

Développement d'une nanoplateforme SERS simple et abordable à base de papier pour la détection rapide d'acides nucléiques

Ismaël Mahboub

*Institut de Recherche Interdisciplinaire en
Bio-nano-sciences
Département de Physique Biomoléculaire,
Faculté de Physique, Université Babes-
Bolyai, Cluj-Napoca, Roumanie
ismael.mahboub@ubbcluj.ro*

Monica Potara

*Institut de Recherche Interdisciplinaire en
Bio-nano-sciences
Cluj-Napoca, Roumanie
Monica.potara@ubbcluj.ro*

Septimiu Tripon

*Institut National de Recherche et de
Développement des Technologies
Isotopiques et Moléculaires,
Université Babes-Bolyai,
Cluj-Napoca, Roumanie
Septimiu.tripon@ubbcluj.ro*

Simion Astilean

*Institut de Recherche Interdisciplinaire en
Bio-nano-sciences
Département de Physique Biomoléculaire,
Faculté de Physique, Université Babes-
Bolyai, Cluj-Napoca, Roumanie
simion.astilean@ubbcluj.ro*

Monica Focsan

*Institut de Recherche Interdisciplinaire en
Bio-nano-sciences
Département de Physique Biomoléculaire,
Faculté de Physique, Université Babes-
Bolyai, Cluj-Napoca, Roumanie
monica.iosin@ubbcluj.ro*

Marc Lamy de la Chapelle

*Institut de Recherche Interdisciplinaire en
Bio-nano-sciences
Institut des Molécules et Matériaux
du Mans (IMMM - UMR6283),
Université du Mans
Le Mans, France
marc.lamydelachapelle@univ-lemans.fr*

I. INTRODUCTION

La spectroscopie Raman exaltée de surface (SERS) est une technique analytique de pointe, reconnue pour sa sensibilité exceptionnelle, son caractère non destructif et sa rapidité [1]. Elle permet la détection en temps réel d'analytes à des concentrations ultra-faibles. Toutefois, la conception de substrats SERS à la fois reproductibles, économiques et performants demeure un défi majeur.

Dans ce contexte, nous avons développé une nanoplateforme plasmonique à base de papier, optimisée pour une détection SERS simple, rapide et sensible, présentant un fort potentiel pour l'analyse des acides nucléiques. Le substrat papier constitue un compromis idéal entre simplicité, flexibilité et faible coût de production. Il permet de concevoir des dispositifs portables tout en atteignant des limites de détection très faibles, faisant ainsi de ce type de support une solution prometteuse pour la détection SERS [2].

Dans cette étude, nous avons commencé par évaluer les performances de la nanoplateforme. Pour cela, nous avons utilisé l'acide 4-mercaptobenzoïque (4-MBA), une sonde SERS bien connue pour sa capacité à générer un signal intense. Nous avons donc mesuré l'intensité SERS du 4-MBA en faisant varier la concentration des nanoparticules d'or déposées sur la nanoplateforme, afin de déterminer la configuration plasmonique optimale.

Dans un second temps, afin d'évaluer la capacité de la nanoplateforme à détecter des acides nucléiques, nous avons utilisé une solution de SH-PolyA20b à une concentration de 10^{-4} M. Il s'agit d'une séquence d'ADN composée de 20 adénosines, servant ici de biorécepteur en vue d'étudier, à terme, son hybridation avec le brin complémentaire PolyT20b. L'objectif est de mettre en évidence la variation d'intensité SERS induite par la formation de la double hélice, permettant ainsi de quantifier la concentration de biomarqueurs dans le cadre de diverses applications.

II. METHODES

Les nanoplateformes ont été fabriquées à l'aide de nanosphères d'or synthétisées en solution (AuNPs). Celles-ci ont été déposées sur du papier Whatman par cycles successifs d'immersion de 5 secondes, permettant ainsi de recouvrir uniformément la surface du support avec les AuNPs. Les papiers ont ensuite été laissés sécher à l'air libre à température ambiante.

Les analytes à étudier ont été ajoutés par dépôt successif de trois gouttes de 5 μ L de solution sur la nanoplateforme.

Les nanoparticules d'or (AuNPs) ont été synthétisées par voie chimique selon la méthode de Turkevich [3]. Pour cela, 50 mL d'une solution d'acide tétrachloroaurique (HAuCl_4) à 1 mM ont été portés à ébullition sous agitation magnétique vigoureuse. Une fois le point d'ébullition atteint, 5 mL de citrate de sodium ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) à 38,8 mM ont été ajoutés rapidement à la solution. La réaction a été maintenue à 100°C sous agitation pendant 15 minutes, la solution a ensuite été laissée refroidir naturellement à température ambiante.

Les mesures d'extinction de la résonance plasmonique de surface localisée (LSPR) des AuNPs ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre Jasco V-670 UV-Vis-NIR.

Les mesures SERS du 4-MBA ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre Raman portable Raman R3000CN, équipé d'une diode laser à 785 nm couplée à une fibre optique de 100 μ m. La puissance du laser utilisée était de 64,5 mW, avec un temps d'acquisition de 15 secondes par spectre.

Enfin, les mesures du SH-PolyA20b ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre Raman confocal Witec Alpha300R. Le laser utilisé pour les mesures était un He-Ne à 632,8 nm. L'objectif utilisé était un x50, avec un temps d'intégration de 30 secondes et 1 accumulation par spectre. La puissance du laser était de 0,137 mW.

III. RESULTATS

Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence du nombre de cycles d'immersion dans les colloïdes d'AuNPs sur la réponse plasmonique des nanoplateformes. **La Figure 1** met en évidence une augmentation progressive de l'intensité d'extinction en fonction du nombre de cycles. Cette augmentation de la réponse optique est directement corrélée à l'enrichissement en AuNPs sur le papier. La courbe noire, correspondant aux AuNPs en solution, sert de contrôle et permet de comparer l'évolution du maximum de la LSPR ($\lambda = 522$ nm) en fonction des cycles d'immersion.

On observe ainsi un décalage de la LSPR, de $\lambda = 522$ nm (colloïdes) à $\lambda = 520$ nm pour l'ensemble des nanoplateformes plasmoniques. Cependant, en comparant les spectres des différentes nanoplateformes, on constate qu'une augmentation de la concentration en AuNPs entraîne un léger décalage de la LSPR vers des longueurs d'onde plus élevées. Ce phénomène est attribué à une augmentation du taux d'agrégation des AuNPs sur la surface du support. Ce comportement est particulièrement marqué dans la région spectrale comprise entre 650 et 700 nm, où une élévation notable de l'intensité d'extinction traduit la formation accrue d'agrégats de AuNPs.

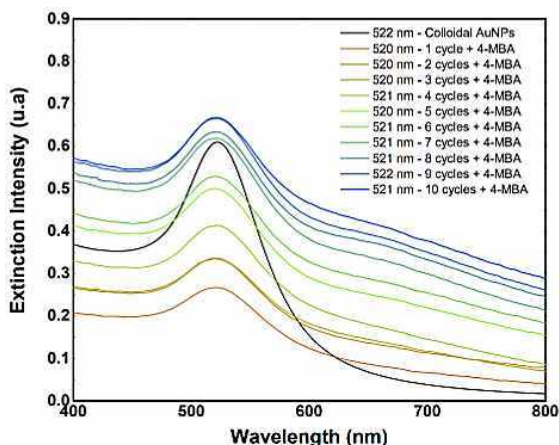


Figure 1 : Spectres d'extinction des colloïdes d'AuNPs (en noir) et des différents cycles d'immersion sur papier (en couleur) du cycle 1 (rouge) au cycle 10 (bleu).

Les images obtenues par microscopie électronique (**Figure 2a et 2b**) permettent de mieux visualiser la distribution des nanoparticules sur les fibres de cellulose de la nanoplateforme. On remarque clairement la présence sur la **figure 2a**, correspondant à 1 cycle d'immersion, d'une concentration relativement faible de AuNPs, la plupart étant isolées.

En revanche, la **Figure 2b**, correspondant à 6 cycles d'immersion, révèle une concentration nettement plus élevée de AuNPs, avec notamment la présence d'agrégats. Ce qui est en adéquation avec les réponses plasmoniques obtenues sur la **Figure 1**.

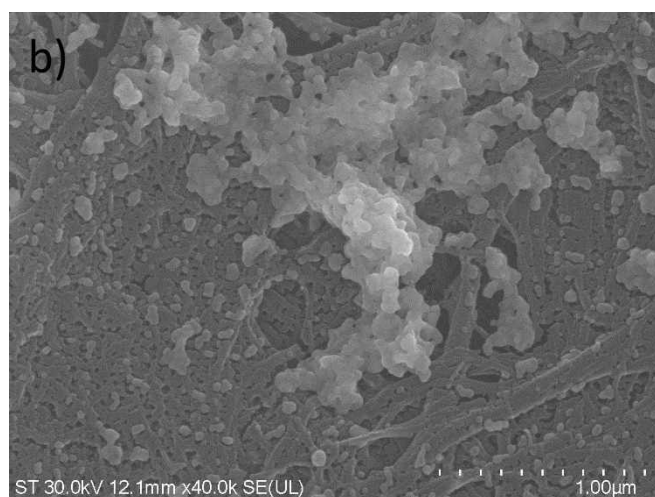
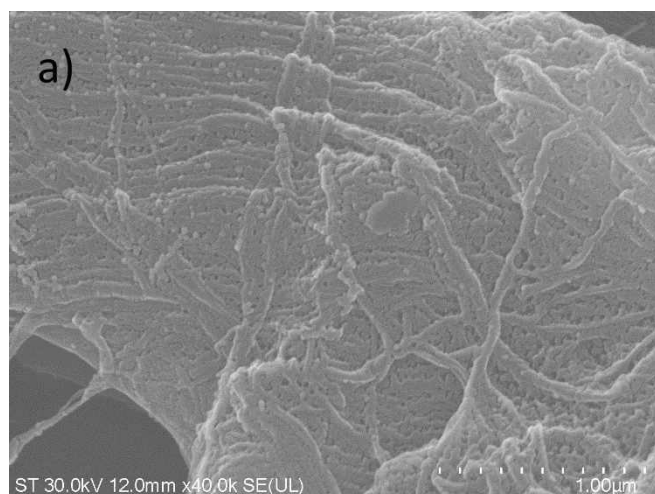


Figure 2 : Image obtenue par Microscopie Électronique à Balayage (MEB) des nanoplateformes après 1 (a) et 6 (b) cycles d'immersion.

La **Figure 4** présente les spectres d'intensité Raman du 4-MBA (**figure 3**), reconnaissables grâce à ses deux pics caractéristiques à 1080 cm^{-1} et 1590 cm^{-1} [4]. On observe que, selon le nombre de cycles d'immersion, l'intensité SERS augmente progressivement pour atteindre un maximum après 6 cycles d'immersion, avant de diminuer. Cette tendance est liée à l'augmentation de la concentration en AuNPs et à la formation de points chauds générés par les agrégats. Plus le taux d'agrégation des AuNPs est élevé, plus la probabilité d'obtenir un signal provenant d'un point chaud augmente, ce qui permet d'obtenir des intensités SERS beaucoup plus élevées. Cependant, de trop gros agrégats de AuNPs peuvent entraîner une diminution du signal SERS en raison de la perte de la réponse optique des AuNPs.

Figure 3 : Structure moléculaire de l'acide 4-mercaptobenzoïque (4-MBA).

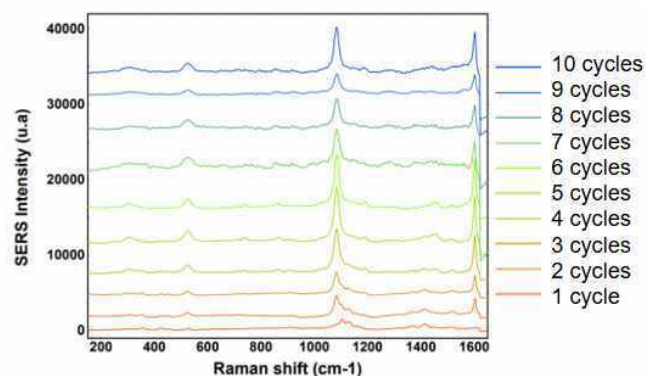


Figure 4 : Intensités SERS du 4-MBA (10^{-4} M) en fonction du nombre de cycles d'immersion dans les AuNPs, du cycle 1 (rouge) au cycle 10 (bleu).

Finalement, pour valider les performances de nos nanoplateformes dans la détection de biomolécules, généralement plus difficiles à analyser en SERS en raison de leur section efficace de diffusion plus faible, des tests de détection du SH-PolyA20b (**figure 5**) ont été réalisés. Pour cela, nous avons choisi les nanoplateformes à 1 et 6 cycles d'immersion dans les AuNPs. Le cycle 6 représente un bon compromis entre concentration et taux d'agrégation, maximisant ainsi les chances d'obtenir des signaux SERS intenses tout en évitant une inhomogénéité trop importante et la perte de signal due à un taux d'agrégats trop élevé. Le cycle 1, quant à lui, permet de confirmer que l'intensité SERS dépend directement de la concentration en AuNPs sur le substrat.

Sur la **figure 6**, une différence marquée d'intensité SERS est observée entre les deux nanoplateformes. La présence du pic caractéristique de l'Adénine autour de 734 cm^{-1} [5] confirme, dans un premier temps, la capacité de ce type de nanoplateforme à détecter des biomolécules, même à faible concentration en AuNPs. Cette performance est particulièrement illustrée par le signal SERS nettement plus intense obtenu avec la nanoplateforme à 6 cycles d'immersion, comparé à celle à 1 cycle. Cela démontre que l'intensité du signal SERS peut être significativement optimisée en ajustant la configuration de la nanoplateforme, ouvrant ainsi la voie à de nombreuses applications potentielles en détection biomoléculaire.

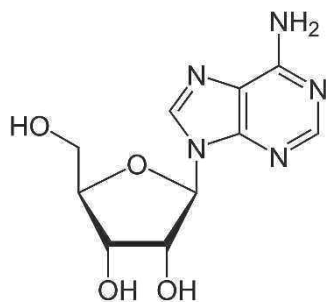


Figure 5 : Structure moléculaire de l'Adénosine.

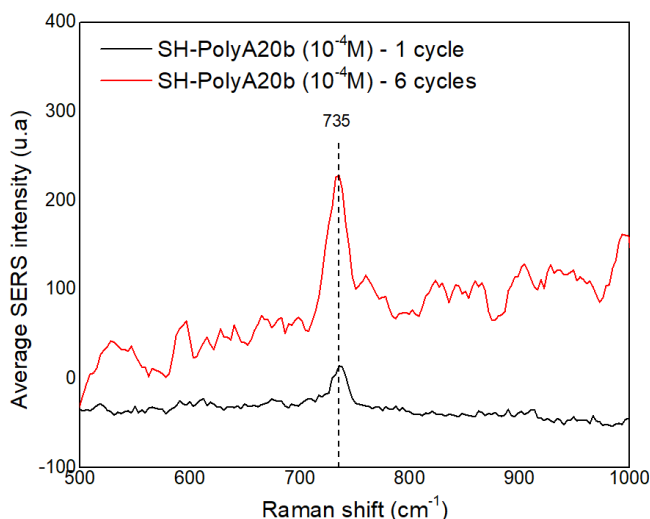


Figure 6 : Intensités SERS moyennes du SH-PolyA20b (10^{-4} M) en fonction des cycles d'immersion, 1 (noir) et 6 (rouge).

CONCLUSIONS

À travers cette étude, nous avons pu démontrer que cette nanoplateforme plasmonique simple, à base de papier, offre une solution économique, portable et sensible pour la détection SERS. Son adaptabilité et ses performances dans l'analyse des acides

nucléiques soulignent son potentiel pour des applications variées dans le domaine du diagnostic médical.

Les futures études se concentreront sur l'optimisation de la nanoplateforme et l'élargissement de son champ d'application, notamment grâce à la polyvalence des aptamères, ce qui permettra de détecter une grande diversité de types moléculaires. Dans un contexte médical, les prochaines recherches porteront sur la détection des microARN.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été soutenu par le projet « Biologie médiée par les plasmons : exploitation de la plasmonique pour étudier et améliorer les processus biologiques et application aux problématiques biomédicales (acronyme : BioPlasmonics) », financé par l'Union européenne – NextGenerationEU et le Gouvernement roumain, dans le cadre du Plan National de Relance et de Résilience pour la Roumanie, contrat n° 760037/23.05.2023, code PNRR-C9-I8-CF-199/28.11.2022, via le Ministère roumain de la Recherche, de l'Innovation et de la Numérisation, dans le cadre de la Composante 9, Investissement I8.

REFERENCES

- [1] Zhang, Z., Liang, X., Liu, X., Jiang, R., Xu, Q.-H., & Wang, J. (2024). Surface-enhanced Raman spectroscopy: a half century historical perspective. *Chemical Society Reviews*, **53**(7), 1886–1930.
- [2] Campu, A.; Mureșan, I.; Crăciun, A.-M.; Vulpoi, A.; Căinap, S.; Astilean, S.; Focșan, M. Innovative, Flexible, and Miniaturized Microfluidic Paper-Based Plasmonic Chip for Efficient Near-Infrared Metal Enhanced Fluorescence Biosensing and Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2023**, *15* (48), 55925–55937.
- [3] Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussion of the Faraday Society*, *11*, 55–75.
- [4] Wang, Y., Zeng, C., Zhao, Q., & Wang, H. (2015). "SERS of 4-Mercaptobenzoic Acid: Mechanisms and Application to Sensing," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *478*, 182–189.
- [5] Madzharova, F., Heiner, Z., Gühlke, M., & Kneipp, J. (2017). Surface-Enhanced Hyper-Raman Spectra of Adenine, Guanine, Cytosine, Thymine, and Uracil. *The Journal of Physical Chemistry C*, *121*(9), 5209–5215.