

Université de Montréal

Détection d'antigènes de noix avec des nanosondes de  
nanocornes de carbone.

Par

Laurence St-Pierre

Département de Chimie, Université de Montréal

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de

Maîtrise ès sciences (M. Sc.)

En discipline

Juin 2022

© Laurence St-Pierre

## Composition du comité

Ce mémoire a été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

**William Skene**

Président-rapporteur

**Suzanne Giasson**

Co-directrice de recherche

**Richard Martel**

Co-directeur de recherche

**Antonella Badia**

Membre du jury

## Résumé

La détection d'antigènes à large échelle s'avère être un enjeu majeur dans le secteur de la production alimentaire. Le défi persistant encore à ce jour est la détection spécifique et quantitative des protéines allergènes dans les produits commercialisés, comestibles, cosmétiques ou autres.

La technique la plus répandue en industrie pour la détection de matériel biologique spécifique est le test enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA). ELISA permet un dosage de diverses protéines au sein d'un échantillon, mais ne détecte qu'un seul antigène à la fois, ce qui est coûteux et peu efficace. La hausse des réactions allergiques notées chez la population de divers pays demande à ce qu'une technique plus efficace et moins coûteuse soit développée.

Dans le cadre de ce mémoire, une méthode alternative au test ELISA pour la détection d'allergènes de noix sera présentée. Cette nouvelle méthode appelée RIISA (Raman imaging immunosorbent assay), fait intervenir les propriétés de diffusion Raman de nanostructures de carbone, tel que les nanotubes et les nanocornes de carbone, pour les adapter comme sonde optique. L'objectif de ce travail est d'adapter cette méthode pour la détection triplex, permettant la reconnaissance RIISA entre trois couples d'antigène-anticorps, soit d'amande, de cachou et de noisette. Les sondes sont fonctionnalisées d'anticorps permettant la reconnaissance avec la protéine et comportent aussi un colorant encapsulé dans la cavité interne, ce qui permet la différenciation des couples. Le système de détection est couplé à l'imagerie Raman pour permettre une sensibilité plus aigüe du système. Un phénomène de réaction croisée entre

les anticorps et les antigènes empêche toutefois de réaliser une détection en triplex. La preuve de concept sera donc démontrée en utilisant les trois monoplexes, et ce, avec divers colorants mettant en évidence la polyvalence du système de détection présenté.

Mots clés : Nanotubes de carbone, Antigène, Nanocorne de carbone, Polymère, Raman, Triplex, Allergènes, Noix, Multiplexe, Colorant, Nanotechnologie

## Abstract

Large scale antigen detection is a major issue in the food production sector. The challenge that still persists nowadays is the specific and quantitative detection of allergenic protein products on the market, whether edible, cosmetic or otherwise.

The most widely used technique in the industry for the specific biological detection of allergens is the Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). This assay detects various proteins in a simple sample. The ELISA test can detect only one allergen at a time and its quantitative detection is limited. In addition, the increase in allergic reactions observed in the population of various countries require a more efficient and less expensive technique to be developed.

As part of this master's thesis, an alternative method to the ELISA assay to detect nut allergens will be presented. This assay, called Raman imaging immunosorbent assay (RIISA), uses carbon nanostructure based nanoprobe consisting of carbon nanotubes and nanohorns. The objective is to develop a triplex detection system using RIISA, that selectively recognizes between three antigen-antibody pairs, namely almond, cashew, and hazelnut. The dye encapsulated nanoprobe are functionalized with antibodies recognizing the protein and for simultaneously differentiating the couples. The presented detection system is coupled with Raman imaging and allows a more acute sensitivity of the system. However, cross reactions between the antibodies and the antigens prevent the triplex detection. The proof of concept will be demonstrated using the three monoplex couples with various dyes that highlight the versatility of the developed system.

Key words: Carbon nanotubes, Antigen, Carbon Nanohorn, Polymer, Raman, Triplex,  
Allergens, Nut, Multiplex, Dye, Nanotechnology / Nanotechnology

# Table des matières

Composition du comité .....	I
Résumé .....	II
Abstract .....	IV
Liste des tableaux .....	IX
Liste des figures .....	IX
Liste des abréviations et symboles.....	XII
Remerciements .....	XIV
<b>CHAPITRE I – Présentation</b> .....	<b>1</b>
1.1 Contexte .....	1
1.2 Problématiques et objectifs .....	1
1.3 Hypothèse.....	7
1.4 Plan du mémoire .....	8
<b>CHAPITRE II – Théorie</b> .....	<b>8</b>
2.1 Structure, fragments et fonctions de l'anticorps .....	8
2.2 Biomarqueurs d'anticorps .....	10
2.3 Capteurs .....	11
2.3.1 Détection immunologique.....	12
2.3.2 Nanomatériaux et nanocapteurs .....	13
2.4 Spectroscopie Raman .....	14
2.4.1 Origines et principes.....	14
2.5 Introductions aux nanostructures de carbone .....	16
2.5.1 Synthèse des CNHs .....	20
2.6 Modification des nanocornes de carbone.....	27
2.6.1 Fonctionnalisation covalente et applications.....	27
2.6.2 Encapsulation de colorants dans les nanostructures de carbone.....	29
<b>CHAPITRE III – Méthodologie et matériels</b> .....	<b>33</b>
3.1 Synthèse de nanocornes de carbone .....	33
3.2 Fonctionnalisation covalente des nanotubes de carbone.....	33
3.3 Fonctionnalisation non-covalente des nanocornes de carbone .....	34
3.4 Fonctionnalisation covalente des nanocornes de carbone.....	34
3.5 Préparation des échantillons d'antigène.....	35
3.6 Auto-assemblage du système monoplexe immunofluorescent sur Si/SiO <sub>2</sub> .....	35

3.6.1 Demi-sandwich monoplexe immunofluorescent sur Si/SiO <sub>2</sub> .....	36
3.6.2 Sandwich complet monoplexe immunofluorescent sur Si/SiO <sub>2</sub> .....	37
3.7 Auto-assemblage du système monoplexe de CNH sur Si/SiO <sub>2</sub> pour détection Raman. ....	38
3.7.1 Demi-sandwich monoplexe de CNH pour détection Raman.....	38
3.7.2 Sandwich complet monoplexe de CNH pour détection Raman.....	39
3.8 Marquage Immunogold.....	39
3.9 Test de réactivité croisée .....	40
3.9.1 Demi-sandwich .....	40
3.9.2 Sandwich complet .....	40
3.10 Spectroscopie de fluorescence.....	41
3.11 Spectroscopie Raman .....	41
3.12 Microscopie électronique.....	42
<b>CHAPITRE VI – Résultats et discussion .....</b>	<b>43</b>
4.1 Monoplexe immunofluorescent.....	43
4.1.1 Système de détection en demi-sandwich .....	43
4.1.2 Système de détection en sandwich complet.....	45
4.2 Marquage Immunogold.....	50
4.3 Monoplexe avec sondes de carbone.....	54
4.3.1 Système de détection en demi-sandwich – Nanocornes de carbone .....	54
4.3.2 Système de détection en sandwich complet.....	63
4.3.3 Étude quantitative des nanosondes d’AN-PEG-CNHS .....	69
4.4 Étude de la réactivité croisée par immunofluorescence.....	75
4.4.1 Étude de la réactivité croisée : Demi-sandwichs en immunofluorescence.....	76
4.4.2 Étude de la réactivité croisée : Sandwichs complets en immunofluorescence .....	79
4.5 Monoplexe avec colorants encapsulés dans les sondes de carbone .....	81
4.5.1 Encapsulation des colorants dans les CNHS .....	82
4.5.2 Essai en demi-sandwich.....	86
4.5.3 Essai en sandwich complet.....	91
4.5.4 Triplex des dye@PEG-CNHS.....	94
<b>CHAPITRE V – Conclusion .....</b>	<b>98</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>101</b>
Annexe 1 : Étude DLS.....	101
Annexe 2 : Réactivité croisée .....	102

Références..... 106

## Liste des tableaux

TABLEAU 1 : ENSEMBLE D'ALLERGÈNES COMMUNÉMENT RETROUVÉS DANS LES EXTRAITS DE NOISETTE, D'AMANDE ET DE CACHOU.....	76
---	----

## Liste des figures

FIGURE 1 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE A) NANOTUBE DE CARBONE À PAROI SIMPLE (SWCNT) ET B) IMAGES MET DE NANOCORNES DE CARBONE À PAROI UNIQUE (SWNH) TELS QUE CULTIVÉS, C) DES SWNH INDIVIDUELS ET D) DES SWNH À TROUS OUVERTS INDIQUÉS PAR LES FLÈCHES, ADAPTÉ DE LA RÉFÉRENCE [5].....	3
FIGURE 2 : A) SUBSTRAT Si/SiO <sub>2</sub> AVEC DIFFÉRENTS DISQUES D'ANTICORPS IMPRIMÉS PAR IMPRESSION MICROCONTACT (μCP). CHAQUE COULEUR REPRÉSENTE UN COUPLE D'ANTICORPS-ANTIGÈNE. LE ROUGE REPRÉSENTE L'ANTICORPS D'ANTI-NOISETTE, LE BLEU D'ANTI-CACHOU ET LE VERT D'ANTI-AMANDE. B) ZOOM AVANT DU SCHÉMA EN A QUI ILLUSTRE LE SYSTÈME DE DÉTECTION RIISA. LES PROTÉINES ANTIGÈNES (SPHÈRES) SE FIXENT SUR LES ANTICORPS CORRESPONDANTS ET LES NANOSONDES FONCTIONNALISÉES CIBLÉNT LES ANTIGÈNES VIA LA COMPLEXATION DE L'ANTICORPS. LES DIFFÉRENTS COUPLES SONT REPRÉSENTÉS PAR DES COULEURS POUR UNE MEILLEURE DISTINCTION, LE ROUGE REPRÉSENTE LE COUPLE DE NOISETTE, LE BLEU DE CACHOU ET LE VERT D'AMANDE.....	4
FIGURE 3 : STRUCTURE DES COLORANTS ENCAPSULÉS DANS LES CNHS ET ÉTUDIÉS EN SPIN COATING ET EN μCP. ....	6
FIGURE 4 : UNE REPRÉSENTATION EN RUBAN D'UN FRAGMENT FAB D'IMMUNOGLOBULINE G. DE SOURIS (PARTIE SUPÉRIEURE), FRAGMENT Fc (PARTIE INFÉRIEURE), CHAÎNE LOURDE (BLEU ET CYAN), CHAÎNE LÉGÈRE (VERT), PARATOPES (SITES DE LIAISON À L'ANTIGÈNE) ET RÉGIONS CHARNIÈRES (CENTRE).[8].....	9
FIGURE 5 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE DIVERS NANOMATÉRIAUX À BASE DE CARBONE.[30] .....	17
FIGURE 6 : MICROGRAPHES À TRANSMISSION ÉLECTRONIQUES DE NANOCORNES DE CARBONE. A) NANOCORNES DE CARBONE INDIVIDUEL DE SAITO, Y., ET AL. (1996) (B) AGRÉGATS DE CLUSTERS DE NANOCORNES DE CARBONE (DAHLIAS), ET (C) AGRANDISSEMENT DE QUELQUES DAHLIAS, PRODUITS PAR ABLATION LASER DU CARBONE PAR IJIMA, S., ET AL. (1999).[31,32] .....	18
FIGURE 7 : IMAGES STEM DE (A) NE-SWCNHs MENANT À UNE STRUCTURE DU TYPE SEED-LIKE.[38] IMAGES TEM DE PARTICULES DE NANOCORNES UNIQUES, B) STRUCTURES SEMBLABLES À DES BUD-LIKE ET C) STRUCTURE TYPIQUES DE TYPE DHALIA.[39] .....	22
FIGURE 8 : IMAGE SEM ET TEM DE NANOCORNES DE CARBONES OBTENUES PAR ABLATION LASER CO <sub>2</sub> EN UTILISANT DU NE, DE L'AR ET DE L'HE COMME GAZ TAMPONS. A) IMAGE SEM DE NE-DAHLIAS, B-C) IMAGES TEM DE NE-DAHLIAS, D) IMAGE TEM DE AR-DAHLIAS ET E) IMAGE TEM DE HE-BUDS.[40].....	23
FIGURE 9 : A) IMAGE TEM DE PARTICULES DE CARBONE GRAPHITIQUE MONTRANT DES AGRÉGATIONS DE STRUCTURES DE TYPE TUBULE DÉPASSANT DE LA SURFACE DES PARTICULES.[32] C) MICROGRAPHES ÉLECTRONIQUES DE LA SURFACE DES PARTICULES SWNH, QUI MONTRENT CLAIREMENT DES STRUCTURES EN FORME DE CÔNE.[35] D) IMAGE TEM D'UNE AUTRE SURFACE DE SWCNH MONTRANT DES SAILLIES EN FORME DE CORNES CONIQUES POUVANT ATTEINDRE 20 NM DE LONG SUR LA SURFACE DES PARTICULES CERTAINES DÉVIATIONS DE FORME.[32].....	24
FIGURE 10 : SPECTRES RAMAN DE DÉPÔTS CARBONÉS PRODUITS PAR ABLATION AU LASER CO <sub>2</sub> À TEMPÉRATURE AMBIANTE ET UNE PRESSION DE GAZ AR DE A) 10, B) 50, C) 200 ET D) 600 TORR. LES AGRÉGATS DE CNH DE LA FIGURE 9D ONT PRODUIT LE SPECTRE RAMAN ILLUSTRÉ EN D. [32].....	26
FIGURE 11 : SCHÉMA RÉACTIONNEL DE LA FONCTIONNALISATION COVALENTE DES CNHS AVEC UN NH <sub>2</sub> -PEG-COOH VIA UN COUPLAGE AVEC L'EDC ET LE S-NHS.....	29
FIGURE 12 : SCHÉMAS D'UNE SEULE UNITÉ D'AGRÉGAT DE PAIRES ET D'UN SPECTRE RAMAN TYPIQUE DE 6T @ SWCNT À UNE LONGUEUR D'ONDE D'EXCITATION DE 532 NM. L'INTENSITÉ EST NORMALISÉE AVEC LE SIGNAL DE LA BANDE G DES SWCNT.[68].....	32
FIGURE 13 : PROCÉDURE D'IMPRESSIION MICROCONTACT SCHÉMATISÉE POUR LE SYSTÈME SANDWICH UTILISANT DES SONDÉS GAM IGG 488 OU AB-PEG-CNHS OU AB-PEG-CNTS. ....	38

FIGURE 14 : A) SCHÉMATISATION DU SYSTÈME DE DÉTECTION EN DEMI-SANDWICH UTILISANT L'ANTICORPS GOAT ANTI-MOUSE IGG 488 EN TANT QUE SONDE FLUORESCENTE. B) IMAGE OPTIQUE FLUORESCENTE À UNE LONGUEUR D'ONDE DE 488 NM D'UNE IMPRESSION DE PROTÉINES DE NOISETTE SUR SUBSTRAT DE Si/SiO <sub>2</sub> APRÈS UNE INCUBATION AVEC L'ANTI-NOISETTE ET ENSUITE AVEC LE GAM IGG 488. L'ANTICORPS GAM FLUORESCENT RECONNAIT LA CHAÎNE LOURDE DE L'ANTI-NOISETTE, CE DERNIER AYANT FORMÉ UN COMPLEXE AVEC LA PROTÉINE DE NOISETTE AU PRÉALABLE. ....	44
FIGURE 15 : A) SCHÉMA DE L'ESSAI SANDWICH UTILISANT L'ANTICORPS GOAT ANTI-MOUSE IGG 488 EN TANT QUE SONDE. ENTRE CROCHET EST SCHÉMATISÉ LE COMPLEXE FORMÉ EN INCUBATION PRÉALABLE ENTRE L'ANTICORPS DE NOISETTE ET LE GAM IGG 488. B) IMAGE DE MICROSCOPIE FLUORESCENTE À 488 NM DE L'ESSAI SANDWICH SUR SUBSTRAT DE Si/SiO <sub>2</sub> REPRÉSENTÉ EN A. ....	46
FIGURE 16 : A) ILLUSTRATION DU MARQUAGE IMMUNOGOLD MONTRANT LA COMPLEXATION DES GAM IGG SE TROUVANT SUR LES GNPs AVEC LES FRAGMENTS Fc DES ANTI-NOISETTES SUR LES SONDAS CARBONÉES (CNTs OU CNHS). B-C) IMAGES TEM DU MARQUAGE IMMUNOGOLD EFFECTUÉES SUR LES AN-PEG-CNTs AND D-E) SUR LES AN-PEG-CNHS. SEULEMENT LES AGRÉGATS DE CNTs SONT VISIBLES AVEC CETTE TECHNIQUE, MONTRÉE EN B) ET EN C). LES POINTS NOIRS REPRÉSENTENT LES GNPs FONCTIONNALISÉS AVEC LES GOAT-ANTI-MOUSE CIBLANT LES ANTICORPS DE NOISETTE TROUVÉS SUR LA SURFACE DES CNTs (B-C) E DES CNHS (D-E). ....	51
FIGURE 17 : TROIS IMAGES TEM DIFFÉRENTES D'AGRÉGATS DE PEG-CNHS D'UN MARQUAGE IMMUNOGOLD D'UN CONTRÔLE NÉGATIF, INCUBÉS AVEC DES AN-PEG-GNPs. ....	52
FIGURE 18 : A) SCHÉMA DU SYSTÈME DE DÉTECTION DE NOISETTE EN DEMI-SANDWICH AVEC UN OURSIN DE CNH FONCTIONNALISÉ. B) ET D) IMAGES RAMAN À 1590 CM <sup>-1</sup> D'UN ESSAI EN DEMI-SANDWICH AVEC DES NANOCORNES DE CARBONE FONCTIONNALISÉ AVEC DES ANTICORPS ANTI-NOISETTE. LES DISQUES IMPRIMÉS ONT UN DIAMÈTRE DE 50 μM. LES IMAGES EN C) ET E) SONT DES IMAGES OPTIQUES OÙ LES SIGNAUX LA BANDE G (ROUGE) DES CNH ONT ÉTÉ SUPERPOSÉS AUX IMAGES B) ET D). ....	56
FIGURE 19 : A) SCHÉMA DU SYSTÈME DE DÉTECTION D'AMANDE EN DEMI-SANDWICH AVEC UN OURSIN DE CNH FONCTIONNALISÉ. B-E) IMAGES RAMAN À 1590 CM <sup>-1</sup> D'ESSAIS EN DEMI-SANDWICH AVEC DES AA-PEG-CNHS CIBLANT LES RÉGIONS DE 50 μM DE DIAMÈTRE D'ANTIGÈNE D'AMANDE IMPRIMÉES SUR LE SUBSTRAT SILICE. F) SPECTRE RAMAN DU SIGNAL TOTAL DANS LE MOTIF IMPRIMÉ DE 50 μM DE DIAMÈTRE (CERCLE NOIR EN B, ROUGE EN C, BLEU EN D ET VERT EN E) D'UNE ACQUISITION ENTRE 1560 CM <sup>-1</sup> ET 1630 CM <sup>-1</sup> . ....	59
FIGURE 20 : SYSTÈME DE DÉTECTION EN DEMI-SANDWICH AVEC DES PROTÉINES DE CACHOU IMPRIMÉES PAR μCP SUR UN SUBSTRAT Si/SiO <sub>2</sub> AVEC LES NANOSONDAS AC-PEG-CNHS. LE MOTIF CONSISTE EN DES DISQUES IMPRIMÉS DE 50 μM DE DIAMÈTRE SUR UN SUBSTRAT PASSIVÉ AU BSA. A) SCHÉMA DE L'ASSEMBLAGE DEMI-SANDWICH REPRÉSENTÉ EN B-E. B-D) IMAGERIE RIMA DES RÉGIONS CONTENANT UN DISQUE AVEC DES NANOSONDAS CIBLANT LES RÉGIONS PROTÉINES DE CACHOU IMPRIMÉES SUR LE SUBSTRAT SILICE. E) IMAGE OPTIQUE DE LA RÉGION IMAGÉE EN C. F) SPECTRE RAMAN DU SIGNAL TOTAL DANS LE MOTIF IMPRIMÉ DE 50 μM DE DIAMÈTRE (CERCLE EN B-D). ....	61
FIGURE 21 : SYSTÈME DE DÉTECTION EN SANDWICH AVEC DES ANTICORPS ANTI-NOISETTE IMPRIMÉS PAR μCP SUR UN SUBSTRAT Si/SiO <sub>2</sub> UTILISANT LES NANOSONDAS AN-PEG-CNTs. LE MOTIF EST CONSTITUÉ DE QUATRE DISQUES IMPRIMÉS DE 50 μM DE DIAMÈTRE SUR UN SUBSTRAT PASSIVÉ AU BSA. A) SCHÉMA DE L'ASSEMBLAGE SANDWICH. B) IMAGERIE RIMA D'UNE RÉGION CONTENANT QUATRE DISQUES AVEC DES NANOSONDAS CIBLANT LES RÉGIONS DE PROTÉINES S'ÉTANT LIÉES AUX ANTICORPS IMPRIMÉS SUR LE SUBSTRAT SILICE. C) SPECTRE RAMAN DU SIGNAL TOTAL DANS LE MOTIF IMPRIMÉ DE 50 μM DE DIAMÈTRE, NUMÉROTÉS EN B, ET SPECTRE RAMAN D'UNE RÉGION CHOISIE EN DEHORS DES MOTIFS IMPRIMÉS SANS POINTS BRILLANTS REPRÉSENTANT LE BRUIT DE FOND (CERCLE NUMÉRO 5 EN B). ....	64
FIGURE 22 : A) SCHÉMA DE L'ASSEMBLAGE SANDWICH. B) C) ET D) : IMAGES RAMAN D'UN ESSAI SANDWICH AVEC DES NANOCORNES DE CARBONE PÉGYLÉES ET FONCTIONNALISÉES AVEC DES ANTICORPS ANTI-NOISETTE. LES MOTIFS EN POINTILLÉS IMPRIMÉS ONT UN DIAMÈTRE DE 50 μM ET LE SUBSTRAT Si/SiO <sub>2</sub> EST PASSIVÉ AU BSA. E) EST L'IMAGE OPTIQUE DE B. F) SPECTRES RAMAN DES SIGNAUX DE CNH DANS LE MOTIF IMPRIMÉ DE 50 μM DE DIAMÈTRE (CERCLES NOIR, ROUGE ET BLEU EN B, C ET D, RESPECTIVEMENT). ....	67
FIGURE 23 : A) IMAGE RAMAN À LARGE BANDE AVEC UN FILTRE SUR LA BANDE G. CHAQUE IMAGE A ÉTÉ PRISE À UN INTERVALLE D'ATTENTE DE DEUX MINUTES (I : 0 MIN., II : 2 MIN., III : 4 MIN., IV : 6 MIN.). B) HISTOGRAMME D'INTENSITÉ LORS DE L'AUGMENTATION DU TEMPS D'IRRADIATION LASER. ....	70

FIGURE 24 : A) ACQUISITION RAMAN UTILISANT DIFFÉRENTS POINTS FOCaux POUR LE MÊME DISQUE, DE 1 À 4 DÉFOCALISÉ À FOCALISÉ. B) VARIATION DE LA DISTRIBUTION D'INTENSITÉ POUR DIFFÉRENTS FOCERS, DE 1 À 5 : DÉFOCALISÉ À FOCALISÉ .....	70
FIGURE 25 A) SÉRIE D'IMAGES RAMAN (100x) D'ESSAIS EN SANDWICH AVEC DES NANOCORNES DE CARBONE PÉGYLÉES FONCTIONNALISÉES AVEC DES ANTICORPS ANTI-NOISETTE POUR 3 CONCENTRATIONS DIFFÉRENTES D'INCUBATION DE PROTÉINES DE NOISETTE, DE GAUCHE À DROITE : 0,5, 1, 1,5 1,5 µG/ML. B) HISTOGRAMME DE L'INTENSITÉ DE LA BANDE G POUR CHAQUE IMAGE EN A. C) COURBE D'ÉTALONNAGE BASÉE SUR L'INTENSITÉ DE L'HISTOGRAMME DE LA BANDE G EN B. LE POINT EN ROUGE REPRÉSENTE L'INTENSITÉ DU SIGNAL RAMAN À 0,5 µG/ML ET EST CONSIDÉRÉ COMME ABERRANT ET EST RETIRÉ DU CALCUL DE LA COURBE D'ÉTALONNAGE. ( $I = (1,87 \pm 0,64)[C] - 1,64 \pm 0,87$ ) ( $R^2 = 0,8949$ )....	72
FIGURE 26 : IMAGES RAMAN DU TEST SANDWICH AVEC NANOSONDES D'AN-PEG-CNHS INCUBÉES AVEC 1,5 µG/ML DE PROTÉINE AVEC FILTRE POUR LA BANDE G DES CNHS À 1590 $cm^{-1}$ . AU TOTAL, 15 DISQUES SONT IMAGÉS DANS UNE RÉGION DE L'ÉCHANTILLON PRÉSENTANT LA MEILLEURE SÉLECTIVITÉ. ....	74
FIGURE 27 : GRAPHIQUES EN DE L'INTENSITÉ DE FLUORESCENCE LE LONG D'UNE TRANCHE HORIZONTALE DE 14 DISQUES IMPRIMÉS PAR µCP SUR Si/SiO <sub>2</sub> POUR UNE DÉTECTION MONOPLEXE DEMI-SANDWICH. INCUBATION EN A) AVEC DES ANTICORPS D'AMANDE, B) AVEC DES ANTICORPS DE NOISETTE ET C) AVEC DES ANTICORPS DE CACHOU, TOUS INCUBÉS AVEC DES ANTICORPS D'AMANDE. LA LIGNE DE BASE ÉTANT SOUSTRAITÉ DE CHACUNE DES COURBES .....	77
FIGURE 28 : GRAPHIQUES EN DE L'INTENSITÉ DE FLUORESCENCE LE LONG D'UNE TRANCHE HORIZONTALE DE 14 DISQUES IMPRIMÉS PAR µCP SUR Si/SiO <sub>2</sub> POUR UNE DÉTECTION MONOPLEXE SANDWICH. INCUBATION EN A) AVEC DES ANTICORPS D'AMANDE, B) AVEC DES ANTICORPS DE NOISETTE ET C) AVEC DES ANTICORPS DE CACHOU, TOUS INCUBÉS AVEC DES ANTICORPS D'AMANDE. LA LIGNE DE BASE ÉTANT SOUSTRAITÉ DE CHACUNE DES COURBES .....	80
FIGURE 29 : A-B) IMAGES OPTIQUES DIVISÉES D'ENDUCTION CENTRIFUGE D'INDIGO@CNH-PEG, C) DE SUDANIV@CNH-PEG ET D) DE 6T@CNH-PEG SUR SUBSTRAT DE Si/SiO <sub>2</sub> . E) SPECTRE RAMAN D'UNE PARTICULE DE NANOCORNE PRÉSENTANT UN SIGNAL RAMAN D'INDIGO, F) DE SUDAN ET G) DE 6T.....	84
FIGURE 30 : A) IMAGES RAMAN À 1590 $cm^{-1}$ ( $\lambda_{ex} = 532$ NM) D'UN ESSAI EN DEMI-SANDWICH AVEC DES DYE@AC-PEG-CNHS ENCAPSULANT L'INDIGO, EN B) LE SUDAN IV ET EN C) LE 6T. LES DISQUES IMPRIMÉS ONT UN DIAMÈTRE DE 50 µM ET SONT ENCELRÉS POUR UNE MEILLEURE DISTINCTION. LE SUBSTRAT Si/SiO <sub>2</sub> EST PASSIVÉ AU BSA. D-F) IMAGES OPTIQUES DE PLUSIEURS IMPRESSIONS. G-I) SPECTRE RAMAN DU SIGNAL D'UN AGRÉGAT DE CNHS SE SITUANT DANS LE MOTIF IMPRIMÉ DE 50 µM DE DIAMÈTRE CORRESPONDANT (CERCLE EN A, B ET C). ....	87
FIGURE 31 : A) IMAGE OPTIQUE DE LA RÉGION IMAGÉE EN B. B) IMAGE RAMAN À 1590 $cm^{-1}$ ( $\lambda_{ex} = 532$ NM) D'UN ESSAI EN DEMI-SANDWICH AVEC DES SUDANIV@AA-PEG-CNHS. LES DISQUES IMPRIMÉS ONT UN DIAMÈTRE D'ENVIRON 50 µM. LE SUBSTRAT Si/SiO <sub>2</sub> EST PASSIVÉ AU BSA. ....	90
FIGURE 32 : IMAGE RAMAN AVEC FILTRE DE LA BANDE G APPLIQUÉ APRÈS A) 3s D'EXPOSITION, B) 5 MINUTES D'EXPOSITION AVEC DES SUDANIV@AC-PEG-CNHS. LES DISQUES IMPRIMÉS ONT UN DIAMÈTRE D'ENVIRON 50 µM. LE SUBSTRAT Si/SiO <sub>2</sub> EST PASSIVÉ AU BSA. ....	92
FIGURE 33 : A) IMAGE OPTIQUE À 50X DE LA RÉGION IMAGÉE EN B. B) IMAGE RAMAN À 1590 $cm^{-1}$ ( $\lambda_{ex} = 532$ NM) D'UN ESSAI EN SANDWICH COMPLET AVEC DES SUDANIV@AC-PEG-CNHS. LES DISQUES IMPRIMÉS ONT UN DIAMÈTRE DE 50. LE SUBSTRAT Si/SiO <sub>2</sub> EST PASSIVÉ AU BSA. ....	93
FIGURE 34 : A) IMAGE OPTIQUE DU SUBSTRAT. B) IMAGES RAMAN À 1590 $cm^{-1}$ ( $\lambda_{ex} = 532$ NM) D'UNE ENDUCTION PAR CENTRIFUGATION TRIPLEX DES 6T@AC-PEG-CNHS, 4T4@AC-PEG-CNHS ET DPP1@AC-PEG-CNHS. LES DIFFÉRENTS AGRÉGATS SONT ENCELRÉS PAR CODE DE COULEUR, RELIÉ AU COLORANT EN C) SPECTRE RAMAN D'UN AGRÉGAT DE NANOCORNES PRÉSENTANT UN SIGNAL DE 6T (NOIR), DE 4T4 (ROUGE) ET DE DPP2 (BLEU). ....	95

## Liste des abréviations et symboles

AA	Anti-amande
Ab	Anticorps ( <i>angl. antibody</i> )
Ab-PEG-CNH	Nanocorne de carbone fonctionnalisée avec des anticorps pégylés
Ab-PEG-CNTs	Nanotube de carbone fonctionnalisée avec des anticorps pégylés
AC	Anti-cachou
AN	Anti-noisette
CNH	Nanocorne de carbone ( <i>angl. carbon nanohorn</i> )
CNT	Nanotube de carbone ( <i>angl. carbon nanotube</i> )
DPP2	Dérivés de dicétopyrrolopyrrole
DSPE-PEG	Polyéthylène glycol - 1,2-distearoyl-sn-glycéro-3-phosphoryléthanolamine
Dye@Ab-PEG-CNH	Nanocorne de carbone fonctionnalisée avec des anticorps pégylés avec colorant
EDC	1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
ELISA	Immunoabsorption par enzyme liée ( <i>anglais enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
MES	Acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique
μCP	Impression par microcontact ( <i>angl. microcontact printing</i> )
PBS	Tampon de phosphate salin ( <i>angl. phosphate buffered saline</i> )
PEG	Polyéthylène glycol
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
RIISA	Technique de dosage d'immunoabsorption par imagerie Raman ( <i>anglais Raman imaging immunosorbent assay</i> )
SC	Enduction centrifuge ( <i>angl. spin coating</i> )
Sulfo-NHS (S-NHS)	1-Hydroxy-2,5-dioxopyrrolidine-3-sulfonate de sodium

TEM

Microscopie électronique en transmission (*angl.*  
*transmission electron microscopy*)

6T

Sexithiophène

## Remerciements

Plusieurs personnes se sont impliquées dans ce projet me permettant de réaliser ce mémoire et méritent une reconnaissance.

Je tiens d'abord à remercier les professeurs Suzanne Giasson et Richard Martel, qui ont été mes codirecteurs durant ma maîtrise. Grâce à votre support et vos conseils, j'ai réussi à travailler sur un projet de recherche bien audacieux et relever les nombreux défis qui sont survenus. J'ai acquis beaucoup de compétences en matière de recherche et de développement en faisant partie de vos équipes.

Je voudrais aussi remercier tous les membres des groupes de recherche de S. Giasson et de R. Martel, spécialement Charli Ou, Phan Huu Trong, Alberto Guerron, Charlotte Allard, Suraj Mal, Robert Gigras, Nathalie Tang, Valérie Lefevbre, Natasha Shoghi, Monique Tie, Léonard Schue, Carolane David et Amira Bencherif. Vous m'avez guidé à travers l'usage de nombreux instruments en laboratoire, offert vos généreux conseils et vous avez toujours été très sympathiques à mon égard. J'appréciais notamment nos diners d'anniversaires, où Valérie apportait un gâteau toujours plus impressionnant que le précédent, et les pique-nique dans les parcs l'été.

J'aimerais remercier particulièrement Nathalie Tang, Charlotte Allard, Suraj Mal, Robert Gigras et Valérie Lefevbre. Nathalie m'as transmis son savoir en matière de fonctionnalisation de surface et de reconnaissance immunologique. Charlotte et Suraj m'ont tellement appris sur les nanomatériaux à base de carbone et leurs fonctionnalisations. Germain m'as permis de développer une méthode d'analyse Raman

adaptée pour mon étude. J'aimerais aussi remercier Valérie pour son implication en gestion dans le groupe en organisant les rencontres et en gérant les commandes.

J'aimerais diriger des remerciements spéciaux vers l'Université de Sherbrooke et l'Université de Laval pour leur partenariat avec l'Université de Montréal, apportant une contribution essentielle au projet. Je remercie notamment Nadi Braidy et Jérémie Theolier pour m'avoir fourni du matériel indispensable pour réaliser ce mémoire.

# CHAPITRE I – Présentation

## 1.1 Contexte

Les allergies de tous types ont considérablement augmenté à travers le monde au cours des 50 dernières années.<sup>1</sup> Une réaction allergique se produit lorsqu'une agent, comme un allergène ou un antigène, est introduite dans un organisme vivant. Rapidement, des symptômes d'irritation se déclenchent, qu'ils soient cutanés, oculaires, ou respiratoires. Les réactions allergiques peuvent être graves dans certains cas et mener à la mort. La réponse du système immunitaire est responsable de la réaction allergique lorsque l'allergène est détecté dans l'organisme.<sup>2</sup> Les symptômes d'une allergie sont alors visibles durant le processus de neutralisation et d'évacuation de l'allergène hors de l'organisme. La toxine peut se trouver sous plusieurs formes, soit sous forme de particules, de molécules ou de protéines.

## 1.2 Problématiques et objectifs

La problématique des allergies alimentaires est une réalité englobant la société actuelle et apporte des préoccupations majeures dans l'industrie de l'agroalimentaire. Pour garantir la confiance des consommateurs, les gouvernements ont mis en place des lois et des tests de contrôle pour répondre aux nouvelles exigences et réglementations en matière de sécurité. Le test ELISA permet la détection ou le dosage de molécules biologiques présentes dans un échantillon, tel que des anticorps, des antigènes, des protéines ou des glycoprotéines. La détection se produit sur un support solide où l'anticorps de capture y est fixé. L'échantillon à analyser est ajouté et l'antigène spécifique se lie à l'anticorps de capture. Ensuite, un anticorps de détection est ajouté. Cet anticorps

est couplé à une enzyme et se lie à l'antigène sur le support. La dernière étape consiste à ajouter un substrat chromophore que l'enzyme convertit en produit coloré. Le test ELISA est le plus utilisé pour l'analyse des allergènes dans les produits alimentaires. C'est une méthode efficace lorsqu'appliquée à la sécurité et celle-ci possède une limite de détection autour de 0,07 µg/mL et une limite de quantification d'environ 3 mg/mL.<sup>3</sup> Cette méthode standard reste assez coûteuse pour les industries de contrôle de qualité agroalimentaire à long terme. De plus, ELISA ne peut détecter qu'un allergène à la fois, et il faut donc plusieurs tests pour vérifier différents allergènes, ce qui ajoute aux coûts et rend donc la détection ELISA prohibitive à grande échelle.

Ce travail vise à développer une nouvelle alternative de détection des allergènes, et de concevoir un système de détection multiplexé, appelée RIISA. L'alternative présentée ici exploite les avantages des nanotechnologies et de la biologie, de la physique et de la chimie. Le système de détection exploite les avantages des nanosondes de carbone pour une détection en spectroscopie Raman, tel que leur forte signature Raman et leur stabilité physicochimiques.<sup>4</sup> Ces nanosondes sont produites à partir de nanotubes de carbone à simple paroi (SWCNT) et de nanocornes de carbone (CNH) illustrés à la Figure 1.

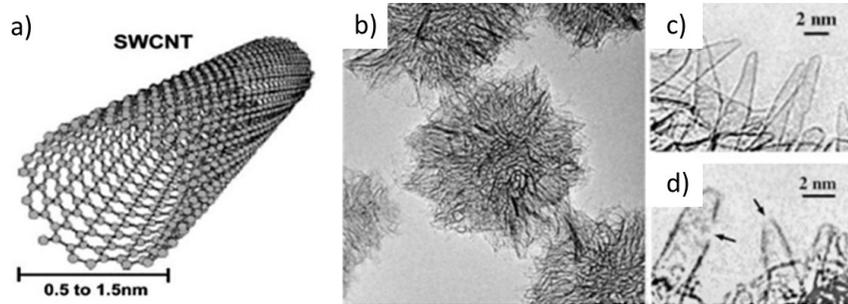


Figure 1 : Représentation schématique de a) nanotube de carbone à paroi simple (SWCNT) et b) Images MET de nanocornes de carbone à paroi unique (SWNH) tels que cultivés, c) des SWNH individuels et d) des SWNH à trous ouverts indiqués par les flèches, adapté de la référence [5]

Le système détection RIISA repose sur le principe de reconnaissance entre un anticorps et un antigène de manière analogue au test ELISA. Un anticorps imprimé sur le substrat agit comme site de liaison pour les antigènes à détecter. Un second anticorps couplé à un agent actif en spectroscopie Raman est utilisé pour se lier aux antigènes préalablement liés sur le substrat via le premier anticorps imprimé. Ce système est représenté à la figure 2. La Figure 2a montre le schéma d'une détection en multiplexage en impression par microcontact ( $\mu$ CP) sur substrat d'oxyde de silice. Les régions circulaires, définies comme disques d'impressions, mesurent environ 50  $\mu$ m de diamètre. Les trois couleurs, rouge, bleue et verte, représente un type de matériel biologique imprimé, tel que les anticorps d'amande, de noisette et de cachou, respectivement. La figure 2b montre le schéma de l'autoassemblage des trois couples d'anticorps-antigènes sur un même substrat. L'anticorps est fixé sur le substrat d'oxyde de silice par  $\mu$ CP. L'antigène, représenté par une sphère, se lie ensuite au site actif de l'anticorps imprimé. Et enfin, attaché à la nanosonde de carbone avec du polyéthylène glycol (PEG), un second anticorps se lie à cet antigène. Le code de couleur des anticorps et des antigènes se

rapporte à leur affinité biologique correspondant à celui énoncé pour le schéma à la Figure 2a.

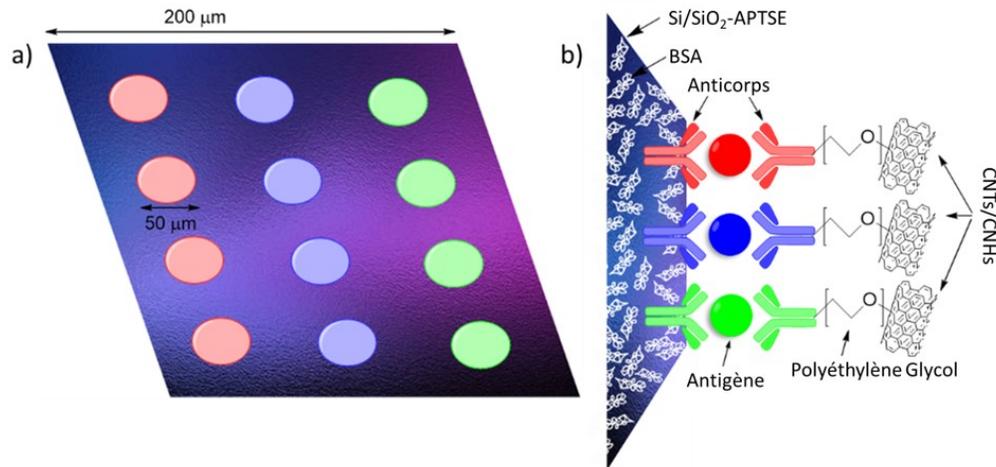


Figure 2 : a) Substrat Si/SiO<sub>2</sub> avec différents disques d'anticorps imprimés par impression microcontact ( $\mu$ CP). Chaque couleur représente un couple d'anticorps-antigène. Le rouge représente l'anticorps d'anti-noisette, le bleu d'anti-cachou et le vert d'anti-amande. B) Zoom avant du schéma en a qui illustre le système de détection RIISA. Les protéines antigènes (sphères) se fixent sur les anticorps correspondants et les nanosondes fonctionnalisées ciblent les antigènes via la complexation de l'anticorps. Les différents couples sont représentés par des couleurs pour une meilleure distinction, le rouge représente le couple de noisette, le bleu de cachou et le vert d'amande.

Les sondes sont fonctionnalisées avec du polyéthylène glycol (PEG) et un anticorps (Ab) est fixé sur le groupement terminal du polymère. Les anticorps agissent en tant qu'agent de ciblage envers les allergènes. Ils possèdent donc un rôle crucial puisque l'affinité de liaison entre l'anticorps et l'antigène est la force motrice de l'autoassemblage du système de détection. Il est possible d'attacher différents anticorps spécifiques à ces nanosondes comme l'illustre la Figure 2b. Le schéma à la Figure 2b représente le noyau du projet ici présenté, soit de développer un système de détection multiplexe d'allergènes de noix utilisant des nanosondes de carbone fonctionnalisées avec des anticorps pegylés. Le système vise une conformation nommée sandwich, illustrée sur la Figure 2b, dans laquelle les antigènes se lient à des anticorps préalablement imprimés et

ces antigènes sont détectés par la nanosonde respective. Le terme sandwich fait référence à l'allure de l'autoassemblage, où l'antigène est intercalé entre deux anticorps. Un système simplifié est nommé demi-sandwich, dans lequel l'antigène est imprimé sur le substrat et un seul anticorps intervient dans la fonction de détection. Dans ce scénario, la nanosonde fonctionnalisée est désignée par Ab-PEG-CNTs ou Ab-PEG-CNHs, pour indiquer que les Ab sont pégylés (PEG) sur nanotubes de carbone ou nanocornes de carbone.

La détection multiplexée se fait à l'aide de colorants encapsulés dans des nanostructures de carbone permettant d'obtenir une signature Raman distincte pour chaque sonde. Pour ce projet, plusieurs colorants, à savoir le colorant à base de dicétopyrrolopyrrole (DPP2,  $1538\text{ cm}^{-1}$ ), l' $\alpha$ -sexithiophène (6T,  $1461\text{ cm}^{-1}$ ), le Chat-Th-Chat ( $1377$  et  $1429\text{ cm}^{-1}$ ), le Sudan IV ( $1350$  et  $1460\text{ cm}^{-1}$ ) et l'indigo ( $1250$  et  $1308\text{ cm}^{-1}$ ), seront utilisés pour générer un système de détection Raman en triplex.<sup>6,7</sup> Leur structures sont présentées à la Figure 3. Chacun des colorants possède une signature unique et donnent lieu à des bandes étroites dans le spectre Raman. Les colorants ont été choisis pour que leurs bandes caractéristiques ne se chevauchent pas et qu'une fois encapsulés dans les nanostructures, chaque sonde comporte un signal distinctif lors de l'imagerie en spectroscopie Raman.

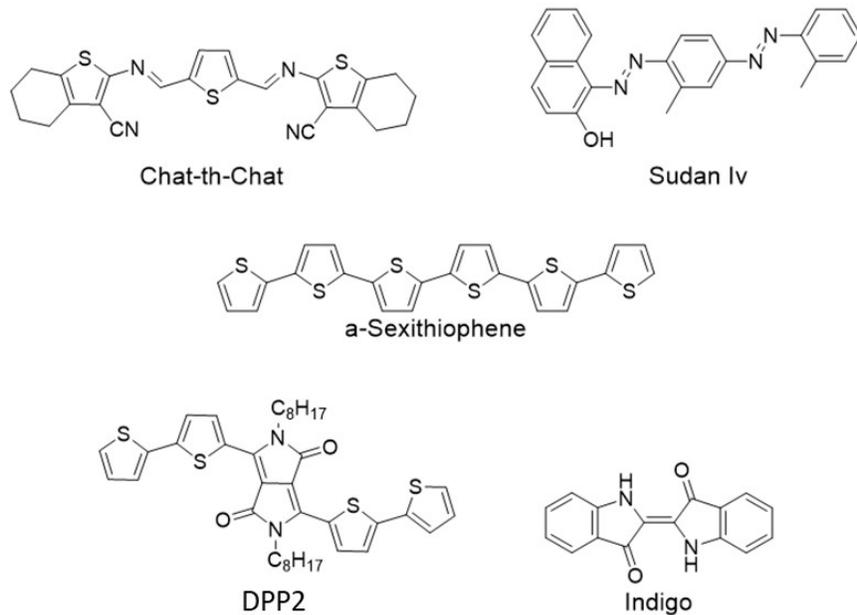


Figure 3 : Structure des colorants encapsulés dans les CNHs et étudiés en spin coating et en  $\mu$ CP.

L'imagerie par spectroscopie Raman est, dans le cas de cette étude, un choix de prédilection. Ce projet est dirigé vers l'étude d'un système de détection dont les sondes sont constituées de nanostructures de carbone présentant une activité Raman intense. Les nanostructures de carbone seules sont presque entièrement composées de liaisons C=C, soit un groupement très actif en Raman. Aussi, l'avantage d'utiliser un imageur Raman permet de cartographier un substrat en trois dimensions, où les composantes x et y sont associés à l'image 2D et la troisième dimension z est associée au spectre Raman de la région. De plus, le laser Raman n'endommage pas les CNTs ni les CNHs, l'usage de nanosondes de carbone permet donc aux substrat d'être stable dans le temps et il est ainsi possible de performer plusieurs analyses sur un même échantillon. Le seul inconvénient à cette méthode est l'accessibilité à un imageur Raman, un instrument dispendieux et complexe.

La plateforme de détection proposée les avantages suivants. Le substrat d'oxyde de silice possède une chimie de surface permettant le greffage de divers composés et macromolécules. Le traitement de sa surface par le (3-aminopropyl)triéthoxysilane (APTES) génère une surface chargée positivement améliorant la physisorption de l'autoassemblage des monocouches. La méthode d'impression par microcontact permet de former des zones distinctes où un seul type de matériel biologique est imprimé. La taille des disques imprimés de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre permet d'imager plusieurs sondes en microscopie Raman.

L'objectif de ce mémoire est donc de développer un système de détection d'allergènes de noix avec des nanosondes de CNTs et de CNHs fonctionnalisées avec des anticorps. Différents colorants sont encapsulés dans la cavité interne des nanosondes dans le but de développer un système de détection en multiplexe. Il est attendu de ce système RIISA de permettre une détection d'antigènes à des concentrations inférieures à celle de la méthode ELISA, menant à un système d'une sensibilité supérieure.

### 1.3 Hypothèse

L'hypothèse la plus optimiste consiste à envisager que les sondes de carbone vont permettre une affinité spécifique aux régions de protéines imprimées qui leur correspondent, soit pour le système en demi-sandwich, et aux régions d'anticorps pour le système en sandwich complet. De cette manière, le système de détection en triplex permettra d'imager des régions où des signaux Raman des colorant seront distingués les uns des autres. Aussi, il sera nécessaire d'effectuer des tests pour évaluer la réactivité

croisée entre les différents couples d'antigènes-anticorps puisqu'il s'agit de trois antigènes provenant de noix.

#### 1.4 Plan du mémoire

Ce mémoire est constitué de cinq chapitres. Voici un aperçu des contenus de chacun.

Dans un premier temps, le Chapitre 2 englobe la section expérimentale du travail effectué en laboratoire. Cette section est présentée en une série de protocoles regroupant toutes les techniques et synthèses importantes.

Ensuite, le Chapitre 3 est dédié à toute la théorie qui touche le projet. Pour une bonne compréhension de l'ensemble de l'étude effectuée, cette partie présente une vulgarisation des principes de base concernant la reconnaissance immunologique ainsi qu'une introduction aux nanostructures de carbone et des méthodes de caractérisation. Les résultats et conclusions des études sont présentés aux Chapitres 4 et 5 respectivement.

## CHAPITRE II – Théorie

### 2.1 Structure, fragments et fonctions de l'anticorps

L'anticorps, également appelé immunoglobuline, est une glycoprotéine impliquée dans le système immunitaire. Le mode d'action d'un anticorps est étroitement lié à sa structure générale et celle-ci se décompose en six régions identifiées dans la Figure 4.

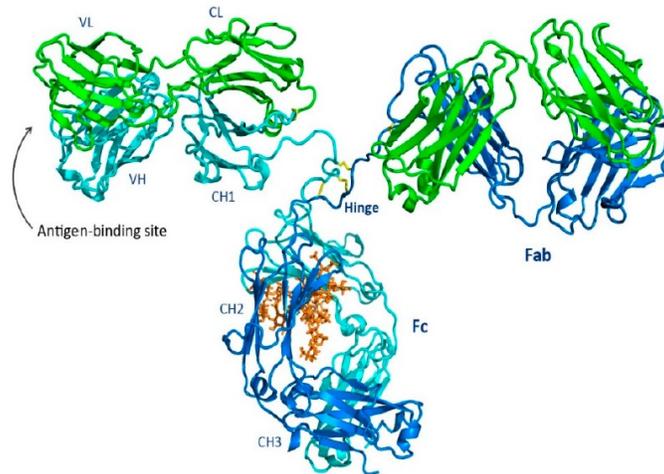


Figure 4 : Une représentation en ruban d'un fragment Fab d'immunoglobuline G de souris (partie supérieure), fragment Fc (partie inférieure), chaîne lourde (bleu et cyan), chaîne légère (vert), paratopes (sites de liaison à l'antigène) et régions charnières (centre).[8]

Premièrement, il est important de distinguer les deux groupes d'anticorps principaux pour comprendre le processus de reconnaissance immunitaire. Le premier groupe d'anticorps est l'anticorps primaire. Celui-ci permet la détection de biomarqueurs de maladies grâce à son fragment Fab, la partie supérieure de l'anticorps, voir la Figure 4.<sup>9</sup> Le deuxième groupe correspond aux anticorps secondaires. Leur principale utilité est d'assurer la détection et l'amplification du signal en se liant au fragment Fc de l'anticorps primaire. La spécificité d'un anticorps correspond à son caractère de liaison à un domaine précis en fonction de l'arrangement des groupements chimiques que l'on trouve sur les paratopes (fragment Fab). Il s'agit de la partie variable de l'immunoglobuline. Plus précisément, les sites de liaison à l'antigène sont localisés dans les paratopes, aux extrémités des deux bras. En général, les anticorps ont une forme en « Y » et c'est pour cette raison que la valence commune d'un anticorps est de deux, mais celle-ci peut également aller jusqu'à dix. La structure des paratopes est donc assez complexe, elle est constituée de six régions déterminant la complémentarité (complementarity-determining

regions (CDRs)), dont trois sont sur le domaine variable de la chaîne lourde (bleu) et trois autres sur le domaine variable de la chaîne légère (vert) pour un total de douze CDR sur les deux récepteurs antigéniques. Les épitopes antigéniques, soit les parties variables des antigènes, sont les parties qui sont reconnues par l'anticorps, permettant au système immunitaire de déterminer si un matériel biologique doit être considéré comme invasif ou non. Cette reconnaissance entre l'épitope et le paratope est ce qui déclenche la réponse immunitaire spécifique.<sup>10</sup>

## 2.2 Biomarqueurs d'anticorps

L'intention de développer un système de détection basé sur la reconnaissance de l'anticorps avec son antigène est effectivement motivée par les résultats de l'efficacité des recherches sur les biomarqueurs d'anticorps. Le dispositif développé n'est pas conçu pour être utilisé in vivo et aura plutôt la fonction d'un capteur, sensible à divers allergènes donnés.

De manière générale, un biomarqueur est décrit comme étant une caractéristique biologique mesurable. Cette caractéristique permet de déterminer l'état physiologique, ou une réponse suite à un traitement, qu'il soit normal ou pathologique.<sup>11</sup> Il existe de nombreux biomarqueurs de protéines qui ont été découverts depuis les dernières années grâce à l'avancement des technologies disponibles et à la compréhension du génome humain. Ils permettent le dépistage précoce de divers types de cancers, tel que celui de la prostate, du sang, de ceux reliés au système digestifs et biens d'autres.<sup>12</sup> Les biomarqueurs permettent d'autant plus d'évaluer les risques de maladies chez les populations à plus hauts risques, mais ils peuvent aussi trouver leurs applications pour

guider les thérapies ciblées utilisées dans le diagnostic différentiel.<sup>13,14,15,16</sup> Bien que la détection de maladie a connu un essor remarquable, les diagnostics reçus étaient généralement d'une précision modeste. Il a bien été démontré qu'en utilisant une panoplie de peptides isolés couplés à des algorithmes de classification statistique, le diagnostic qui pourrait être posé serait plus précis encore.<sup>17</sup> Cependant, l'efficacité des diagnostics demeurait insuffisante, sur le point de sensibilité et de spécificité considérées trop basses. C'est donc dans cette optique d'amélioration de l'efficacité que les recherches se sont dirigées vers le développement de diagnostics basés sur les anticorps. Il a été démontré que les biomarqueurs d'anticorps permettaient d'obtenir des taux de spécificité et de sélectivité supérieurs à 95% dans la majorité des cas.<sup>18,19</sup> La principale préoccupation concernant les anticorps utilisés comme biomarqueurs est d'identifier l'antigène qu'ils ciblent. Les anticorps servant d'indicateurs de biomarqueurs pour plusieurs types de maladies sont souvent inconnus.

### 2.3 Capteurs

Un capteur est un dispositif essentiel qui trouve une utilité dans plusieurs domaines de la science et de la santé. Il consiste à détecter ou à convertir un état physique et/ou chimique de son environnement en données utilisables. Un capteur est nécessairement couplé à un instrument de mesure de manière à permettre la détection et la quantification de l'état du système évalué. Dans le cas présent, le type de capteur utilisé est un capteur biologique, bien qu'il existe une grande variété de capteurs, chimiques, neuromorphiques ou fait de semiconducteurs de métal-oxides. Ainsi, les deux types de capteurs développés dans ce mémoire, soit à base de nanotubes de carbone et

de nanocornes de carbone, sont des capteurs qui sont conçus pour détecter un état physique, tel que la présence, ou non, d'un allergène particulier. Le principe sur lequel repose la réponse du capteur est la liaison sélective de l'anticorps, attaché à la surface de la nanostructure de carbone, à l'antigène et sa réponse en imagerie Raman.

### 2.3.1 Détection immunologique

La détection immunologique repose sur l'affinité entre un anticorps et une molécule ou une macromolécule spécifique en solution. Dans le cas présent, la macromolécule porte le nom d'antigène. Généralement, il est question d'utiliser un anticorps connu pour détecter la présence d'un antigène, mais le cas inverse est aussi possible. Les premiers systèmes de détection impliquant les principes de la reconnaissance immunologique consistaient en un antigène radioactivement marqué et couplé à des anticorps. Cette technique a été appelée dosage radio-immunologique (RISA) et développée par S.A. Berson et al. en 1956 et le prix Nobel de médecine a été décerné au Dr Yalow en 1977.<sup>20</sup> Cette technique repose sur une détection indirecte où une compétition a lieu entre des antigènes marqués avec des isotopes gamma-radioactifs de l'iode, préalablement liés aux anticorps, et des antigènes non marqués du sérum. Les antigènes non marqués ont une affinité plus élevée et se lient aux anticorps en remplaçant les antigènes marqués sur l'anticorps, les laissant libres en solution. La radioactivité des anticorps marqués non liés dans le surnageant après séparation est ensuite mesurée à l'aide d'un compteur gamma permettant une quantification indirecte dans le sérum. Cependant, cette technique n'est pas la plus efficace lorsque de nombreux échantillons doivent être analysés. Il était nécessaire de faciliter la mise en œuvre de cette

technique afin de répondre à la demande croissante d'analyses immunologiques. Pour cela, plutôt que d'utiliser un antigène radiomarqué pour la détection, Engvall et Perlmann ont développé le premier dosage immuno-enzymatique (ELISA) en 1971.<sup>21</sup> C'est encore aujourd'hui une méthode analytique couramment utilisée. Dans le même ordre d'idée, cette méthode permet la reconnaissance d'un antigène via sa liaison avec un anticorps spécifique, ou inversement. L'anticorps de détection est quant à lui couplé à une enzyme qui catalyse une réaction lors de l'ajout de son substrat chromogène. Les substrats communément utilisés pour les tests ELISA sont la peroxydase de raifort et la phosphatase alcaline. Le substrat est ainsi converti en une forme détectable, soit en produisant de la couleur. L'intensité du signal obtenu est proportionnelle à la quantité d'antigène détecté et les résultats sont quantifiés par un lecteur de microplaques ELISA.

### 2.3.2 Nanomatériaux et nanocapteurs

La nanoscience et la nanotechnologie sont des domaines sujets à de rapides développements depuis que Norio Taniguchi les a baptisé ainsi, en 1974, et sont donc devenus les sujets de recherche les plus convoités.<sup>22</sup> Ce sont des domaines d'études qui se rapportent à la matière nanoscopique, c'est-à-dire aux structures dont la taille est de l'ordre de  $10^{-9}$  m. Généralement, les propriétés physiques ainsi que les comportements des structures nanoscopiques diffèrent de ceux observés dans leur état macroscopique. Les nanomatériaux peuvent autant être retrouvés dans la nature, tel les protéines véhiculées par le sang, ou créés à partir de divers éléments, appelés nanomatériaux modifiés (engineering nanomaterials, ENM). Les ENMs se retrouvent dans la plupart des produits, structures, appareils électriques et autres commercialisés. Les nanomatériaux,

tels que des nanoparticules, des nanofibres, des nanotubes, des nanocanaux, du graphène, etc., trouvent applications dans les dispositifs d'administration de médicaments, les diagnostics médicaux, les détections électrochimiques et pour la remédiation environnementale.<sup>23,24,25</sup> Il est possible de concevoir des dispositifs nanoscopiques permettant la mesure ou la détection de stimulus à de très faibles concentrations ou dans des endroits où les méthodes macroscopiques ne le permettent pas. Ces nanocapteurs sont utilisés aujourd'hui dans de nombreux domaines liés aux nanosciences, tels que les soins de santé, les produits pharmaceutiques, la physique, la défense militaire, l'alimentation, etc.

## 2.4 Spectroscopie Raman

Cette section est dédiée à la spectroscopie Raman, ses origines, les principes sur lesquels cette méthode repose, ses champs d'applications ainsi que l'intérêt porté vers cette technique d'observation dans le cadre de ce mémoire. Puisque la spectroscopie Raman est la principale technique utilisée dans ce mémoire, les principes de base sont présentés afin de permettre une bonne compréhension et interprétation des résultats présentés.

### 2.4.1 Origines et principes

La spectroscopie Raman consiste en une méthode d'analyse permettant l'observation et la caractérisation de divers matériaux. Le faisceau monochromatique envoyé sur l'échantillon est diffusé selon une interaction spécifique avec le milieu. Il est ainsi possible d'obtenir une signature caractéristique d'un composé en interprétant le

spectre Raman obtenu, celui-ci composé des différentes bandes ou lignes Raman caractéristiques des déplacements de fréquences.

Le faisceau laser envoyé sur l'échantillon est composé de photons qui interagissent avec les électrons des molécules présentes. Ces électrons peuvent absorber les photons incidents les amenant à une énergie plus haute, appelé l'état excité. Dans la plupart des cas, la relaxation de l'électron émettra un photon de même énergie que le laser, ce qui décrit la diffusion de Rayleigh.

Cependant, le transfert d'énergie du photon vers l'électron n'est pas toujours optimal. La diffusion Raman est un phénomène de diffusion inélastique. Deux scénarios sont alors possibles. Le premier consiste en la diffusion Raman Stokes, où le photon émis est de plus basse énergie que celui du laser. Le deuxième scénario de diffusion inélastique possible est la diffusion Raman anti-Stokes, où le photon réémit possède une énergie supérieure à celle du laser incident.<sup>26</sup>

La transition la plus fréquente est d'ailleurs la diffusion Raman Stokes, puisqu'elle n'implique pas d'électrons dans un niveau d'énergie excité. À une température ambiante, la population du niveau excité est de plusieurs ordres de grandeur inférieure à celle du niveau énergétique fondamental. Ainsi, la probabilité que la transition reliée à la diffusion Raman Anti-Stokes se produise est aussi diminuée de manière exponentielle.

Ce qui détermine l'intensité des bandes Raman est aussi un aspect important permettant de comprendre l'aspect qualitatif mais aussi quantitatif de la spectroscopie Raman. Cependant, il ne sera pas question de s'attarder sur cette portion. L'aspect

d'intérêt pour cette étude est l'interaction avec les liaisons possédant une grande polarisabilité aux vibrations tel que les liens C=C ou C≡C.

Le spectre Raman permet de visualiser les photons réémis qui ne possèdent pas la même fréquence que le laser incident en fonction de leur fréquence, donnant lieu à des bandes spécifiques du matériau analysé.

## 2.5 Introductions aux nanostructures de carbone

Les nanocornes de carbone à paroi unique (SWCNH) sont considérés comme similaires aux nanotubes de carbone à paroi unique (SWCNT). Elles font partie de la large famille des nanostructures de carbone qui regroupe plusieurs structures, autant unidimensionnelles que tridimensionnelles. Cette section permettra de comprendre l'intérêt suscité par les nanostructures de carbone pour leur exploitation dans ce qui a trait au domaine de la nanotechnologie.

Le carbone est probablement l'un des éléments les plus polyvalents du tableau périodique. Il peut se trouver sous forme de nombreux allotropes et hybridations possibles, tels que  $sp$ ,  $sp^2$  et  $sp^3$ . C'est au début des années 1960 que sont menées les premières recherches sur les nanostructures de carbone. Hanns-Peter Boehm, considéré comme le pionnier de la recherche sur le graphène, est à l'origine de la conception de cette nanostructure.<sup>27</sup> Ce n'est qu'une décennie plus tard que la prédiction d'une autre structure, celle-ci trois dimensionnelle, le fullerène, a été possible par le professeur Eiji Osawa. Il a fallu cependant attendre jusqu'en 1985 pour que le premier fullerène soit synthétisé par Harold Kroto, Robert Curl et Richard Smalley.<sup>28</sup> En 1991, le nanotube de carbone (CNT) émergea des laboratoires de Sumio Iijima.<sup>29</sup> Depuis ce jour, la recherche

sur les CNTs s'est considérablement développée. Les CNTs présentent des propriétés mécaniques et électriques uniques, conduisant à un potentiel d'application exceptionnel. Pour ces raisons, les matériaux à base de carbone sont le centre d'intérêt pour la recherche et l'utilisation courante dans le domaine des nanotechnologies.

Il existe de nombreux types de nanomatériaux à base de carbone qui présentent des caractéristiques adaptées aux applications de nanocapteurs. Ils peuvent être exploités pour la détection chimique en raison de leur caractère hydrophobe, de leur faible fluorescence dans le spectre visible et de leur versatilité pour ce qui est de la fonctionnalisation en surface. Parmi les structures carbonées utilisées comme nanocapteurs, on trouve entre autres du graphène, des nanotubes de carbone, du graphite et des nanocornes de carbone, schématisés à la Figure 5. Une attention particulière s'est portée sur un nouveau type de nanostructure de carbone, les nanocornes de carbone, voir la Figure 6.

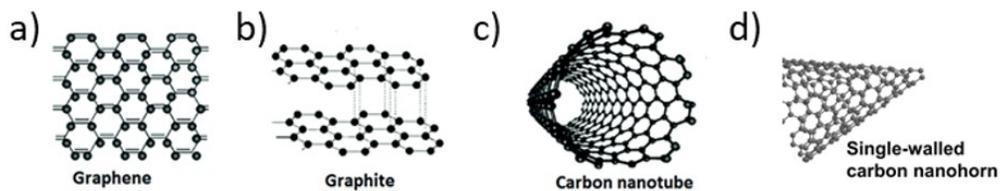


Figure 5 : Représentation schématique de divers nanomatériaux à base de carbone.[30]

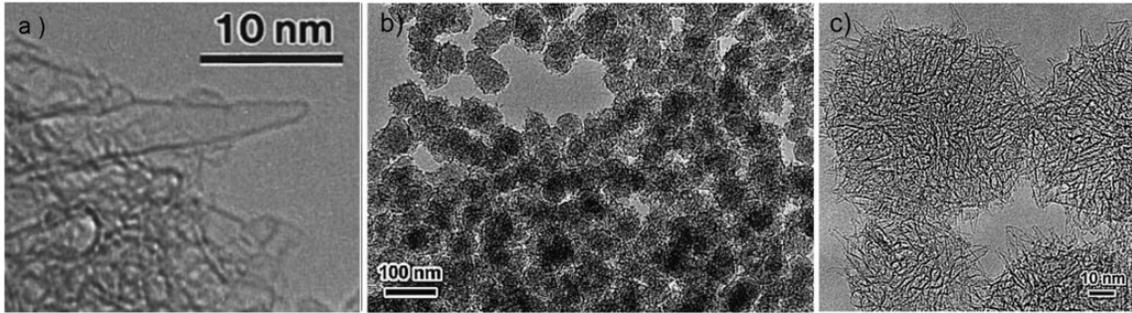


Figure 6 : Micrographes à transmission électroniques de nanocornes de carbone. a) Nanocornes de carbone individuel de Saito, Y., et al. (1996) (b) Agrégats de clusters de nanocornes de carbone (dahlias), et (c) agrandissement de quelques dahlias, produits par ablation laser du carbone par Iijima, S., et al. (1999).[31,32]

Une brève description des trois nanostructures carbonées les plus utilisées se voit d'être utile pour comprendre les applications possibles pour chacune d'elles. Dans un premier temps, le graphène (fig. 4a) est une structure simple constituée d'un feuillet d'atomes de carbone disposés de manière à former un patron hexagonal d'hybridation  $sp^2$ . Cette nanostructure peut être synthétisée en monocouche, double couche ou encore en multicouche. C'est la base structurelle de tous les autres types de nanostructures de carbone. S'il est empilé verticalement, on obtient du graphite (3D, fig. 4b), possédant des interactions de van der Waals générant un espacement de 3,35 Å entre chaque feuillet. En l'enroulant sur lui-même, on obtient le nanotube de carbone (1D, fig. 4c).

Le nanotube de carbone est un type de nanostructure tubulaire cylindrique creuse unidimensionnel. Il peut être composé d'un ou plusieurs feuillets d'atomes de carbone enroulés sur eux-mêmes formant un tube de simple paroi (SWCNT) ou encore à plusieurs parois (MWCNT) généralement nommés CNTs. Cette structure est également composée d'atomes de carbone d'hybridation  $sp^2$  disposés de manière hexagonale. Ces nanostructures ont suscité un grand intérêt pour leurs propriétés électriques. En raison

de leur surface élevée par rapport au volume occupé, les CNTs sont de bons candidats pour les capteurs biologiques et chimiques. Ils sont donc adaptés à l'adsorption de grandes quantités de molécules, par exemple des gaz ou des colorants, soit sur leurs surfaces mais aussi à l'intérieur de leurs creux. Ils sont également capables de résister à une densité de courant très élevée jusqu'à quatre ordres de grandeur par rapport à d'autres métaux.<sup>30</sup>

Les nanocornes de carbone (CNHs) ont été découverts en 1999.<sup>32</sup> Puisqu'il s'agit d'un composé émergent, ses caractéristiques sont encore à l'étude afin de mieux comprendre le comportement de cette nanostructure. Les CNHs sont des particules sphériques qui s'assemblent en agrégats, de type dahlia, bourgeon (bud-like) ou graine (seed-like), de 80-100 nm de diamètre en moyenne. Le terme nanocornes fait référence à la forme conique des structures situées à la surface des particules, généralement de 2 à 5 nm de diamètre et de 40 à 50 nm de long orientées radialement. L'intérieur des particules est plutôt constitué de structures carbonées tubulaires ou d'agrégats de nanocornes. Les nanocornes sont structurellement comparable aux nanotubes de carbones. Leur synthèse se fait généralement selon trois méthodes discutées à la section 2.5.1. Ces synthèses ne nécessitent pas l'utilisation de catalyseurs métalliques, de sorte que le produit obtenu est pur, plus respectueux de l'environnement, moins toxique et exempt d'agent interférent. Aussi, la forme sphérique conduit à des propriétés électroniques particulièrement intéressantes. Les nanocornes de carbone sont d'autant plus utilisées pour le développement de nanocapteurs électrochimiques que les CNTs.<sup>33</sup> Concernant leur chimie de surface, les CNH ont des liaisons  $sp^3$  qui sont réactives,

permettant une fonctionnalisation de surface plus efficace que celle des CNTs. De plus, leur porosité élevée et leur surface spécifique sont d'autres caractéristiques avantageuses à exploiter pour les applications de détection. Tout comme les CNTs, les CNHs sont capables de désactiver la fluorescence d'autres analytes, ce qui leur permet d'être des candidats prometteurs dans la détection avec le laser optique et dans la détection par multiplexage.

### 2.5.1 Synthèse des CNHs

Les nanocapteurs à base de CNHs démontrent une grande sensibilité, une réponse rapide ainsi qu'une excellente stabilité.<sup>34</sup> Ces caractéristiques sont principalement attribuées à l'excellente conductivité électrique, à la grande fenêtre électrochimique, à la résistance mécanique et à la grande surface spécifique de ces nanostructures carbonées. Trois méthodes peuvent être utilisées pour la synthèse des CNHs. La première est l'ablation au laser de CO<sub>2</sub> d'une tige de graphite à température ambiante dans un réacteur sous vide pompé à l'Argon à 760 Torr. C'est la première méthode présentée par Iijima, S., et al en 1999.<sup>32</sup> La deuxième est la méthode de l'arc électrique, dans laquelle un gaz est déchargé entre deux électrodes, le rendant conducteur. Une tige de carbone est soumise à l'impulsion de courant continu à pression atmosphérique conduisant à de petites particules de 50 nm de diamètre en moyenne avec une grande pureté.<sup>35</sup> D'autres types de méthodes d'arc peuvent être utilisées avec de l'eau ou de l'azote liquide, et les nanocornes peuvent être retrouvées en flottant à la surface du liquide.<sup>36</sup> Il existe aussi une troisième méthode de préparation des CNHs initialement utilisée pour les CNTs et les fullerènes appelée méthode de chauffage par effet Joule, utilisée pour la première fois

pour la synthèse des CNHs en 2012 par C. Pagura, et al.<sup>37</sup> Il s'agit d'une méthode qui permet de générer un chauffage des conducteurs par induction électromagnétique. L'attrait principal de cette technique provient de la haute densité de puissance qui peut être concentrée à l'intérieur d'un objet permettant d'atteindre une température suffisante pour l'évaporation du graphite.

#### *a) Structures et caractéristiques des CNHs*

Cette sous-section est destinée à la compréhension des CNHs, autant portée sur leurs caractéristiques structurelles que sur leurs propriétés exploitables. Cela inclut les paramètres qui permettent de modifier et d'influencer leur structure lors de leur création. Les CNHs ont été brièvement introduits à la section 3.6.2, cette section présente une étude plus exhaustive de cette nanostructure.

#### *Propriété physique*

Les trois types de structures principales retrouvées chez les CNHs se distinguent de la manière dont les cornes croissent au sein de l'agrégat. Pour ce qui est du type Dahlia, les cornes se retrouvent à l'extérieur de la surface d'agrégation pointant l'extérieur de leur extrémité fermée. Les deux autres types de structure, soit les types bud-like et seed-like, les cornes se développent à l'intérieur de la particule. En moyenne, une particule est constituée d'un assemblage allant jusqu'à 2000 cornes, générant la structure d'agrégation sphérique entre 80 et 100 nm de diamètre. La Figure 7 suivante permet d'illustrer ces trois types de structures.

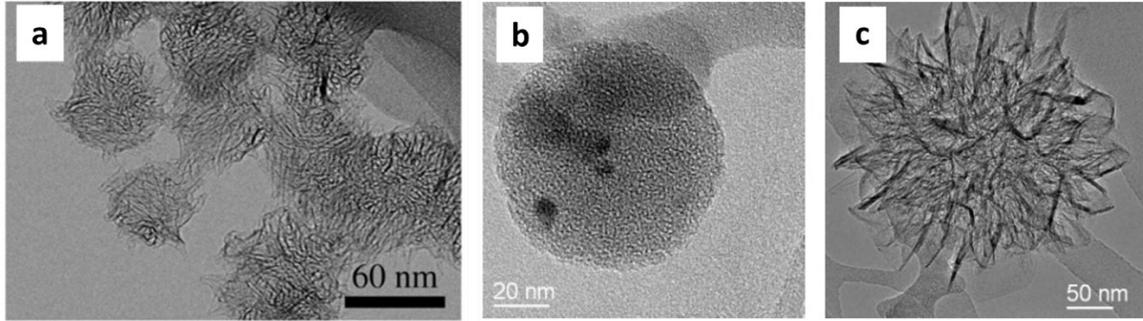


Figure 7 : Images STEM de (a) Ne-SWCNHs menant à une structure du type seed-like.[38] Images TEM de particules de nanocornes uniques, b) structures semblables à des bud-like et c) structure typiques de type Dahlia.[39]

La nature du gaz tampon utilisé lors de la synthèse des CNHs ainsi que la pression de celui-ci ont des impacts directs sur la pureté et la morphologie des particules obtenues avec la méthode d'ablation laser au CO<sub>2</sub>. Les deux modifications possibles sont apportées au niveau de la taille de la particule et de la longueur des cornes qui la composent. Des gaz tel que l'hélium et le néon génèrent de plus petites particules, voir la Figure 8. L'hélium génère les structures de type bud-like tandis que le néon tend à générer des structures du type seed-like, voir la Figure 7a-b et 8a-e. La structure du type seed-like est la plus petite des trois, elle possède une grafitisation plus faible, les cornes qui la composent sont cohérentes et plus longues que celles de la structure de type bud-like.<sup>40</sup> En contrepartie, il a été montré que l'usage de l'argon menait à l'obtention des plus grandes tailles de particules, aussi composées des cornes les plus longues. C'est aussi en utilisant ce gaz que la structure majoritairement obtenue est du type Dahlia (Figure 7c et Figure 8d).

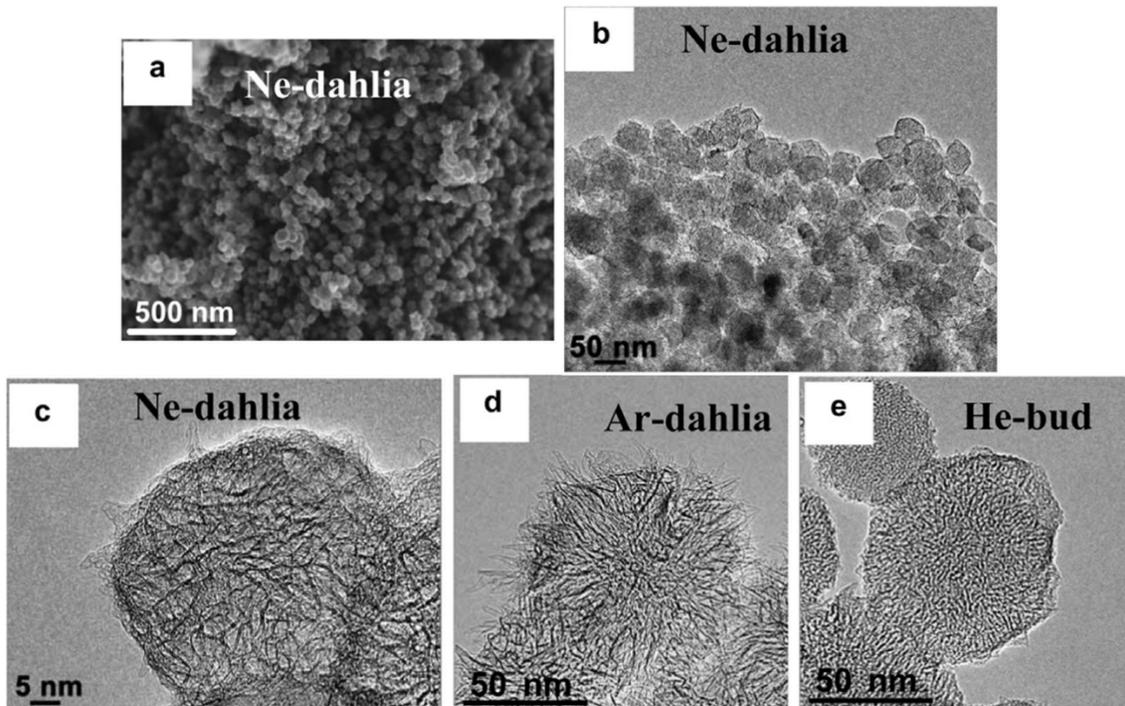


Figure 8 : Image SEM et TEM de nanocornes de carbones obtenues par ablation laser  $CO_2$  en utilisant du Ne, de l'Ar et de l'He comme gaz tampons. a) Image SEM de Ne-dahlia, b-c) images TEM de Ne-dahlia, d) image TEM de Ar-dahlia et e) image TEM de He-buds.[40]

La raison pour laquelle l'usage de différents gaz génère une variation au niveau de la grandeur des particules trouve son origine dans la vitesse de diffusion du panache généré par la technique d'ablation laser. L'argon possède la masse la plus élevée des trois gaz et se diffuse donc plus lentement que l'hélium ou le néon. Dans un nuage de plasma qui diffuse rapidement, la fréquence de collision entre les amas de carbone se voit réduite, ce qui diminue ainsi la taille des particules de carbone créées. Toutefois, cette tendance n'est pas observée entre les tailles de particules obtenues sous Ne et He. En effet, les He-SWCNTs ont des diamètres moyens plus importants que les Ne-SWCNHs. Une explication pour cette déviation n'a pas été étudiée, mais T. Azami, et al. suggèrent plutôt une différence au niveau structurelle des particules à plus petite échelle.<sup>40</sup> Cela regroupe les différences structurelles des particules de nanocornes de carbone.

L'aspect général d'une corne est abusivement décrit comme ressemblant à un cône. Cependant, la structure se compose d'une partie tubulaire munie d'une extrémité fermée conique. L'angle moyen formée par ces structures est d'environ 20° et l'extrémité se compose généralement de cinq hexagones de carbone dont le rayon est d'une dimension inférieure au nanomètre, comparable à celui du C<sub>60</sub>.<sup>32</sup> La section tubulaire des cornes possède un diamètre avoisinant les 3 nm. Comparativement aux nanotubes de carbones à simple parois, dont leur diamètre est près de 1 nm, les cornes possèdent une cavité interne beaucoup plus volumineuse.<sup>41</sup> Contrairement aux nanotubes cependant, la section transversale des cornes n'est pas toujours circulaire parfaite, mais peut être considérablement déformée de manière irrégulière. Les cornes dépassent parallèlement à la normale de la surface des particules de 20 nm en moyenne, ce qui confère une allure d'oursin aux agrégats. Des Images TEM présentées à la Figure 9 permettent de bien illustrer ces caractéristiques structurales.

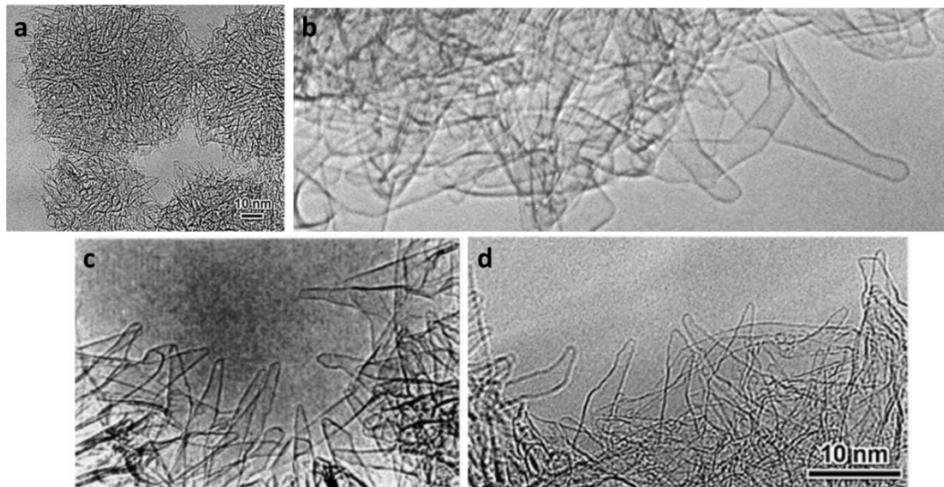


Figure 9 : a) image TEM de particules de carbone graphitique montrant des agrégations de structures de type tubule dépassant de la surface des particules.[32] c) Micrographes électroniques de la surface des particules SWNH, qui montrent clairement des structures en forme de cône.[35] d) Image TEM d'une autre surface de SWCNH montrant des saillies en forme de cornes coniques pouvant atteindre 20 nm de long sur la surface des particules certaines déviations de forme.[32]

### Propriétés chimiques

Les CNHs, comme mentionné précédemment, sont une alternative à plusieurs nanomatériaux de carbone, tel que les CNTs et le graphène. Certaines caractéristiques leurs sont communes, mais d'autres sont uniques et propres aux nanocornes de carbone, en raison de leur forme conique. Les trois principaux aspects qui seront couverts ici seront leurs signatures Raman, les influences de leurs extrémités coniques et leur porosité leur conférant un caractère adsorbant.

La signature Raman typique d'une nanocorne de carbone se décrit comme un spectre possédant deux bandes principales comme l'illustre la Figure 10. La première se situant à  $1590\text{ cm}^{-1}$  correspond à la bande G, qui est assignée aux vibrations de réseau de type  $E_{2g}$  au sein des atomes de carbone hybridé  $sp^2$ . Il s'agit d'un mode de cisaillement tangentiel des atomes de carbone correspondant à un mode d'étirement dans un plan. La seconde, la bande D, se trouve à  $1341\text{ cm}^{-1}$  et elle est associée au mode de symétrie  $A_{1g}$  qui s'attribue à l'ordre du plan basal.<sup>42</sup> Il s'agit d'un phonon optique longitudinal. Cette bande est connue sous le nom de mode désordonné ou défaut. La région conique de l'extrémité des cornes brise la périodicité du plan basal, ce qui génère effectivement cette large bande. La forme conique influence particulièrement les propriétés électroniques de ce type de nanostructures. La Figure 10 illustre des spectres Raman typiques pour différents types de CNHs. Les bandes G et D varient d'intensités dépendamment de la composition des CNHs.

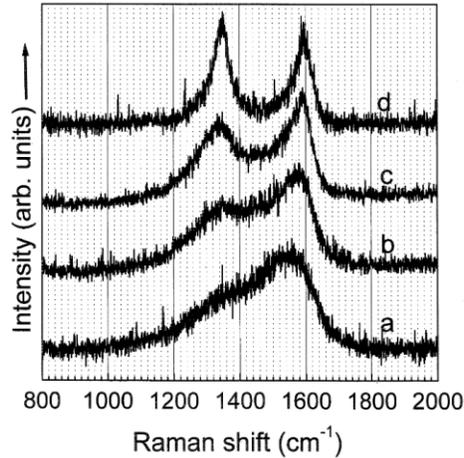


Figure 10 : Spectres Raman de dépôts carbonés produits par ablation au laser  $CO_2$  à température ambiante et une pression de gaz Ar de a) 10, b) 50, c) 200 et d) 600 Torr. Les agrégats de CNH de la figure 9d ont produit le spectre Raman illustré en d. [32]

Une propriété spécialement avantageuse des CNHs est leur porosité, et directement reliée, leur capacité d'adsorption de diverses matières. Cette propriété est d'autant plus modulable par oxydation, permettant d'accéder aux pores internes de la structure. L'oxydation des nanocornes génère des trous au sein du squelette carboné comparables à des fenêtrés nanoscopiques. L'oxydation est possible soit par traitement thermique en condition oxydante ou acidifiante.<sup>43,44,45</sup> Sous certaines conditions, cette oxydation peut être réversible thermiquement. Les trous formés sur les parois latérales des cornes sont généralement plus difficiles à refermer que ceux formés sur les extrémités. Aussi, les trous d'une dimension inférieure à 0,9 nm se refermeraient plus rapidement.<sup>46</sup> De plus, l'oxydation des CNHs permet de générer des fonctions spécifiques à leurs surfaces, tel que des fonctions acides (-COOH) lors d'un traitement de peroxydes et des fonctions carboxyles (-C=O) lors d'un traitement thermique dans l'air. Afin de retirer ces fonctions, un traitement thermique en présence d'hydrogène ( $H_2$ ) s'impose.<sup>47</sup> Le volume des micropores ainsi que l'aire surfacique des CNTs ont été mesurés et seraient

d'environ 0,11 mL/g et de 308 cm<sup>2</sup>/g, respectivement, ce qui est considérable. Dans un agrégat de type dahlia, deux types de pores peuvent être retrouvés, tels que les pores interstitiels, dont leurs tailles dépendent de la température à laquelle la structure a été créée, et les pores internes, soient des cavités nanoscopiques.<sup>48,49</sup> D'un autre côté, le caractère adsorbant des nanocornes de carbone à l'état pure leur permet de stocker modérément du CO<sub>2</sub> et de l'O<sub>2</sub>, leur confèrent des propriétés de semiconducteurs.

## 2.6 Modification des nanocornes de carbone

La modification de la chimie de surface des CNHs via une fonctionnalisation chimique permet de modifier leurs propriétés. Principalement, l'ajout de fonctions spécifiques sur les CNHs permet d'améliorer leur dispersion dans divers solvants, ainsi que de les rendre hydrosolubles, les rendant plus facile à manipuler, permettant ainsi d'élargir leur champ d'applications. Deux principales méthodes de fonctionnalisation seront abordées, soit la fonctionnalisation covalente et la fonctionnalisation non-covalente. La fonctionnalisation covalente se divise en deux catégories : l'oxydation des extrémités coniques ainsi que l'introduction directe de groupement fonctionnels sur les parois latérales des CNHs.

### 2.6.1 Fonctionnalisation covalente et applications

Plusieurs méthodes peuvent être employées afin de modifier la chimie de surface des CHNs. La fonctionnalisation covalente est une méthode permettant d'attacher des groupements spécifiques via un lien stable sur des nanocornes de carbone oxydées ou encore intactes. Plus d'attention sera accordée à la fonctionnalisation des nanocornes de

carbone oxydé, plutôt qu'au processus faisant intervenir des nanocornes intactes, puisque ce processus correspond à celui employé dans ce projet.

L'oxydation des CNHs permet d'incorporer des groupements carboxyliques aux extrémités coniques des structures, agissant comme site de liaison pour les groupements chimiques d'intérêts. Ces unités peuvent être entre autre différents alkyls, aryles, amines, des alcools, des thiols, certains polymères et encore plus.<sup>50,51,52</sup> Parmi toutes les propriétés qui peuvent être ajoutées (alcool, acide, amine, amide, etc.), certaines sont principalement utiles pour les applications en nanotechnologie.

D'une part, l'ajout de groupements photoactifs permet de créer des nanomatériaux hybrides applicables dans divers milieux. Parmi plusieurs hybrides de nanocornes de carbone, certains hybrides de porphyrines (CNHs-H<sub>2</sub>P) et les Cu<sup>II</sup>Tpy-CNHs sont particulièrement intéressants pour la conversion d'énergie via un système de donneur et d'accepteur d'électrons où les CNHs agissent comme accepteurs.<sup>51,53</sup> Certains avancements ont aussi permis de développer un hybride comportant des propriétés de photothérapie contre le cancer. En effet, les CNHs comportant des molécules de ZnPc dans leur cavité interne ainsi qu'une double fonctionnalisation de surface de ZnPc et de BSA présentent une meilleure efficacité anticancéreuse que les techniques de thérapie photodynamique (PDT) et photohyperthermique (PHT) couplée à l'usage de ZnPc.<sup>54</sup>

Un exemple de fonctionnalisation des nanocornes de carbone oxydé pertinent à cette étude est la fixation d'agents bioactifs. Cette modification est généralement effectuée par des réactions d'amidation à base de carbodiimide. De cette manière, une

variété d'agents bioactifs, tel que des protéines, des biopolymères, des anticorps et autres, peuvent être attachés de manière covalente à la surface des CNHs. Ce type de modification permet non seulement au nanomatériau de carbone de former une dispersion stable dans un milieu aqueux, mais conduit aussi à une réduction de la cytotoxicité des CNHs et permet ainsi leur internalisation via endocytose dans les cellules.<sup>55</sup> Il est ainsi possible de développer des dispositifs de ciblage et d'étiquetage de cellules avec les CNHs en attachant des groupements actifs en fluorescence ou encore en introduisant des colorants dans leur cavité interne.<sup>56</sup> La figure 11 illustre la réaction de fonctionnalisation des CNHs utilisée dans cette étude.

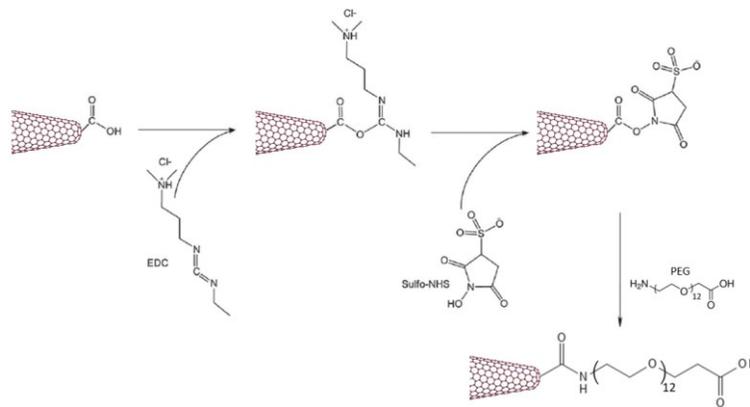


Figure 11 : Schéma réactionnel de la fonctionnalisation covalente des CNHs avec un  $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$  via un couplage avec l'EDC et le S-NHS.

### 2.6.2 Encapsulation de colorants dans les nanostructures de carbone

Ce qui est pertinent pour cette étude est l'encapsulation de composés dans leur cavité interne, ce qui permet de modifier leurs propriétés chimiques, électrique et magnétique.<sup>57</sup> Deux méthodes sont majoritairement utilisées pour remplir les nanotubes de carbone. La première exploite les avantages de la chimie douce en solution.<sup>57</sup> Les tubes sont abord oxydés en reflux acide pour ouvrir leurs extrémités et l'encapsulation devient

possible dans divers solvants organiques.<sup>58</sup> La seconde est la méthode physique, exploitant la force de capillarité du nanotube pour le remplir de matériel fondu, souvent un métal.<sup>59,60</sup> Aucun solvant est nécessaire pour ce processus.

La méthode utilisant la voie humide est plus avantageuse puisqu'elle offre la possibilité d'encapsuler dans les nanostructures une gamme de composés plus étendue.<sup>61,62</sup> Cette méthode offre des paramètres expérimentaux plus faciles à contrôler. Cependant, puisqu'il est question de travailler en milieu dilué, une quantité inférieure de matière entre dans les cavités internes des nanostructures, comparativement à la méthode physique. D'un autre côté, l'intérêt principal motivant l'usage de la méthode physique pour remplir des nanotubes est la formation de nanofils.<sup>59</sup> Cette méthode permet un remplissage dense de la nanocavité et les nanofils sont facilement obtenus suite à un traitement thermique ou une irradiation électronique.<sup>63</sup>

Dans ce mémoire, la méthode utilisée pour introduire des colorants dans les nanocornes de carbone est la voie humide. La force motrice permettant l'encapsulation est l'interaction entre la molécule et la paroi interne de la nanostructure. Les forces de Van der Waals dominent pour l'encapsulation de certaines molécules et la condensation par capillarité permet l'adsorption bidimensionnelle d'autres petites molécules, tel que l'argon et certains gaz.<sup>64,65,66</sup> Cette interaction mène à une stabilisation énergétique des composés typiquement représentée par une courbe de potentiel de Lennard-Jones, où une distance optimale entre les deux composés génère un minimum d'énergie potentiel.<sup>67</sup> Il a aussi été démontré avec le sexithiophène (6T) que les molécules peuvent

emprunter différentes voies pour pénétrer dans les CNTs, menant à des taux de remplissages différents.

Dans ce mémoire, des colorants sont encapsulés dans les nanocornes de carbone pour en faire des dispositifs de détection en multiplexage. Deux avantages majeurs ressortent de l'encapsulation de ces molécules dans des nanostructures de carbone. Le premier étant la désactivation efficace de la fluorescence en spectroscopie Raman.<sup>68,69</sup> Le second avantage que confère l'encapsulation dans une structure  $\pi$ -conjuguée unidimensionnelle est la protection des colorants contre le blanchiment moléculaire.<sup>4, 68</sup> Ainsi, l'intensité du signal Raman des colorants dans les sondes ne diminue pas lors de l'exposition au laser.

L'étude menée par E. Gaufres et al. (2016) sur l'encapsulation de l' $\alpha$ -Sexithiophène (6T) a permis de démontrer les différents modes d'agrégation de la molécule dans un nanotube de carbone.<sup>68</sup> Les molécules de 6T s'alignent parallèlement au tube pour ensuite s'insérer dans la nanocavité. Les nanotubes se remplissent d'abord par les extrémités et seulement deux molécules peuvent être présentes cotes, voir la Figure 12. Des encapsulation partielles et complètes montrent qu'un contrôle peut être maintenu sur le processus. De plus, un signal Raman de plus forte intensité est noté pour une paire d'agrégation dans les tubes. Ce phénomène est causé par une interaction importante entre les molécules de 6T dans le nanotube.<sup>68</sup>

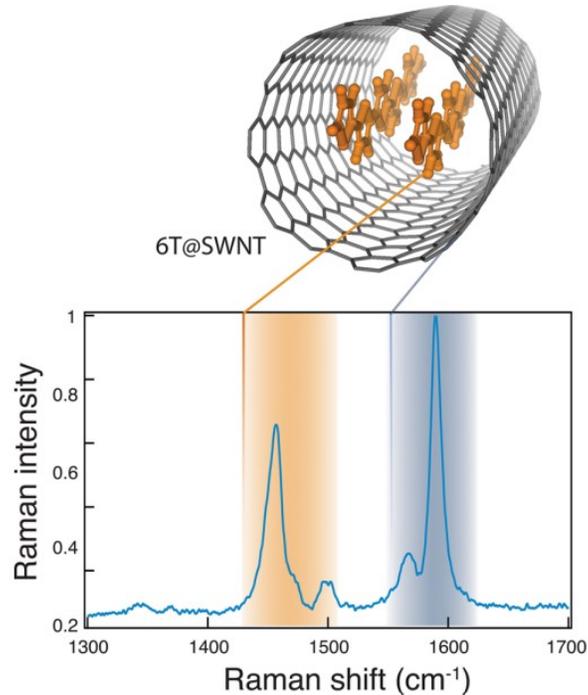


Figure 12 : Schémas d'une seule unité d'agrégat de paires et d'un spectre Raman typique de 6T @ SWCNT à une longueur d'onde d'excitation de 532 nm. L'intensité est normalisée avec le signal de la bande G des SWCNT.[68]

L'encapsulation de composés dans les nanocornes de carbone est encore émergente. Des études ont été faites montrant que les nanocornes de carbone peuvent encapsuler différentes molécules organiques et être utilisées comme transporteurs de médicaments anticancéreux.<sup>70,71</sup> La nanocavité des CNHs est cependant plus volumineuse que celle des CNTs, alors un arrangement interne moins structurée des colorants est possible. Les nanocornes oxydées présentent une capacité d'encapsulation supérieure à celle qui ne sont pas oxydées, car leur surface est parsemée de nanofenêtres, permettant aux molécules d'infiltrer la nanocavité.<sup>71</sup>

## CHAPITRE III – Méthodologie et matériels

### 3.1 Synthèse de nanocornes de carbone

La synthèse des nanocornes de carbone est réalisée par une méthode plasma-torch tel que décrit de Fanny Casteignau à la référence [72]. Les nanocornes de carbone utilisées dans ce projet ont été fournies par le groupe de Nady Braidy de l'Université de Sherbrooke.

### 3.2 Fonctionnalisation covalente des nanotubes de carbone

Les CNTs (Raymor) sont laissés durant une nuit à reflux dans une solution concentrée de  $\text{HNO}_3$  (8 M). Le mélange résultant est filtré sur filtre de polytétrafluoroéthylène (PTFE) et la poudre résiduelle est ensuite lavée avec NaOH et HCl pour neutraliser le pH. Les nanotubes de carbones (CNTs) oxydés ainsi obtenus sont dispersés dans un bain ultrasons pendant 1h dans une solution d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES, 1 mM, pH 7,4). Une quantité de 150  $\mu\text{g}$  d'éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) est alors ajoutée à 2 mL de la solution de nanotubes et le mélange est agité pendant 2 min. 300  $\mu\text{g}$  de sel de *N*-hydroxysulfosuccinimide sodium (Sulfo-NHS) sont alors ajoutés au mélange et agité pendant 2h à température ambiante. La solution est ensuite centrifugée à 12 000 rpm pendant 15 min et le surnageant est éliminé. L'échantillon est ensuite redispersé dans une solution d'HEPES (1 mM) et soniqué à nouveau pendant 15 min. Le polyéthylène glycol (PEG, 10 mg) bifonctionnalisés ( $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$ ) (Biochempeg, 600 g/mol) sont dissous dans le mélange et agités 2h dans un bain de glace. À nouveau, du EDC (150  $\mu\text{g}$ ) et du S-NHS (300  $\mu\text{g}$ ) sont ajoutés comme précédemment en suivant les mêmes étapes de centrifugation et de redispersions. Enfin, les anticorps (150  $\mu\text{g}$ , 2,88 mg/mL, dans du

PBS 1%) en solution sont ajoutés aux PEG-CNT et laissés dans un flacon en verre pendant une nuit au réfrigérateur. Les échantillons sont transférés après 12 heures dans un tube Eppendorf et centrifugés sept fois à 12 000 rpm pendant 15 min.

### 3.3 Fonctionnalisation non-covalente des nanocornes de carbone

Dans un flacon, 3 mg de distéaroylphosphatidyléthanolamine dérivés du PEG à groupement carboxyle (DSPE-PEG-COOH), l'EDC (2,3 mg) et le NHS (1,7 mg) dans 2 mL d'acide 2-(*N*-morpholino)éthanosulfonique (MES) sont mélangés pendant 10 min au vortex. Les anticorps (50  $\mu$ L 2,8 mg/mL dans du PBS 1%) sont ajoutés au mélange et agités à l'obscurité pendant 3h à 4°C. Les nanocornes ont été produites et oxydées dans un réacteur contenant 5% d'O<sub>2</sub>. Séparément, les CNH oxydés (0,5 mg) sont dispersées dans 8 mL de MES (1 mM) sous sonication pendant 5 secondes. La solution précédente de DSPE-PEG-COO-Ab est ajoutée aux CNHs et le mélange est agité pendant 2h à 4°C. La solution résultante est centrifugée à 10 000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et l'échantillon est ensuite redispersé dans une solution HEPES (1 mM), répété cinq fois. L'échantillon est laissé une nuit au réfrigérateur et utilisé tel quel.

### 3.4 Fonctionnalisation covalente des nanocornes de carbone

Les CNH sont dispersées dans un bain ultrason pendant 30 min dans du MES (1 mM). Du EDC (100  $\mu$ g) est alors ajoutée à 2 mL de la solution de nanocornes et le mélange est agité pendant 5 min. Du Sulfo-NHS (200  $\mu$ g) est ensuite ajoutés au mélange et agité pendant 2h à température ambiante. La solution est ensuite centrifugée à 12 000 rpm pendant 15 min et le surnageant est éliminé. L'échantillon est ensuite redispersé dans une solution de MES (1 mM) et soniqué à nouveau pendant 15 min. Le NH<sub>2</sub>-PEG-COOH

(10 mg, Biochempeg, 600 g/mol) est dissout dans le mélange et agités pendant 1h, centrifugés à nouveau à 12 000 rpm pendant 15 min et redispersés dans du MES 1 mM. Le EDC (100 µg) et le S-NHS (200 µg) sont ajoutés comme précédemment suivis des mêmes étapes de centrifugation et de redispersions. Enfin, les anticorps (150 µg, 2,88 mg/mL) en solution sont ajoutés aux PEG-CNH et agités pendant 1h. Les échantillons sont centrifugés cinq fois à 12 000 rpm pendant 15 min. La Figure 11 permet d'illustrer le schéma réactionnel de la fonctionnalisation covalente des CNHs, voir la Section 2.6.1.

### 3.5 Préparation des échantillons d'antigène

Les échantillons d'allergènes ont été préparés par Jérémie Theolier à l'Université Laval à Québec et ils sont obtenus sous forme de poudre. Une première solution mère de 1 mg/mL est effectuée et agitée à l'aide d'un vortex durant 5 minutes. Pour se débarrasser des plus gros agrégats de protéines, la solution mère est agitée dans un bain à ultrasons à 30°C durant 15 minutes. Les solutions de concentrations différentes sont créées à partir de cette solution mère. Les concentrations utilisées durant ce projet allaient de 2 mg/mL à 0,5 µg/mL. Tous les résultats présentés au Chapitre 4 en demi-sandwich et en sandwich complet ont été obtenus avec des concentrations d'antigènes de 2 µg/mL, à l'exception de la Section 4.4, où différentes concentrations ont été utilisées pour étudier l'effet du dosage des antigènes.

### 3.6 Auto-assemblage du système monoplexe immunofluorescent sur Si/SiO<sub>2</sub>

Des substrats Si/SiO<sub>2</sub> de 1 cm<sup>2</sup> sont lavés séquentiellement dans de l'acétone et dans l'isopropanol sous ultrasons pendant 10 min. Les surfaces sont ensuite activées dans du Piranha (HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pendant 15 min à température ambiante. Les substrats sont

rincés à l'eau milli-Q puis à l'isopropanol et séchés sous un flux d'azote. Les substrats sont déposés ensuite sur une lamelle de verre posée sur les bords d'un bécher contenant 1 mL d'APTES ((3-aminopropyl)-triéthoxysilane)). Le dépôt d'APTES s'effectue en phase vapeur dans un dessiccateur sous vide pendant 60 secondes (vanne ouverte) et le vide est maintenu (vanne fermée) pendant 30 secondes supplémentaires. Les substrats sont ensuite retirés du dessiccateur et recuits dans une étuve à 80 °C pendant 1h. Le tampon PDMS est d'abord lavé à l'aide d'une solution savonneuse (6 g/L) pendant 10 min dans un bain ultrasons et rincé successivement à l'eau distillée, à l'isopropanol, puis séché sous flux d'azote. Le tampon est irradié sous lumière UV pendant 10 min et lavé successivement avec de l'eau distillée, de l'isopropanol et séché à nouveau sous azote.

#### 3.6.1 Demi-sandwich monoplexe immunofluorescent sur Si/SiO<sub>2</sub>.

L'impression du matériel biologique sur le substrat se fait avec des tampons en PDMS préparés au préalable selon des motifs spécifiques, disques de 50 µm de diamètre espacés de 150 µm de centre à centre. Dans le groupe de Samuel Geodfroy (Université Laval), Jérémie Théolier et Virginie Barrere ont préparé de la poudre d'antigène fraîche directement extraite des noix (noix de cajou, amande, noisette). Cette poudre est dissoute dans une solution tampon de PBS pour former des solutions protéiques à 10 µg/mL. La solution d'antigène (80 µL, 10 µg/mL) est déposée sur la surface d'impression du tampon de PDMS pendant 30 min. L'excédent est séché sans rinçage sous flux d'azote durant 10 secondes à température ambiante. Le tampon PDMS ainsi encré est déposé par contact direct sur le substrat Si/SiO<sub>2</sub> préparé pendant 30 min. Les tampons sont ensuite retirés avec précaution et la surface de Si/SiO<sub>2</sub> est finalement enduite de bovine serum

albumin (70  $\mu$ L, 1% w/w, BSA) pendant 15 min et rincé trois fois avec la solution de PBS. Le substrat est incubé dans une solution contenant l'anticorps de noix (0,25  $\mu$ g/mL) pendant 30 min, ensuite rincé à trois reprises avec du PBS et finalement incubé avec le goat anti-mouse IgG 488 (GAM IgG 488, 0,2  $\mu$ g/mL) pendant 60 min. Le substrat est enfin rincé trois fois avec du PBS et séché sous un flux d'azote. Les motifs d'impression sont ensuite observés en microscopie optique à fluorescence (Zeiss Axio Zoom V16 équipé d'un objectif Zeiss Plan-Neofluar Z 1x/0.25 FWD 56 mm).

### 3.6.2 Sandwich complet monoplexe immunofluorescent sur Si/SiO<sub>2</sub>.

L'impression du matériel biologique sur le substrat se fait avec des tampons en PDMS préparés au préalable selon des motifs spécifiques, disques de 50  $\mu$ m de diamètre. La Figure 13 schématise les étapes de l'impression par microcontact menant à l'autoassemblage du sandwich complet. Le tampon de PDMS est encré avec une solution d'anticorps (50  $\mu$ g/mL) et déposé sur le substrat selon le même protocole qu'à la section 2.6.1. La passivation du substrat avec la BSA (1% w/w, BSA) est aussi identique. Le substrat est incubé pendant 30 min avec une solution protéique à 2  $\mu$ g/mL et rincé trois fois avec du PBS. L'anticorps de noix est complexé avec le GAM IgG 488 selon un rapport de 3 :1 dans une solution tampon de PBS pendant 20 min dans un tube Eppendorf. Le substrat est enfin incubé pendant 20 min à température ambiante avec la solution d'Ab complexée au GAM IgG 488 et rincé trois fois avec du PBS. Les motifs d'impression sont ensuite observés en microscopie optique à fluorescence (Zeiss Axio Zoom V16 équipé d'un objectif Zeiss Plan-Neofluar Z 1x/0.25 FWD 56 mm).

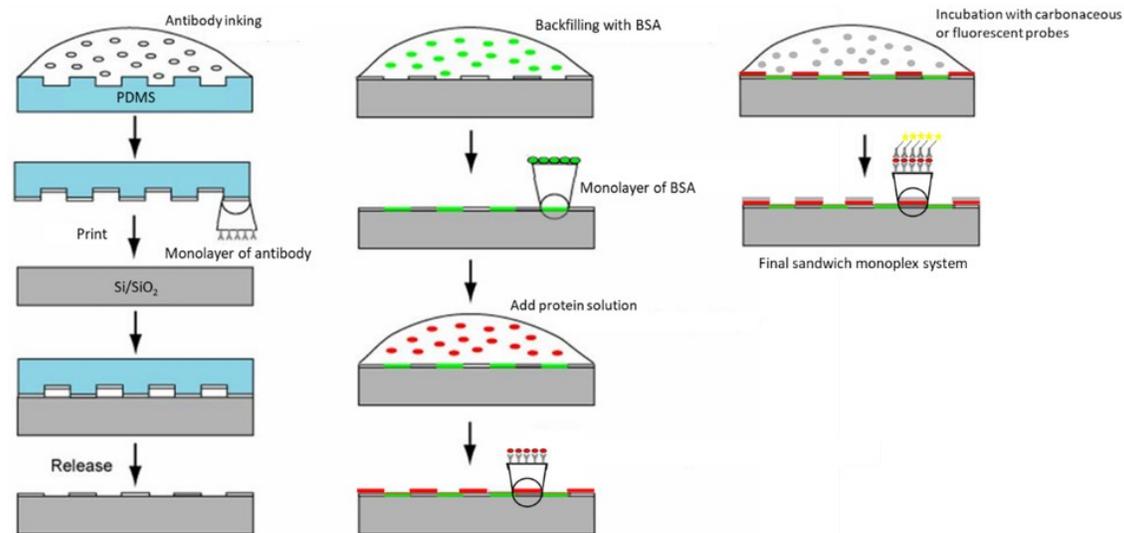


Figure 13 : Procédure d'impression Microcontact schématisée pour le système sandwich utilisant des sondes GAM IgG 488 ou Ab-PEG-CNHS ou Ab-PEG-CNTs.

### 3.7 Auto-assemblage du système monoplexe de CNH sur Si/SiO<sub>2</sub> pour détection Raman.

Les tampons de PDMS et les substrats d'oxyde de silice sont traités comme mentionné à la section 2.6. Les images optiques, les cubes Raman ainsi que les images Raman sont faites par un microscope Raman RIMA de Photon Etc.

#### 3.7.1 Demi-sandwich monoplexe de CNH pour détection Raman.

Le tampon de PDMS est encre, séché et déposé sur le substrat selon les mêmes directives qu'à la Section 2.6.1. Le substrat est passivé au BSA (1% w/w) 15 minutes, suivi de trois rinçages au PBS et finalement incubé avec une solution de nanosonde de carbone fonctionnalisée avec anticorps (Ab-PEG-CNHS) (8-10 mg/mL). De nombreuses incubations ont été évaluées ; incubation de 3h à 12h, à température ambiante ou au frigo, sur agitateur ou immobile, afin d'obtenir une plus grande sélectivité sur les régions de protéines imprimées et moins de bruit de fond.

### 3.7.2 Sandwich complet monoplexe de CNH pour détection Raman.

Le tampon de PDMS est encre, séché et déposé sur le substrat selon les mêmes directives qu'à la Section 2.6.2 et le substrat est passivé au BSA (1% w/w) 15 minutes, suivi de trois rinçages au PBS. Le substrat est finalement incubé avec une solution d'antigène de noix (2 µg/mL) pendant 30 min, suivi de trois rinçages au PBS. Finalement, le substrat est incubé avec une solution de nanosondes de carbone fonctionnalisées avec anticorps (Ab-PEG-CNT ou Ab-PEG-CNHs) (8-10 mg/mL). De nombreuses incubations ont été évaluées ; incubations de 3h à 12h, à température ambiante ou au frigo, sur agitateur ou immobile, afin d'obtenir une plus grande sélectivité sur les régions de protéines imprimées et moins de bruit de fond.

### 3.8 Marquage Immunogold

Le marquage Immunogold est un test performé sur les nanosondes avec les anticorps pour connaître l'efficacité de la fonctionnalisation. Il utilise des nanoparticules d'or fonctionnalisés avec des anticorps secondaires permettant de se lier aux anticorps primaires sur les nanostructures de carbone fonctionnalisées. Le résultat est imagé en microscopie électronique en transmission. Une goutte de 10 µL d'une solution d'Ab-PEG-CNTs ou d'Ab-PEG-CNHs (5 g/mL) est déposée sur un disque de mousse de nickel utilisé comme grilles formvar (Thermo Fisher) pour le microscope électronique à transmission (TEM), et 10 min sont allouées pour l'adsorption des sondes carbonées sur le substrat. La solution résiduelle est éliminée à l'aide d'un morceau de papier hautement adsorbant et la surface est ensuite exposée à une goutte de 10 µL de glycine (2% en PBS, tampon phosphate salin) pendant 10 min, puis, l'échantillon est rincé deux fois à l'aide de 10 µL d'eau Mili-Q avec au moins 3 min d'incubation pour la dernière goutte. L'eau de rinçage

est à nouveau éliminée à l'aide d'un morceau de papier. Une goutte de 10  $\mu$ L d'une solution de nanoparticules d'or (diamètre de 10 nm, diluée au 1/10 de la solution mère) fonctionnalisées avec des GAM IgG est déposée sur l'échantillon et laissée 30 min pour permettre le ciblage des nanosondes de carbone. Enfin, la grille de TEM est soigneusement rincée par immersion successive dans trois récipients différents contenant chacun 30 mL d'eau Mili-Q. Le disque est séché à l'air pendant 1 h ou plus, avant l'analyse en TEM.

### 3.9 Test de réactivité croisée

Cette série de tests permet de connaître l'affinité de chacun des anticorps avec les trois antigènes de noix fournis. La préparation du substrat d'oxyde de silice et du tampon de PDMS est similaire à celle décrite pour l'assemblage système immunofluorescent à la section 2.6.

#### 3.9.1 Demi-sandwich

Les trois antigènes sont imprimés sur chacun des substrats par  $\mu$ CP. Chaque substrat est incubé dans une solution contenant chacune un anticorps de noix différent, suivi d'une seconde solution contenant le complexe anticorps-GAM IgG 488. Les temps d'incubations et les concentrations des solutions sont identiques à celles mentionnées en 2.6.1. Un schéma du protocole est fourni en annexe 2 (voir la Figure A). Les motifs d'impression sont ensuite observés en microscopie optique à fluorescence (Zeiss Axio Zoom V16 équipé d'un objectif Zeiss Plan-Neofluar Z 1x/0.25 FWD 56 mm).

#### 3.9.2 Sandwich complet

Les trois anticorps sont imprimés sur chacun des substrats par  $\mu$ CP. Chaque substrat est incubé dans une solution contenant chacune un seul antigène différente suivi

d'une seconde solution contenant le complexe anticorps-GAM IgG 488. Les temps d'incubation et les concentrations des solutions sont identiques à celles mentionnées en 2.6.2. Un schéma du protocole est fourni en annexe 2 (voir la Figure E). Les motifs d'impression sont ensuite observés en microscopie optique à fluorescence (Zeiss Axio Zoom V16 équipé d'un objectif Zeiss Plan-Neofluar Z 1x/0.25 FWD 56 mm).

### 3.10 Spectroscopie de fluorescence

Les imageries en microscopie de fluorescence ont été effectuées sur deux microscopes différents. L'un permet d'obtenir des images qui rendent compte de la sélectivité macroscopique du système de détection, tandis que l'autre est utilisé pour la sensibilité microscopique du système. Le premier était emprunté au département d'histologie de l'IRIC et le deuxième à la Faculté de Pharmacie de L'Université de Montréal (Zeiss Axio Zoom V16 équipé d'un objectif Zeiss Plan-Neofluar Z 1x/0.25 FWD 56 mm). Un filtre Fluorescéine (FITC) est utilisé pour sélectionner une longueur d'onde d'irradiation de 488 nm.

### 3.11 Spectroscopie Raman

Les images Raman présentées dans ce document ont été obtenues à l'aide d'un microscope hyperspectrale (RIMA™ de Photon etc.) fournissant de l'information spatiale et spectrale. Le laser utilisé possède une longueur d'onde de 532 nm et il est réglé à une puissance de 3.25 W. Les acquisitions se font de 1550 à 1650  $\text{cm}^{-1}$  pour les échantillons ne comportant pas de colorants encapsulés, et de 1200 à 1700  $\text{cm}^{-1}$  pour les échantillons où des colorants ont été encapsulés dans les nanostructures de carbone. L'acquisition des cubes est réalisée avec une exposition de 1 seconde par image et un regroupement

(binning) de 2x2 pixels. Un filtre de 1400 à 2000  $\text{cm}^{-1}$  est appliqué pour ne laisser passer que la portion de longueur d'onde correspondant à la bande G des nanocornes et des nanotubes de carbone. Chaque image menant au hypercube est prise à des intervalles de 3 à 10  $\text{cm}^{-1}$  pour accommoder le temps d'analyse.

### 3.12 Microscopie électronique

Les imageries du champ clair de microscopie électronique en transmission (TEM) ont été acquises en utilisant le microscope électronique analytique JEOL 2100-F FEG (JEOL, Akishima, Tokyo, Japon) opéré à 200 kV.

## CHAPITRE VI – Résultats et discussion

### 4.1 Monoplexe immunofluorescent

Cette section couvre les tests d'immunofluorescence préliminaires effectués. Cette technique est appliquée à la microscopie optique, principalement à l'aide d'un microscope à fluorescence. Cette technique permet de détecter des antigènes ou des anticorps de manière indirecte, soit via une biomolécule marquée avec une composante active en fluorescence. L'immunofluorescence a été utilisée sur plusieurs tissus ou cellules au fil du temps. Les tests effectués dans ces sections sont comparables à ceux performés par la méthode de sandwich ELISA. Le terme essai sandwich est utilisé pour décrire la structure de l'auto-assemblage des anticorps et des protéines sur le substrat. Essentiellement, la protéine est prise entre deux anticorps, l'un fixé sur le substrat et l'autre, sur la nanosonde. Dans le même ordre d'idée, le terme demi-sandwich désigne le système où la protéine est prise en sandwich par un anticorps et le substrat d'oxyde de silice.

#### 4.1.1 Système de détection en demi-sandwich

Cette section est destinée à développer la preuve de concept de la détection en demi-sandwich. La détection d'un seul antigène sera évaluée, menant à une détection monoplexe. La détection en demi-sandwich permet d'obtenir une confirmation rapide et simple de la reconnaissance entre l'anticorps et la protéine antigène. Le système en demi-sandwich comporte ainsi moins de paramètres variables, tel que des étapes de rincage et d'incubation en moins et l'incorporation de moins de matériel biologique. La faisabilité des essais sandwich est donc évaluée sans l'incorporation de nanosondes carbonées, car celles-ci ajouteraient au système une composante supplémentaire de complexité. Pour

cela, la microscopie optique à fluorescence est exploitée. L'agent de marquage est un anticorps fluorescent, soit le Goat Anti-Mouse IgG 488 (GAM IgG 488). L'utilisation de cet agent fluorescent est motivée par la simplicité, l'efficacité et la rapidité de la réponse en microscopie à fluorescence. Cela permet de valider l'auto-assemblage de chaque couche pour le système sandwich monoplexe. Comme illustré sur la Figure 14a, une première étape de validation utilisant le GAM IgG émettant à 488 nm peut être utilisée pour évaluer l'efficacité de la complexation entre l'anticorps de noisette (Anti-Noisette) et sa protéine correspondante en impression par microcontact ( $\mu$ Contact Printing,  $\mu$ CP). Les résultats de ces tests expérimentaux de complexation protéine-anticorps sur un substrat Si/SiO<sub>2</sub> passivé avec de la BSA sont présentés sur la Figure 14b. Ce test est essentiellement appelé un test demi-sandwich.

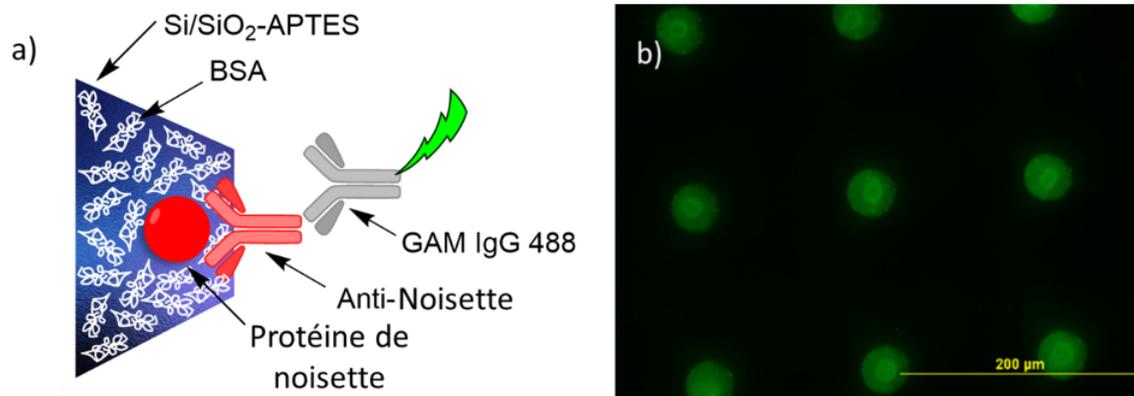


Figure 14 : a) Schématisation du système de détection en demi-sandwich utilisant l'anticorps Goat Anti-Mouse IgG 488 en tant que sonde fluorescente. b) Image optique fluorescente à une longueur d'onde de 488 nm d'une impression de protéines de noisette sur substrat de Si/SiO<sub>2</sub> après une incubation avec l'anti-noisette et ensuite avec le GAM IgG 488. L'anticorps GAM fluorescent reconnaît la chaîne lourde de l'anti-noisette, ce dernier ayant formé un complexe avec la protéine de noisette au préalable.

Comme schématisé à la Figure 14a, l'essai monoplexe de demi-sandwich s'auto-assemble sur le substrat de silice. La protéine de noisette (sphère rouge), imprimée sur les zones circulaires de 50  $\mu$ m de diamètre par  $\mu$ CP sur le substrat d'oxyde de silice silanisé

(plaquette violette), agit comme récepteur pour l'anti-noisette. La zone entourant les régions imprimées est passivée avec de la BSA représentée par les nuages blancs. La BSA agit comme agent de passivation formant une couche protectrice contre la non-sélectivité de l'anti-noisette, représenté en rouge à la Figure 14a. Elle repousse donc électrostatiquement l'anticorps des régions où le récepteur ne se trouve pas. Ensuite, l'anticorps GAM IgG 488, représenté par l'anticorps gris, reconnaît l'anti-noisette. Le résultat de cet essai est montré à la Figure 14b. Un total de neuf disques imprimés sont imagés par microscopie de fluorescence. Une couleur verte est visible sur chacun de ces disques en raison de la longueur d'onde d'émission du GAM IgG 488, soit de 520 nm. La BSA sur le substrat de silice apparaît noir aux régions entourant les régions imprimées, puisqu'aucun fluorophore est présent dans ces régions. Les disques fluorescents sont bien distingués sur le substrat analysé. Ce test de fluorescence confirme donc la sélectivité des sondes GAM IgG 488 fixées, qui se limite aux disques imprimés. Ceci sera discuté plus en détail dans l'essai sandwich monoplexe.

#### 4.1.2 Système de détection en sandwich complet

L'essai monoplexe en sandwich complet implique l'incorporation d'une couche supplémentaire dans le système auto-assemblé schématisé à la Figure 15a. Dans ce cas, la première couche imprimée sur le substrat de Si/SiO<sub>2</sub> par  $\mu$ CP est constituée d'anti-noisette, représenté par l'anticorps rouge. Cela génère un assemblage où la protéine de noisette se retrouve complexée entre les deux anticorps.

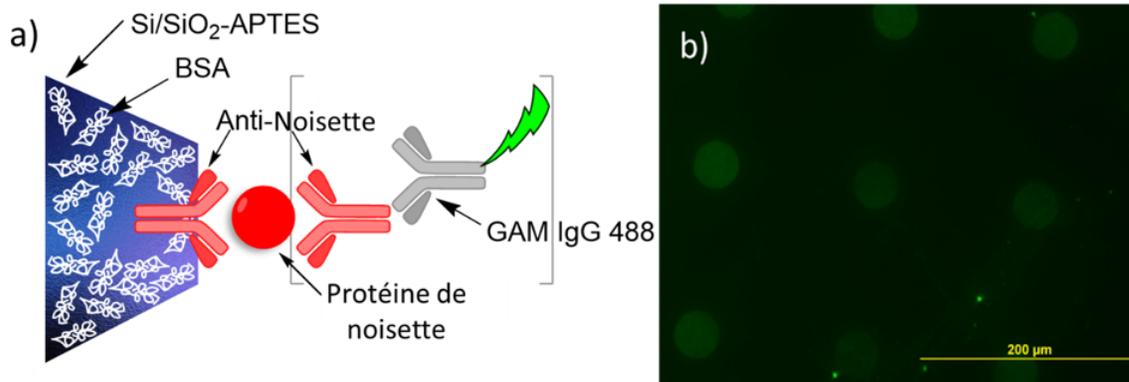


Figure 15 : a) Schéma de l'essai sandwich utilisant l'anticorps Goat Anti-Mouse IgG 488 en tant que sonde. Entre crochet est schématisé le complexe formé en incubation préalable entre l'anticorps de noisette et le GAM IgG 488. b) Image de microscopie fluorescente à 488 nm de l'essai sandwich sur substrat de Si/SiO<sub>2</sub> représenté en a).

Puisque l'anticorps GAM IgG 488 est capable de se lier à la chaîne lourde des deux anti-noisettes (anticorps rouges, Figure 15a), il est important de s'assurer que la sonde fluorescente ne détecte que la protéine de noisette. Comme représenté avec les crochets gris (Figure 15a), le GAM IgG 488 et l'anti-noisette libre en solution sont complexés préalablement à l'incubation. Cela génère une sonde biologique fluorescente en une étape (anti-noisette-GAM IgG 488) qui détecte directement la protéine, évitant alors à au GAM IgG 488 marqué de se lier à l'anti-noisette imprimé sur le substrat. Neuf disques imprimés de 50 µm de diamètre sont imagés, aussi teinté d'une couleur verte, et illustrés à la Figure 15b. Cela étant cohérent avec la sélectivité attendue pour l'assemblage des anti-noisette-GAM IgG 488 dans les régions imprimées. Cependant, une certaine adsorption non spécifique est notée, comme en témoignent les trois points lumineux brillants situés en bas au centre de l'image, en dehors des régions imprimées. Aussi, le substrat entourant les disques n'apparaît pas totalement noir, mais est plutôt teinté légèrement d'une couleur verte, reliée à la longueur d'onde d'émission du GAM IgG 488.

Concernant les essais en demi-sandwich et en sandwich complet des Figures 14 et 15, il est important de comprendre que l'anticorps GAM IgG 488 utilisé comme sonde fluorescente est un anticorps secondaire. Il se fixe avec sa chaîne légère, fragment Fab nommé anti-souris, sur la chaîne lourde, fragment Fc, de l'anti-noisette. En revanche, l'anti-noisette est un anticorps primaire cultivé biologiquement dans la rate de souris. Ainsi, la chaîne lourde (Fc) de cet anticorps comporte la caractéristique de reconnaissance de type souris. En d'autres termes, le fragment Fab anti-souris du GAM IgG 488 reconnaît le fragment Fc souris de l'anticorps primaire anti-noisette. À son tour, le fragment Fab de l'anticorps anti-noisette reconnaît les protéines de noisette. Ainsi, chaque région où se trouve un antigène de noisette sur le substrat apparaîtra lumineuse en microscopie à fluorescence. D'où l'importance de faire réagir l'anti-noisette avec le GAM IgG 488 avant l'incubation pour le monoplexe en sandwich complet (Figure 15), sinon tous les disques apparaîtront fluorescents, et ce, même si l'antigène de noix est absent.

Un autre point important à propos de ces tests est la nécessité de passiver avec la BSA la zone externe aux disques imprimés. Cette protéine est largement utilisée pour éviter l'adhésion non sélective de divers types de sondes et autres types de matériel biologique.<sup>73,74</sup> Il est également connu que lors de la passivation, la BSA n'adhère pas aux matériaux biologiques imprimés sur le substrat, soit l'antigène ou l'anticorps dans le cas présent.<sup>75</sup> En effet, le potentiel Zêta de la BSA et de l'anti-noisette en solution tampon de PBS à pH de 7,4 mesuré par DLS est d'une valeur de -13,73 mV et -10,93 mV, respectivement, voir le tableau A en annexe 1. Ces deux macromolécules ont des charges de surface négatives et se repoussent donc électrostatiquement et permet de réduire

l'adsorption non-spécifique des nanosondes sur les régions entourant les disques imprimés Ceci justifie l'utilisation de BSA comme agent de passivation.

Ayant ces points à l'esprit, nous pouvons maintenant discuter du résultat du demi-sandwich immunofluorescent de la Figure 14b. Les disques verts apparaissent clairs, brillants et bien définis. Cette couleur est reliée à la longueur d'onde d'émission de l'anticorps GAM IgG 488, soit de 520 nm. Il n'y a pas de fluorescence en dehors zones imprimées. Le résultat de l'essai en demi-sandwich rapporté à la Figure 14 permettent de confirmer la reconnaissance spécifique de l'anticorps anti-noisette vis-à-vis les antigènes de noisette à l'aide d'un système de fluorescence simplifié. Ce test de fluorescence simple a été utile, car il permet d'établir une partie des paramètres optimaux et de trouver les bonnes conditions pour l'impression et l'incubation de chaque biomolécule permettant une fixation efficace.

L'impression d'un anticorps par  $\mu$ CP peut provoquer un stress sur celui-ci et imprimer le matériel biologique dans des conformations inadéquates, ce qui peut bloquer les sites actifs tels que les fragments Fab dans le cas du système en sandwich complet.<sup>76</sup> Par conséquent, le système demi-sandwich (Figure 14a) ne permet pas d'évaluer directement la viabilité de l'anticorps imprimé pour le système sandwich final puisqu'aucune impression d'anticorps n'est performée. La Figure 15a illustre le concept de l'essai sandwich fluorescent, qui permet de valider la capacité de la protéine à se lier à l'anticorps imprimé. Cependant, l'anticorps GAM IgG 488 peut reconnaître indifféremment le fragment Fc de l'anti-noisette imprimé et l'anti-noisette de la seconde incubation. Pour empêcher le GAM IgG 488 de se lier à l'anticorps imprimé, et

uniquement à celui de la deuxième incubation, soit l'anticorps rouge à droite, Figure 15a, l'anti-noisette-GAM IgG 488 ont été complexés avant d'être incubé avec le substrat fonctionnalisé. Le GAM IgG 488 et l'anti-noisette sont mélangés selon un rapport de 2:3, où l'anti-noisette est présent en excès pour assurer la liaison du fragment Fab du GAM IgG 488 avec le fragment Fc de l'anti-noisette et aussi pour s'assurer qu'aucun GAM IgG 488 pourrait être trouvé libre en solution. L'anti-noisette, portant ainsi le marqueur fluorescent sur sa chaîne lourde, peut alors se lier sur l'antigène de noix complexé sur les anticorps imprimés. Sur la Figure 15a, le contraste n'est pas optimal et cela s'explique par la faible quantité de sondes fluorescentes utilisées pour l'incubation par rapport à celle de l'anti-noisette (Figure 14), donc moins de fluorescence est émise que celle du dosage précédent pour un temps d'incubation identique. L'intensité des trois points brillants trouvés en bas au centre de la Figure 15b est considérablement supérieure à celle notée sur les disques de 50 µm de diamètre. Cette intensité de fluorescence indiquant une forte densité d'agent fluorescent, soit du complexe d'anti-noisette-GAM IgG 488, suggère une adsorption non spécifique de petits agrégats de protéines de noisette par gravité sur la zone passivée au BSA. En effet, des agrégats dont leur taille est de l'ordre des micromètres subissent généralement la gravité et peuvent se déposer autour des disques imprimés, entraînant des signaux de non-spécificité. Malgré ces deux points luminescents non spécifiques, l'ensemble du système sandwich est validé, car un motif fluorescent clair a été obtenu sur les zones imprimés. Cependant, il est impossible de rendre compte de la non-sélectivité du système en fluorescence, puisque la sensibilité de la méthode est trop faible pour une détection à l'échelle d'un seul anticorps fluorescent sur le substrat.

## 4.2 Marquage Immunogold

Le marquage à l'Immunogold est une technique alternative à l'immunofluorescence utilisée pour la première fois en 1971.<sup>77</sup> Cette technique est appliquée à la microscopie électronique à balayage (scanning electron microscopy, SEM) ou à la microscopie électronique à transmission (transmission electron microscopy, TEM). Cette technique utilise des nanoparticules d'or colloïdal (gold nanoparticles, GNP) fonctionnalisées avec des anticorps secondaires. Ces dispositifs nanoscopiques sont utilisés pour détecter des anticorps primaires et des antigènes sur des structures pouvant être visualisées par SEM ou TEM, telles que des cellules, des neurones, des organites et diverses nanostructures de carbone. Les GNPs sont exploitées dans cette technique de marquage en raison de leur haute densité électronique, augmentant la diffusion des électrons en microscopie électronique. En raison du contraste élevé, les GNPs apparaissent sous forme de taches sombres, facilitant l'identification des régions de haute densité d'anticorps ou d'antigènes sur les structures.

Avant l'introduction des nanosondes de carbone dans le système de détection sandwich pour la détection Raman, la densité de greffage de l'anticorps anti-noisette sur les nanosondes doit être évaluée par cette technique alternative qu'est le marquage Immunogold (Figure 16).

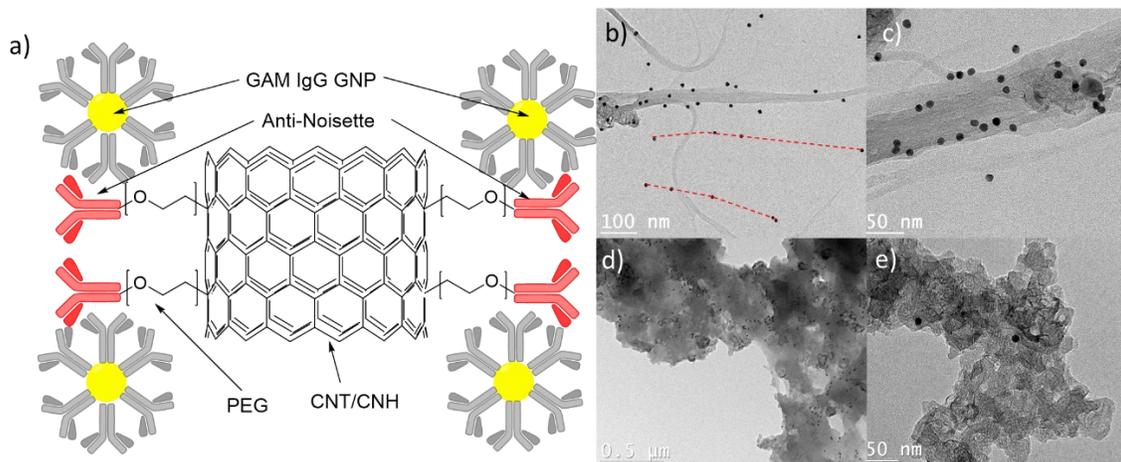


Figure 16 : a) Illustration du marquage Immunogold montrant la complexation des GAM IgG se trouvant sur les GNPs avec les fragments Fc des anti-noisettes sur les sondes carbonées (CNTs ou CNHs). b-c) Images TEM du marquage Immunogold effectuées sur les AN-PEG-CNTs and d-e) sur les AN-PEG-CNHs. Seulement les agrégats de CNTs sont visibles avec cette technique, montrée en b) et en c). Les points noirs représentent les GNPs fonctionnalisés avec les Goat-anti-mouse ciblant les anticorps de noisette trouvés sur la surface des CNTs (b-c) e des CNHs (d-e).

Comme illustré schématiquement à la Figure 16a, le marquage Immunogold utilise des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec un anticorps secondaire GAM IgG pour cibler les anticorps primaires. La Figure 16b-c montre des images de TEM de CNTs pégylés sur lesquels est fixée l'anti-noisette (AN-PEG-CNT). Ces structures sont représentées sous forme de filaments de CNT sur lesquels les particules de GNP (points noirs) sont attachées aux surfaces de CNT via la reconnaissance d'anticorps. Certaines nanoparticules d'or se trouvent dans l'arrière-plan et elles sont apparemment fixés de manière non-sélective à la surface de la grille TEM, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'attachement aux AN-PEG-CNT en raison de l'effet de gravité. Bien que la surface de la grille de TEM ait été passivée avec de la glycine, cette étape ne possède pas une efficacité absolue. Une densité beaucoup plus élevée de GNPs est observée sur les agrégats de CNHs illustrée à la Figure 16d et aucune nanoparticule n'est observée dans l'arrière-plan de l'image. Cependant, sur la Figure 16e, l'agrégat de nanocorne imagé ne contient que deux nanoparticules. La densité des

récepteurs d'anticorps présents sur les nanocornes est variable au sein de l'échantillon analysé.

Des contrôles négatifs sont effectués sur les nanocornes afin de connaître la fiabilité de la technique de marquage Immunogold. Pour se faire, des CNHs ont été fonctionnalisées seulement avec le PEG, donc aucun anticorps ne se trouvait à leur surface. Il était attendu qu'après l'analyse en TEM, aucune AN-PEG-GNPs ne devrait être visible sur les agrégats de nanocornes de carbone, mais des images à grossissement différents à la Figure 17, montrent toutefois que ce n'est pas le cas.

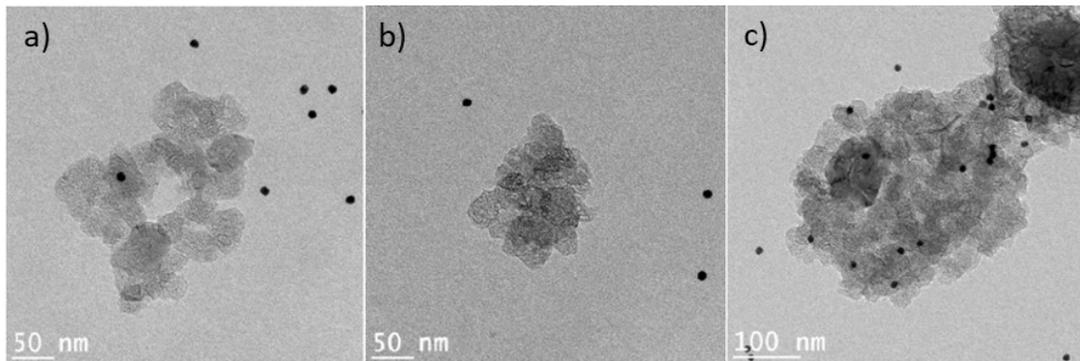


Figure 17 : Trois images TEM différentes d'agrégats de PEG-CNHs d'un marquage Immunogold d'un contrôle négatif, incubés avec des AN-PEG-GNPs.

À la Figure 17, trois images TEM montrent des agrégats de PEG-CNHs de tailles différentes ainsi que des AN-PEG-GNPs. Les agrégats de nanocornes sont visibles comme nuages foncés tandis que les petits points noirs sont associés aux AN-PEG-GNPs de 10 nm de diamètre. Les plus petits agrégats de nanocornes est présenté à la Figure 17b et à la Figure 17c est observé le plus gros agrégat. Le fond gris uniforme des images est causé par le signal de fond de la grille de nickel utilisée. Seulement les agrégats de nanocornes

imagés aux Figures 17a et 17c possèdent des AN-PEG-GNPs adsorbés de manière non spécifique à leur surface.

La complexation entre le GAM IgG et l'anti-noisette sur les nanotubes ou sur les nanocornes de carbone se déroule de la même manière que pour les systèmes sandwich fluorescents. C'est-à-dire que les fragments Fab de l'anticorps du GAM IgG sur les nanoparticules d'or reconnaissent les fragments Fc de l'anti-noisette des nanosondes de carbone, voir Figure 16a. Sur les Figures 16b et c, les images TEM ne montrent que les CNTs en agrégats, aucun CNT individuel n'est alors visible. Cela est dû au faible contraste obtenu avec l'instrument. Il est néanmoins possible que certaines GNPs soient disposées de manière linéaire et liées à des anti-noisettes attachés sur des CNTs individuels, comme le suggèrent les lignes pointillées rouges à la Figure 16b. La densité très élevée en nanoparticules d'or trouvée sur l'agrégat de CNHs présenté à la Figure 16d laisse croire qu'en effet, les nanocornes de carbones sont des candidats de choix pour être utilisées en tant que sondes sélectives pour ce projet. Une densité élevée de récepteur sur les nanosondes assure une bonne sélectivité lors de l'application en détection sandwich.

Les contrôles négatifs rapportés à la Figure 17 montrent que les GNPs peuvent s'attacher de manière non-spécifique aux agrégats de CNHs. Cependant, une densité moins élevée de nanoparticules est retrouvée sur les petits agrégats des deux images de gauches que sur l'agrégat de l'image de droite à un grossissement de 100x. L'adsorption non-spécifique des GNPs sur les nanocornes pégylés s'expliquerait par la forme de la surface des agrégats. En effet, les structures plus grosses sont constituées de plusieurs dahlias, leur surface possède donc un relief plus irrégulier que les petits agrégats. De cette

manière, les GNPs peuvent rester emprisonnées sur les surfaces irrégulières formées par les nanocornes. C'est pour cette raison qu'elles sont ainsi visibles en images TEM. Aussi, la quantité de GNPs visibles en arrière fond est plus importante que celle trouvée sur les petits agrégats. Cela laisse croire d'autant plus que l'attachement des GNPs sur ces contrôles négatifs serait plutôt aléatoire. Par contre, aucun contrôle négatif n'a été réalisé sur les échantillons de nanotubes.

Le marquage Immunogold confirme que la fonctionnalisation des CNTs et des CNHs avec des anticorps anti-noisette pégylés est réussie. Cependant, la densité de greffage au sein d'un échantillon demeure un paramètre difficile à étudier et à contrôler, car il est impossible de dénombrer les nanostructures individuelles dans les agrégats avec cette méthode. Cela nous amène donc à amorcer l'étape suivante, soit les premiers essais du système de détection en sandwich avec les sondes carbonées.

### 4.3 Monoplexe avec sondes de carbone

L'étude du système en demi sandwich et en sandwich complet avec les CNTs et les CNHs est discuté dans cette section. Il est question ici d'essais en monoplexe, donc, chaque couple d'anticorps-antigène sera étudié individuellement.

#### 4.3.1 Système de détection en demi-sandwich – Nanocornes de carbone

Tout comme les essais en immunofluorescence, les protéines antigènes sont directement imprimées sur la surface de silice et ensuite incubées avec les sondes. Cette procédure réduit les erreurs de manipulation et permet de tester plus spécifiquement le caractère sélectif des nanosondes envers les protéines. Les CNHs sont une alternative avantageuse aux CNTs. La procédure d'oxydation pour les CNTs permet de générer entre

0,1 et 1% de groupes oxydés à leur surface, ce qui est une faible densité de sites de greffage pour les anticorps pégylés.<sup>78</sup> Bien que les CNHs sont des nanostructures de carbone nouvelles, elles seront utilisées comme nanosondes par la suite du projet. Les nanocornes de carbone contiennent plus de défauts structurels à leurs surfaces, et par conséquent, nous pensons qu'elles offrent une densité de greffage plus élevée, comme illustré à la Figure 16d, ce qui devrait mener à une densité de fonctionnalisation plus élevée et donc améliorer la sélectivité du ciblage.

Dans cette section, trois essais en demi-sandwich sont présentés afin d'évaluer la faisabilité du système de détection avec divers allergènes. Ces trois essais sont réalisés selon le même protocole (voir Section 2.7). Les trois protéines utilisées proviennent d'extraits de noisette, identique à ceux utilisés préalablement, d'extraits d'amande et de noix de cachou.

*a) Protéine extraite de la noisette*

Le premier essai est le système de détection avec des CNHs en demi-sandwich de noisette. Celui-ci est schématisé sur la Figure 18a et les résultats en imageries RIMA sont présentés sur la Figure 18b et d. Les Figures 18c et e sont les images optiques des imageries RIMA. Les résultats illustrent une superposition des signaux de la bande G des CNHs (en rouge) sur l'image optique correspondante.

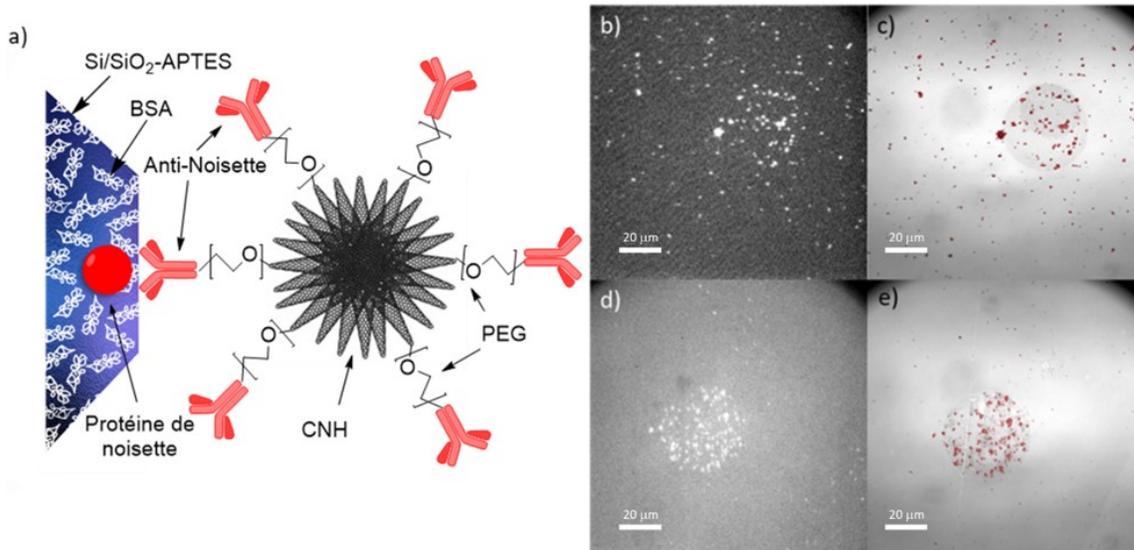


Figure 18 : a) Schéma du système de détection de noisette en demi-sandwich avec un oursin de CNH fonctionnalisé. b) et d) Images Raman à  $1590\text{ cm}^{-1}$  d'un essai en demi-sandwich avec des nanocornes de carbone fonctionnalisé avec des anticorps anti-noisette. Les disques imprimés ont un diamètre de  $50\text{ }\mu\text{m}$ . Les images en c) et e) sont des images optiques où les signaux la bande G (rouge) des CNH ont été superposés aux images b) et d).

Le schéma illustré à la Figure 18a montre un substrat d'oxyde de silice passivé à la BSA, représentée par des nuages blancs, sur lequel l'antigène de noisette (sphère rouge) est directement imprimé par  $\mu\text{CP}$ . La nanosonde AN-PEG-CN H se lie à l'antigène imprimé via la reconnaissance anticorps-antigène des anti-noisette à la surface des CNHs (anticorps rouge). En Figures 18b et 18d sont présentées deux images RIMA de régions où, sur chacune d'elles, un disque d'environ  $50\text{ }\mu\text{m}$  de diamètre d'antigène de noisette est imprimé. Le périmètre du disque imagé à la Figure 18b est difficile à délimiter à l'œil. Son image optique à la Figure 18d est fournie pour aider la différenciation des zones où l'antigène est imprimé, soit au centre légèrement à droite où un disque plus foncé est visible. Les agrégats de CNHs apparaissent comme des points blancs sur les images RIMA. Les signaux Raman de la bande G des CNHs sont superposés sur les images optiques et apparaissent comme des points rouges (Figure 18c et 18e). La distribution du signaux

Raman des CNHs est plus dense sur les régions imprimées d'antigènes, bien qu'une non-sélectivité soit observée sur les deux images RIMA, plus forte à la Figure 18b.

Les résultats obtenus à la Figure 18 montrent bien que les sondes de CNHs permettent d'obtenir une certaine sélectivité pour les régions comportant de l'antigène de noisette. Cette affirmation est mise en évidence par la faible densité de AN-PEG-CNHs autour du disque imprimé à la Figure 18d. Ce test nous a permis, dans un premier temps, de réaliser que les AN-PEG-CNHs sont facilement dispersées en plus petits agrégats dans un milieu aqueux en utilisant un traitement aux ultrasons modéré. Cette dispersion plus douce permet de mieux préserver la structure quaternaire de l'anticorps sur le PEG, car les ultrasons peuvent créer des cavités et engendrer la rupture des liaisons covalentes.<sup>79,80</sup> De plus, la portion de l'échantillon d'AN-PEG-CNH utilisé pour l'incubation a été collecté de manière à laisser les plus gros agrégats au fond du tube Eppendorf. Cette fraction utilisée, celle où l'on retrouve une proportion plus importante de sondes dispersées et stables, permet une plus grande sélectivité sur les disques de protéines de noisette. De plus, l'ensemble du processus de fonctionnalisation des CNHs a été réalisé dans l'obscurité, une précaution supplémentaire par rapport à ce qui a été réalisé avec les CNTs (voir Section 4.3.2a). Ce nouveau protocole contribue à protéger les groupements ester contre la photooxydation. Les PEGs utilisés ont un degré de polymérisation de 12. Ainsi, l'oxydation du PEG réduit significativement sa longueur. Par conséquent, si le PEG subit une dégradation avant d'être ajouté aux CNHs, la mobilité résultante de l'anticorps en bout de chaîne se voit aussi diminuée. La fonction de ciblage est directement affectée par la longueur du polymère et si celui-ci s'oxyde, la sonde perd

de son efficacité. Dans le même ordre d'idée, si la liaison ester entre la CNH et le polymère s'hydrolyse, les anticorps se détachent de la sonde et celle-ci perd son caractère sélectif. Une autre utilité que le PEG apporte est la stabilité colloïdale des nanocornes en milieu aqueux. L'oxydation du polymère compromet donc la stabilité et la dispersion des sondes.

*b) Protéine extraite de l'amande*

Afin de permettre de valider la preuve de concept sur divers allergènes, le système de détection en demi-sandwich est réalisé avec des protéines extraites de l'amande ont été imprimées. Ainsi cet essai sera nommé système de détection en demi-sandwich d'amande. Les sondes qui sont utilisées dans cet essai sont des nanocornes de carbone fonctionnalisées avec des anti-amandes pégylés, désignées par AA-PEG-CNH. Puisque la méthode n'a pas été changée, il était attendu d'obtenir des résultats comparables à ceux obtenus avec le système de noisette. La Figure 19 regroupe un schéma de l'autoassemblage du système, les tests de reproductibilité et les quatre spectres Raman de la bande G des régions encadrées.

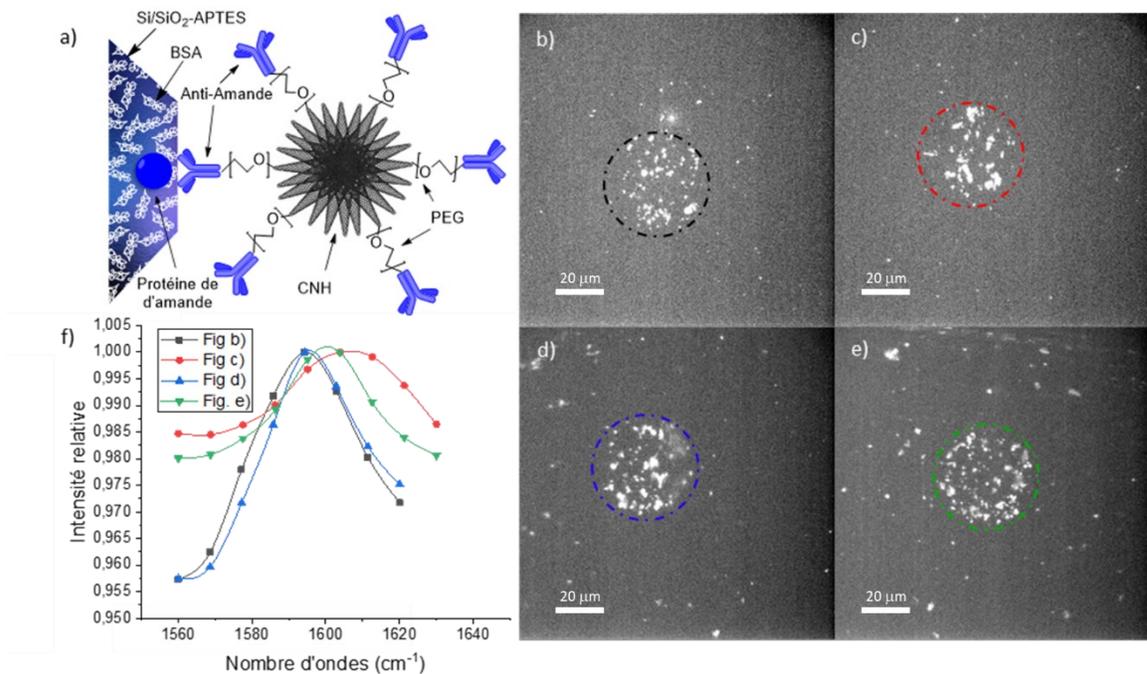


Figure 19 : a) Schéma du système de détection d'amande en demi-sandwich avec un oursin de CNH fonctionnalisé. b-e) Images Raman à 1590 cm<sup>-1</sup> d'essais en demi-sandwich avec des AA-PEG-CNHS ciblant les régions de 50 μm de diamètre d'antigène d'amande imprimées sur le substrat silice. f) Spectre Raman du signal total dans le motif imprimé de 50 μm de diamètre (cercle noir en b, rouge en c, bleu en d et vert en e) d'une acquisition entre 1560 cm<sup>-1</sup> et 1630 cm<sup>-1</sup>.

À la Figure 19a est schématisé l'autoassemblage du demi-sandwich d'amande sur un substrat d'oxyde de silice passivé à la BSA (nuage blanc) sur lequel la protéine d'amande (sphère bleue) est directement imprimée par μCP. La nanosonde AA-PEG-CNHS se lie à l'antigène imprimé via la reconnaissance anticorps-antigène des anti-amande à la surface des CNHS (anticorps bleu). Les Figures 19b-e regroupent des images RIMA de régions où, sur chacune d'elles, un disque d'environ 50 μm de diamètre d'antigène d'amande est imprimé. Le périmètre des disques imagés est ici explicitement délimité par les traits circulaires pointillés pour rendre la distinction des régions imprimés d'antigènes évidente. Une forte densité de points blancs est visible à l'intérieur des cercles délimités, relevant la présence de nanosondes sélectives. Toutefois, des signaux de CNHS sont aussi détectés à l'extérieur des disques imprimés, mettant en évidence une faible portion de

nanosonde non-sélectives. Les acquisitions des images Raman ont été effectuées entre  $1560\text{ cm}^{-1}$  et  $1630\text{ cm}^{-1}$ , les spectres de la Figure 19f ne montrent donc que la bande G à titre indicatif des CNHs observés sur les disques imprimés.

À première vue, le système de détection en demi-sandwich d'amande montre une meilleure reproductibilité que celui de noisette. La densité d'AA-PEG-CNHS observée dans les quatre disques d'antigène d'amande imprimés (Figures 19b-e) est plus constante que celle pour l'essai demi-sandwich de noisette (Figures 18b et 18d). Les spectres Raman à la Figure 19f confirment que toutes les régions d'antigène d'amande montrent le signal de la bande G des CNHs en raison d'un maximum autour de  $1590\text{ cm}^{-1}$ . La courbe en rouge, Figure 19f, montre une large bande G, et son maximum d'intensité se trouve à un nombre d'onde plus élevé que celui des trois autres, soit à  $1606\text{ cm}^{-1}$ . Cette déviation est attribuée à une graphitisation plus importante des CNHs dans cet échantillon. La non-sélectivité des nanosondes de carbone demeure tout de même problématique puisque, sur les Figures 19d et 19e, une quantité importante de nanocornes peut être dénombré à l'extérieur des disques imprimés. Les Figures 19b et 19c montrent cependant une meilleure sélectivité à la zone imprimée et la densité de sonde sur les régions entourant les disques est plus faible.

### *c) Protéine extraite de la noix de cachou*

Le système de détection en demi sandwich a aussi été évalué par rapport à un troisième allergène, soit la protéine extraite de la noix de cachou. De même que pour les deux essais précédents, les nanosondes qui sont utilisées dans celui-ci sont des nanocornes de carbone fonctionnalisées avec des anti-cachous pégylés, désignées par AC-

PEG-CNH. La Figure 20 regroupe un schéma de l'autoassemblage du système de cachou, trois images RIMA des tests de reproductibilité, une image optique du test à la Figure 20c ainsi que les trois spectres Raman de la bande G des régions imprimées.

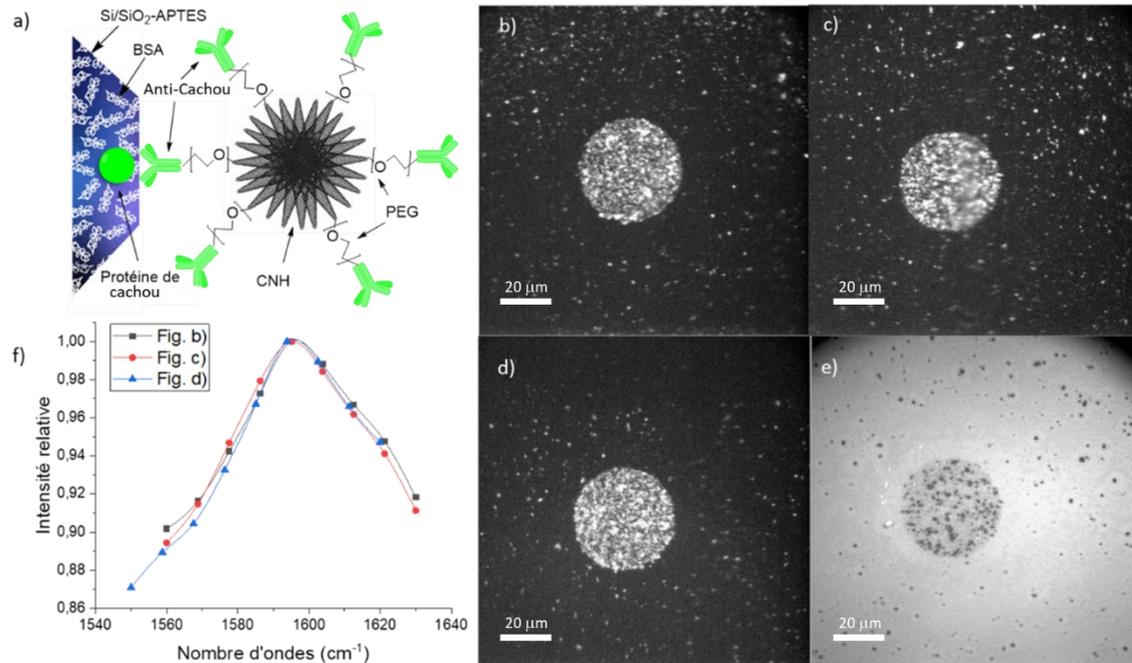


Figure 20 : Système de détection en demi-sandwich avec des protéines de cachou imprimées par  $\mu$ CP sur un substrat Si/SiO<sub>2</sub> avec les nanosondes AC-PEG-CNHs. Le motif consiste en des disques imprimés de 50  $\mu$ m de diamètre sur un substrat passivé au BSA. a) Schéma de l'assemblage demi-sandwich représenté en b-e. b-d) Imagerie RIMA des régions contenant un disque avec des nanosondes ciblant les régions protéines de cachou imprimées sur le substrat silice. e) Image optique de la région imagée en c. f) Spectre Raman du signal total dans le motif imprimé de 50  $\mu$ m de diamètre (cercle en b-d).

En Figure 20a est schématisé l'autoassemblage du demi-sandwich de cachou sur un substrat d'oxyde de silice passivé à la BSA (nuage blanc) sur lequel la protéine de cachou (sphère verte) est directement imprimée par  $\mu$ CP. La nanosonde AC-PEG-CNH se lie à l'antigène imprimé via la reconnaissance anticorps-antigène des anti-cachous à la surface des CNHs (anticorps vert). Les Figures de 20b à 20d regroupent des images RIMA de régions où, sur chacune d'elles, un disque d'environ 50  $\mu$ m de diamètre d'antigène de cachou est imprimé. La densité des nanosondes sur les disques imprimés est assez élevée

pour distinguer facilement le périmètre des régions imprimés d'antigènes. Cette distribution de CNHs fortement préférentielle aux régions imprimées relève d'une importante portion de nanosondes sélectives. Toutefois, des signaux de CNHs sont aussi détectés à l'extérieur des disques imprimés, mettant en évidence une portion non négligeable de nanosondes non-sélectives. Une image optique de la Figure 20d est présentée à la Figure 20e, où les agrégats de CNHs sont visibles en tant que points noirs. Le disque d'environ 50  $\mu\text{m}$  de diamètre au centre de l'image correspond à la région où l'antigène est imprimé. Des petites régions plus pâles à gauche du disque sont visibles et correspondent possiblement à des impuretés, tel qu'une cristallisation du HEPES lors du séchage ou possiblement de la poussière. Les acquisitions des cubes Raman ont été effectuées entre 1560  $\text{cm}^{-1}$  et 1630  $\text{cm}^{-1}$ , les spectres de la Figure 20f ne montrent donc que la bande G à titre indicatif des CNHs observés sur les disques imprimés.

Cet essai à la Figure 20 révèle une très forte densité de sonde de carbone se trouvant non seulement à l'intérieur des régions imprimées, mais aussi à l'extérieur de celles-ci. Cela relève du problème de non-sélectivité des nanosondes. Ce problème est similaire à celui adressé lors des deux essais précédents. La densité de sonde qui se trouve dans les régions imprimées est toutefois significativement plus élevée que celle des deux essais précédents. Ces résultats permettent de rendre compte de la meilleure sélectivité de la sonde que dans le cas de l'amande et de la noisette, si on considère que la densité de sonde est proportionnelle aux signaux Raman. Ainsi, une faible proportion des nanocornes de carbones dans chaque échantillon aurait un caractère très peu sélectif, et s'adsorbe de manière uniforme sur le substrat. En incubant toute une nuit, cela permet à

un maximum de nanosondes de s'attacher de manière sélective sur les disques, mais aussi de retrouver une portion dans les régions avoisinantes. Pour remédier à cela, des lavages intensifs ainsi que des temps d'incubation plus court ont été effectués pour les essais suivants.

Les résultats obtenus pour la détection en demi-sandwich permettent de confirmer une bonne reproductibilité du système.

#### 4.3.2 Système de détection en sandwich complet

Cette section abordera les essais du système sandwich en utilisant les AN-PEG-CNTs et AN-PEG-CNHs comme sondes. Les étapes pour l'autoassemblage du monoplexe sandwich complet sont semblables à celles décrites pour les essais en immunofluorescence (voir Section 4.1.2). La dernière étape consiste ici à incuber les substrats de silice avec les nanosondes AN-PEG-CNTs ou AN-PEG-CNHs pour une détection en imagerie Raman (RIMA). Pour ces tests, aucun colorant n'est encapsulé dans les nanotubes et le signal de la sonde a été suivi avec la bande Raman se situant à  $1590\text{ cm}^{-1}$ , ce qui correspond au mode vibrationnel Raman de la bande G des nanotubes.<sup>81</sup>

##### *a) AN-PEG-CNTs en tant que nanosonde*

La Figure 21 montre le premier résultat prometteur de cet essai en sandwich complet, schématisé à la Figure 21a, avec un total de quatre régions imprimées d'environ  $50\text{ }\mu\text{m}$  de diamètre. Cet essai est fait avec des nanosondes de nanotubes de carbone pour évaluer la faisabilité du système avec une nanostructure plus rependue et connue à des fins de comparaisons pour un système de détection.

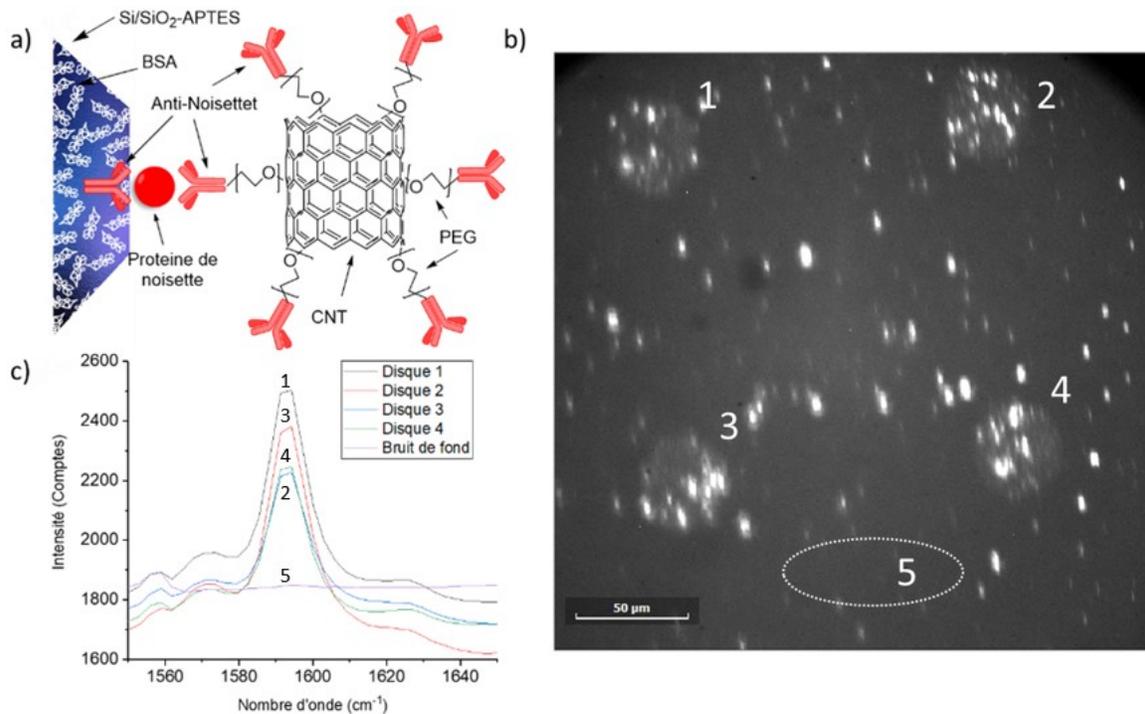


Figure 21 : Système de détection en sandwich avec des anticorps anti-noisette imprimés par  $\mu$ CP sur un substrat Si/SiO<sub>2</sub> utilisant les nanosondes AN-PEG-CNTs. Le motif est constitué de quatre disques imprimés de 50  $\mu$ m de diamètre sur un substrat passivé au BSA. a) Schéma de l'assemblage sandwich. b) Imagerie RIMA d'une région contenant quatre disques avec des nanosondes ciblant les régions de protéines s'étant liées aux anticorps imprimés sur le substrat silice. c) Spectre Raman du signal total dans le motif imprimé de 50  $\mu$ m de diamètre, numérotés en b, et spectre Raman d'une région choisie en dehors des motifs imprimés sans points brillants représentant le bruit de fond (cercle numéro 5 en b).

La longueur d'onde du laser utilisé pour imager ce test est de 532 nm. Les points blancs, situés de part et d'autre de l'image RIMA à la Figure 21b, correspondent aux signaux venant de la bande G des CNTs. Cette diffusion Raman de la bande G est illustrée par le graphique à la Figure 21c, associée à chacune des régions de l'image RIMA. Les disques d'anticorps imprimés sont numérotés d'un à quatre, ils sont localisés aux quatre coins de l'image. Le signal de fond, correspondant au substrat d'oxyde de silice passivé à la BSA, est observé comme étant noir sur l'image RIMA, étant inactif en Raman, permettant d'obtenir un fort contraste avec les nanosondes. Une région correspondant à ce signal de fond est délimitée par la section numérotée 5 et est tracée sur le graphique à la Figure 21c.

Les spectres de la Figure 21c confirment que les régions lumineuses diffusent le signal Raman des CNTs, avec un pic d'intensité à  $1590\text{ cm}^{-1}$ , alors qu'aucun signal n'est détecté dans les régions sombres, où le bruit de fond ne montre aucun signal particulier. Les signaux Raman de la bande G des CNTs génèrent des pics plus étroits que ceux des CNHs. Cela est dû à la structure plus ordonnée des nanotubes. D'un autre côté, une forte non-spécificité est notée par la présence de larges points lumineux situés à l'extérieur des disques imprimés (Figure 21b). Les agrégats non-spécifiques sont aussi visiblement plus larges que ceux présents sur les disques imprimés. Aussi, le périmètre des disques imprimés est facilement visible puisque ceux-ci sont globalement plus pâles que les régions environnantes. En raison d'un focus non optimal, les CNTs individuels ne sont pas précisément distinguables. La pâleur globale des régions imprimées laisse croire qu'il s'agit d'un nuage de CNTs individuels attachés sélectivement au substrat. Malgré des agrégats non-sélectifs de CNTs de part et d'autre de l'échantillon, une certaine sélectivité des nanosondes est clairement visible pour ce test.

Étant donné le traitement d'image, la distribution des nanosondes AN-PEG-CNTs à la Figure 21b permet de relever l'agrégation et l'interaction non-sélective des nanosondes avec le substrat dans les régions en dehors des disques d'impression de protéines. Certains agrégats de nanosondes sont donc adsorbés de manière non-spécifique, et sans complexation anticorps-antigène. Néanmoins, chaque disque imprimé présente une densité plus élevée de régions où les AN-PEG-CNTs sont détectables, ce qui démontre un ciblage d'un grand nombre de nanosondes, quoique souvent agrégées, vers les protéines de noisette attachées aux anticorps imprimés. Le test présenté à la Figure

21 montre un signal fort pour une concentration en protéines de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Ce résultat relève encore la haute sensibilité de la technique par rapport à un test ELISA classique, qui possède une limite de quantification de 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La sensibilité élevée est due au signal Raman intense des CNTs à  $1593\text{ cm}^{-1}$ . Malgré les problèmes notés de non-sélectivité pour l'essai en sandwich, cette démonstration montre une préférence de ciblage pour les régions riches en protéines. Il s'agit d'une preuve de concept importante puisqu'une fois fonctionnalisées avec les anticorps pégylés, les sondes montrent une tendance préférentielle à se complexer avec les protéines de noisette dans ce système.

Pour obtenir une plus grande sélectivité, de nombreux essais de reproductibilité ont été effectués par la suite, sans succès. La liaison ester entre le PEG et la CNH est une liaison labile et elle est sensible aux bases. Une réaction de saponification pourrait se produire lorsque les échantillons sont entreposés, considérant que le pH de la solution tampon est de 7.4, entraînant l'élimination du PEG de la surface des CNHs.<sup>82</sup> A partir de ce moment, nous avons décidé de nous tourner vers un nouveau type de matériau carboné; les nanocornes de carbone, un nouveau nanomatériau de carbone qui offre des particularités plus intéressantes pour ce type de ciblage.

#### *b) AN-PEG-CNHs en tant que nanosonde*

L'essai en sandwich, schématisé sur la Figure 22a, a permis d'obtenir des images RIMA présentées aux Figures 22b-d. L'essai a été réalisé à trois reprises et considéré comme étant tout de même reproductible en tenant en compte une légère variation standard. Plus d'essais serait à performer pour obtenir une étendue de données suffisante.

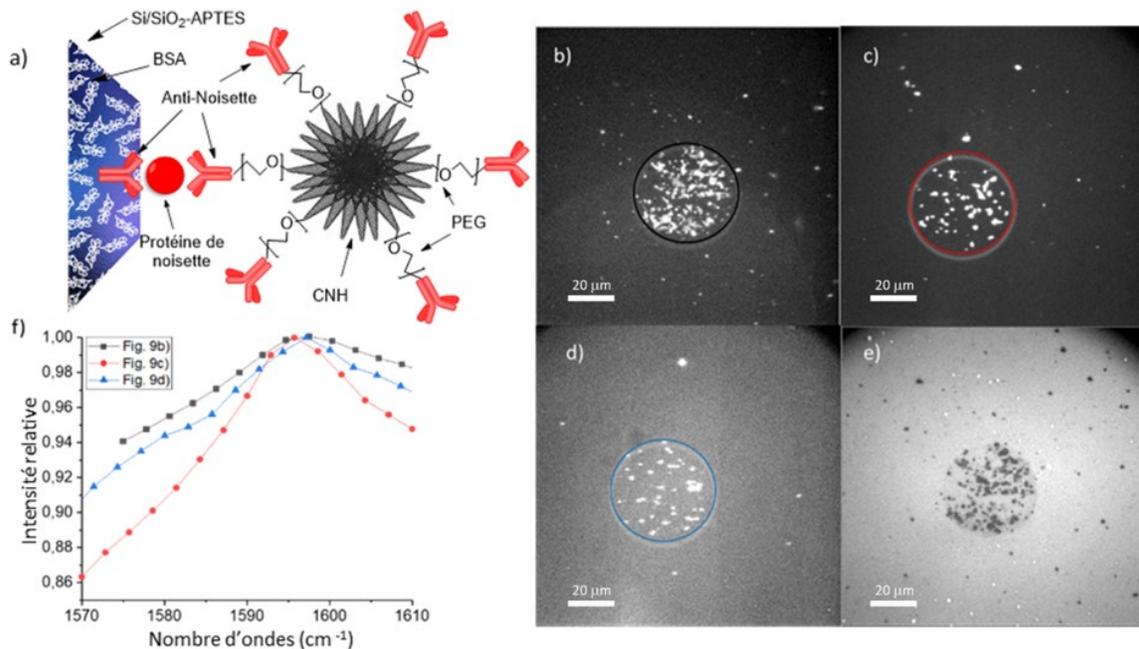


Figure 22 : a) Schéma de l'assemblage sandwich. b) c) et d) : Images Raman d'un essai sandwich avec des nanocornes de carbone pégyliées et fonctionnalisées avec des anticorps anti-noisette. Les motifs en pointillés imprimés ont un diamètre de 50  $\mu\text{m}$  et le substrat Si/SiO<sub>2</sub> est passivé au BSA. e) est l'image optique de b. f) Spectres Raman des signaux de CNH dans le motif imprimé de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre (cercles noir, rouge et bleu en b, c et d, respectivement).

L'autoassemblage du demi-sandwich de noisette sur un substrat d'oxyde de silice passivé à la BSA (nuage blanc) est schématisé à la Figure 22a. L'anti-noisette (anticorps rouge) est directement imprimée par  $\mu\text{CP}$ . L'antigène de noisette (sphère rouge) vient s'attacher selon une reconnaissance anticorps-antigène sur l'anti-noisette imprimée. La nanosonde AA-PEG-CNH se lie à l'antigène imprimé via une seconde reconnaissance anticorps-antigène du couple de noisette à la surface des CNHs (anticorps rouge). Les points blancs, situés de part et d'autre des images RIMA (Figure 22b-d), correspondent aux signaux venant de la bande G des CNHs. Les régions où l'anticorps de noisette est imprimé est délimité par un périmètre circulaire permettant de distinguer les différentes régions sur le substrat. À l'extérieur des périmètres est la région passivée au BSA. Une densité élevée en CNHs est observée par les nombreux points blancs dans ces régions imprimées. Le spectre Raman autour de la bande G des CNHs est tracé au graphique à la

Figure 22f entre  $1570\text{ cm}^{-1}$  et  $1610\text{ cm}^{-1}$ , correspondant à la plage de nombres d'onde utilisée pour l'acquisition des cubes Raman. Un code de couleur permet de relier chaque spectre à son image RIMA correspondante. La passivation du substrat avec la BSA est observée comme étant noir sur l'image RIMA puisque ce matériel biologique n'est pas actif en Raman, menant au fort contraste avec les CNHs.

Bien que peu d'attachements non-spécifiques est noté en dehors des disques imprimés, les images Raman montrent que les nanosondes sont sélectivement attachées aux régions de protéines de noisette sur la surface. La densité des sondes sur les régions circulaires (Figure 22c-d) est inférieure à celle observée sur l'assemblage demi-sandwich (Figure 18d). La différence peut être due à une densité plus faible de protéines de noisette sur la région imprimées. Pour l'assemblage demi-sandwich, les allergènes ont été directement imprimés sur le substrat Si/SiO<sub>2</sub>, ce qui permet une couverture totale. Avec l'assemblage sandwich, c'est l'anticorps anti-noisette qui est imprimé sur le substrat, puis la protéine diluée est incubée avec le substrat. Le recouvrement en protéines de noisette sur les régions imprimées devrait être inférieure à celle du demi-sandwich. Cela expliquerait pourquoi il semble y avoir moins de nanosondes A.H.-PEG-CNH qui adhèrent à la surface. L'agrégation des sondes peut également influencer la sélectivité. Après la fonctionnalisation de la CNH par l'anticorps pégylé, la dispersion des sondes dans la solution tampon donne un premier indice sur l'efficacité de la fonctionnalisation. Par exemple, les nanosondes utilisées pour l'incubation de la Figure 22b étaient vraiment bien dispersées et quasiment aucun agrégat n'a été retrouvé au fond de l'Eppendorf, même 24h après la fonctionnalisation. En revanche, les sondes utilisées pour l'incubation sur les

Figures 22c-d étaient instables et demandaient 5 secondes de sonication avant l'utilisation. Par conséquent, les gros agrégats observés dans les régions environnantes et la plus faible densité de signal sur les régions imprimées de la Figure 22b-c sont probablement reliés aux solutions des nanosondes de plus faibles stabilités. Une étude plus approfondie sera nécessaire pour mieux comprendre l'effet de la dispersion des nanocornes.

Le protocole établi est néanmoins considéré comme robuste et fiable compte tenu du succès des tests de reproductibilité.

#### 4.3.3 Étude quantitative des nanosondes d'AN-PEG-CNHs

Cette section est consacrée à l'étude quantitative de la détection des nanosondes. Il sera question d'étudier l'intensité du signal Raman obtenu sur les disques imprimés selon différentes concentrations d'allergènes afin d'évaluer le potentiel de quantification de la méthode employée. Des tests ont été faits par incubation avec une solution de concentration initiale de protéines de noisette à 1,5  $\mu\text{g/mL}$ , en diluant jusqu'à des concentrations aussi basses que 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , ce qui vise à déterminer la courbe d'étalonnage et la limite de détection des dosages monoplexe. En seconde partie, une étude sur la constance de l'intensité du signal Raman lors du dosage d'antigène à une concentration spécifique est présentée.

##### *a) Dosage de l'antigène de noisette avec la nanosonde d'AN-PEG-CNH.*

La première chose à considérer au sujet des mesures quantitatives est de définir les paramètres d'imagerie pour obtenir des images reproductibles. Une courbe

d'étalonnage peut ensuite être établie. Différentes approches d'analyse d'images Raman peuvent être utilisées pour révéler les facteurs influençant l'intensité des signaux.

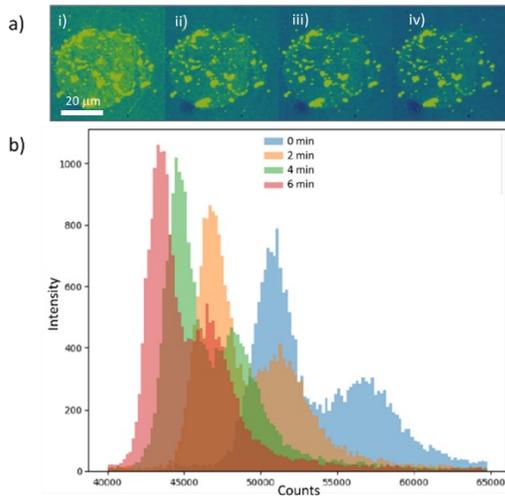


Figure 23 : a) Image Raman à large bande avec un filtre sur la bande G. Chaque image a été prise à un intervalle d'attente de deux minutes (i : 0 min., ii : 2 min., iii : 4 min., iv : 6 min.). b) Histogramme d'intensité lors de l'augmentation du temps d'irradiation laser.

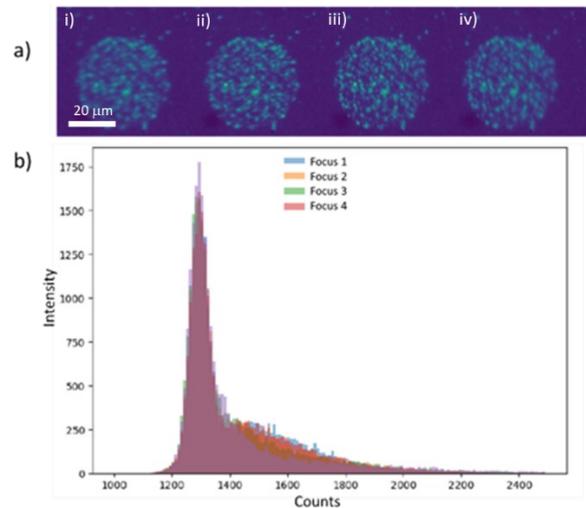


Figure 24 : a) Acquisition Raman utilisant différents points focaux pour le même disque, de 1 à 4 défocalisé à focalisé. b) Variation de la distribution d'intensité pour différents foyers, de 1 à 5 : défocalisé à focalisé

Tout d'abord, il est important de considérer le paramètre de temps lors de l'acquisition de l'image Raman. À la Figure 23a sont présentés quatre images RIMA d'une région imprimée d'environ 50 mm de diamètre comportant des AN-PEG-CNHS exposées au laser de 532 nm à des intervalles de deux minutes, où les Figures 23a(i à iv) correspondent aux expositions de 0, 2, 4 et 6 minutes, respectivement. Les régions en jaune correspondent aux signaux des CNHS, et en vert, le signal de fond du substrat d'oxyde de silice passivé. La Figure 23b présente la variation des histogrammes des intensités pour les différents temps, où chaque couleur est reliée à un temps d'exposition donné.

Le test présenté à la Figure 23 montre que la diffusion Raman des nanocornes de carbone doit être stabilisée après un minimum de 30 min d'irradiation, ce qui permet de réduire la luminescence. Sinon, il y aurait une fluctuation de l'histogramme d'intensité due au blanchiment de l'échantillon, voir la Figure 23b. Ce phénomène se caractérise par une intensité lumineuse élevée au début de l'exposition laser, et suite au blanchiment de l'échantillon, l'image finale possède une intensité lumineuse inférieure et stable dans le temps.

Il y a aussi le problème de focalisation sur l'échantillon qui affecte l'intensité du signal Raman reçu. Ce phénomène est présenté à la Figure 24. La Figure 24a montre quatre images RIMA d'une région imprimée d'environ 50  $\mu\text{m}$  de diamètre comportant des AN-PEG-CNHs exposées au laser de 532 nm à des mises au point focales différentes, où le point focal 1 étant le moins bon et le point focal 4 étant optimal. Les régions en vert indiquent la présence de CNHs et les régions en bleu correspondent au signal de fond du substrat d'oxyde de silice passivé.

Le phénomène de focalisation amène une variation au niveau de la distribution d'intensité, car la proportion de pixels dont la valeur est proche du seuil ne sera plus considérée dans le calcul de la proportion de nanocornes de carbone., la perte de focalisation génère un biais sur l'intensité moyenne de l'échantillon affectant le critère de calibration, car les essais montrent que le signal moyen peut chuter de 20% (voir Figure 24a(i à iv)).

Maintenant que les paramètres optiques sont déterminés, une droite d'étalonnage peut être mesurée. Pour cela, des échantillons ayant été incubés avec différentes concentrations de protéine de noisette ont été étudiés, les résultats sont présentés à la Figure 25a.

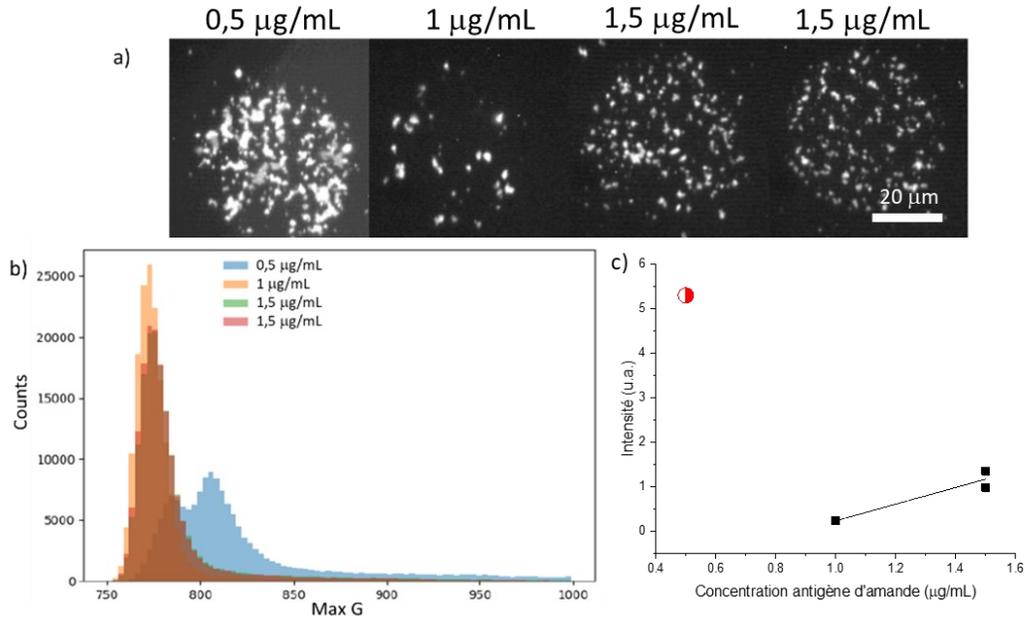


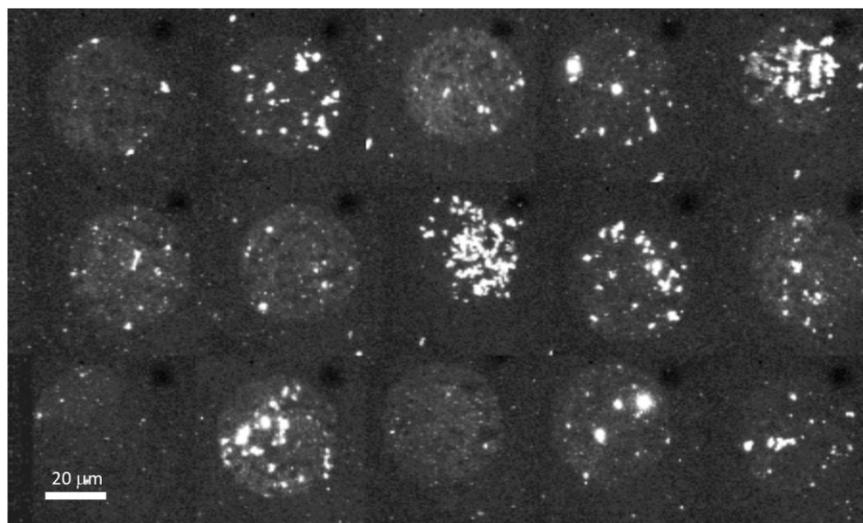
Figure 25 a) Série d'images Raman (100x) d'essais en sandwich avec des nanocornes de carbone pégyliées fonctionnalisées avec des anticorps anti-noisette pour 3 concentrations différentes d'incubation de protéines de noisette, de gauche à droite : 0,5, 1, 1,5, 1,5 µg/mL. b) Histogramme de l'intensité de la bande G pour chaque image en a. c) Courbe d'étalonnage basée sur l'intensité de l'histogramme de la bande G en b. Le point en rouge représente l'intensité du signal Raman à 0,5 µg/mL et est considéré comme aberrant et est retiré du calcul de la courbe d'étalonnage. ( $I = (1,87 \pm 0,64)[C] - 1,64 \pm 0,87$ ) ( $R^2 = 0,8949$ )

La Figure 25a présente quatre images RIMA de sandwichs monoplexes avec les nanosondes d'AN-PEG-CNHS réalisés à trois concentrations d'antigènes de noisette différentes. L'échantillon de 0,5 µg/mL, à gauche de la Figure 25a, présente l'intensité de pixel la plus élevée en raison d'une forte densité de CNHS imagée. Pourtant, on s'attendait à l'inverse. L'échantillon à 1 µg/mL possède la densité en CNHS la plus faible, tandis que les deux à 1,5 µg/mL montrent une densité de nanosondes relativement semblables. À la

Figure 25b est présenté l'histogramme de l'intensité de la bande G pour chaque image RIMA. Seulement l'histogramme pour la première concentration montre une allure inhabituelle. Une source lumineuse différente des autres échantillons, probablement de la luminescence, est suspectée en raison du deuxième maximum observé, ce qui expliquerait pourquoi l'échantillon à 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  possède une intensité lumineuse aussi forte, et donc, incohérente avec les résultats. Le point à 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  est alors rejeté pour tracer la courbe d'étalonnage, celle-ci est illustrée à la Figure 25c. Aucune conclusion de corrélation ne peut être portée avec la courbe d'étalonnage présentée, puisqu'elle est basée sur seulement trois données. Le coefficient de corrélation est d'autant inférieur à 0,9, ce qui indique que la relation linéaire est faible pour ce test.

*b) Étude de la linéarité de la réponse des AN-PEG-CNH*

Un second paramètre important des mesures quantitatives est l'uniformité de la densité de la nanosonde dans les régions imprimées. Pour se faire, un total de 15 échantillons ont été assemblés en sandwich avec des nanosondes AN-PEG-CNHS. Les substrats ont été incubés avec une solution de protéines de noisette à 1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La Figure 26 regroupe les images RIMA de ces échantillons.



*Figure 26 : Images Raman du test sandwich avec nanosondes d'AN-PEG-CNHs incubées avec 1,5 µg/mL de protéine avec filtre pour la bande G des CNHs à 1590 cm<sup>-1</sup>. Au total, 15 disques sont imagés dans une région de l'échantillon présentant la meilleure sélectivité.*

L'assemblage de ce test correspond à celui du sandwich complet schématisé à la Figure 22a, voir la Section 4.3.2a, utilisant des nanocornes de carbone comme nanosondes. La plupart des disques imprimés sont facilement visibles, due à un léger contraste les rendant plus pâles que les régions avoisinantes passivées à la BSA. Certains disques comportent une forte densité de CNHs, en raison d'une haute densité de points lumineux blancs, tandis qu'il est difficile de détecter un signal de CNHs sur d'autres régions imprimées. Parmi tous les échantillons analysés, une variation de la densité de CNHs est observée sur l'ensemble des régions imagées pour une même concentration de noisettes lors de l'incubation, montré à la Figure 26. Cette non-uniformité du test complique l'interprétation des échantillons et rend le processus de quantification impossible.

À la lumière de ces résultats, nous ne pouvons pas conclure que la composante quantitative du système est suffisamment développée, car la courbe d'étalonnage

obtenue possédait une faible corrélation linéaire et que la réponse des nanosondes était variable pour une concentration donnée. Les efforts du projet seront ainsi concentrés sur l'aspect qualitatif du système.

#### 4.4 Étude de la réactivité croisée par immunofluorescence

Cette section est consacrée à l'étude de la réactivité croisée entre les trois types d'allergènes et les trois anticorps de noix utilisés dans le projet. Le couple antigène-anticorps de noisette ne sera pas reproduit dans cette section. La Section 4.1 couvre l'étude de celui-ci. La réactivité croisée, ou encore appelée immunité croisée en immunologie, est un phénomène qui survient lorsqu'un anticorps spécifique à un antigène est également efficace pour reconnaître un autre antigène qui lui est voisin. Dans certains cas, la réactivité croisée d'un anticorps est souhaitée pour obtenir un système qui reconnaît un vaste ensemble de pathogènes semblable. C'est sur ce principe que le vaccin contre la grippe s'appuie. Toutefois, pour d'autres systèmes, tel que celui à l'étude, la réactivité croisée est un problème pour ce qui est de la spécificité des sondes. Il est question ici d'évaluer si le système permet, par exemple, la reconnaissance exclusivement entre les anticorps d'amande et les antigènes d'amande, et de même que pour les deux autres couples de cachou et de noisette à l'étude. Pour cela, chacune des combinaisons seront évaluées en immunofluorescence entre les couples anticorps-antigènes, correspondants et non-correspondants, et ce, en demi-sandwich et en sandwich complets.

Les antigènes utilisés dans ce projet sont des extraits de protéines provenant de la noix pure, fournis par Jérémie Theolier de l'Université Laval à la Faculté des sciences de

l'agriculture et de l'alimentation. Aucune analyse protéomique ni séparation spécifique n'a été réalisée sur les extraits. Le tableau suivant regroupe les différentes protéines allergènes connues chez les trois types noix utilisés dans ce projet.

Tableau 1: Ensemble d'allergènes communément retrouvés dans les extraits de noisette, d'amande et de cachou.

CLASSE	MAGNOLIOPSIDE		
SOUS-CLASSE	Hamamelididae	Rosidae	
ORDRE	Fagale	Rosale	Spindale
NOIX	<b>Noisette</b> <sup>83</sup>	<b>Amande</b> <sup>84,85,86</sup>	<b>Cachou</b> <sup>87,88</sup>
<b>PROTÉINE ALLERGÈNE</b>	11S Globuline	11S Globuline	11S Globuline
	2S Albumine	2S Albumine	2S Albumine
	Profiline	Profiline	
	Oléosine	Oléosine	
	Protéine de transfert lipidique non spécifique	Protéine de transfert lipidique non spécifique	

Il est attendu que les extraits de noix soient composés d'un ensemble de protéines allergènes communes, majoritairement l'albumine 2S et la globuline 11S. Il s'agit de protéines globulaires constituées majoritairement de feuillets  $\beta$  et comportant un nombre de sous-unités propres. La présence de protéines semblables expliquent la réactivité croisée du système en demi-sandwich immunofluorescent.

#### 4.4.1 Étude de la réactivité croisée : Demi-sandwichs en immunofluorescence

Ayant confirmé précédemment la sélectivité des sondes avec le couple noisette, le système de détection immunofluorescent en demi-sandwich permet d'évaluer le caractère spécifique de l'anticorps sur la sonde via une incubation avec un substrat de silice fonctionnalisé avec les trois antigènes en  $\mu$ CP. La spécificité des trois antigènes est évaluée en les incubant, sur substrat d'oxyde de silice, avec les trois anticorps.

Chacune des incubations est analysée en microscopie de fluorescence, voir l'annexe 1 pour les images optiques de fluorescence (Figure B à D) et une description détaillée de la procédure. L'intensité de fluorescence le long d'une rangée de 14 disques imprimés d'antigène est tracée de la Figure 27.

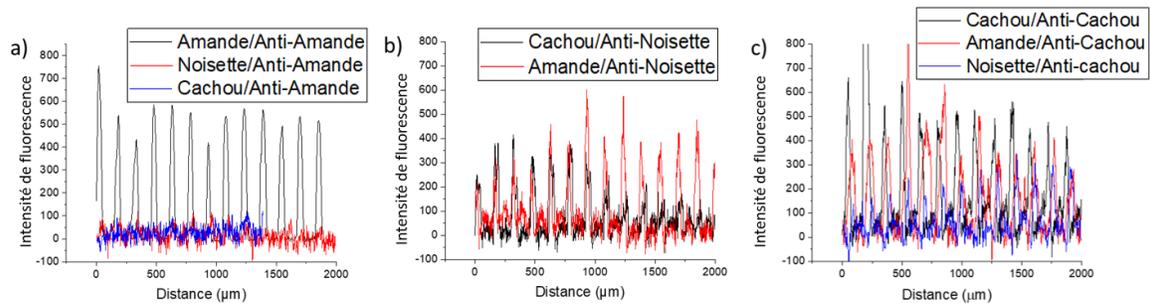


Figure 27 : Graphiques en de l'intensité de fluorescence le long d'une tranche horizontale de 14 disques imprimés par  $\mu$ CP sur  $\text{Si}/\text{SiO}_2$  pour une détection monoplexe demi-sandwich. Incubation en a) avec des anticorps d'amande, b) avec des anticorps de noisette et c) avec des anticorps de cachou, tous incubés avec des anticorps d'amande. La ligne de base étant soustraite de chacune des courbes

Chaque graphique de la Figure 27 permettent de superpose trois courbes d'intensités. Les courbes sont regroupés selon la nature de l'anticorps présent dans l'incubation subit, de manière à comparer, à chaque graphique, l'interaction des trois antigènes envers un seul anticorps. Ainsi, la Figure 27a montre des résultats qui peuvent être comparés avec les résultats obtenus pour l'étude de réactivité croisée des trois antigènes envers l'anticorps d'amande, envers l'anticorps de noisette à la Figure 27b et envers l'anticorps de cachou à la Figure 27c. Dans le cas présent, une reconnaissance immunologique sur un disque imprimé génère un signal de fluorescence et se traduit par un maximum d'intensité sur le graphique. À la Figure 27a, la courbe en noir montre 13 maximums d'intensité, soit pour le couple d'antigène de cachou et d'anti-amande. Les courbes bleue et rouge ne montrent aucun pic d'intensité marquée le long d'une rangée

de disques, mais beaucoup de bruit de fond. Pour ce qui est du graphique à la Figure 27b, les deux courbes montrent une intensité de fluorescence se distinguant du bruit de fond pour chacun des disques imprimés sur le substrat. Les maximums d'intensités pour le couple d'antigène d'amande et d'anti-noisette sont moins intenses. Le graphique de la Figure 27c montre aussi des maximums d'intensité sur toute la région mesurée. Cependant, les pics de la courbe bleue, correspondant au couple d'antigène de noix et d'anti-cachou, sont plus faibles que ceux des deux autres courbes tracées.

Les résultats de l'incubation en demi-sandwich présentés à la Figure 27a permet de conclure qu'aucune réactivité croisée n'est observée avec l'anticorps d'amande envers les deux autres antigènes, puisqu'aucune fluorescence n'est mesurée pour les couples non-correspondants, soit l'antigène de noix et de cachou envers l'anti-amande. Par contre, aux Figures 27b et 27c, il est remarqué que l'anticorps de noix ainsi que l'anticorps de cachou montrent une affinité de reconnaissance variable envers leurs antigènes non-correspondants, en raison d'une intensité de fluorescence significativement plus importante que le bruit mesuré sur les régions imprimées.

À lumière de ces résultats, l'objectif de réaliser une détection triplex semble compromis. Il est donc nécessaire de se tourner du côté des anticorps pour mieux comprendre et optimiser le système de détection en sandwich. Les anticorps ont été obtenus par immunisation génétique chez des souris. Le processus consiste à obtenir dans un premier temps des anticorps polyclonaux suite à une injection d'isolat de protéines chez les souris. Ensuite les souris avec les meilleurs titres sont sélectionnées pour produire des anticorps monoclonaux. Ces anticorps utilisés dans cette étude sont fournis

par R-Biopharm®, et ils sont connus pour être produits par culture cellulaire en récupérant la rate des souris. Cela permet ainsi d'obtenir des anticorps ciblant les échantillons d'antigènes extraits des noix.

L'hypothèse posée pour surpasser la réactivité croisée va comme suit : dans une première étape, la fonctionnalisation des substrats avec les trois anticorps primaires permettrait de sélectionner spécifiquement, durant l'incubation, des antigènes qui correspondent le mieux aux sites de liaison des anticorps. Ainsi, dans la seconde étape d'incubation, les couples non-correspondant ne devraient pas montrer de réactivité, puisque seulement les protéines de plus haute affinité envers leurs anticorps auront été sélectionnées. Il est donc attendu que le système de détection en sandwich complet immunofluorescent permette de résoudre le problème de réactivité croisée.

#### 4.4.2 Étude de la réactivité croisée : Sandwichs complets en immunofluorescence

Le système est assemblé de manière à évaluer la réponse immunologique des couples d'anticorps-antigène non-correspondants en immunofluorescence, voir l'annexe 1 pour les images optiques de fluorescence. Les graphiques à la Figure 28, illustrant l'intensité du signal de fluorescence le long d'une rangée de huit disques, permettent ainsi de montrer les résultats obtenus pour les trois types d'incubations, menant aux sandwichs complets.

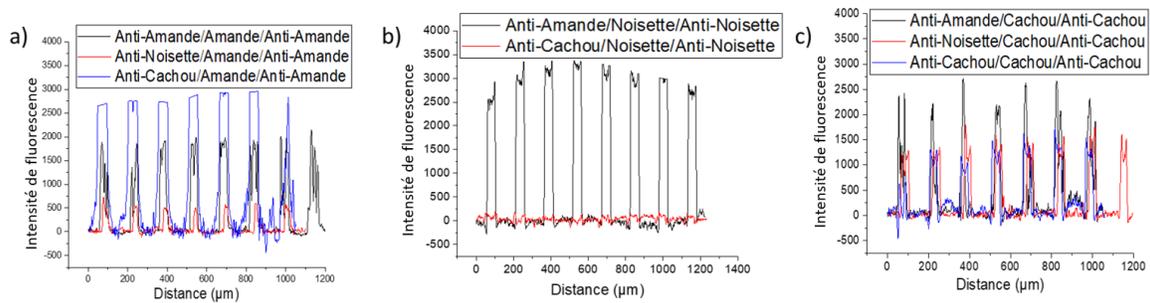


Figure 28 : Graphiques en de l'intensité de fluorescence le long d'une tranche horizontale de 14 disques imprimés par  $\mu$ CP sur  $\text{Si/SiO}_2$  pour une détection monoplexe sandwich. Incubation en a) avec des anticorps d'amande, b) avec des anticorps de noisette et c) avec des anticorps de cachou, tous incubés avec des anticorps d'amande. La ligne de base étant soustraite de chacune des courbes

Chaque graphique de la Figure 28 superpose trois courbes d'intensités, aussi regroupés selon la nature de l'antigène et l'anticorps présent dans les incubations effectuées. À la Figure 28a, 28b et 28c, les résultats obtenus pour l'étude de réactivité croisée des trois anticorps envers l'antigène et l'anticorps d'amande de noisette et de cachou sont comparés, respectivement. Pour ce qui est du graphique à la Figure 28a, la courbe en bleu représentant le couple sandwich d'anti-cachou et d'amande montre une saturation du signal de fluorescence sur les disques imprimés. Les maximums d'intensités, pour la courbe en rouge associée au couple sandwich d'anti-noisette et d'amande, sont les moins intenses, en raison d'une faible réponse en fluorescence. Le graphique de la Figure 28b montre que de la fluorescence est détectée seulement pour le couple sandwich d'anti-amande et de noisette, courbe noire. Pour ce qui est du graphique à la Figure 28c, les intensités de fluorescence de la courbe bleue et la courbe rouge sont sensiblement les mêmes, tandis que celles de la courbe noire sont plus élevées.

Les incubations présentées ci-haut montrent que seulement deux couples montrent des affinités, soit le sandwich d'anti-noisette envers l'antigène d'amande et celui d'anti-cachou envers l'antigène de noisette, Figures 27b et 28b, respectivement.

Cela permet de conclure qu'avec le matériel biologique fournis, il est impossible de réaliser un système de détection en triplex ou encore même en duplexe puisque l'anticorps d'amande reconnaît les trois antigènes. Et bien que l'anticorps de cachou ne reconnaisse pas l'antigène de noisette, un système de détection duplex entre le cachou et la noisette ne serait pas concluant puisque l'anticorps de noisette présente une affinité avec l'antigène de cachou (Figure 28c, courbe rouge).

Ainsi, l'étude de réactivité croisée permet de montrer que l'objectif de développer un système de détection triplex ne sera pas possible avec le matériel biologique présenté. Pour cette raison, la suite du projet a été dirigée vers l'amélioration du système de détection en sandwich complet monoplexe avec des nanocornes de carbone à l'intérieur desquels divers colorants ont été encapsulés.

#### 4.5 Monoplexe avec colorants encapsulés dans les sondes de carbone

Cette section présentera les résultats obtenus en  $\mu$ CP pour le système de détection en demi-sandwich ainsi qu'en sandwich complet en introduisant les sondes de carbone comportant des colorants encapsulés. Rappelons que l'objectif est de rendre possible la détection de divers allergènes avec des sondes de nanocornes de carbones incorporant un colorant dans leur cavité interne. À la lumière des résultats de la section 4.5, il ne sera pas possible de présenter un multiplexe en raison de la réactivité croisée entre les allergènes et les anticorps. L'objectif est de montrer que l'identifications de divers allergènes est possible à l'aide du système de ciblage et de marquage ici présenté.

En première partie sera présentée les résultats en demi sandwich de deux couples d'anticorps-antigènes, soit de cachou et d'amande. Les colorants utilisés pour

l'encapsulation sont le Sudan IV, le Sexithiophene (6T) et l'indigo. Cette partie permettra d'évaluer lequel des colorants est le plus approprié pour l'encapsulation dans les nanocornes de carbone fonctionnalisées.

#### 4.5.1 Encapsulation des colorants dans les CNHs

Dans un premier temps, la stabilité colloïdale des nanocornes de carbones contenant le colorant et fonctionnalisées avec le PEG est étudiée. Cela permet à la fois de s'assurer que l'ajout d'un colorant dans la cavité interne des CNH est possible et d'évaluer l'impact de cette modification sur leur agrégation en solution. L'agrégation des nanocornes de carbone est un problème majeur compromettant l'encapsulation des colorants. Lorsque les nanostructures s'agglomèrent, les trous permettant l'accès à la cavité interne s'encombrent et l'encapsulation des molécules de colorants est compromise. De plus, le caractère sélectif des agrégats de nanocornes de carbone est significativement plus faible que lorsqu'elles sont bien dispersées. Ainsi, plusieurs échantillons ont été préparés par enduction centrifuge (SC, spin coating) sur substrat de silice afin d'évaluer par imagerie Raman la taille des agrégats de cornes obtenus. Il a été question d'un peu d'essai-erreur afin de déterminer quel colorant allait être utilisé pour le système de détection en essai sandwich. En parallèle, des essais en demi-sandwich avec divers colorants ont été réalisés pour permettre un meilleur avancement du projet. Cette section a été possible grâce à la collaboration des étudiants Suraj Kaswan et Germain Robert Bigras du groupe de Richard Martel.

Les structure de tous les colorants utilisés dans le but d'obtenir une signature triplex en imagerie Raman ainsi que pour les monoplexes en essai demi-sandwich sont présentées à la Figure 3 (voir Section 1.2).

Dans la partie de SC, trois colorants sont encapsulés dans les CNHs pour une observation individuelle en RIMA, soit l'Indigo, le Sudan IV et le  $\alpha$ -Sexithiophene. Ces colorants sont choisis selon certains critères, tel que leurs bandes caractéristiques ne chevauchent pas les bandes D et G des CNH et que l'intensité des bandes soient significativement plus importantes que le bruit de fond des échantillons. Les paramètres étudiés sont l'intensité de la signature Raman des colorants dans les CNH, la densité ainsi que la taille des particules observables. La Figure 29 présente les résultats obtenus pour chaque échantillon ainsi qu'un spectre du signal Raman d'un agglomérat de nanocorne.

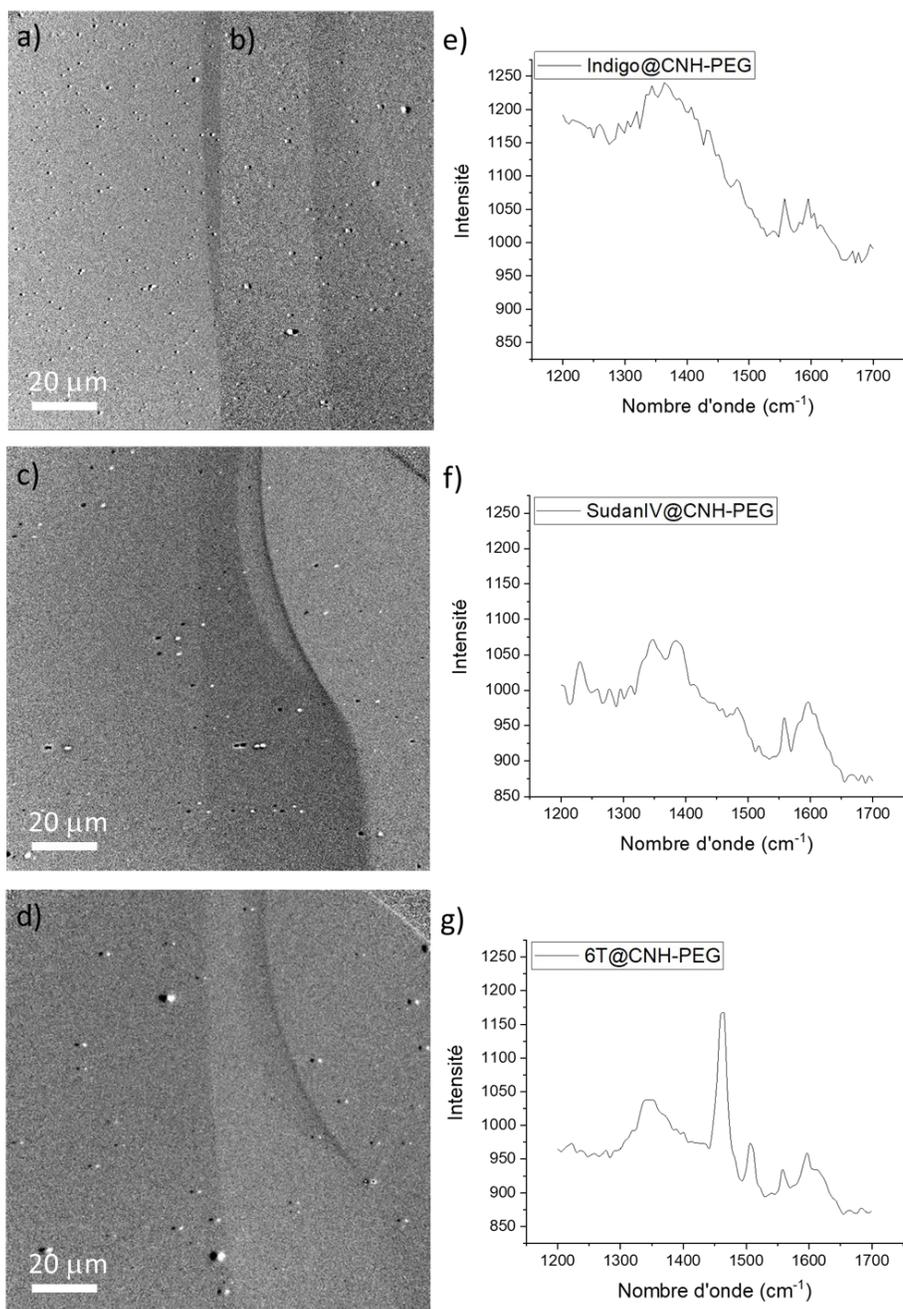


Figure 29 : a-b) Images optiques divisées d'enduction centrifuge d'Indigo@CNH-PEG, c) de SudanIV@CNH-PEG et d) de 6T@CNH-PEG sur substrat de Si/SiO<sub>2</sub>. e) Spectre Raman d'une particule de nanocorne présentant un signal Raman d'indigo, f) de Sudan et g) de 6T.

Les images optiques présentées aux Figures 29a-d, sont obtenues suite à une division de deux images légèrement décalées. Cette manipulation permet de faire ressortir les particules ainsi que d'annuler les artefacts liés à l'objectif, permettant ainsi d'augmenter le contraste de l'image et la visibilité des agrégats. Les agrégats de

nanocornes de carbone apparaissent comme des points blancs sur ces images. Les points noirs, légèrement à la gauche des points blancs, correspondent aussi aux CNHs, mais de l'image décalée et le signal est donc divisé. Les formes ondulées qui apparaissent au centre des images sont reliées à un artefact optique de l'objectif de l'appareil RIMA. Le signal de fond gris correspond au substrat d'oxyde de silice. Les graphiques présentés aux Figures 29e-f sont les spectres Raman d'un agrégat trouvé sur le substrat imagé à gauche.

Globalement, la densité de particules observées sur les échantillons est faible pour une dispersion en SC. Aussi, l'intensité de la signature Raman des colorants n'était pas comparable entre les particules de différentes tailles comme il était attendu. Effectivement, seulement les agrégats de petites tailles présentaient les pics caractéristiques des colorants. Cependant, l'indigo subit une dégradation lors de l'exposition au laser. Il n'est donc pas possible de proprement distinguer les pics dans le spectre présenté à la Figure 29e. Aussi, sur d'autres échantillons, un fort signal de fond de fluorescence a été mesuré. Cela laisse croire que les molécules n'étaient pas proprement encapsulées dans la nanostructure, mais plutôt adsorbées en surface de celle-ci, car l'encapsulation de colorants dans des nanostructures de carbone permet la désactivation de fluorescence.<sup>4</sup> Pour ces raisons, l'indigo ne pourra pas être retenu comme colorant de choix pour le système triplex. La dispersion de nanocornes montrée aux Figures 29a-c est considérée idéale puisque la taille des agrégats obtenues est petite. Aussi, à la Figure 29f, certains pics du Sudan IV sont facilement distingués à  $1348\text{ cm}^{-1}$  et à  $1459\text{ cm}^{-1}$ . L'encapsulation de ce colorant est donc réussie, malgré une augmentation mineure de la taille des particules. L'échantillon de 6T@CNH-PEG (Figure 29d) est par

ailleurs celui comportant les particules les plus grandes ainsi que la plus faible densité d'agrégats en surface. D'un autre côté, un fort signal Raman est noté en raison la bande caractéristique prononcée du  $\alpha$ -Sexithiophène à  $1461 \text{ cm}^{-1}$ .

Compte tenu de ces résultats, seulement le Sudan IV peut être retenu pour la l'encapsulation dans les nanocornes.

#### 4.5.2 Essai en demi-sandwich

Ayant déjà confirmé la reproductibilité du système de détection en demi-sandwich avec les trois allergènes à notre disposition, cette section ne s'attardera pas à prouver une seconde fois le paramètre de reproductibilité. Il sera plutôt question de valider, d'un point de vue qualitatif, la mesure d'un spectre Raman comportant à la fois les bandes caractéristiques des colorants et celles des nanocornes de carbone sur la région du substrat où des protéines de noix auront été imprimées, consistant en un système d'assemblage en demi-sandwich.

Puisque les essais en demi-sandwich utilisant des CNHs à colorants encapsulés (dye@CNH-PEG-AB) ont été procédées durant les analyses en SC, Section 4.5.1, les colorants les plus appropriés n'étaient pas encore déterminés. Le Sudan IV, l'Indigo et le 6T ont été choisis pour les premiers essais dans cette section.

Le choix du couple anticorps-antigène étudié pour ces essais est motivé par les résultats obtenus à la Section 4.3.1, où le couple montrant la plus haute densité de sondes sur les disques imprimés est celui avec cachou. Ainsi, en incorporant un élément nouveau dans le système, soit un colorant encapsulé, il est attendu d'obtenir une densité assez

élevée sur les disques pour évaluer la sélectivité des nouvelles sondes. La nanosonde de CNH fonctionnalisée avec des anti-cachous pégylés avec colorants (dye) est désignée comme dye@AC-PEG-CNH, où ces trois sondes avec colorants, l'Indigo, le Sudan IV et le 6T, seront désignées comme Indigo@AC-PEG-CNHs, SudanIV@AC-PEG-CNHs et 6T@AC-PEG-CNHs, respectivement. La Figure 30 ci-dessous montre deux essais en demi-sandwich utilisant le couple d'anticorps-antigène de cachou, ainsi qu'un spectre Raman d'une région comportant des CNHs.

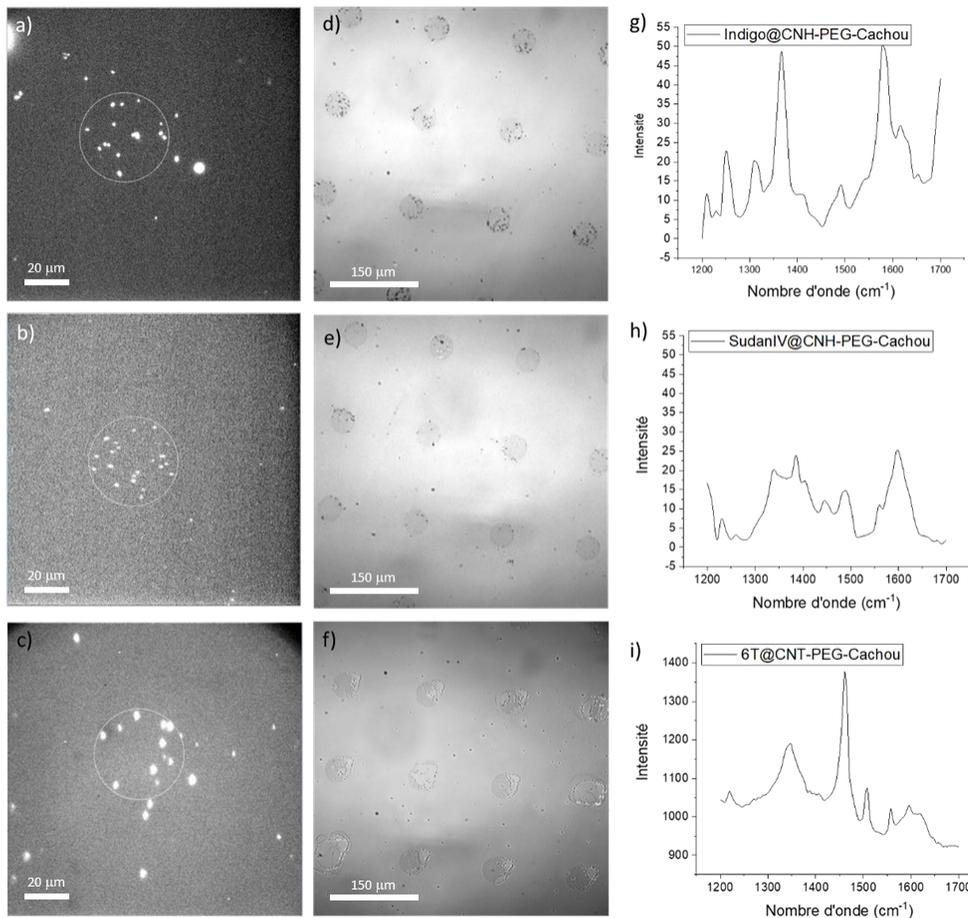


Figure 30 : a) Images Raman à  $1590\text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda_{ex} = 532\text{ nm}$ ) d'un essai en demi-sandwich avec des dye@AC-PEG-CNH encapsulant l'indigo, en b) le Sudan IV et en c) le 6T. Les disques imprimés ont un diamètre de  $50\text{ }\mu\text{m}$  et sont encerclés pour une meilleure distinction. Le substrat Si/SiO<sub>2</sub> est passivé au BSA. d-f) Images optiques de plusieurs impressions. g-i) Spectre Raman du signal d'un agrégat de CNHs se situant dans le motif imprimé de  $50\text{ }\mu\text{m}$  de diamètre correspondant (cercle en a, b et c).

Sur les images Raman aux Figures 30a-c, les agrégats de dye@AC-PEG-CNH apparaissent comme des taches blanches, tandis que la région imprimée est délimitée par un cercle blanc. Le substrat correspond à la zone grise entourant les nanosondes. Les images optiques aux Figures 30d-f présentent une partie du substrat comportant plusieurs régions imprimées apparaissant comme des disques réguliers légèrement plus foncés que le substrat, gris pâle. Les agrégats de nanosondes apparaissent comme de petits points noirs, et les impuretés (Figure 30f) correspondent aux régions plus claires entourant les impressions. Chacun des spectres Raman présentés aux Figures 30g-i sont reliés au signal d'un agrégat comportant du colorant de l'image Raman correspondante.

En commençant par les résultats obtenus pour le demi-sandwich avec l'Indigo, les sondes montrent une bonne sélectivité envers les régions où des protéines de cachou ont été imprimées. À la Figure 30a, peu de nanosondes sont observées autour de l'empreinte. Aussi, sur l'image optique à la Figure 30d, une plus forte densité de CNHs est observée sur les pourtours des empreintes comparées au centre de celles-ci. Cependant, la densité de sonde sur les empreintes varie légèrement au sein du substrat. Ensuite, les résultats pour l'essai avec le Sudan IV (Figure 30b) sont sensiblement comparables à ceux avec l'Indigo. Effectivement, la sélectivité des sondes est encore meilleure, puisque seulement neuf régions lumineuses sont détectées à l'extérieure de la région imprimée, comparativement à une douzaine pour l'échantillon à la Figure 30a. Les sondes encapsulant le Sudan IV semblent aussi avoir une préférence pour les régions externes des empreintes, ce qui était attendu par les observations en SC, voir Section 4.5.1. La bonne dispersion des sondes est effectivement un paramètre améliorant le caractère

sélectif des sondes. La non-uniformité d'attachement est aussi un problème observé puisque certaines régions sont visiblement plus peuplées en nanosondes que d'autres de part et d'autre de l'échantillon de la Figure 30e. En contrepartie, l'essai avec du 6T ne montrent pas de résultats encourageants, voir Figure 30c. Une forte agglomération est observée en raison de très larges régions lumineuses ainsi qu'une faible sélectivité justifiée par un fort signal de fond. Cela était effectivement anticipé par l'étude de revêtement par centrifugation montrant l'agrégation des sondes lors de l'encapsulation du 6T dans les CNHs. De plus, il y a des signes de contamination sur le substrat autour des régions imprimées, ce qui est visible sur l'image de la Figure 30f. Cette contamination est due à un mauvais séchage après la fonctionnalisation du substrat. Les zones plus pâles entourant les zones imprimées correspondent à la trace laissée par la solution tampon de HEPES cristallisée.

Pour ce qui est des résultats en spectroscopie Raman (Figure 30g-i), les trois essais présentent distinctement les bandes caractéristiques des colorants. En effet, trois bandes correspondant à l'indigo à  $1260\text{ cm}^{-1}$ ,  $1310\text{ cm}^{-1}$  et  $1635\text{ cm}^{-1}$ , deux bandes du Sudan IV à  $1350\text{ cm}^{-1}$  et  $1455\text{ cm}^{-1}$  ainsi que la forte bande du 6T à  $1460\text{ cm}^{-1}$  permettent de confirmer le succès de l'essai en demi-sandwich suite à une encapsulation de colorant dans les nanocornes de carbone. Par ailleurs, le spectre Raman de l'indigo ne montre pas de signe de dégradation ou encore de fluorescence. Ainsi, l'Indigo en surface des CNHs a probablement aussi éliminé par le solvant, car la nanosonde a subi plusieurs étapes de lavage supplémentaire lors de l'ajout de l'anticorps et lors de l'assemblage en demi-sandwich.

Un essai qualitatif a été fait avec le couple d'anticorps-antigène d'amande dans le but de valider le demi-sandwich avec le colorant de Sudan IV, soit le colorant le plus approprié jusqu'à maintenant pour effectuer la détection d'antigènes avec les sondes de nanocornes de carbone. Cependant, l'acquisition hyperspectrale n'a pas été étendue sur un nombre d'onde assez large pour couvrir le spectre Raman au-delà de la bande G des nanocornes. Les résultats sont présentés à la Figure 31 où l'image optique et l'image RIMA sont présentées.

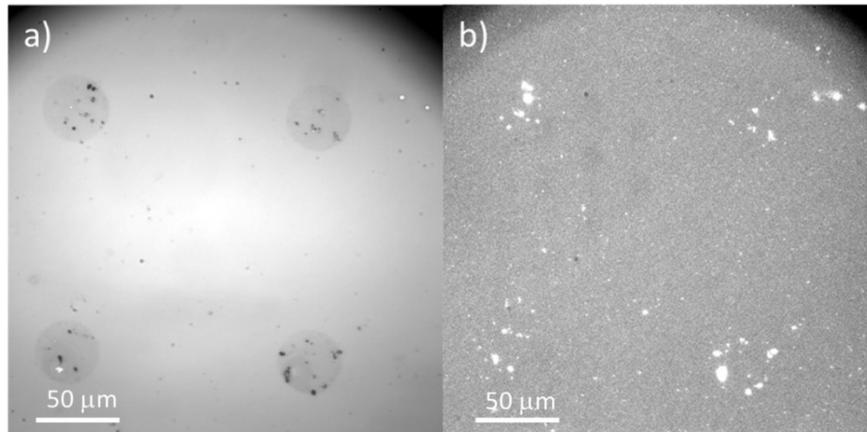


Figure 31 : a) Image optique de la région imagée en b. b) Image Raman à  $1590\text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda_{ex} = 532\text{ nm}$ ) d'un essai en demi-sandwich avec des SudanIV@AA-PEG-CNHS. Les disques imprimés ont un diamètre d'environ  $50\text{ }\mu\text{m}$ . Le substrat Si/SiO<sub>2</sub> est passivé au BSA.

Du point de vue qualitatif, une forte agglomération des nanosonde est observée sur le substrat, contrairement à ce qui était attendu. D'un autre côté, une forte non-sélectivité est également notée, ce qui contraste avec les résultats de la Figure 31b. Aussi, une densité suffisante de sonde est trouvée sur les empreintes, ce qui rend compte d'un caractère sélectif majoritaire des nanocornes. En somme, la détection d'antigènes d'amande est aussi possible avec les sondes fonctionnalisées et encapsulant le Sudan IV.

Ces résultats sont d'autant plus encourageants malgré certains paramètres qui demeurent sujets à l'amélioration, comme le niveau d'agrégation des sondes et la non-sélectivité. En contrepartie, cette section montre qu'il est possible de cibler des régions de différents types d'antigènes avec trois colorants différents.

#### 4.5.3 Essai en sandwich complet

Cette section porte sur l'objectif final du projet, soit l'assemblage du sandwich complet avec les nanosondes complètes, faites avec les nanocornes fonctionnalisées et marqué avec un colorant. Cet assemblage complexe est celui qui comporte le plus de paramètres à risque. Depuis le début de l'étude, le système a été simplifié pour assurer une méthode plus reproductible. Plusieurs essais ont été faits de façon à obtenir des échantillons comparables à ceux obtenus à la section précédente. La Figure 32 présente un résultat représentatif des échantillons obtenus en monoplexe sandwich complet avec le colorant de Sudan IV. Les images sont obtenues en appliquant un filtre laissant passer une gamme de nombres d'ondes entre  $1400\text{ cm}^{-1}$  et  $2000\text{ cm}^{-1}$ , correspondant à un filtre permettant de laisser passer la bande G des nanomatériaux de carbone.

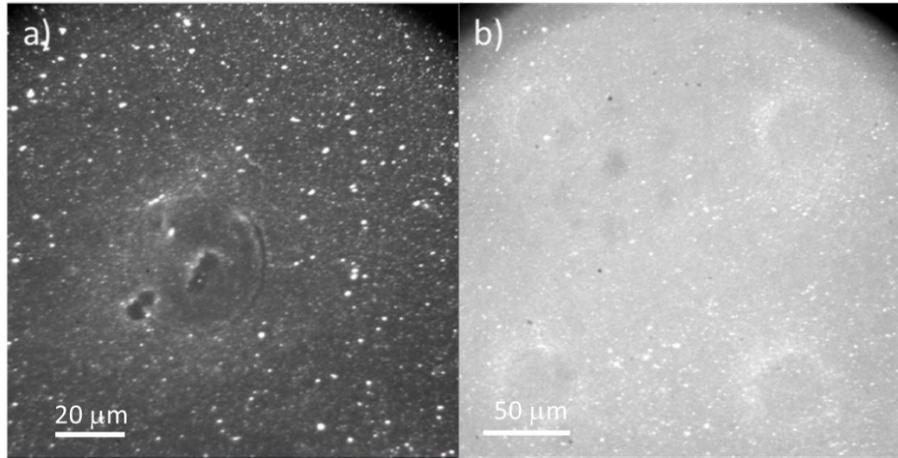


Figure 32 : Image Raman avec filtre de la bande G appliqué après a) 3s d'exposition, b) 5 minutes d'exposition avec des SudanIV@AC-PEG-CNHs. Les disques imprimés ont un diamètre d'environ 50  $\mu\text{m}$ . Le substrat Si/SiO<sub>2</sub> est passivé au BSA.

La Figure 32 montre deux images Raman du même échantillon à deux temps d'exposition différents. Un seul disque imprimé est imagé à la Figure 32a et quatre autres sont montrés à la Figure 32b. Des points blancs et des régions blanches embrouillées sont visibles autour des disques imprimés sur les images (Figures 32a et 32b). Le contraste est réduit à la Figure 32b en raison du blanchiment causé par l'exposition prolongée du substrat au laser. Une exposition laser prolongée du substrat au laser devrait permettre d'augmenter le contraste de l'image, voir Section 4.3.3a. Le contraire est plutôt observé ici. Le filtre appliqué permet de laisser passer une large fenêtre de signaux Raman et ne filtre pas exclusivement la bande G à 1590  $\text{cm}^{-1}$ , attribués aux CNH. Il est donc estimé que les points blancs sur les images présentées à la Figure 32 ne correspondent pas aux signaux Raman des CNH. Ils seraient plutôt attribués à la fluorescence causée par le matériel biologique imprimé sur le substrat.

Un autre essai en sandwich complet avec les SudanIV@AC-PEG-CNHs a été fait et la Figure 33 montre les résultats obtenus.

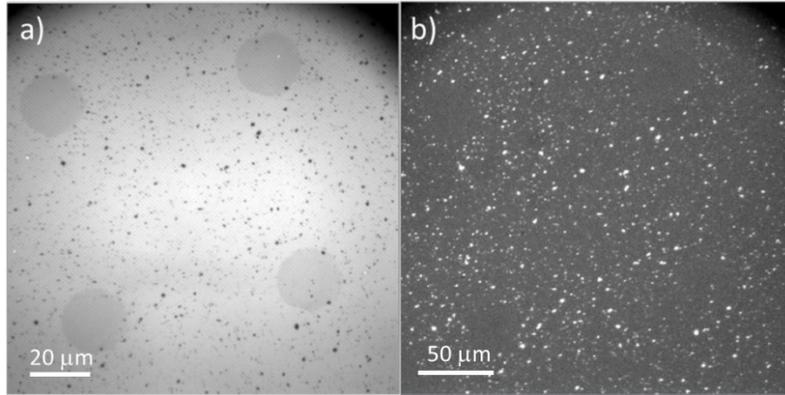


Figure 33 : a) Image optique à 50x de la région imagée en b. b) Image Raman à  $1590\text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda_{ex} = 532\text{ nm}$ ) d'un essai en sandwich complet avec des SudanIV@AC-PEG-CNHS. Les disques imprimés ont un diamètre de 50. Le substrat Si/SiO<sub>2</sub> est passivé au BSA.

La Figure 33a montre l'image optique de quatre régions imprimées (disques gris) où les agrégats de nanocornes apparaissent comme points noirs. Une réflexion de la lumière utilisée sur le substrat rend le centre de l'image plus pâle, par rapport aux coins. La Figure 33b montre l'image Raman à  $1590\text{ cm}^{-1}$  des mêmes quatre régions imprimées, où les agrégats de nanosondes de SudanIV@AC-PEG-CNHS apparaissent comme points blancs.

Le résultat montré à la Figure 33 est intéressant puisqu'il rapporte un comportement des nanosondes jamais observé. L'image Raman à la Figure 33b montre un caractère anti-sélectif des nanosondes. Ce caractère est justifié par l'absence quasi totale de nanosonde à l'intérieur des régions imprimées. Il est ainsi facile de distinguer les quatre disques de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre aux coins de l'image. Il semble que les nanosondes de SudanIV@CNH-PEG-AA auraient une affinité supérieure avec la BSA, ce qui est totalement contre-intuitif.

Les pistes explorées pour justifier l'échec du système sandwich complet sont variées. D'une part, il est possible que les polymères agissant comme ligand entre la

nanocorne et l'anticorps ait subi une altération entre le temps de la synthèse de la sonde et l'utilisation de celle-ci. Les hypothèses proposées sont que soit une altération a été initiée par la méthode de redispersions avant de les utiliser lors du traitement ultrason, ou que la méthode de conservation n'a pas été efficace. Aussi, la possibilité que des molécules de colorant adsorbées à la surface de la nanocorne affecte l'efficacité de l'anticorps ou la mobilité du polymère n'est pas à exclure.

En somme, les nanosondes présentaient un caractère anti-sélectif vis-à-vis des régions imprimées pour le sandwich complet avec nanosondes incorporant le colorant.

#### 4.5.4 Triplex des dye@PEG-CNHs

Dans cette section est discuté le premier essai triplex des nanocornes de carbone fonctionnalisées avec le PEG. Il s'agit du premier et du seul essai performé avec les nanocornes encapsulant isolément trois colorants, soit le 6T, le dicétopyrrolopyrrole (DPP2) ainsi que le Chat-th-Chat (4T4), celui-ci ayant été synthétisé dans le groupe de William Skene à l'Université de Montréal en 2016.<sup>89</sup> Les nanosondes sont aussi fonctionnalisées avec le PEG pour permettre une dispersion en milieu aqueux. Cette partie est réalisée avec la collaboration de Suraj Kaswan et Germain Robert Bigras du groupe de Richard Martel. Il est question de déterminer la possibilité d'obtenir, sur une même image, les trois signaux des colorants. Le Sudan IV n'a pas été considéré comme étant un colorant approprié pour cet essai triplex parce que ses bandes caractéristiques chevauchent celles du 6T à  $1460\text{ cm}^{-1}$  et celle du DPP2 à  $1340\text{ cm}^{-1}$ . Quelle que soit l'agglomération provoquée et constatée par l'encapsulation du 6T dans les CNHs, nous en avons profité pour risquer les premières tentatives avec le 6T. La Figure 34 ci-dessous

présente l'image optique, l'image Raman ainsi que les spectres Raman de différentes régions comportant les signaux des colorants encapsulés dans les CNHs.

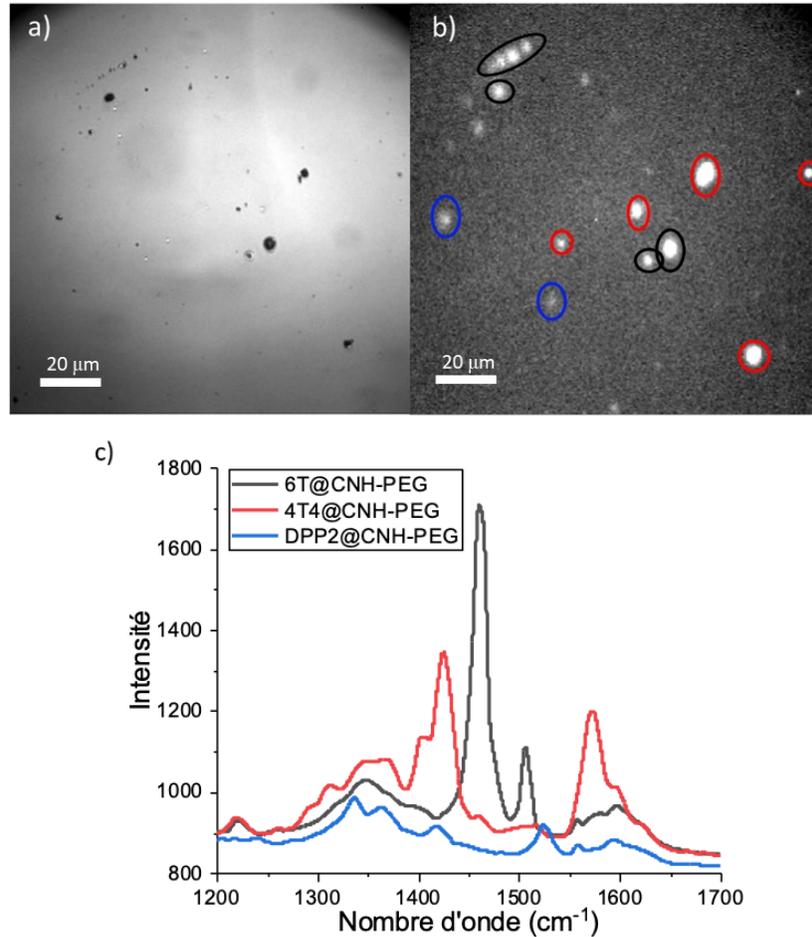


Figure 34 : a) Image optique du substrat. b) Images Raman à  $1590\text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda_{ex} = 532\text{ nm}$ ) d'une enduction par centrifugation triplex des 6T@AC-PEG-CN, 4T4@AC-PEG-CN et DPP1@AC-PEG-CN. Les différents agrégats sont encerclés par code de couleur, relié au colorant en c) Spectre Raman d'un agrégat de nanocornes présentant un signal de 6t (noir), de 4T4 (rouge) et de DPP2 (bleu).

La Figure 34a montre d'une région sur le substrat où des agrégats de nanosondes apparaissent comme taches et points noirs. Un reflet de la lumière blanche est visible au centre de l'image. Des taches grises floues sont visibles de part et d'autre de l'image optique sont reliées à un artefact de l'objectif, puisqu'elles sont présentes sur toutes les images optiques. Une image Raman de cette région est présentée à la Figure 34b, où les

taches blanches correspondent aux agrégats de nanocornes de carbone. Les agrégats dont le signal des colorants est distingué sont encerclés selon un code de couleur référant au graphique de la Figure 34c. Les spectres Raman de chacune des nanosondes sont superposés sur un graphique présenté à la Figure 34c, où la courbe en noir correspond au signal de la nanosonde de 6T@CNH-PEG, en rouge pour celle de 4T4@CNH-PEG et en bleu pour celle de DPP2@CNH-PEG.

Puisqu'il s'agit du premier test effectué pour l'imagerie du triplex en SC, les concentrations des composants du mélange n'ont pas été optimisées. Le ratio utilisé pour le mélange était donc de 1 :1 :1 pour chaque échantillon de nanocornes. Aussi, des impuretés sont observées sur l'image optique à la Figure 34a, prenant la forme de petites taches blanches et d'autres taches semblables à des bulles blanches. Celles-ci ne sont pas actives en Raman, d'où leur absence à la Figure 34b, ce qui pourrait être expliqué par des poussières ambiantes s'étant adsorbées sur le substrat où encore une cristallisation du solvant utilisé. Celui-ci était composé d'un mélange de MES-MeOH, donc une solution saline en présence d'un alcool, deux médias qui ne sont pas parfaitement solubles l'un avec l'autre. Ensuite, la Figure 34b montre que le substrat est dominé par la présence de nanosondes encapsulant le 6T et le Chat-th-Chat (noir et rouge), puisque seulement deux régions montrent des signes de DPP2 encerclés en bleu. Les autres régions possèdent une intensité du signal Raman trop faible, la limite de détection est donc perdue dans le bruit. Ceci étant problématique pour l'obtention d'un signal, permettant de déterminer la nature de la sonde. D'un autre côté, la dispersion des sondes est loin d'être idéale. Les plus gros agrégats sont ceux reliés à l'encapsulation du Chat-th-Chat, tandis que les plus

petits correspondent aux nanosondes avec le DPP2. De cela, il est estimé que les nanosondes avec DPP2 possèderaient la meilleure sélectivité lors d'un essai en sandwich.

En somme, il s'agit de résultats très prometteurs pour un premier test puisque les trois colorants sont faciles à distinguer et puisqu'il est possible de dénombrer les différentes régions comportant différents signaux.

## CHAPITRE V – Conclusion

Un nouveau système de détection d'allergènes de noix a pu être développé avec des nanosondes de CNHs encapsulant divers colorants. Chaque étape de l'auto-assemblage de l'essai sandwich a été démontré pour la détection des protéines de noisette par  $\mu$ CP en immunofluorescence. Il a également été possible de démontrer le concept de l'essai sandwich monoplexe avec des nanotubes de carbone. Malgré une non-sélectivité apparente, l'essai a permis de détecter les protéines de noisette de manière fiable. Afin d'obtenir une meilleure densité de greffage d'anticorps pégylés sur les nanosondes, ainsi qu'une meilleure stabilité colloïdale, nous avons exploré l'utilisation de nanocornes de carbone produites dans l'équipe de N. Braidy à L'Université de Sherbrooke dans un essai en demi-sandwich. Ces résultats montrent une nette amélioration par rapport aux dosages de nanosondes réalisés avec des CNTs. Les essais utilisant les nanosondes à base de CNHs démontrent une bonne reproductibilité et une détection améliorée. Cependant, la sélectivité des nanosondes de CNHs reste à parfaire puisqu'un signal en arrière-plan, d'intensité variable, est mesuré pour chaque essai, ce qui est causé en partie par une agrégation mineure des nanosondes en solution. Compte tenu de ces résultats, nous avons testé le système sandwich complet avec les CNHs et démontré une meilleure sélectivité et reproductibilité par rapport aux essais performés avec des sondes de CNTs. Bien que la non-sélectivité reste un problème, nous pensons que les résultats constituent une preuve de concept solide pour la détection en monoplexe. Le développement d'une analyse quantitative de la sensibilité du système monoplexe n'a cependant pas été concluant. D'une autre part, l'avancée vers la détection multiplex avec

des nanosondes de carbone n'a pas pu être possible lors du projet puisque les anticorps utilisés faisaient l'objet de beaucoup de réactivité croisée. Toutefois, la sensibilité du système développée est plus haute que celle offerte par le test ELISA, ce qui consiste en un avantage.

L'encapsulation de colorants, tel que l'Indigo, le Sudan IV, le 6T, le 4T4 et le DPP2 dans les CNHs a permis de développer cinq nanosondes possédant chacune une signature propre. Il a été démontré que celles-ci peuvent être appliquées pour la détection d'antigènes en monoplexe et à une dispersion triplex.

Les deux parties majeures du projet ont pu être suffisamment développées pour illustrer convenablement le potentiel du système ici-développé. D'une part, la détection sélectives entre anticorps et antigène de trois couples différents s'est avérée un succès, ainsi que l'imagerie d'un triplex en RIMA. La suite du projet consisterait à développer un protocole permettant une reproductibilité du système sandwich complet. Aussi, l'incorporation d'anticorps de source différentes, tel que des allergènes de fruit de mer, de produits laitiers ou d'animaux, permettrait de résoudre le problème de réactivité croisée avec les couples utilisés dans cette étude. Avec des couples d'anticorps et d'antigènes qui ne présenteraient aucune réactivité croisée, le système en détection triplex serait alors possible.

Le contrôle de la qualité des aliments reste une préoccupation majeure pour les industriels. Le test ELISA est encore une méthode largement utilisée pour le dosage d'anticorps ou d'antigènes. En raison des exigences grandissantes, une méthode plus

efficace avec un rendement supérieur doit voir le jour. Nous estimons que les résultats de cette recherche auront un potentiel d'impact majeur pour les industries de contrôle de qualité alimentaires et de la santé. Le système de détection RIISA mène à une amélioration du test ELISA, faisant intervenir les propriétés de diffusion Raman de nanostructures de carbone permettant une détection plus sensible de plusieurs allergènes simultanément, soit deux avantages supplémentaires au test ELISA.

## ANNEXE

### Annexe 1 : Étude DLS

*Tableau A : Données expérimentales brutes regroupées de l'étude DLS sur les différents matériels utilisés pour le système de détection demi-sandwich et sandwich complet.*

Échantillon	T (°C)	Potentiel Zeta (mV)	Mobilité ( $\mu\text{mcm/Vs}$ )	Conductivité (mS/cm)	Angle de diffusion (°)
BSA 0.1% 1	23	-9,97	-0,75	16,6	12,8
BSA 0.1% 2	23	-18,60	-1,40	18,4	12,8
BSA 0.1% 3	23	-19,10	-1,44	18,2	12,8
BSA 1% 1	23	-14,20	-1,07	16,6	12,8
BSA 1% 2	23	-13,90	-1,05	16,8	12,8
BSA 1% 3	23	-13,10	-0,99	17,4	12,8
Moyenne		13,93	-1.03	16,9	12,8
Protéine amande 0.1% 1	23	-10,20	-0,77	15,7	12,8
Protéine amande 0.1% 2	23	-8,74	-0,66	16,3	12,8
Protéine amande 0.1% 3	23	-11,10	-0,84	16,5	12,8
Moyenne		-10,93	-0,75	16,2	12,8
Protéine noisette 0.1% 1	23	-11,10	-0,83	16,0	12,8
Protéine noisette 0.1% 2	23	-10,70	-0,81	16,6	12,8
Protéine noisette 0.1% 3	23	-11,00	-0,83	16,9	12,8
Moyenne		-10,93	-0,82	16,5	12,8
CNH 0.01% 1	23	-9,14	-0,69	13,8	12,8
CNH 0.01% 2	23	-8,86	-0,67	14,4	12,8
CNH 0.01% 3	23	-9,11	-0,69	14,6	12,8
Moyenne		-9,04	-0,68	14,3	12,8

## Annexe 2 : Réactivité croisée

Pour chacune des incubations, une image en microscopie de fluorescence a été effectuée sur chacune des régions imprimées. Le couple en demi-sandwich d'anticorps-antigènes de cachou est présenté à la Section 4.1.1. La Figure A illustre la séquence d'incubation précédée et les Figures B à D regroupent les images optiques de fluorescence pour les incubations avec les trois antigènes imprimés sur le substrat.

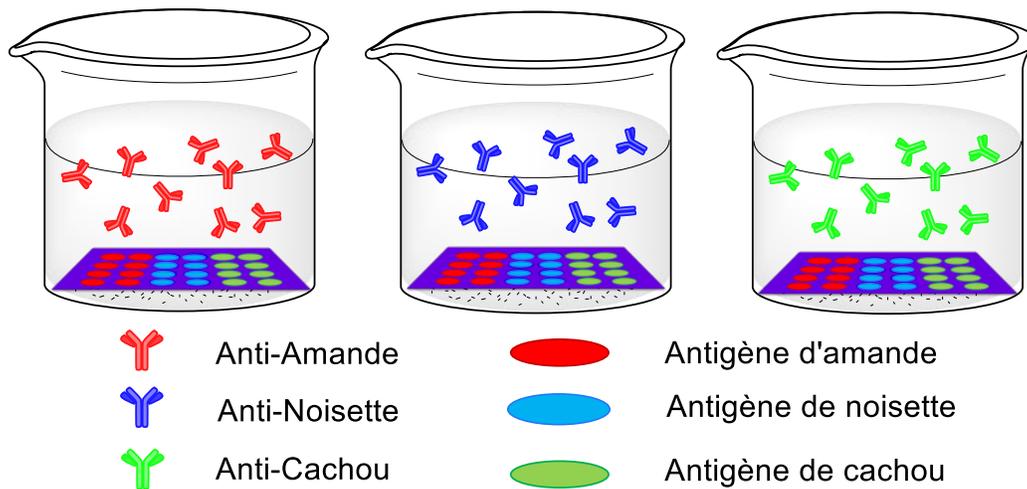


Figure A : Schéma illustrant l'incubation de substrats dans trois conditions représentées par un code de couleur. En rouge, incubation avec les anticorps d'amande, en bleu avec les anticorps de noisette et en vert avec les anticorps de cachou.

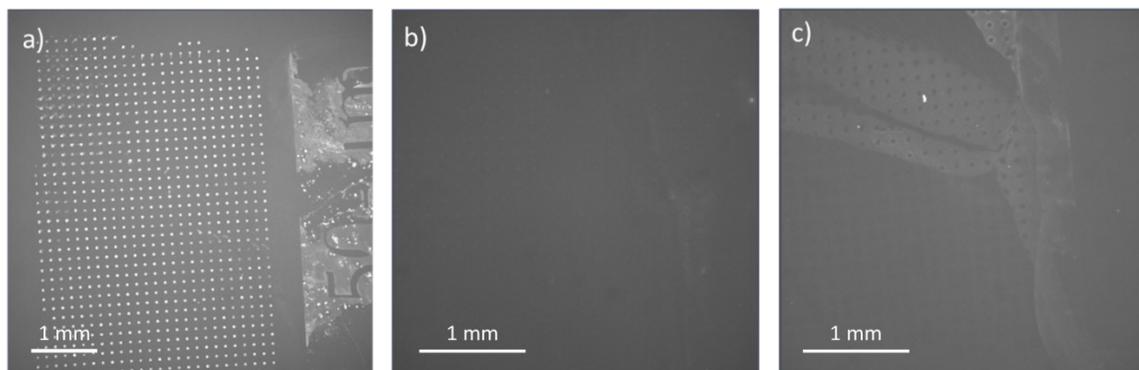


Figure B : Images de fluorescence de substrat fonctionnalisé en  $\mu$ CP a) avec des allergènes d'amande, b) avec des allergènes de noisette et c) avec des allergènes de cachou, tous incubés avec des anticorps d'amande.

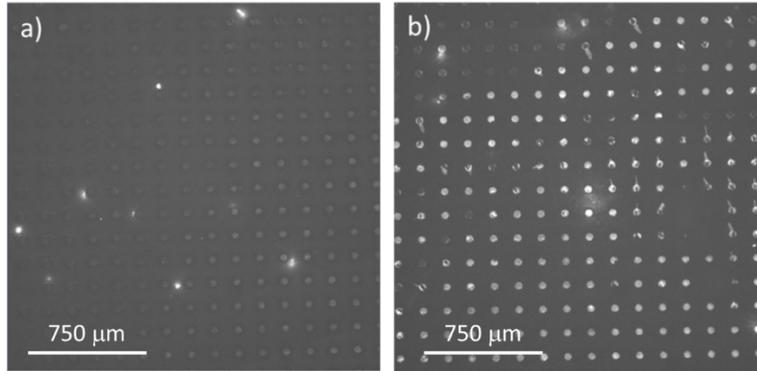


Figure C : Images de microscopie de fluorescence de substrat fonctionnalisé en  $\mu$ CP a) avec des allergènes de cachou et b) avec des allergènes d'amande, tous incubés avec des anticorps de noisette.

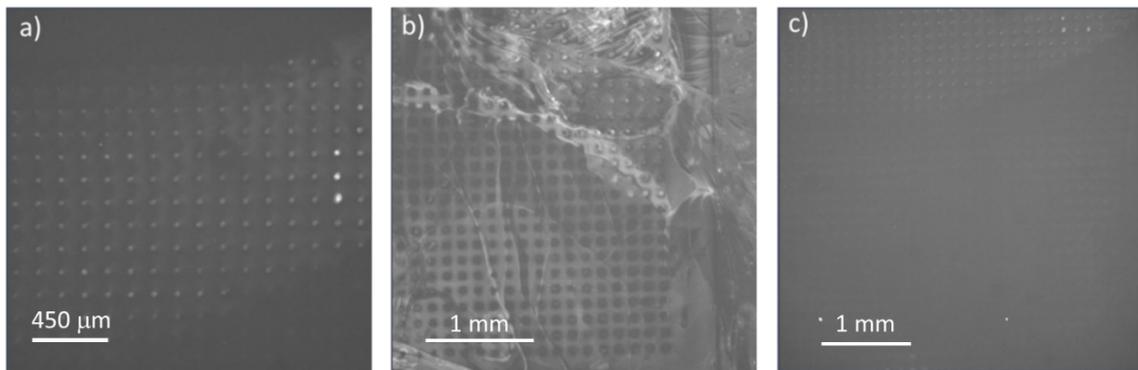


Figure D : Images de microscopie de fluorescence de substrat fonctionnalisé en  $\mu$ CP a) avec des allergènes de cachou, b) avec des allergènes d'amande et c) avec des allergènes de noisette, tous incubés avec des anticorps de cachou.

Pour la seconde incubation, l'anticorps fluorescent est préalablement complexé à l'anticorps primaire, ce dernier présent en excès, de manière à éviter une complexation entre l'anticorps secondaire et les anticorps imprimés sur le substrat. De même que pour le demi-sandwich, l'essai sandwich immunofluorescent de noisette est présenté à la Section 4.1.2. La Figure E illustre la séquence d'incubation procédée et les Figures F à H

regroupent les images optiques de fluorescence pour les incubations avec les trois anticorps imprimés sur le substrat.

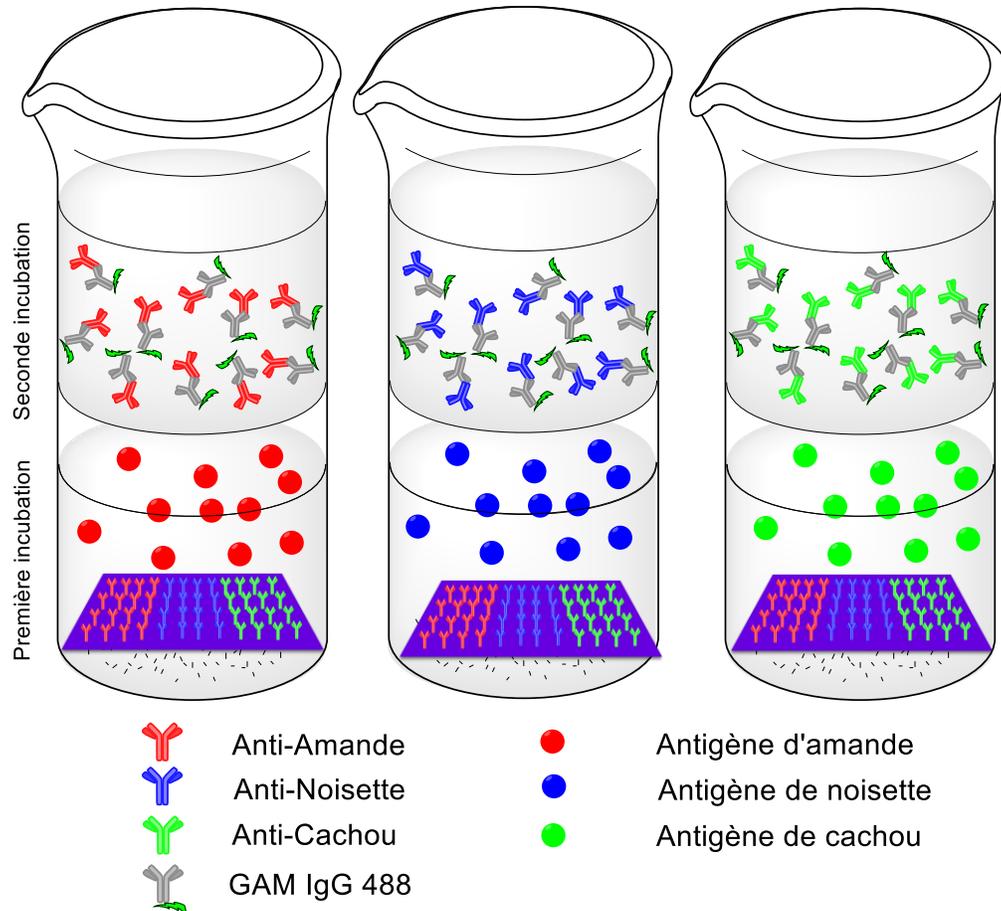


Figure E : Schéma illustrant la séquence d'incubation en deux étapes de substrats fonctionnalisés avec des anticorps dans trois conditions représentées par un code de couleur. En rouge, incubation avec le matériel correspondant à l'amande, en bleu avec la noisette et en vert au cachou. Un rinçage est effectué entre les incubations.

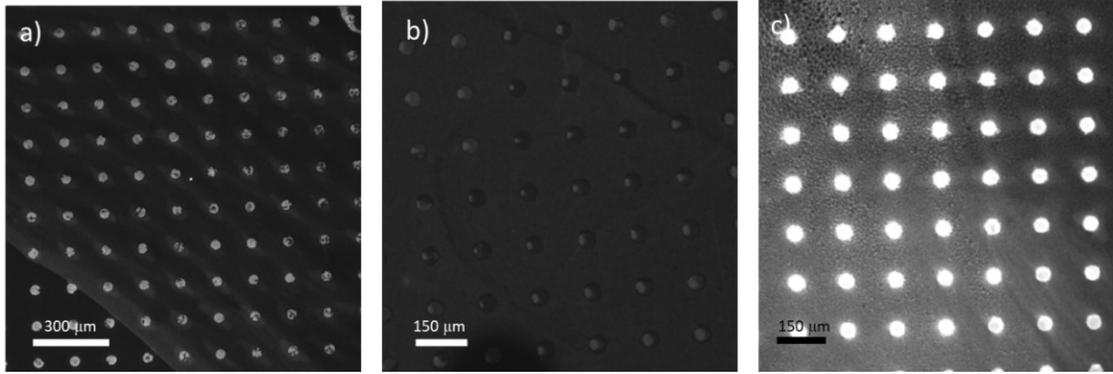


Figure F : Imagerie de microscopie de fluorescence d'un substrat fonctionnalisé en  $\mu\text{Cp}$  avec des anticorps a) d'amande, b) de noisette et c) de cachou, première incubation partie avec des antigènes d'amande et en seconde, des anticorps d'amande complexés aux GAM IgG 488.

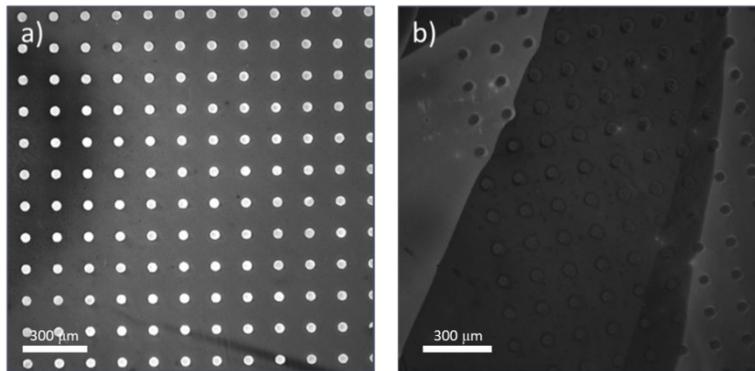


Figure G : Imagerie de microscopie de fluorescence d'un substrat fonctionnalisé en  $\mu\text{Cp}$  avec des anticorps a) d'amande et b) de cachou, première incubation partie avec des antigènes de noisette et en seconde, des anticorps de noisette complexés aux GAM IgG 488. Le graphique en c) est réalisé en mesurant l'intensité de fluorescence le long d'une tranche horizontale de disques imprimés, la ligne de base étant soustraite de chacune des courbes.

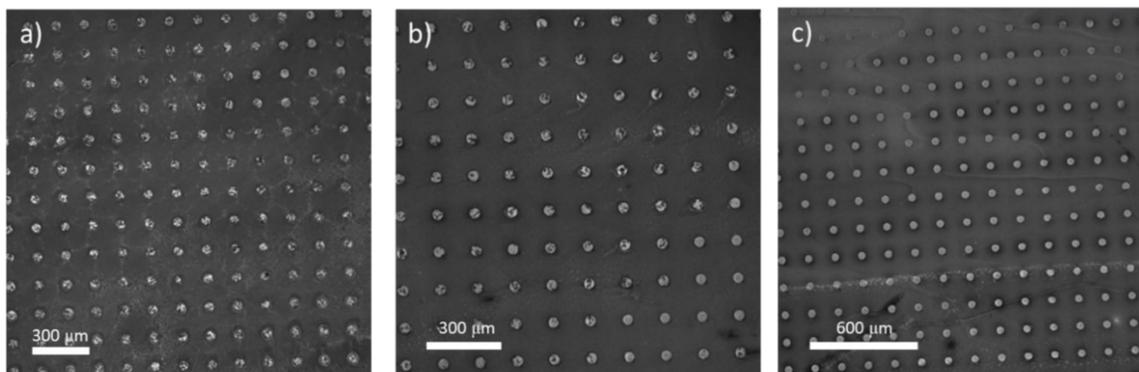


Figure H : Imagerie de microscopie de fluorescence d'un substrat fonctionnalisé en  $\mu\text{Cp}$  avec des anticorps a) d'amande, b) de noisette et c) de cachou, première incubation partie avec des antigènes de cachou et en seconde, des anticorps de cachou complexés aux GAM IgG 488. Le graphique en d) est réalisé en mesurant l'intensité de fluorescence le long d'une tranche horizontale de disques imprimés, la ligne de base étant soustraite de chacune des courbes.

## Références

1. Ring, J.; Krämer, U.; Schäfer, T.; Behrendt, H., Why are allergies increasing? *Current Opinion in Immunology* **2001**, *13* (6), 701-708.
2. Traidl-Hoffmann, C.; Jakob, T.; Behrendt, H., Determinants of allergenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2009**, *123* (3), 558-566.
3. Hayashi, Y.; Matsuda, R.; Maitani, T.; Imai, K.; Nishimura, W.; Ito, K.; Maeda, M., Precision, limit of detection and range of quantitation in competitive ELISA. *Analytical Chemistry*. **2004**, *76* (5), 1295-1301.
4. Gaufres, E.; Tang, N.-W.; Lapointe, F.; Cabana, J.; Nadon, M.-A.; Cottenye, N.; Raymond, F.; Szkopek, T.; Martel, R., Giant Raman scattering from J-aggregated dyes inside carbon nanotubes for multispectral imaging. *Nature Photonics* **2014**, *8* (1), 72-78.
5. Hattori, Y.; Touhara, H., 5 - Fluorination–Defluorination and Fluorine Storage Properties of Single-Wall Carbon Nanotubes and Carbon Nanohorns. In *New Fluorinated Carbons: Fundamentals and Applications*, Boltalina, O. V.; Nakajima, T., Eds. Elsevier: Boston, 2017; pp 113-133.
6. Barszcz, B.; Kędzierski, K.; Jeong, H. Y.; Kim, T.-D., Spectroscopic properties of diketopyrrolopyrrole derivatives with long alkyl chains. *Journal of Luminescence* **2017**, *185*, 219-227.
7. Sarkar, U. K.; Chakrabarti, S.; Misra, T. N.; Pal, A. J., A comparative study of SERS from  $\alpha$ -sexithiophene and other thiophene oligomers. *Chemical Physics Letters*. **1992**, *200* (1), 55-59.
8. Chiu, M. L.; Goulet, D. R.; Teplyakov, A.; Gilliland, G. L., Antibody structure and function: the basis for engineering therapeutics. *Antibodies* **2019**, *8* (4), 55.
9. Davies, D. R.; Chacko, S., Antibody structure. *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26* (8), 421-427.
10. Sethi, D. K.; Agarwal, A.; Manivel, V.; Rao, K. V.; Salunke, D. M., Differential epitope positioning within the germline antibody paratope enhances promiscuity in the primary immune response. *Immunity* **2006**, *24* (4), 429-438.
11. Group, B. D. W.; Atkinson Jr, A. J.; Colburn, W. A.; DeGruttola, V. G.; DeMets, D. L.; Downing, G. J.; Hoth, D. F.; Oates, J. A.; Peck, C. C.; Schooley, R. T., Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2001**, *69* (3), 89-95.
12. Kulasingham, V.; Diamandis, E. P., Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nature Clinical Practice Oncology* **2008**, *5* (10), 588-600.
13. Benitez, J.-M.; Meuwis, M.-A.; Reenaers, C.; Van Kemseke, C.; Meunier, P.; Louis, E., Role of endoscopy, cross-sectional imaging and biomarkers in Crohn's disease monitoring. *Gut* **2013**, *62* (12), 1806-1816.
14. Havrilesky, L. J.; Whitehead, C. M.; Rubatt, J. M.; Cheek, R. L.; Groelke, J.; He, Q.; Malinowski, D. P.; Fischer, T. J.; Berchuck, A., Evaluation of biomarker panels for early stage ovarian cancer detection and monitoring for disease recurrence. *Gynecologic Oncology* **2008**, *110* (3), 374-382.
15. Janelidze, S.; Mattsson, N.; Palmqvist, S.; Smith, R.; Beach, T. G.; Serrano, G. E.; Chai, X.; Proctor, N. K.; Eichenlaub, U.; Zetterberg, H., Plasma P-tau181 in Alzheimer's disease: relationship to other biomarkers, differential diagnosis, neuropathology and longitudinal progression to Alzheimer's dementia. *Nature Medicine* **2020**, *26* (3), 379-386.

16. Yokobori, S.; Hosein, K.; Burks, S.; Sharma, I.; Gajavelli, S.; Bullock, R., Biomarkers for the clinical differential diagnosis in traumatic brain injury—a systematic review. *CNS Neuroscience & Therapeutics* **2013**, *19* (8), 556-565.
17. Spatola, B. N.; Murray, J. A.; Kagnoff, M.; Kaukinen, K.; Daugherty, P. S., Antibody repertoire profiling using bacterial display identifies reactivity signatures of celiac disease. *Analytical Chemistry*. **2013**, *85* (2), 1215-1222.
18. van Venrooij, W. J.; van Beers, J. J.; Pruijn, G. J., Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future. **2011**.
19. Leffler, D. A.; Schuppan, D., Update on Serologic Testing in Celiac Disease. *The American Journal of Gastroenterology* **2010**, *105* (12), 2520-2524.
20. Berson, S. A.; Yalow, R. S.; Bauman, A.; Rothschild, M. A.; Newerly, K., Insulin-I 131 metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects. *The Journal of Clinical Investigation* **1956**, *35* (2), 170-190.
21. Engvall, E.; Perlmann, P., Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA: III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *The Journal of Immunology* **1972**, *109* (1), 129-135.
22. Taniguchi, N., On the basic concept of nanotechnology. *Proceeding of the ICPE* **1974**.
23. Aragay, G.; Merkoçi, A., Nanomaterials application in electrochemical detection of heavy metals. *Electrochimica Acta* **2012**, *84*, 49-61.
24. Qian, H.; Liu, B.; Jiang, X., Application of nanomaterials in cancer immunotherapy. *Materials Today Chemistry* **2018**, *7*, 53-64.
25. Mondal, P.; Anweshan, A.; Purkait, M. K., Green synthesis and environmental application of iron-based nanomaterials and nanocomposite: A review. *Chemosphere* **2020**, 127509.
26. Long, D. A., Raman spectroscopy. *New York* **1977**, *1*.
27. Boehm, H.-P.; Clauss, A.; Fischer, G.; Hofmann, U., Das adsorptionsverhalten sehr dünner kohlenstoff-folien. *Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie* **1962**, *316* (3-4), 119-127.
28. Kroto, H.; Heath, J.; Brien, S.; Curl, R.; Smalley, R., C60: Buckminsterfullerene, *Nature* Vol. **318**. **1985**.
29. Iijima, S., Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, *354* (6348), 56-58.
30. Yan, Q.-L.; Gozin, M.; Zhao, F.-Q.; Cohen, A.; Pang, S.-P., Highly energetic compositions based on functionalized carbon nanomaterials. *Nanoscale* **2016**, *8* (9), 4799-4851.
31. Saito, Y.; Nishikubo, K.; Kawabata, K.; Matsumoto, T., Carbon nanocapsules and single-layered nanotubes produced with platinum-group metals (Ru, Rh, Pd, Os, Ir, Pt) by arc discharge. *Journal of Applied Physics*. **1996**, *80* (5), 3062-3067.
32. Iijima, S.; Yudasaka, M.; Yamada, R.; Bandow, S.; Suenaga, K.; Kokai, F.; Takahashi, K., Nano-aggregates of single-walled graphitic carbon nano-horns. *Chemical Physics Letters*. **1999**, *309* (3-4), 165-170.
33. Baptista, F. R.; Belhout, S. A.; Giordani, S.; Quinn, S. J., Recent developments in carbon nanomaterial sensors. *Chemical Society Reviews*. **2015**, *44* (13), 4433-4453.
34. Liu, X.; Ying, Y.; Ping, J., Structure, synthesis, and sensing applications of single-walled carbon nanohorns. *Biosensors and Bioelectronics* **2020**, *167*, 112495.
35. Yamaguchi, T.; Bandow, S.; Iijima, S., Synthesis of carbon nanohorn particles by simple pulsed arc discharge ignited between pre-heated carbon rods. *Chemical Physics Letters*. **2004**, *389* (1-3), 181-185.
36. Wang, H.; Chhowalla, M.; Sano, N.; Jia, S.; Amaratunga, G., Large-scale synthesis of single-walled carbon nanohorns by submerged arc. *Nanotechnology* **2004**, *15* (5), 546.

37. Pagura, C.; Barison, S.; Mortalò, C.; Comisso, N.; Schiavon, M., Large scale and low cost production of pristine and oxidized single wall carbon nanohorns as material for hydrogen storage. *Nanoscience and Nanotechnology Letters* **2012**, *4* (2), 160-164.
38. Yuge, R.; Yudasaka, M.; Toyama, K.; Yamaguchi, T.; Iijima, S.; Manako, T., Buffer gas optimization in CO<sub>2</sub> laser ablation for structure control of single-wall carbon nanohorn aggregates. *Carbon* **2012**, *50* (5), 1925-1933.
39. Pagura, C.; Barison, S.; Battiston, S.; Schiavon, M., Synthesis and characterization of single wall carbon nanohorns produced by direct vaporization of graphite. *Proceeding of TechConnect World. Volume* **2010**, *1*.
40. Azami, T.; Kasuya, D.; Yoshitake, T.; Kubo, Y.; Yudasaka, M., Production of small single-wall carbon nanohorns by CO<sub>2</sub> laser ablation of graphite in Ne-gas atmosphere. *Carbon (New York, NY)* **2007**, *45* (6), 1364-1367.
41. Raval, J. P.; Joshi, P.; Chejara, D. R., Carbon nanotube for targeted drug delivery. In *Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery*, Elsevier: 2018; pp 203-216.
42. Bandow, S.; Rao, A.; Sumanasekera, G.; Eklund, P.; Kokai, F.; Takahashi, K.; Yudasaka, M.; Iijima, S., Evidence for anomalously small charge transfer in doped single-wall carbon nanohorn aggregates with Li, K and Br. *Applied Physics A* **2000**, *71* (5), 561-564.
43. Murata, K.; Kaneko, K.; Steele, W.; Kokai, F.; Takahashi, K.; Kasuya, D.; Hirahara, K.; Yudasaka, M.; Iijima, S., Molecular potential structures of heat-treated single-wall carbon nanohorn assemblies. *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105* (42), 10210-10216.
44. Utsumi, S.; Miyawaki, J.; Tanaka, H.; Hattori, Y.; Itoi, T.; Ichikuni, N.; Kanoh, H.; Yudasaka, M.; Iijima, S.; Kaneko, K., Opening mechanism of internal nanoporosity of single-wall carbon nanohorn. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109* (30), 14319-14324.
45. Fan, J.; Yudasaka, M.; Miyawaki, J.; Ajima, K.; Murata, K.; Iijima, S., Control of hole opening in single-wall carbon nanotubes and single-wall carbon nanohorns using oxygen. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (4), 1587-1591.
46. Fan, J.; Yuge, R.; Miyawaki, J.; Kawai, T.; Iijima, S.; Yudasaka, M., Close– Open– Close Evolution of Holes at the Tips of Conical Graphenes of Single-Wall Carbon Nanohorns. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112* (23), 8600-8603.
47. Bekyarova, E.; Kaneko, K.; Yudasaka, M.; Kasuya, D.; Iijima, S.; Huidobro, A.; Rodriguez-Reinoso, F., Controlled opening of single-wall carbon nanohorns by heat treatment in carbon dioxide. *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107* (19), 4479-4484.
48. Murata, K.; Kaneko, K.; Kokai, F.; Takahashi, K.; Yudasaka, M.; Iijima, S., Pore structure of single-wall carbon nanohorn aggregates. *Chemical Physics Letters* **2000**, *331* (1), 14-20.
49. Ohba, T.; Omori, T.; Kanoh, H.; Yudasaka, M.; Iijima, S.; Kaneko, K., Interstitial nanopore change of single wall carbon nanohorn assemblies with high temperature treatment. *Chemical Physics Letters*. **2004**, *389* (4-6), 332-336.
50. Mountrichas, G.; Tagmatarchis, N.; Pispas, S., Functionalization of carbon nanohorns with polyethylene oxide: synthesis and incorporation in a polymer matrix. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2009**, *9* (6), 3775-3779.
51. Pagona, G.; Tagmatarchis, N.; Fan, J.; Yudasaka, M.; Iijima, S., Cone-end functionalization of carbon nanohorns. *Chemistry of Materials*. **2006**, *18* (17), 3918-3920.
52. Sandanayaka, A. S.; Pagona, G.; Fan, J.; Tagmatarchis, N.; Yudasaka, M.; Iijima, S.; Araki, Y.; Ito, O., Photoinduced electron-transfer processes of carbon nanohorns with covalently linked pyrene chromophores: Charge-separation and electron-migration systems. *Journal of Materials Chemistry*. **2007**, *17* (24), 2540-2546.

53. Rotas, G.; Sandanayaka, A. S.; Tagmatarchis, N.; Ichihashi, T.; Yudasaka, M.; Iijima, S.; Ito, O., (Terpyridine) copper (II)- carbon nanohorns: metallo-nanocomplexes for photoinduced charge separation. *Journal of the American Chemical Society*. **2008**, *130* (14), 4725-4731.
54. Zhang, M.; Murakami, T.; Ajima, K.; Tsuchida, K.; Sandanayaka, A. S.; Ito, O.; Iijima, S.; Yudasaka, M., Fabrication of ZnPc/protein nanohorns for double photodynamic and hyperthermic cancer phototherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105* (39), 14773-14778.
55. Miyako, E.; Deguchi, T.; Nakajima, Y.; Yudasaka, M.; Hagihara, Y.; Horie, M.; Shichiri, M.; Higuchi, Y.; Yamashita, F.; Hashida, M., Photothermic regulation of gene expression triggered by laser-induced carbon nanohorns. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109* (19), 7523-7528.
56. Li, J.; He, Y.; He, Z.; Zeng, P.; Xu, S., Synthesis of NaYF<sub>4</sub>: Yb, Er/single-walled carbon nanohorns nanocomposite and its application as cells label. *Analytical Biochemistry*. **2012**, *428* (1), 4-6.
57. Tsang, S.; Chen, Y.; Harris, P.; Green, M., A simple chemical method of opening and filling carbon nanotubes. *Nature* **1994**, *372* (6502), 159-162.
58. Ajayan, P.; Ebbesen, T.; Ichihashi, T.; Iijima, S.; Tanigaki, K.; Hiura, H., Opening carbon nanotubes with oxygen and implications for filling. *Nature* **1993**, *362* (6420), 522-525.
59. Ugarte, D.; Chatelain, A.; De Heer, W., Nanocapillarity and Chemistry in Carbon Nanotubes. *Science* **1996**, *274* (5294), 1897-1899.
60. KuanáChen, Y.; ChiáTsang, S., Synthesis of carbon nanotubes filled with long continuous crystals of molybdenum oxides. *Chemical Communications*. **1996**, (21), 2489-2490.
61. Tiusanen, J.; Vlasveld, D.; Vuorinen, J., Review on the effects of injection moulding parameters on the electrical resistivity of carbon nanotube filled polymer parts. *Composites Science and Technology*. **2012**, *72* (14), 1741-1752.
62. Zein, S. H. S.; Yeoh, L.-C.; Chai, S.-P.; Mohamed, A. R.; Mahayuddin, M. E. M., Synthesis of manganese oxide/carbon nanotube nanocomposites using wet chemical method. *Journal of Materials Processing Technology* **2007**, *190* (1-3), 402-405.
63. Green, M. á. H., Synthesis of carbon nanotubes containing metal oxides and metals of the d-block and f-block transition metals and related studies. *Journal of Materials Chemistry*. **1997**, *7* (3), 545-549.
64. Song, L.; Zhao, F.-Q.; Xu, S.-Y.; Ye, C.-C.; Ju, X.-H., Molecular dynamic insight into aluminum nanoparticles self-encapsulated by CNTs and their oxygen ignition. *Materials Today Communications* **2021**, *28*, 102628.
65. Jiang, J.; Sandler, S. I.; Smit, B., Capillary phase transitions of n-alkanes in a carbon nanotube. *Nano Letters* **2004**, *4* (2), 241-244.
66. Jakubek, Z. J.; Simard, B., Two confined phases of argon adsorbed inside open single walled carbon nanotubes. *Langmuir* **2004**, *20* (14), 5940-5945.
67. Zhang, Z.-S.; Kang, Y.; Liang, L.-J.; Liu, Y.-C.; Wu, T.; Wang, Q., Peptide encapsulation regulated by the geometry of carbon nanotubes. *Biomaterials* **2014**, *35* (5), 1771-1778.
68. Gaufres, E.; Tang, N. Y.-W.; Favron, A.; Allard, C.; Lapointe, F.; Jourdain, V.; Tahir, S.; Brosseau, C.-N.; Leonelli, R.; Martel, R., Aggregation control of  $\alpha$ -sexithiophene via isothermal encapsulation inside single-walled carbon nanotubes. *ACS Nano* **2016**, *10* (11), 10220-10226.
69. Yanagi, K.; Miyata, Y.; Kataura, H., Highly stabilized  $\beta$ -carotene in carbon nanotubes. *Advanced Materials*. **2006**, *18* (4), 437-441.
70. Ajima, K.; Yudasaka, M.; Murakami, T.; Maigné, A.; Shiba, K.; Iijima, S., Carbon nanohorns as anticancer drug carriers. *Molecular Pharmaceutics* **2005**, *2* (6), 475-480.

71. Murakami, T.; Ajima, K.; Miyawaki, J.; Yudasaka, M.; Iijima, S.; Shiba, K., Drug-loaded carbon nanohorns: adsorption and release of dexamethasone in vitro. *Molecular Pharmaceutics* **2004**, *1* (6), 399-405.
72. Casteignau, F.; Aissou, T.; Allard, C.; Ricolleau, C.; Veilleux, J.; Martel, R.; Braidy, N., Synthesis of Carbon Nanohorns by Inductively Coupled Plasma. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* **2022**, 1-17.
73. Park, J. H.; Sut, T. N.; Jackman, J. A.; Ferhan, A. R.; Yoon, B. K.; Cho, N.-J., Controlling adsorption and passivation properties of bovine serum albumin on silica surfaces by ionic strength modulation and cross-linking. *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2017**, *19* (13), 8854-8865.
74. Sweryda-Krawiec, B.; Devaraj, H.; Jacob, G.; Hickman, J. J., A new interpretation of serum albumin surface passivation. *Langmuir* **2004**, *20* (6), 2054-2056.
75. Gast, M.; Kühner, S.; Sobek, H.; Walther, P.; Mizaikoff, B., Enhanced selectivity by passivation: molecular imprints for viruses with exceptional binding properties. *Analytical Chemistry*. **2018**, *90* (9), 5576-5585.
76. Graber, D. J.; Zieziulewicz, T. J.; Lawrence, D. A.; Shain, W.; Turner, J. N., Antigen binding specificity of antibodies patterned by microcontact printing. *Langmuir* **2003**, *19* (13), 5431-5434.
77. Page Faulk, W.; Malcolm Taylor, G., Communication to the editors: An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* **1971**, *8* (11), 1081-1083.
78. Cottenye, N.; Tang, N. Y. W.; Gaufrès, E.; Leduc, A.; Barbeau, J.; Martel, R., Raman tags derived from dyes encapsulated inside carbon nanotubes for Raman imaging of biological samples. *Physica Status Solidi (a)* **2014**, *211* (12), 2790-2794.
79. Izadifar, Z.; Babyn, P.; Chapman, D., Ultrasound cavitation/microbubble detection and medical applications. *Journal of Medical and Biological Engineering* **2019**, *39* (3), 259-276.
80. Amate, M.; Goldgewicht, J.; Sellamuthu, B.; Stagg, J.; Yu, F. T., The effect of ultrasound pulse length on microbubble cavitation induced antibody accumulation and distribution in a mouse model of breast cancer. *Nanotheranostics* **2020**, *4* (4), 256.
81. Zhao, X.; Ando, Y.; Qin, L.-C.; Kataura, H.; Maniwa, Y.; Saito, R., Multiple splitting of G-band modes from individual multiwalled carbon nanotubes. *Applied Physics Letters* **2002**, *81* (14), 2550-2552.
82. Theodorou, V.; Skobridis, K.; Tzakos, A. G.; & Ragoussis, V. A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. *Tetrahedron Letters*, **2007**, *48* (46), 8230-8233.
83. Nitride, C.; Picariello, G.; Mamone, G.; Ferranti, P., Proteomics of Hazelnut (*Corylus avellana*). In *Proteomics in Food Science*, Elsevier: 2017; pp 107-125.
84. Bezerra, M.; Ribeiro, M.; Igrejas, G., An Updated Overview of Almond Allergens. *Nutrients* **2021**, *13* (8), 2578.
85. Beisson, F.; Ferte, N.; Vouloury, R.; Arondel, V., Large scale purification of an almond oleosin using an organic solvent procedure. *Plant Physiology and Biochemistry* **2001**, *39* (7), 623-630.
86. Garino, C.; De Paolis, A.; Coisson, J. D.; Arlorio, M., Pru du 2S albumin or Pru du vicilin? *Computational Biology and Chemistry* **2015**, *56*, 30-32.
87. Robotham, J. M.; Wang, F.; Seamon, V.; Teuber, S. S.; Sathe, S. K.; Sampson, H. A.; Beyer, K.; Seavy, M.; Roux, K. H., Ana o 3, an important cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) allergen of the 2S albumin family. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2005**, *115* (6), 1284-1290.
88. Bastiaan-Net, S.; Reitsma, M.; Cordewener, J. H.; van der Valk, J. P.; America, T. A.; Dubois, A. E.; van Wijk, R. G.; Savelkoul, H. F.; de Jong, N. W.; Wichers, H. J., IgE cross-reactivity of cashew nut allergens. *International Archives of Allergy and Immunology* **2019**, *178* (1), 19-32.
89. Tremblay, M.H.; Gelle, A.; Skene, W.G., Ambipolar azomethines as potential cathodic color switching materials. *New Journal of Chemistry* **2017**, *41*(6), pp.2287-2295.

