 1260. Le logiciel d'acquisition pour prendre les mesures est ZPlot™, et pour la visualisation ZView™.

### 2.6.5. Microbalance de cristal de quartz (QCM)

Des films d'or sont utilisés pour les mesures QCM (Microbalance à cristal de quartz). L'expérience de QCM a été effectuée avec un analyseur de cristal de quartz EG&G, modèle QCA-917 relié à un potentiostat EG&G 263A (Perkin Elmer). Le logiciel d'acquisition été CorrWare™ et le logiciel d'analyse de données CorrView™.

L'adsorption oxydative des dendrimères se fait sur un film d'or déposé sur un cristal de quartz. Cette déposition cause un changement de la fréquence de résonance du cristal. Le changement de masse sur la surface d'or est calculé à partir du changement de la fréquence à l'aide de l'équation de Sauerbrey:

$$\Delta f = - 2f_0^2 \Delta m / A (\mu_q \rho_q)^{1/2} \quad (2.1)$$

où  $m$  est la masse en ng,  $f$  est la fréquence de résonance du cristal de quartz en Hz,  $A$  est la surface active en  $\text{cm}^2$ ,  $f_0$  est la fréquence du cristal de quartz avant le changement de la masse,  $\rho_q$  est le densité du cristal. Toutes les termes sauf  $\Delta m$  et  $\Delta f$  sont constants (Deyu Qu et Morin, 2001), donc dans notre cas on peut écrire que :

$$\Delta m = - 5,608 \Delta f \text{ ng cm}^{-2} \text{ Hz}^{-1} \quad (2.2)$$

Le cristal de quartz peut être relié à une cellule de trois électrodes (voir figure 2.12), dont le cristal de quartz est utilisé comme électrode de travail (EQCM ou electrochemical quartz crystal microbalance). De cette façon il est possible d'enregistrer le voltampérogramme cyclique en même temps que le changement de la fréquence. La masse sur la surface d'or peut être calculée de deux façons : (1) à partir de la fréquence et (2) à partir du charge du pic de réduction par l'équation suivante :

$$m (\text{g cm}^{-2}) = \text{Charge (C)} / (MM (\text{g mol}^{-1}) / S (\text{cm}^2) F (\text{C mol}^{-1})) \quad (2.3)$$

où  $S$  est la surface de l'électrode =  $0,22 \text{ cm}^2$  (Qu, D. et M. Morin (2001, 2004),  $F$  est la constante de Faraday =  $96\,485 \text{ C mol}^{-1}$  et  $MM$  est la masse molaire de  $\frac{1}{2}$  molécule de PAMAM =  $304,5 \text{ (g mol}^{-1})$ . La comparaison entre les deux valeurs donne de l'information sur l'exactitude de travail.



**Figure 2.12.** Microbalance de cristal de quartz (QCM922) reliée à une cellule de trois électrodes. Reproduit de Princeton Applied Research, [www.princetonappliedresearch.com](http://www.princetonappliedresearch.com).

La cellule à trois électrodes utilisée pour faire les mesures électrochimiques est immergée dans l'acide sulfurique concentré chaud pendant une heure et rincée avec de l'eau nanopure. L'électrode de calomel saturé (ECS) est l'électrode de référence, et la contre-électrode est un fil d'or. Le cristal de quartz utilisé dans cette étude comporte une coupure AT qui assure une fréquence assez élevée.

La déposition électrochimique de PAMAM( $G_0$ ) sur l'or a été faite dans des solutions aqueuses de  $0,5 \text{ M KOH}$  après un barbotage dans l'argon ultra pur pendant 25 minutes. Un flux d'argon continu est utilisé pour empêcher la contamination de QCM avec de l'oxygène. La contre électrode est recuite à la flamme (gaz naturel) et rincée avec de l'eau nanopure avant chaque utilisation. La surface d'or de QCM est immergée dans  $\text{H}_2\text{SO}_4$  99,99 % pendant 15 minutes et rincée avec de l'eau nanopure suivie par un rinçage avec éthanol 99,99 % et séchage. Pour s'assurer de la propreté de la surface d'or des voltampérogrammes cycliques dans  $\text{KOH } 0,5 \text{ M}$  ont été mesurés avant chaque déposition.

### 2.6.6 Dépôt chrono-ampérométrique de PAMAM

La dépôt chrono-ampérométrique de PAMAM consiste à fixer le potentiel pendant 5 minutes à -1.3 V (là où il n'y a pas de dépôt de thiols) pour stabiliser l'appareil et ensuite de l'échanger à -0.5 V pendant 10 minutes pour faire la dépôt.

### 2.7 Références

- Barkenhoff, G. 1979. «Imaging modes in confocal scanning light microscopy (CSLM)». *J. Microsc.*, vol. 117, p. 233-242.
- Bogdan, N., M. Bozoukova, R. Roy et M. Morin. Soumis. «Water-soluble glycodendrimer-coated gold nanoparticles as sensors for lectins and fimbriated bacteria».
- Brust, M., M. Walker, D. Bethell, D. Schiffrin et R. Whyman. 1994. «Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system». *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, p. 801-802.
- Cayot, P. et G. Tainturier. 1997. «The quantification of protein amino groups by the trinitrobenzenesulfonic acid method: a reexamination». *Analytical Biochemistry*, vol. 249, p. 184-200.
- Instruction manual for 90Plus/BI-MAS Multi angle particle sizing option operation manual, Brookhaven Instruments Corporation, New York, U.S.A.
- Grabowski, E. et I. Morrison. 1983. «Particle size distributions from analysis of quasi-elastic light scattering data», dans «Measurement of suspended particles by quasi-elastic light scattering», chapitre 7. Édition par B. Dahneke, Wiley-Interscience, New York.
- Hamelin, A., M. Sottomayor, F. Silva, S.-C. Chang et M. Weaver. 1990. «Cyclic voltammetric characterization of oriented monocrystalline gold surfaces in aqueous alkaline solution». *J. Electroanal. Chem.*, vol. 295, p. 291.
- Hosteler, M., J. Wingate, C. Zhong, J. Harris, R. Vachet, M. Clark, J. Londono, S. Green, J. Stokes, G. Wignall, G. Glish, M. Porter, N. Evans et R. Murray. 1998. «Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: core and monolayer properties as a function of core size». *Langmuir*, vol. 14, p. 17 – 30.

- Karlsson, A., M. Markafjall, H. Lundqvist, N. Stromberg et C. Dahlgren. 1995. «Detection of glycoprotein receptors on blotting membranes by binding of live bacteria and amplification by growth». *Analytical Biochemistry*, vol. 224, p. 390-394.
- Kim, Y.-G.; S.-K. Oh, R. Crooks. «Preparation and characterization of 1-2 nm dendrimer-encapsulated gold nanoparticles having very narrow size distributions». 2004. *Chem. Mater.*, vol. 16(1), p. 167-172.
- Klopper, J., R. Mielke, M. S. Wong, K. Neelson, G. Stucky, et J. Nadeau. 2003. «Quantum dots as strain – and metabolism-specific microbiological labels». *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, p. 4205 – 4213.
- Page, D. et R. Roy. 1997. «Synthesis and biological properties of mannosylated starburst poly(amidoamine) dendrimers». *Bioconjugate Chem.*, vol. 8, No. 5, p. 714 – 723.
- Qu, D. et M. Morin. 2001. «An EQCM study of the oxidative deposition of alkylthiolates on gold». *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 517, 45–53.
- Qu, D. et M. Morin. 2004. «The effect of concentration on the oxidative deposition of a monolayer of alkylthiolate on gold: from island formation to random adsorption». *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 565, p. 235–242.
- Stoimenov, P., R. Klinger, G. Marchin et K. Klabunde. 2002. «Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents». *Langmuir*, vol. 18, p. 6679-6686.
- Tomalia, D., H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Rocck, J. Ryder et P. Smith. 1985. «A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules». *Polym. J.*, vol. 17, p. 117.
- Valkenburg, J., C. Woldringh, G. Brakenhoff, H. van der Voort et N. Nanning. 1984. «Confocal scanning light microscopy of the Escherichia coli nucleoid : compareson with phase-contrast and electron microscope images». *Journal of Bacteriology*, vol. 161, p. 478-783.

## CHAPITRE III

# CARACTÉRISATION DE NANOPARTICULES D'OR RECOUVERTES DE DENDRIMÈRES

### 3.1 Introduction

Dans ce chapitre, les nanoparticules d'or recouvertes de PAMAM synthétisées par les méthodes décrites dans le chapitre 2 sont caractérisées par la spectroscopie UV-Vis et IR afin de vérifier l'efficacité de leur synthèse. Le potentiel zeta a été déterminé et le pKa des amines terminales a été mesuré.

Un autre objectif de cette étude est la détermination du nombre de moles des amines terminales par gramme de Au-PAMAM( $G_0$ ) à partir de deux méthodes différentes soit une analyse thermogravimétrique et un titrage par acide 2,4,6-trinitrobenzène-1-sulfonique, TNBS (Cayot et Tainturier, 1997; Kim, Oh et Crooks, 2004). Le comportement des nanoparticules en solution est aussi étudié afin de vérifier leur agrégation. Comme toutes les macromolécules, les dendrimères ont tendance à s'agglomérer et une partie de leurs groupes fonctionnels à la surface peuvent alors devenir inaccessibles. Jie Zheng et ses coéquipiers (2002) ont montré que le pH détermine la stabilité des nanoparticules d'argent encapsulées dans le PAMAM-OH. À pH élevé les nanoparticules subissent une décomposition. Deux types de précipités sont formés, un de couleur noir dû à l'agglomération d'argent et un coloré dû à l'aggrégation du PAMAM-OH. Le précipité coloré est probablement le résultat d'une interaction dipôle – dipôle ou de la formation de liaisons hydrogène entre les groupes  $-NH_2$  et  $-OH$ . Zheng et ses coéquipiers (2002) ont voulu examiner le comportement d'Ag-PAMAM en fonction de la force ionique, mais l'oxydation d'Ag n'a pas permis d'effectuer cette étude.

Le problème avec l'agglomération de nanoparticule d'Au-PAMAM reste à être examiné. Avec l'or, une grande partie des problèmes mentionnés plus haut peuvent être éliminées. Par exemple, les nanoparticules d'Au-PAMAM ne se décomposent pas en changeant le pH de la solution et l'or ne subit pas d'oxydation à pH élevé.

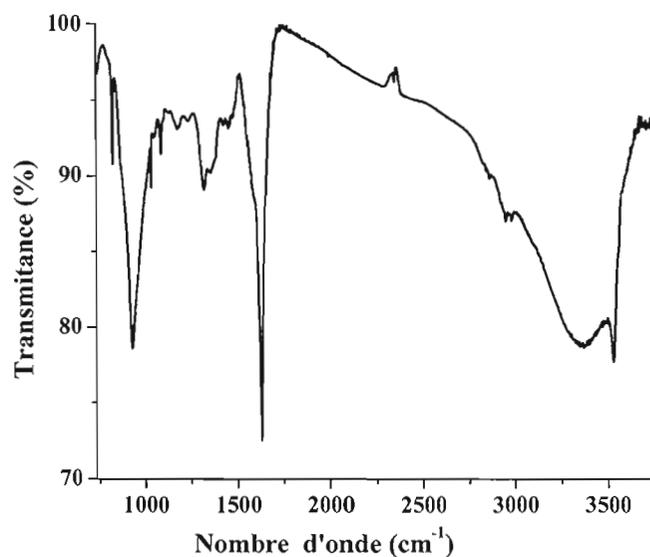
L'agrégation d'Au-PAMAM ( $G_0$ ) en fonction du pH et de la force ionique du milieu aqueux sera donc étudiée. Un autre point sera de savoir si l'agrégation se produit seulement pour Au-PAMAM( $G_0$ ) ou elle prend place pour le dendrimère PAMAM( $G_0$ ).

## 3.2 Résultats et discussion

### 3.2.1 Caractérisation

#### 3.2.1.1 Spectroscopie infrarouge

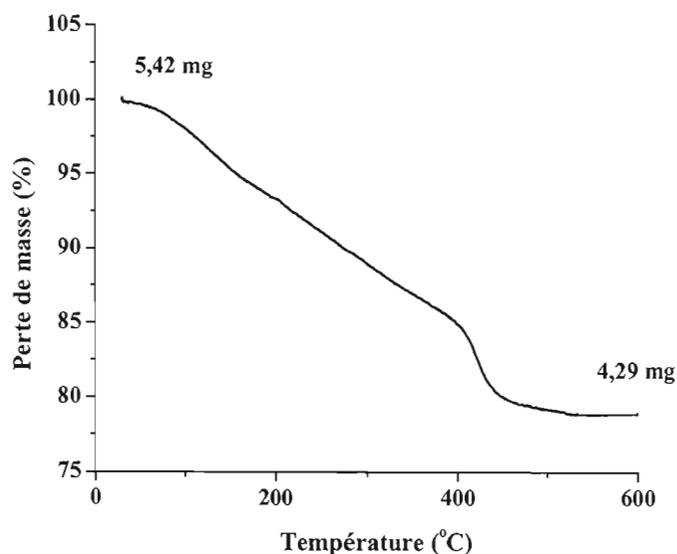
Le spectre IR de Au-PAMAM dans le méthanol (pour la méthode et l'appareillage voir le chapitre II, section 2.5.1) est présenté sur la figure 3.1. L'identification des pics (Silverstein, Basler et Morill, 1998) confirme l'adsorption de PAMAM sur les nanoparticules. On retrouve les vibrations caractéristiques de l'amide secondaire, l'amine primaire et groupements  $CH_2$ . Le pic entre  $3500$  et  $3000\text{ cm}^{-1}$  correspond aux vibrations d'élongations  $N-H$  des amines primaires et de l'amide secondaire. Les deux pics à  $2939$  et  $2860\text{ cm}^{-1}$  correspondent aux vibrations d'élongations symétriques et asymétriques  $C-H$  du groupement  $CH_2$ . La bande d'élongation de  $C=O$  de l'amide secondaire (bande I) est à  $1626\text{ cm}^{-1}$ . La bande de déformation de  $N-H$  (bande II) de l'amide secondaire est à  $1560\text{ cm}^{-1}$ . La bande d'élongation de  $C-N$  de l'amide secondaire est à  $1444\text{ cm}^{-1}$ . Les déformations angulaires de  $C-H$  donnent un pic à  $1355\text{ cm}^{-1}$ . Le pic à  $922\text{ cm}^{-1}$  correspond à l'élongation de  $C-N$  de l'amine primaire. Le pic à  $816\text{ cm}^{-1}$  correspond au balancement de  $C-H$  ( $CH_2$ ) et au balancement hors du plan de  $N-H$  ( $NH_2$ ). On ne retrouve pas les pics caractéristiques pour les esters de la génération -0,5, ce qui confirme que la synthèse de PAMAM de génération 0 est complète.



**Figure 3.1** Spectre infrarouge de l'Au-PAMAM.

### 3.2.1.2 Analyse thermogravimétrique

La thermogravimétrie est utilisée pour estimer la proportion de la masse organique de Au-PAMAM. Le chauffage linéaire de l'échantillon volatilise la fraction organique du matériau Au-PAMAM (pour la méthode et l'appareillage voir chapitre II, section 2.5.3). À une température de 600 °C la partie organique est volatilisée mais pas l'or. En comparant la masse à 100 °C et à 600 °C on peut déduire le pourcentage de la partie organique dans la nanoparticule encapsulée dans des dendrimères. Avec cette assignation on obtient que  $20,5 \pm 0,7$  % de la masse est organique. Le graphique correspondant est donné sur la figure 3.2. En sachant que la masse molaire de  $\frac{1}{2}$  molécule PAMAM( $G_0$ ) est de 304,5 g/mol on peut dire que dans 1 g de Au-PAMAM( $G_0$ ) on a 0,205 g soit  $6,7 \times 10^{-4}$  mol PAMAM( $G_0$ ) par gramme de Au-PAMAM. Comme chaque branche adsorbé sur l'or contient deux groupements  $NH_2$ , on a donc  $1,35 \pm 0,04$  mmol  $NH_2$  par gramme de Au-PAMAM( $G_0$ ).



**Figure 3.2** Analyse thermogravimétrique (TGA).

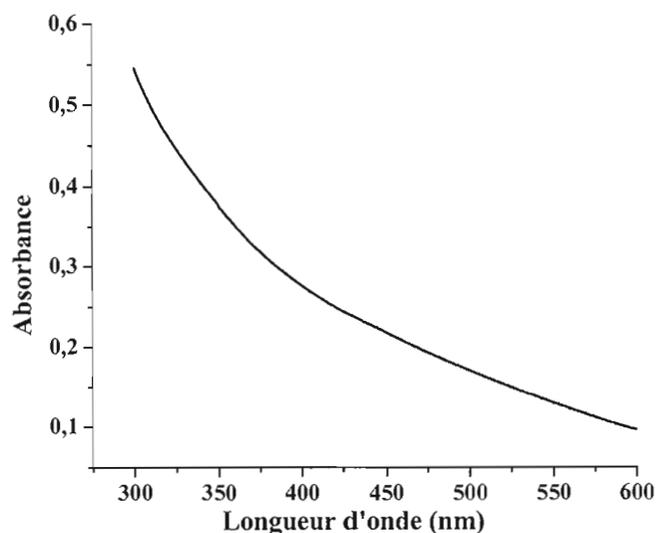
### 3.2.1.3 Quantification des amines primaires

L'acide 2,4,6-trinitrobenzène-1-sulfonique (TNBS) est un réactif utilisé pour détermination des amines primaires (Cayot et Tainturier, 1997; Kim, Oh et Crooks, 2004). La réaction est présentée à la figure 2.7, et pour la méthode voir chapitre II, section 2.5.4. La courbe d'étalonnage pour la quantification des amines primaires est présentée à la figure 2.8. Le nombre moyen de moles de  $\text{NH}_2$  calculé est de  $1,7 \pm 0,6$  mmol par gramme Au-PAMAM( $G_0$ ). Le résultat est proche du résultat obtenu par l'analyse thermogravimétrique.

### 3.2.1.4 Spectroscopie UV-Visible

La spectroscopie UV-vis fournit une estimation de la taille des nanoparticules d'or (Hosteler et al, 1998) car l'absorption de son plasmon de surface dépend de la taille de la particule. Le spectre UV-visible de Au-PAMAM dans l'eau est présenté sur la figure 3.3

(pour la méthode et l'appareillage voir chapitre II, section 2.5.2). On remarque que l'absorbance entre 300 et 600 nm augmente avec la diminution de la longueur d'onde. L'absorbance dans cette région est due à la transition entre le niveau 5d et la bande de conduction de l'or. Les nanoparticules d'or de taille supérieure à 2 nm ont une bande de plasmon de surface typique entre 500 – 550 nm superposée au spectre d'absorption, dont la position dépend de la taille de la nanoparticule (Gopidas, Whitesell, et Fox, 2003; Hosteler et al, 1998). Cette bande se déplace vers les plus basses énergies s'il y a agrégation des particules. Dans notre cas cette bande est indétectable ce qui signifie que les particules sont de taille plus petite que 2 nm. Cette interprétation est supportée par les mesures de ICP et TGA faites auparavant (Bogdan et al, soumis 2006) qui démontrent la présence d'une fraction organique très large sur les nanoparticules d'or. Le diamètre total d'une nanoparticule recouverte de dendrimères de PAMAM de génération 0 est environ 6 nm (voir chapitre V).



**Figure 3.3** Spectre d'absorption UV-visible de Au-PAMAM.

### 3.2.1.5 Détermination du pKa des amines terminales

Pour expliquer le comportement de l'Au-PAMAM ( $G_0$ ) en solution et l'impact du pH sur l'agrégation il faut connaître le pKa des amines terminales. Pour se faire, un titrage de Au-PAMAM dans HCl 0,04 M avec KOH 0,04 M a été effectuée (pour la méthode voir chapitre II, section 2.5.5). Les amines terminales de l'Au-PAMAM dans HCl se trouvent protonées. Le titrage avec KOH amène à la déprotonation. Le pKa qui est égal au pH au point de demi-équivalence est de 1,8. La formation des liaisons hydrogènes intermoléculaires et intramoléculaires semble avoir un effet sur le pKa observé. Les résultats sont présentés sur la figure 3.4.

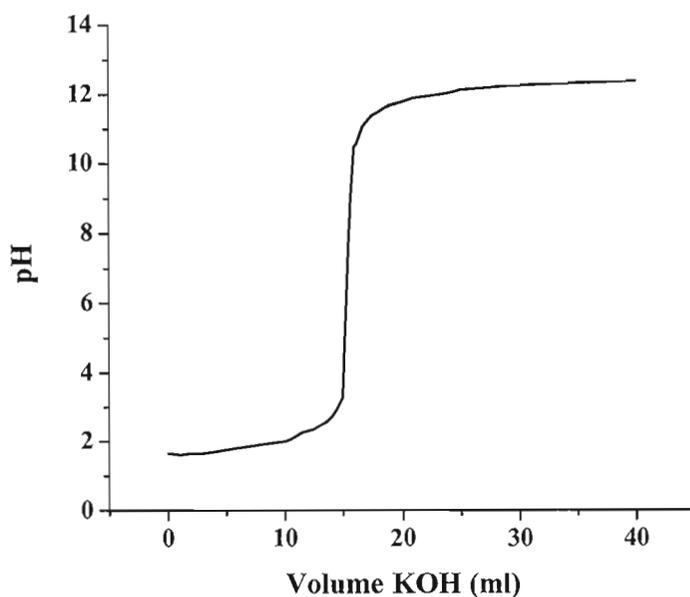


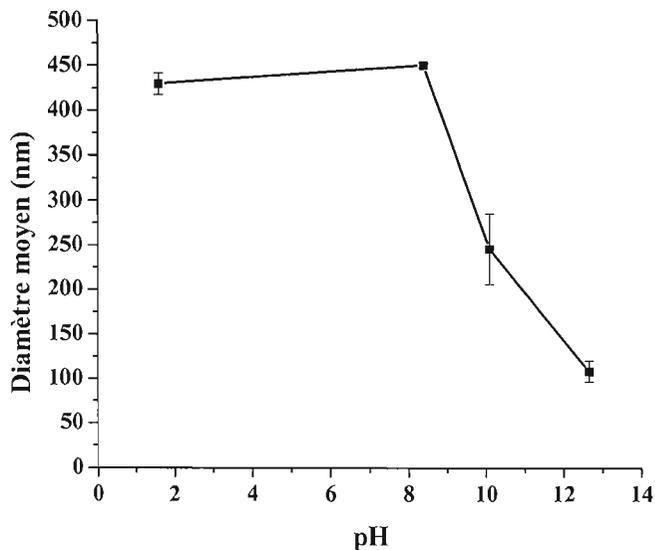
Figure 3.4 Titrage en retour de l'Au-PAMAM.

### 3.2.2 Agrégation de particules d'or recouvertes de dendrimères

Les particules Au-PAMAM (Go) ainsi que le dendrimère PAMAM (Go) sont solubles dans l'eau. Cependant, il est essentiel de déterminer si ceux-ci forment des agrégats. Pour répondre à cette question le diamètre des particules et des dendrimères a été mesuré. Des solutions de différents pH et force ionique ont été employées. La mesure de la taille des particules (Grabowski et Morrison, 1983) est basée sur la dispersion angulaire de la lumière par des particules se trouvant en solution (pour la méthode et l'appareillage voir chapitre II, section 2.5.6).

#### 3.2.2.1 Diamètre moyen du PAMAM (Go) par rapport au pH

Les diamètres moyens des dendrimères PAMAM (Go) non adsorbés sur une nanoparticule, mesurés dans l'eau à différent pH, sont présentés sur la figure 3.5. La présence d'agrégation est évidente (le diamètre du PAMAM  $G_0$  est d'environ 4 nm, voir chapitre V). Elle est beaucoup plus prononcée dans un milieu acide ( $d_{\text{moyen}} = 430$  nm) que dans un milieu basique ( $d_{\text{moyen}} = 108$  nm). La taille des agrégats est presque constante dans la région de pH = 1,6 à pH = 8. Une diminution de taille remarquable se produit entre pH = 8 et 10 après lequel le diamètre continu à diminuer avec l'augmentation du pH. La chute est probablement reliée au pKa de 7,6 des amines à la surface de dendrimère. Au pH plus petits que 7,6 les amines terminales sont protonées. Il est très probable que les dendrimères s'agglomèrent pour former des micelles dont les parties chargées sont vers l'extérieur. La formation des micelles peut s'expliquer avec la différence de l'hydrophobicité dans les différentes parties de la molécule (les parties chargées sont moins hydrophobes) ou avec la formation des liaisons hydrogènes. L'augmentation du pH à plus que 8 amène une déprotonation des amines ce qui rend la molécule de dendrimère neutre. La différence de l'hydrophobicité dans la molécule disparaît et la formation de liaisons hydrogènes diminue.



**Figure 3.5** Diamètre moyen du PAMAM (Go) par rapport au pH.

### 3.2.2.2 Diamètre moyen de l'Au-PAMAM (Go) en fonction du pH

Les particules Au-PAMAM (Go) forment aussi des agrégats mais leur taille est plus petite que celle des PAMAM (Go). Leur comportement est différent par rapport au pH. Les diamètres (figure 3.6) varient dans un domaine beaucoup moins large et il n'y a pas de chute autour de pH = 8. En fait, aux pH plus bas que 7,6 les amines terminales sont protonés, mais la charge est distribuée sur toute la surface de la particule. Les particules se repoussent ce qui empêche la formation des gros agrégats. On peut conclure que les nanoparticules recouvertes de dendrimères sont plus stables par rapport au pH que les dendrimères seuls. La faible diminution de taille de Au-PAMAM (Go) avec l'augmentation du pH entre dans les marges d'erreurs. L'écart type diminue avec l'augmentation du pH.

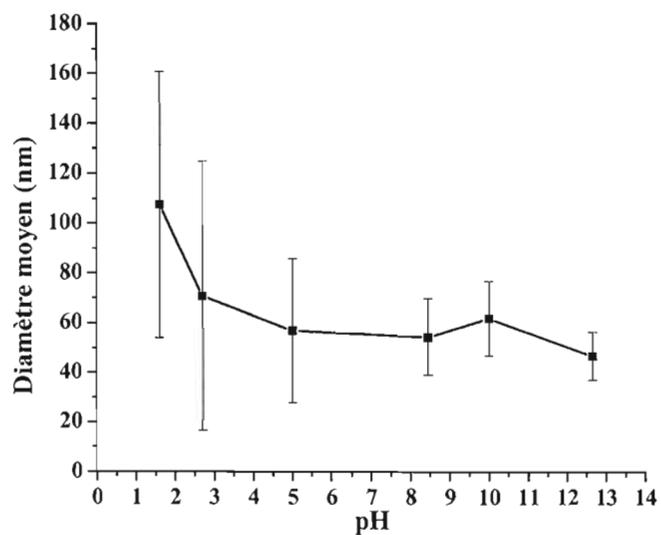


Figure 3.6 Diamètre moyen de l'Au-PAMAM (Go) par rapport au pH.

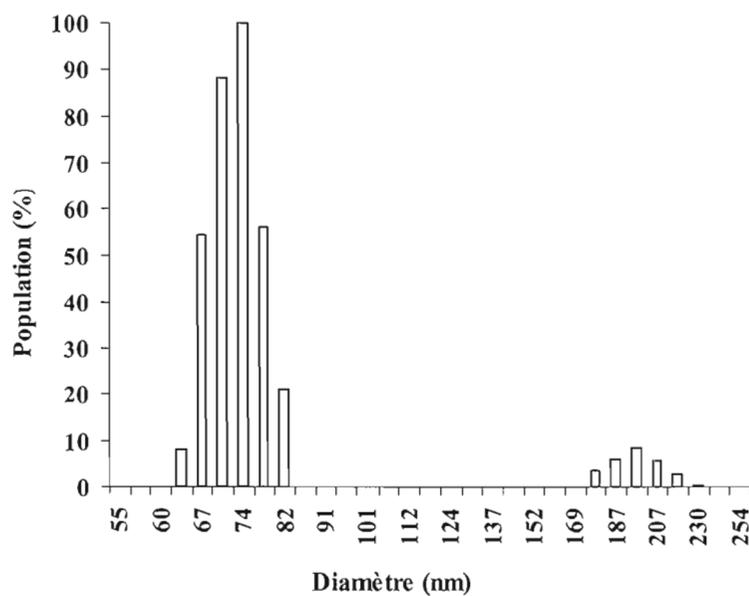


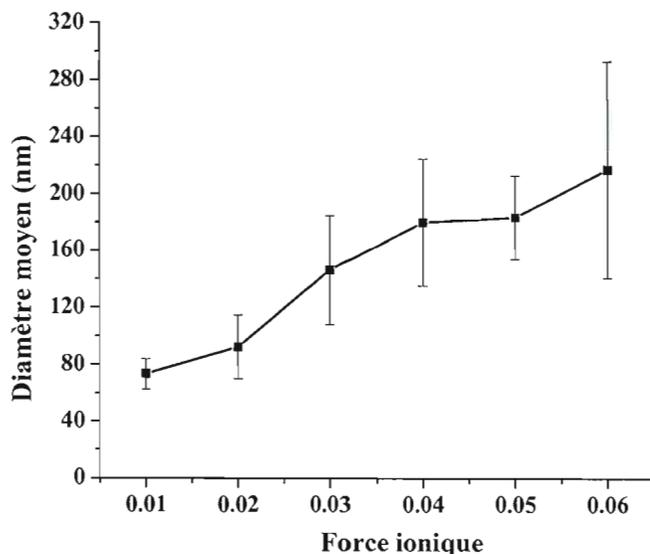
Figure 3.7 Exemple de distribution de taille de l'Au-PAMAM obtenue par l'option MSD.

L'utilisation de l'option MSD (Multimodal Size Distribution) a permis d'obtenir la distribution de taille (Grabowski et Morrison, 1983). Très souvent les solutions contiennent des particules de taille non uniforme. On retrouve des agglomérats de 4 à 20 particules (autour de 95 %) en même temps que des agglomérats de 60 à 75 particules (autour de 5 %). Un exemple de distribution de taille de Au-PAMAM obtenue par l'option MSD est donné à la figure 3.7. Les diamètres moyens présentés sur les figures 3.6, 3.8 et 3.9 sont calculés à partir de la distribution de taille comportant 95 % des agglomérats.

### **3.2.2.3 Diamètre moyen de l'Au-PAMAM (Go) par rapport à la force ionique au pH 12**

La figure 3.8 représente la variation du diamètre de Au-PAMAM (Go) avec la force ionique au pH 12. Les solutions de forces ioniques différentes ont été obtenues en mélangeant une quantité constante de KOH avec des quantités variables de KCl, de cette façon le pH a été gardé constant. La solution où il n'y a pas de KCl correspond aux tailles les plus petites. Avec l'ajout de KCl le diamètre de l'agglomérat augmente et la distribution des tailles s'élargit. Les solutions contenant KCl ont précipité après quelques jours, la précipitation est plus forte où les concentrations de KCl sont plus élevées.

À un pH élevé les amines terminales sont déprotonnées et la surface des particules doit être neutre ( $-NH_2$  seulement). Donc la force ionique ne doit pas jouer un rôle important ici. En réalité, la taille des agglomérats dans un milieu basique (pH 12) augmente avec la force ionique (figure 3.8). Les écarts de la taille des agglomérats augmentent aussi. La plupart des solutions contiennent des agglomérats de taille non uniforme, dont plus qu'une distribution de taille est présente. L'agglomération et la précipitation peuvent s'expliquer avec la formation des liaisons hydrogènes ou avec une amidation possible entre les amines primaires d'une particule et le carbone du groupe amide secondaire d'une autre branche.



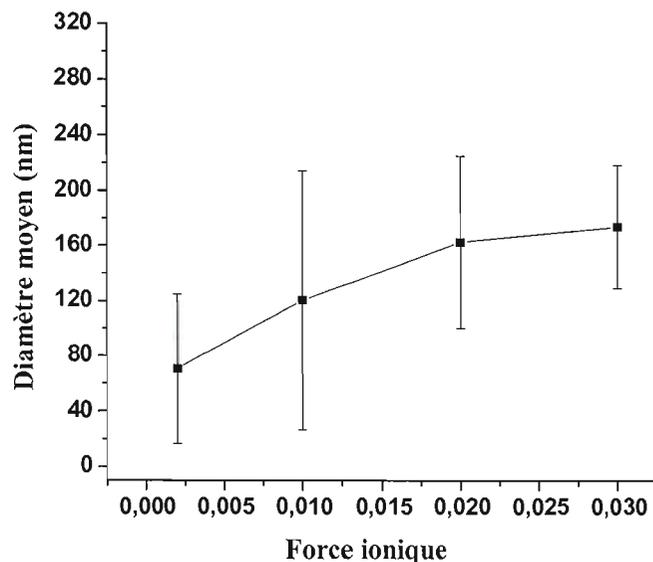
**Figure 3.8** Diamètre moyen de l’Au-PAMAM (Go) par rapport à la force ionique au pH 12.

### 3.2.2.4 Diamètre moyen de l’Au-PAMAM (Go) par rapport à la force ionique au pH 2,7

La figure 3.9 représente la variation du diamètre moyen de Au-PAMAM avec la force ionique au pH 2,7. Les solutions de pH constants et forces ioniques différentes ont été obtenues en mélangeant une quantité constante HCl avec des quantités variables de KCl. Le diamètre de l’agglomérat augmente légèrement avec l’augmentation de la force ionique. Une large gamme de taille de particules est présente dans la solution.

Dans un environnement acide la charge globale de la macromolécule est positive, ce qui a été confirmée par la mesure du potentiel zeta positif pour Au-PAMAM (Go) (voir 3.2.2.5). Si la force ionique de la solution est élevée l’atmosphère ionique est dense et l’épaisseur de la double couche électrique est petite. La répulsion entre les charges de double couche électrique sur les particules voisines est aussi petite, ce qui provoque une agrégation des particules. En diminuant la force ionique l’atmosphère ionique devient moins dense, la double couche électrique augmente et la répulsion entre les particules augmente aussi. On

voit sur la figure 3.9 que le diamètre moyen des agrégats diminue. Mais comme l'erreur sur la taille des particules est très grande on peut dire que l'effet de la force ionique est très faible ou inexistant.



**Figure 3.9** Diamètre moyen de Au-PAMAM (Go) par rapport à la force ionique au pH 2,7.

### 3.2.2.5 Mesures du potentiel zeta

Le potentiel zeta est obtenu par la mesure de la vitesse de déplacement des particules lorsqu'elles sont soumises à l'action d'un champ électrique (pour la méthode et l'appareillage voir chapitre II, sectionne 2.5.7). Les résultats sont présentés dans le tableau 3.1. Dans les solutions aqueuse de pH 1,6 et 8,5 le potentiel zeta de Au-PAMAM et de PAMAM est positif pendant les premières minutes, ensuite il commence à diminuer et devient négatif. Les dendrimères et les particules se déposent sur les électrodes de Pt et les bloquent. Les valeurs positives au début s'expliquent avec la présence de  $-\text{NH}_3^+$  qui détermine une charge positive à la surface de la particule. Le potentiel zeta de Au-PAMAM mesuré dans une solution aqueuse de KOH (pH 12,6) donne une valeur négative de  $-44$  mV (moyenne de 5 mesures).

Les valeurs négatives peuvent s'expliquer avec des liaisons hydrogènes qui peuvent se former entre les amines terminales et les groupements OH<sup>-</sup> qui donne une charge négative à la surface de la molécule. Le potentiel mesuré est moins variable avec le temps. On ne voit pas de dépôt sur les électrodes, mais il est possible que des tels dépôts soient formés. L'adsorption des nanoparticules et des dendrimères, bloque la surface d'électrode et fait les mesures de potentiel zeta non fiables.

**Tableau 3.1**  
Potentiel zeta de l'Au-PAMAM

	Changements de Potentiel zeta (mV) avec le temps				
	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min
Au-PAMAM, pH 1,6	31,6	30,6	9,7	-9,6	-14,5
Au- PAMAM, pH 8,5	39,7	20,6	5,7	-10,2	-15,3
Au- PAMAM, pH 12,6	-44,8	-47,2	-43,2	-27,8	-46,8
PAMAM, pH 1,6	18,8	-6,4	-9,8	-9,6	-6,6

### 3.3 Conclusion

Les spectres infrarouges confirment l'absorption de PAMAM sur l'or. La taille des nanoparticules d'or est inférieure à 2 nm car la bande caractéristique à 500 – 550 nm due au plasmon de surface est absente.

La partie organique déterminée par l'analyse thermogravimétrique est de  $20,5 \pm 0,7$  % et le nombre de moles des groupes -NH<sub>2</sub> sur la surface de dendrimère est de  $1,35 \pm 0,04$  mmol NH<sub>2</sub> par gramme Au-PAMAM (Go). La quantification des amines primaires par TNBS donne une valeur similaire de  $1,7 \pm 0,6$  mmol par gramme Au-PAMAM (Go).

Les amines primaires se trouvant à la surface de la nanoparticule d'or ont un pKa de 1,8. Dans un environnement acide le potentiel zeta mesuré est positif, en milieu alcalin il est

négatif. L'accumulation des nanoparticules et des dendrimères à la surface d'électrode diminue la fiabilité de ces résultats.

Les nanoparticules Au-PAMAM ( $G_0$ ) et les dendrimères de PAMAM se trouvent sous forme d'agglomérats. En général, les agrégats de PAMAM ( $G_0$ ) présentent une taille 2 à 4 fois plus grande qu'Au-PAMAM ( $G_0$ ). Le pH joue un rôle important pour l'agglomération des PAMAM, mais pas pour l'agglomération des Au-PAMAM, donc une stabilisation des dendrimères adsorbés sur une nanoparticule d'or par rapport aux dendrimères seuls est constatée. La grande erreur sur la taille des particules et la présence de plusieurs distributions de taille mettent en doute l'effet de la force ionique sur l'agrégation.

L'avantage de l'utilisation des nanoparticules d'or pour la construction du biocapteur a été démontré. Les nanoparticules d'or ne s'oxyde pas comme les nanoparticules d'Ag (Zheng et al, 2002; Goodson et al, 2004) ou de Cu (Balogh et Tomalia, 1998). Au-PAMAM est plus stable par rapport au pH et ne subit pas une décomposition comme les nanoparticules d'Ag-PAMAM (Zheng et al, 2002). L'utilisation de la cystamine comme un cœur central du PAMAM donne la possibilité d'une adsorption facile et stable du dendrimère sur la nanoparticule d'or. De cette façon la multifonctionnalité a été augmentée (Bogdan et al, soumis) par rapport à la multifonctionnalité de PAMAM non adsorbé sur l'or (Pagé et Roy, 1997).

### 3.4 Références

Bogdan, N., M. Bozoukova, R. Roy et M. Morin. Soumis. «Water-soluble glycodendrimer-coated gold nanoparticles as sensors for lectins and fimbriated bacteria».

Balogh, L. et D. Tomalia. 1998. «Poly(amido amine) dendrimer-templated nanocomposites. Synthesis of zerovalent copper nanoclusters». *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120, p. 7355-7356.

Brust, M., M. Walker, D. Bethell, D. Schiffrin et R. Whyman. 1994. «Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system». *J. Chem. Soc. Chem. Commun*, p. 801-802.

Cayot, P. et G. Tainturier. 1997. «The quantification of protein amino groups by the trinitrobenzenesulfonic acid method: a reexamination». *Analytical Biochemistry*, vol. 249, p. 184 – 200.

Gopidas, K., J. Whitesell et M. Fox. 2003. «Nanoparticle-cored dendrimers: synthesis and characterization». *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, p. 6491-6502.

Instruction manual for 90Plus/BI-MAS Multi angle particle sizing option operation manual, Brookhaven Instruments Corporation, New York, U.S.A.

Grabowski, E. et I. Morrison. 1983. «Particle size distributions from analysis of quasi-elastic light scattering data», dans «Measurement of suspended particles by quasi-elastic light scattering», chapitre 7. Édition par B. Dahneke, Wiley-Interscience, New York.

Hosteler, M., J. Wingate, C. Zhong, J. Harris, R. Vachet, M. Clark, J. Londono, S Green, J. Stokes, G. Wignall, G. Glish, M. Porter, N. Evans et R. Murray. 1998. «Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: core and monolayer properties as a function of core size». *Langmuir*, vol. 14, p. 17 – 30.

Kim, Y.-G.; S.-K. Oh, R. M. Crooks. «Preparation and characterization of 1-2 nm dendrimer-encapsulated gold nanoparticles having very narrow size distributions». 2004. *Chem. Mater.*, vol. 16(1), p. 167-172.

Pagé, D. et R. Roy. 1997. «Synthesis and biological properties of mannosylated starburst poly(amidoamine) dendrimers». *Bioconjugate Chem.*, vol. 8, No. 5, p. 714 – 723.

Satoh, K., T. Yoshimura et K. Esumi. 2002. «Effects of various thiol molecules added on morphology of dendrimer–gold nanocomposites». *Journal of Colloid and Interface Science*, 255, 312 – 322.

Silverstein, M., G. Basler et T. Morill. 1998. «Identification spectrométrique de composés organiques». Trad. De l'anglais par E. Larue, révision scientifique par A. Schanck. 5<sup>e</sup> éd. américain. Paris (France) : De Boeck et Larcier, p. 91 – 142, 289 - 315.

Tomalia, D., H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Rocck, J. Ryder et P. Smith. 1985. «A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules». *Polym. J.*, vol. 17, p. 117.

Zhuo, R., Du, B., Lu, Z., 1999. «In vitro release of 5-fluorouracil with cyclic core dendritic polymer». *J. Control. Release*, vol. 57, p. 249–257.

Zheng, J., M. Stevenson, R. Hikida et P. Van Patten. 2002. «Influence of pH on dendrimer-protected nanoparticles». *J. Phys. Chem.*, vol. 106, p. 1252 – 1255.

## CHAPITRE IV

# NANOPARTICULES RECOUVERTES DE GLYCODENDRIMÈRES

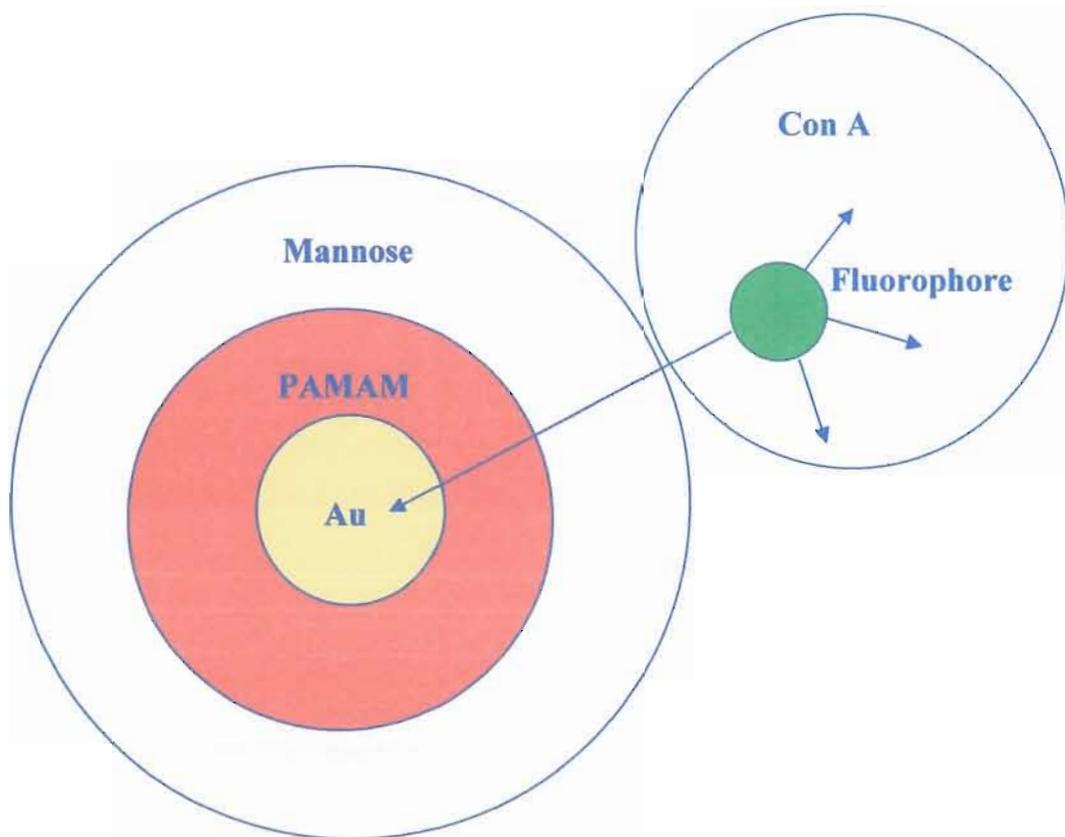
### 4.1 Introduction

L'objectif principal de ce projet est d'examiner la possibilité d'utiliser les glyconanoparticules pour la reconnaissance de lectines dont certaines sont associées à des maladies. Le greffage de carbohydrates sur les amines terminales de dendrimère de Au-PAMAM rendrait sa surface similaire à celle des cellules sur laquelle les virus, bactéries et toxines peuvent s'accrocher. Dans ce chapitre, deux biocapteurs basés sur des sucres différents sont présentés. La synthèse des nanoparticules modifiées avec le  $\alpha$ -D-mannopyranoside (Au-PAMAM-mannose) et le  $\beta$ -D-galactopyranoside (Au-PAMAM-galactose) a été décrite dans le chapitre II, section 2.4.3. L'étude est inspirée de la méthode de Pagé et Roy (1997) pour la synthèse de glycodendrimères à partir de PAMAM et de p-isothiocyanate phényle  $\beta$ -D-mannopyranoside (un dérivé du D-mannose).

En premier lieu, un essai de reconnaissance de la Concanavalin A (Con A) est réalisé. Con A est une protéine de type lectine, extrait de *Canavalia ensiformis* (une fève). Sa structure est dépendante du pH, aux pH < 5,6 Con A existe comme un dimère, entre pH 5,8 et 7,0 Con A forme un tétramère de masse moléculaire de 102 kDa. Des organisations plus compliquées sont formées aux pH > 7,0 (Bucur, Danet et Marty, 2004). Il est connu que Con A possède une bonne affinité pour le  $\alpha$ -mannose et une plus petite affinité pour le  $\beta$ -galactose. La forme du tétramère facilite la formation des complexes stables avec le mannose (Brewer, 1996). Pagé et Roy (1997) ont obtenu des complexes insolubles quelques minutes

après le mélange de PAMAM- $\alpha$ -D-mannopyranoside et Con A. Ils ont aussi montré la réversibilité de cette interaction en additionnant des excès de D-mannose qui dissout le précipité.

Beaucoup d'exemples de biocapteurs basés sur le rôle de la nanoparticule d'or comme atténuateur de la fluorescence sont connus (Maxwell, Taylor et Nie, 2002; Pineda, Ronis, 1985; Dubertret, Calame et Libchaber, 2001). Donc, l'affinité de Con A pour le mannose peut être combinée avec les propriétés optiques de la nanoparticule d'or. Dans cette étude Con A conjugué avec un fluorophore est utilisé. Une mesure de la fluorescence de Con A conjugué avant et après le mélange avec les nanoparticules peut nous indiquer si la reconnaissance a eu lieu. Le principe de l'expérience est donné sur la figure 4.1.



**Figure 4.1** Atténuation de la fluorescence de Con A-fluorophore par l'Au-PAMAM-mannose.

Des tests d'immunoprécipitation sont effectués avec les nanoparticules-mannose et Con A, ainsi qu'avec Con A conjugué avec la fluorescéine ou la tétraméthylrhodamine (TMR). Les particules modifiées avec du galactose sont utilisées pour vérifier la sélectivité des Au-PAMAM-sucres. Des mesures de fluorescence ont été faites en utilisant différentes conditions (température, temps, concentration) afin de vérifier si les nanoparticules d'or entourées des glycodendrimères peuvent être utilisées comme atténuateurs de la fluorescence provenant du fluorophore sur Con A.

## **4.2 Résultats et discussion**

### **4.2.1 Immunoprécipitation**

La formation d'un précipité après l'ajout de Con A à une solution de Au-PAMAM ( $G_0$ )-mannose est instantanée (voir chapitre II section 2.5.9.1).

Les mêmes tests d'immunoprécipitation ont été faits avec Con A conjugué avec la fluorescéine ou TMR. Les résultats obtenus démontrent que la conjugaison n'influence pas l'affinité de Con A envers le mannose. Toutes les solutions ont précipitées quelques minutes après le mélange. L'ajout d'un excès de D-mannose démontre la réversibilité de la réaction, car le précipité est dissout. La précipitation de Con A-fluorescéine semble être un peu plus lente et moins efficace que Con A-TMR.

Des tests avec Con A (ainsi que Con A-TMR et Con A-fluorescéine) et Au-PAMAM ( $G_0$ )-galactose ont été aussi effectuées. Des complexes insolubles ne sont pas obtenus même après plusieurs heures, ce qui s'explique par l'affinité plus faible de Con A pour le  $\beta$ -D-galactose. Cette expérience démontre que la reconnaissance de Con A par les nanoparticules-mannose est spécifique.

## **4.2.2 Atténuation de la fluorescence par les nanoparticules d'or**

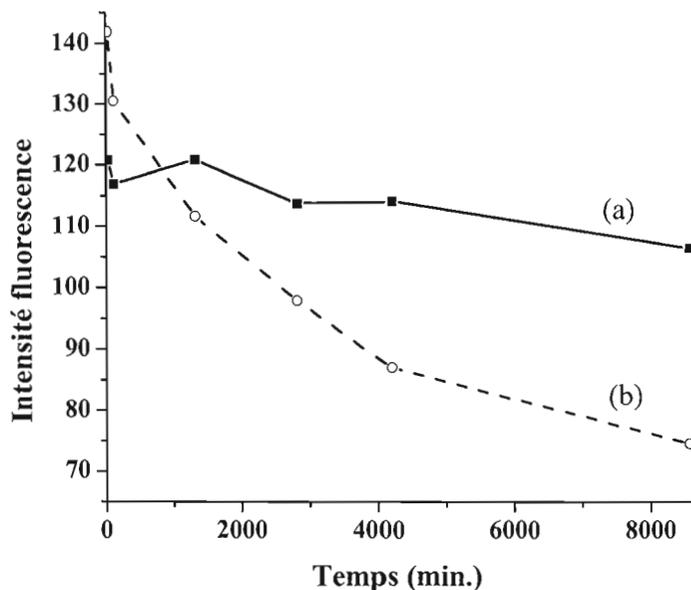
### **4.2.2.1 Atténuation de la fluorescence de Con A-fluorescéine par les nanoparticules d'or**

La possibilité que les nanoparticules d'or atténuent la fluorescence en absorbant l'énergie d'excitation du fluorophore a été étudiée. La longueur d'onde d'excitation utilisée est 494 nm (comme indiqué dans Product Information, Molecular Probes, 2002). Le spectre UV-Vis mesuré d'une solution de Con A-fluorescéine confirme cette information. La fluorescence est mesurée à 523 nm (voir chapitre II, section 2.5.8.1).

Les nanoparticules recouvertes de dendrimères sont stables et peuvent être conservées à la température ambiante. Ce n'est pas le cas avec Con A (Con A-fluorophore) qui se décompose à plus haute température (Product Information, Molecular Probes, 2002). Des mesures de fluorescence à température basse ont donc été effectuées. Des essais à 25 °C ont été également faits.

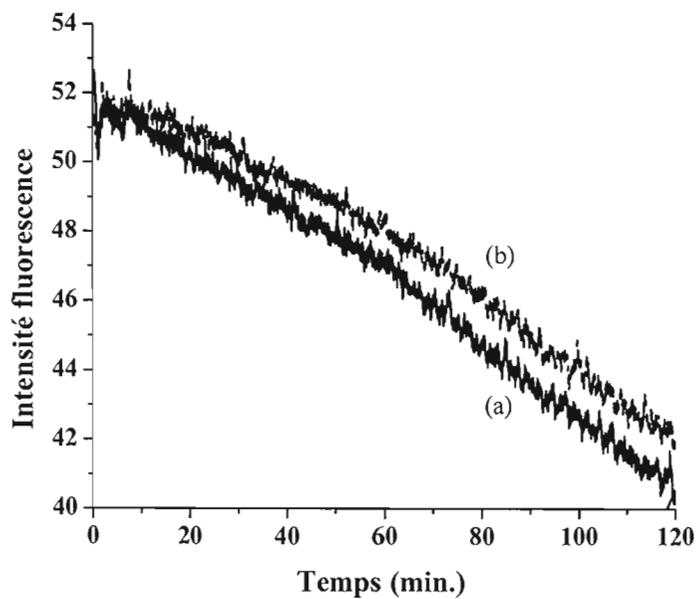
Il est aussi intéressant d'examiner la stabilité de la fluorescence avec le temps. Même si les solutions sont gardées au froid, il est possible que l'intensité de la fluorescence change avec le temps.

La fluorescence d'une solution de Au-PAMAM-mannose : Con A-fluorescéine, conservée à une température de 25 °C ou à 4 °C a été mesurée pendant 6 jours. Les résultats sont présentés sur la figure 4.2. La fluorescence diminue progressivement avec le temps si la solution est gardée à la température de la pièce ce qui est probablement dû de la dégradation de la Con A-fluorescéine. Les solutions gardées au réfrigérateur sont plus stables et peuvent être utilisées plusieurs jours. La fluorescence d'une solution de Con A-fluorescéine seule pendant 2 heures à des températures de 25 °C et de 4 °C a été aussi mesurée (figure 4.3 et 4.4). Le même phénomène est remarqué.



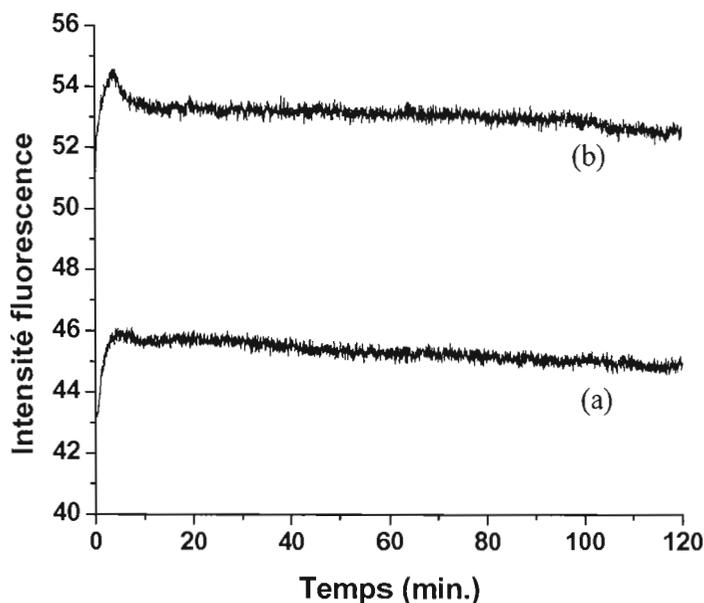
**Figure 4.2** Fluorescence à 523 nm, mesurée pendant 6 jours d'une solution de Au-PAMAM-mannose : Con A-fluorescéine en proportion 2 : 1 qui a été conservée à une température de (a) 4 °C ou (b) 25 °C; excitation à 494 nm, résolution de 4 nm, concentration de Con A-fluorescéine dans la solution est de 16,7  $\mu\text{g/ml}$ .

Pour étudier le phénomène d'atténuation de la fluorescence par les nanoparticules d'or et voir si l'atténuation dépend de la température les mesures suivantes ont été faites : la mesure de la fluorescence pendant 2 heures de solution Au-PAMAM-mannose : Con A-fluorescéine maintenue à des températures de 25 °C ou de 4 °C. Comme référence, la solution de Con A-fluorescéine a été utilisée. Les résultats sont présentés dans la figure 4.3 et 4.4. Les valeurs de fluorescence sont corrigées par la valeur du blanc (PBS). À 25 °C, l'intensité de la fluorescence de la référence (Con A-fluorescéine) et de la solution (Au-PAMAM-mannose : Con A-fluorescéine) diminuent avec le temps (voir figure 4.3). Il y a une légère atténuation qui n'est pas significative. Elle augmente légèrement avec le temps et après deux heures atteint 3 %.



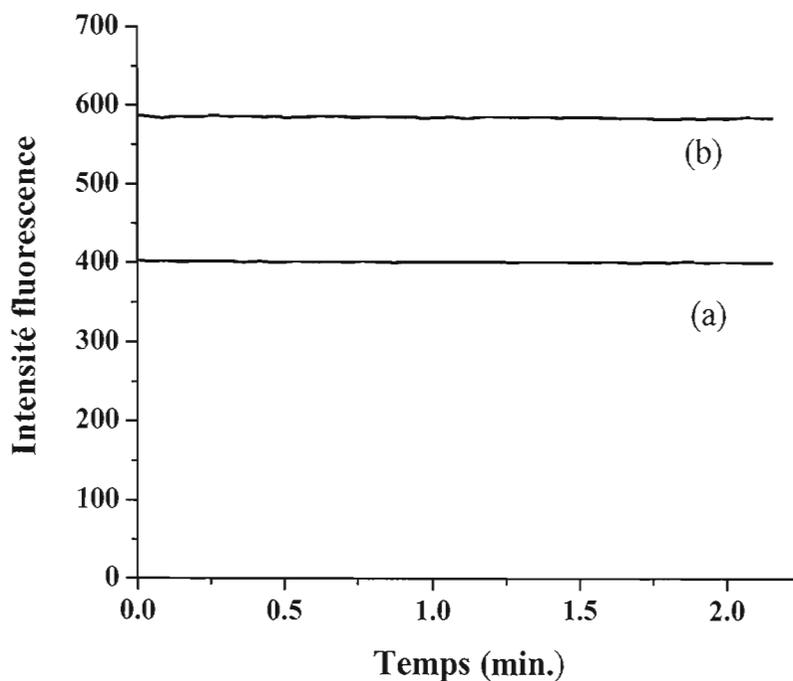
**Figure 4.3** Mesure de la fluorescence à 523 nm pendant 2 heures (a) d'une solution de Au-PAMAM-mannose : Con A-fluorescéine en proportion 2 : 1 et (b) de la référence Con A-fluorescéine à une température de 25 °C; excitation à 494 nm, résolution de 5 nm. La concentration de Con A-fluorescéine dans les solutions est de 2,5 µg/ml.

Par contre, si les mesures sont effectuées à une température de 4 °C (voir figure 4.4), l'intensité de la fluorescence de l'Au-PAMAM-mannose : Con A-fluorescéine et de la référence augmente pendant les premières minutes avant d'atteindre une stabilisation. L'intensité est ensuite constante avec le temps. L'atténuation est aussi constante avec le temps mais toujours petite (de 8 % à 14 % seulement).



**Figure 4.4** Mesure de la fluorescence à 523 nm pendant 2 heures (a) d'une solution de Au-PAMAM-mannose : Con A-fluorescéine en proportion 2 : 1 et (b) de la référence Con A-fluorescéine à une température de 4 °C; excitation à 494 nm, résolution de 5 nm. La concentration de Con A-fluorescéine est de 2,5 µg/ml.

D'autres essais ont été faits en augmentant la concentration des solutions ou en changeant le rapport Au-PAMAM-mannose : Con A-fluorescéine. Un résumé de tous les résultats obtenus est donné dans le tableau 4.1. L'atténuation de la fluorescence est variable. La plus grande diminution est de 30 % (figure 4.5) pour un rapport Au-PAMAM-sucres : Con A-fluorescéine 5:1, concentration de Con A-fluorescéine de 12,5 µg/ml. L'augmentation du rapport Au-PAMAM-sucres : Con A-fluorescéine à 10 : 1 et la diminution de la concentration de Con A-fluorescéine à 2,5 µg/mL amène à une atténuation de 2 %, ce qui démontre la non fiabilité des résultats.



**Figure 4.5** Mesure de la fluorescence à 523 nm (a) d'une solution de Au-PAMAM-mannose : Con A-fluorescéine en proportion 5 : 1 et (b) de la référence Con A-fluorescéine à 4 °C; excitation à 494 nm, résolution de 5 nm. La concentration de Con A-fluorescéine est de 12,5  $\mu\text{g/mL}$ .

L'atténuation faible de la fluorescence par les nanoparticules d'or est peut-être due à la grande distance entre les nanoparticules et la fluorescéine. Les dendrimères de poly(amido amines)-mannose sont trop longs et ont une densité assez grande ce qui restreint la possibilité que le fluorophore s'approche de la nanoparticule. L'atténuation faible peut-être due aussi à la petite taille des nanoparticules. D'après Dubertret, Calame et Libchaber (2001), la longueur d'onde de 520 nm est un canal pour le transfère non radiatif de l'énergie vers la nanoparticule d'or. Mais pour que la particule absorbe il est nécessaire qu'elle soit semi-conductrice. Comme il a été vu auparavant les particules trop petites perdent cette caractéristique et le plasmon de surface devient invisible. Une solution envisageable serait de remplacer les dendrimères avec des molécules plus courtes ou de travailler avec des nanoparticules de taille plus grande.

**Tableau 4.1**

Atténuation de la fluorescence de fluorescéine par l'Au-PAMAM-mannose. Longueur d'onde d'excitation 494 nm, émission à 523 nm, température 4°C

Rapport Au-PAMAM-mannose : Con A-fluorescéine	Concentration de Con A-fluorescéine	Atténuation de la fluorescence par rapport à la référence
1 : 1	2,5 µg / mL	3 %
2 : 1		8 %
10 : 1		2 %
50 : 1		10 %
10 : 1	25,0 µg / mL	0 %
5 : 1	12,5 µg / mL	30 %
10 : 1		20 %

#### 4.2.2.2 Atténuation de la fluorescence de Con A-TMR par les nanoparticules d'or

L'utilisation de Con A-fluorescéine n'amène pas à une atténuation significative, un autre fluorophore – TMR a été étudié. Con A-TMR est plus difficile à dissoudre dans le PBS par rapport à Con A-fluorescéine donc les mesures sont faites 1 journée après la préparation de la solution Con A-TMR/ PBS qui a été conservée à 4 °C (voir chapitre II, section 2.5.8.2).

Les mesures de fluorescence ont été effectuées en excitant à une longueur d'onde de 555 nm et en mesurant l'émission à 580 nm, comme indiqué dans Product Information, Molecular Probes (2002) à une température de 4 °C. L'atténuation pour le mélange Au-PAMAM-mannose : Con A-TMR 5 : 1 est de 3 %, pour Au-G<sub>0</sub>-mannose : Con A-TMR 10 : 1 de 6 %. L'atténuation de Con A-TMR est encore moins intense que celle de Con A-fluorescéine.

### 4.3 Conclusion

Con A et Con A conjugué avec la fluorescéine ou TMR forment des complexes insolubles avec Au-PAMAM- $\alpha$ -D-mannose. La réversibilité de cette interaction a été montrée en additionnant des excès de D-mannose qui dissout le précipité. Aucune précipitation ne se produit si on mélange Con A avec Au-PAMAM- $\beta$ -D-galactose. Par cette expérience, la spécificité de la reconnaissance de la lectine Con A par Au-PAMAM- $\alpha$ -D-mannose a été démontrée. Les résultats sont en accord avec ceux de Brewer (1996), P. Pagé et R. Roy (1997) et Raja, Wang et Finn (2003).

Con A conjugué avec un fluorophore a été utilisé pour voir si la nanoparticule d'or est capable d'atténuer leur fluorescence. L'atténuation n'est pas significative. Les causes probables sont la taille petite des nanoparticules d'or qui leur donne un caractère semi-conducteur et/ou la grande distance entre celles-ci et le fluorophore. D'après Pineda et Ronis (1985) pour les nanoparticules d'or de 2 – 3 nm le transfert non-radiatif de l'énergie de la molécule excitée vers la nanoparticule demande des distances de 1 à 2 nm. La distance entre la nanoparticule et le fluorophore peut être calculée (voir chapitre V) mais il est impossible de déduire le diamètre exact de la nanoparticule.

Les dendrimères sur la nanoparticule ont une densité élevée (Bogdan, soumis 2006). Cela ne permet pas au fluorophore de s'approcher de la surface de la nanoparticule pour que l'atténuation soit possible comme suggérer par Maxwell, Taylor et Nie (2002) et Dubertret, Calame et Libchaber (2001).

En conclusion, pour pouvoir effectuer la détection par atténuation de la fluorescence, il est nécessaire soit d'augmenter le diamètre de la nanoparticule, soit d'adsorber des molécules plus courtes et plus flexibles et de diminuer leur densité à la surface de la particule.

#### 4.4 Références

Concanavalin A Conjugates - Product Information, Molecular Probes (2002).

Bogdan, N., M. Bozoukova, R. Roy et M. Morin. Soumis. «Water-soluble glycodendrimer-coated gold nanoparticles as sensors for lectins and fimbriated bacteria».

Brewer, C. 1996. «Multivalent lectin-carbohydrate cross-linking interactions». *Chemtracts Biochem. Mol. Biol.*, vol. 6, p. 165-179.

Bucur, B., A. Danet et J. Marty. 2004. «Versatile method of cholinesterase immobilisation via affinity bonds using Concanavalin A applied to the construction of a screen-printed biosensor». *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20 (2), p. 217-225.

Dubertret, B., M. Calame et A. Libchaber. 2001. «Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides». *Nature Biotechnology*, vol. 19, p. 365-370.

Maxwell, D., J. Taylor et Shuming N. 2002. «Self-assembled nanoparticle probes for recognition and detection of biomolecules». *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, p. 9606 – 9612.

Pagé, D. et R. Roy. 1997. «Synthesis and biological properties of mannosylated starburst poly(amidoamine) dendrimers». *Bioconjugate Chem.*, vol. 8, No. 5, p. 714 – 723.

Pineda, A. et D. Ronis. 1985. «Fluorescence quenching in molecules near rough metal surfaces». *J. Chem. Phys.*, vol. 83, p. 5330.

Raja, K., Qian Wang et M. Finn. 2003. «Icosahedral virus particles as polyvalent carbohydrate display platforms». *ChemBioChem*, vol. 4, p. 1348 – 1351.

## CHAPITRE V

# MODÉLISATION MOLÉCULAIRE DE DENDRIMÈRES DE POLY(AMIDO AMINES)

### 5.1 Introduction

Dans le chapitre précédent il a été vu que la détection envisagée par l'atténuation de la fluorescence d'un fluorophore, se trouvant sur Con A, par la nanoparticule d'or n'a pas été possible. Les causes probables sont la taille petite des nanoparticules d'or et/ou la grande distance avec le fluorophore. Il est donc nécessaire de faire certaines modifications au niveau du biocapteur. Les approches suivantes se présentent : augmenter la taille des nanoparticules ou utiliser des molécules plus courtes à la place des dendrimères. Cependant, de tels changements rendent nécessaire la modification des méthodes de synthèse.

Une approche alternative consiste à attacher des molécules fluorescentes directement sur les branches de PAMAM de la même façon qu'on attache les sucres. Le FITC (fluorescéine isothiocyanate), un fluorophore très efficace, sera greffé aux amines terminales en même temps et en faible proportion par rapport au *p*-isothiocyanate phényle  $\beta$ -D-mannopyranoside. Cette réaction est décrite dans le chapitre 2, section 2.4.4. De cette façon, la nanoparticule résultante (Au-PAMAM( $G_0$ )-suce-fluorophore) deviendra un capteur fluorescent. La détection de Con A (non conjugué cette fois-ci avec un fluorophore) s'effectuerait par la mesure de la fluorescence.

L'atténuation de la fluorescence de FITC par la nanoparticule d'or pourrait se produire. L'atténuation de la fluorescence dépend du diamètre de la nanoparticule et de la distance avec la molécule excitée (Dubertret, Calame et Libchaber, 2001 ; Maxwell, Taylor et Nie, 2002). Pour les nanoparticules d'or de 2 – 3 nm de diamètre le transfert non-radiatif de l'énergie

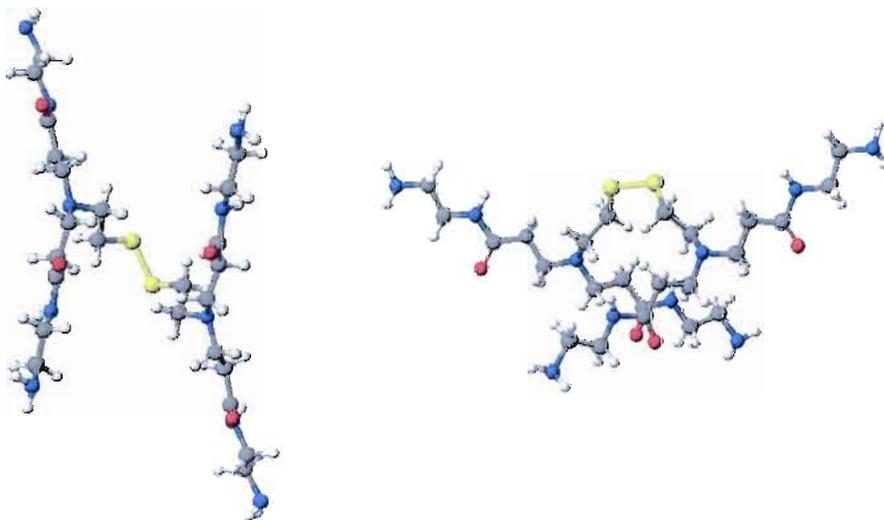
demande des distances de 1 – 2 nm (Pineda et Ronis, 1985). La taille des nanoparticules d'or, déduite par la spectroscopie UV (voir chapitre III) serait inférieure à 2 nm, mais la taille de la partie organique qui l'enrobe n'est pas encore connue. Donc, il est important d'estimer la taille du PAMAM modifiée afin de constater si la fluorescence sera atténuée par la nanoparticule d'or.

La modélisation moléculaire telle que décrite dans le chapitre II, section 2.5.10 permettrait d'estimer la taille et d'illustrer la structure ouverte des dendrimères qui favoriserait l'insertion des carbohydrates dans les récepteurs des protéines et le processus de reconnaissance. Les structures de PAMAM, PAMAM-mannose et PAMAM-mannose-FITC dans le vide sont calculées. Les structures hydratées sont aussi calculées dans le but de voir si l'hydratation apporte un changement important de la structure. La méthode donne aussi la possibilité d'interpréter le spectre IR et de le comparer avec les résultats expérimentaux. Des calculs avec les dendrimères adsorbés sur l'or ne sont pas faits à cause de sa complexité et de l'envergure des calculs.

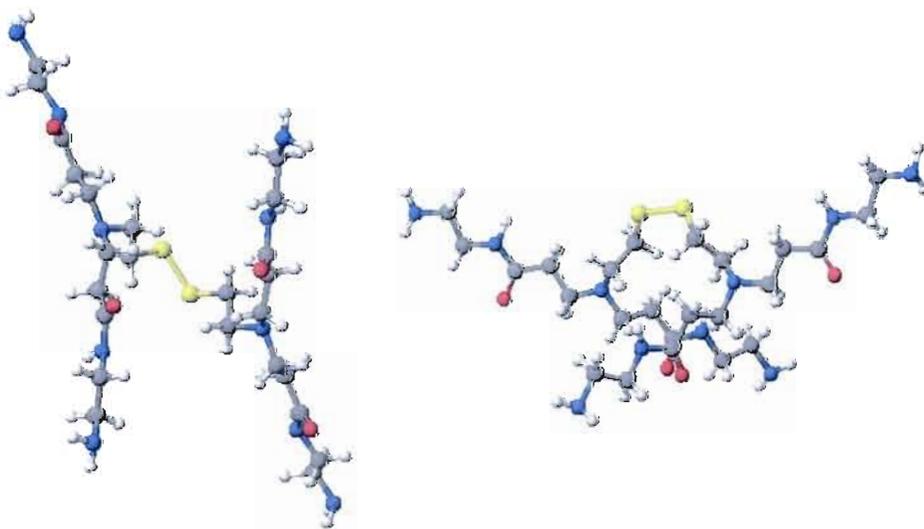
## 5.2 Résultats

Les structures les moins énergétiques du PAMAM, PAMAM-mannose et PAMAM-mannose-FITC, ainsi que les structures calculées dans l'eau et les bandes vibrationnelles correspondantes sont présentées si dessous.

### 5.2.1 PAMAM( $G_0$ )

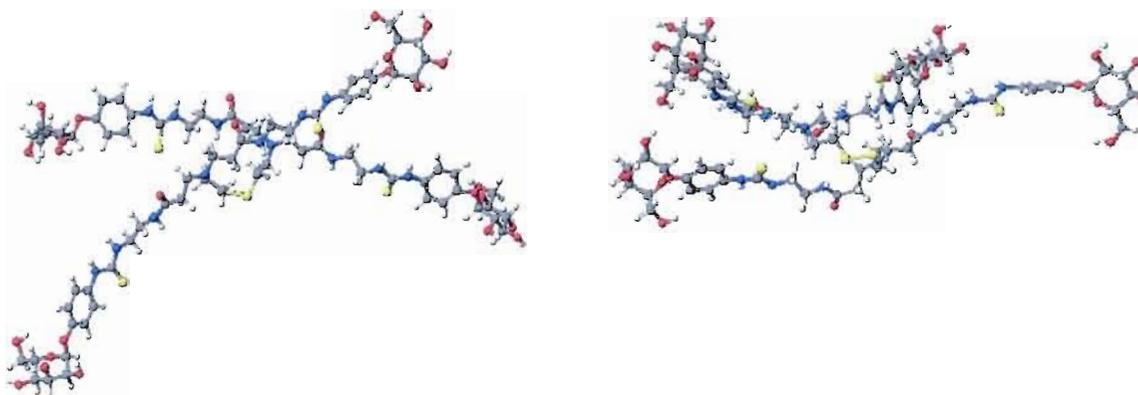


**Figure 5.1** Structure du PAMAM( $G_0$ ) après la minimisation de l'énergie par la méthode semi-empirique MOPAC-PM3.

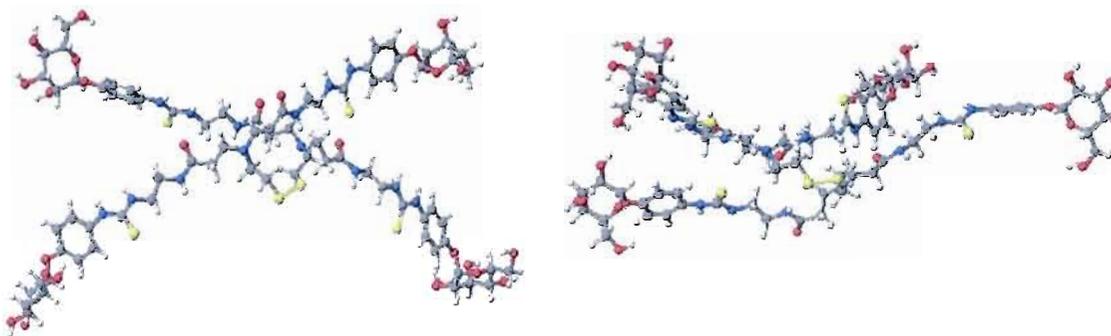


**Figure 5.2** Structure du PAMAM( $G_0$ ) dans l'eau après la minimisation de l'énergie par la méthode semi-empirique MOPAC-PM3.

### 5.2.2 PAMAM( $G_0$ )-mannose

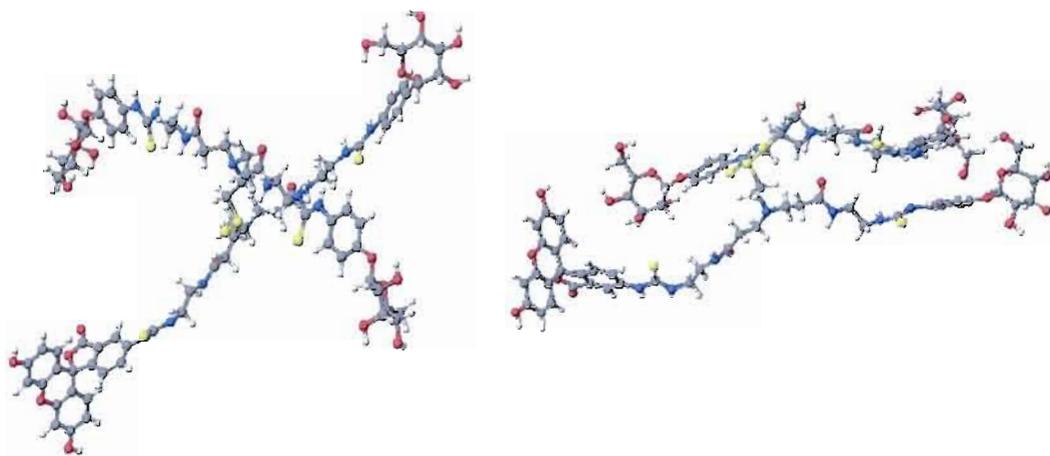


**Figure 5.3** Structure du PAMAM( $G_0$ )-mannose après la minimisation de l'énergie par la méthode semi-empirique MOPAC-PM3.

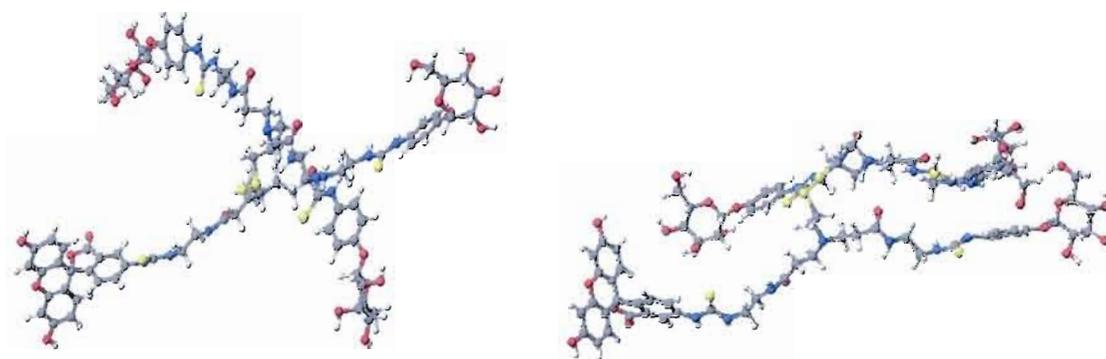


**Figure 5.4** Structure du PAMAM( $G_0$ )-mannose dans l'eau après la minimisation de l'énergie par la méthode semi-empirique MOPAC-PM3.

### 5.2.3 PAMAM( $G_0$ )-mannose-FITC



**Figure 5.5** Structure du PAMAM( $G_0$ )-mannose-FITC après la minimisation de l'énergie par la méthode semi-empirique MOPAC-PM3.



**Figure 5.6** Structure du PAMAM( $G_0$ )-mannose-FITC dans l'eau après la minimisation de l'énergie par la méthode semi-empirique MOPAC-PM3.

## 5.3 Discussion

### 5.3.1 Dimension des trois structures

Les trois molécules examinées dans cette étude présentent des structures ouvertes avec des groupes fonctionnels bien exposés à la surface. Les dimensions des structures solvatées de PAMAM( $G_0$ ) et de PAMAM ( $G_0$ )-mannose-FITC sont un peu plus petites que les structures mesurées dans le vide (voir tableau 5.1). Par contre, les dimensions de PAMAM( $G_0$ )-mannose dans l'eau sont un peu plus grandes que sans eau. Dans les trois cas les dimensions et les structures solvatées et non solvatées sont très proches, on remarque le même emplacement des atomes dans l'espace. Donc, la solvataion ne cause pas un changement structural important des trois molécules.

Les longueurs des branches données dans le tableau 5.1 correspondent à la distance entre l'atome de soufre et l'atome d'hydrogène le plus éloigné de l'atome du soufre. Cette distance pour le PAMAM( $G_0$ )-mannose-FITC est environ 2 nm. Ceci indique que le transfert non-radiatif de l'énergie de la fluorescéine vers la particule d'or serait faible.

La distance entre deux fonctions mannose sur la même branche est environ de 4 nm pour le PAMAM( $G_0$ )-mannose. En sachant que la distance entre deux récepteurs à mannose dans Con A est aussi autour de 4 nm, on peut supposer que deux lectines peuvent s'accrocher sur la même molécule.

**Tableau 5.1**

Comparaison entre les dimensions des trois structures : PAMAM ( $G_0$ ), PAMAM ( $G_0$ )-mannose, PAMAM ( $G_0$ )-mannose-FITC, calculées avec la méthode semi-empirique MOPAC en utilisant des paramètres PM3

<i>Sans eau</i>		
	<i>Distance entre deux fonctions terminales sur la même branche (Å)</i>	<i>Longueur de la branche (Å)</i>
PAMAM( $G_0$ )	18.03 et 18.54	10.48
PAMAM( $G_0$ )-mannose	40.73 et 40.13	20.66
PAMAM( $G_0$ )-mannose-FITC	39.84 (branche avec mannose) 39.35 (branche avec FITC et mannose)	19.75
<i>Dans l'eau</i>		
	<i>Distance entre deux fonctions terminales sur la même branche (Å)</i>	<i>Longueur de la branche (Å)</i>
PAMAM ( $G_0$ )	18.00 et 18.44	10.47
PAMAM( $G_0$ )-mannose	39.64 et 40.63	21.64
PAMAM( $G_0$ )-mannose-FITC	39.84 (branche avec mannose) 39.34 (branche avec FITC et mannose)	19.39

### 5.3.2 Spectroscopie infrarouge

Les calculs du spectre IR ont permis l'assignation des bandes vibrationnelles des PAMAM( $G_0$ ), PAMAM( $G_0$ )-mannose et PAMAM( $G_0$ )-mannose-FITC. L'identification des pics (voir tableau 5.2) confirme la composition chimique des trois composées. On retrouve dans tous les spectres les bandes caractéristiques de l'amide secondaire, l'amine primaire et des groupements  $CH_2$ . Le spectre de PAMAM calculé avec le logiciel et celui de l'Au-PAMAM mesuré expérimentalement (figure 3.1) concordent. L'emplacement des pics ainsi que leur intensité sont similaires.

**Tableau 5.2**

Comparaison entre les spectres vibrationnels de PAMAM ( $G_0$ ), PAMAM ( $G_0$ )-mannose, PAMAM ( $G_0$ )-mannose-FITC

	<i>Nombre d'onde (<math>cm^{-1}</math>) calculées avec MOPAC-PM3</i>			<i>Nombre d'onde (<math>cm^{-1}</math>) mesuré*</i>
	PAMAM ( $G_0$ )	PAMAM ( $G_0$ ) mannose	PAMAM( $G_0$ )-mannose-FITC	Au-PAMAM( $G_0$ )
<i>Élongation O-H de sucre</i>	-	3886	3885	-
<i>Élongations N-H de l'amine primaire et amide secondaire</i>	3522-3368	3342	3371-3318	3500-3000
<i>Élongation C-H aromatique</i>	-	3040	3066-3043	-
<i>Élongation symétrique et asymétrique C-H de <math>CH_2</math></i>	3039-2882	3065-2769	3043-2755	2939 et 2860
<i>Élongation de C=O de l'amide secondaire</i>	1726	1727	1709	1626
<i>Déformation C-H aromatique</i>	-	1792-1756	1794-1560	-
<i>Déformation de N-H de l'amide secondaire et l'amine primaire</i>	1668	1513	1510-1453	1560
<i>Élongation de C-N de l'amide secondaire</i>	1424	1376	1316-1108	1444
<i>Déformations angulaires de <math>CH_2</math></i>	1352	1215	1297-931	1355
<i>Élongation de C-N de l'amine primaire</i>	943	-	-	922
<i>Balancement (<math>CH_2</math>), l'amide secondaire et l'amine primaire</i>	817-0	736-0	751-0	816

\* Les données proviennent du spectre IR de figure 3.1.

#### 5.4 Conclusion

Dans cette étude, la modélisation moléculaire des PAMAM( $G_0$ ), PAMAM( $G_0$ )-mannose et PAMAM( $G_0$ )-mannose-FITC suggère des structures ouvertes. En milieu aqueux aucun changement important de la structure n'est calculé. Les longueurs des branches de PAMAM( $G_0$ )-mannose-FITC sont comme suit : 2 nm si non hydraté et 1,9 nm

si hydraté, ce qui indique que le transfert non-radiatif de l'énergie de la fluorescéine vers la particule d'or est difficile à effectuer.

### 5.5 Références

- Dubertret, B., M. Calame et A. Libchaber. 2001. «Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides». *Nature Biotechnolog*, vol. **19**, p. 365-370.
- Maxwell, D., J. Taylor et N. Shuming. 2002. «Self-assembled nanoparticle probes for recognition and detection of biomolecules». *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, p. 9606 – 9612.
- Pineda, A. et D. Ronis. 1985. «Fluorescence quenching in molecules near rough metal surfaces». *J. Chem. Phys.*, vol. 83, p. 5330.

## CHAPITRE VI

# NANOPARTICULES FLUORESCENTES UTILISÉES COMME BIOCAPTEUR

### 6.1 Introduction

Dans ce chapitre des nanoparticules d'au-PAMAM de génération 0 sont utilisées comme support pour construire un nanobiocepteur fluorescent capable de détecter des lectines et des bactéries ayant des récepteurs à mannose. Les nanoparticules sont modifiées avec le  $\alpha$ -D-mannopyranoside (Pagé et Roy, 1997) et la fluorescéine-5(6)-isothiocyanate (FITC) en proportions 99 : 1 (Raja, Wang et Finn, 2003). La synthèse est décrite dans le chapitre II, section 2.4.4. La longueur des branches de PAMAM( $G_0$ )-mannose-FITC, calculée dans le chapitre précédent est de 2 nm, ce qui indique que l'atténuation de la fluorescéine par la nanoparticule d'or est difficile à effectuer. Donc, des nanoparticules fluorescentes Au-PAMAM-mannose-FITC seront synthétisées pour réaliser la détection de Concanavaleine A et *E. coli*.

La méthode de manipulation et détection de Con A dans cette étude est inspirée par la recherche de Klopfer et Nadeau (2003) qui utilisent des nanoparticules fluorescentes de CdSe pour l'étiquetage des bactéries gram positives. Les nanoparticules sont entourées de protéines capables de s'associer sélectivement avec des mono- ou oligosaccharides se trouvant sur la surface de la cellule bactérienne. Les nanoparticules sont incubées avec les bactéries en suspension. Les agrégats formés sont centrifugés et lavés avec de l'eau nanopure, puis mis de nouveau en suspension. La détection se fait par le changement de couleur des bactéries, par microscopie optique ou spectroscopie UV-Vis.

Dans cette étude les nanoparticules modifiées avec le mannose et la fluorescéine sont mises en contact avec Con A. Les complexes formés sont centrifugés et lavés avec de l'eau nanopure et remis en suspension. La détection est effectuée par la mesure de la fluorescence.

La détection d'*E. coli* par les nanoparticules est également présentée. Les mesures de fluorescence sont faites avec la microscopie de fluorescence confocale (Barkenhoff et al, 1979; Valkenburg et al, 1984).

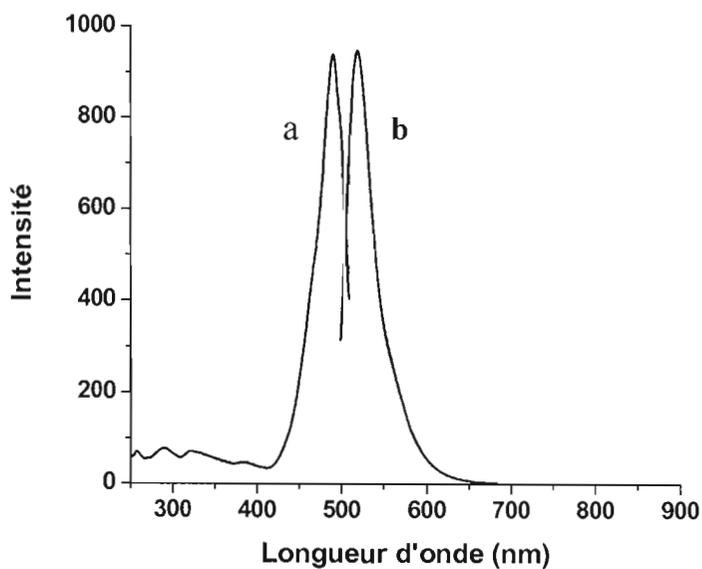
Dans le chapitre III, il a été vu qu'Au-PAMAM-mannose reconnaît la lectine Con A, tandis que l'Au-PAMAM-galactose ne la reconnaît pas. Il est connu que *E. coli* possédant des fibrilles de type-1, tout comme Con A se lie spécifiquement avec  $\alpha$ -D-mannose (Karlsson et al, 1995), mais interagit très peu avec le  $\beta$ -D-galactose (Raja, Wang et Finn, 2003). Des nanoparticules modifiées avec  $\beta$ -D-galactose et la tétra-méthyle-rhodamine en proportion 99,5 : 0,5 (Au-PAMAM-galactose-TRITC) sont donc synthétisées dans le but d'être utilisées comme blanc. La synthèse est présentée dans le chapitre II, section 2.4.6.

Les tests d'immunoprécipitation (pour la méthode voir chapitre II, section 2.5.9.2) sont effectués en utilisant des solutions concentrées de Con A et de Au-PAMAM-mannose-FITC (1 mg/ml) pour vérifier si la présence de FITC modifie l'affinité du biocapteur pour Con-A.

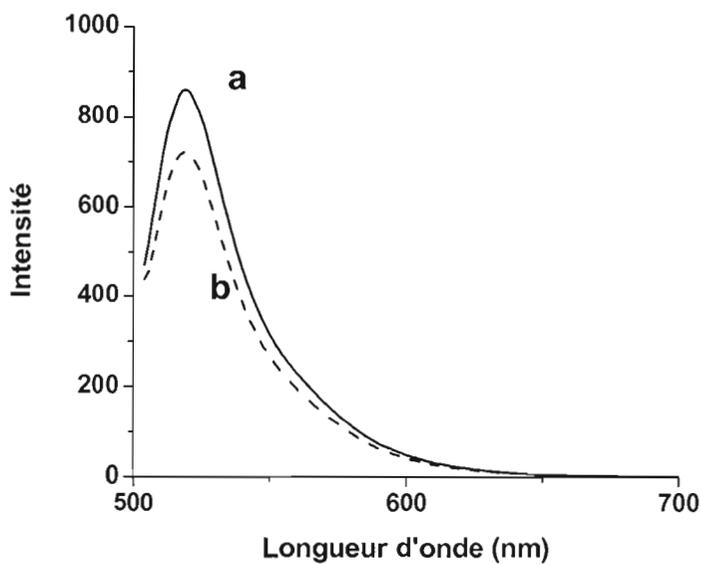
## 6.2 Résultats et discussion

### 6.2.1 Caractérisation de Au-PAMAM-mannose-FITC (99 : 1)

Sur la figure 6.1 les spectres (a) d'excitation et (b) d'émission d'Au-PAMAM-mannose-FITC sont présentés. Les particules sont stables et la fluorescence reste constante avec le temps (mesures faites pour plus qu'une année). La réaction de Au-PAMAM-mannose-FITC avec Con A amène à une diminution de 16 % de l'intensité de la fluorescence (figure 6.2, pour la méthodologie voir chapitre II, section 2.5.8.3).



**Figure 6.1** Spectre (a) d'excitation et (b) d'émission de l'Au-PAMAM-mannose-FITC (99 : 1), concentration 0,1 mg/ml dans le PBS.



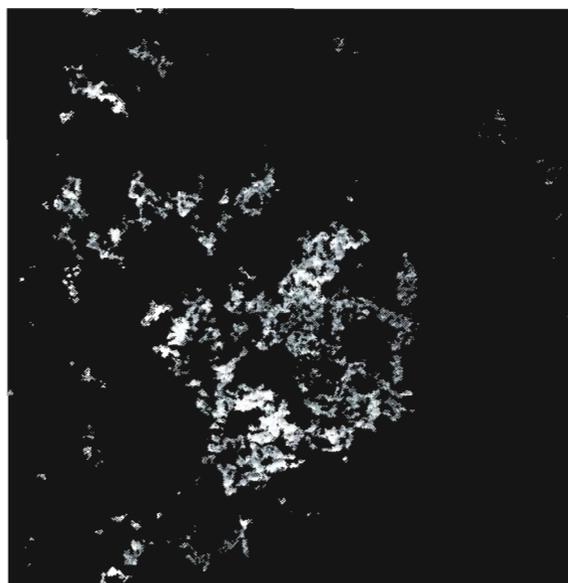
**Figure 6.2** Spectre d'émission (a) de l'Au-PAMAM-mannose-FITC (99 : 1), concentration 0,1 mg/mL dans le PBS et (b) de l'Au-PAMAM-mannose-FITC (99 : 1) 0,1 mg/mL + Con A.

### 6.2.2 Détection de la bactérie *E. coli* à l'aide de Au-PAMAM-mannose-FITC

La microscopie confocale de fluorescence (Barkenhoff et al, 1979; Valkenburg et al, 1984) est utilisée pour examiner la spécificité du biocapteur (voir chapitre II, 2.5.11). Les bactéries sont mises en contact avec les nanoparticules Au-PAMAM-mannose-FITC et ensuite immobilisées (Karlsson et al, 1995; Stoimenov et al, 2002) sur des plaques de verre (pour la manipulation voir chapitre II, section 2.5.12 – 2.5.15). Deux types de mesures sont faites. La première est basée sur la réflexion de la lumière par les bactéries et les nanoparticules d'or. Dans ce cas l'appareil fonctionne comme un microscope, ce qui rend possible la détection des bactéries auxquelles les nanoparticules sont accrochées, ainsi que les bactéries individuelles. Des agglomérats de bactéries et de nanoparticules sont observés. Un tel agglomérat est représenté sur la figure 6.3. Les points noirs correspondent aux agrégats de nanoparticules et les bâtons blancs aux bactéries *E. coli*. Des bactéries individuelles sont aussi observées cependant, la plus grande partie des *E. coli* se trouve regroupées autour des particules. L'autre type de mesure est basé sur la fluorescence détectée à 523 nm. Sur la figure 6.4 on voit les agrégats de la figure 6.3 en mode fluorescence. Les agrégats de bactéries et particules sont très fluorescents et facilement détectables. Par contre, les bactéries individuelles ne fluorescent pas.



**Figure 6.3** CSLM, détection par réflectance, de l’Au-PAMAM-mannose-FITC + *E. coli*.



**Figure 6.4** CSLM, détection par fluorescence, de l’Au-PAMAM-mannose-FITC + *E. coli*.

La spécificité du biocapteur Au-PAMAM-mannose-FITC pour la reconnaissance des bactéries *E. coli* est démontrée. Pour ce faire, les particules modifiées avec galactose sont utilisées (Au-PAMAM-galactose-TRITC) et la détection de la fluorescence est mesurée à 580 nm. Les récepteurs se trouvant sur les fibrilles de la bactérie interagissent faiblement

avec le galactose. De gros agglomérats de particules et de bactéries ne sont pas observés. Les bactéries trouvées sur la plaque sont plutôt individuelles et ne fluorescent pas. Les quelques petits agrégats trouvés présentent une faible fluorescence (figure 6.5 et 6.6) qui est négligeable en comparaison avec la fluorescence des agrégats de Au-PAMAM-mannose-FITC.

Les particules Au-PAMAM-galactose-TRITC peuvent être utilisées dans la détection d'autres bactéries ou protéines spécifiques pour le galactose. Dans sa construction un fluorophore différent (TRITC, émettant à une longueur d'onde différente que FITC) est employé dans le but de pouvoir détecter plusieurs cibles par un mélange de Au-PAMAM( $G_0$ )-galactose-TRITC et Au-( $G_0$ )-mannose-FITC.



**Figure 6.5** CSLM, détection par fluorescence, de l'Au-PAMAM-galactose-TRITC + *E. coli*.



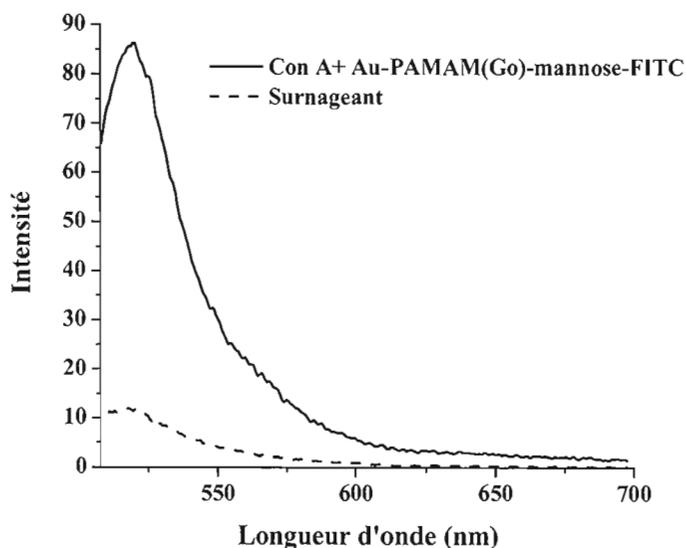
**Figure 6.6** CSLM, détection par réflectance, de l’Au-PAMAM-galactose-TRITC + *E. coli*.

### 6.2.3 Détection de Con A en suspension à l’aide de Au-PAMAM-mannose-FITC

Des tests d’immunoprécipitation (voir chapitre II, section 2.5.9.2) sont effectués en premier lieu pour s’assurer que le greffage du fluorophore sur le biocapteur n’influence pas la reconnaissance spécifique de Con A. La lectine Con A forme des complexes insolubles et colorés avec Au-PAMAM-mannose-FITC. La réversibilité de cette interaction est démontrée en additionnant des excès de D-mannose. Aucune précipitation ne se produit si on mélange Con A avec Au-PAMAM-galactose-TRITC (le blanc), ce qui démontre la spécificité de la reconnaissance.

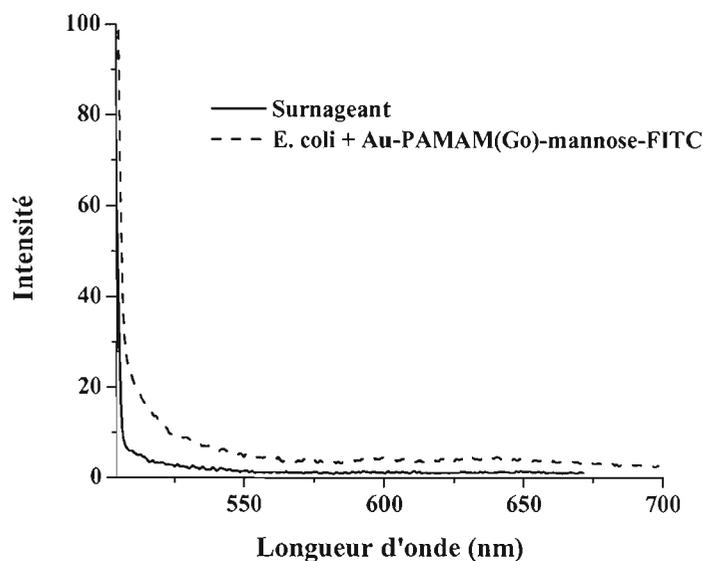
Pour que le précipité soit visible à l’œil une concentration élevée (1 mg/mL ou plus) en lectine et en particules est nécessaire (voir chapitre II, section 2.5.8.4). Pour détecter la Con A en concentrations plus petites (0,5 mg/mL), des mesures de fluorescence sont faites. Dans ce cas, le mélange de Con A et nanoparticules de mannose a été centrifugé et lavé plusieurs fois avec de l’eau. La fluorescence du surnageant est d’abord mesurée pour s’assurer qu’il ne reste pas des particules non réagies avec la lectine. Ensuite, le précipité est mis en suspension (0,5 mg/mL) et sa fluorescence est détectée avec un fluorimètre. Les résultats obtenus (voir figure 6.7) montrent que les Au-PAMAM-mannose-FITC

reconnaissent Con A. Les agrégats en suspension donnent un pic de fluorescence à 523 nm avec une intensité autour de 90, tandis que le surnageant de la même solution centrifugée représente une intensité autour de 10.



**Figure 6.7** Détection de Con A (0,5 mg/mL) en suspension à l'aide de l'Au-PAMAM-mannose-FITC (0,075 mg/mL), excitation à 494 nm, résolution de 5 nm

La méthode décrite plus haut a été appliquée pour la détection des bactéries *E. coli*. L'immunoprécipitation (chapitre II, section 2.5.9.2) est possible si la concentration en bactéries et en particules est élevée (1 mg/mL ou plus). Les complexes sont légèrement colorés. Par contre, un essai pour détecter des concentrations plus faibles (chapitre II, section 2.5.8.4) ne donne pas des résultats satisfaisants. Le précipité dans ce cas a une couleur blanche et ne fluoresce pas (voir figure 6.8). Les bactéries utilisent ses récepteurs sur les fibrilles pour s'accrocher aux nanoparticules en formant des agglomérats. Il est possible que l'affinité des bactéries envers les nanoparticules soit affaiblie après le traitement des échantillons par centrifugation. Les fibrilles des bactéries sont très fragiles et peuvent se décrocher facilement. Une méthode moins brusque est nécessaire, comme par exemple de laisser les complexes précipiter par la gravité ce qui peut prendre beaucoup plus de temps.



**Figure 6.8** Détection de *E. coli* en suspension à l'aide de l'Au-PAMAM-mannose-FITC, excitation à 494 nm, résolution de 5 nm.

### 6.3 Conclusion

La reconnaissance de Con A et *E. coli* par les nanoparticules entourées de glycodendrimères fluorescents a été démontrée. La méthode d'immunoprécipitation est simple, efficace et sélective. Pour des concentrations plus élevées de lectine ou bactérie (1 mg/mL et plus) la détection visuelle est possible. Le résultat obtenu est semblable que celui de Raja, Wang et Finn (2003); Klopfer et Nadeau (2003) et Pagé et Roy (1997).

La détection des concentrations petites en lectine (0,5 mg/ml) est effectuée à l'aide d'un spectromètre de fluorescence. Cette méthode demande plusieurs étapes de lavage. En plus, la détection de *E. coli* n'a pas été possible, contrairement aux résultats obtenus par Klopfer et Nadeau (2003) avec des bactéries gram positives.

La synthèse des particules est coûteuse. Un autre inconvénient est que la fluorescéine diminue la solubilité de la nanoparticule dans l'eau, ce qui confirme les résultats obtenus par Rojas et al (2002). Les particules utilisées dans cette étude sont solubles mais le rapport de FITC : sucres est seulement de 1 : 99 (II, 2.4.4). Des essais pour augmenter le

pourcentage de FITC (à 5 %) donnent des particules insolubles et non fluorescentes. Ce problème est encore plus prononcé avec les particules de galactose. Le produit Au-PAMAM(G<sub>0</sub>)-galactose-TRITC(99 : 1) est non soluble dans l'eau (II, 2.4.5). Le produit Au-PAMAM(G<sub>0</sub>)-galactose-TRITC(99,5 : 0,5) est soluble et fluorescente, mais ces propriétés disparaissent dans quelques semaines (II, 2.4.6).

La reconnaissance de la bactérie *E. coli* par Au-PAMAM-mannose-FITC a été réalisée par microscopie confocale. Un inconvénient de ces approches est que la récupération des nanoparticules après leur utilisation est impossible. Voilà pourquoi dans les chapitres qui suivent des approches électrochimiques de détection sont élaborées.

#### 6.4 Références

- Barkenhoff, G. 1979. «Imaging modes in confocal scanning light microscopy (CSLM)». *J. Microsc.*, vol. 117, p. 233-242.
- Karlsson, A., M. Markafjall, H. Lundqvist, N. Stromberg et C. Dahlgren. 1995. «Detection of glycoprotein receptors on blotting membranes by binding of live bacteria and amplification by growth». *Analytical Biochemistry*, vol. 224, p. 390-394.
- Klopper, J., R. Mielke, M. Wong, K. Nealon, G. Stucky, et J. Nadeau. 2003. «Quantum dots as strain – and metabolism-specific microbiological labels». *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, p. 4205 – 4213.
- Pagé, D. et R. Roy. 1997. «Synthesis and biological properties of mannosylated starburst poly(amidoamine) dendrimers». *Bioconjugate Chem.*, vol. 8, No. 5, p. 714 – 723.
- Raja, K., Qian Wang et M. Finn. 2003. «Icosahedral virus particles as polyvalent carbohydrate display platforms». *ChemBioChem*, vol. 4, p. 1348 – 1351.
- Rojas, T., J. de la Fuente, A. Barrientos, S. Penadés, L. Ponsonnet, et A. Fernández. 2002. «Gold glyconanoparticles as building blocks for nanomaterials design». *Adv. Mater.*, vol. 8, p. 585 – 588.
- Stoimenov, P., R. Klinger, G. Marchin et K. Klabunde. 2002. «Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents». *Langmuir*, vol. 18, p. 6679-6686.
- Valkenburg, J., C. Woldringh, G. Brakenhoff, H. van der Voort et N. Nanning. 1984. «Confocal scanning light microscopy of the Escherichia coli nucleoid: comparison with

phase-contrast and electron microscope images». *Journal of Bacteriology*, vol. 161, p. 478-783.

## CHAPITRE VII

# ÉLECTRO - ASSEMBLAGE DE MONOCOUCHE DE DENDRIMÈRES MODIFIÉS AVEC DES SUCRES SUR LA SURFACE D'UN MONOCRISTAL D'OR (111) POUR LA DÉTECTION DE LECTINES

### 7.1 Introduction

La reconnaissance de Con A et de la bactérie *E. coli* par des nanoparticules d'or entourées de glycodendrimères a été présentée dans les chapitres précédents. Cette méthode démontre bien la spécificité du biocapteur mais présente quelques problèmes, la purification et la sensibilité à la lumière et la chaleur. La détection de Con A par Au-PAMAM-mannose-FITC à l'aide d'un spectromètre de fluorescence est efficace. La reconnaissance de la bactérie *E. coli* a été aussi réalisable par la microscopie confocale. Dans cette méthode la récupération des nanoparticules après leur utilisation est impossible. Voilà pourquoi dans une deuxième approche discutée dans ce chapitre, l'électro-assemblage de monocouches de glycodendrimères sur un monocristal d'or a été effectué. Cette méthode consiste l'adsorption oxydative des dendrimères sur l'or(111), la modification des amines terminales avec du mannose et la détection spécifique de Con A par la spectroscopie d'impédance électrochimique. La méthode électrochimique de détection est moins sensible que la fluorescence, là où des molécules individuelles peuvent être détectées mais donne la possibilité de construire un biocapteur réutilisable.

La méthode d'électrodéposition consiste en l'application d'un potentiel dans une solution électrolytique contenant le composé à déposer. Ces molécules s'oxydent et

s'adsorbent à la surface de l'or. Le potentiel est choisi dans le domaine où il n'y a pas d'autres processus d'oxydoréduction. Le temps optimal de déposition est celui qui donne un taux de recouvrement maximum (le nombre de moles déposé sur une unité de surface). Le taux de recouvrement maximal d'un thiol aliphatique est de  $7,6 \times 10^{-10}$  mol.cm<sup>-2</sup> (Alves, Schmidt et Porter, 1992). Ce résultat est compatible avec l'adsorption dans l'interstice entre trois atomes d'or (Calvente et al, 2001).

Le phénomène d'électrodéposition de monocouches de thiols dans des solutions diluées a été étudié par Qu et Morin (2004; 2001). Ils proposent un mécanisme d'adsorption oxydatif des alkyl thiols. Il a été vu que l'adsorption oxydative est influencée par la concentration de thiolates dans la solution utilisée. Ainsi, elle se fait en deux étapes indépendantes. Pour les concentrations plus petites que  $7 \times 10^{-5}$  M la première étape est un processus de Langmuir soit l'adsorption indépendante des molécules sur la surface d'or. Lors de cette adsorption la plus grande partie des molécules sont déposées sur la surface d'or. La deuxième étape est un processus de Langmuir plus lent relié avec la réorganisation et la déposition du reste des molécules. La basse concentration amène à une diffusion limitée des molécules vers la surface de l'électrode se qui limite la vitesse de formation de la couche.

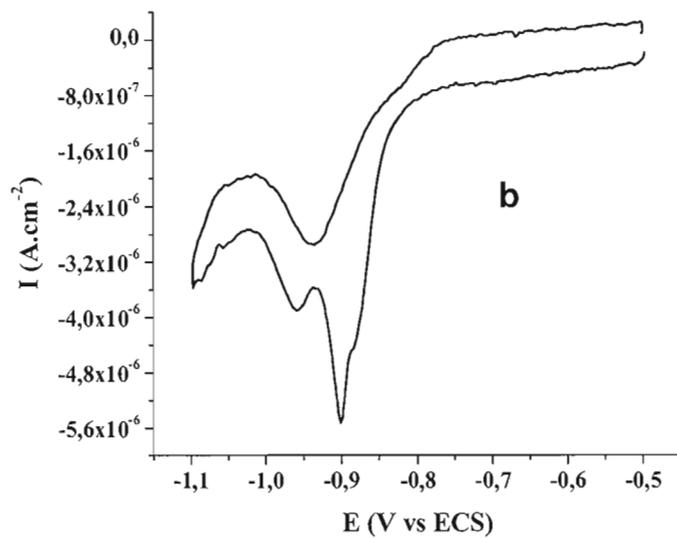
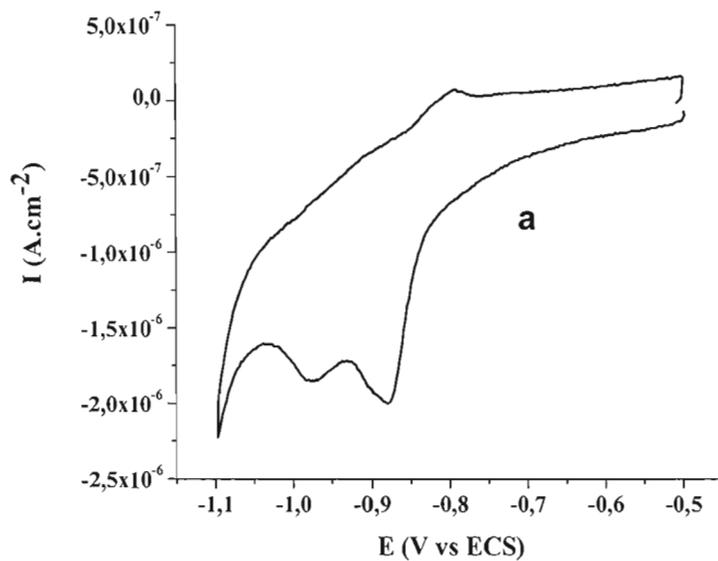
Pour les concentrations plus grandes que  $7 \times 10^{-4}$  M l'adsorption initiale se caractérise par la nucléation et la croissance due à l'interaction attractive entre les molécules dans la solution et la formation des micelles. La déposition commence par formation des noyaux compacts et stables. La deuxième étape est toujours un processus Langmuir.

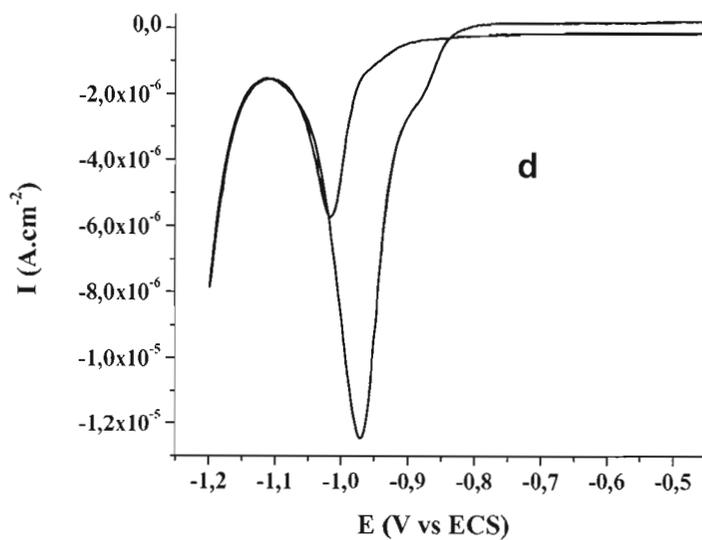
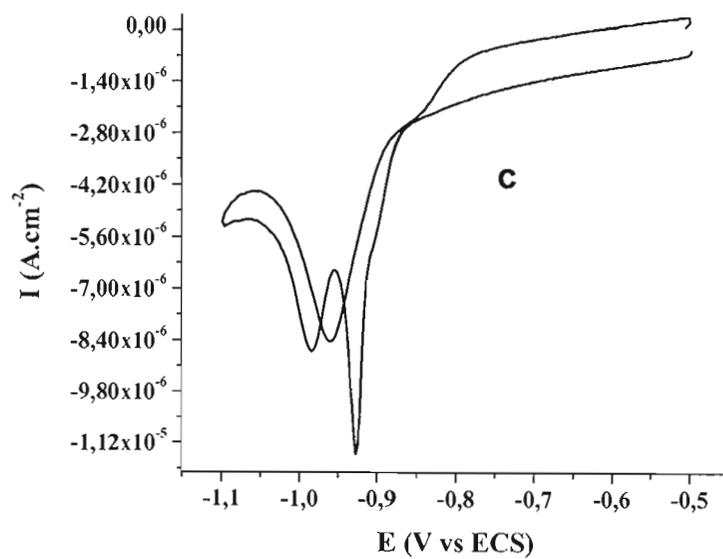
Il a été démontré que les dendrimères de PAMAM peuvent être immobilisés sur des surfaces d'or dans le but d'être utilisés comme biosenseurs (Svobodova et al, 2004; Yoon et Kim, 2000). L'adsorption se fait par les groupes amines se trouvant sur la surface des dendrimères. Les films sont formés par auto-assemblage pour 18 h et démontrent une bonne stabilité mécanique et une possibilité de fonctionnalisation (Svobodova et al, 2004). La grande surface des dendrimères augmente le nombre de fonctions immobilisées, donc la sensibilité de détection. La formation des films mixtes de PAMAM de génération 0 ou 1 avec 1-hexadecanethiol (Svobodova et al, 2004; Svobodova, Snejdarkova et Hianik, 2002), hexylmercaptan (Snejdarkova et al, 2001) a été aussi effectuée dans le but d'obtenir des films plus compacts. Pour utiliser les films organiques comme biosenseurs il faut effectuer les mesures dans l'eau à pH neutre.

Les dendrimères de PAMAM dans notre cas contiennent un pont disulfure provenant de la cystamine. Il a été vu que la liaison S – S peut être détruite et les deux branches de chaque dendrimère s'adsorbent facilement sur une nanoparticule d'or. Le même processus pourrait être effectué sur un monocristal d'or (111). Une première possibilité pour faciliter l'adsorption est de réduire les disulfures en thiols en utilisant  $\text{NaBH}_4$  et ensuite d'adsorber les thiols sur la surface d'or. La deuxième possibilité c'est d'effectuer l'adsorption oxydative directement à partir des disulfures. La formation des couches auto-assemblées d'alkyl disulfures (Ulman, 1991) et des oligonucléotides fonctionnalisés avec des disulfures (Wackerbarth et al, 2004) est déjà connue. Il suffit d'exposer la surface d'or à la solution de ces composés et la réaction se réalise spontanément. Dans ce travail l'adsorption oxydative de PAMAM (disulfure) ainsi que de PAMAM-SH (modifié en thiol) est réalisée. Ensuite les amines terminales sont modifiées avec du mannose et la détection de la lectine Con A est accomplie par des mesures électrochimiques.

## 7.2 Résultats et discussion

La synthèse de PAMAM-SH est décrite dans chapitres II, section 2.4.8. La cellule à trois électrodes utilisée pour les mesures électrochimiques est montrée à la figure 2.10. Les méthodes et l'appareillage pour la formation de la monocouche de PAMAM sont données dans le chapitre II, section 2.6. L'étude de la déposition oxydative de PAMAM et PAMAM-SH est effectuée en utilisant différentes conditions : temps de déposition (de 0 à 30 minutes) et concentration de PAMAM (de  $10^{-3}$  à  $10^{-7}$  M). Le disulfure et le thiol donnent des résultats semblables, les voltampérogrammes cycliques ont la même allure. Le pic oxydatif vers -0,79 V versus ECS correspond à la déposition oxydative ( $\text{PAMAM-S}^- + \text{Au} \rightarrow \text{Au-S-PAMAM} + 1e^-$ ), les pics réductifs (négatifs) à -0,88 V et -0,98 V correspondent à la désorption réductive ( $\text{Au-S-PAMAM} + 1e^- \rightarrow \text{Au} + \text{PAMAM-S}^-$ ) (voir figure 7.1a). Les pics d'oxydation et de réduction ne sont pas symétriques. Les pics d'oxydation sont très faibles, ce qui est lié à la solubilité de PAMAM dans l'eau. Après la désorption les molécules de PAMAM s'éloignent de l'électrode.





**Figure 7.1** Voltampérommes cycliques du PAMAM-SH après une déposition potentiostatique de 5 minute sur un monocristal d'or dans KOH 0,1 M et une vitesse de balayage de 20 mV/s. (a) concentrations du PAMAM de  $2 \times 10^{-5}$  M, (b)  $4,3 \times 10^{-5}$  M, (c)  $2 \times 10^{-4}$  M, (d)  $2 \times 10^{-3}$  M.

Les voltampérogrammes cycliques mesurés pour différentes concentrations de PAMAM-SH sont présentés sur la fig. 7.1 a, b, c, d. En augmentant la concentration de PAMAM plus que  $2 \times 10^{-5}$  M on remarque un déplacement du pic de réduction vers le potentiel plus négatif avec une augmentation du courant. Ces changements signifient que la couche formée est plus dense ce qui fait la pénétration des ions pendant la réduction plus difficile ce qui cause le déplacement du pic. Également le deuxième pic de réduction devient plus important.

Le pic correspondant à la déposition oxydative disparaît avec l'augmentation de la concentration. En plus, un pic réductif commence à se former lors du cycle anodique indiquant qu'un processus de réduction se produit. Il s'agit peut-être d'un processus de réduction de disulfure de PAMAM dans la solution en thiols (Buettner, 1993; Antonello et al, 2003; Borsari et al, 2002). Pour des concentrations plus grandes que  $10^{-3}$  M ce pic devient plus important que le pic de réduction associé à la désorption réductive des PAMAM (voir fig. 7.1d).

Pour des concentrations plus petites que  $2 \times 10^{-5}$  M des voltampérogrammes cycliques semblables à celui de fig. 7.1a sont obtenues. Pour s'assurer d'avoir le bon processus d'adsorption avec un taux de recouvrement élevé, la construction de notre biocapteur est effectuée en utilisant une concentration de déposition de  $2 \times 10^{-5}$  M en PAMAM (ou PAMAM-SH).

Les voltampérogrammes cycliques mesurés pour différentes concentrations de PAMAM ne sont pas présentés ici parce qu'ils sont semblables à ceux de la fig. 7.1. Les pics de désorption réductive sortent toujours à -0,88 et -0,98 V vs ECS avec une charge d'environ  $6 \times 10^{-6}$  C pour une concentration de  $2 \times 10^{-5}$  M et un temps de déposition de 5 minutes. On peut constater que le PAMAM et le PAMAM-SH s'adsorbent de la même façon sur la surface d'or. La liaison S-S de PAMAM se brise au potentiel de déposition de -0,5 V et une molécule de PAMAM donne deux molécules de thiol PAMAM-SH. Dans une solution de 0,1 M de KOH les thiols se trouvent déprotonés PAMAM-S<sup>-</sup>. L'électrodéposition à partir des PAMAM est plus simple et plus rapide que celle de PAMAM-SH.

L'étude suivante porte sur le temps de déposition optimal pour obtenir un taux de recouvrement maximal. Le premier pic de réduction après une déposition potentiostatique est une mesure de la quantité du composé réduit. La charge de ce pic permet le calcul du

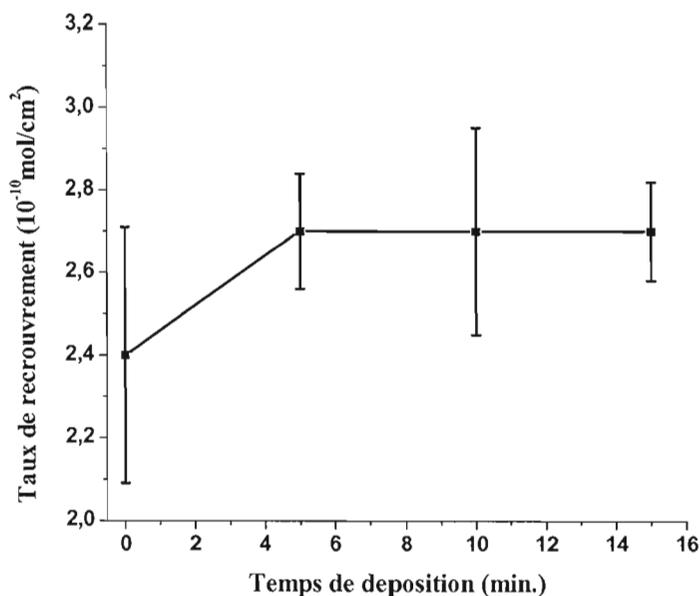
taux de recouvrement en sachant qu'un électron est consommé pour la désorption réductive de chaque molécule. La déposition potentiostatique est effectuée à un potentiel de  $-0.5V$  appliqué pour différents temps (0, 5, 10, 15 et 30 minutes). La concentration de PAMAM-S<sup>-</sup> dans KOH 0,1 M est de  $2 \times 10^{-5}$  M. Ensuite le voltampérogramme cyclique est enregistré dans la même solution en balayant le potentiel de  $-0,5$  V à  $-1,1$  V. La charge du premier pic de désorption réductive a été calculée par le logiciel CorrView<sup>TM</sup> soustrayant la ligne de base. Pour obtenir le taux de recouvrement la formule suivante est utilisée :

$$\Gamma \text{ (mol.cm}^{-2}\text{)} = \text{Charge (C)} / S \text{ (cm}^2\text{)} F \text{ (C.mol}^{-1}\text{)} \quad (7.1)$$

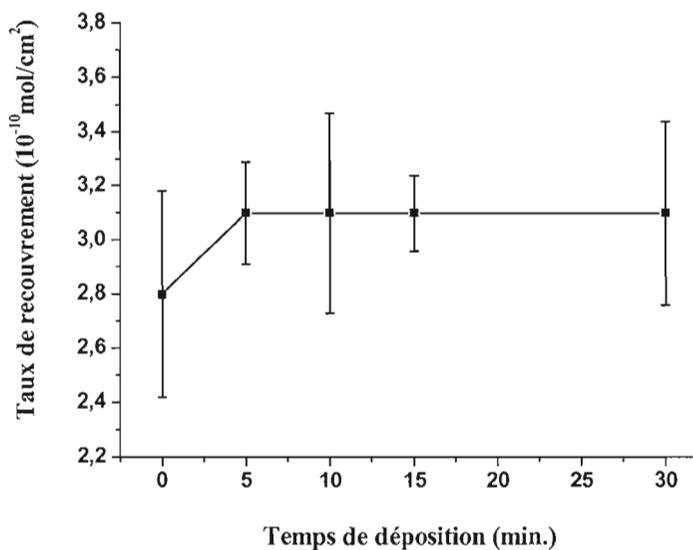
où S est la surface de l'électrode de  $0,195 \text{ cm}^2$  et F est la constante de Faraday de  $96\,485 \text{ C.mol}^{-1}$ .

Le taux de recouvrement en fonction du temps de déposition pour le PAMAM et PAMAM-SH est présenté sur les figures 7.2 et 7.3. Les deux courbes suivent la même tendance. D'abord le taux de recouvrement augmente avec le temps de déposition. Après la 5<sup>ème</sup> minute la surface d'électrode est saturée et les changements du taux de recouvrement ne sont pas grands. Le taux de recouvrement pour PAMAM-SH est légèrement plus élevé ( $3,1 \pm 0,4 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$  pour une déposition de 10 min.) que ce de PAMAM ( $2,7 \pm 0,3 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$  pour une déposition de 10 min.). Comme l'utilisation de PAMAM-SH demande une étape supplémentaire, il est plus avantageux de faire la déposition directement à partir de PAMAM. Voilà pourquoi, les expériences qui suivent sont faites avec PAMAM. Un temps de déposition potentiostatique de 10 minutes est employé.

Le calcul du taux de recouvrement donne la possibilité d'estimer le nombre d'amines terminales se trouvant sur une nanoparticule d'or en sachant que sa surface est principalement d'une orientation (111) (Chen et al, 200). La surface d'une nanoparticule de 2 nm est de  $12,6 \text{ nm}^2$ . Si le taux de recouvrement de la surface est de  $3,1 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$ , donc 23 branches de dendrimères sont adsorbées sur chaque particule ce qui correspond à 46 groupes d'amines.



**Figure 7.2** Taux de recouvrement en fonction du temps de déposition du PAMAM. Potentiel de la déposition potentiostatiques de -0,5V, vitesse de 20 mV/s, concentration du PAMAM-S $^-$  de  $2 \times 10^{-5}$  M dans KOH 0,1 M.

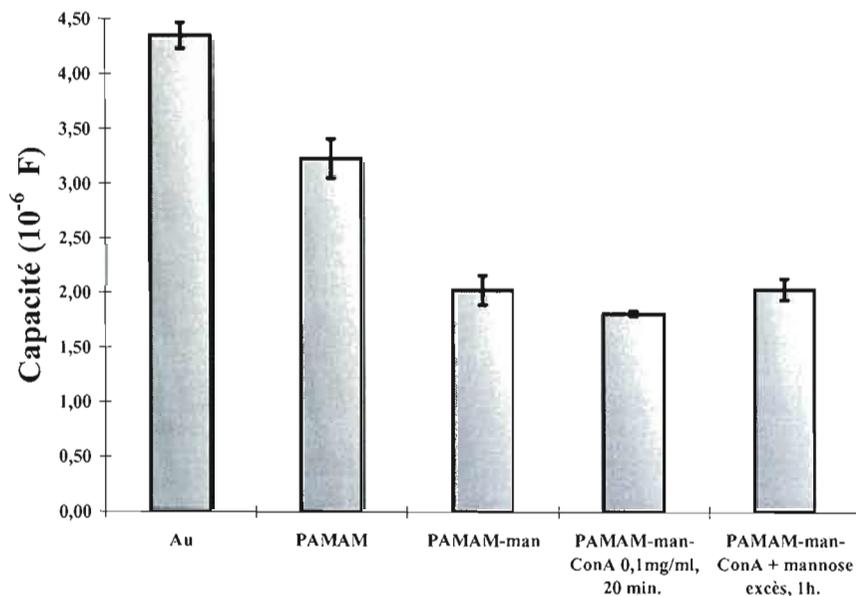


**Figure 7.3** Taux de recouvrement en fonction du temps de déposition du PAMAM-SH. Potentiel de la déposition potentiostatiques de -0,5V, vitesse de 20 mV/s, concentration du PAMAM-S $^-$  de  $2 \times 10^{-5}$  M dans KOH 0,1 M.

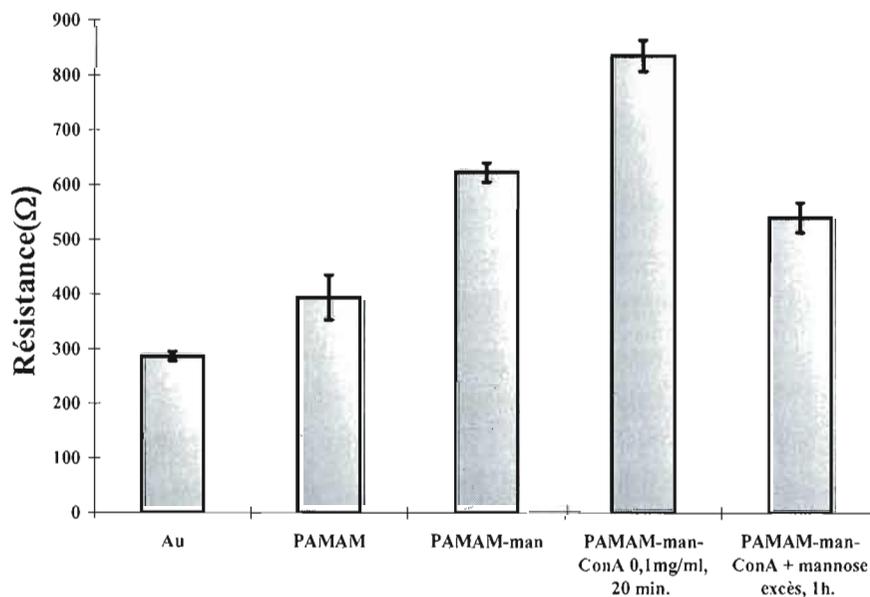
Après avoir électrodéposé la monocouche de PAMAM sur la surface d'or, les amines terminales ont été modifiées avec du mannose. La réaction a été effectuée directement sur l'électrode. Chaque étape de construction du biocapteur a été suivie par la spectroscopie d'impédance électrochimique (voir chapitre II, section 2.6.4). Les résultats sont présentés sur les figures 7.4 et 7.5. Avec le blocage de la surface de l'électrode la capacité diminue et la résistance augmente. L'or (111) après un recuit démontre une capacité de  $4,4 \pm 0,1 \times 10^{-6}$  F et une résistance de  $286 \pm 8 \Omega$ . Après la déposition de la couche de PAMAM la capacité tombe à  $3,2 \pm 0,2 \times 10^{-6}$  F et la résistance augmente à  $395 \pm 41 \Omega$ . Le greffage du mannose diminue encore la capacité à  $2,0 \pm 0,1 \times 10^{-6}$  F et augmente la résistance à  $624 \pm 17 \Omega$ . Ces résultats supportent la formation de la monocouche de PAMAM et le greffage du mannose.

Le monocristal modifié avec le PAMAM et le mannose représente un capteur qui peut être utilisé pour la détection des lectines spécifique pour le mannose. Un premier essai a été fait avec la lectine Con A dont l'affinité envers le mannose est connue. L'électrode modifiée est mise en contact avec la lectine (0,1 mg/ml) pour une durée de 20 minutes. Ensuite la capacité et la résistance sont mesurées. La capacité diminue à  $1,81 \pm 0,02 \times 10^{-6}$  F et la résistance augmente à  $837 \pm 29 \Omega$ . La réversibilité de la réaction entre le mannose et Con A a été démontrée précédemment. Cette réversibilité est utilisée ici pour déplacer la lectine de la surface du senseur et le rendre réutilisable. Pour se faire l'électrode est trempée dans une solution concentrée de D-mannose pendant 1 h. On remarque que les valeurs mesurées de la capacité ( $2,0 \pm 0,1 \times 10^{-6}$  F) et la résistance ( $542 \pm 27 \Omega$ ) sont proches des valeurs avant la réaction avec Con A. Donc Con A est détaché de la surface et le senseur est prêt pour une deuxième utilisation. Des tests répétitifs d'adsorption et désorption de Con A sur la même surface ont été effectués et les résultats obtenus sont reproductibles.

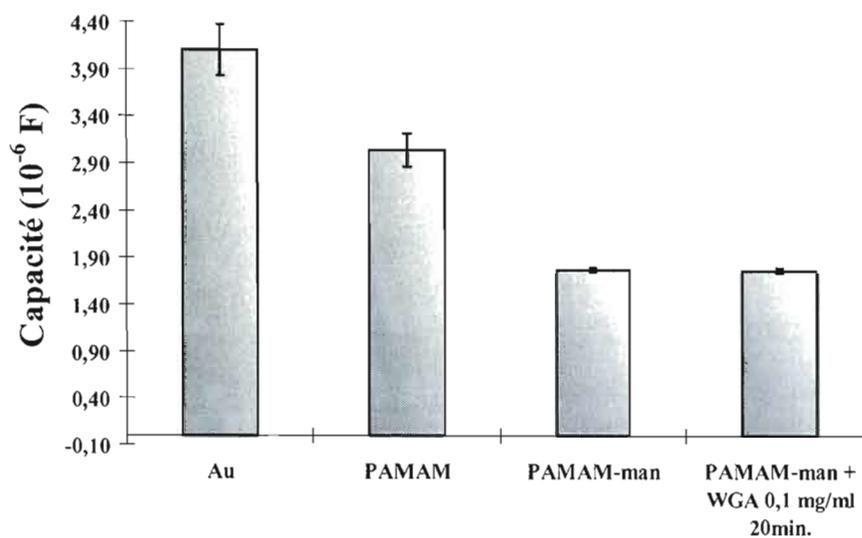
Pour démontrer la spécificité du capteur des tests avec *Triticum vulgaris* (WGA) sont effectués. Le WGA est un lectine qui au pH neutre est en forme de dimère avec une masse moléculaire de 36 kDa. Le WGA a une faible activité versus le mannose. La capacité et la résistance ne changent pas après avoir immergé l'électrode modifiée dans une solution de WGA (0,1 mg/ml) (voir figures 7.6 et 7.7).



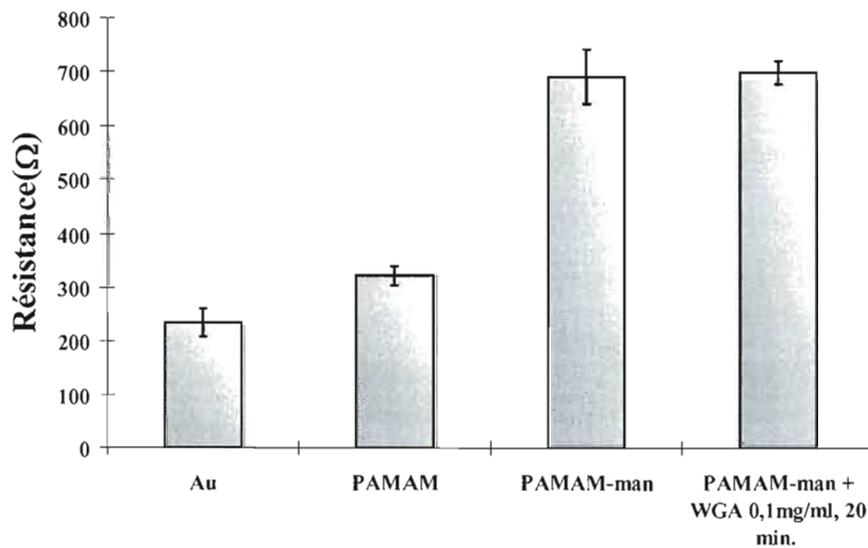
**Figure 7.4** Détection de Con A. Capacité mesurée à  $-0,4$  V vs référence (ECS) dans le PBS (pH = 7,4) à la température de la pièce. Fréquence de 20 Hz, amplitude de 10 mV, vitesse de 5 mV/s.



**Figure 7.5** Détection de Con A. Résistance mesurée à  $-0,4$  V vs référence (ECS) dans le PBS (pH = 7,4) à la température de la pièce. Fréquence de 20 Hz, amplitude de 10 mV, vitesse de 5 mV/s.



**Figure 7. 6** Essai avec WGA. Capacité mesurée à -0,4 V vs référence (ECS) dans le PBS (pH = 7,4) à la température de la pièce. Fréquence de 20 Hz, amplitude de 10 mV, vitesse de 5 mV/s.

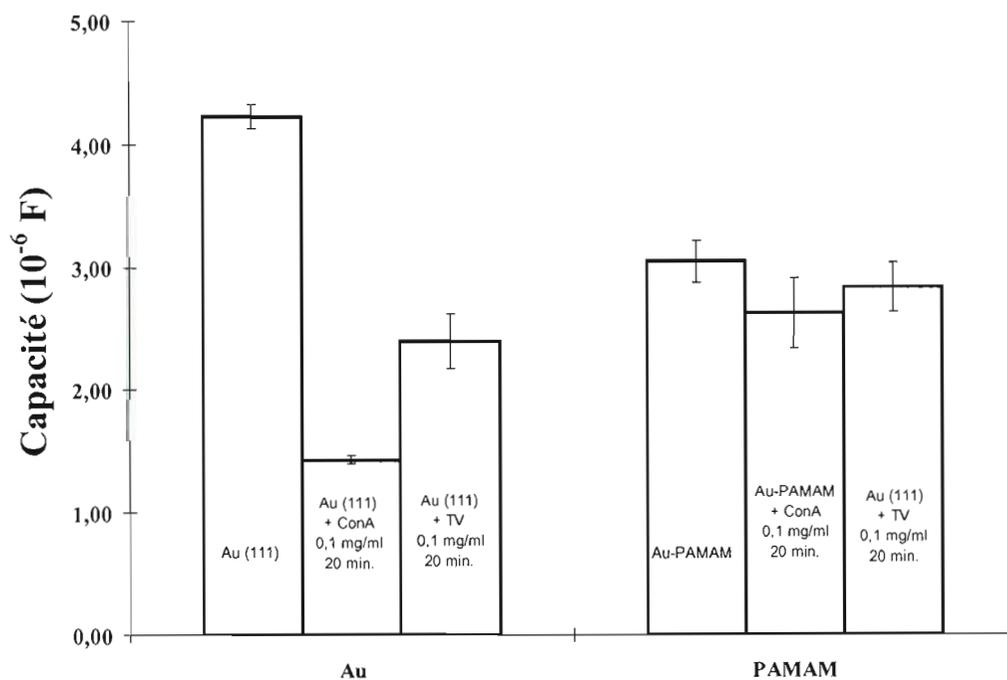


**Figure 7.7** Essai avec WGA. Résistance mesurée à -0,4 V vs référence (ECS) dans le PBS (pH = 7,4) à la température de la pièce. Fréquence de 20 Hz, amplitude de 10 mV, vitesse de 5 mV/s.

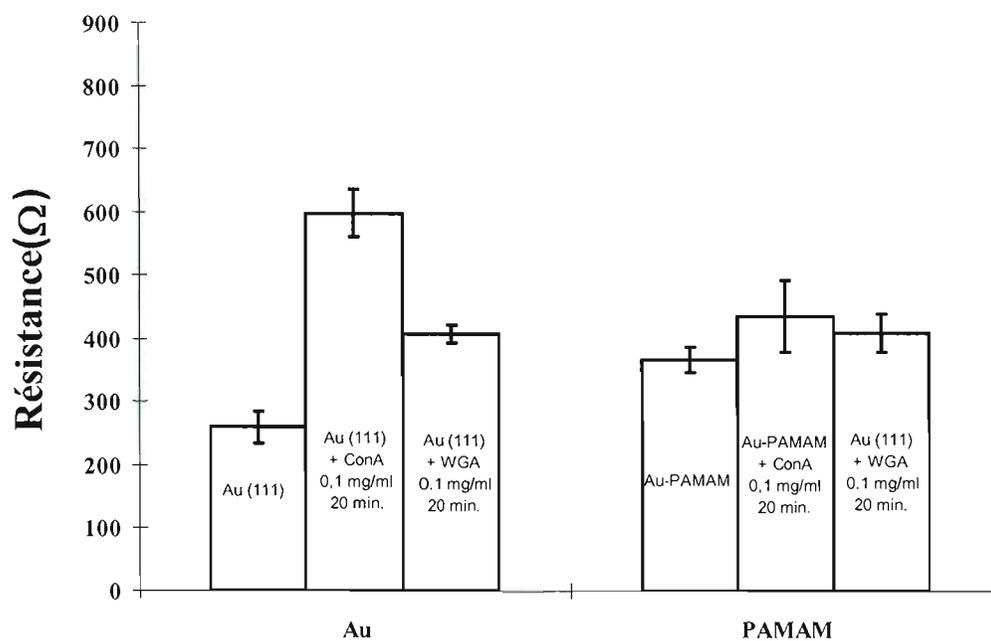
Con A et WGA collent facilement sur la surface d'Au (111). Même quelques minutes de contact sont suffisantes. Comme il est possible de constater sur les figures 7.8 et 7.9, la capacité et la résistance de l'Au (111) subissent des grands changements après que le monocristal ait été trempé dans des solutions de 0,1 mg/ml Con A et WGA.

Les tests semblables ont été effectués avec les monocouches de PAMAM (figures 7.8 et 7.9). La déposition de PAMAM sur la surface d'or empêche en partie l'adsorption de Con A et WGA. La différence entre les valeurs de capacité et résistance entre dans les erreurs expérimentales.

Finalement, le greffage du mannose sur PAMAM rend la surface du monocristal sélective.



**Figure 7.8** Test sur l'Au(111) non modifié. Capacité mesurée à -0,4 V vs référence (ECS) dans le PBS (pH = 7,4) à la température de la pièce. Fréquence de 20 Hz, amplitude de 10 mV, vitesse de 5 mV/s.



**Figure 7.9** Test sur l’Au(111) non modifié. Résistance mesurée à  $-0,4$  V vs référence (ECS) dans le PBS (pH = 7,4) à la température de la pièce. Fréquence de 20 Hz, amplitude de 10 mV, vitesse de 5 mV/s.

Il a été démontré précédemment (chapitre II) que le greffage du galactose sur la surface du PAMAM est aussi possible. La réaction est simple et se déroule de la même façon que celle avec le mannose. Cela nous laisse croire que ce greffage peut s’effectuer avec succès sur le monocristal modifié avec le PAMAM. L’échange du mannose par un autre sucre peut donner la possibilité d’adapter le capteur d’après les utilisations demandées.

### 7.3 Conclusion

Dans cette étude, la construction d’un biocapteur par l’électrodéposition de PAMAM a été réussie. La synthèse est plus simple que la synthèse du biocapteur basé sur les nanoparticules. Il a été vu que l’électrodéposition à partir des PAMAM et PAMAM-SH

donne des résultats semblables avec un taux de recouvrement d'environ  $3 \times 10^{-10}$  mol.cm<sup>-2</sup>. Cette valeur est beaucoup plus basse que le taux de recouvrement calculé pour un thiol aliphatique (Alves, Schmidt et Porter, 1992), ce qui est relié à la grosseur de la molécule de PAMAM.

Les meilleures conditions de déposition trouvées sont une concentration en PAMAM de  $2 \times 10^{-5}$  M et un temps de déposition potentiostatique de 5-10 minutes à -0,5 V. Ce temps de déposition est beaucoup plus court que le temps nécessaire pour la formation des couches auto-assemblées des alkyles disulfures (Ulman, 1991; 1996), des oligonucléotides fonctionnalisés avec des disulfures (Wackerbarth et al, 2004), ainsi que des couches de PAMAM (Svobodova et al, 2004). Les monocouches de PAMAM sont stables, ce qui est en accord avec l'étude de Svobodova et al (2002, 2004) et Snejdarkova (2001).

La modification des amines terminales de PAMAM avec du mannose a permis la détection spécifique de la lectine Con A. Le capteur est réutilisable, un lavage avec une solution concentrée de mannose permet le déplacement du lectine de la surface. La détection est simple mais il manque de sensibilité et sélectivité par rapport à la fluorescence. Par exemple WGA a quant même une faible activité versus le mannose qui ne peut pas être détecté par la spectroscopie d'impédance électrochimique.

#### 7.4 Références

Alves, C., E. Schmidt et M. Porter. 1992. «Atomic scale imaging of alkanethiolate monolayers at gold surfaces with atomic force microscopy». *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 114, p. 1222-1227.

Antonello S., K. Daasbjerg, H. Jensen, F. Taddei et F. Maran. 2003. «Formation and cleavage of aromatic disulfide radical anions». *JACS*, vol.125, p. 14905-14916.

Borsari M., M. Cannio et G. Gavioli. 2003. «Electrochemical behavior of diphenyl disulfide and thiophenol on glassy carbon and gold electrodes in aprotic media». *Electroanalysis*, vol. 15, p. 1192-1197.

Buettner GR. 1993. «The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate». *Arch Biochem Biophys*, vol. 300, p. 535-543.

- Calvente, J., M. Gil, R. Andreu, E. Rolan et M. Dominguez. 1999. «Influence of adsorption/diffusion coupling on surface voltammetric waves. First stages of 2-mercaptoethanesulfonate oxidative adsorption on gold ». *Langmuir*, vol. 15, p. 1842-1852.
- Chen, S., A. Templeton, R. Murray. 2000. «Monolayer-protected cluster growth dynamics». *Langmuir*, vol. 16, p. 3543 - 3548.
- Qu, D. et M. Morin. 2004. «The effect of concentration on the oxidative deposition of a monolayer of alkylthiolate on gold: from island formation to random adsorption». *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 565, p. 235–242.
- Qu, D. et M. Morin. 2001. «An EQCM study of the oxidative deposition of alkylthiolates on gold». *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 517, 45–53.
- Snejdarkova, M., L. Svobodova, V. Gajdos et T. Hianik. 2001. « Glucose biosensors based on dendrimer monolayers». *J. Mater. Sci., Mater. Mad.*, vol. 12, p. 1079-1082.
- Svobodova, L., M. Snejdarkova, K. Toth, R. Gyrcsanyi et T. Hianik. 2004. «Properties of mixed alkanthiol-dendrimer layers and their applications in biosensing». *Bioelectrochemistry*, vol. 63, 285-289.
- Svobodova, L., M. Snejdarkova et T. Hianik. 2002. «Properties of glucose biosensors based on dendrimer layers. Effect of enzyme immobilization ». *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 373, p. 735-741.
- Ulman, A. 1996. «Formation and structure of self-assembled monolayers». *Chem. Rev.*, vol. 96, p. 1533.
- Ulman, A. 1991. «Ultrathin organic films». First Ed.; Academic Press, Inc.: San Diego.
- Wackerbarth, H., R. Marie, M. Grubb, J. Zhang, A. Hansen, I. Chorkendorff, C. Christensen, A. Boisen et J. Ulstrup. 2004. «Thiol- and disulfide-modified oligonucleotide monolayer structures on polycrystalline and single-crystal Au(111) surfaces». *Journal of Solid State Electrochemistry*, vol. 8, 474-481.
- Yoon H. et H. 2000. «Multilayered assembly of dendrimers with enzymes on gold - thickness-controlled biosensing interface». *Kim. Anal. Chem.*, vol. 72(5), 922-926.

## CHAPITRE VIII

# MICROBALANCE À CRISTAL DE QUARTZ POUR LA DÉTECTION DE LECTINES

### 8.1 Introduction

Dans le chapitre précédent la spectroscopie d'impédance électrochimique a été utilisée pour la reconnaissance de Con A à l'aide des monocouches de PAMAM adsorbés électrochimiquement sur l'Au (111) et modifiés avec du mannose. Il a été mentionné aussi que WGA, qui a une faible affinité pour le mannose, ne peut pas être détectée par cette méthode. Dans le présent chapitre la microbalance à cristal de quartz (QCM) est utilisée afin d'augmenter la sensibilité du biocapteur en détectant le changement de masse suite à l'adsorption de protéines sur la surface modifiée. Cet appareil est capable de détecter 0,1 nanogrammes.

L'adsorption des protéines a plusieurs applications telles que le développement des biocapteurs (Ram et al, 2001; Saby et Luong, 1998; Olivia et al, 2004), de supports solides pour les techniques de séparation (Kandori, Uoya et Ishikawa, 2002; Puerta et al, 2002) ou d'implants médicaux (Khan, Williams et Williams, 1996). Le QCM est une méthode utile pour étudier les phénomènes d'adsorption.

Le premier résonateur de cristal de quartz utilisé pour suivre la déposition de films minces a été introduit par Sauerbrey en 1959. Il a découvert que l'application d'une tension ayant une fréquence appropriée sur les deux faces d'une lame de quartz cause une oscillation mécanique (processus inverse de la piézo-électricité) qui est proportionnel à l'amplitude du potentiel appliqué. L'utilisation de la résonance spécifique du quartz amène à une proportionnalité directe de la masse déposée sur le cristal au changement de sa fréquence. Un avantage de

cette méthode est qu'on peut déposer une couche de métal sur la surface du quartz et de telle façon de mesurer des interactions spécifiques comme l'adsorption des protéines. Le changement de la masse à la surface de la couche métallique amène à une modification de la fréquence de cristal de quartz (Brosseau et al, 2004).

La déposition de PAMAM sur le Pt ou l' Au et l'étude par QCM a été aussi faite (Takada, 1999; 2001; Storrier, Takada et Abruna, 1999). Les molécules de PAMAM ont subi une fonctionnalisation de la surface pour pouvoir être adsorbées. Manriquez et ses coéquipiers (2003) ont étudié par l'QCM l'adsorption des PAMAM de génération 3; 3,5 et 4 sur une surface d'or propre ou sur une surface d'or modifiée par des thiols. Des taux de recouvrement de  $9 \times 10^{-12}$  mol.cm<sup>-2</sup> pour les PAMAM sur la surface d'or propre et  $18 \times 10^{-12}$  mol.cm<sup>-2</sup> pour les PAMAM sur la surface d'or modifiée ont été obtenus.

Dans cette étude l'adsorption des dendrimères de PAMAM se fait sur un film d'or déposé sur un cristal de quartz (voir chapitre II, section 2.6.5). Les dendrimères sont liés à la surface par une liaison S-Au (voir chapitre VII). Le processus d'adsorption oxydative des thiols a été décrit précédemment (Deyu Qu et Morin, 2001; 2004). Ensuite les amines terminales de PAMAM sont modifiées avec du mannose (voir chapitre II, section 2.4.7). La surface d'or modifiée est immergée dans des solutions concentrées de Con A et WGA. La détection des lectines se fait en mesurant le changement de la fréquence de résonance du cristal causé par leur adsorption à la surface. Le changement de masse sur la surface d'or est calculé à partir du changement de la fréquence à l'aide de l'équation de Sauerbrey (Deyu Qu et Morin, 2001) :

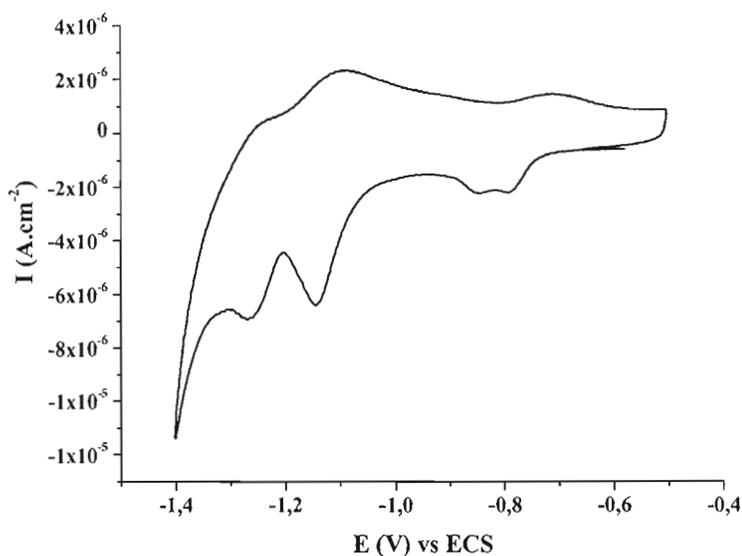
$$\Delta m = - \Delta f * 5.608 \text{ ng cm}^{-2} \text{ Hz}^{-1} \quad (8.1)$$

où m est la masse en ng et f est la fréquence de résonance du cristal de quartz en Hz.

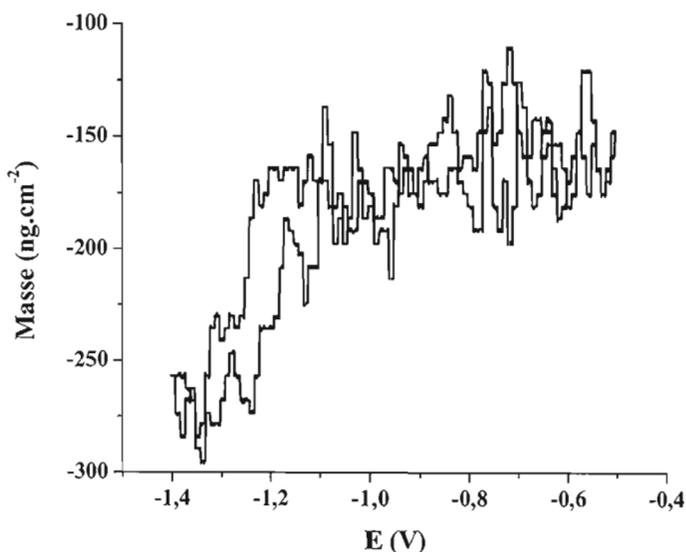
## 8.2 Résultats et discussion

Le cristal de quartz a été monté sur une cellule de 3 électrodes (EQCM ou electrochemical quartz crystal microbalance), dont le cristal de quartz est l'électrode de

travail. De cette façon il a été possible de faire la déposition oxydative de PAMAMs (10 minutes à  $-0,5$  V) et par la suite d'enregistrer un voltampérogramme cyclique (figure 8.1) en même temps que le changement de la fréquence de résonance du cristal de quartz (figure 8.2). La masse de PAMAM qu'on a déposé sur la surface d'or est calculée de deux façons soit : (1) à partir du charge du pic de réduction et (2) à partir de la fréquence. Les valeurs obtenues sont de  $128 \pm 28$  ng.cm<sup>-2</sup> par la méthode (1) et de  $125 \pm 24$  ng.cm<sup>-2</sup> par la méthode (2). Les taux de recouvrement ( $\Gamma$ ) correspondant sont respectivement  $(3,4 \pm 0,8) \times 10^{-10}$  mol.cm<sup>-2</sup> et  $(3,3 \pm 0,7) \times 10^{-10}$  mol.cm<sup>-2</sup>. Ces taux de recouvrement de PAMAM sont similaires au taux de recouvrement de PAMAM sur la surface du monocristal d'or (chapitre VII) ( $(2,7 \pm 0,3) \times 10^{-10}$  mol.cm<sup>-2</sup> pour une déposition de 10 min.). Les erreurs sur les valeurs de  $\Gamma$  pour l'EQCM sont plus élevées. L'orientation de la surface d'or sur l'EQCM est généralement (111) mais elle contient plus de défauts que la surface du monocristal ce qui explique la différence dans les résultats.

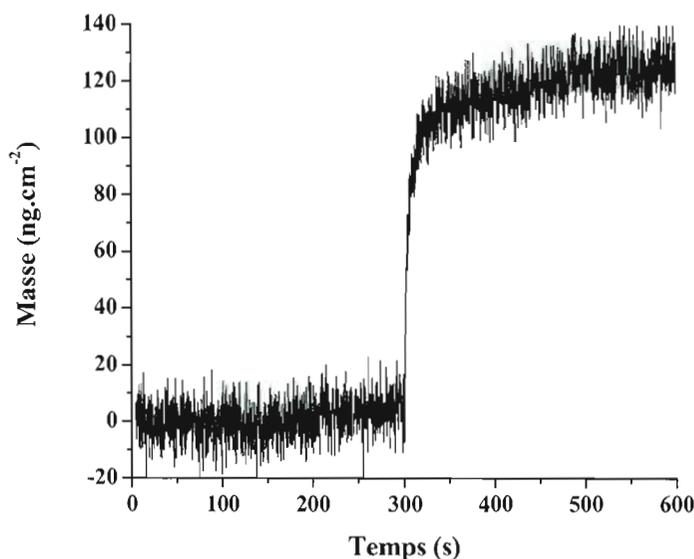


**Figure 8.1.** Voltampérogramme cyclique correspondant à la déposition oxydative et la désorption réductive du PAMAM  $2 \times 10^{-5}$  M dans le KOH 0,5 M, vitesse de balayage de 20 mV/s.



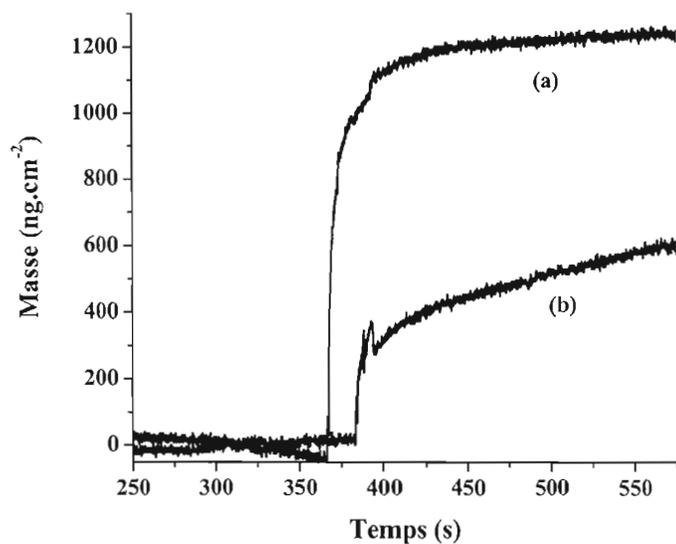
**Figure 8.2.** Changement de la fréquence, converti en masse au cours de la déposition oxydative, désorption réductive du PAMAM  $2 \times 10^{-5}$  M dans le KOH 0,5 M, vitesse de balayage de 20 mV/s.

Pour former la monocouche de PAMAM sur la surface d'or une déposition chrono-ampérométrique a été faite. D'abord le potentiel est fixé pendant quelques minutes à -1.3 V (là où il n'y a pas de déposition) pour stabiliser la fréquence de la microbalance. Ensuite le potentiel est augmenté à -0.5 V pour effectuer la déposition. Le changement de masse est de  $126 \pm 25$  ng.cm<sup>-2</sup> (voir figure 8.3) ce qui concorde avec les résultats précédents. Le taux de recouvrement calculé à partir du changement de la fréquence pendant la déposition est de  $(3,4 \pm 0,7) \times 10^{-10}$  mol.cm<sup>-2</sup>.



**Figure 8.3.** Changement de la fréquence, converti en masse au cours de la déposition chronoampérométrique du PAMAM  $2 \times 10^{-5}$  M dans le KOH 0,5 M;  $E_1 = -1,3$  V vs ECS de 0 à 300 s;  $E_2 = -0,5$  V vs ECS de 300 à 600 s.

Une fois déposée, la monocouche de PAMAM est modifiée par le greffage du mannose. Cette surface est utilisée pour la détection de Con A et WGA. D'abord la fréquence de la surface modifiée avec le PAMAM-mannose est mesurée pendant environ 1 h pour s'assurer de sa stabilité. Ensuite, le compartiment contenant la surface modifiée est rempli avec une solution de PBS et la fréquence est de nouveau mesurée pendant 5 – 10 minutes. Finalement, la solution de lectine est ajoutée (concentration finale en lectine dans le compartiment de  $0,8 \text{ ml.ml}^{-1}$ ). Avec la déposition de la lectine sur la surface modifiée la fréquence de résonance du quartz diminue. Sur la figure 8.4 la masse de lectines accumulée sur le cristal de quartz calculée à partir du changement de la fréquence est présentée. La masse augmente brusquement avec l'ajout de la lectine. La masse de Con A détectée est de  $1135 \pm 336 \text{ ng.cm}^{-2}$  ou bien  $4,5 \times 10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$  de monomère de Con A. Par contre la masse de *Triticum vulgare* (WGA) déposée est moins que la moitié ( $502 \pm 99 \text{ ng.cm}^{-2}$  ou  $2,8 \times 10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$  de monomère de WGA). Contrairement à la méthode SIE, par cette méthode on peut détecter les deux lectines et on constate la plus faible affinité de la surface modifiée pour le WGA (voir figure 8.4).



**Figure 8.4.** Changement de la fréquence converti en masse au cours de la détection de (a) Con A et (b) WGA ( $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$ ) dans le PBS.

Le capteur est réutilisable. Un lavage avec une solution concentrée de D-mannose permet la libération de la surface du lectine. De cette façon plusieurs mesures reproductibles ont pu être effectuées successivement.

### 8.3 Conclusion

Dans cette étude, la synthèse d'un biocapteur par déposition chrono-ampérométrique de PAMAM et la modification des amines terminales avec du mannose ont été effectuées. Le taux de recouvrement de PAMAM sur la surface a été calculé par trois méthodes soit à partir de la charge du pic de réduction sur la voltampérogramme cyclique et à partir du changement de la fréquence au cours de la déposition chrono-ampérométrique ainsi qu'au cours de la désorption. Les trois valeurs sont très proches une de l'autre et confirment le bon fonctionnement de la formation de la couche. La détection de la lectine Con A a été possible. Le WGA s'adsorbe aussi sur la surface mais avec une affinité plus faible.

La méthode présentée ici est plus avantageuse que celle de Takada (1999; 2001), Storrier, Takada et Abruna (1999) et Manriquez et al (2003) où la formation de monocouche nécessite une fonctionnalisation de la surface de PAMAM ou de l'électrode. Le taux de recouvrement obtenu de  $3,4 \pm 0,8 \times 10^{-10}$  mol.cm<sup>-2</sup> est plus élevé que Manriquez et ces coéquipières (2003) qui utilisent des PAMAM de générations plus grandes.

Le QCM est plus sensible et sélective que la spectroscopie d'impédance électrochimique, mais moins sensible que la fluorescence. La synthèse est plus simple par rapport à la synthèse des nanoparticules, en plus le capteur est réutilisable.

#### 8.4 Références

Brosseau, C., M. Maurice, S. Bearne, S. Roscoe. 2004. «Electrochemical quartz crystal nanobalance (EQCN) studies of the adsorption behavior of an enzyme, mandelate racemes, and its substrate, mandelic acid, on Pt». *Electrochimica Acta*, vol 50, p. 1289-1297.

Kandori, K., Y. Uoya, T. Ishikawa. 2002. «Effects of acetonitrile on adsorption behavior of bovine serum albumin onto synthetic calcium hydroxyapatite particles». *J. Colloid Interf. Sci.*, vol. 252, p. 269

Khan, M., R. Williams et D. Williams. 1996. «In vitro corrosion and wear of titanium alloys in the biological environment». *Biomaterials*, vol. 17, p. 2117.

Manriquez, J., E. Juaristi, O. Munoz-Muniz et L. Godinez. 2003 «QCM study of the aggregation of starburst PAMAM dendrimers on the surface of bare and thiol-modified gold electrodes». *Langmuir*, vol. 19, p. 7315-7323.

Olivia, H., B. Sarada, K. Honda et A. Fujishima. 2004. «Continuous glucose monitoring using enzyme-immobilized platinized diamond microfiber electrodes». *Electrochimica Acta*, vol. 49, p. 2069-2076

Puerta A, Jaulmes A, De Frutos M, Diez-Masa J. et Vidal-Madjar C. 2002. «Adsorption kinetics of beta-lactoglobulin on a polyclonal immunochromatographic support». *J Chromatogr A*, vol. 953, p. 17-30.

Qu, D. et M. Morin. 2004. «The effect of concentration on the oxidative deposition of a monolayer of alkylthiolate on gold: from island formation to random adsorption». *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 565, p. 235–242.

Qu, D. et M. Morin. 2001. «An EQCM study of the oxidative deposition of alkylthiolates on gold». *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 517, 45–53.

Ram, M., P Bertoncello, H Ding, S Paddeu et C. Nicolini. 2001. «Cholesterol biosensors prepared by layer-by-layer technique». *Biosens Bioelectron*, vol. 16, p. 849-856.

Saby, C. et J. Luong. 1998. «Mytilus edulis adhesive protein (MAP) as an enzyme immobilization matrix in the fabrication of enzyme-based electrodes». *Electroanalysis*, vol. 10, p. 1193-1199.

Sauerbrey, G. 1959. «Use of vibrating quartz for thin films weighing and microweighing (in German)». *Z. Phys.*, vol. 155, p. 206-222.

Storrier, G., K. Takada et H. Abruña. 1999. «Synthesis characterization, electrochemistry and EQCM studies of polyamidoamine dendrimers surface-functionalized with polypyridyl metal complexes». *Langmuir*, vol. 15, p. 872-884.

Takada, K., G. Storrier, J. Goldsmith et H. Abruna. 2001. «Electrochemical and adsorption properties of PAMAM dendrimers surface-functionalized with polypyridyl cobalt complexes». *J. Phys. Chem. B*, vol. 105, p. 2404-2411

Takada, K., G. Storrier, M. Morán et H. Abruna. 1999. «Thermodynamics and kinetics of adsorption of PAMAM dendrimers surface functionalized with ruthenium (II) complexes». *Langmuir*, vol. 15, p. 7333-7339.

## CHAPITRE XI

### CONCLUSION

Deux types de biocapteur plurifonctionnel et spécifique pour *E. coli* et Con A ont été élaborés. Différentes méthodes de détection optiques, électrochimique ou de masse ont été employées et les résultats obtenus par ces méthodes ont été comparés.

Le premier type de biocapteur est constitué d'une nanoparticule d'or de taille inférieure à 2 nm, recouverte de dendrimères de PAMAM de génération 0, dont la partie organique déterminée par l'analyse thermogravimétrique est de  $20,5 \pm 0,7$  %. Les amines primaires ont été quantifiés de deux façon : par TNBS ( $1,7 \pm 0,6$  mmol par gramme Au-PAMAM) et par TGA ( $1,35 \pm 0,04$  mmol  $\text{NH}_2$  par gramme Au-PAMAM).

Une étude portant sur la taille des nanoparticules indique qu'elles forment des agrégats. Les dendrimères non adsorbés sur une nanoparticule s'agglomèrent aussi. Les agrégats de PAMAM présentent une taille 2 à 4 fois plus grande qu'Au-PAMAM. En plus, le changement du pH joue un rôle importante sur l'agglomération des PAMAM, mais pas sur l'agglomération des Au-PAMAM. Ceci suggère une stabilisation des dendrimères par l'adsorption de ses branches sur des nanoparticules.

Une fois adsorbé sur les nanoparticules d'or, les amines terminales des dendrimères ont été modifiées avec des sucres (*p*-isothiocyanate phényle  $\alpha$ -D mannopyranoside ou *p*-isothiocyanate phényle  $\beta$ -D-galactopyranoside) et des molécules fluorescentes (fluorescéine-5(6)-isothiocyanate et tétraméthylrhodamine-5(6)-isothiocyanate), dans le but d'obtenir deux types de nanoparticules : Au-PAMAM- $\alpha$ -D-mannose-FTIC et Au-PAMAM- $\beta$ -D-galactose-TRITC. La modélisation moléculaire a permis de constater que les branches ont une structure ouverte et une longueur d'environ 2 nm. Vu la petite taille des nanoparticules d'or et la grande distance avec le fluorophore, il est peu probable que la fluorescence du fluorophore soit atténuée par la nanoparticule. En fait, les biocapteurs obtenus sont très fluorescents. Les particules de mannose sont employées pour la détection de Con A et *E. coli*. Les particules de galactose jouent le rôle de blanc.

La détection de Con A et *E. coli* en fortes concentrations (1 mg/mL et plus) a été faite par immunoprécipitation. Con A et *E. coli* ont été précipité par l'addition de Au-PAMAM- $\alpha$ -D-mannose-FITC, mais pas par Au-PAMAM- $\beta$ -D-galactose-TRITC, ce qui démontre la spécificité de la reconnaissance.

La détection de Con A en plus faibles concentrations (0,5 mg/mL), là où la précipitation est lente, a été faite par centrifugation et mesure de la fluorescence des complexes insolubles. Cette méthode par mesure de la fluorescence n'a pas permis la détection de l'*E. coli*.

La reconnaissance de la bactérie *E. coli* par Au-PAMAM-mannose-FITC a été réalisée par microscopie confocale. Des agglomérats fluorescents de bactéries et particules sont distingués. La sélectivité du biocapteur est encore une fois démontrée en utilisant les particules de galactose, pour lesquelles l'agrégation n'est pas importante.

Le deuxième type de biocapteur est constitué d'une couche de PAMAM électrodéposée sur une surface d'or (111). Les PAMAM sont reliés à l'or par une liaison Au-S. La déposition est faite à partir d'une solution de PAMAM de  $2 \times 10^{-5}$  M dans KOH 0,1 M et à un potentiel à -0,5 V. Le temps optimal de déposition est évalué à 10 minutes. Le taux de recouvrement obtenu est de  $(3,1 \pm 0,4) \times 10^{-10}$  mol.cm<sup>-2</sup>.

La spectroscopie d'impédance électrochimique a permis la détection de Con A après une modification des amines terminales de PAMAM avec du mannose. La détection par cette méthode est simple, mais elle manque de sensibilité et sélectivité. Le *Triticum vulgare*, qui a une faible affinité versus le mannose, n'a pas pu être détecté.

Afin d'augmenter la sensibilité et sélectivité de détection, la microbalance à cristal de quartz a été utilisée. Le biocapteur est obtenu par une déposition chrono-ampérométrique de PAMAM, suivie par la modification des amines terminales avec du mannose. Le taux de recouvrement obtenu ici est le même ( $(3,4 \pm 0,8) \times 10^{-10}$  mol.cm<sup>-2</sup>) que sur l'électrode d'or (111) en tenant compte de la précision des mesures. Le cristal de quartz a été relié à une cellule de trois électrodes, ce qui a donné la possibilité d'enregistrer le voltampérogramme cyclique en même temps que le changement de la fréquence. De cette façon, la formation de la monocouche de PAMAM a été suivie et confirmée par plusieurs méthodes. La détection de Con A et *Triticum vulgare* a été possible. L'affinité du biocapteur versus Con A et *Triticum vulgare* a été aussi démontrée.

Les capteurs sur des surfaces d'or sont réutilisables. Un lavage avec une solution concentrée de D-mannose permet le déplacement de la lectine de la surface.

Les résultats obtenus avec les méthodes de détection basées sur des nanoparticules fluorescentes, ainsi que sur le QCM sont encourageants et peuvent être développés dans le futur. Par exemple, les nanoparticules de différents sucres et fluorophores peuvent être utilisées pour

résoudre un mélange de lectines, en les détectant aux différentes longueurs d'ondes. Le QCM peut être utilisé pour détection en flux continu. Une séquence de substrats de QCM modifiées avec des sucres différents peut être utilisée pour résoudre des mélanges de lectines. Cependant, il reste à résoudre le problème d'agglomération des nanoparticules. L'agglomération des nanoparticules limite leur efficacité car elle diminue leur surface active. De plus, il serait nécessaire de déterminer les limites de détection des méthodes basées sur les nanoparticules et le QCM afin d'apprécier leurs potentiel d'utilisation.