



HAL
open science

Thermodynamique de l'assemblage de nano-structures et d'origami d'ADN

Clothilde Coilhac

► **To cite this version:**

Clothilde Coilhac. Thermodynamique de l'assemblage de nano-structures et d'origami d'ADN. Science des matériaux [cond-mat.mtrl-sci]. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAY007 . tel-01831617

HAL Id: tel-01831617

<https://theses.hal.science/tel-01831617v1>

Submitted on 6 Jul 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Nanophysique**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Clothilde COILHAC

Thèse dirigée par

Olivier BOURGEOIS, Directeur de recherche, Institut Néel/CNRS
et

Hervé GUILLOU, Maître de conférence, UGA

préparée au sein de l'Institut Néel/CNRS

dans l'**École Doctorale de Physique de Grenoble**

Thermodynamique de l'assemblage de nanostructures et d'origami d'ADN

Thèse soutenue publiquement le **14 février 2018**
devant le jury composé de :

Madame Élisabeth CHARLAIX

Professeur, LIPHY, Présidente

Monsieur Yannick RONDELEZ

Chargé de Recherche, CNRS/ESPCI, Rapporteur

Monsieur Javier RODRIGUEZ VIEJO

Professeur, Universitat Autònoma de Barcelona, Rapporteur

Monsieur Juan ELEZGARAY

Directeur de Recherche, CBMN/CNRS, Examineur

Monsieur Olivier BOURGEOIS

Directeur de Recherche, Institut Néel/CNRS, Directeur de thèse

Monsieur Hervé GUILLOU

Maître de conférence, UGA, Codirecteur de thèse



Remerciements

Alors que cette aventure de trois ans (et plus si affinité) touche à sa fin, arrive la rude tâche de devoir remercier toutes les personnes qui ont contribuées, de près ou de loin, à faire de cette thèse une expérience inoubliable.

J'aimerais dans un premier temps remercier les membres du jury : Yannick Rondelez, Javier Rodriguez Viejo, Juan Elezgaray et Elisabeth Charlaix pour avoir consacré du temps pour la lecture de ce travail de thèse et d'avoir fait le déplacement pour la soutenance. Je tiens également à remercier L'Université Grenoble Alpes qui a fourni la bourse de thèse permettant de financer ce travail.

Tout ce travail n'aurait pas été possible sans mes directeurs de thèse Hervé Guillou et Olivier Bourgeois, qui m'ont encadré pendant ces trois années. Un grand merci à tous les deux pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce sujet de thèse au sein de l'équipe TPS. Merci pour vos soutiens, conseils, bonne humeur, discussions scientifiques ou autres ! Cette thèse a été une expérience très enrichissante qui m'a permis d'apprendre énormément et dans des domaines très variés. Ça a été une chance de pouvoir travailler dans un environnement de travail aussi stimulant et convivial !

J'aimerais également remercier les stagiaires qui ont travaillé sur ce projet de thèse et qui ont apporté leurs pierres à l'édifice. Merci donc à Benjamin Lambert, Maxime David et Jérôme Richard.

Les pôles et services de l'institut Néel ont été d'une grande aide au cours de cette thèse. Je tiens à remercier Gaël Moiroux, Anne Gérardin, Emmanuel André et Jean-Luc Garden qui ont contribué au développement du calorimètre et du capteur ainsi que l'ensemble des membres des pôles capteur, cryogénie, électronique, informatique, optique et nanofab.

Un grand merci à Adib, Tiphaine et Olivier pour tous les bons moments passés dans les bars et autres depuis le moment où nous étions de jeunes thésards insouciantes jusqu'aux durs moments de la rédaction !

Merci également à l'ensemble de l'équipe TPS (Thermodynamique et biophysique des Petits Systèmes)¹ pour leurs contributions au cadre de travail toujours très agréable, pour

¹ou Teuf, Physique et Sport

les soirées rasaca, les sorties ski, squash, badminton etc. Merci à Dimitri, Jacques, Cécile, Antoine, Yanqing, Tuyen, Jessy, Rahul, Dhruv, Anaïs, Céline.

Parce qu'il n'y a pas eu que la thèse pendant ces trois années, je souhaite également remercier mes colocataires Cyrielle, Nelly, et Flavie avec qui j'ai pu découvrir la ville de Grenoble, et plus récemment Fred et Pauline. Merci aussi à Baptiste pour les sorties ski de rando, Fabien et Cécile pour les sorties hockey, rando, et bien d'autres encore!

Merci aux bécégistes qui m'ont permis de me maintenir en forme en jouant au bad et plus spécialement à la BCG4 : Manue, Sandra, Émeline, Anne-Claire, Yann, Loïs, Alexandre, Pierre-Yves, Floflo.

Pour finir, j'aimerais remercier ma famille qui a toujours été présente. Merci Clémence pour ton soutien inconditionnel! Tout le monde n'a pas la chance d'avoir une sœur jumelle comme toi!

Merci à tous!

Résumé

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est le support de notre génome, c'est aussi un biopolymère dont les propriétés d'hybridation de deux simples brins complémentaires en une double hélice permettent son utilisation comme brique élémentaire pour l'auto-assemblage de structures avec une résolution de quelques nanomètres. Parmi les différentes méthodes d'assemblage développées, l'origami d'ADN dans lequel un simple brin d'ADN issu du génome d'un phage est replié de manière programmable par un ensemble de brins synthétiques plus petits appelés agrafes, permet l'assemblage de structures bi ou tri-dimensionnelles de manière très robuste. La conception de ces origami est basée sur la thermodynamique à l'équilibre, c'est à dire sur l'optimisation de l'appariement complémentaire des bases. Cependant, bien que des outils interactifs qui facilitent la conception de structures aient été développés, très peu de recherches se sont focalisées sur le processus du repliement et sur son optimisation. Notre travail a consisté à étudier la thermodynamique de nanostructures d'ADN afin de mieux comprendre le processus d'assemblage et d'en identifier des étapes clés.

Nous avons effectué des mesures en calorimétrie différentielle à balayage (DSC) sur des structures modèles et des origami d'ADN. Ainsi, nous avons pu identifier la présence d'étapes clés dans le repliement de nanostructures comportant un petit nombre de brins d'ADN. Nous montrons qu'en modifiant les séquences il est possible de changer la coopérativité et la stabilité de l'assemblage des nanostructures et donc de modifier le chemin de repliement.

L'étude d'origami simplifiés comportant une ou deux agrafes nous a permis de mesurer l'influence de la position des agrafes, de la taille des boucles et de l'orientation des brins d'ADN sur la thermodynamique du repliement. Enfin, les mesures calorimétriques effectuées sur des origami d'ADN nous ont permis de résoudre l'hybridation collective d'ensembles d'agrafes. Cela nous permet de hiérarchiser l'assemblage de l'origami en domaines distincts.

Ce travail de thèse a également consisté au développement de méthodes innovantes de nanocalorimétrie ultrasensible intégrant de la microfluidique. Ces méthodes calorimétriques permettront d'accéder aux paramètres cinétiques de l'assemblage en plus des paramètres thermodynamiques à l'équilibre.

Nos résultats obtenus sur les nanostructures modèles montrent qu'il est possible d'optimiser la conception des nanostructures d'ADN en intégrant dans la conception le processus d'assemblage. Des nanostructures d'ADN à l'assemblage performant permettront peut-être à l'avenir le développement d'automates moléculaires synthétiques qui sont une des applications très prometteuses de ces systèmes.

Abstract

DNA is the support of genetic information. Moreover its property of self-assembly of two complementary single strands into a double helix enable the use of this biopolymer as a building block for nanofabrication. DNA origami is a strategy that enable the self-assembly of 2D or 3D nanostructures. In DNA origami, a long single-stranded DNA taken from the genome of a phage is folded on itself in a programmable way thanks to a lot of short synthetic DNA strands. The design of origami is based on the thermodynamics and on the optimization of base pairing in the structure. However, although interactive tools that facilitate the design of DNA nano-structures have been developed, we know little about the folding process and its optimization. In this work, we study the thermodynamics of DNA nanostructures in order to have a better understanding of the folding processes and to identify the key steps of the folding.

We performed differential scanning calorimetry (DSC) on model structures and on DNA origami. Thus, we have been able to identify the presence of key steps in the folding of small nanostructures. We show that by changing the sequences of some strands, it is possible to modify the cooperativity and the stability of the assembly of the nanostructure and thus change the folding path. The study of small origami with one or two staples allowed us to see the influence of the position of the staples, the size of the loops and the orientation of the staples on the thermodynamics of the folding. Finally, the calorimetric measurements performed on origami allowed us to solve the collective hybridization of some staple sets. This enable us to prioritize the origami assembly into separate domains.

This work also consisted of the development of innovative methods of ultra-sensitive nano-calorimetry integrating microfluidics. These calorimetric methods will give us the access to the kinetic parameters of the folding and to the equilibrium thermodynamic parameters.

Our results obtained on model nanostructures show that it is possible to optimize the design of DNA nanostructures by integrating the assembly process in the design of the structures. Such high-performance DNA origami may allow in the future the development of molecular robot which is a very promising application of DNA nanostructures.

Table des matières

Remerciements	1
Résumé	2
Abstract	3
Table des matières	5
Introduction	1
1 Fabrication de nano-structures et d'origami d'ADN	3
1.1 L'ADN : une brique de base pour la nanofabrication	4
1.1.1 Avantages de l'ADN pour la nanofabrication	4
1.1.2 Au delà de la double hélice	7
1.1.3 Nanocages d'ADN	9
1.1.4 Origami d'ADN	10
1.1.5 Applications	15
1.1.6 Conclusion sur les nano-structures d'ADN	15
1.2 Vers une conception plus rationnelle des structures d'ADN	16
1.2.1 Discussion sur la méthode de conception des origami d'ADN	16
1.2.2 Analogie avec le problème du repliement des protéines	17
1.3 Étude du processus de repliement des structures d'ADN	19
1.3.1 Méthodes utilisées pour l'étude de la thermodynamique du replie- ment de structures d'ADN	19
1.3.2 Guider le repliement des nanostructures d'ADN	21
1.3.3 Motivations	22
2 La calorimétrie pour l'étude thermodynamique de l'assemblage de struc- tures d'ADN	23
2.1 La calorimétrie	24
2.1.1 Principe général des calorimètres	24
2.1.2 Thermométrie	26
2.1.3 Méthodes courantes utilisées en calorimétrie	27
2.1.4 Intérêt de la DSC et de l'ITC pour l'étude de l'assemblage de struc- tures d'ADN	32
2.2 Thermodynamique de l'hybridation d'une double hélice d'ADN	37

2.2.1	Variation d'enthalpie, d'entropie et d'énergie libre	40
2.2.2	Température de fusion	40
2.2.3	Variation de chaleur spécifique	42
2.2.4	Modèle du plus proche voisin	43
2.2.5	Limites du modèle du plus proche voisin	44
2.3	Analyse des données en DSC	45
2.3.1	Traitement de données	45
2.3.2	Stabilité des structures d'ADN	49
2.3.3	Déconvolution en transitions intermédiaires à deux états	50
2.4	Coopérativité de l'assemblage de structures d'ADN	51
2.4.1	Différents niveaux de coopérativité	52
2.4.2	Evaluation qualitative de la coopérativité par la variation d'enthalpie de Van't Hoff	53
2.5	Conclusion	56
3	Thermodynamique du repliement de tétraèdres d'ADN	59
3.1	Descriptions des nanocages en forme de tétraèdre	60
3.2	Repliement du tétraèdre T_{17}	62
3.2.1	Chaleur spécifique excédentaire, variation d'enthalpie, variation d'entropie	62
3.2.2	Influence de la force ionique sur les paramètres thermodynamiques du repliement	64
3.2.3	Coopérativité lors du repliement du tétraèdre T_{17}	66
3.2.4	Déconvolution en une succession de transitions à deux états	69
3.2.5	Conclusion sur le tétraèdre T_{17}	72
3.3	Repliement du tétraèdre T_{20}	74
3.3.1	Identification d'états intermédiaires dans le repliement du tétraèdre T_{20}	75
3.3.2	Coopérativité et stabilité des différents tétraèdres	78
3.3.3	Déconvolution et chemin de repliement	79
3.3.4	Limites de la méthode de déconvolution	87
3.3.5	Coopérativité, stabilité, compétition	87
3.4	Conclusion	89
4	Repliement des origami d'ADN	91
4.1	Repliement de boucles d'ADN	91
4.1.1	Position <i>int</i>	92
4.1.2	Position <i>ext</i>	94
4.1.3	Coopérativité	96
4.1.4	Modèle de Jacobson et Stockmayer	97
4.1.5	Conclusion	99
4.2	Repliement d'origami à deux agrafes	100
4.2.1	Réduction de la boucle et formation de jonction Holliday	100
4.2.2	Orientation des agrafes, interaction d'empilement et jonction Holliday	103
4.2.3	Conclusion sur les origami à deux agrafes	107

4.3	Repliement des origami d'ADN	108
4.3.1	Coopérativité dans le repliement d'origami d'ADN	108
4.3.2	Importance relative de différents types d'agrafes sur le repliement d'un origami rectangulaire 2D	116
4.3.3	Comparaison de plusieurs stratégies de repliement	119
4.3.4	Conclusion et perspectives	127
5	Développement d'un nano-calorimètre à flux	131
5.1	Développement du capteur microfluidique	132
5.1.1	Principe général de fonctionnement	132
5.1.2	Développement du capteur	135
5.2	Développement du calorimètre	141
5.2.1	Description du calorimètre	141
5.2.2	Système de pompage et micro-fluidique	141
5.2.3	Régulation des étages	142
5.3	Mesures de la régulation du calorimètre	145
5.4	Caractérisations des capteurs	146
5.4.1	Calcul des coefficients de températures	146
5.4.2	Mesure du bruit et de la dérive des thermomètres	148
5.4.3	Mesure de la sensibilité du thermomètre	151
5.5	Conclusion	152
	Conclusion	153
	Bibliographie	158
	A Schéma des origami	169
	B Séquences des agrafes	179

Introduction

La découverte de la structure de la molécule d'ADN est une des plus grandes découvertes du XX^{ième} siècle et a engendré l'essor de la génétique telle qu'on la connaît actuellement. La molécule d'ADN, en plus d'être le support de l'information génétique dans tous les êtres vivants, est aussi une molécule qui possède des propriétés physiques très intéressantes qui permettent son utilisation comme matériau de construction pour l'assemblage de nano-structures. Ces nano-structures auto-assemblées d'ADN ciblent des applications dans des domaines très variés comme la médecine, l'optique, ou encore l'électronique et la robotique.

De nombreuses structures d'ADN ont été assemblées, cependant peu de recherches se sont intéressées au processus du repliement lui-même. Pourtant ce processus est un problème fondamental en biologie qui dépasse largement le domaine des nanotechnologies. Comment une structure ou une forme finale fonctionnelle est encodée de manière optimale par une séquence? Dans le cas des protéines, la séquence est une série d'acides aminés ayant des interactions complexes les uns avec les autres. L'optimisation de la structure est certainement liée à une sélection par un processus d'évolution qui optimise à la fois la fonction et la robustesse du repliement. Dans le cas des nano-structures d'ADN, la séquence est une série de nucléotides potentiellement synthétiques dont les interactions sont configurables. L'optimisation s'est concentrée sur la conception de structures originales de plus en plus complexes sans chercher à contrôler le processus d'assemblage lui-même afin d'en augmenter le rendement ou la robustesse dans un sens large.

Le but de ce travail de thèse est donc de mieux comprendre le processus d'assemblage de nano-structures d'ADN afin d'en optimiser le repliement et de concevoir des nano-structures complexes et fonctionnelles qui cibleront les applications imaginées pour ces objets. Pour cela nous développons une approche expérimentale originale en basant notre travail sur les mesures des propriétés thermodynamiques des nano-assemblages d'ADN. Nous utilisons en particulier la calorimétrie différentielle à balayage (DSC).

Nous allons voir dans le chapitre 1 comment l'ADN peut être utilisé comme une brique de base pour la nano-fabrication et quels sont les différents types de structures qui ont été assemblés à partir d'ADN. Nous verrons également comment ces structures sont caractérisées et les méthodes qui ont été utilisées pour en étudier le repliement. Nous utiliserons ces résultats afin de formuler nos hypothèses sur les principes qui décrivent le repliement des structures d'ADN.

Nous verrons ensuite dans le chapitre 2 le principe général des différentes méthodes de calorimétrie et comment celles-ci peuvent être utilisées pour étudier la thermodynamique du repliement de structures d'ADN.

Nous avons étudié la thermodynamique de structures modèles afin de valider la méthode expérimentale et d'identifier des étapes clés lors du repliement de structures simples. Pour cela, nous avons d'abord étudié le repliement de différents tétraèdres d'ADN ce qui fera l'objet du chapitre 3. Nous verrons comment la DSC a pu être utilisée pour déconvoluer une transformation multi-moléculaire en une succession d'étapes intermédiaires et comment nous avons pu modifier le chemin de repliement de tétraèdres d'ADN en modifiant les séquences de certains brins.

Dans le chapitre 4, nous nous intéresserons au repliement d'un type de structure particulier qui est l'origami d'ADN. L'origami d'ADN est le repliement d'un long brin d'ADN sur lui-même grâce à l'hybridation d'un grand nombre de petites "agrafes" d'ADN. Cette méthode permet l'assemblage de grandes structures 2D ou 3D. Nous commencerons par étudier le repliement de petites structures élémentaires à la base des origami d'ADN qui sont les boucles d'ADN et les origami à deux agrafes avant de nous intéresser à des origami complets. Nous verrons comment nous pouvons évaluer la coopérativité du repliement et comment l'utilisation de mélanges réduits de brins permet de hiérarchiser différentes étapes du repliement.

Les mesures par DSC nous apportent des informations cruciales sur la thermodynamique à l'équilibre des nano-structures. Cependant nous verrons au cours de cette thèse que le processus d'assemblage des grandes structures est un processus hors équilibre. Pour cela, il va être nécessaire d'effectuer des mesures de titration calorimétrique isotherme (ITC) qui sont des mesures complémentaires à la DSC qui devraient nous permettre de mesurer des échanges de chaleur au cours de processus hors-équilibre. Dans le chapitre 5, nous présenterons le développement d'un capteur calorimétrique intégrant de la microfluidique conçu pour effectuer des mesures calorimétriques de type ITC. Le développement ainsi que les performances du calorimètre et du capteur seront présentés. Cette dernière partie du travail de thèse représente un défi instrumental majeur car la chambre de réaction a été réduite considérablement par rapport aux calorimètres commerciaux afin de pouvoir effectuer des mesures sur des très faibles quantités d'ADN. La stabilité de nos régulations de température nous a permis de caractériser la dérive des thermomètres en NbN qui sont des thermomètres de très haute sensibilité utilisés au sein du groupe pour de nombreuses applications en physique du solide.

Chapitre 1

Fabrication de nano-structures et d'origami d'ADN

La molécule d'ADN est une molécule célèbre pour être le support de l'information génétique chez tous les êtres vivants. Sa structure en double hélice est rentrée dans l'imaginaire collectif en devenant le symbole de la génétique et des biotechnologies tant les efforts passés se sont concentrés sur le séquençage des génomes des êtres vivants. Dans ce travail de thèse, nous n'utilisons pas directement l'ADN pour ses capacités à être le support de l'information génétique, mais comme un matériau qui permet d'assembler des nanostructures de manière programmable. La science qui étudie l'assemblage de nanostructures à base d'ADN a été baptisée nanotechnologie structurales de l'ADN par un de ses pionniers, Nadrian Seeman [1].

Nous allons d'abord voir dans ce chapitre d'introduction en quoi les propriétés de l'ADN permettent l'auto-assemblage de nanostructures. Dans un second temps, nous nous intéresserons plus particulièrement à la méthode d'assemblage des origami d'ADN qui permet d'obtenir des structures de quelques centaines de nanomètres. Enfin, nous verrons pourquoi il est nécessaire de mieux comprendre la thermodynamique de l'assemblage des structures d'ADN pour en améliorer leur conception et quelles sont les méthodes qui peuvent être utilisées pour cela. Cela nous permettra de poser les hypothèses et le cadre général dans lequel le travail de thèse se situe.

1.1 L'ADN : une brique de base pour la nanofabrication

1.1.1 Avantages de l'ADN pour la nanofabrication

L'ADN ou acide désoxyribonucléique est un polymère de nucléotides, chacun composé d'une base, d'un sucre, et d'un groupe phosphate (voir figure 1.1). Les nucléotides sont liés les uns aux autres par des liaisons covalentes entre les phosphates et les désoxyriboses situés sur les carbones 3' et 5' des sucres ce qui donne une direction à la molécule d'ADN. Quatre types de bases composent l'ADN génomique : l'adénine, la thymine, la guanine et la cytosine (ou A, T, C, G). C'est la séquence en ces quatre nucléotides qui code l'information génétique de chaque être vivant. Les nucléotides peuvent s'apparier deux à deux par le biais de liaisons hydrogène et ainsi former une double hélice. Les bases puriques (A et G) forment respectivement 2 et 3 liaisons hydrogène avec les bases pyrimidiques (T et C) (voir figure 1.2). Deux simples brin d'ADN complémentaires et antiparallèles (de sens opposés) peuvent ainsi s'auto-assembler pour former la fameuse structure en double hélice découverte par Watson et Crick en 1953 [2]. La double hélice d'ADN existe sous trois conformations différentes suivant les conditions d'hydratation, de force ionique et la séquence en nucléotides. Les trois conformations A, B et Z sont représentées dans la figure 1.1.

L'ADN s'auto-assemble le plus fréquemment selon les interactions de Watson-Crick, mais ce n'est pas la seule façon de former des paires entre deux nucléotides. L'appariement de Hoogsteen permet la formation de paires de bases mettant en jeu une face différente de la purine. Cette interaction est présente dans des structures plus complexes de l'ADN comme la triple hélice d'ADN [3] ou le G quadruplex [4]. La triple hélice d'ADN est composée d'une double hélice d'ADN B formée d'un brin homo-purique, d'un brin homopyrimidique et d'un troisième brin situé dans le grand sillon de la première hélice. Le troisième brin est stabilisé par des interactions de Hoogsteen. Les G quadruplex sont des structures à quatre brins dans lesquelles quatre guanines interagissent sur un plan par des interactions de Hoogsteen. Il est stabilisé par la présence d'un cation monovalent : Na^+ ou K^+ . Les interactions de Watson-Crick et de Hoogsteen ainsi que les structures comme la triple hélice d'ADN ou le G quadruplex sont présentées dans les figures 1.2 et 1.3

L'ADN est donc une molécule linéaire qui possède une structure secondaire dépendant de sa séquence et des conditions du milieu (pH, présence en cations, hydratation etc.). Dans les nanotechnologies structurales de l'ADN, on utilise principalement la conformation en hélice B de l'ADN et l'appariement des paires de bases suivant les interactions de Watson-Crick. Cela nous permet de programmer, en fonction de la séquence en nucléotides, la structure secondaire désirée.

L'hélice d'ADN-B est une hélice droite d'un diamètre de 2 nm ayant un pas d'hélice de 3.3 nm ce qui correspond à 10.5 nucléotides. L'ADN double brin est bien plus rigide

que le simple brin puisqu'il a une longueur de persistance de 50 nm soit 15 tours d'hélice ou 160 nucléotides alors que l'ADN simple brin a une longueur de persistance entre 1 et 2 nm [5]. Les propriétés de l'ADN sont assez bien décrites par une WLC (worm like chain) et ont été étudiées dans les années 1990 au moment de l'essor des méthodes de manipulations de molécules uniques [6, 7].

La double hélice d'ADN est stabilisée grâce à deux interactions :

- L'interaction d'appariement (base pairing) : interaction responsable de la spécificité de l'appariement de bases complémentaires. Elle est causée par la présence de deux ou trois liaisons hydrogène situées entre les bases complémentaires.
- L'interaction d'empilement (base stacking) : elle est la principale source de stabilisation de la double hélice d'ADN. Elle est dirigée le long des brins d'ADN et est causée par la délocalisation des électrons présents dans les groupes aromatiques des bases.

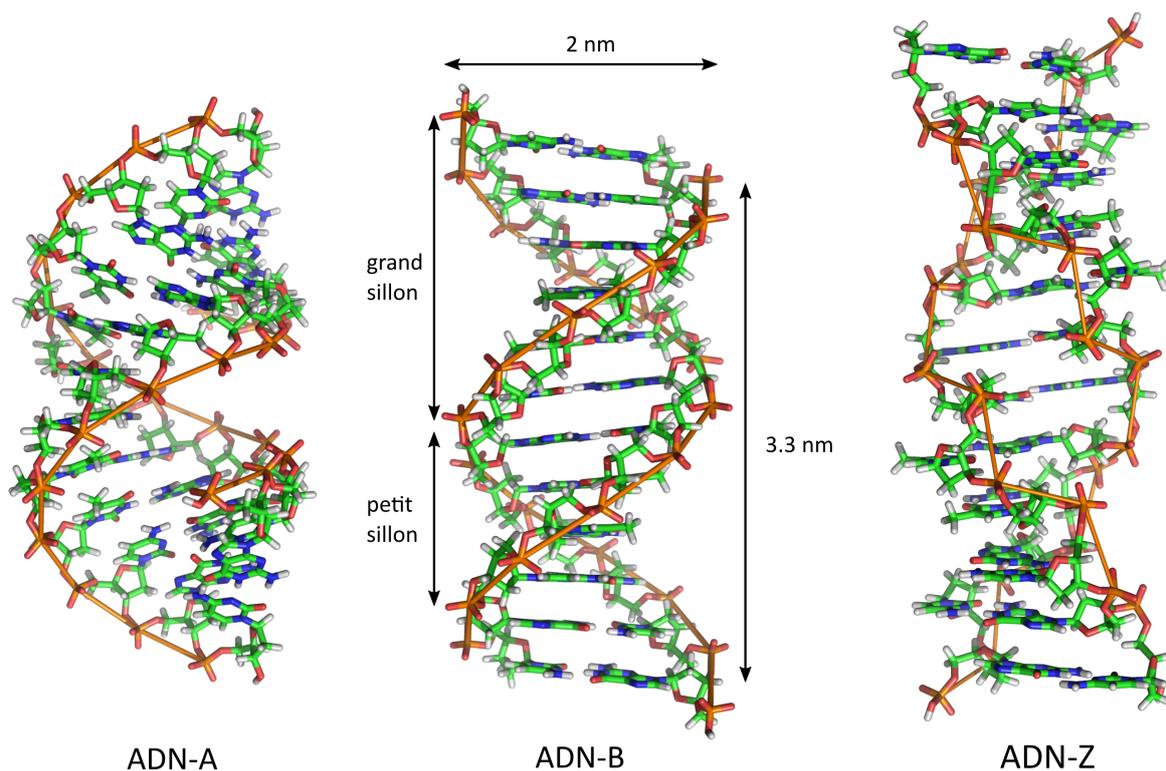


FIGURE 1.1 – Représentations des différentes conformations A, B et Z de l'ADN (Credit : Richard Wheeler (Zephyris) at en.wikipedia)

Le principal atout de l'ADN pour son utilisation en nano-fabrication est sa propriété d'auto-assemblage. En effet, deux brins complémentaires vont s'hybrider afin de former une double hélice de manière à minimiser l'énergie du système. L'auto-assemblage permet

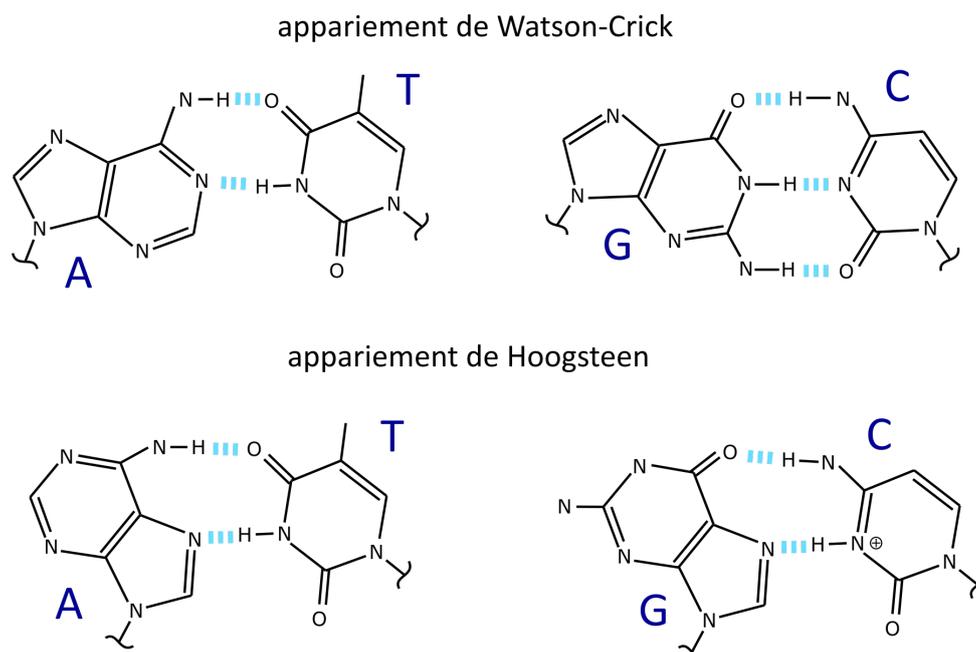


FIGURE 1.2 – Schéma représentant les appariements de Watson-Crick et de Hoogsteen des nucléotides AT et GC.

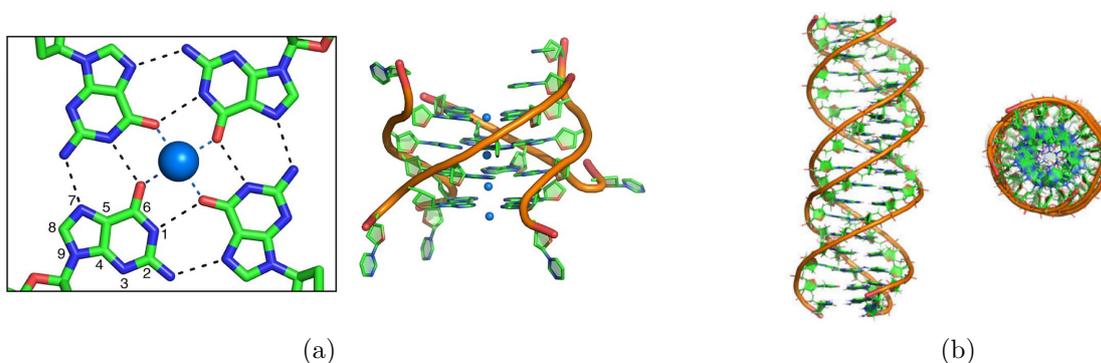


FIGURE 1.3 – a) G quadruplex avec la structure à droite et les liaisons hydrogène entre les nucléotides à gauche tiré de [8] b) Triple hélice d'ADN (Credit : Annalisa Arcella. IRB Barcelona)

la fabrication de structures en suivant une approche ascendante (ou bottom-up) opposée à l'approche descendante (top-down) comme la lithographie qui est plus couramment utilisée en micro-électronique.

La spécificité de l'hybridation des brins selon les interactions de Watson-Crick est un autre avantage. Cela permet la programmation de l'assemblage de nano-structures à partir des séquences en nucléotides. La synthèse de l'ADN s'est industrialisée à la suite des grands

projets de séquençage des génomes des êtres vivants et le coût a régulièrement diminué (voir figure 1.4). Grâce à cette flexibilité dans la synthèse de brins, on peut facilement choisir la séquence des simples brin synthétiques afin de programmer l'assemblage de structures plus complexes.

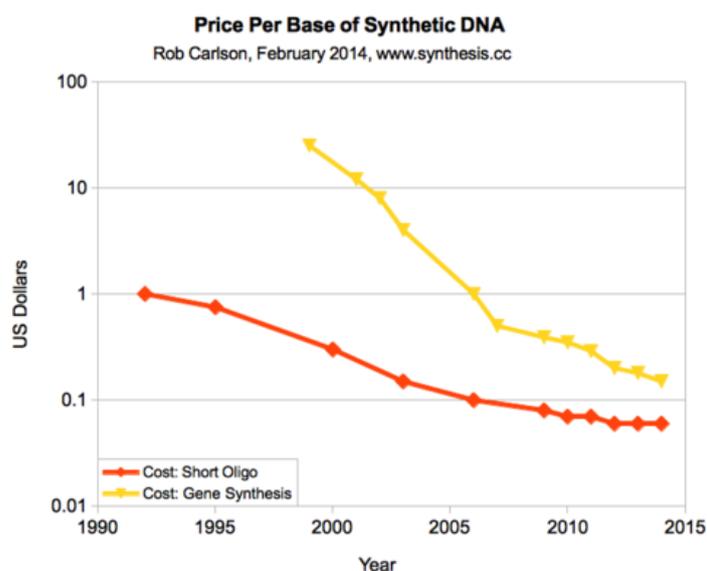


FIGURE 1.4 – Évolution du prix de synthèse de courts oligonucléotides (rouge) et de gènes (jaune) (Credit : Rob Carlson, <http://www.synthesis.cc/>)

Enfin, l'ADN est une molécule très robuste. Contrairement aux protéines, les réactions d'hybridations et de dénaturations sont réversibles. On peut ainsi chauffer l'ADN jusqu'à 100 °C sans détériorer la molécule. La double hélice va se dénaturer, puis se reformer lorsque la température redescendra en dessous d'une température qu'on appelle température de fusion (ou T_m). Toutes ces propriétés font de l'ADN un matériau de choix pour la nanofabrication programmée de nano-structures.

1.1.2 Au delà de la double hélice

Nous avons vu qu'il existe plusieurs façons d'organiser la double hélice d'ADN en fonction du pH, de la séquence, ou de la force ionique. Il est également possible de construire des assemblages dans lesquels plus de deux brins sont impliqués formant alors des structures multibrins. De même, un brin d'ADN auto-complémentaire va pouvoir se replier sur lui-même formant une structure en épingle à cheveux (ou *hairpin*). Ces structures en épingle à cheveux sont très utilisées dans les biocapteurs pour la détection de séquences spécifiques en acide nucléique ou de petites molécules, on parle alors de *molecular beacon* [9]. Une des structures multibrins naturellement présente in-vivo est la jonction Holliday (HJ). Cette

jonction est un intermédiaire de la recombinaison génétique. Lors de la recombinaison génétique, les brins formant les jonctions Holliday sont très symétriques ce qui rend les jonctions Holliday mobiles : les différents brins peuvent glisser les uns par rapport aux autres. Des jonctions Holliday fixes ont ensuite été conçues puis synthétisées et utilisées comme brique de base pour certaines nanostructures d'ADN [10]. Dans ces jonctions, chaque brin est complémentaire avec la moitié de deux autres brins (figure 1.5) ce qui permet la formation d'une croix. De la même manière, il est possible de relier plusieurs hélices par deux jonctions ou plus : on peut alors former les jonctions à double crossover (DX) [11] ou triple crossover (TX) [12]. Toutes ces structures sont représentées sur la figure 1.5 mais on peut imaginer continuer ainsi et tisser une étoffe moléculaire.

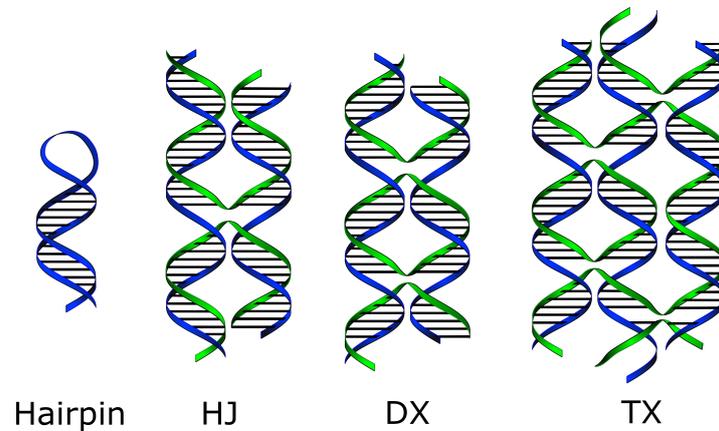


FIGURE 1.5 – Représentation schématique de différentes structures d'ADN : structure en épingle à cheveu ou hairpin, jonction holliday (HJ), double crossover (DX), triple crossover (TX).

Seeman a été le premier à utiliser l'ADN pour fabriquer des nanostructures qui permettraient de stabiliser des protéines sans avoir besoin de les cristalliser. Son objectif initial était de créer un réseau tri-dimensionnel d'ADN afin d'effectuer des mesures de diffraction et de résoudre la structure des protéines [13]. Il voulait pour cela se baser sur des jonctions Holliday et les assembler entre elles à l'aide d'extrémités cohésives (*sticky end*). Les extrémités cohésives sont des prolongements non hybridés positionnés aux extrémités des hélices permettant à deux structures d'ADN de s'associer par hybridation de deux extrémités cohésives complémentaires (voir figure 1.6). Seeman a eu l'idée d'une telle structure en 1982 [13] mais ce n'est qu'en 1998 [14] que le premier cristal 2D d'ADN a été réalisé. Le premier cristal 3D a lui été réalisé en 2009, à partir de structures de tenségrité triangulaire [15].

L'assemblage de petits motifs d'ADN aussi appelé tuiles d'ADN (*DNA tiles*) afin de former des structures plus grosses est une stratégie utilisée pour fabriquer des rubans d'ADN [16, 17], des tubes d'ADN [18, 19], ou encore des polyèdres [20]. Les tuiles d'ADN sont en général constituées de jonctions d'ADN comme les jonctions HJ, DX ou TX mais elles peuvent aussi être formées d'un unique simple brin d'ADN uniquement composé

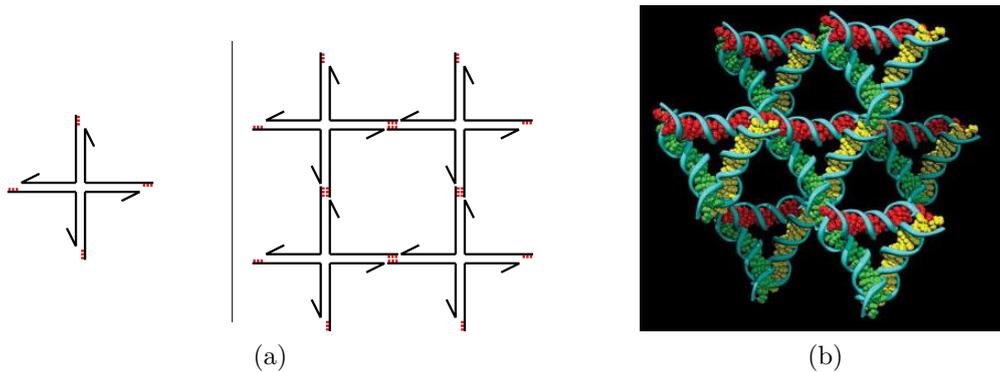


FIGURE 1.6 – a) À gauche : jonction holliday possédant des extrémités cohésives. Au milieu : réseau 2D imaginé par Seeman en 1982 composé de jonctions Holliday reliées entre elles par des extrémités cohésives. b) Cristal 3D basé sur des structures de tensegrité triangulaire réalisé en 2009 [15].

d'extrémités cohésives [19, 21, 22]. Ainsi, des structures finies et complexes ont été réalisées en 2D [21] ou en 3D [22] à partir de tuiles simple brin aussi appelées briques d'ADN dans le cas des structures à trois dimensions. Les tuiles d'ADN sont également utilisées pour faire de la programmation à base d'ADN. Les extrémités cohésives des tuiles correspondent aux entrées et sorties et dirigent l'auto-assemblage de plusieurs tuiles de manière programmée ce qui permet d'encoder moléculairement une suite d'opérations logiques [23].

1.1.3 Nanocages d'ADN

Une des applications ciblée par les nano-structures d'ADN est l'encapsulation d'objets chimiques ou biologiques, pour cela des structures d'ADN en forme de nanocages ont été réalisées. Les premières structures d'ADN finies et en trois dimensions sont le cube [24] et l'octaèdre tronqué [25] conçus par Seeman en 1991 et 1994. Un octaèdre a ensuite été réalisé à partir du repliement d'un brin d'ADN synthétique de 1.7 kbases [26] et des tétraèdres d'ADN ont été conçus par Goodman *et al.* en 2004 [27] et 2005 [28]. Par la suite, de nombreux polyèdres ont été réalisés, ils sont répertoriés dans [29]. Les géométries du cube, de l'octaèdre tronqué et des tétraèdres sont très proches : les arêtes sont formées d'une double hélice d'ADN et chaque brin dessine une face du polyèdre. Cependant, ces structures diffèrent grandement dans leur mode d'assemblage et leur rendement de fabrication. En effet, le cube et l'octaèdre tronqué nécessitent plusieurs étapes de ligation et de purification pour pouvoir être assemblés et leur rendement final est inférieur à 10 %. Le tétraèdre quant à lui se replie en une seule étape avec un rendement supérieur à 95 %. La présence d'étapes de ligation font que le cube et l'octaèdre sont assemblés de manière covalente et ne peuvent donc pas être dénaturés et reformés de manière réversible comme c'est le cas pour le tétraèdre.

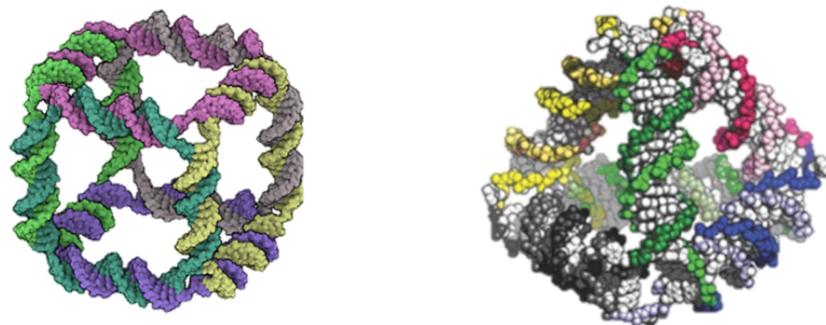


FIGURE 1.7 – Représentation des structures d'ADN en forme de cube [24] et de tétraèdre [27]

Les nanocages d'ADN sont assemblées à partir d'ADN synthétique. Elles ont l'avantage d'être facilement fonctionnalisable et biocompatibles. Les tétraèdres d'ADN ont par exemple été utilisés pour organiser différents groupes chimiques et biologiques sur une surface où ils peuvent alors être utilisés comme biocapteurs [30, 31]. Les nanocages d'ADN peuvent de plus être utilisées pour encapsuler des molécules ou protéines pour la médiation de médicament [29]. Certaines structures d'ADN peuvent en effet passer à travers les membranes plasmiques des cellules contrairement aux ADN simple brin et doubles brin et ainsi être utilisées in-vivo [32].

1.1.4 Origami d'ADN

Principe des origami d'ADN

L'origami d'ADN est une méthode inventée par Rothemund en 2006 permettant la formation de grandes structures d'ADN grâce au repliement sur lui-même d'un long simple brin d'ADN appelé *scaffold* par un grand nombre de courts brins d'ADN : les agrafes [33]. Le *scaffold* le plus utilisé est le M13mp18 : c'est un ADN simple brin, circulaire de 7249 bases de long constituant le génome d'un phage. Cependant, n'importe quel simple brin peut être replié sur lui-même par la méthode des origami d'ADN. Les agrafes sont des courts brins d'ADN synthétiques dont certaines zones sont complémentaires à différentes parties du *scaffold*. Ces zones, constituées d'une succession de nucléotides complémentaires à une autre succession de nucléotides sur le *scaffold* sont appelées domaines. Les domaines des agrafes sont complémentaires à des zones éloignées du *scaffold* ce qui permet de les rapprocher et de les replier. L'origami d'ADN est donc composé d'un assemblage de doubles hélices d'ADN parallèles, qui résultent de l'appariement d'un domaine du *scaffold* avec un domaine de l'agrafe complémentaire. Les hélices d'ADN sont reliées entre elles par les agrafes au niveau de jonctions Holliday (figure 1.8) ce qui permet de rigidifier la structure globale. Les séquences des agrafes sont entièrement déterminées par la séquence

du scaffold à laquelle elles doivent être complémentaires; elles sont donc à priori toutes différentes et leur séquence définit le "programme" du repliement.

L'avantage de cette technique est qu'elle permet la formation de structures de grande taille grâce à l'utilisation d'un long brin d'ADN génomique. Pour avoir un ordre de grandeur, les origami d'ADN fabriqués à partir du M13 mesurent environ 100 nm de côté et sont composés d'environ 200 agrafes différentes. La taille des structures 3D basées sur des brins d'ADN synthétiques n'est que de l'ordre de la dizaine de nanomètres alors que les cristaux d'ADN réalisés à partir de tuiles d'ADN sont des structures non finies. Les origami d'ADN permettent donc l'assemblage de structures de grandes taille et l'utilisation du scaffold M13 permet de limiter la quantité d'ADN synthétiques à utiliser et donc d'en réduire le prix.

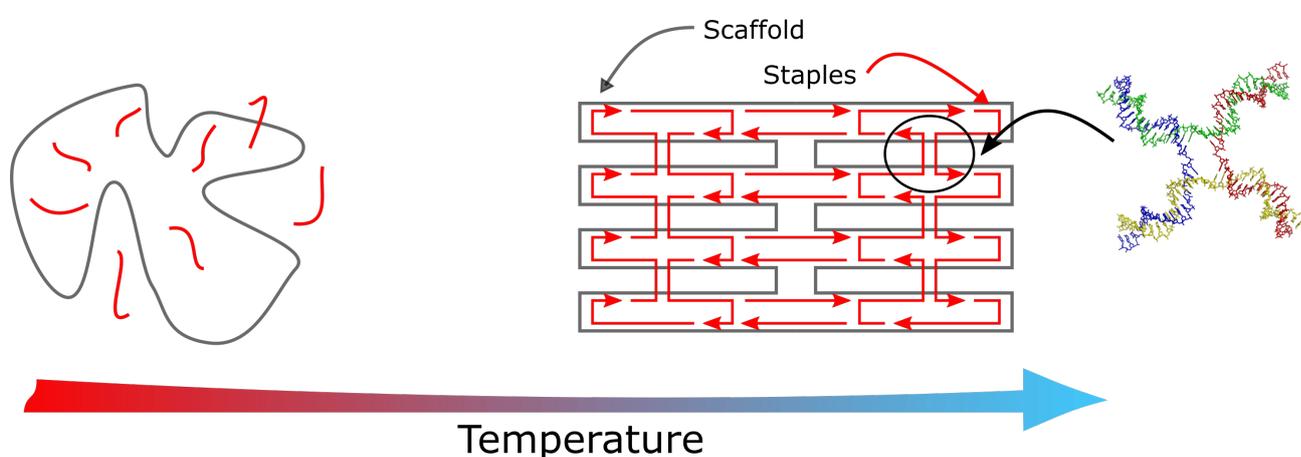


FIGURE 1.8 – Schéma représentant l'assemblage d'un origami d'ADN. Les agrafes sont en rouge et le scaffold en gris. La coupe met en évidence la jonction Holliday.

Depuis leurs apparitions en 2006, la méthodologie s'est montrée très robuste puisque de nombreux origami ont été conçus puis assemblés. Les premiers origami étaient en 2D [33], ils ont ensuite assez rapidement été fabriqués en 3D [34, 35], torsadés [36], ou présentant des courbes arrondies [37]. La figure 1.9 montre le célèbre smiley 2D réalisé par Rothemund en 2006 [33] ainsi qu'un origami 3D observé par cryo-EM [38]. Des structures encore plus grandes ont également pu être fabriquées grâce à l'assemblage de plusieurs origami d'ADN entre eux [39-41]. Les origami d'ADN peuvent avoir de nombreuses applications qui seront décrits par la suite dans la partie 1.1.5 de ce chapitre.

Conception des origami d'ADN

La conception d'origami d'ADN est bien documentée et s'effectue en suivant des étapes bien précises [33, 42, 43]. Un logiciel de conception assisté par ordinateur (caDNAno)

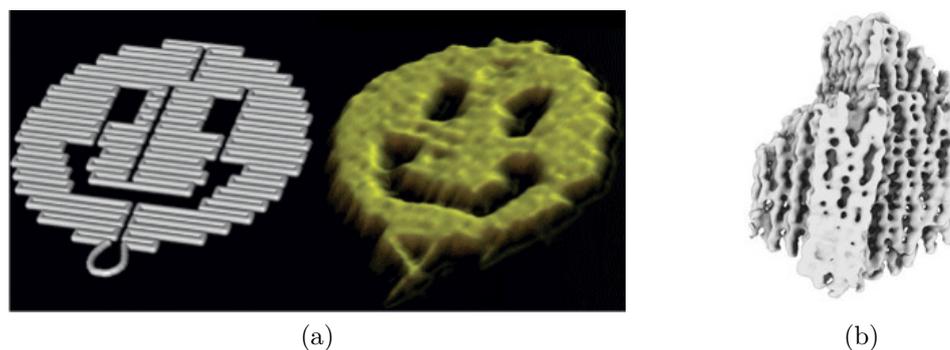


FIGURE 1.9 – (a) Origami 2D observé par AFM [33]; (b) Origami 3D observé par cryo-EM [38].

facilite et automatise la conception des origami d'ADN [42].

La conception des origami d'ADN consiste principalement à dessiner la position du scaffold et la façon dont celui-ci est replié sur lui-même à l'aide des agrafes. Le nombre de paires de bases de la structure doit correspondre au nombre de bases présentes dans le scaffold. Plusieurs règles doivent être respectées afin de prendre en compte les spécificités de la structure de la double hélice d'ADN. Les jonctions doivent en effet être placées de façon à respecter l'hélicité de l'ADN. Le logiciel caDNAno propose de placer les hélices d'ADN composant l'origami de deux manières différentes : selon un réseau en carré [35] ou selon un réseau en nid d'abeille [34]. Les origami 2D sont conçus selon le réseau en carré dans lequel toutes les hélices d'ADN sont alignées. La figure 1.10 montre les images obtenues pour les deux différents types de réseaux proposés par caDNAno.

Un tour d'hélice d'ADN-B est composé de 10.5 nucléotides donc dans les origami basés sur le réseau en carré, les jonctions entre deux hélices doivent être séparées d'un multiple de 10.5 nucléotides. Dans le réseau en nid d'abeille, l'angle formé par 3 hélices voisines étant de 120° , les jonctions doivent être séparées par un multiple de 7 nucléotides. Dans certains cas, le nombre de nucléotides est volontairement supérieur ou inférieur à celui imposé par l'hélicité de l'ADN, cela introduit des contraintes mécaniques permettant la réalisation de structures torsadées [36].

L'hélicité de l'ADN impose certaines contraintes sur le placement des agrafes sur le scaffold mais il existe toujours de nombreuses manières de les placer. Le jeu d'agrafe permettant de replier un même origami n'est donc pas unique. La figure 1.11 montre deux stratégies permettant de placer les agrafes sur un même origami 2D rectangulaire. Dans la première, les agrafes ont une forme de U et dans la seconde, une forme de S mais les deux jeux d'agrafes replient finalement le même origami d'ADN. Une fois le jeu d'agrafe choisi, les séquences des agrafes sont déduites de la séquence du scaffold et peuvent être synthétisées.

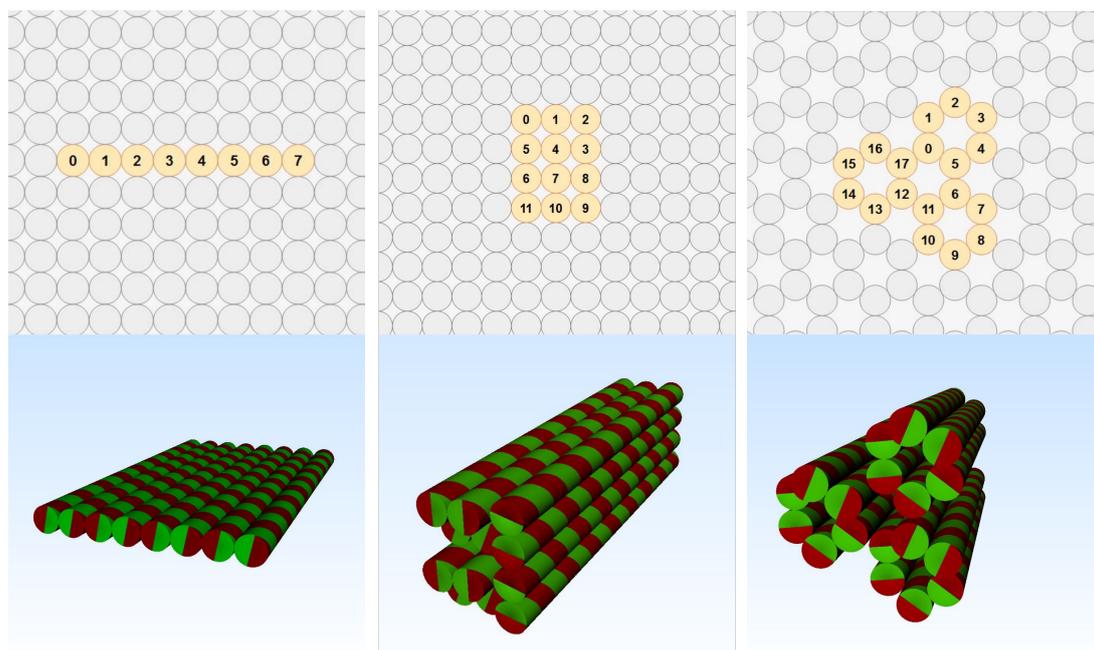


FIGURE 1.10 – Images obtenues avec caDNAno lors de la conception d'origami d'ADN 2D (à gauche), 3D en réseau carré (au milieu), 3D en nid d'abeille (à droite).

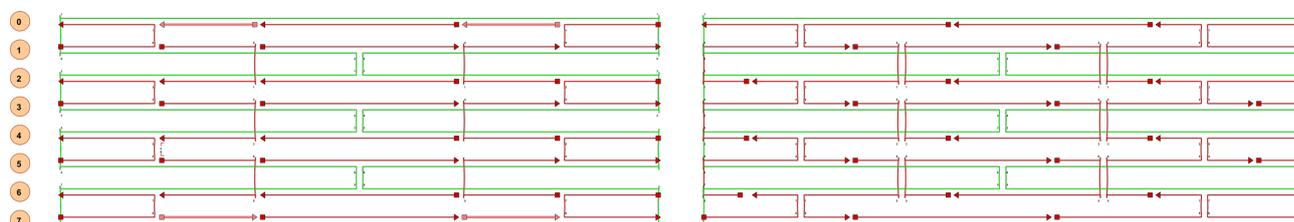


FIGURE 1.11 – Images obtenues par caDNAno lors de la conception de deux origami rectangulaire 2D avec à gauche la stratégie en U et à droite la stratégie en S .

L'utilisation du logiciel caDNAno permet de faciliter grandement la conception des origami d'ADN mais limite la conception des origami. En effet, on ne peut pas concevoir d'origami dont les hélices ne sont pas positionnées sur un réseau en carré ou en nid d'abeille. Ces origami sont pourtant réalisables, il suffit d'ajuster le nombre de nucléotides entre chaque jonction en fonction de l'angle formé entre deux hélices voisines. La figure 1.12 montre des origami ne pouvant pas être réalisés à l'aide de caDNAno : un origami dont les hélices voisines forment un angle de 60° , un origami en pentagone dont les hélices forment un angle de 108° et un origami en Y utilisant un mélange d'angle de 180° et de 120° . L'utilisation de caDNAno permet d'optimiser géométriquement la position des agrafes sur le scaffold mais aucune optimisation n'est effectuée au niveau des séquences. Il est donc possible d'avoir au final des répétitions de séquences sur des agrafes différentes.

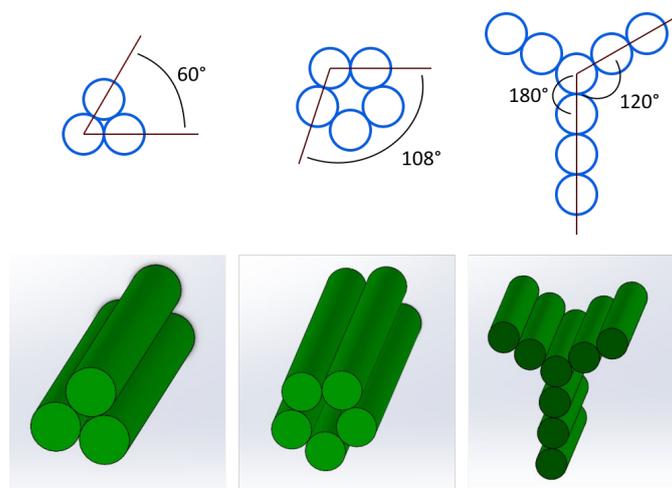


FIGURE 1.12 – Exemples d'origami non réalisable à partir de caDNAno avec des angles entre les hélices de 60° , 108° , ou des mélange d'angle de 120° et 180° .

Assemblage des origami d'ADN

Une fois les séquences des agrafes déterminées, il est possible de synthétiser les différentes agrafes afin d'assembler l'origami. Dans un premier temps, tous les brins (agrafes et scaffold) sont mélangés dans un tampon contenant des ions positifs. En effet, le squelette phosphate de l'ADN étant chargé négativement, les ions positifs sont nécessaires afin d'écranter les charges négatives et de faciliter le rapprochement puis l'hybridation de deux simples brin. Les ions magnésium sont en général utilisés à des concentrations allant de 10 mM à 25 mM. Pour réduire le coût des origami, il a été constaté qu'il n'est pas nécessaire de purifier les agrafes si celles-ci sont en large excès dans le mélange [33]. Ainsi, les agrafes sont souvent utilisées à des concentrations en général dix fois supérieures à celle du scaffold. Pour former l'origami, la température est augmentée jusqu'à 80°C - 90°C afin de déshybrider tous les nucléotides appariés, puis elle est diminuée lentement jusqu'à la température ambiante lors d'un recuit. Ce recuit permet à la structure de minimiser son énergie à chaque température et donc de former la structure la plus stable. Les vitesses de recuit utilisées peuvent aller de quelques heures pour les structures 2D [33] à plusieurs jours pour les structures 3D [34] et sont toujours le résultat d'une optimisation empirique.

Caractérisation des origami d'ADN

Une fois les origamis assemblés, différentes méthodes sont utilisées afin de les caractériser et d'estimer un rendement de repliement. L'observation directe est la méthode la plus utilisée pour s'assurer du bon repliement d'un origami. Les observations sont en général effectuées par AFM [33, 44-47], TEM [34, 36], ou par cryo-EM [38, 48]. Le rendement de repliement est alors estimé par un comptage manuel des structures bien formées. L'élec-

trophorèse sur gel est également utilisée pour vérifier le bon repliement des structures et les purifier [49]. Cependant, ces méthodes donnent une information qualitative sur la présence ou non de défauts, mais ne permettent pas d'évaluer le rendement de façon quantitative. Wagenbauer *et al.* proposent de déterminer le nombre de nucléotides non appariés en utilisant une méthode originale basée sur les séquences de de Bruijn [50]. Les séquences de de Bruijn sont des simples brin d'ADN, marqués par fluorescence, contenant une unique fois toutes les séquences de deux ou trois nucléotides existantes. La détermination du nombre de nucléotides non appariés dans les structures se fait ensuite à partir de l'intensité de la fluorescence mesurée sur des gels d'agarose. Cette méthode permet de quantifier le nombre de défaut mais ne donne pas d'information qualitative sur la nature des défauts et leur position. Elle est donc complémentaire aux observations AFM, TEM ou cryo-EM.

1.1.5 Applications

Il est possible de fabriquer une grande variété de nanostructures à base d'ADN possédant des tailles et des géométries diverses. Ces nanostructures vont être utilisées dans des applications allant de l'optique à la médecine en passant par la nanoélectronique [51].

L'une des premières applications des nanostructures d'ADN est l'organisation d'objets à des échelles nanométriques. En effet, la longueur de persistance de l'ADN (50 nm) étant bien plus grande que la distance généralement utilisée entre deux jonctions, les nanostructures d'ADN sont rigides et permettent l'organisation d'objets comme les protéines [16], les nanoparticules [52, 53], ou encore les nanotubes de carbone [54] de manière très précise. Ces architectures sont surtout utilisées en nanophotonique [55] ou en plasmonique [53, 56].

Une autre application est l'utilisation des nanostructures d'ADN pour la nano et micro-fabrication en général. Ainsi, des nanofils d'ADN ont été métallisés pour des applications en nanoélectroniques [57]. Certaines structures d'ADN peuvent également être utilisées comme masques pour la lithographie [58].

Enfin, l'application phare des nanostructures d'ADN concerne le transfert de médicament. Il est en effet possible d'encapsuler des médicaments dans des nano-cages ou nano-boîtes d'ADN [29, 59] et de les libérer à un endroit précis sous l'influence d'un signal extérieur d'origine chimique.

1.1.6 Conclusion sur les nano-structures d'ADN

Depuis les débuts des technologies de l'ADN, en 1982, jusqu'à aujourd'hui, d'immenses progrès ont été réalisés en ce qui concerne la fabrication de structures de plus en plus com-

plexes. Cela a été permis notamment grâce aux avancées dans les techniques de synthèse de l'ADN qui permet la fabrication d'oligonucléotides synthétiques à des prix de plus en plus faibles. Le prix pour la synthèse d'un oligonucléotide à une échelle de 25 nmol est actuellement de 0.2 € par base. Aujourd'hui, deux défis se démarquent pour la fabrication de nanostructures d'ADN :

- Créer des structures toujours plus larges et plus complexes en utilisant des scaffold de plus en plus grand [60] ou en assemblant plusieurs structures entre elles [61].
- Créer des structures fonctionnelles et dynamiques [61] pour en faire des nano-robots.

Nous allons voir dans la suite en quoi la compréhension du processus de repliement de ces nano-structures d'ADN est nécessaire pour optimiser la fabrication de ces objets et développer les applications.

1.2 Vers une conception plus rationnelle des structures d'ADN

1.2.1 Discussion sur la méthode de conception des origami d'ADN

Nous avons vu dans la partie 1.1.4 que la conception des origami est essentiellement géométrique et basée sur l'optimisation de l'hybridation des bases complémentaires et le respect de l'hélicité de l'ADN dans la forme finale de la structure. La position des agrafes sur le scaffold est dessinée de manière à respecter le nombre de nucléotides dans un tour d'hélice ; cependant, il existe de nombreuses manières de placer les agrafes pour l'obtention d'une même structure finale. La figure 1.11 montre que deux stratégies de repliement mènent à la formation du même origami 2D rectangulaire : la première est basée sur des agrafes en forme de U possédant uniquement deux domaines alors que la seconde est basée sur des agrafes en forme de S composées de trois domaines. Pour une même forme finale, plusieurs stratégies de repliement sont donc possibles. Il est intéressant de se demander si une des stratégies de repliement est plus optimale et permet la fabrication de structures avec moins de défauts. De plus, pour une même stratégie de placement des agrafes, les séquences de celles-ci vont dépendre du point de départ pris pour le scaffold. Pour le M13 possédant 7249 bases, il y a donc 7249 jeux d'agrafes possible par rotation du scaffold. Une fois le jeu d'agrafes choisi, celles-ci sont synthétisées et l'origami est assemblé puis observé par AFM, TEM ou par gel. Si les origami sont bien repliés, le jeu d'agrafes est validé, sinon un autre jeu d'agrafes peut être testé. La méthode de conception des origami est donc encore actuellement très empirique et peut certainement être optimisée en prenant en compte les propriétés thermodynamique des séquences ou encore le nombre et la position des jonctions.

De plus, le processus de repliement des origami d'ADN est assez mal compris. Les structures sont conçues de manière à minimiser l'énergie libre de la forme finale en maximisant l'hybridation des paires de bases entre le scaffold et les agrafes, mais le processus de repliement n'est pas pris en compte lors de la conception de l'origami. Cependant, lors de la formation de structures complexes comme les origami d'ADN, de nombreux états intermédiaires correspondant à des minima locaux d'énergie peuvent être peuplés. Ces états peuvent être des pièges cinétiques rendant le repliement moins direct et peuvent être sources de défauts ou de mauvais repliements. La connaissance du paysage d'énergie complet du repliement permettrait donc de connaître les différentes étapes composant le repliement et de concevoir les structures, pas uniquement à partir de leur forme finale, mais aussi de manière à optimiser leur repliement.

1.2.2 Analogie avec le problème du repliement des protéines

L'auto-assemblage des origami d'ADN est un problème analogue au problème fondamental en biologie associé au repliement des protéines. Ce problème consiste à déterminer à partir d'une séquence en acides aminés la forme tri-dimensionnelle qui assurera à la protéine ses fonctions. Dans les protéines, les interactions entre les différents éléments de la chaîne d'acides aminés permettent le repliement de la protéine en structures secondaires puis tertiaires. Le repliement dépend d'interactions complexes (liaisons hydrogène, interactions hydrophobes, interactions de Van der Waals, ponts disulfure, etc.). L'étude du processus de repliement des protéines modèles a mis en évidence l'importance des états intermédiaires appelés globules fondus et a développé le concept de paysage d'énergie. Le système évolue dans un paysage d'énergie très complexe déterminé par la diversité des interactions possibles entre les acides aminés de manière à minimiser son énergie libre et ainsi obtenir la forme optimale de la protéine. En chemin, le système peut se retrouver piégé dans un fond de vallée et rester partiellement replié ou être dirigé vers un minimum correspondant à un mauvais repliement. La protéine perd alors sa fonctionnalité ce qui induit des pathologies. Parfois, la mutation d'un seul acide aminé change le paysage d'énergie de telle façon qu'il est impossible de replier correctement la protéine.

Le repliement des structures d'ADN est beaucoup plus simple, car une seule interaction peut être prise en compte et elle peut être aisément programmée : il s'agit de l'appariement spécifique de deux bases complémentaires par les interactions de Watson-Crick. Les structures d'ADN peuvent donc être utilisées comme systèmes-modèles pour l'investigation du chemin de repliement de biomolécules plus complexes et du problème fondamental qui associe une séquence à une forme en trois dimensions. La relation séquence-forme est primordiale car c'est la forme des protéines qui leur permet d'assurer leurs fonctions. Contrôler la forme de structures d'ADN permettrait donc l'assemblage de structures fonctionnelles analogues aux enzymes

Les enzymes sont des protéines fonctionnelles capable de catalyser les réactions chimiques. En se liant à un substrat, elles diminuent l'énergie d'activation de la réaction

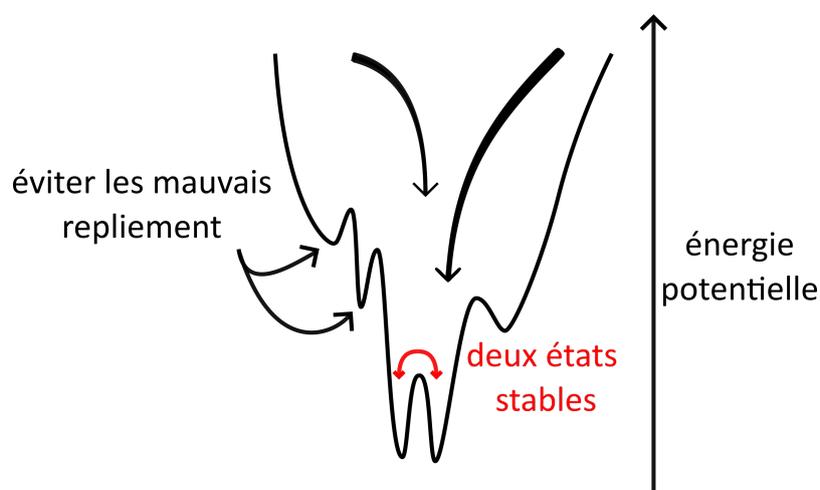


FIGURE 1.13 – Illustration du paysage d'énergie que pourrait avoir une structure d'ADN possédant deux états stables.

chimique ce qui en accroît la vitesse. Les enzymes allostériques sont un type d'enzyme particulièrement intéressante car leur forme et donc leur fonctionnalité est modifiée lors de la liaison d'un substrat pouvant les rendre active ou inactive. Un des défis de nanotechnologies est de concevoir des objets fonctionnels à base d'ADN pouvant agir dans le corps humain à la manière des enzymes formant ainsi des robots moléculaires.

Des robots moléculaires permettant l'ouverture de boîtes formées à bases d'ADN ont déjà été réalisés. L'ouverture se commande par un mécanisme de déplacement de brin [39] ou à l'aide d'un aptamère spécifique à un anticorps cible [62]. Cependant dans ces deux cas, la cible permet l'assemblage ou non de plusieurs origami d'ADN mais la forme globale des origami reste inchangée. La conception de structures d'ADN possédant plusieurs états stables et pouvant changer de forme grâce à l'influence d'un signal extérieur reste un défi majeur.

On a pu voir précédemment (paragraphe 1.1.4) qu'un même scaffold peut être replié de différentes façons par des jeux d'agrafes différents. On peut donc imaginer la possibilité de construire un nanorobot formé d'un origami d'ADN pouvant avoir plusieurs états stables et pouvant passer de l'un à l'autre de manière contrôlée. Majikes *et al.* ont placé un scaffold en présence de deux jeux d'agrafes en compétition, et ont observé la formation de l'un ou l'autre des origami ou d'un origami hybride [44]. À l'inverse, Dunn *et al.* ont réalisé différentes structures à partir d'un unique jeu d'agrafes et d'un dimère de scaffold composé de la réunion de deux scaffold identiques [47]. On voit donc qu'il est possible de jouer sur la compétitivité de l'hybridation des agrafes avec le scaffold pour créer plusieurs structures stables à partir d'un même mélange de brins d'ADN. Pour pouvoir de cette manière fabriquer un robot moléculaire, il faut alors connaître parfaitement le chemin de repliement menant à l'une ou l'autre de ces structures afin d'être capable d'en diriger le repliement. La figure 1.13 représente un exemple de paysage d'énergie que pourrait avoir

une structure d'ADN possédant deux formes stables.

Pour répondre au défi qui est l'assemblage d'objets de plus en plus complexes et fonctionnels, il est nécessaire d'avoir une compréhension du chemin de repliement et des mécanismes d'assemblages. Un des objectifs de cette thèse est de contribuer à ce problème en identifiant les étapes clés pour le repliement de structures modèles afin de pouvoir, soit contrôler le chemin de repliement, soit prendre en compte ce chemin de repliement dans une conception plus rationnelle des origami.

1.3 Étude du processus de repliement des structures d'ADN

Des études ont été réalisées de manière à observer et de comprendre le repliement de structures d'ADN [63]. Nous allons décrire dans cette partie qu'elles sont les méthodes utilisées et quelles ont été les principales conclusions de ces études.

1.3.1 Méthodes utilisées pour l'étude de la thermodynamique du repliement de structures d'ADN

Observation directe par microscopie

La méthode la plus utilisée pour l'étude du repliement d'origami d'ADN est l'observation directe par microscopie AFM, ou TEM [28, 45, 46, 64]. Les images obtenues permettent une visualisation directe de la structure formée et donc l'estimation d'un rendement de repliement par comptage manuel des origami. Ces images ont été utilisées pour caractériser la forme des origami dans des conditions en agrafes (concentrations, modification des séquences, absence de certaines agrafes) [44, 47]. Les observations AFM ou TEM permettent de connaître l'état final de l'origami mais ne donnent pas d'information sur le chemin pour y parvenir. Pour cela, un AFM contrôlé en température a permis la visualisation directe du repliement des origami ainsi que l'évolution de la taille des origami en fonction de la température [46]. Des images AFM ont également été réalisées successivement à des trempes pour observer le repliement d'origami [45] au cours de rampes de température. Ainsi, Lee Tin Wah *et al.* ont observé que dans des conditions normales, le repliement de l'origami rectangulaire 2D commence par les bords pour finir par le centre. Ils ont également pu modifier ce repliement en augmentant la concentration des agrafes centrales [45]. La microscopie en fluorescence a également été utilisée pour étudier la thermodynamique de l'assemblage d'un multimère composé de quatre origami, chaque origami était alors marqué avec un fluorophore différent [65].

Électrophorèse sur gel

L'électrophorèse sur gel est également utilisée pour vérifier le bon repliement et la pureté des origami. Pour cela, des gels d'agarose à 2% sont en général utilisés. L'électrophorèse sur gel à été utilisée pour observer l'influence de certaines stratégies sur le repliement d'origami 3D : Ke *et al.* ont ainsi observé que les origami 3D basés sur les réseau en nid d'abeille se replient plus efficacement lorsque leurs agrafes présentent un long domaine de 14 nucléotides, et que la présence d'intercalants permet la stabilisation des origami torsadés [64]. Grâce à l'utilisation de trempes, les gels peuvent également être utilisés pour suivre le repliement d'un origami. C'est ce qui a été fait dans [49] où l'assemblage des origami est observé grâce à des gel en fonction de la température ou à température constante au cours du temps.

Les observations directes par microscopie ou par gels donnent des informations sur la structure finale, mais ne fournissent pas d'information sur le chemin de repliement. Pour cela, il faut effectuer des trempes afin de stopper le repliement à des températures bien précises. Ces expériences ne permettent donc pas d'obtenir une bonne résolution en température lors du repliement. Le meilleur moyen pour observer le repliement de structure est de le faire au cours de rampes de températures durant lesquelles les structures sont repliées ou dénaturées.

Méthodes optiques au cours de rampes de température

En utilisant l'hyperchromicité de l'ADN, l'hybridation de brins d'ADN et l'assemblage de nano-structures peuvent être suivi par absorption UV au cours de rampes de température. L'ADN absorbe en effet les UV à 260 nm, et cette absorbance est plus importante pour les simples brin que pour les doubles brin. En suivant l'absorbance au cours d'une rampe de température, il est donc possible de calculer le pourcentage de brins hybridés en fonction de la température. Cette méthode expérimentale à notamment été utilisée dans une étude sur l'influence de la position et de la topologie des agrafes sur le repliement d'un petit origami. En ce basant sur ces résultats, les auteurs ont établi un premier modèle thermodynamique du repliement des origami [66, 67].

L'introduction d'intercalants fluorescents permet également de suivre le repliement par fluorescence [49], car ceux-ci s'intercalent uniquement dans les doubles brin. Une augmentation de la fluorescence est donc directement corrélée à une augmentation du nombre de doubles brin dans la structure. On en déduit comme précédemment la fraction des bases hybridées dans un origami.

Enfin, la dernière méthode optique utilisée pour l'observation d'assemblage de structures d'ADN au cours de rampes de température est le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes ou transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) [68]. En FRET, deux simples brin sont marqués par : un fluorophore donneur d'énergie, et un receveur

qui peut, lui-aussi, être un fluorophore. Le donneur d'énergie est excité et transfère son énergie lors d'un échange non radiatif au receveur, mais seulement lorsque ceux-ci sont suffisamment proches. Cette technique permet donc d'avoir des informations très locales sur le rapprochement de deux agrafes voisines alors que l'absorption UV et l'utilisation d'intercalants donnent des informations plus globales sur l'état apparié ou non des brins d'ADN. Le FRET a été utilisé pour mesurer l'assemblage d'origami 2D et 3D ainsi que l'influence de la présence ou non d'agrafes voisines sur l'hybridation d'une agrafe sur le scaffold [69], ainsi que pour l'étude de l'assemblage de tuiles d'ADN reliées entre elles par des extrémités cohésives [70, 71].

Toutes ces méthodes informent, soit sur la forme de la structure finale, soit sur l'état apparié ou non apparié des nucléotides, mais ne donnent aucune information sur les échanges d'énergies lors de la transformation. Les paramètres thermodynamiques peuvent être calculés en effectuant une analyse Van't Hoff (voir chapitre 2), mais c'est une méthode qui ne peut être utilisée qu'en faisant l'hypothèse d'une transition à deux états, ce qui n'est plus le cas pour des structures complexes comme les origami d'ADN. La seule méthode permettant la mesure directe et sans modèle des paramètres thermodynamiques d'une transition est la calorimétrie.

Calorimétrie

La calorimétrie est une méthode assez peu utilisée dans l'étude des structures d'ADN. Cela est certainement dû à la difficulté du traitement des données et au fait qu'une quantité importante de matériel est nécessaire pour effectuer une mesure (voir chapitre 2). Elle a cependant été utilisée pour l'étude de l'hybridation de duplexes [72] ainsi que pour l'assemblage de structures simples comme les jonctions PX et JX [73], ainsi que les G quadruplexes [74]. La calorimétrie a l'avantage d'être la seule méthode permettant la mesure des paramètres thermodynamiques d'une transformation sans avoir besoin de faire l'hypothèse d'un modèle de repliement. Les deux méthodes de calorimétrie les plus couramment utilisées sont la calorimétrie différentielle à balayage (ou DSC : Differential Scanning Calorimetry), et la titration calorimétrique isotherme (ou ITC : Isothermal Titration Calorimetry); elles seront décrites plus en détail dans le chapitre 2. Au cours de cette thèse, nous utilisons la DSC pour étudier le repliement de structures d'ADN diverses.

1.3.2 Guider le repliement des nanostructures d'ADN

Les méthodes décrites plus haut ont été utilisées afin d'avoir une meilleure compréhension du repliement des structures d'ADN, mais elles ont également permis de montrer la possibilité de guider le repliement des origami en modifiant les agrafes ou leur concentration. Ainsi, lors du repliement compétitif d'un scaffold par plusieurs jeux d'agrafes par Majikes

et al., il a été observé que la forme finale de l'origami (hybride ou non) dépend de l'excès en agrafes des différents jeux utilisés. Un diagramme de phases a été réalisé indiquant quel excès en agrafes il faut utiliser pour guider le repliement vers l'une ou l'autre des structures [44]. De même, lors du repliement du scaffold double, Dunn *et al.* ont pu guider le repliement en modifiant certaines agrafes et en faisant varier leur concentration [47]. Lee Tin Wah *et al.* ont également pu guider le repliement d'un origami en le forçant à se replier par le centre ou par les extrémités en faisant varier les concentrations en agrafes [45]. Dans les travaux de Arbona *et al.*, la stabilité et le repliement dépendent de la topologie et des séquences des agrafes [67]. Toutes ces études indiquent qu'il est possible de contrôler et d'optimiser le chemin de repliement d'un origami en modifiant les concentrations et/ou la position des agrafes qui le replient.

1.3.3 Motivations

Notre objectif est donc d'étudier la thermodynamique du repliement de structures d'ADN afin d'en comprendre les mécanismes clés et de concevoir les origami d'ADN de manière plus rationnelle. Cela permettra d'en optimiser le repliement ce qui devrait permettre la fabrication de structures plus complexes et fonctionnelles. Notre approche expérimentale sera thermodynamique et nous permettra d'extraire de nos mesures des règles phénoménologiques aidant à la conception de structures futures.

On utilise pour cela la calorimétrie et en particulier la calorimétrie différentielle à balayage (ou DSC). La méthode utilisée ainsi que son intérêt pour l'étude de l'assemblage de structures d'ADN sera décrite dans le chapitre 2. Nous nous sommes intéressés au repliement de structures modèles qui sont le tétraèdre d'ADN, et les origami à une ou deux agrafes, avant d'étudier le repliement d'origami complet. Les résultats obtenus sur ces différents objets seront décrits dans les chapitres 3 et 4. Enfin, il va être nécessaire de compléter les mesures obtenues par des mesures hors-équilibre de titration calorimétrique isotherme (ITC). L'ITC nous permettra d'effectuer des mesures lorsque la composition du mélange change ce qui devrait nous permettre de guider le repliement d'un origami et d'observer l'assemblage de structures préformées.

Nous verrons dans le chapitre 5 le développement d'un nanocalorimètre intégrant de la microfluidique qui permettra d'effectuer des mesures hors-équilibre.

Chapitre 2

La calorimétrie pour l'étude thermodynamique de l'assemblage de structures d'ADN

Les technologies de l'ADN utilisent à leur avantage les propriétés physicochimiques de l'ADN comme l'hybridation de la double hélice pour la nanofabrication. Cela permet la fabrication de nanostructures en utilisant une approche ascendante (bottom-up) : la nanostructure est fabriquée à partir de l'auto-assemblage d'objets plus petits. Cette approche est opposée à l'approche descendante (top-down) qui est plus couramment utilisée en microfabrication. L'auto-assemblage consiste en l'assemblage spontané de plusieurs éléments. Il s'accompagne d'une diminution de l'enthalpie libre du système ΔG . L'hybridation de brins d'ADN est une réaction favorable enthalpiquement et défavorable entropiquement : les variations d'enthalpie et d'entropie associées à la réaction d'hybridation sont toutes les deux négatives ($\Delta H, \Delta S < 0$). La variation d'enthalpie libre étant $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, deux brins d'ADN complémentaires vont donc s'auto-assembler en une double hélice en dessous d'une température qui est appelée température de fusion ou T_m (melting temperature).

Actuellement, la conception des structures d'ADN est basée sur l'optimisation de l'hybridation de bases complémentaires ce qui équivaut à minimiser l'énergie libre du système. Les contraintes prises en compte concernent la géométrie de la structure 2D ou 3D une fois repliée. Cependant, lors de la formation d'une structure complexe, la transformation peut être composée d'un certain nombre de conformations intermédiaires et de minima locaux d'énergie pouvant créer des blocages cinétiques. La connaissance du paysage d'énergie complet du repliement permettrait alors d'en connaître les différentes étapes et de concevoir la structure de manière à optimiser son repliement (voir partie 1.2). On se place dans cette optique pour étudier les propriétés thermodynamiques des structures assemblées à base d'ADN.

De nombreuses méthodes sont utilisées pour avoir des informations plus ou moins directes sur l'hybridation des brins d'ADN (UV, FRET, AFM, cryo-EM, électrophorèse sur gel) (voir partie 1.3.1). Cependant, ces méthodes nous informent sur la structure des objets ou sur l'état hybridé ou non des nucléotides, mais ne fournissent pas d'information directe sur la thermodynamique du repliement. C'est pourquoi nous utilisons la calorimétrie qui est la seule méthode permettant d'avoir accès aux paramètres thermodynamiques du système sans avoir à utiliser de modèle.

Dans ce chapitre, nous allons dans un premier temps voir les différentes méthodes de calorimétrie et comment elles peuvent être utilisées pour mesurer la chaleur dégagée dans de faibles volumes de liquide, puis nous verrons dans une seconde partie les principes thermodynamiques de l'assemblage de nanostructures d'ADN. Enfin, nous décrirons dans une troisième partie les expériences effectuées en calorimétrie différentielle à balayage (DSC) ainsi que le traitement des données permettant le calcul des paramètres thermodynamique de l'assemblage des structures d'ADN. Ceux-ci pourront nous informer sur différentes caractéristiques du repliement des structures d'ADN qui sont la stabilité, la coopérativité, et le nombre de transitions intermédiaires.

2.1 La calorimétrie

2.1.1 Principe général des calorimètres

Introduction

La calorimétrie consiste en la mesure d'échanges de chaleur au cours de transformations dans des systèmes thermodynamiques. Pour cela, on utilise un calorimètre qui est l'enceinte dans laquelle ces mesures de chaleur sont réalisées. Deux types de mesures sont effectuées en calorimétrie. La première est la mesure de chaleur spécifique. Celle-ci correspond à l'énergie qu'il faut fournir à un kilogramme de matière pour élever sa température de 1 K, elle s'exprime donc en J/K/kg. La deuxième est la mesure de chaleur mise en jeu lors de réactions chimiques, ou lors de transitions de phase. En physique, la calorimétrie est utilisée pour étudier les anomalies de chaleurs spécifiques liées aux transitions de phases de matériaux divers comme les nanoparticules, les couches minces, les cristaux ou encore les polymères [75].

La première mesure de calorimétrie en biologie est a été réalisée en 1780 par Lavoisier et Laplace afin de mesurer la chaleur dégagée par le métabolisme d'animaux vivants [76]. Un cochon d'Inde était placé au centre d'un calorimètre à glace constitué de trois enceintes : une enceinte centrale contenant le cochon d'Inde et deux enceintes remplies de glace ; l'enceinte la plus externe servant à isoler le reste du calorimètre du milieu extérieur. La chaleur fournie par l'animal était mesurée à partir du volume d'eau fondant

de la deuxième enceinte (figure 2.1). Aujourd'hui, la calorimétrie est utilisée pour étudier des objets beaucoup plus petit ce qui a été permis grâce à l'émergence d'appareils de plus en plus sensibles, mais le principe reste le même. Le calorimètre est une enceinte isolée du milieu extérieur. Il doit pouvoir mesurer la chaleur dégagée par l'échantillon situé dans l'enceinte grâce à un élément de thermométrie. Dans le cas du calorimètre à glace de Lavoisier et Laplace, le volume de glace fondu fait office de thermomètre. La figure 2.1 montre le calorimètre ITC développé au cours de cette thèse ainsi que le calorimètre à glace de Lavoisier.

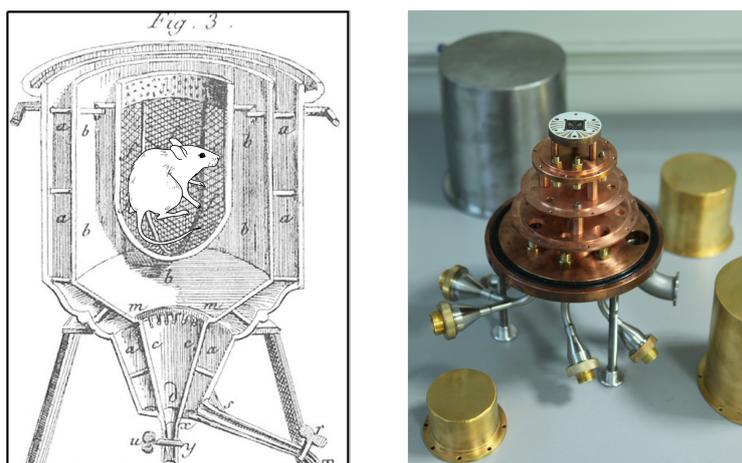


FIGURE 2.1 – À gauche : calorimètre à glace de Lavoisier et Laplace ; à droite : calorimètre ITC en développement (voir chapitre 5).

Principe des mesures en calorimétrie

Un calorimètre est un système isolé : l'échantillon à l'intérieur du calorimètre ne doit pas pouvoir échanger ni chaleur ni travail avec l'extérieur. À l'intérieur de l'enceinte se trouve l'échantillon et les addenda, constitués du porte échantillon, ainsi que des éléments de chauffage et de thermométrie. La capacité calorifique du calorimètre est donc : $C_{calo} = C_{ech} + C_{addenda}$. En pratique, le calorimètre n'est jamais parfaitement isolé et une conductance thermique K relie l'échantillon au bain thermique (figure 2.2). En considérant la conservation de l'énergie, si une puissance P est apportée au niveau de l'échantillon, soit par un élément chauffant, soit par une transformation chimique, alors on peut écrire l'équation différentielle suivante dite équation de la chaleur où K est la conductance thermique et C la capacité calorifique du calorimètre :

$$P = K(T - T_0) + C \frac{dT}{dt} \quad (2.1)$$

On suppose alors que la température de l'échantillon est homogène et donc que le temps caractéristique de diffusion dans l'échantillon τ_{diff} est très petit devant le temps de re-

laxation du calorimètre τ_{bain} :

$$\tau_{bain} \gg \tau_{diff} \quad (2.2)$$

avec

$$\tau_{bain} = \frac{C}{K} \quad (2.3)$$

et

$$\tau_{diff} = \frac{L^2}{D} \quad (2.4)$$

Avec L la dimension caractéristique de l'échantillon, et D la diffusivité thermique de l'échantillon. Plus τ_{bain} est grand, plus le calorimètre est isolé.

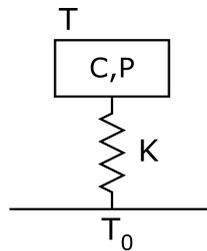


FIGURE 2.2 – Principe général d'un calorimètre de capacité calorifique C , de conductance thermique K et dans lequel une puissance P est apportée.

Pour avoir un ordre de grandeur, un échantillon de 1 cm^3 d'eau a un temps de diffusion de 700 s alors que celui d'un échantillon de 1 cm^3 de cuivre est de 0.8 s. Dans le cas de l'eau, le calorimètre doit donc être très isolé et avoir une constante de temps τ_{bain} supérieur à 7000 s. La faible diffusivité thermique de l'eau rend l'isolation primordiale lors de la mesure d'échantillons liquides ce qui est une des difficulté des mesures de calorimétrie en biologie.

2.1.2 Thermométrie

Deux types de thermométrie sont généralement utilisés dans les calorimètres : il s'agit de la thermistance et du thermocouple.

- une thermistance est une résistance dont la résistivité varie avec la température. La sensibilité d'une thermistance est caractérisé par son coefficient de température α

$$\alpha = \frac{1}{R} \frac{dR}{dT}$$

Dans les thermomètres de platine qui sont très couramment utilisés, $\alpha = 3.9 \times 10^{-3} \text{K}^{-1}$.

- les thermocouples sont composés de jonctions thermoélectriques entre deux matériaux différents. Lorsqu'il y a une différence de température ΔT entre deux de ces jonctions, cela engendre une différence de potentiel : c'est l'effet Seebeck. La mesure de la tension entre les deux jonctions permet de mesurer le ΔT . Les thermocouples sont généralement associés entre eux afin de former des thermopiles et ainsi augmenter la sensibilité du signal.

La qualité d'un thermomètre dépend de nombreux facteurs qui sont la sensibilité du thermomètre, la masse et la taille du thermomètre qui déterminent le temps de réponse, la stabilité du thermomètre (dérive au cours du temps), et la puissance dissipée lors d'une mesure de température.

2.1.3 Méthodes courantes utilisées en calorimétrie

Différentes méthodes de calorimétrie sont utilisées suivant le type de mesure effectuée et l'échantillon étudié, dans cette partie nous fournissons une revue synthétique de ces méthodes. Nous allons voir en quoi la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) est la méthode la plus pertinente pour nos mesures.

Calorimétrie adiabatique

La calorimétrie adiabatique est une méthode qui utilise directement l'équation de la chaleur vue précédemment (2.1). Elle est surtout utilisée pour mesurer des chaleurs spécifiques de solides. Le calorimètre est isolé du milieu extérieur et une puissance est envoyée au niveau de l'échantillon ce qui permet de calculer sa chaleur spécifique. En effet, comme :

$$C_p = \lim_{\Delta T \rightarrow 0} \frac{\Delta Q}{\Delta T} \quad (2.5)$$

il est possible de calculer la chaleur spécifique de l'échantillon en mesurant la variation de température ΔT lors de l'injection d'une puissance P connue :

$$C = \frac{P \delta t}{\Delta T} \quad (2.6)$$

Le principal inconvénient de cette technique est que l'isolation n'est jamais parfaite, il existe toujours une fuite thermique K . Cela est particulièrement gênant lors de la mesure de petits échantillons dans lesquelles les fuites thermiques sont importantes par rapport à la faible capacité calorifique des échantillons, et lorsque la diffusivité thermique de l'échantillon est faible (échantillons liquides). Le tableau ci-dessous (2.1) indique les conductances thermiques maximales permettant d'avoir $\tau_{bain} = 10 \tau_{diff}$ pour des échantillons en cuivre et en eau de différentes dimensions. On peut voir que pour des échantillons de respectivement 1 mg, 100 μg , et 10 μg d'eau, la conductance thermique doit être inférieure à

matériau	volume	masse (mg)	C (J/K)	D (m ² /s)	τ_{diff} (s)	K pour avoir $\tau_{bain} = 10 \tau_{diff}$ (mW/K)
cuivre	1 cm ³	8960	3.4	1.17 10 ⁻⁴	0.85	400
cuivre	1 mm ³	8.96	0.0034	1.17 10 ⁻⁴	0.0085	40
eau	1 cm ³	1000	4.18	1.5 10 ⁻⁷	700	0.6
eau	1 mm ³	1	0.00418	1.5 10 ⁻⁷	7	0.06
eau	465 μm ³ (100 μg)	0.1	4.2 10 ⁻⁴	1.5 10 ⁻⁷	1.5	0.028
eau	216 μm ³ (10 μg)	0.01	4.2 10 ⁻⁵	1.5 10 ⁻⁷	0.3	0.013

TABLE 2.1 – Capacités calorifiques, diffusivités thermiques, temps de diffusion et conductances thermiques d'échantillons de cuivre et d'eau de différentes dimensions.

respectivement 60 μW/K, 27 μW/K, et 13 μW/K. La conductance thermique d'un fil de cuivre de 10 cm de long et de 0.1 mm de diamètre est d'environ 30 μW/K. L'isolation thermique devient donc vite un problème limitant pour les plus petits échantillons. D'autres méthodes ont donc été développées afin de s'affranchir des problèmes liés à l'isolation des échantillons.

Calorimétrie à relaxation

La calorimétrie à relaxation consiste en l'application d'une impulsion de chaleur au niveau du capteur ce qui cause une augmentation très rapide de la température de l'échantillon. Cette méthode est utilisée pour les petits échantillons pour lesquels le temps caractéristique de diffusion est très petit ce qui permet à la température de l'échantillon d'être rapidement homogène après l'impulsion. On s'intéresse ensuite à la décroissance de la température. Une fois la température à son maximum, celle-ci décroît de manière exponentielle avec la relation :

$$T(t) = T_{bain} + \frac{P_0}{K} \exp^{-t/\tau} \quad (2.7)$$

où $\tau = C/K$. La conductance thermique K pouvant être préalablement déterminée à partir de la température de l'échantillon en régime stationnaire, il est ensuite possible de calculer la chaleur spécifique de l'échantillon avec la décroissance exponentielle de la température après une impulsion. Cette méthode est très utilisée pour des mesures de couches minces sur des grandes gammes de températures [77]. Des appareils commerciaux

(PPMS) permettent d'effectuer ce type de mesure. La calorimétrie à relaxation permet de mesurer des chaleurs spécifiques avec une résolution de 10^{-3} . Une autre méthode permet de mesurer la chaleur spécifique de petits échantillons avec encore plus de résolution, il s'agit de la calorimétrie AC.

Calorimétrie AC

La calorimétrie AC a été utilisée pour la première fois par Sullivan et Seidel [78]. Elle consiste à injecter dans l'échantillon une puissance alternative $P(t) = P_0 \cos(\omega t)$ ce qui résulte en une température également oscillante. De cette manière, il est possible de s'affranchir de la fuite thermique en choisissant une fréquence de mesure f_{mes} suffisamment grande avec $1/\tau_{bain} \ll f_{mes}$. Cependant, cette fréquence de mesure est limitée par le temps caractéristique de diffusion du système τ_{diff} . En effet, pour que la température du système soit homogène, il faut : $f_{mes} \ll 1/\tau_{diff}$ donc $1/\tau_{bain} \ll f_{mes} \ll 1/\tau_{diff}$. La température résultante, solution de l'équation de la chaleur, possède une composante continue et une composante alternative oscillant à la fréquence $2f_{mes}$. La température alternative dans le thermomètre est :

$$\delta T_{AC} = \frac{P_0}{\omega C} \left[1 + \frac{1}{(\omega \tau_{bain})^2} + (\omega \tau_{diff})^2 \right]^{1/2} \cos(2\omega t + \varphi) \quad (2.8)$$

donc si $1/\tau_{bath} \ll 2\pi\omega \ll 1/\tau_{diff}$, l'oscillation de la température est :

$$\delta T_{AC,RMS} = \frac{P_0}{\omega C} \quad (2.9)$$

La température étant mesurée à une fréquence bien précise, il est possible d'utiliser une détection synchrone pour mesurer des oscillations de températures ayant de très faibles amplitudes et d'en déduire des variations de chaleur spécifique avec des $\Delta C_p/C_p$ pouvant aller jusqu'à 10^{-4} [79, 80]. La calorimétrie AC est surtout utilisée dans le domaine des basses températures [81] mais elle est également utilisée en biologie pour la mesure de petits volumes [75, 82, 83]. L'équipe TPS a développé une expertise reconnue dans la calorimétrie AC avec des mesures de nanocalorimétrie AC allant des basses température à l'ambiante [75]. ces mesures sont possibles grâce au développement en interne des nanocalorimètres pouvant atteindre notamment des sensibilités de l'ordre de quelques attojoules (10^{-18} J) [84].

La calorimétrie AC est une méthode très sensible, mais une difficulté apparaît lors de l'étude de transformations chimiques lentes comme l'assemblage de structure d'ADN. En effet, la fréquence de mesure n'est alors plus limitée uniquement par τ_{diff} mais également par le temps caractéristique de la réaction qui est de l'ordre de la dizaine de minutes pour les origami d'ADN [49]. La calorimétrie AC ne peut donc pas être utilisée pour l'étude de réactions chimiques lentes comme l'assemblage des origami d'ADN. Pour l'étude d'échantillons biologiques, les méthodes de calorimétrie les plus utilisées sont la calorimétrie différentielle à balayage (DSC : differential scanning calorimetry) et la titration calorimétrique isotherme (ITC : isothermal titration calorimetry).

Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La calorimétrie différentielle à balayage (ou DSC) est une méthode qui est très utilisée en biologie pour l'étude de la stabilité et de la dénaturation de protéines, d'acides nucléiques [73, 74], ainsi que de membranes lipidiques [85]. Elle est également utilisée en physique pour l'étude de colloïdes, de polymères ou de transitions de phases dans des nanomatériaux [85]. La méthode consiste à effectuer des rampes de température au cours desquelles la température est augmentée puis diminuée de manière contrôlée. Le calorimètre est composé de deux cellules : une cellule de référence et une cellule de mesure (figure 2.3). Les variations de température de la cellule de mesure par rapport à la cellule de référence sont mesurées afin d'en déduire la chaleur spécifique de l'échantillon en fonction de la température.

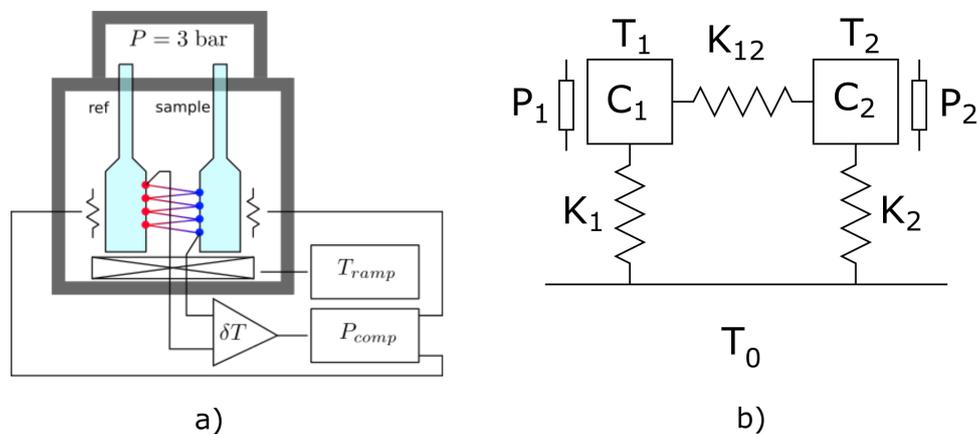


FIGURE 2.3 – Principe de fonctionnement d'un calorimètre DSC à puissance compensée (a) et liens thermiques entre les différents éléments du calorimètre (b).

Il existe deux types d'instrumentation DSC : la DSC à compensation de puissance et la DSC à flux de chaleur. Dans la DSC à compensation de puissance, chaque cellule possède un chauffage. La différence de température existante entre les deux cellules est mesurée et une puissance est fournie à l'un ou l'autre des chauffages de manière à maintenir les deux cellules à la même température (figure 2.3). La puissance compensée fournie correspond donc à la puissance dégagée ou absorbée par la cellule de mesure par rapport à la cellule de référence. Dans la DSC à flux de chaleur, il n'y a pas de compensation ; les deux cellules sont dans une même enceinte et c'est le flux de chaleur existant entre les deux cellules qui est directement mesuré. L'avantage de la DSC par compensation de puissance est qu'il est inutile de prendre en compte les fuites thermiques entre les deux cellules car celles-ci sont à la même température. L'instrument est plus complexe mais l'analyse des résultats est grandement simplifiée.

La figure 2.3 représente schématiquement les liens thermiques d'un calorimètre DSC à puissance compensée avec une cellule de mesure (C_1) et une cellule de référence (C_2).

La conservation de l'énergie implique que :

$$P_1 = C_1 \frac{dT_1}{dt} + K_{12}(T_1 - T_2) + K_1(T_1 - T_0)$$

$$P_2 = C_2 \frac{dT_2}{dt} + K_{12}(T_2 - T_1) + K_2(T_2 - T_0)$$

On a donc :

$$\Delta P = P_1 - P_2 = C_1 \frac{dT_1}{dt} - C_2 \frac{dT_2}{dt} + 2K_{12}(T_1 - T_2) + K_1(T_1 - T_0) - K_2(T_2 - T_0)$$

La boucle de contre réaction impose $T_1 = T_2 = T$ donc :

$$\Delta P = (C_1 - C_2) \frac{dT}{dt} + (K_1 - K_2)(T - T_0)$$

La chaleur spécifique de la cellule de mesure peut se décomposer en deux parties : une correspondant à la cellule C_{cell} et une due à l'échantillon C_{ech} . Si les deux cellules n'ont pas exactement la même masse, cela cause un déséquilibre $\Delta C_{cell} = C_{cell\ ech} - C_{cell\ ref}$. On a donc :

$$\Delta P = \Delta C_{cell} \frac{dT}{dt} + C_{ech} \frac{dT}{dt} + (K_1 - K_2)(T - T_0)$$

Si l'on suppose que le calorimètre est idéal et parfaitement équilibré, cela implique $\Delta C_{cell} = 0$ et $K_1 = K_2$. Il reste donc :

$$\Delta P = C_{ech} \frac{dT}{dt}$$

La chaleur spécifique de l'échantillon peut donc être mesurée directement par la relation suivante :

$$C_p = \frac{\Delta P}{\gamma} \quad (2.10)$$

Avec ΔP la puissance compensée, et γ la vitesse de rampe.

Les variations d'enthalpie et d'entropie peuvent ensuite être calculées avec les relations suivantes :

$$H(T) = H(T_0) + \int_{T_0}^T C_p(T) dT \quad (2.11)$$

$$S(T) = S(T_0) + \int_{T_0}^T \frac{C_p}{T} dT \quad (2.12)$$

En pratique, les chaleurs spécifiques et les fuites thermiques des deux cellules ne sont pas parfaitement identiques ce qui provoque une légère variation de la ligne de base lors des

mesures. Cela peut être corrigé lors de la calibration de l'appareil et lors du traitement des données qui sera détaillé par la suite. Les appareils DSC commerciaux permettent la mesure de chaleur spécifique avec une erreur de 1%. Cette erreur est principalement due à la non répétabilité de la ligne de base en raison de faibles déséquilibres entre les cellules.

La puissance obtenue en DSC est directement proportionnelle à la vitesse de rampe γ (eq 2.10). Une méthode permettant d'augmenter significativement la sensibilité de la mesure est donc d'augmenter la vitesse de rampe. Les instruments classiquement utilisés pour les mesures avec des liquides ont des vitesses de rampe autour de 1°C/min. Les conceptions des instruments ne permettent pas de varier cette vitesse de manière significative pour, par exemple, étudier la cinétique des phénomènes physiques. Pour cela, des méthodes spéciales adaptées aux grandes vitesses doivent être implémentées : c'est la *fast speed DSC* dans laquelle des vitesses de rampes allant jusqu'à 10⁴ K/s – 10⁶ K/s peuvent être atteintes. Cela a l'avantage, en plus d'augmenter la sensibilité, de contourner les problèmes d'isolation et de permettre la mesure d'effets cinétiques [86]. Dans le cas de l'assemblage de structures d'ADN cependant, la *fast speed DSC* ne peut être utilisée pour des mesures thermodynamiques à l'équilibre en raison de la faible cinétique des transformations.

Titration calorimétrique isotherme (ITC)

La titration calorimétrique isotherme (ITC), comme la DSC, est une méthode qui est très utilisée en biologie, mais à l'inverse de la DSC, les mesures sont effectuées à température constante. L'ITC est plutôt utilisée pour l'étude d'interactions comme les interactions protéines/ligands, protéine/protéine, ADN/molécules, etc. [87]. Au cours des mesures ITC, un réactif titré est injecté dans une solution contenant un autre réactif titrant et la chaleur dégagée lors de chaque injection est mesurée par le calorimètre au cours du temps. Au fur et à mesure des injections, l'équilibre thermodynamique est déplacé et la quantité de réactifs réagissant est modifiée ce qui permet de mesurer la variation d'enthalpie et la constante d'équilibre K_{eq} de la réaction. À chaque injection, la chaleur libérée est mesurée en fonction du temps ce qui permet également d'avoir des informations sur la cinétique de la réaction. La figure 2.4 montre les données typiques obtenues en ITC avec la puissance dégagée en fonction du temps pour une succession d'injections.

2.1.4 Intérêt de la DSC et de l'ITC pour l'étude de l'assemblage de structures d'ADN

Les méthodes de calorimétrie les plus utilisées en biologie sont la DSC et l'ITC. Ce sont des méthodes bien distinctes de calorimétrie fournissant des informations complémentaires. Les mesures en DSC sont effectuées au cours de rampes de température ce qui permet d'observer la dénaturation ou le repliement de protéines, les transitions de phase

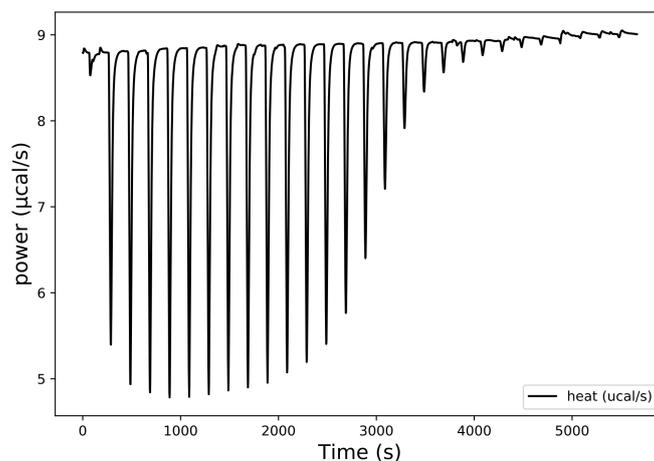


FIGURE 2.4 – Données brutes obtenues en ITC pour le dosage d’un simple brin d’ADN de 16 nucléotides avec son complémentaire. Les mesures sont réalisées par le calorimètre VP-ITC de l’EMBL.

de membranes lipidiques, ou en ce qui nous concerne l’assemblage de nanostructures d’ADN. L’ITC consiste en la titration de deux réactifs à température constante. Les mesures par ITC permettent donc la mesure de constantes d’équilibres de réaction et sont particulièrement adaptées à l’étude d’interactions entre biomolécules comme les interactions protéines/ligands, protéine/protéine, ADN/molécules [88].

Pour l’étude du repliement de nano-structures d’ADN, nous utilisons la DSC pour obtenir des informations sur le repliement global des différentes structures. La DSC permet d’obtenir les paramètres thermodynamiques tels que la variation d’enthalpie ΔH , la variation d’entropie ΔS , ou encore la température de fusion, sans avoir recours à des modèles. Nous développerons la méthodologie plus loin dans cette partie (partie 2.3) et dans le chapitre 3. Des informations complémentaires comme le nombre d’états intermédiaires et leurs propriétés thermodynamiques peuvent également être obtenues à l’aide de modèles. Ces informations complémentaires ne sont donc pas aussi indiscutables que les paramètres thermodynamiques provenant de mesures directes.

L’ITC pourrait être utilisé pour cibler des étapes précises du repliement en utilisant comme réactifs des états préformés (voir figure 2.5) ou pour mesurer des variations d’enthalpie lorsque la composition du mélange change. Comme les mesures en ITC sont effectuées à une température fixe choisie par l’expérimentateur, on peut aussi les utiliser pour mesurer l’influence de la température sur certains paramètres thermodynamiques (voir partie 2.2.3).

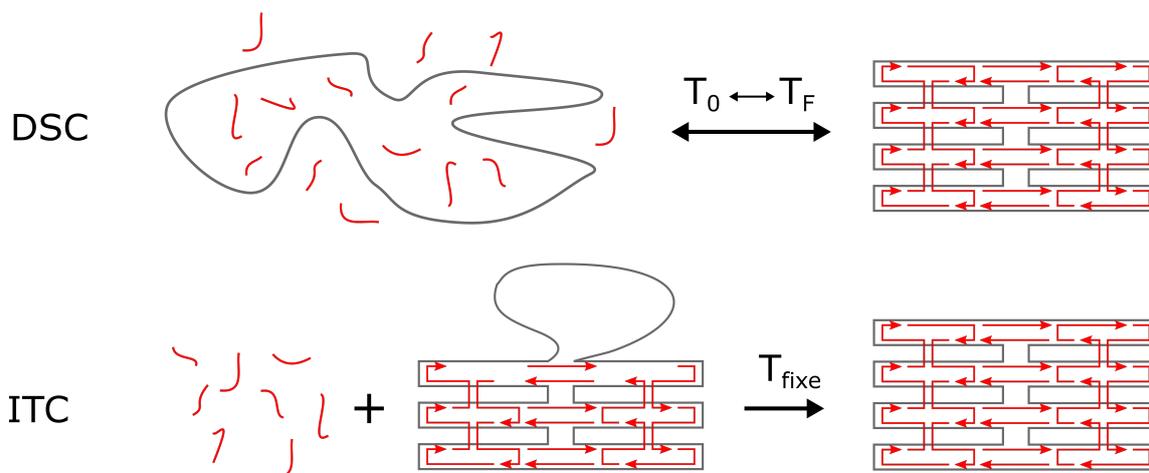


FIGURE 2.5 – Schéma représentant les principes des expériences DSC et ITC. La DSC est utilisée pour observer le repliement global de la structure en fonction de la température, l'ITC se concentre sur le repliement d'une étape du repliement à une température fixe.

Calorimètres commerciaux

Les appareils commerciaux que nous utilisons (la nanoDSC III de CSC pour la DSC et le VP-ITC microcal pour l'ITC) nécessitent une quantité de matériel bien plus importante que les expériences par absorption UV, gel, ou AFM qui sont plus généralement utilisées pour l'étude de l'ADN. En effet, il faut respectivement 100 et 300 nmol de paires de bases d'ADN pour une expérience en DSC et en ITC. Une expérience en DSC coûte donc environ 500€ pour les origami et 40€ pour les structures plus petites comme les tétraèdres. De plus, suivant la sensibilité des appareils, il peut être nécessaire d'utiliser des solutions relativement concentrées ce qui peut être problématique pour l'étude de certains objets pouvant former des agrégats. Les spécifications des appareils ITC et DSC disponibles dans le commerce sont indiquées dans les tables 2.2 et 2.3. L'étude de l'assemblage d'origami d'ADN bénéficiera du développement de calorimètres très sensibles comme le sont les nanocalorimètres.

Nanocalorimétrie pour l'étude d'échantillons liquides

Un moyen de réduire le coût est de réduire la quantité de matière et donc d'augmenter la sensibilité des calorimètres. On parle de nano-calorimétrie, soit lorsque les dimensions de l'échantillon sont de l'ordre du nm, soit lorsque les énergies mesurées sont inférieures au nJ. Dans les deux cas, les systèmes étudiés sont de faibles dimensions ce qui nécessite le développement de capteurs miniaturisés très sensibles [90]. Il y a en biologie, un besoin important en nano-calorimètres permettant la mesure de faibles volumes de liquides. De nombreux nano-calorimètres ont été développés pour pallier ce manque [91]. Ils peuvent

	cellule	volume échantillon (μL)	bruit ($\mu\text{cal}/^\circ\text{C}$)	répétabilité de la ligne de base ($\mu\text{cal}/^\circ\text{C}$)	temps de réponse (s)
Privalov 1974[89]	capillaire	1000	4	20	-
microcal capillary VP DSC	capillaire 130 μL tantale	370	0.05	1.5	5
microcal PEAQ DSC	capillaire 130 μL tantale	250	0.05	1	5
CSC nanoDSC III capillaire	capillaire 330 μL platine	700	0.2	4	5
CSC nanoDSC III cylindrique	cylindrique 330 μL or	500	0.2	4	5
TA instrument nanoDSC	capillaire 300 μL platine	1000	0.2	0.4	7
Setaram MICRODSC7 EVO	cylindrique 1 mL	1000	0.4	-	-

TABLE 2.2 – Comparaison des instruments DSC commerciaux. Les valeurs de bruits sont données en $\mu\text{cal}/^\circ\text{C}$ à $1^\circ\text{C}/\text{min}$.

	matériau cellule	volume cellule (μL)	volume seringue (μL)	bruit de fond (nW)	temps de réponse (s)	stabilité en température (μK)
microcal VP-ITC	hastelloy	1400	300	2.1	20	150
microcal ITC200	hastelloy	200	40	0.8	10	150
microcal PEAQ-ITC	hastelloy	200	40	0.6	8	120
TA instrument nanoITC volume standard	hastelloy ou or 24 carats	1000	100-250	2.5	13	200
TA instrument nanoITC volume réduit	or 24 carats	190	50	1.4	11	200

TABLE 2.3 – Comparaison des instruments ITC commerciaux.

être conçus pour des mesures en calorimétrie AC [82], en ITC [92, 93], ou encore en DSC [94-97].

La principale difficulté en nano-calorimétrie est l'isolation des échantillons. En effet, on observe dans la table 2.1 que plus l'échantillon est petit, plus la conductance thermique permettant de remplir la condition $\tau_{bain} \gg \tau_{diff}$ doit être faible. Cela est d'autant plus vrai lorsque l'échantillon a une diffusivité faible ce qui est le cas de l'eau. De plus, les dimensions des addenda deviennent non négligeables par rapport aux dimensions de l'échantillon. Il est donc nécessaire d'isoler thermiquement l'échantillon et le thermomètre du porte échantillon et du chauffage. Pour cela, les nano-calorimètres sont généralement composés d'une membrane suspendue de faible épaisseur ($<1 \mu\text{m}$) sur laquelle se trouve le thermomètre ainsi que l'échantillon. L'utilisation d'une membrane permet en même temps de diminuer la conductance thermique et la capacité calorifique des addenda par rapport à celle de l'échantillon. La micro-fabrication est donc nécessaire en nano-calorimétrie pour la fabrication de ces membranes suspendues ainsi que pour avoir des éléments de thermométrie (thermomètre, chauffage) les plus petits et les plus sensibles possible.

Lors de la mesure d'échantillons liquides, une difficulté supplémentaire concerne l'enfermement et le mélange du liquide. Deux stratégies sont utilisées :

- la chambre de réaction peut être ouverte [98-100], l'échantillon est alors directement

déposé sur la membrane. C'est la méthode la plus simple mais limitée par le risque d'évaporation du liquide qui vient perturber les mesures.

- la chambre peut être fermée [94, 96, 101-104] ce qui limite l'évaporation mais il faut alors ajouter un système microfluidique pour injecter les liquides sur la membrane. Cela augmente cependant la capacité calorifique du capteur et surtout sa conductance thermique. Les calorimètres à chambre fermée mesurant la chaleur dégagée lors du mélange de deux liquides sont appelés *calorimètre à flux*.

Les tables 2.4 et 2.5 comparent les différents nano-calorimètres qui ont été réalisés pour l'étude d'échantillons liquides.

Notre équipe est spécialisée dans les mesures thermodynamiques de petits systèmes ; de nombreux nano-calorimètres ont été réalisés pour des applications très larges [75] : des mesures ont été effectuées à basse température pour la mesure d'effet supraconducteurs dans des nano-disques et nano-anneaux [106, 107] à l'aide d'un calorimètre pouvant détecter des énergies de l'ordre de l'attojoule [84]. Un nano-calorimètre basé sur une membrane en polymère a également été développé pour la mesure de nanomagnétisme [108] et un autre pour des mesures de transition de phases dans des polymères à l'ambiante [109]. En ce qui concerne la mesure d'échantillons liquides, un calorimètre AC a été développé pour l'étude de la dénaturation de protéines [82]. Cependant, nous avons vu dans la partie 2.1.3 que la calorimétrie AC n'est pas adaptée à la mesure du repliement de structures d'ADN en raison de la faible vitesse du repliement des structures d'ADN. En revanche, nous utilisons l'expertise acquise par l'équipe en thermométrie et en fabrication de capteurs pour développer des nano-calorimètres ITC et DSC dédiés à l'étude de ces structures. Le développement du nano-calorimètre ITC a été effectué au cours de cette thèse et sera décrit dans le chapitre 5.

2.2 Thermodynamique de l'hybridation d'une double hélice d'ADN

Le développement des technologies de l'ADN avec l'utilisation de techniques comme la PCR (polymerase chain reaction) et l'essor des biocapteurs à ADN pour le diagnostic médical a rendu nécessaire la compréhension de la thermodynamique de l'hybridation de l'ADN. Il est en effet nécessaire de connaître les températures de fusion des différents duplex d'ADN utilisés lors des PCR ou dans les biopuces. Les paramètres thermodynamiques de nombreux duplex d'ADN ont donc été mesurés et des modèles ont été élaborés afin de décrire la thermodynamique de l'hybridation de duplex à partir de leurs séquences en nucléotides. Dans cette partie, nous introduisons les concepts et les modèles qui décrivent la thermodynamique de l'hybridation de l'ADN.

ref	ouvert/fermé	membrane	thermomètre	microfluidique
Higuera-Guisset et al. 2004 [101]	fermé	Si	thermopile Si	-
Xu et al. 2008 [92]	ouvert	1.5 μmSiO_2 - Si_3N_4	thermopile Si-Al	PTFE
Lee et al. 2009 [102]	fermé	parylene-C	thermopile Au/Ni	parylene - PDMS
Nam et al. 2010 [105]	fermé	SiO_2 - SiN	thermopile Au-Ni	PDMS
Zhang et al. 2004 [104]	fermé	Si_3N_4 - SiO_2 - Si_3N_4	p-type polysilicon - Au microthermopile	pyrex 7740 ou PDMS
Wang et al. 2016 [94]	fermé	polyimide	thermistance oxyde de vanadium	PDMS
Torres et al. 2004/2008 [93, 98]	ouvert	polyimide	thermistance silicium amorphe	-
Baier et al 2005 [103]	fermé	SiN	thermopile BiSb/Sb	PMMA
Davaji et al. 2014 [95]	fermé	SiN	thermistance Ni	-
Wang et al 2008 [96]	fermé	Si et SU-8	thermopile Ni-Cr	PDMS
Johannessen et al. 2002 [99]	fermé	SiN	thermopile Au-Ni	-
Chancelor et al. 2004 [100]	fermé	SiN	thermopile Ti-Bi	-

TABLE 2.4 – Comparaison de différents nanocalorimètres permettant l'étude d'échantillons liquides.

ref	type mesure	volume	résolution puissance	résolution énergie	sensibilité
Higuera-Guisset et al. 2004 [101]	mesures différentielles	600 μL	0.6 μW	-	0.39 V/W
Xu et al. 2008 [92]	ITC	50 nL	22 nW	132 nJ	2.9 V/W
Lee et al. 2009 [102]	calorimètre à flux	3.5 nL	4.2 nW	10 nJ	-
Nam et al. 2010 [105]	calorimètre à flux	350 nL	20 nW	-	461 V/W
Zhang et al. 2004 [104]	calorimètre à flux	15 nL	~ 100 nW	-	0.94 V/W
Wang et al. 2016 [94]	DSC	1 μL	40 nW	-	6V/W
Torres et al. 2004/2008 [93, 98]	enthalpy array - ITC	500 nL	-	~ 1000 nJ	-
Baier et al 2005 [103]	calorimètre à flux	$< 5 \mu\text{L}/\text{min}$	< 100 nW	-	4-6V/W
Davaji et al. 2014 [95]	AC - DSC	200 nL	-	-	-
Wang et al 2008 [96]	calorimètre à flux - DSC	0.8-1.2 μL	50 nW	-	0.87 V/W - 1.2 V/W
Johannessen et al. 2002 [99]	cell-based assay	< 1 nL	13 nW	-	-
Chancelor et al. 2004 [100]	mesure d'enthalpie de réaction	1-500 pL	1.5 nW	-	-

TABLE 2.5 – Comparaison de différents nanocalorimètres permettant l'étude d'échantillons liquides.

2.2.1 Variation d'enthalpie, d'entropie et d'énergie libre

L'hybridation de deux simples brins d'ADN en une double hélice est une réaction exothermique. L'hybridation et la dénaturation de structures d'ADN sont donc accompagnées d'échanges de chaleur qui peuvent être mesurés en calorimétrie. La réaction d'hybridation de deux simples brins en une double hélice est associée à une variation d'enthalpie négative $\Delta H < 0$. Cette variation d'enthalpie vient des interactions qui stabilisent la double hélice d'ADN qui sont l'appariement de Watson-Crick et l'interaction d'empilement. La variation d'entropie ΔS est également négative. Elle est causées par les effets de solvation et par le fait que le nombre de degrés de liberté est plus faible dans une double hélice d'ADN que dans deux simples brins. Il y a donc une diminution du désordre lors de l'hybridation de deux simples brins d'ADN en une double hélice. La variation d'enthalpie libre est donc :

$$\Delta G(T) = \Delta H(T) - T\Delta S(T) \quad (2.13)$$

Les duplex d'ADN s'hybrident différemment suivant leur taille. Les polymères d'ADN

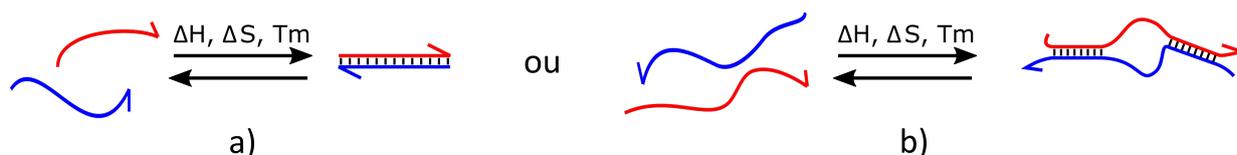


FIGURE 2.6 – Hybridation d'un oligonucléotide court (a) et d'un polynucléotide long (b).

(composés de plus d'une vingtaine nucléotides) s'hybrident par domaines allant de vingt à plusieurs centaines de bases alors que dans les oligonucléotides courts (composés de moins de vingt bases), toutes les bases s'hybrident coopérativement en une seule étape (figure 2.6). Dans ce dernier cas, la réaction d'hybridation peut être modélisée par une réaction bi-moléculaire à deux états. Dans certains cas cependant, l'hybridation de courts oligonucléotides est constituée de deux transitions à deux états, une transition de pré-fusion précédant l'étape de fusion [110].

2.2.2 Température de fusion

La température de fusion (T_m) est la température pour laquelle la moitié des brins sont hybridés. Elle est directement liée à la stabilité de la structure : plus T_m est grand, plus la structure est stable. Pour une réaction mono-moléculaire du type $A \rightleftharpoons B$ comme le repliement d'une épingle à cheveux d'ADN, la température de fusion peut être simplement calculée à partir de la variation d'enthalpie et de la variation d'entropie avec la relation $T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S}$. Dans le cas de l'hybridation d'un duplex d'ADN qui est une réaction bi-moléculaire du type $A + B \rightleftharpoons C$, la concentration en espèces entre en jeu. En effet, le tableau d'avancement de la réaction d'hybridation est représentée dans le tableau 2.6. La

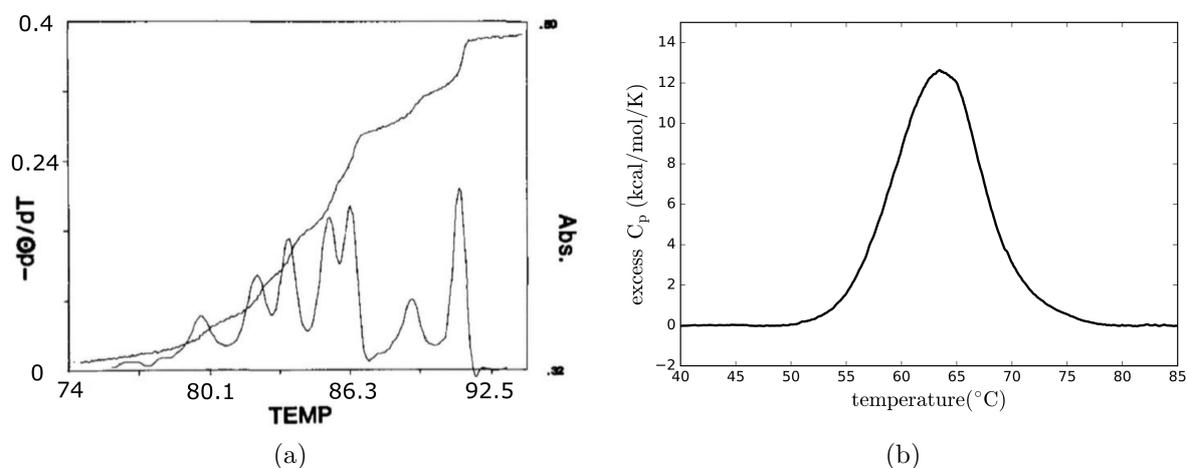


FIGURE 2.7 – a) Absorbance et dérivée de l'absorbance par rapport à la température lors de la dénaturation d'un polymère d'ADN de 1630 paires de bases. Les courbes sont tirées de [111]. b) Chaleur spécifique excédentaire mesurée lors de la dénaturation d'un duplex de 16 paires de bases au cours de cette thèse.

	A	+	B	→	C
état initial	C_A		C_B		0
état final	$C_A - x$		$C_B - x$		x

TABLE 2.6 – Tableau d'avancement de l'hybridation de deux brins d'ADN complémentaires.

constante d'équilibre de la réaction est donc :

$$K_{eq} = \frac{x}{(C_A - x)(C_B - x)} \quad (2.14)$$

Si les deux réactifs sont initialement dans les proportions stœchiométrique avec $C_A = C_B = C_0$, à la température de fusion $T = T_m$, $x = \frac{C_0}{2}$ donc

$$K_{eq}(T_m) = \frac{2}{C_0} \quad (2.15)$$

or,

$$K_{eq}(T_m) = \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT_m}\right) \quad (2.16)$$

$$-R T_m \ln(K_{eq}) = \Delta H - T_m \Delta S \quad (2.17)$$

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln\left(\frac{C_0}{2}\right)} \quad (2.18)$$

La connaissance des variations d'enthalpie et d'entropie permettent donc de calculer de manière simple la température de fusion et donc la stabilité d'une structure d'ADN. Cependant ce modèle n'est valable que dans lorsque les transformations sont à deux états. Lorsque le repliement est composé d'états intermédiaires, la température de fusion correspondant à la température à laquelle la moitié des bases sont hybridées ne peut être calculé facilement. Il est alors nécessaire de décomposer la transformation en une succession de transitions à deux états et de calculer la température de fusion propre à chaque transition intermédiaire.

2.2.3 Variation de chaleur spécifique

La variation de chaleur spécifique ΔC_p correspond à la différence de chaleur spécifique entre l'état dénaturé et l'état replié. La principale conséquence d'un ΔC_p non nul est le fait que les variations d'enthalpie et d'entropie dépendent de la température de transition suivant les relations :

$$\Delta H(T) = \Delta H_0 + (T - T_0) \Delta C_p \quad (2.19)$$

$$\Delta S(T) = \Delta S_0 + \ln\left(\frac{T}{T_0}\right) \Delta C_p \quad (2.20)$$

Où ΔH_0 et ΔS_0 sont les variations d'enthalpie et d'entropie à une température de référence T_0 . ΔC_p peut être mesuré de différentes manières. On peut mesurer la variation d'enthalpie d'un même duplex ayant différentes températures de fusion en faisant varier la concentration en duplex ou la concentration en cations (Na^+ ou Mg^{2+}) présents dans le tampon. Une autre méthode consiste à mesurer la variation d'enthalpie d'un duplex par ITC à différentes températures [112, 113]. De cette façon, on peut mesurer la variation d'enthalpie en fonction de la température. La variation de chaleur spécifique peut alors simplement être calculée avec la relation :

$$\Delta C_p = \frac{d\Delta H}{dT_{transition}} \quad (2.21)$$

La variation de chaleur spécifique a été estimée dans le cas des duplex d'ADN à 40 – 100 cal/K par mole de paires de bases [114]. La figure 2.8 montre une simulation donnant l'enthalpie libre et la chaleur spécifique excédentaire d'un duplex de seize paires de bases à 15 μM avec ou sans variation de chaleur spécifique. Les paramètres thermodynamiques utilisés pour la réaction d'hybridation sont : $\Delta H = -121$ kcal/mol, $\Delta S = -334$ cal/mol/K

et $\Delta C_p = -1.6$ kcal/mol/K. On observe que la présence d'une variation de chaleur spécifique provoque une courbure de l'enthalpie libre en fonction de la température ce qui cause un maximum de stabilité et une dénaturation froide. La dénaturation froide a lieu ici à une température proche de -60°C et n'est donc évidemment pas observable dans un milieu liquide mais elle a déjà été observée pour des protéines et certains ARN [115, 116]. La dénaturation des protéines comme celle des acides nucléiques est accompagné

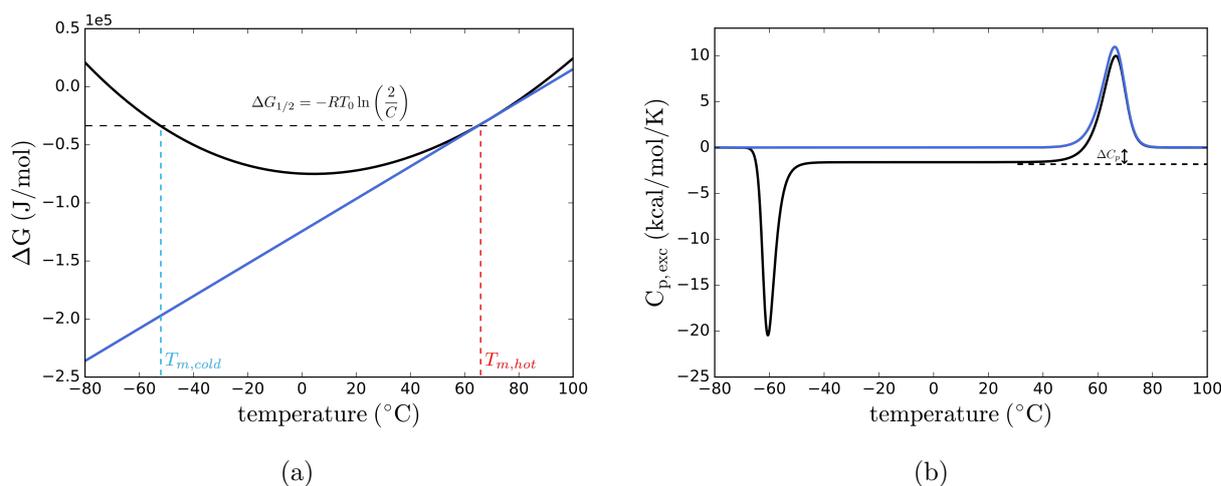


FIGURE 2.8 – Simulation donnant la variation d'enthalpie libre (a) et la chaleur spécifique excédentaire (b) en fonction de la température d'un duplex de seize paires de bases avec (noir) ou sans (bleu) variation de chaleur spécifique.

d'un ΔC_p positif qui est dû à l'hydratation des zones polaires ou apolaires ainsi qu'aux interactions entre les macromolécules. Dans les cas des acides nucléiques, les interactions d'empilement entre simples brins interviennent également dans la variation de chaleur spécifique [113, 117].

2.2.4 Modèle du plus proche voisin

Les avancées en génétique avec le séquençage des génomes et l'apparition des biopuces à ADN ont rendu nécessaire la prédiction précise des températures de fusion des duplex d'ADN. Pour cela, un modèle décrivant l'hybridation de duplex d'ADN a été développé : il s'agit du modèle du plus proche voisin (ou NN model : nearest neighbour model).

Ce modèle permet de calculer les paramètres thermodynamiques à partir de la nature des nucléotides et de leurs plus proches voisins. Il prend en compte les différences dans les énergies d'interactions (base pairing et base stacking) suivant la nature des nucléotides considérés (A, T, C ou G). Les valeurs de variation d'enthalpie libre ont donc été mesurées pour les dix doublets (succession de deux nucléotides) existants, à partir de différents types d'ADN (oligonucléotides et polynucléotides), et à l'aide de différentes méthodes

(absorption UV, DSC). Ces valeurs ont été ensuite unifiées et tabulées [118]. La tabulation en doublets et non uniquement en nucléotides permet de prendre en compte l'interaction d'empilement qui est une interaction qui a lieu le long de la double hélice entre deux nucléotides voisins. On remarque que les doublets comportant les nucléotides C et G sont plus stables que ceux qui sont composés des nucléotides A et T ce qui est cohérent car trois liaisons hydrogène sont présentes dans la paire de bases C/G alors qu'il n'y en a que deux dans la paire de bases A/T. La variation d'enthalpie libre peut ensuite être calculée comme la somme des variations d'enthalpie correspondant à chaque doublet à laquelle on ajoute un terme d'initiation, une pénalité en cas de paire A/T terminale et éventuellement un terme entropique de symétrie si le duplex est auto-complémentaire.

$$\Delta G_{total} = \sum_{ij} \Delta G_{ij} + \Delta G_{initiation} + \Delta G_{AT\ terminal} + \Delta G_{sym} \quad (2.22)$$

Dans ce modèle, la variation d'enthalpie est supposée être indépendante de la concentration en ions positifs (Na^+ , Mg^{2+}). La présence et la concentration de ces ions est prise en compte dans le terme entropique ΔS_{ij} .

Certains logiciels en ligne comme nupack [119], dinamelt [120], ou encore mfold [121] proposent de calculer les paramètres thermodynamiques de structures d'ADN en se basant sur ce modèle. Pour les structures plus complexes, des corrections ont été tabulées afin de prendre en compte les décalages (mismatch), boucles (loop), renflements (bulges), ou encore les extrémités non appariées (dangling ends) [122].

2.2.5 Limites du modèle du plus proche voisin

Le modèle du plus proche voisin permet de calculer de manière précise les paramètres thermodynamiques des structures simples, mais il a certaines limites :

- il n'est pas suffisant pour décrire le repliement de structures complexes possédant plus de deux brins, comme les structures tri-dimensionnelles, ou encore les origamis d'ADN.
 - dans ce modèle, la variation d'enthalpie est supposée être indépendante de la concentration en ions présents dans le tampon ce qui n'est pas le cas lorsque des ions Mg^{2+} sont utilisés. Nous avons en effet observé une dépendance logarithmique de la variation d'enthalpie avec la concentration en ions magnésium. Cela peut être gênant pour l'estimation des paramètres thermodynamiques des structures les plus complexes où les ions magnésium sont préférés aux ions sodium.
 - de plus, ce modèle suppose que la variation de chaleur spécifique ΔC_p est nulle puisque les variations d'enthalpie et d'entropie ne dépendent pas de la température. Des études ont montré que si on prend en compte un ΔC_p non nul, les paramètres du modèle obtenus par les différentes études s'accordent beaucoup mieux [123, 124].
-

Lorsqu'on extrapole les différents paramètres à une même température, leurs écarts sont beaucoup plus faibles. La température à laquelle a lieu l'hybridation a alors plus d'influence sur la thermodynamique de l'hybridation que la séquence en nucléotides.

2.3 Analyse des données en DSC

La DSC est une méthode qui est très adaptée à l'étude de la thermodynamique du repliement ou de la dénaturation de nanostructures d'ADN, car la mesure est effectuée au cours de rampes de température durant lesquelles les structures se dénaturent ou s'auto-assemblent. C'est une méthode qui a été très utilisée pour l'étude de la dénaturation de protéines [85]. Cependant, dans le cas des protéines, le repliement n'est généralement pas réversible puisque les protéines dénaturées s'aggrègent en raison de l'exposition des résidus hydrophobes au solvant. Une unique rampe de dénaturation peut donc être effectuée. Le grand avantage de l'ADN est que l'hybridation de deux simples brins en une double hélice est réversible. On peut donc mesurer soit la dénaturation des structures lors des montées en température, soit leur repliement lors des descentes en température. La calorimétrie permet le calcul des grandeurs thermodynamique qui sont les variations d'enthalpie et d'entropie (ΔH et ΔS), ainsi que la température de fusion (T_m). Nous allons voir dans cette partie comment les données obtenues en DSC sont traitées et quelles sont les informations qu'elles fournissent sur la thermodynamique du repliement (stabilité, coopérativité, nombre de transitions intermédiaires).

2.3.1 Traitement de données

La méthode utilisée pour le traitement des données en DSC est décrite à partir d'un exemple simple : l'hybridation d'un duplex d'ADN de 16 paires de bases.

Dup 1 : CCA-TTA-ACC-GCT-AGA-T

Dup 2 : ATC-TAG-CGG-TTA-ATG-G

Les expériences ont été effectuées avec un calorimètre nano-DSCIII de CSC. Les cycles des rampes de température sont effectués de 5°C à 95°C à 1°C/min. Entre chaque cycle, l'appareil se maintient 15 min à 5°C ou à 95°C pour s'équilibrer. L'instrument fournit la puissance compensée en fonction de la température lors de chaque rampe de manière à maintenir les cellules de mesure et de référence à la même température. La concentration en duplex est de 15 μM et le tampon est composé de 10 mM de Tris, 1 mM d'EDTA, 200 mM de NaCl ajusté à pH= 8.2 et filtré à 0.2 μm .

La figure 2.9 montre les données brutes obtenues lors de la dénaturation (ou fonte) du duplex de 16 paires de bases. On observe une transition qui correspond à la dénaturation

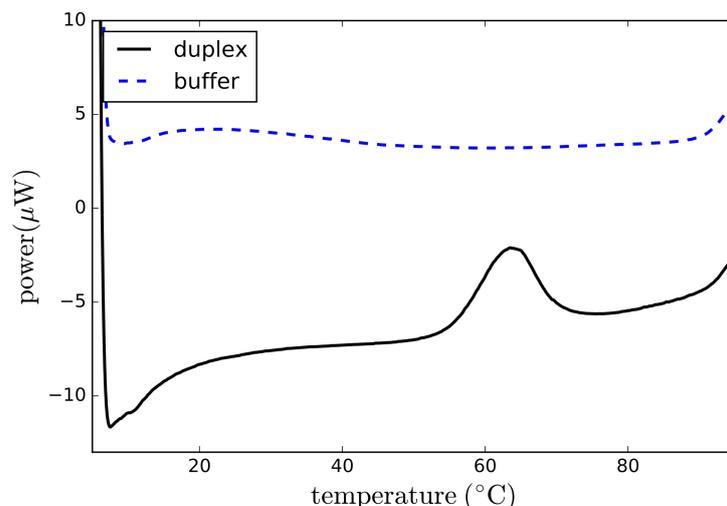


FIGURE 2.9 – Exemple de données obtenues en DSC pour le duplex de 16 paires de bases. La puissance compensée obtenue pour le duplex est en noir, celle obtenue lors de la mesure tampon vs tampon et en bleu pointillé.

de la double hélice à environ 63°C. Cependant, avant et après la transition, la ligne de base varie légèrement en raison du déséquilibre préexistant entre les cellules ou causé par des différences de remplissages. Le tampon a une influence sur la ligne de base en raison des réactions de protonation et déprotonation ayant lieu au cours des rampes de température. Les tampons les plus adaptés sont donc les tampons dont le pH varie peu avec la température et ayant une chaleur de réaction de protonation la plus faible possible. Les tampons remplissant les mieux ces critères sont les tampons à base de sodium phosphate ou de cacodylate [125]. Cependant, le cacodylate est très toxique et le phosphate forme des complexes avec les ions magnésium que nous utilisons fréquemment pour écranter les charges négatives de l'ADN. Nous avons donc fait le choix d'utiliser des tampons à base de Tris qui sont les tampons presque systématiquement utilisés pour l'assemblage de structures d'ADN. Les variations de la ligne de base causées par le tampon restent faibles et peuvent être supprimées lors du traitement des données. Pour cela, des rampes tampon vs tampon sont réalisées pour chaque expérience (figure 2.9). La différence entre les puissances compensées obtenues pour l'échantillon et pour le tampon est due à une légère différence de remplissage. Elle n'est pas gênante car on ne cherche pas à mesurer la chaleur spécifique absolue de l'échantillon mais la variation de chaleur spécifique lors de la transformation. La puissance compensée résultant des mesures tampon/tampon est ensuite soustraite à celle des différents échantillons donnant une nouvelle puissance $P_1 = P_{\text{compensée}} - P_{\text{tampon}}$ (figure 2.10). La nouvelle ligne de base est ensuite ajustée avant et après la transition par des polynômes d'ordre 3. Puis, ces deux portions sont réunies par une interpolation effectuée avec un polynôme d'ordre 3 dont la dérivée est continue (figure 2.10). Il est ensuite possible de calculer la chaleur spécifique excédentaire à partir de la puissance compensée. En effet, la puissance compensée est reliée à la capacité calorifique

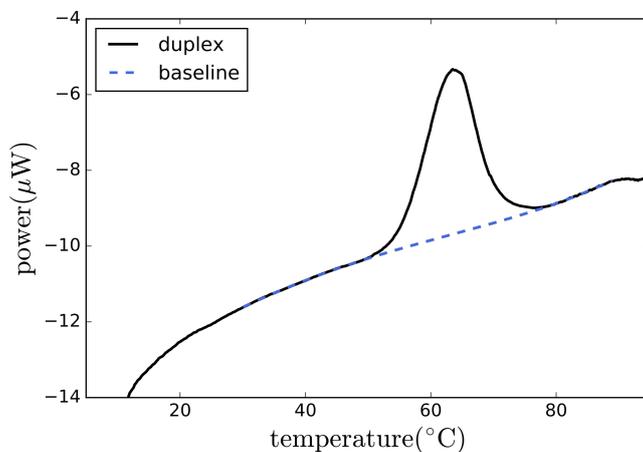


FIGURE 2.10 – Exemple de l’ajustement de la ligne de base pour le duplex de 16 paires de bases. La puissance P_1 obtenue après la soustraction de P_{buffer} est en noir, l’ajustement de la ligne de base est en bleu pointillé.

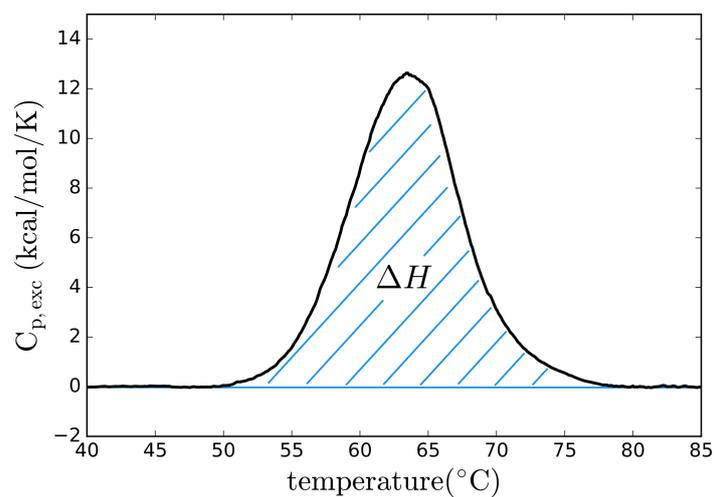


FIGURE 2.11 – Chaleur spécifique excédentaire dans le cas du duplex de 16 paires de bases. La variation d’enthalpie ΔH correspond à l’aire sous la courbe.

de l'échantillon à partir de l'équation 2.10 et donc :

$$C_{p,exc} = \frac{P_1}{n\gamma} \quad (2.23)$$

avec $C_{p,exc}$ la chaleur spécifique excédentaire produite lors de la transition (en kcal/mol/K), γ la vitesse de balayage (en K/s) et n la quantité de structure d'ADN (en mol). La courbe de chaleur spécifique du duplex de 16 paires de bases en fonction de la température est indiquée sur la figure 2.11.

La variation d'enthalpie de la transition est obtenue par l'intégration de $C_{p,exc}$ sur la température, et la variation d'entropie par l'intégrale de $\frac{C_{p,exc}}{T}$ sur la température (voir les équations 2.11 et 2.12 dans la partie 2.1.3).

$$\Delta H = \int_{T_0}^{T_F} C_p dT \quad (2.24)$$

$$\Delta S = \int_{T_0}^{T_F} \frac{C_p}{T} dT \quad (2.25)$$

ou T_0 est la température à laquelle tous les brins sont dénaturés et T_F la température à laquelle tous les brins sont hybridés. On peut aussi calculer une énergie moyenne cumulée $\langle \Delta H(T) \rangle$ qui correspond à l'intégrale de la chaleur spécifique excédentaire jusqu'à la température T (figure 2.12).

$$\langle \Delta H(T) \rangle = \int_{T_0}^T C_p(T) dT \quad (2.26)$$

Si on considère l'hybridation d'un duplex, avec T_0 la température à laquelle tous les

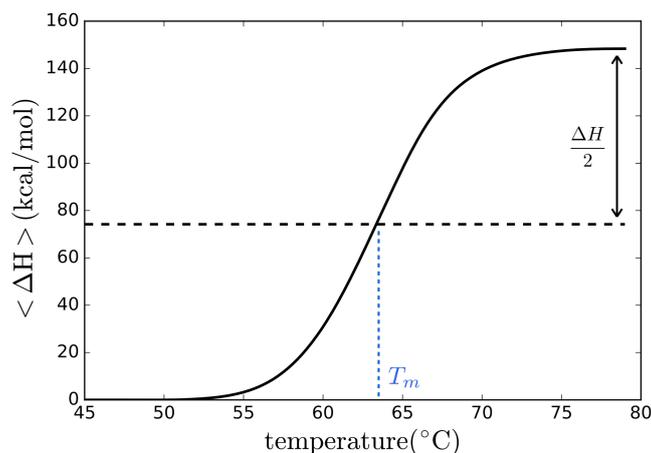


FIGURE 2.12 – Énergie moyenne cumulée lors de l'hybridation du duplex de 16 paires de bases.

brins sont dénaturés et T_F la température à laquelle tous les brins sont hybridés ; l'énergie moyenne cumulée à une température T correspond à l'énergie qui a été libérée par l'hybridation du duplex au cours de la descente en température de T_0 à T . Cette énergie est nulle à T_0 et est égale à la variation d'enthalpie totale à T_F . $\langle \Delta H(T_0) \rangle = 0$ et $\langle \Delta H(T_F) \rangle = \Delta H$. On peut ensuite tracer à partir de l'énergie moyenne cumulée une courbe d'hybridation $x_{cal}(T)$ correspondant à l'avancement de la réaction en fonction de la température d'un point de vue énergétique. $x_{cal}(T)$ représente la fraction d'énergie impliquée dans la réaction de T_0 à T par rapport à l'énergie totale de la transformation ΔH . On parle de courbe de fusion lorsque la réaction de fusion et non d'hybridation est considérée.

$$x_{cal}(T) = \frac{\langle \Delta H(T) \rangle}{\Delta H} \quad (2.27)$$

Si on suppose que l'énergie impliquée dans la transformation est due uniquement à l'hybridation des simples brins en doubles brins et que chaque paire de bases y contribue de manière homogène, alors la courbe d'hybridation obtenue par calorimétrie peut être comparée à celle obtenue par des méthodes optiques comme l'absorption UV, la fluorescence et le FRET. La température de fusion (ou T_m) est la température pour laquelle la moitié de la transformation a eu lieu donc pour laquelle $x(T_m) = \frac{1}{2}$.

Nous réalisons une hypothèse importante dans notre traitement de donnée : en effet, l'ajustement de la ligne de base avant et après la transition revient à négliger la présence d'une variation de chaleur spécifique ΔC_p . Dans la littérature, la variation de chaleur spécifique associée à la dénaturation d'un duplex d'ADN est estimée entre 40 – 100 cal/K par mole de paire de bases [114]. Dans l'exemple du duplex de 16 paires de bases, celle-ci devrait donc valoir entre 0.7 kcal/mol/K et 1.6 kcal/mol/K et donc à une puissance compensée située entre 0.6 μ W et 1.7 μ W. De telles variations bien qu'elles soient au dessus du bruit de mesure ne peuvent être appréciées lors d'une mesure en DSC à cause des dissymétries des cellules de mesures. Pour la mesurer, il faudrait faire plusieurs mesures de ΔH à différentes températures (voir partie 2.2.3). De plus, la variation de chaleur spécifique ne donne pas d'information sur la stabilité ou la coopérativité du repliement des structures d'ADN, on va donc la négliger dans la suite.

La DSC est la seule méthode énergétique permettant de suivre le repliement et la dénaturation de structure au cours de rampes de températures, elle permet une mesure directe de tous les paramètres thermodynamiques associés à la formation des structures. On va voir dans la suite que la DSC est très intéressante pour l'étude de structures d'ADN car elle fournit des informations sur différents aspects du repliement comme la stabilité, la coopérativité ou le nombre de transitions intermédiaires.

2.3.2 Stabilité des structures d'ADN

La stabilité d'une structure est liée à sa température de fusion (T_m) : plus T_m est élevée et plus la structure est stable. Dans le cas d'une transformation à deux états, la température

de fusion est la température à laquelle la moitié des nucléotides sont hybridés. Elle peut s'exprimer facilement à partir de la variation d'enthalpie, de la variation d'entropie et de la concentration en brins (voir paragraphe 2.2.2). Dans le cas de réactions bi-moléculaires comme l'hybridation d'un duplex d'ADN, la température de fusion s'exprime comme :

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln\left(\frac{C_0}{2}\right)} \quad (2.28)$$

Pour les réactions mono-moléculaires comme le repliement d'une épingle à cheveux, T_m s'exprime comme :

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S} \quad (2.29)$$

Lors de réactions plus complexes avec plus de deux états, la température de fusion est plus difficile à évaluer et différentes définitions peuvent être utilisées. Si les transitions sont bien distinctes, alors on peut considérer les températures de fusion de chaque transition comme le maximum de chaque pic. Sinon, on peut aussi considérer une température de fusion globale de la transformation comme la température à laquelle la moitié de l'énergie a été mise en jeu : $\langle \Delta H(T_{m,cal}) \rangle = \Delta H/2$.

La stabilité de la structure d'ADN dépend également de la concentration en cations présents dans le tampon. En effet, la double hélice d'ADN est très peu stable dans l'eau en raison des charges négatives présentes au niveau des groupes phosphate du squelette de l'ADN. Des ions positifs sont nécessaires pour écranter ces charges et permettre le rapprochement puis l'hybridation de deux brins complémentaires. Les ions Na^+ et Mg^{2+} sont en général utilisés pour la formation de structures d'ADN.

2.3.3 Déconvolution en transitions intermédiaires à deux états

La mesure de ΔH , ΔS et T_m permet d'avoir des informations sur la stabilité de la structure, mais la stabilité seule ne permet pas de décrire le repliement d'une structure. Pour cela, il est nécessaire d'avoir des informations supplémentaires sur le nombre de transitions intermédiaires composant la transformation, ainsi que sur la coopérativité. Ces informations peuvent être obtenues grâce à la forme du pic de transition qui est relié à la distribution de l'énergie entre les différents états intermédiaires. Freire et Biltonen ont montré qu'on pouvait, à partir des données obtenues en DSC, calculer la fonction de partition et donc la population des différents états intermédiaires, ce qui permet de déconvoluer la transition en une succession de transitions à deux états [126, 127]. Cette méthode utilise le fait que l'énergie moyenne cumulée mesurée en DSC peut s'exprimer en fonction du nombre d'états intermédiaires, de leur énergie et de leur population :

$$\langle \Delta H(T) \rangle = \sum_{i=0}^u \Delta H_i \times P_i(T) \quad (2.30)$$

ce qui permet la déconvolution de transformations en une succession de réactions à deux états. Cette méthode est particulièrement adaptée pour l'étude de la dénaturation de protéines où une seule macromolécule peut coexister dans différentes conformations. Cette méthode a également été utilisée pour décrire la formation de structures d'ADN comme le G-quadruplex [74] ou encore les jonctions PX et JX [73] impliquant des brins d'ADN. La différence fondamentale entre la dénaturation des protéines et celle des structures d'ADN, est qu'une protéine est constituée en général d'une seule chaîne d'acide aminé alors que la structure d'ADN est constituée de plusieurs simple brin. Les étapes constituant la dénaturation des protéines sont donc mono-moléculaires alors qu'elles peuvent être bi-moléculaires dans le cas des structures d'ADN lorsqu'elles consistent en l'appariement de deux simples brin en un duplex d'ADN. Dans cette méthode, nous supposons que la transformation est une succession de transitions à deux états allant d'un état dénaturé I_0 à un état replié I_f , par l'intermédiaire d'états I_i (figure 2.13). Cette méthode sera décrite plus précisément lors de l'étude du repliement de tétraèdres d'ADN dans le chapitre 3 partie 3.2.4.

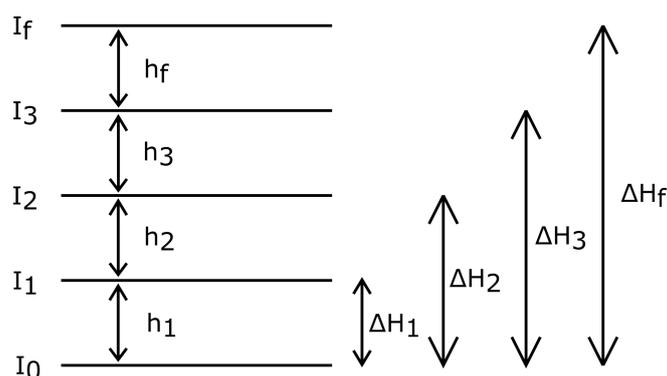


FIGURE 2.13 – représentation des différentes étapes composant une transition

2.4 Coopérativité de l'assemblage de structures d'ADN

Le terme de coopérativité en biologie est surtout utilisé dans le cas des protéines sur lesquelles plusieurs ligands peuvent se fixer. La fixation d'un ligand est dite coopérative si elle favorise la fixation d'un autre ligand sur un autre site de la protéine. Nous allons voir dans la partie suivante ce qu'est la coopérativité dans le cas de l'assemblage de nano-structures d'ADN.

2.4.1 Différents niveaux de coopérativité

Dans les nano-structures d'ADN, on peut définir différentes classes de coopérativité qui peuvent subvenir lors de l'hybridation de l'ADN et de l'assemblage de nano-structures.

Coopérativité intra-brin

À l'intérieur d'un même duplex d'ADN, l'hybridation est coopérative car tous les nucléotides s'hybrident en une seule étape. Pour le duplex de 16 paires de bases par exemple, il n'y a pas 16 réactions d'hybridation de variation d'enthalpie $\Delta H_{\text{nucléotide}}$, mais une réaction de variation d'enthalpie $16 \times \Delta H_{\text{nucléotide}}$. Le fait que l'hybridation d'un duplex d'ADN s'effectue en une seule étape et puisse être modélisée par une réaction à deux états montre que l'appariement de tous les nucléotides se fait de manière coopérative. Cela n'est plus vrai pour les polymères d'ADN dépassant un certain nombre de paires de bases où la dénaturation se fait coopérativement sur des domaines d'une vingtaine à plusieurs centaines de paires de bases (figure 2.7).

Coopérativité intra-brin, inter-domaines

Dans le cas des origamis d'ADN, les agrafes sont des simples brins d'ADN divisées en plusieurs domaines. Ces domaines sont les zones du brin d'ADN composées de nucléotides contigus s'hybridant à une même zone du scaffold. Les agrafes sont en général composées de plusieurs domaines ce qui permet le rapprochement de zones éloignées du scaffold. Il peut y avoir de la coopérativité entre deux domaines d'une agrafe si le fait qu'un domaine s'hybride au scaffold aide le deuxième domaine à s'hybrider (figure 2.14). Si les deux domaines d'un même brin s'hybrident indépendamment, alors il n'y a pas de coopérativité, mais s'ils s'hybrident en une seule étape comme un seul duplex, alors l'hybridation des deux domaines est coopérative.

Coopérativité inter-brins

Enfin, on peut observer de la coopérativité entre deux brins d'ADN différents. C'est surtout le cas dans les origamis d'ADN lorsque l'hybridation d'une agrafe au scaffold favorise l'hybridation d'une agrafe voisine (figure 2.14). C'est la coopérativité telle qu'elle a été observé par Arbona *et al.* dans [66].

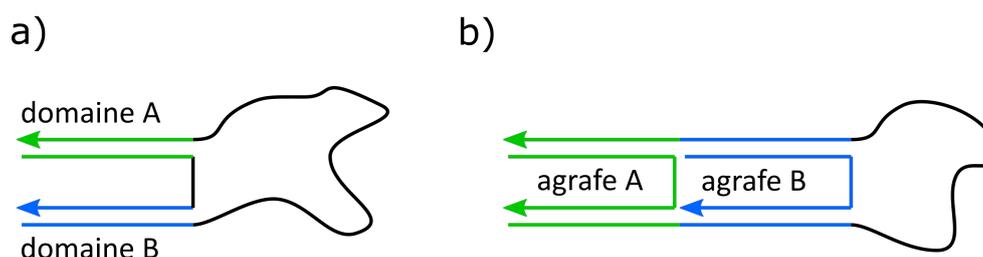


FIGURE 2.14 – Exemple de coopérativité pouvant exister entre : a) deux domaines d’une même agrafe (coopérativité intra-brin, inter-domaine); b) deux agrafes dans un même origami (coopérativité inter-brins).

2.4.2 Evaluation qualitative de la coopérativité par la variation d’enthalpie de Van’t Hoff

De manière qualitative, la coopérativité du repliement des structures d’ADN est traduite par la largeur du pic de transition. Plus le pic est fin, plus le repliement a lieu dans une petite gamme de température et plus la transition est dite coopérative. La largeur du pic est corrélée au nombre de paires de bases s’hybridant au cours d’une même étape et peut être associée à la variation d’enthalpie de Van’t Hoff (ΔH_{VH}). La variation d’enthalpie de Van’t Hoff est la variation d’enthalpie mesurée à partir de la constante d’équilibre de la réaction dans une réaction à deux états. Dans une telle réaction, la constante d’équilibre est reliée à la température par la relation de Van’t Hoff :

$$\frac{d \ln(K)}{dT} = \frac{\Delta H_{VH}}{RT^2} \quad (2.31)$$

ou encore

$$\Delta H_{VH} = -R \frac{d \ln(K)}{d(1/T)} \quad (2.32)$$

De nombreuses méthodes basées sur des mesures optiques (absorption UV, fluorescence, FRET) ou calorimétriques (DSC, ITC) permettent de mesurer ΔH_{VH} [128].

Calcul de la constante d’équilibre en fonction de la température

On peut calculer ΔH_{VH} en utilisant directement les relations 2.31 et 2.32. On a vu précédemment que dans le cas d’une réaction bi-moléculaire comme l’hybridation d’un duplex d’ADN, $K(T_m) = \frac{2}{C}$. On peut donc calculer ΔH_{VH} en faisant varier la concentration en espèce et en traçant la courbe $\ln(C) = f\left(\frac{1}{T_m}\right)$. Cette relation doit cependant être modifiée suivant la moléularité de la réaction considérée [128].

Ajustement de la chaleur spécifique excédentaire ou de l'avancement de la réaction

La variation d'enthalpie de Van't Hoff correspond à la variation d'enthalpie de la réaction si l'on fait l'hypothèse que celle-ci est une réaction à deux états avec ΔH et ΔS indépendants de la température. Pour un couple ΔH , ΔS donné, on peut facilement calculer la constante d'équilibre $K(T)$ correspondant à la transformation à deux états associée et calculer l'avancement de la réaction en fonction de la température et donc la chaleur spécifique excédentaire. En effet, pour une réaction bi-moléculaire à deux états, la constante d'équilibre est :

$$K_{eq}(T) = \frac{x(T)}{(C_A - x(T))(C_B - x(T))} = \exp\left(-\frac{\Delta H_{VH}(T) - T\Delta S_{VH}(T)}{RT}\right) \quad (2.33)$$

Il est donc possible, en résolvant l'équation du second degré ci-dessus, de calculer l'avancement $x(T, \Delta H, \Delta S)$ et la chaleur spécifique excédentaire $C_p(T, \Delta H_{VH}, \Delta S_{VH})$ en fonction de ΔH_{VH} et ΔS_{VH} :

$$C_p(T, \Delta H_{VH}, \Delta S_{VH}) = \Delta H_{VH} \times \frac{dx(T, \Delta H_{VH}, \Delta S_{VH})}{dT} \quad (2.34)$$

La variation d'enthalpie de Van't Hoff peut donc être calculée en ajustant la chaleur spécifique excédentaire obtenue en DSC ou l'avancement de la réaction obtenu en UV ou FRET avec comme paramètres d'ajustement ΔH_{VH} et ΔS_{VH} .

Largeur de la transition

Enfin, une troisième méthode qualitative permettant de mesurer ΔH_{VH} consiste à utiliser la largeur de la transition : en effet, si on considère la largeur du pic comme la différence des températures pour lesquelles 25% et 75% des nucléotides sont hybridés. On peut donc à partir de la largeur du pic calculer la variation d'enthalpie de Van't Hoff :

	A	+	B	→	C
T	$C_A - x$		$C_B - x$		x
$T_{0.25}$	$0.75 C_0$		$0.75 C_0$		$0.25 C_0$
$T_{0.75}$	$0.25 C_0$		$0.25 C_0$		$0.75 C_0$

La constante d'équilibre à $T_{0.25}$ est :

$$K_{eq 0.25} = \frac{0.44}{C_0}$$

et à $T_{0.75}$:

$$K_{eq\ 0.75} = \frac{12}{C_0}$$

or,

$$T = \frac{\Delta H}{\Delta S - R \ln(K_{eq})}$$

donc

$$\frac{1}{T_{0.25}} - \frac{1}{T_{0.75}} = \frac{R \ln\left(\frac{K_{eq\ 0.75}}{K_{eq\ 0.25}}\right)}{\Delta H}$$

$$\Delta H_{VH} = \frac{R \ln(27)}{\frac{1}{T_{0.25}} - \frac{1}{T_{0.75}}}$$

ΔH_{VH} est donc lié à la largeur du pic : plus le pic est fin, plus ΔH_{VH} est grand.

Variation d'enthalpie de Van't Hoff et coopérativité

De nombreuses méthodes permettent donc de calculer ΔH_{VH} , mais contrairement à la mesure directe par calorimétrie ΔH_{cal} , on suppose ici que la transition est à deux états sans étapes intermédiaires. Le calcul de ΔH_{VH} fournit donc la variation d'enthalpie qui serait celle de la réaction si celle-ci était une réaction à deux états. ΔH_{VH} peut être ramené à un nombre de paires de bases s'hybridant coopérativement en une seule étape : on peut calculer la variation d'enthalpie moyenne associée à l'hybridation d'une paire de bases de cette manière :

$$\Delta H_{bp} = \frac{\Delta H_{cal}}{n_{bp}}$$

avec n_{bp} le nombre de paires de bases dans la structure. Pour une transition donnée, le nombre de paires de bases s'hybridant de manière coopérative en une seule étape peut donc être estimé par la relation :

$$n_{bp\ coop} = \frac{\Delta H_{VH}}{\Delta H_{bp}} = n_{bp} \frac{\Delta H_{VH}}{\Delta H_{cal}}$$

Le ratio $\Delta H_{VH}/\Delta H_{cal}$ est un indicateur utilisé pour quantifier la coopérativité. Si celui-ci est inférieur à 1, cela signifie qu'il y a des transitions intermédiaires ($n_{bp\ coop} < n_{bp}$) le repliement des n_{bp} paires de bases s'effectue en plusieurs étapes. Si ce ratio est égal à 1, cela signifie que tous les nucléotides s'apparient de manière coopérative en une transition à deux états. S'il est supérieur à 1, alors le nombre de paires de bases s'hybridant de manière coopérative est plus grand que le nombre de paires de bases présentes dans la structure. Il y a alors certainement formation d'agrégats ou de multimères. Nous utiliserons ces définitions au chapitre 3 et 4 lors de l'étude de l'assemblage de tétraèdres et d'origami d'ADN.

Stabilité et coopérativité dans le cas de duplex d'ADN

La coopérativité intra-brin est bien visible sur l'exemple de l'hybridation de duplex de différentes longueurs. Des simulations de la chaleur spécifique en fonction de la température pour quatre duplex de quatre longueurs différentes (10, 20, 30 et 40 paires de bases) mais avec à chaque fois une composition de 50% de nucléotides A/T et 50% de nucléotides C/G sont représentées sur la figure 2.15. Les duplex sont à une concentration de 10 μM , dans un tampon contenant 1 M de NaCl. Afin de pouvoir comparer les différents duplex, les chaleurs spécifiques sont données en kcal par mole de paire de bases. On remarque que plus le duplex est long, plus il est stable et plus la transition est fine donc coopérative. Le nombre de nucléotides s'hybridant coopérativement est en effet plus grand puisqu'il est égal au nombre de nucléotides présent dans le duplex.

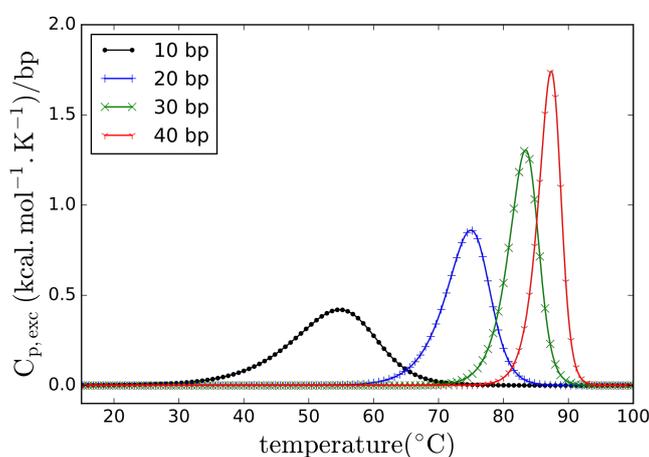


FIGURE 2.15 – Simulation de l'hybridation de plusieurs duplex d'ADN ayant la même composition en nucléotides mais des longueurs différentes. La chaleur spécifique est donnée par paire de bases.

2.5 Conclusion

Parmi les méthodes expérimentales utilisées pour étudier l'assemblage de nano-structures d'ADN, la calorimétrie est la seule méthode permettant une mesure directe des paramètres thermodynamiques du système. La DSC et l'ITC sont deux méthodes complémentaires permettant d'obtenir les variations d'enthalpie et d'entropie associées à la réaction d'assemblage des nano-structures d'ADN. La DSC est une méthode dynamique pour laquelle le système est à l'équilibre tant que les vitesses de rampes sont raisonnables. L'ITC est une méthode hors équilibre dans laquelle la composition chimique du mélange est modifiée. Nous n'avons pas pu réaliser des mesures autres que préliminaires par titration isotherme

mais cette méthode est certainement très pertinente pour l'étude de l'assemblage des nanostructures.

Nous avons utilisé la DSC pour l'étude du repliement de structures modèles qui sont le tétraèdre d'ADN, les origami à une ou deux agrafes et des origami d'ADN. Nous verrons dans les chapitres 3 et 4 comment la calorimétrie différentielle nous permet mesurer, pour chaque nano-structure, les variations d'enthalpie et d'entropie associées au repliement. La stabilité des structure peut être évaluée à partir des température de fusion et d'assemblages. Nous avons défini un critère qualitatif pour évaluer la coopérativité ce qui nous permettra de définir la taille des domaines dont l'assemblage est collectif et coopératif. Dans le cas du tétraèdre, les courbes de chaleur spécifique excédentaire nous permettront également de décomposer le repliement en une succession d'états intermédiaires et ainsi d'identifier des configurations thermodynamiques du système qui sont peuplées lors du repliement.

Les plus grosses structures d'ADN nécessitant un nombre important de brins d'ADN différents, il est nécessaire de développer des nano-calorimètres intégrant de la microfluidique pour étudier le repliement de ces structure à des coûts raisonnables. Le développement d'un nano-calorimètre à flux miniaturisé sera présenté dans le chapitre 5.

Chapitre 3

Thermodynamique du repliement de tétraèdres d'ADN

Notre objectif est de comprendre la thermodynamique du repliement de nano-structures d'ADN afin d'optimiser rationnellement leur conception. Nous avons choisi de sonder leurs propriétés thermodynamiques par des mesures de calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Aucune mesure de calorimétrie n'avait été réalisée sur de gros objets du type origami d'ADN et nous avons choisi d'étudier en priorité la thermodynamique de l'assemblage de nano-structures modèles avec comme objectifs :

- de valider la méthodologie expérimentale en identifiant des étapes intermédiaires de l'assemblage. Pour cela il faut que les nano-structures modèles comportent un petit nombre de brins d'ADN afin de rendre possible un travail d'identification combinatoire des états intermédiaires.
- de modifier les états intermédiaires et donc le chemin de repliement en modifiant les séquences des brins. Cela nous permettra de démontrer qu'il est possible en principe de guider rationnellement l'assemblage des structures.

Nous avons choisi d'étudier dans un premier temps des structures simples de type nano-cages d'ADN car elles sont généralement constituées d'un petit nombre de brins d'ADN courts, ce qui les rends abordables et configurables. Deux de ces nano-cages en forme de tétraèdre ont été conçues par Goodman *et al.* en 2004 et 2005 [27, 28] et comportent comme énorme avantage de s'assembler de manière relativement coopérative et avec un haut rendement sans qu'il soit nécessaire de réaliser des étapes de ligation et de purification intermédiaires contrairement à la structure emblématique du cube assemblée par Seeman [24].

Dans la première partie de ce chapitre nous décrirons les structures assemblées par Goodman *et al.*, et nous soulignerons les différences et les points communs entre les

deux structures qui, bien que très similaires par la forme finale, se replient différemment. Nous utiliserons la première nano-structure pour introduire et décrire notre méthodologie expérimentale. Puis nous caractériserons un deuxième type de tétraèdre où nous nous focaliserons sur les chemins de repliement possible. Enfin nous fourniront une analyse critique de notre méthodologie et souligneront ses limites. Dans cette partie nous avons utilisé la possibilité de modifier les séquences d'ADN et de l'utiliser comme une molécule programmable.

3.1 Descriptions des nanocages en forme de tétraèdre

Dans cette partie nous décrivons brièvement les deux structures d'ADN que nous avons étudiées en nous basant essentiellement sur des résultats de la littérature. Les motivations initiales à la conception des tétraèdres consistaient à obtenir un solide élémentaire du type nano-cage, rigide, adaptable et dont l'assemblage se fasse sans impliquer de réactions enzymatiques. Les deux tétraèdres conçus par Goodman *et al.* en 2004 [27] et 2005 [28] répondent à ce cahier des charges et ont été extensivement caractérisés.

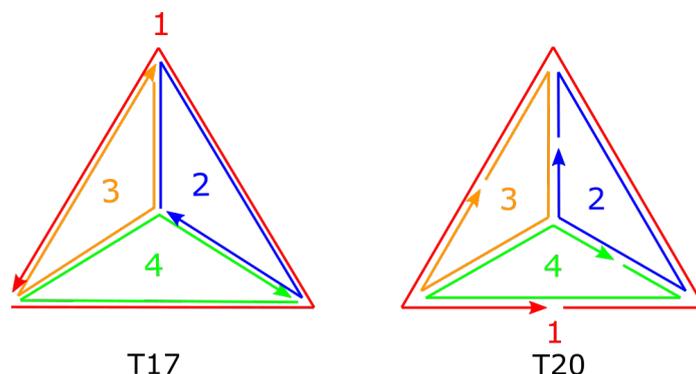


FIGURE 3.1 – Schéma représentant les tétraèdres T_{17} et T_{20}

Dans sa conception originale, le tétraèdre comporte 17 paires de bases sur chaque côté et chaque brin comporte deux nucléotides non appariés aux sommets. Chaque sommet est en fait similaire à une jonction trois brins dont un des brins serait coupé. Chaque brin comporte 55 nucléotides et dessine une face du tétraèdre. La figure 3.1 représente schématiquement la disposition des brins dans le tétraèdre à 17 paires de bases par arête qu'on appelle dans la suite T_{17} . Dans cette conception les séquences composant les arêtes correspondent à des sites d'actions d'enzymes de restrictions ce qui permet de caractériser les structures auto-assemblées par la migration sur gels des tétraèdres complètement assemblés et des structures digérées. Les caractérisations ont montré que le mélange stœchiométrique des quatre brins produit bien la structure programmée sans qu'il soit nécessaire d'utiliser des enzymes de ligation comme c'était le cas pour les cubes de Seeman

[24]. Cela a pour conséquence immédiate un rendement de l'assemblage très élevé estimé supérieur à 95 %.

Le deuxième tétraèdre conçu en 2005 diffère du T_{17} par trois caractéristiques :

- la taille des arêtes est augmentée et passe à 20 nucléotides ce qui correspond à presque deux tours d'hélice respectant ainsi l'hélicité de la molécule (on le dénomme T_{20}).
- les sommets forment des jonctions trois brins non coupées.
- La flexibilité des brins n'est assurée que par un seul nucléotide non hybridé situé au niveau du sommet. Trois nucléotides non hybridés sont donc présents à chaque sommet.

Une des conséquences de cette conception est que la structure du T_{20} est nettement moins symétrique que la structure du T_{17} puisqu'il y a six arêtes pour seulement quatre brins d'ADN. Deux arêtes du tétraèdre sont donc non coupées par les extrémités des brins. Il s'agit des arêtes formées par l'hybridation des brins 1 et 2 (D_{12}), ainsi que des brins 3 et 4 (D_{34}) comme cela est schématisé sur la figure 3.1. L'originalité fonctionnelle du T_{20} est d'optimiser la résistance à la compression de la nanostructure grâce à l'action d'une ligase rétablissant la continuité du squelette sucre-phosphate sur les arêtes coupées. La structure en forme de tétraèdre a été observée par imagerie AFM ou CryoEM [48]. Les résultats obtenus en CryoEM sont cohérent avec les modèles atomiques de la nanostructure comme le montre la figure 3.2.

Dans un premier temps nous utilisons le T_{17} comme système modèle pour présenter la méthodologie expérimentale. La symétrie de la structure rend difficile l'identification d'espèces intermédiaires. Nous étudierons donc ensuite le T_{20} qui, de par son asymétrie, permet d'identifier plus facilement les étapes intermédiaires.

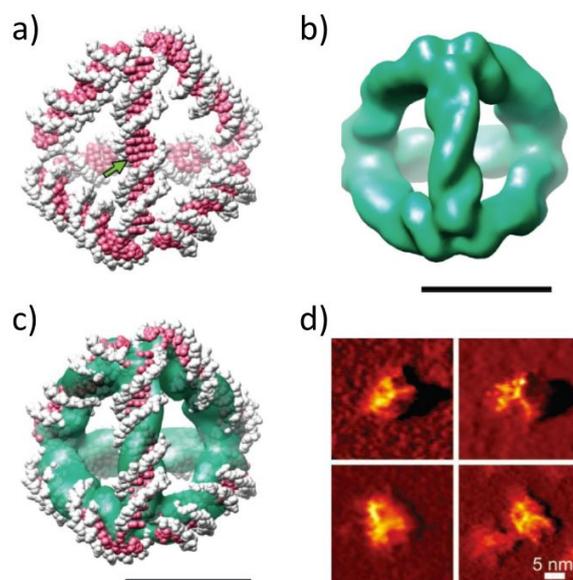


FIGURE 3.2 – Structures du T_{20} . (a) Modèle atomique du tétraèdre. (b) carte de densité obtenue par CryoEM. On distingue les petits et grands sillons de la molécule d'ADN sur les arêtes, le grand sillon est souligné par une flèche. (c) Superposition du modèle atomique et de la carte de densité. (d) Images obtenues par AFM : la résolution n'est pas suffisante pour distinguer des détails moléculaires, en revanche la structure globale est compatible avec une forme de tétraèdre. L'AFM a surtout permis de tester la résistance mécanique du tétraèdre. Dans (b), (c) et (d), la barre d'échelle correspond à 5 nm.

3.2 Repliement du tétraèdre T_{17}

3.2.1 Chaleur spécifique excédentaire, variation d'enthalpie, variation d'entropie

Les séquences des quatre brins d'ADN formant le tétraèdre T_{17} sont données ci-dessous [27] :

- T17-1 : ACA-TTC-CTA-AGT-CTG-AAA-CAT-TAC-AGC-TTG-CTA-CAC-GAG-AAG-AGC-CGC-CAT-AGT-A
- T17-2 : TAT-CAC-CAG-GCA-GTT-GAC-AGT-GTA-GCA-AGC-TGT-AAT-AGA-TGC-GAG-GGT-CCA-ATA-C
- T17-3 : TCA-ACT-GCC-TGG-TGA-TAA-AAC-GAC-ACT-ACG-TGG-GAA-TCT-ACT-ATG-GCG-GCT-CTT-C

– T17-4 : TTC-AGA-CTT-AGG-AAT-GTG-CTT-CCC-ACG-TAG-TGT-CGT-TTG-TAT-TGG-ACC-CTC-GCA-T

Les mesures calorimétriques en DSC ont été effectuées avec une concentration en tétraèdres de 2 μM dans un tampon composé de 10 mM de Tris, 1 mM d'EDTA, 20 mM de MgCl_2 ajusté à $\text{pH} = 8.2$. L'absorbance à 260 nm des brins d'ADN est mesurée à l'aide d'un spectromètre UV petit volume (Biospec Nano de Shimadzu) pour le dosage des brins d'ADN. Les conditions expérimentales sont identiques aux conditions publiées dans [27].

Les résultats calorimétriques obtenus pour le tétraèdre T_{17} en DSC sont donnés sur la figure 3.3 avec la chaleur spécifique et l'énergie moyenne cumulée lors de dix montées et descentes en température successives. Les descentes en température sont représentées en bleu et les montées en rouge.

On peut dans un premier temps remarquer que les mesures se superposent après plusieurs cycles de température. Cela permet de dire que l'hybridation et la fonte de petites structures d'ADN est réversible. La réversibilité permettant l'analyse des montées et descentes en température au cours de cycles successifs est un avantage de l'ADN sur les protéines. En effet, les mesures sur les protéines ne peuvent être effectuées qu'au cours d'une montée en température car lors de la dénaturation, les résidus hydrophobes de la protéine sont exposés au solvant et s'agrègent de manière irréversible. On peut donc en calorimétrie étudier la dénaturation et l'assemblage des structures d'ADN alors que seule la dénaturation peut être observée dans les protéines. Cela confirme que les nanostructures assemblées à partir de l'ADN sont des modèles pertinents pour l'étude de la relation séquence-forme.

On remarque une asymétrie de la courbe et la présence d'une petite hystérésis entre la montée et la descente. Notre appareil de mesure ne permet pas de faire varier la vitesse de variation de la température de manière significative sans perdre complètement sa sensibilité. Il est difficile à ce stade de commenter ces observations qu'on aimerait associer à un processus de repliement hors équilibre.

En utilisant les équations 2.24 et 2.25 on calcule les variations d'enthalpie et d'entropie. Ainsi, on obtient une variation d'enthalpie de $\Delta H_{cal} = -822 \pm 41 \text{ kcal.mol}^{-1}$ et une variation d'entropie de $\Delta S_{cal} = -2.41 \pm 0.12 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$. Les incertitudes proviennent principalement du fait que la ligne de base n'est pas tout à fait plate et de son ajustement par un polynôme d'ordre 3. À titre de comparaison, les valeurs de variations d'enthalpie et d'entropie obtenues par le modèle du plus proche voisin pour la somme de tous les duplex présents dans le tétraèdre sont : $\Delta H_{NN} = -766 \text{ kcal/mol}$ et $\Delta S_{NN} = -2.1 \text{ kcal/mol/K}$. Ces valeurs ont été obtenues à l'aide de *dinamelt* [120]. Les valeurs obtenues par calorimétrie sont supérieures à celles prévues par le modèle ce qui peut être dû à la présence d'un ΔC_p , à la concentration en magnésium de 20 mM, ou à un gain énergétique dû aux interactions d'empilement ayant lieu entre les différentes hélices composant le tétraèdre.

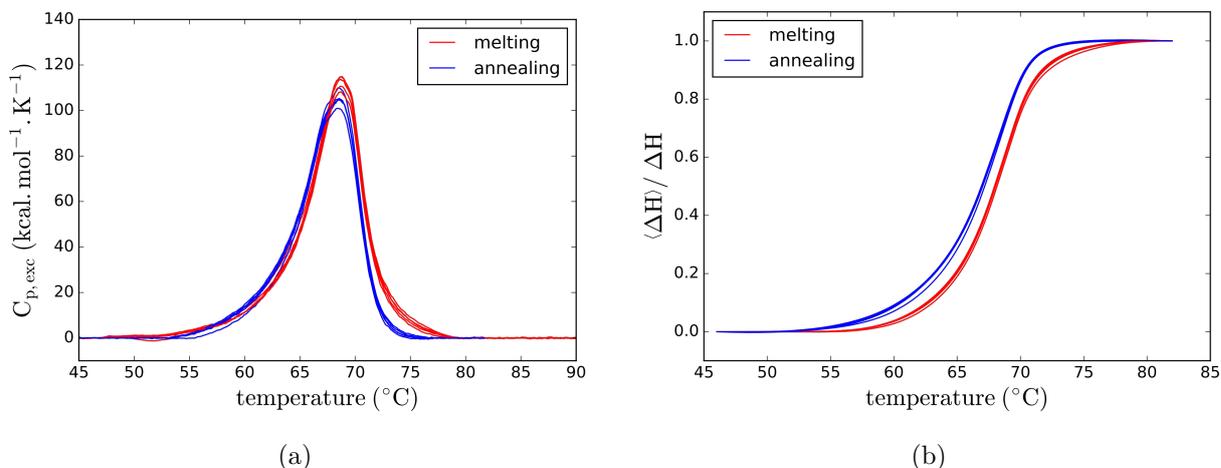


FIGURE 3.3 – Chaleur spécifique excédentaire (a) et énergie moyenne cumulée (b) lors du repliement du tétraèdre T_{17} .

3.2.2 Influence de la force ionique sur les paramètres thermodynamiques du repliement

Le repliement des tétraèdre a en général été effectué dans un tampon contenant 20 mM de Mg^{2+} . Nous avons cependant assemblé des tétraèdres dans des tampons de différentes forces ioniques afin de voir si la concentration et la nature des cations présents dans le tampon ont une influence sur le repliement du tétraèdre. Nous avons donc effectué des mesures en calorimétrie du tétraèdre à 2 μM dans des tampons contenant du magnésium à des concentrations de 10, 20, 30, 50, 100, et 150 mM ou du sodium à des concentrations de 300 et 700 mM. Les squelette phosphate-sucre de l'ADN étant négativement chargés, il est nécessaire d'avoir des cations dans le tampon de manière à écranter ces charges et à permettre le repliement des doubles hélices. Les ions monovalents tels que Na^+ et K^+ sont généralement utilisés pour les structures simples comme les duplex d'ADN, mais pour l'assemblage de structures plus complexes, ce sont les ions Mg^{2+} qui sont les plus utilisés. Lorsqu'on augmente la force ionique du tampon, on stabilise les structures d'ADN ce qui provoque une augmentation du T_m . Le modèle du plus proche voisin suppose que la variation d'enthalpie associée à l'hybridation d'une double hélice d'ADN est indépendante de la nature des ions et de leur concentration [118, 129]. Un terme correctif s'applique à la variation d'entropie en fonction de la nature des ions présents et de leur concentration.

Nous pouvons voir sur la figure 3.4 les données calorimétriques obtenues lors du repliement du tétraèdre dans les différents tampons et sur la figure 3.5 les variations d'enthalpie en fonction soit de la concentration en Mg^{2+} , soit de la température de fusion.

Les résultats montrent une augmentation de la variation d'enthalpie avec la concentration en magnésium. De plus, le profil de repliement du tétraèdre dépend fortement de

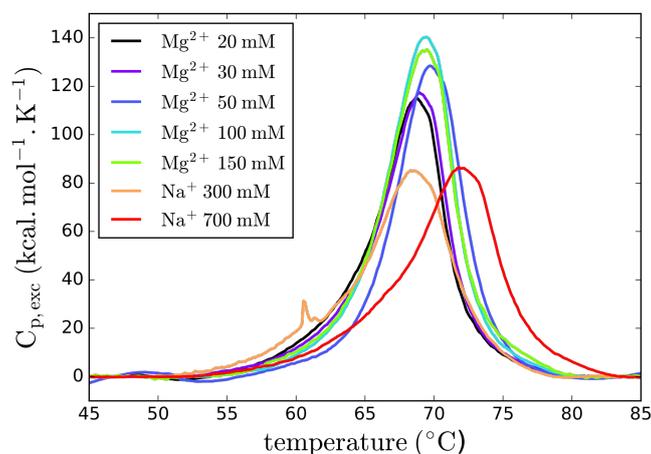


FIGURE 3.4 – Chaleur spécifique excédentaire obtenue lors du repliement du tétraèdre T_{17} dans différentes conditions de tampon. Le tampon est composé de 10 mM de Tris, 1 mM d'EDTA, et de Mg^{2+} ou Na^+ dans des concentrations variables.

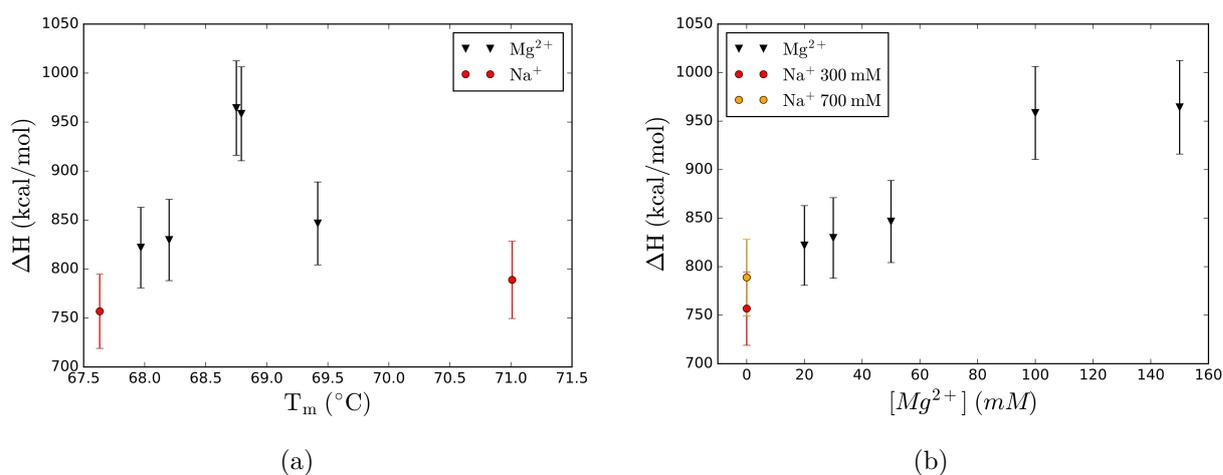


FIGURE 3.5 – Variations d'enthalpie mesurées par DSC lors du repliement des tétraèdres T_{17} dans différentes conditions de tampon. Le tampon est composé de 10 mM de Tris, 1 mM d'EDTA, et de Mg^{2+} ou Na^+ dans des concentrations variables. Les variations d'enthalpie sont indiquées en fonction de la température de fusion dans (a) et en fonction de la concentration en Mg^{2+} dans (b).

la nature (Na^+ ou Mg^{2+}) des cations utilisés. Le repliement est plus coopératif avec une transition plus étroite en présence d'ions Mg^{2+} . La variation d'enthalpie est par contre indépendante de la concentration en ion Na^+ .

Nos mesures semblent donc indiquer que la variation d'enthalpie dépend de la nature des ions et varie avec la concentration en magnésium contrairement à ce qui est supposé

dans le modèle du plus proche voisin. Les augmentations de ΔH que l'on observe ne peuvent pas être dues uniquement à une variation de chaleur spécifique provoquant une dépendance du ΔH en fonction de la température de fusion car lorsqu'on augmente fortement la concentration en Na^+ , augmentant de la même manière le T_m , on ne remarque pas d'augmentation de ΔH . De plus, ΔCp a été mesuré comme étant de 40 - 100 cal/K par paire de bases sur des duplex d'ADN [114]. Pour le tétraèdre composé de 102 paires de bases, l'augmentation de ΔH causé par la présence d'une variation de chaleur spécifique ne devrait pas être supérieure à 36 kcal/mol pour un ΔT_m de 3°C ce qui est bien inférieur aux variations que nous mesurons.

Nous pouvons remarquer que dans les tampons contenant respectivement 300 mM et 700 mM de Na^+ , les variations d'enthalpie mesurées sont : $\Delta H_{300} = 757 \pm 38$ kcal.mol⁻¹ et $\Delta H_{700} = 789 \pm 38$ kcal.mol⁻¹ ce qui est très proche des valeurs prédites par le modèle du plus proche voisin (766 kcal.mol⁻¹). L'excès en variation d'enthalpie que nous avons mesuré précédemment peut donc être dû à la présence d'ions magnésium dans le tampon.

3.2.3 Coopérativité lors du repliement du tétraèdre T_{17}

Les valeurs des variations d'enthalpie et d'entropie nous informent sur la thermodynamique globale de la transition permettant de passer de quatre brins non hybridés indépendants à un tétraèdre en solution. Il serait très intéressant d'analyser l'influence des séquences, de la longueur des brins, ou encore du nombre de nucléotides non hybridés aux sommets sur ces paramètres thermodynamiques. Pour comprendre le mécanisme de repliement, il est nécessaire d'avoir des informations sur la coopérativité ou les étapes intermédiaires du repliement. Nous allons donc utiliser les méthodes données dans le chapitre 2 partie 2.4.2 afin de calculer la variation d'enthalpie de Van't Hoff et de la comparer à la variation d'enthalpie obtenue par calorimétrie.

Coopérativité

La structure du tétraèdre peut être décomposée en six duplex d'ADN, chacun situé au niveau d'une des six arêtes du tétraèdre. Si le repliement était complètement non coopératif, alors les arêtes se replieraient de manière indépendantes les unes des autres. Pour comparer le repliement du tétraèdre T_{17} au repliement des six arêtes indépendantes, nous avons mesuré par DSC le mélange des douze brins d'ADN composant les arêtes du tétraèdre correspondant donc chacun à un tiers de chaque brin. Les résultats peuvent être simulés en utilisant les variations d'enthalpie et d'entropie du modèle du plus proche voisin pour chacun des six duplex. En effet :

$$C_{p,sim,6\ trans} = \sum_{i=1}^6 C_{p,i}(T)(\Delta H_{NN,i}, \Delta S_{NN,i}, T) \quad (3.1)$$

De la même manière, on peut simuler ce que serait le repliement si celui-ci était une transition à deux états passant d'un état complètement dénaturé à un état complètement hybridé :

$$C_{p, sim, 1 trans} = C_p(T) \left(\sum_{i=1}^6 \Delta H_{NN,i}, \sum_{i=1}^6 \Delta S_{NN,i}, T \right) \quad (3.2)$$

Les résultats de la mesure DSC sur le mélange des douze duplex ainsi que les deux simulations sont représentés sur la figure 3.6.

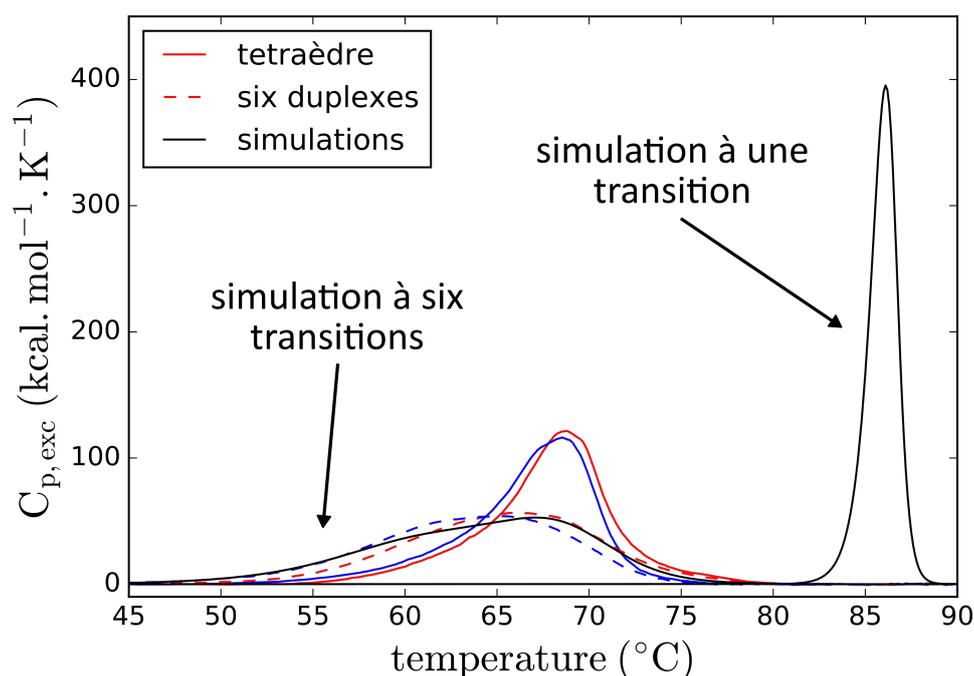


FIGURE 3.6 – Chaleur spécifique excédentaire obtenue lors du repliement du tétraèdre T_{17} (traits pleins bleu (hybridation) et rouge (fonte)) et des six duplex composant les arêtes (traits pointillés bleu et rouge). Les deux simulations donnant les chaleurs spécifiques obtenues à partir du modèle du plus proche voisin pour un repliement soit complètement coopératif, soit complètement non coopératif sont en traits pleins noirs.

La simulation à six transitions est très proche du résultat obtenu pour le mélange des six duplex. Le repliement de duplex d'ADN courts est en effet une transition à deux états et peut donc être modélisé à l'aide du modèle du plus proche voisin. On observe que le repliement du tétraèdre est plus stable et plus coopératif que le repliement des six arêtes indépendantes (la transition est plus fine et a lieu à une température plus élevée). Il est cependant nettement moins coopératif que si les 102 nucléotides composant le tétraèdre s'hybridaient en une seule étape. Le repliement est donc partiellement coopératif et certains états intermédiaires sont peuplés lors du repliement. Nous essayons dans la partie suivante d'estimer à l'aide d'une approche globale le nombre et la taille des domaines qui forment ces états intermédiaires.

Calcul de la variation d'enthalpie de Van't Hoff

L'une des méthodes permettant d'estimer la taille des domaines ainsi que leur nombre, consiste à comparer l'enthalpie de Van't Hoff à l'enthalpie calorimétrique. Pour calculer la variation d'enthalpie de Van't Hoff on ajuste les données obtenues par DSC avec un modèle à deux états avec comme paramètres les variations d'enthalpie et d'entropie de Van't Hoff (ΔH_{VH} et ΔS_{VH}). La figure 3.7 (a) montre cet ajustement dans le cas du T_{17} .

On observe que les données expérimentales ne peuvent pas être reproduites de manière convenable par un modèle à deux états ce qui confirme le fait que l'assemblage implique des états intermédiaires.

Comme indiqué dans la partie 2.4.2, une façon qualitative de définir l'enthalpie de Van't Hoff consiste à se baser sur la largeur de la transition. Dans le cas de la dénaturation, on mesure $T_{0.25} = 65.9 \text{ }^\circ\text{C}$ et $T_{0.75} = 70.0 \text{ }^\circ\text{C}$ ce qui donne $\Delta H_{VH} = 186 \text{ kcal/mol}$. On interprète cette valeur de ΔH_{VH} très différente de ΔH_{cal} ($\Delta H_{cal} = 842 \text{ kcal/mol}$), comme la variation d'enthalpie caractéristique associée à un domaine s'hybridant de manière coopérative. On peut estimer le nombre de domaines distincts qui s'hybride de manière coopérative en effectuant le rapport $\frac{\Delta H_{cal}}{\Delta H_{VH}} = 4.6$. On peut également estimer la taille caractéristique n de ces domaines en supposant qu'ils ont la même énergie moyenne par nucléotides $n_{eq\ coop} = \frac{\Delta H_{VH}}{\Delta H_{cal}} n_{bp} = 22.3$ paires de bases. Cette analyse qualitative permet d'estimer le nombre et la taille des domaines qui vont s'hybrider de manière coopérative. Notre analyse confirme que l'assemblage du tétraèdre n'est pas parfaitement coopératif et ne s'effectue pas en une seule étape. Elle permet en plus d'estimer de manière qualitative que cinq états intermédiaires d'une vingtaine de paires de bases sont impliqués.

Le modèle à deux états ne permet pas d'ajuster convenablement le repliement du tétraèdre car la variation d'enthalpie associée à la réaction est relativement importante. Si la transformation était une transition à deux états, cela signifierait que les 102 nucléotides présents dans les arêtes du tétraèdre s'hybrideraient en une seule et même étape ce qui causerait une transition très coopérative ayant lieu dans une gamme de température très restreinte (figure 3.7 (a)). Ici, ΔH et ΔS sont libre de varier. Mais si on impose le paramètre d'ajustement $\Delta H_{fit} = \Delta H_{VH}$ ne faisant varier que ΔS , on obtiendrait une transition encore plus fine correspondant à l'hybridation coopérative des 102 paires de bases. De plus, dans le cas du tétraèdre, le repliement ne peut pas avoir lieu en une transition à deux états car il faut un minimum de trois réactions bi-moléculaires pour réunir quatre brins en une seule structure.

Un autre moyen de modéliser les mesures expérimentales et d'estimer la coopérativité est donc de supposer que la transformation est composée de n transitions à deux états, toutes ayant les mêmes paramètres thermodynamiques ΔH et ΔS . Ce modèle n'est évidemment pas suffisant pour décrire le repliement car rien ne nous prouve que les transitions intermédiaires ont toutes les mêmes paramètres thermodynamiques mais il permet d'évaluer la coopérativité du repliement. L'ajustement de la courbe DSC par

ce modèle avec comme paramètres n , ΔH et ΔS est donné sur la figure 3.7 (b). Comme on peut l'observer sur la figure 3.7 (b), le modèle permet d'ajuster les données de manière plus acceptable avec comme paramètres d'ajustement $\Delta H_{n\text{ trans}} = 187$ kcal/mol/K, $\Delta S_{n\text{ trans}} = 520$ cal/mol/K et $n = 4.5$. On obtient donc des résultats très proches de ceux obtenus lors de l'estimation des paramètres thermodynamiques de Van't Hoff en se basant sur la largeur de la transition. Le fait que n soit non entier n'est pas physique car le nombre de transitions intermédiaires doit être entier. Cependant, ce modèle ne décrit pas les différentes transitions du repliement, mais permet d'estimer la coopérativité du repliement. Cela indique donc que la transformation est similaire à 4.5 transitions à deux états de paramètres thermodynamiques ΔH_{VH} et ΔS_{VH} .

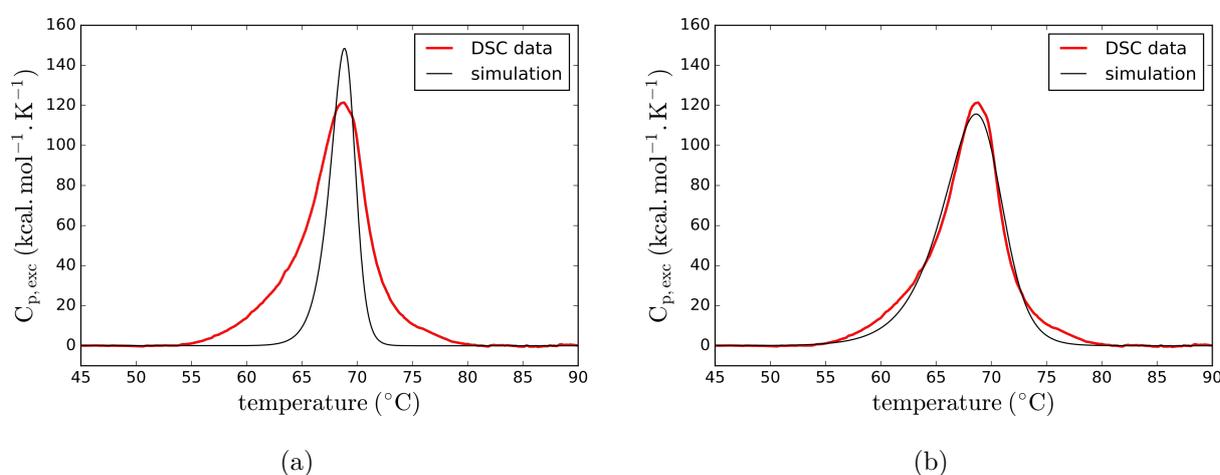


FIGURE 3.7 – Ajustement de la dénaturation du tétraèdre T_{17} par une transition à deux états (a) ou par une n transitions à deux états (b).

Pour aller plus loin dans la description du repliement et tenter d'identifier les paramètres individuels des états intermédiaires, nous présentons dans la partie suivante une méthode de déconvolution qui permet, sans hypothèses a priori, d'estimer le nombre d'états intermédiaires et leurs paramètres thermodynamiques.

3.2.4 Déconvolution en une succession de transitions à deux états

Comme nous l'avons vu dans la partie 2.3.3, il est possible de déconvoluer les données obtenues en DSC afin de décomposer la transformation en une succession de transitions à deux états. En effet, la forme de la transition nous informe sur le nombre d'états intermédiaires et sur la population de ces états en fonction de la température. Cette méthode a été utilisée pour la première fois par Freire et Biltonen pour l'étude de la dénaturation de protéines [126], puis pour l'étude de structures d'ADN simples [73, 74, 127].

Lors du repliement ou de la dénaturation de structures d'ADN, nous supposons que la transition globale est une succession de transitions à deux états bi-moléculaires. L'état de référence est l'état initial I_0 dans lequel tous les brins sont dénaturés et l'état final I_f , celui dans lequel toutes les structures sont formées. On passe de I_0 à I_f par l'intermédiaire d'un certain nombre d'états I_i (figure 3.8).

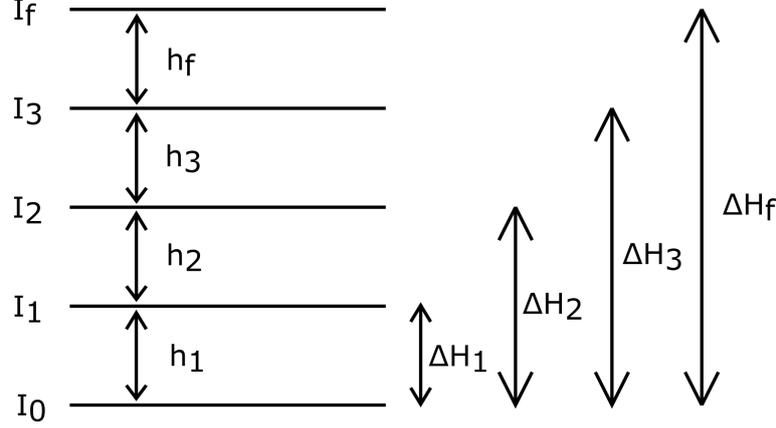


FIGURE 3.8 – Schéma représentant les états intermédiaires lors du repliement d'une nano-structure d'ADN passant d'un état I_0 à un état I_f . I_i sont les états intermédiaires. $h_i = H(i) - H(i - 1)$ et $\Delta H_i = H(i) - H(0)$.

$$\Delta H_0 = 0 \quad (3.3)$$

$$\Delta H_i = H_i - H_0 \quad (3.4)$$

$$h_i = H_i - H_{i-1} \quad (3.5)$$

$$\Delta H_f = \Delta H = H_f - H_0 = \sum h_i \quad (3.6)$$

L'avantage de la DSC est qu'elle permet la mesure directe de l'énergie moyenne cumulée $\langle \Delta H(T) \rangle$ qui est liée au nombre d'états présents lors de la transformation, à leur énergie et à leur population (voir partie 2.3.1) :

$$\langle \Delta H(T) \rangle = \sum_{i=0}^u \Delta H_i \times P_i(T) \quad (3.7)$$

avec P_i la population de l'état i . La fonction de partition $Q(T)$ est reliée à l'énergie moyenne cumulée par la relation :

$$\frac{\partial \ln Q(T)}{\partial T} = \frac{\langle \Delta H(T) \rangle}{RT^2} \quad (3.8)$$

donc

$$Q(T) = \exp\left(\int_{T_0}^{T_f} \frac{\langle \Delta H(T) \rangle}{RT^2} dT\right) \quad (3.9)$$

Or, la fonction de partition peut aussi s'exprimer en fonction des populations et des enthalpies libres de chaque état :

$$P_i(T) = \frac{\exp\left(\frac{-\Delta G_i(T)}{RT}\right)}{Q} \quad (3.10)$$

Donc à l'état de référence I_0 , comme $\Delta G_0 = 0$,

$$P_0(T) = \frac{1}{Q(T)} \quad (3.11)$$

On peut donc directement calculer la population de l'état de référence à partir de l'énergie moyenne cumulée. Il est ensuite possible de calculer la variation d'enthalpie associée à la première transition $h_1 = H_1 - H_0$. On a vu précédemment que l'énergie moyenne cumulée est liée aux différents états par la relation :

$$\langle \Delta H(T) \rangle = \sum_{i=0}^f \Delta H_i \times P_i(T) \quad (3.12)$$

donc,

$$\langle \Delta H(T) \rangle = \sum_{i=1}^f [(\Delta H_i^1 + h_1) \times P_i^1(T)(1 - P_0(T))] \quad (3.13)$$

On considère ici, un nouvel état de référence qui est l'état I_1 . On note $\Delta H_i^j = H_i - H_j$ et $P_i^j(T)$ la population de l'état i dans la réaction ayant pour état de référence l'état I_j : $I_j \rightarrow I_f$

$$\frac{\langle \Delta H(T) \rangle}{1 - P_0(T)} = \sum_{i=1}^f [\Delta H_i^1 \times P_i^1(T)] + \sum_{i=1}^f [h_1 \times P_i^1(T)] \quad (3.14)$$

$$\frac{\langle \Delta H(T) \rangle}{1 - P_0(T)} = \sum_{i=1}^f [\Delta H_i^1 \times P_i^1(T)] + h_1 \quad (3.15)$$

$$\frac{\langle \Delta H(T) \rangle}{1 - P_0(T)} = \langle \Delta H^1(T) \rangle + h_1 \quad (3.16)$$

Avec $\langle \Delta H^1(T) \rangle$ l'énergie moyenne cumulée de la réaction $I_1 \rightarrow \dots \rightarrow I_f$ prenant comme nouvel état de référence l'état I_1 . $\langle \Delta H^1(T) \rangle$ est une fonction décroissante et positive, nulle à $T = T_1$. Considérant le terme :

$$A^i(T) = \frac{\langle \Delta H^i(T) \rangle}{1 - P_i^1(T)} \quad (3.17)$$

Ce terme a un minimum à une température T_i pour laquelle $A^i(T_i) = h_{i+1}$. On peut donc en calculant le minimum de $A^0(T)$ avoir accès à h_1 et T_1 et calculer la nouvelle énergie moyenne cumulée :

$$\langle \Delta H^1(T) \rangle = \frac{\langle \Delta H(T) \rangle}{1 - P_0(T)} - h_1 \quad (3.18)$$

En réutilisant les équations 3.9 et 3.11, on peut calculer la nouvelle fonction de partition $Q_1(T)$ et la population de l'état I_1 dans la réaction $I_1 \rightarrow \dots \rightarrow I_f, P_1^1(T)$.

La méthode est ensuite itérative : on commence par considérer la réaction allant des états I_i à I_f , on calcule $\langle \Delta H^i(T) \rangle, P_i^i(T), A^i(T)$. Ensuite, le minimum de $A^i(T)$ nous donne h_{i+1} ce qui nous permet d'effectuer les mêmes étapes mais en considérant la réaction allant de I_{i+1} à I_f . On effectue ces étapes jusqu'à ce que $A_{f-1}(T)$ n'ait plus de minimum. Lorsque T diminue, $A_{f-1}(T)$ tend alors vers h_f . Pour chaque transition, on connaît la variation d'enthalpie h_i et la population P_i^i en fonction de la température. La température de fusion T_m^i , température pour laquelle $P_i^i = \frac{1}{2}$ nous permet de calculer la variation d'entropie avec la relation :

$$s_i = \frac{h_i}{T_m^i} - R \ln \left(\frac{C}{2} \right) \quad (3.19)$$

où C est la concentration en structure d'ADN. La méthode de déconvolution permet donc de connaître le nombre de transitions intermédiaires, et pour chaque transition, la variation d'enthalpie et d'entropie associée $\Delta H_{\text{deconv}}^i, \Delta S_{\text{deconv}}^i$. La chaleur spécifique de la réaction est la somme des chaleurs spécifiques de chaque transition intermédiaire. On peut ensuite ajuster ces paramètres avec les mesures obtenues par DSC ce qui donne des couples $\Delta H_{\text{fit}}^i, \Delta S_{\text{fit}}^i$ pour chaque transition. Pour illustrer la méthode de déconvolution, les figures 3.9 et 3.10 montrent les différentes grandeurs calculées ($\langle \Delta H^i(T) \rangle, P^i(T), A_i(T)$), ainsi que les états intermédiaires obtenus lors de la déconvolution du tétraèdre T_{17} . On observe que pour le tétraèdre T_{17} , la transformation peut se décomposer en une succession de quatre transitions intermédiaires ce qui est cohérent avec les estimations obtenues utilisant le calcul de la variation d'enthalpie de Van't Hoff. Il est cependant important de noter que c'est la méthode de déconvolution qui nous permet d'obtenir le nombre d'états de transitions présents dans la transformation. Dans la méthode de déconvolution, on ne fait à aucun moment une hypothèse sur le nombre d'états intermédiaires.

3.2.5 Conclusion sur le tétraèdre T_{17}

La calorimétrie différentielle à balayage nous a permis de calculer les paramètres thermodynamiques du tétraèdre T_{17} . En analysant qualitativement la largeur de la transition nous avons estimé que l'assemblage se faisait avec quatre ou cinq intermédiaires d'une vingtaine de paires de bases. En modélisant la transition comme une somme de transitions à deux états identiques nous sommes capables de reproduire la courbe expérimentale de manière cohérente avec notre analyse qualitative.

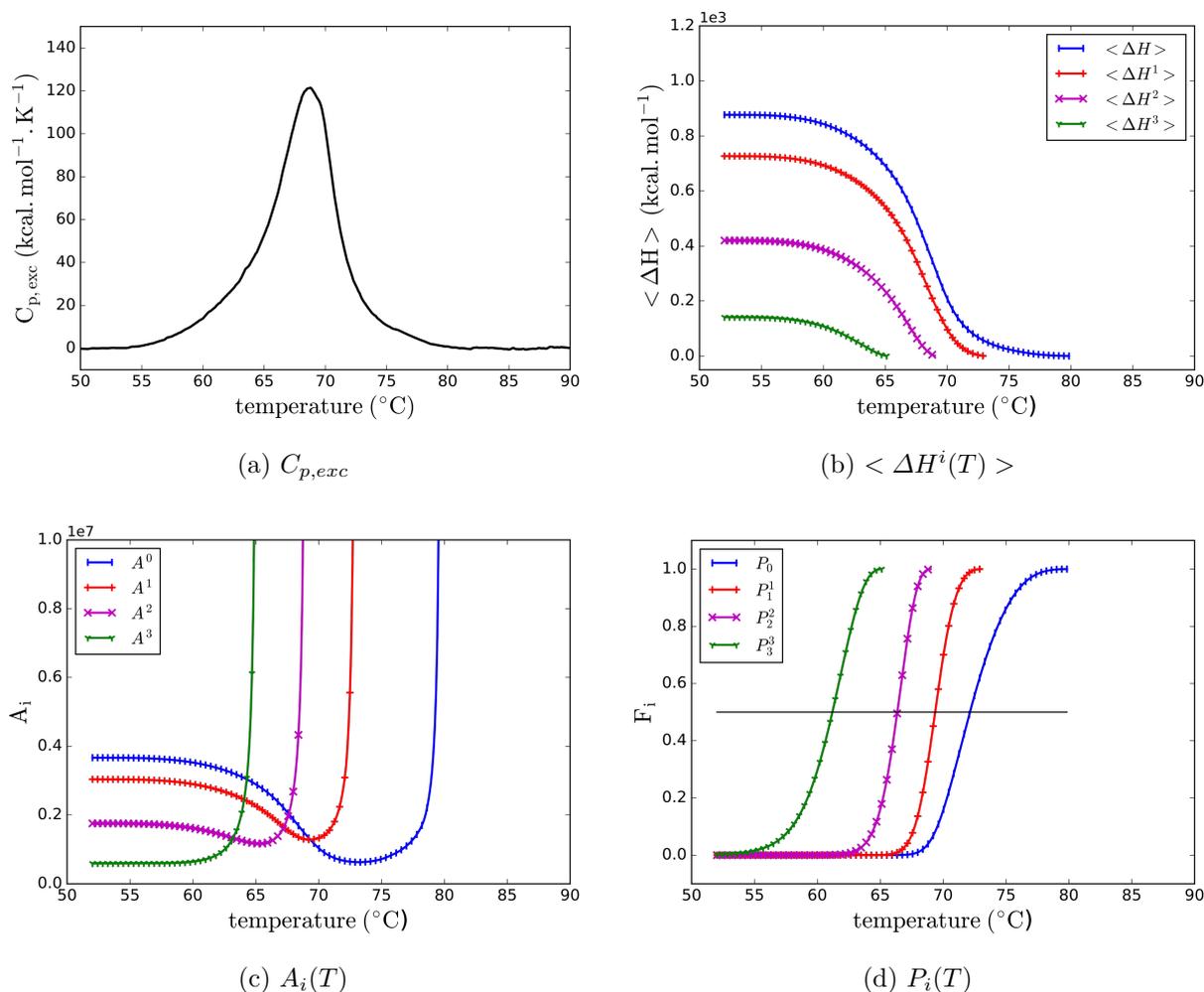


FIGURE 3.9 – Différentes étapes permettant la déconvolution du repliement du tétraèdre T_{17} : (a) chaleur spécifique excédentaire en fonction de la température, (b) énergie moyenne cumulée pour les différents états de références, (c) $\frac{\langle \Delta H^i(T) \rangle}{1 - F_i(T)}$, (d) population de l'état de l'état de référence I_i

La méthode de déconvolution nous a appris que le repliement du tétraèdre est composé de quatre transitions intermédiaires mais nous ne savons pas à quels états ceux-ci correspondent. Si on considère comme possible toutes les réactions bi-moléculaires entre deux brins et si l'on suppose qu'une fois que deux brins sont réunis dans une même structure, alors tous les nucléotides complémentaires entre ces deux brins s'hybrident, on peut calculer qu'il existe en tout 15 chemins de repliement possibles composés chacun de trois transitions intermédiaires parmi 25 transitions possibles. Ces chemins de repliement sont représentés sur la figure 3.11. Étant donné le grand nombre de chemins de repliement, il est difficile de savoir lesquels des états intermédiaires parmi tous les états possibles sont peuplés lors du repliement du tétraèdre. De plus, ce tétraèdre est conçu de manière très symétrique. Bien qu'ayant des séquences différentes, chaque duplex a un rôle similaire

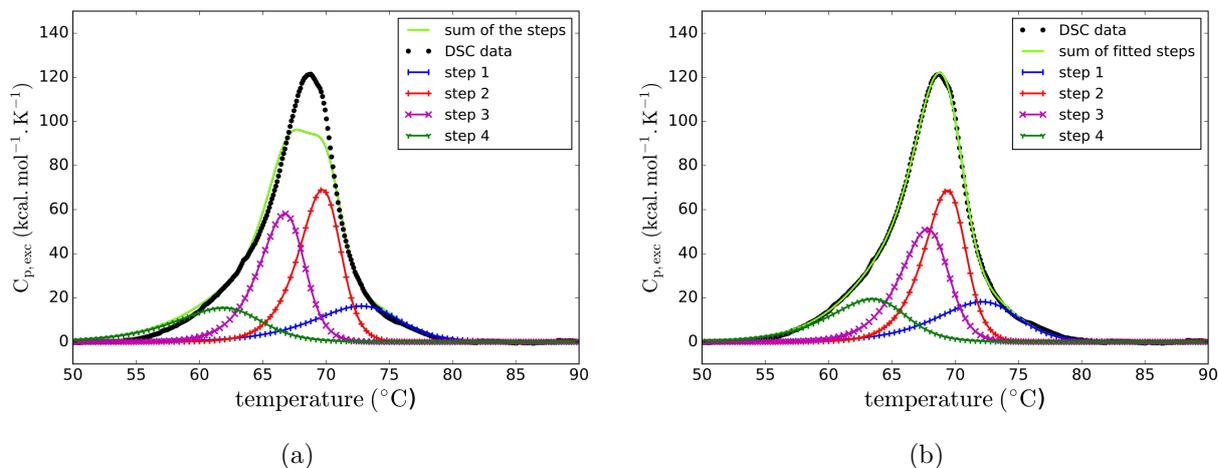
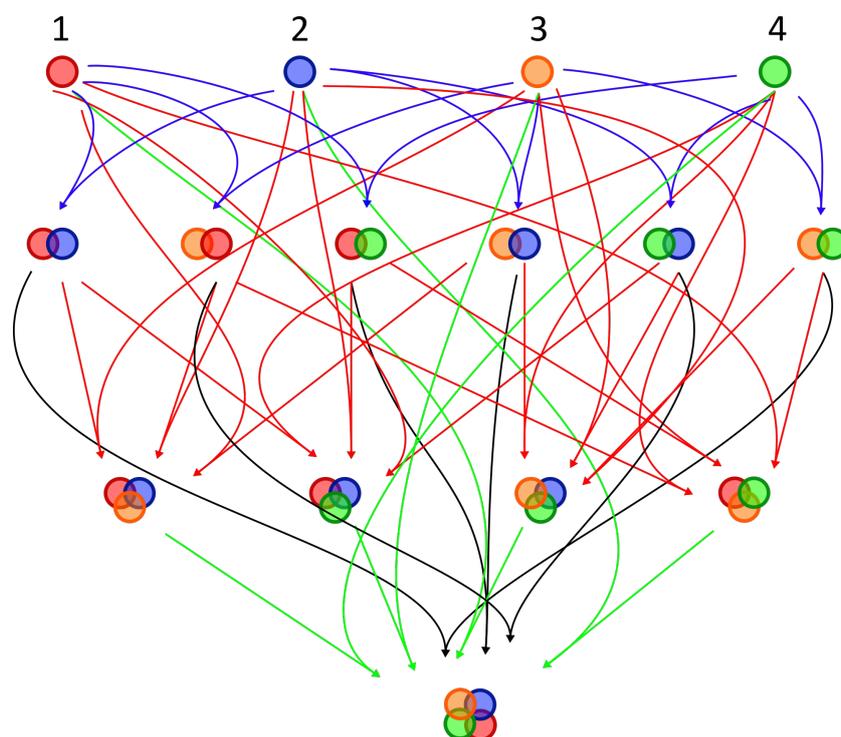


FIGURE 3.10 – Déconvolution du repliement du tétraèdre T_{17} avec à gauche les différentes transitions intermédiaires obtenues par la méthode de déconvolution et à droite, ces mêmes transitions après un ajustement des paramètres thermodynamiques ΔH_{fit} et ΔS_{fit} . Les données DSC sont en noir ; les transitions intermédiaires calculées (a) ou ajustées (b) sont en vert, violet, rouge et bleu ; La somme des transitions intermédiaires est en chartreuse.

dans le repliement. Il est donc difficile d'identifier à quoi correspondent les différentes transitions intermédiaires. Afin de pouvoir déterminer plus facilement le chemin de repliement et les états intermédiaires, nous nous sommes intéressés à un autre tétraèdre similaire en taille mais nettement moins symétrique qui est le tétraèdre T_{20} tiré de [28].

3.3 Repliement du tétraèdre T_{20}

Nous étudions dans cette partie une structure assemblée à partir de quatre brins d'ADN qui forment de nouveau une nano-cage en forme de tétraèdre. Dans la première partie nous précisons en quoi la structure assemblée diffère du tétraèdre T_{17} . Puis, en nous basant sur la méthodologie présentée dans la partie 3.2.4, nous étudierons la décomposition du repliement de ce tétraèdre en transitions intermédiaires ainsi que la possibilité de modifier le chemin du repliement de la structure en modifiant les séquences impliquées dans certaines des transitions intermédiaires.

FIGURE 3.11 – Chemins possible lors du repliement du tétraèdre T_{17} .

3.3.1 Identification d'états intermédiaires dans le repliement du tétraèdre T_{20}

La particularité du tétraèdre T_{20} est que les extrémités des brins d'ADN ne sont plus situées au niveau des sommets du tétraèdre mais proche du milieu des arêtes comme cela est représenté sur la figure 3.12 qui reprend la figure 3.1 avec des couleurs soulignant la structure particulière du tétraèdre. Un seul nucléotide d'adénine non apparié, situé au niveau des sommets du tétraèdre, procure de la flexibilité à la chaîne et permet à deux arêtes adjacentes de former des angles de 60° . Le tétraèdre étant composé de six arêtes et de quatre simples brin d'ADN, deux des arêtes ne sont donc pas coupées par les extrémités des brins et forment des duplex continus. Il s'agit des duplex formés par les brins 1/2 et 3/4 (D_{12} et D_{34}). Les séquences du tétraèdre T_{20} sont indiquées ci-dessous avec des couleurs soulignant les domaines complémentaires. Les domaines rouge et orange correspondent aux domaines D_{12} et D_{34} formant des duplex continus :

- T20-1 : **AGG-CAG-TTG-AGA-CGA-ACA-TTC-CTA-AGT-CTG-AAA-TTT-ATC-ACC-CGC-CAT-AGT-AGA-CGT-ATC-ACC**
- T20-2 : **CTT-GCT-ACA-CGA-TTC-AGA-CTT-AGG-AAT-GTT-CGA-CAT-GCG-AGG-GTC-CAA-TAC-CGA-CGA-TTA-CAG**
- T20-3 : **GGT-GAT-AAA-ACG-TGT-AGC-AAG-CTG-TAA-TCG-ACG-GGA-AGA-**

GCA-TGC-CCA-TCC-ACT-ACT-ATG-GCG

- T20-4 : **CCT-CGC-ATG-ACT-CAA-CTG-CCT-GGT-GAT-ACG-AGG-ATG-GGC-ATG-CTC-TTC-CCG-ACG-GTA-TTG-GAC**

Si les quatre brins ont des séquences énergétiquement équivalentes, la formation des arêtes D_{12} et D_{34} devrait être favorisée par rapport à celle des arêtes D_{13} , D_{14} , D_{23} et D_{24} dans lesquelles une césure est présente. La différence énergétique entre ces deux types d'arêtes doit correspondre au coût énergétique d'une césure. On peut donc supposer que l'assemblage des tétraèdres commencera par l'hybridation des domaines D_{12} et D_{34} . On verra que les séquences et donc les propriétés thermodynamique des domaines D_{12} et D_{34} sont importantes mais qu'il ne suffit pas d'avoir des domaines stables pour optimiser le repliement.

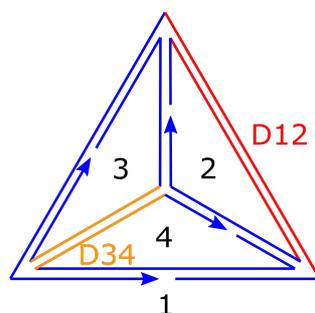


FIGURE 3.12 – Schéma du tétraèdre T_{20} formés de quatre simples brin de 63 nucléotides tiré de [28]. Les couleurs soulignent les domaines complémentaires.

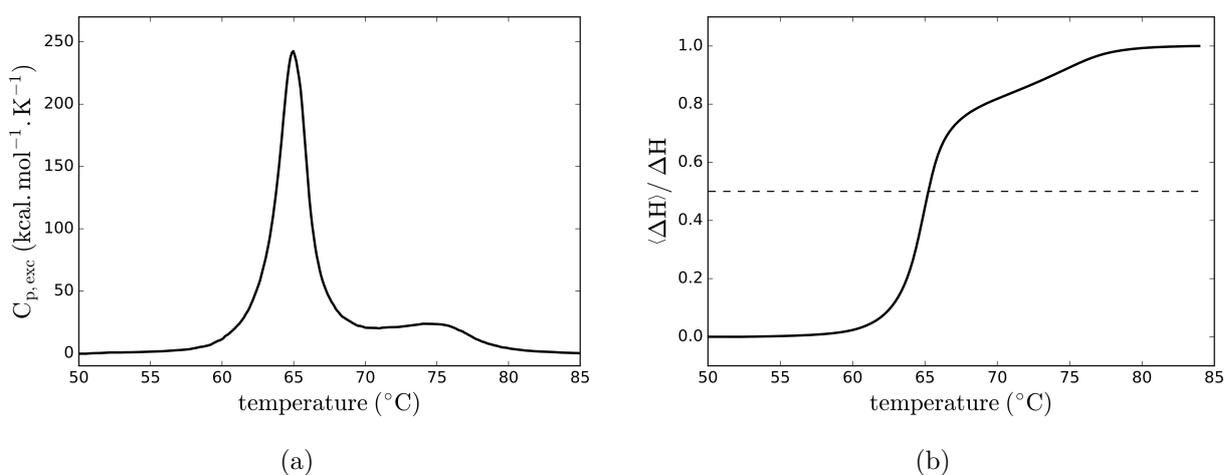


FIGURE 3.13 – Chaleur spécifique excédentaire (a) et énergie moyenne cumulée (b) lors du repliement du tétraèdre T_{20} .

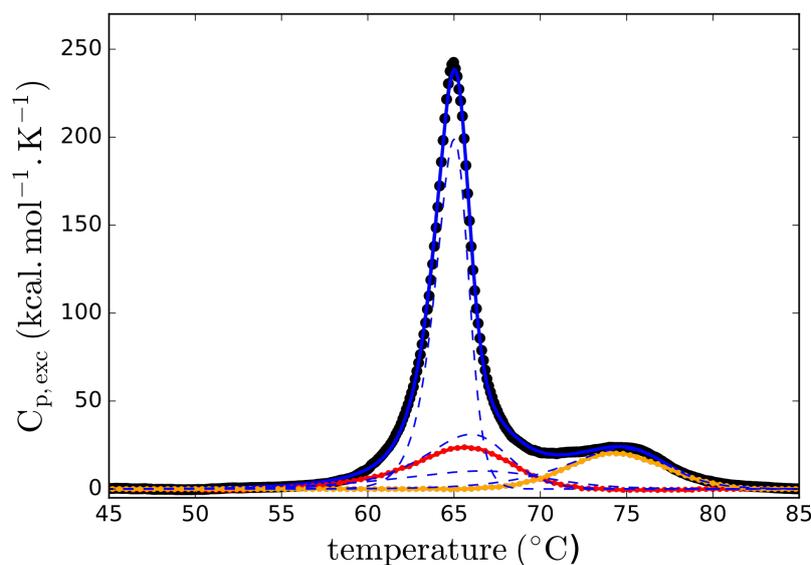


FIGURE 3.14 – Déconvolution du repliement du tétraèdre T_{20} en quatre transitions intermédiaires (bleu pointillé). La somme des quatre transitions est indiquée en trait plein en bleu. Les données DSC obtenues pour le repliement des duplex D_{12} et D_{34} sont respectivement en rouge et en orange.

Les mesures de chaleur spécifique excédentaire ainsi que la courbe de fusion (fraction des paires de bases hybridés en fonction de la température) sont représentées sur la figure 3.13. La présence de deux pics bien distincts, un pic large et de faible amplitude autour de 75 $^{\circ}\text{C}$ et un pic plus fin et dont l'amplitude est plus élevée autour de 65 $^{\circ}\text{C}$, indique immédiatement que l'assemblage de la structure globale peut être séparée en plusieurs étapes. Pour obtenir plus d'informations sur les transitions intermédiaires, il est nécessaire d'utiliser la méthode de déconvolution décrite précédemment. Nos résultats sont représentés sur la figure 3.14 et comme dans le cas du T_{17} , l'assemblage du tétraèdre T_{20} peut être déconvolué comme la superposition de quatre transitions intermédiaires. Étant donné la structure du tétraèdre, on peut supposer que les deux arêtes non coupées par les extrémités des brins sont plus stables que les autres et sont donc les premières à s'hybrider. Pour vérifier cette hypothèse nous avons effectué des mesures DSC sur les mélanges des brins 1 et 2, puis 3 et 4 afin d'observer de manière indépendante l'hybridation des duplex D_{12} et D_{34} . En superposant les chaleurs spécifiques excédentaires obtenues par la déconvolution du tétraèdre avec les données DSC obtenues pour les duplex D_{12} et D_{34} , on observe que deux des transitions intermédiaires correspondent à l'hybridation des arêtes non coupées (figure 3.14). L'hybridation d'un des duplex correspond au premier pic au alentour de 75 $^{\circ}\text{C}$, le second s'hybride à une température légèrement supérieure à celle du pic principal vers 65 $^{\circ}\text{C}$. Les températures de fusion des deux duplex diffèrent d'environ 10 $^{\circ}\text{C}$ ce qui s'explique par des proportions en nucléotides AT et GC très différentes dans leur séquence respective.

Certaines des étapes intermédiaires obtenues par la méthode de déconvolution correspondent à des étapes réelles mesurées par DSC lors de l'hybridation des deux brins indépendamment des deux autres. Les états intermédiaires correspondent précisément aux duplex formés par les arêtes continues du T_{20} (D_{12} et D_{34}).

Nos résultats montrent deux choses : d'abord que la méthode de déconvolution produit des résultats correspondant à des configurations réelles du système, ensuite que l'hybridation des duplex joue un rôle primordial dans l'assemblage global du tétraèdre.

Pour valider la méthode, il faut maintenant modifier ces états intermédiaires en jouant avec la flexibilité de la synthèse de petits oligonucléotides et corrélérer les mesures DSC effectuées sur des mélanges réduits de brins aux transitions obtenues par déconvolution sur les assemblages complets. Pour déterminer quelle est l'influence de l'hybridation de ces duplex sur le repliement global du tétraèdre, nous avons donc conçu d'autres tétraèdres dans lesquels les séquences D_{12} et D_{34} sont modifiées de manière à les stabiliser ou les déstabiliser. Dans la partie suivante nous analysons les résultats obtenus sur ces systèmes.

3.3.2 Coopérativité et stabilité des différents tétraèdres

Afin de modifier la stabilité des duplex complets, des nouvelles séquences ont été conçues de manière à avoir pour chacun des duplex trois températures de fusion : une autour de 61 °C, la seconde autour de 65 °C, et la troisième vers 74 °C. Les séquences des quatre brins d'ADN sont modifiées uniquement au niveau des duplex D_{12} et D_{34} du tétraèdre (en orange et rouge sur les séquences), le reste des brins est laissé à l'identique. Il existe donc pour chaque brin composant le tétraèdre trois versions différentes. En combinant les trois versions de chaque brin, il est alors possible de former neuf tétraèdres avec pour chaque duplex trois températures de fusion possibles. Les tétraèdres sont appelés T_{ij} avec i la température de fusion du duplex D_{12} et j la température de fusion du duplex D_{34} . $i, j = L$ lorsque la température de fusion est la plus basse (vers 61 °C), $i, j = M$ lorsque la température de fusion est la température de fusion médiane (vers 65 °C), et $i, j = H$ lorsque la température de fusion est la plus haute (vers 74 °C). Le T_{20} initial correspond donc au tétraèdre T_{MH} . Sur le tableau 3.1 qui indique les différents tétraèdres réalisables, les sept cases colorées en vert correspondent aux tétraèdres qui ont été mesurés par DSC au cours de cette thèse. Les chaleurs spécifiques excédentaires mesurées pour les sept tétraèdres sont représentées sur la figure 3.15.

On remarque sur les courbes de la figure 3.15 que les séquences des duplex complets ont une grande influence sur le repliement du tétraèdre alors qu'on ne modifie qu'un tiers des séquences. Comme on pouvait s'y attendre, lorsqu'on déstabilise les duplex complets, on déstabilise la formation du tétraèdre qui se forme à une température plus basse. Ce qui est plus étonnant c'est que en déstabilisant le tétraèdre, on semble rendre son repliement plus coopératif ce qui se quantifie par une largeur de transition plus étroite. Le repliement des duplex est donc nécessaire au repliement du tétraèdre, mais si ceux-ci sont déstabilisés, une

fois assemblés, le tétraèdre peut se replier ensuite de manière beaucoup plus coopérative. Ces résultats semblent indiquer que le repliement des deux duplex D_{12} et D_{34} sont des étapes limitantes pour le repliement du tétraèdre.

Aux sept tétraèdres de topologie identique, s'ajoute un huitième tétraèdre, que nous appelons le T_{top} , qui possède les mêmes séquences que le tétraèdre original de 2005 (T_{MH}) mais avec la structure du tétraèdre de 2004 (T_{17}). C'est à dire que les arêtes du tétraèdres sont composées chacune de 20 paires de bases, avec un A non apparié dans chaque sommet et que les extrémités 3' et 5' sont situées au niveau des sommets et non au milieu des arêtes. Les séquences du tétraèdre T_{top} sont données ci-dessous et la chaleur spécifique excédentaire est représentée sur la figure 3.15 :

- T20 - top - 1 : CGA-ACA-TTC-CTA-AGT-CTG-AAATTT-ATC-ACC-CGC-CAT-AGT-AGACGT-ATC-ACCAGG-CAG-TTG-AG
- T20 - top - 2 : TTC-AGA-CTT-AGG-AAT-GTT-CGACAT-GCG-AGG-GTC-CAATAC-CGACGA-TTA-CAGCTT-GCT-ACA-CG
- T20 - top - 3 : CG-GGA-AGA-GCA-TGC-CCA-TCCACT-ACT-ATG-GCG-GGT-GAT-AAAACG-TGT-AGC-AAG-CTG-TAA-TCG
- T20 - top - 4 : GG-ATG-GGC-ATG-CTC-TTC-CCGACG-GTA-TTG-GAC-CCT-CGC-ATGACT-CAA-CTG-CCT-GGT-GAT-ACG

Nos mesures indiquent que le tétraèdre T_{top} est beaucoup plus stable, mais que son repliement est nettement moins coopératif puisqu'il a lieu dans une gamme de température plus large. Cela montre qu'en plus des séquences, la topologie est aussi importante et permet de piloter l'assemblage. On peut imaginer mesurer de même par DSC une gamme de tétraèdres dont le point de départ des brins varierait continument des sommets vers le milieu et dont la topologie varierait continument d'une topologie à la T_{17} vers une topologie à la T_{20} . On pourrait s'attendre à obtenir des repliements intermédiaires à ceux du T_{20} et du T_{top} .

3.3.3 Déconvolution et chemin de repliement

La figure 3.16 montre les déconvolutions obtenues pour les huit tétraèdres. Le tétraèdre T_{LL} est le tétraèdre le moins stable mais également le plus coopératif puisque son repliement peut se décomposer en seulement trois transitions intermédiaires alors que dans les autres tétraèdres, quatre transitions sont nécessaires. On remarque que dans les tétraèdres T_{LH} , T_{HL} , T_{MH} et T_{HM} , l'hybridation des duplex D_{12} et D_{34} fait partie des transitions intermédiaires obtenues. Cependant, lorsque les deux duplex ont des températures de fusion très proches, ce qui est le cas des tétraèdres T_{LL} , T_{MM} et T_{HH} , un état intermédiaire se situe bien au niveau de l'hybridation des duplex mais les deux transitions ne sont pas

		T_m 34		
		60.8 °C	65.2 °C	73.1 °C
T_m 12	60.8 °C	T_{LL}	T_{LM}	T_{LH}
	64.1 °C	T_{ML}	T_{MM}	T_{MH}
	74.3 °C	T_{HL}	T_{HM}	T_{HH}

TABLE 3.1 – Différents tétraèdres réalisables à partir des douze brins d'ADN. Les cases colorées en vert correspondent aux tétraèdres qui ont été mesurés au cours de cette thèse en DSC.

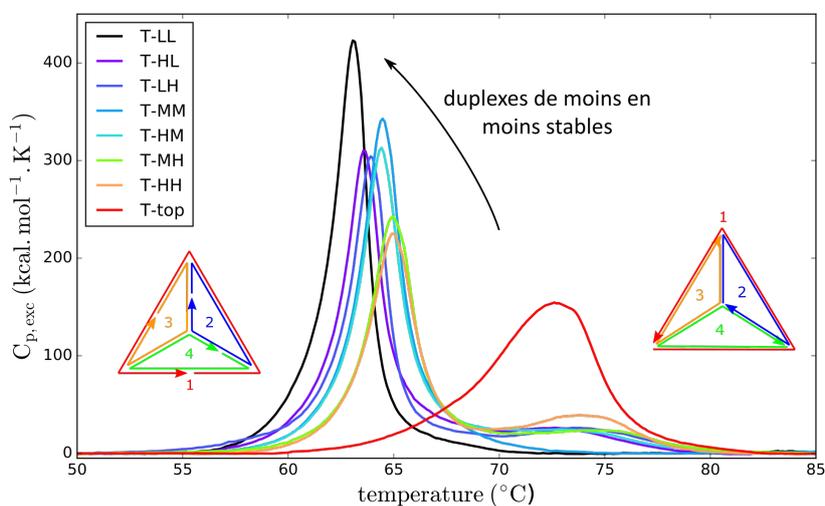


FIGURE 3.15 – Comparaison de la chaleur spécifique excédentaire obtenue pour différents tétraèdres T_{20} . De gauche à droite : T_{LL} , T_{HL} , T_{LH} , T_{MM} , T_{HM} , T_{MH} , et T_{HH} . La courbe en rouge à droite correspond au repliement du tétraèdre T_{top} .

dissociées. Il semble que la transition obtenue par la déconvolution correspond en fait à la somme des transitions associées à l'hybridation des deux duplex. La méthode de déconvolution est donc limitée lorsque deux transitions parallèles ont lieux à la même température de fusion.

Les hybridations des duplex D_{12} et D_{34} semblent être des étapes limitantes au repliement du tétraèdre puisque lorsqu'on les déstabilise, on déstabilise également le tétraèdre. Mais si on considère le cas du tétraèdre T_{HH} dans lequel les deux duplex s'hybrident vers 75 °C, on observe que le pic principal se situe lui, toujours aux alentours de 65 °C et non à 75 °C. Cela montre qu'au moins une troisième étape limitante existe. Il est logique d'avoir trois étapes limitantes lors du repliement du tétraèdre car il faut au minimum trois réactions bi-moléculaires pour passer de quatre brins d'ADN à une seule structure et ceux-ci peuvent s'assembler de deux manières différentes : soit deux duplex commencent par se former deux à deux puis se rassemblent dans une troisième étape, soit un duplex se forme, puis un troisième brin s'hybride au duplex suivi d'un quatrième. Ces deux chemins de repliement possibles sont illustrés sur la figure 3.17.

Pour identifier les étapes limitantes possibles lors de la formation du tétraèdre, on suppose que l'hybridation des demi-arêtes seules ne sont pas des étapes intermédiaires composant le repliement des tétraèdres. Cette hypothèse est justifiée car les demi-arêtes sont des duplex d'ADN de 9 ou 11 paires de bases et sont nettement moins stables que toutes les transitions intermédiaires du repliement des tétraèdres. La plus stable d'entre elle étant la demi-arête formée par le début du brin n°1 avec un bout du brin n°4. Elle possède une température de fusion de 50 °C, température à laquelle tous les tétraèdres sont déjà formés. Si l'on excepte la formation des duplex D_{12} et D_{34} , huit autres réactions bi-moléculaires sont donc susceptibles d'être la troisième étape limitante : il s'agit de la formation des quatre autres arêtes et des quatre sommets des tétraèdres (voir figure 3.18). Les arêtes contenant une coupure (D_{13} , D_{14} , D_{23} , D_{24}) peuvent en effet se replier par la formation d'une boucle sur le brin dont les extrémités se situent au milieu de l'arête. Les sommets peuvent eux se former une fois que le duplex associé est hybridé. Par exemple la formation de duplex D_{12} permet de rapprocher les domaines des brins 1 et 2 complémentaires au brin 4 situé au niveau du sommet. Le sommet S_{12-4} peut donc se former (figure 3.18).

Pour comparer les stabilités de ces transitions, des mélanges réduits de deux ou trois brins d'ADN ont été mesurés par DSC. La figure 3.19 donne les courbes de fusion des différentes étapes bi-moléculaires possibles avec à gauche l'hybridation de toutes les combinaisons de duplex complets D_{12} et D_{34} et à droite le repliement des arêtes coupées (D_{13} , D_{14} , D_{23} , D_{24}) et des sommets (S_{12-3} , S_{12-4} , S_{34-1} , S_{34-2}). Pour le repliement des sommets, les versions H des séquences ont été choisies afin de s'assurer que le duplex complet était déjà formé. Les chaleurs spécifiques correspondant à l'hybridation de ceux-ci ont ensuite été soustraites aux données DSC. On ne représente ainsi que la contribution de l'assemblage du sommet. Les températures de fusion de chacune de ces transitions sont indiquées dans le tableau 3.2.

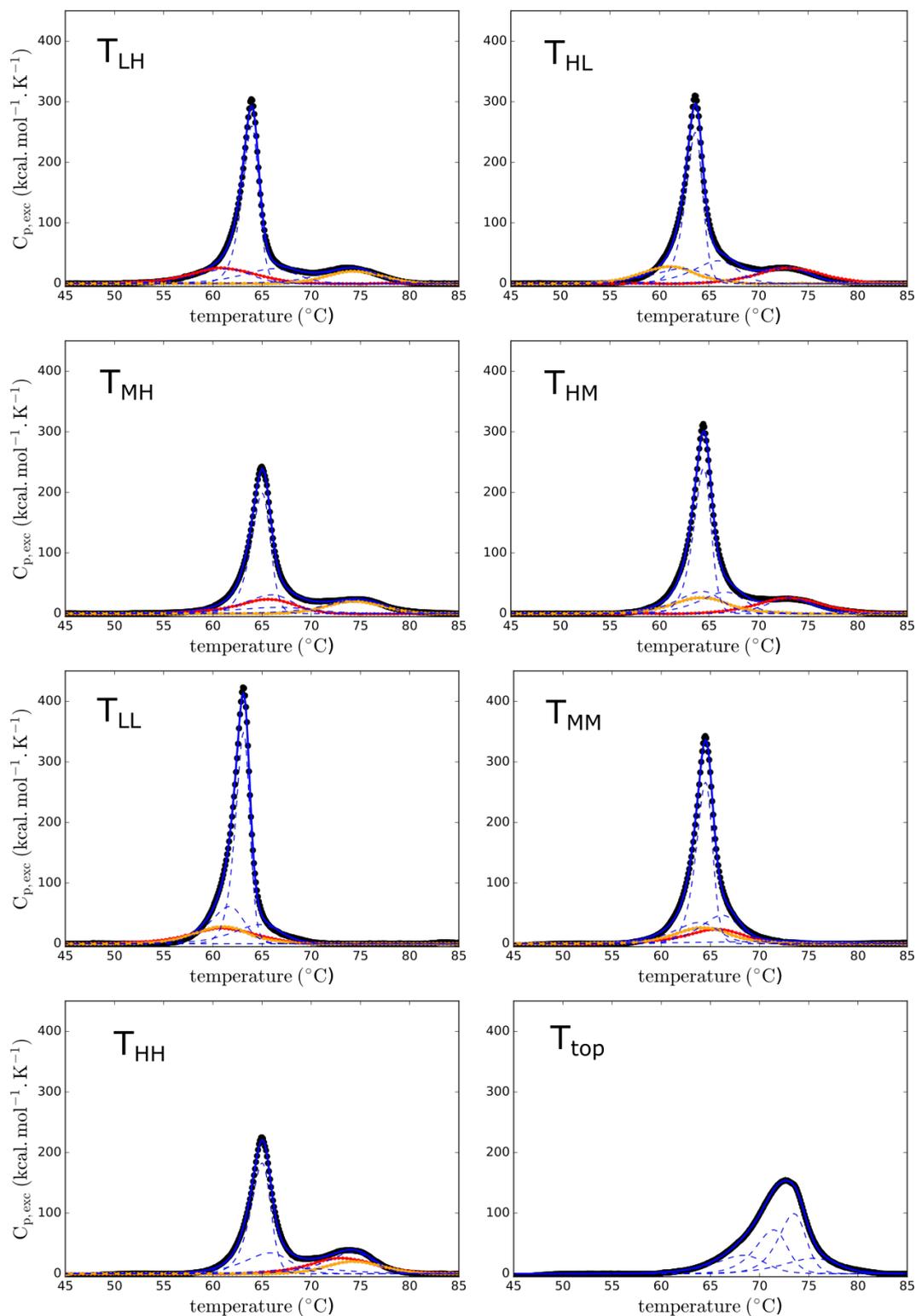


FIGURE 3.16 – Déconvolution des huit tétraèdres T_{20} . Les transitions intermédiaires sont en bleu pointillées, la somme des transitions intermédiaires est en trait plein en bleu. Les données DSC obtenues pour le repliement des duplex D_{12} et D_{34} sont respectivement en rouge et en orange.

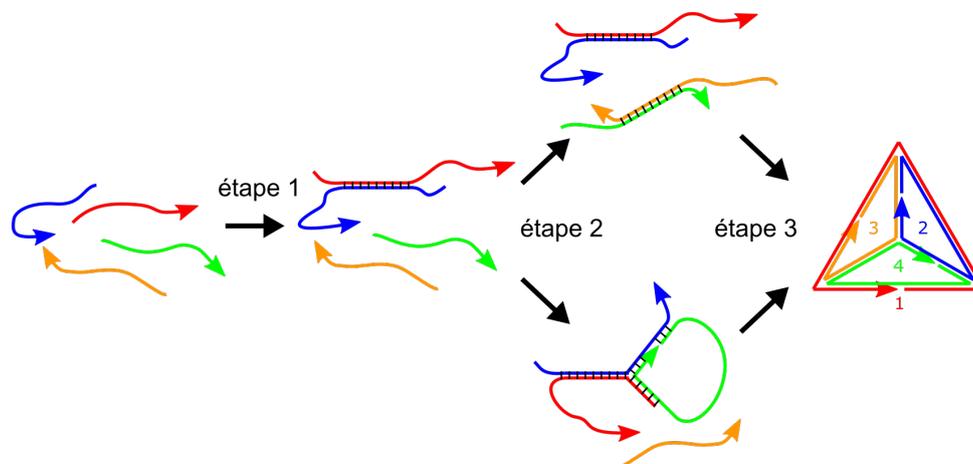


FIGURE 3.17 – Illustration des deux chemins de repliement possibles pour passer de quatre brins d'ADN à un tétraèdre.

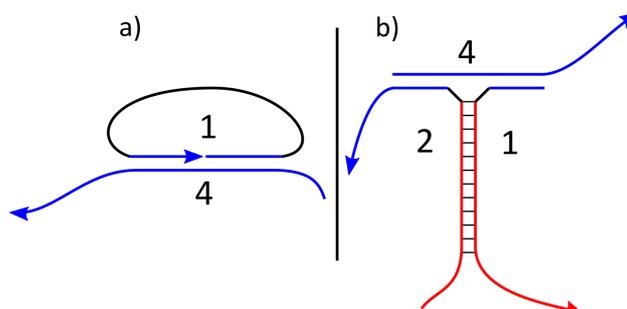


FIGURE 3.18 – a) Illustration du repliement des arêtes coupées du tétraèdre (D_{13} , D_{14} , D_{23} , D_{24}), et des sommets du tétraèdre une fois le duplex complet correspondant hybridé (S_{12-3} , S_{12-4} , S_{34-} , S_{34-2}) (b).

	D_{13}	D_{14}	D_{23}	D_{24}	S_{123}	S_{124}	S_{134}	S_{234}
T_m °C	47.7	57.7	53.6	54.7	60.3	64.3	62.5	61.6

TABLE 3.2 – Températures de fusion des arêtes coupées et des sommets des différents tétraèdres.

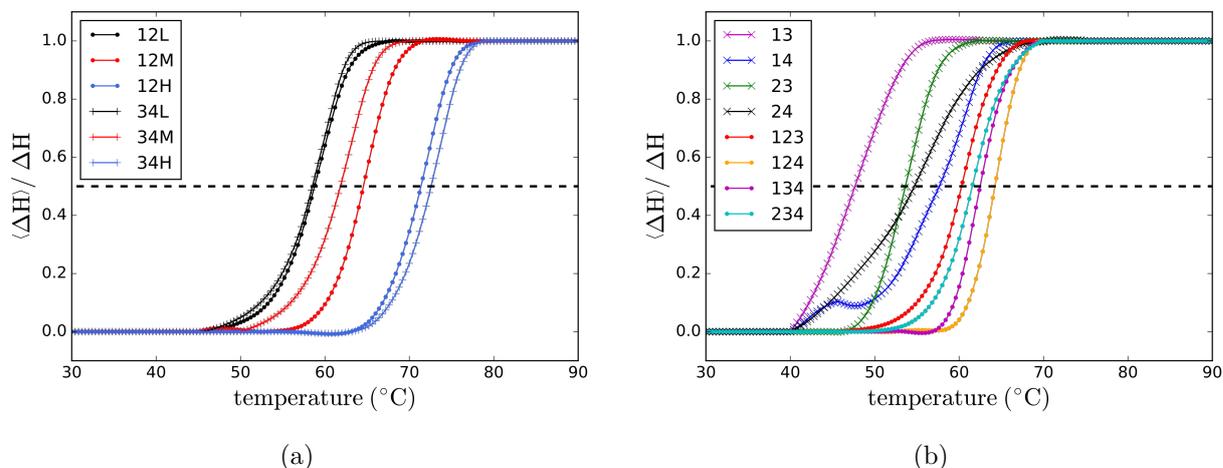


FIGURE 3.19 – Courbes de fusion des différents duplex complets (a), duplex coupés et sommets (b) des tétraèdres T_{20} .

On observe dans un premier temps que les sommets sont tous plus stables que les arêtes coupées. Le plus stable d'entre eux étant le sommet S_{12-4} avec une température de fusion à 64.3°C . Il pourrait donc correspondre à la troisième étape limitante.

Tous les tétraèdres dans lesquels le duplex D_{12} est H possèdent une transition intermédiaire identique à 65°C . La formation du sommet S_{12-4} pourrait donc dans ces cas correspondre à cette transition. La figure 3.20 montre la chaleur spécifique excédentaire des trois tétraèdres T_{HL} , T_{HM} et T_{HH} , avec la transition intermédiaire obtenue par la méthode de déconvolution à 65°C et la chaleur spécifique excédentaire obtenue pour le sommet S_{1-24} à laquelle on a soustrait la contribution de D_{12} . La transition obtenue par déconvolution a lieu à une température légèrement supérieure à celle obtenue par DSC pour le sommet S_{1-24} ce qui peut être dû à une stabilisation de la formation du sommet lorsque les quatre brins sont présents.

La figure 3.21 représente les chemins de repliement possibles si l'on considère que les étapes limitantes sont : a) l'hybridation des duplex D_{12} et D_{34} ainsi que la formation des sommets, b) l'hybridation des duplex D_{12} et D_{34} ainsi que la formation du sommet S_{12-4} . On remarque que le fait d'imposer des étapes limitantes dans le repliement diminue considérablement le nombre de chemins de repliement possibles. Dans le cas (b), il n'y a plus que deux chemins de repliement possibles suivant les stabilités relatives des formations des duplex D_{12} et D_{34} et du sommet S_{12-4} .

Tous les tétraèdres ont en commun la présence d'une transition bien plus coopérative que les autres ayant une température de fusion relativement basse. C'est toujours une des dernières transition du repliement. Cette transition correspond très certainement à la réunion des quatre brins en une seule structure. En effet, une fois les quatre brins réunis, la probabilité des événements de rencontres entre deux brins ne limite plus les

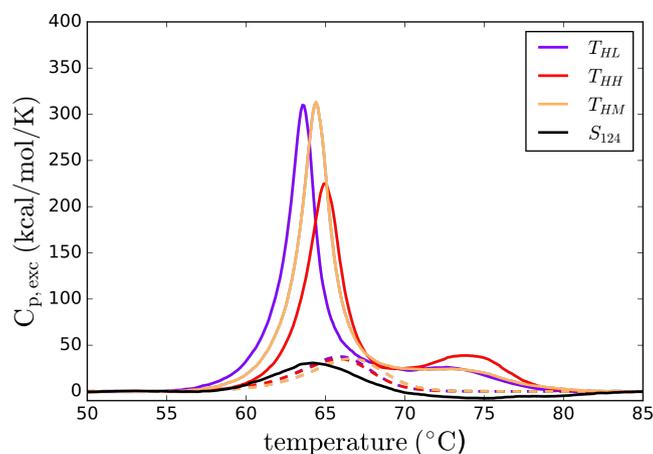


FIGURE 3.20 – Superposition des chaleurs spécifiques obtenues en DSC pour les tétraèdres T_{HL} , T_{HM} , T_{HH} et pour le sommet S_{124} (trait plein) avec l'étape intermédiaire obtenue par déconvolution à 65 °C.

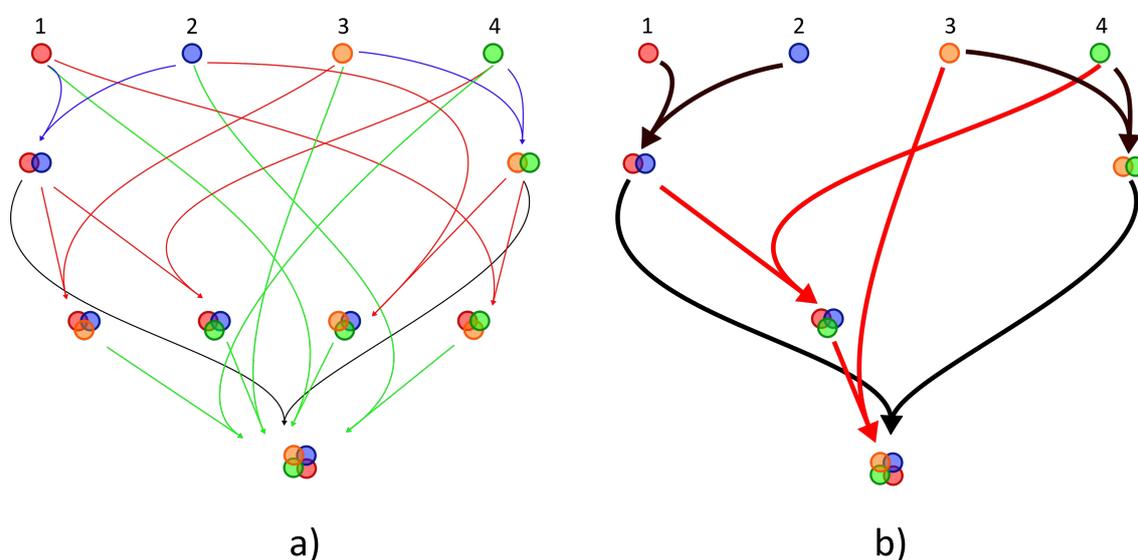


FIGURE 3.21 – Chemins possibles lors du repliement du tétraèdre T_{20} dans le cas où les étapes limitantes sont : a) l'hybridation des duplex D_{12} et D_{34} ainsi que la formation des sommets, b) l'hybridation des duplex D_{12} et D_{34} ainsi que la formation du sommet S_{12-4} .

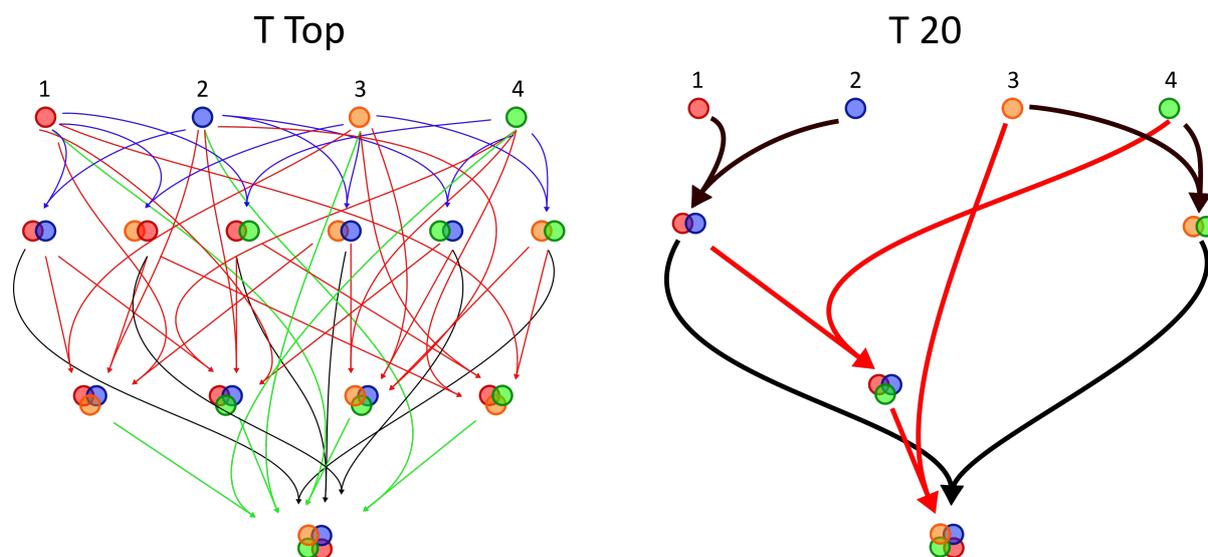


FIGURE 3.22 – Chemins de repliement possibles pour les tétraèdres T_{top} (à gauche) et T_{20} (à droite).

hybridations. La concentration ne rentre plus en jeu, et l'hybridation des nucléotides encore non appariés peut donc se faire de manière bien plus stable. Le pic principal correspond donc certainement au repliement coopératif des brins lors de réactions monomoléculaires après la réunification des quatre brins en une même structure.

Le fait que les formations des sommets soient plus stables que les formations des arêtes coupées mais dépendent de l'hybridation des duplex force un chemin de repliement bien précis. En effet, pour les tétraèdres dont les duplex sont de type L ou M , il faut d'abord que les duplex se forment pour qu'un des sommets puis le tétraèdre se replie par la suite. C'est la raison pour laquelle la coopérativité du repliement est plus importante pour les tétraèdres ayant les duplex les moins stables.

Le tétraèdre T_{top} est l'extrême inverse car il n'y a pas ici deux mais six duplex complets, ceux-ci ayant des températures de fusion allant de $64\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $75\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dans ce tétraèdre, tous les duplex peuvent s'hybrider à des températures similaires de manière indépendante. Le chemin de repliement n'est donc pas forcé comme dans les cas précédents ce qui augmente la stabilité du tétraèdre mais diminue la coopérativité du repliement. La figure 3.22 reprend la figure 3.11 mais en comparant les chemins de repliement possibles pour les tétraèdres T_{top} et T_{20} . Pour le tétraèdre T_{20} , il ne reste plus que deux chemins de repliement possible car trois étapes sont limitantes : il s'agit de la formation des duplex D_{12} , D_{34} et du sommet S_{12-4} . Suivant les stabilités de ces différentes étapes, le repliement va passer par l'un ou l'autre de ces chemins. Dans le cas du T_{top} , un nombre très important de chemins de repliement sont possibles et vont rentrer en compétition.

3.3.4 Limites de la méthode de déconvolution

Les résultats obtenus en comparant la déconvolution des différents tétraèdres en utilisant la méthode décrite dans la partie 2.3.3 nous permettent de comprendre que le repliement du tétraèdre s'effectue au cours de transitions intermédiaires et d'identifier des étapes clés. Il convient néanmoins de rester prudent par rapport aux résultats obtenus par la méthode de déconvolution. En effet, si les expériences DSC nous permettent de mesurer précisément les paramètres thermodynamiques comme les variations d'enthalpie, d'entropie et la température de fusion, les informations obtenues par la déconvolution des courbes sont le fruit d'un modèle et non d'une mesure directe. Ce modèle bien que cohérent avec les résultats obtenus par DSC n'est pas le seul possible. On suppose en effet lors de la déconvolution que le repliement est une succession de transitions à deux états. On ne peut donc pas distinguer deux transitions intermédiaires indépendantes ayant lieu à la même température. C'est pourtant ce qui se passe par exemple lors du repliement du tétraèdre T_{HH} lorsque les deux duplex s'hybrident vers 75 °C.

De plus, la méthode de déconvolution suppose que les réactions sont successives mais indépendantes les unes des autres. Or ce n'est pas le cas du repliement des sommets qui dépendent de l'hybridation des duplex associés. Cela peut mener à une mauvaise décomposition lorsque les duplex ont une température de fusion inférieure à celle des sommets ce qui est le cas pour les versions L des duplex.

Enfin, la méthode de déconvolution donne une première approximation des paramètres thermodynamiques qui sont ensuite ajustés à l'aide d'un nombre de paramètres égal à deux fois le nombre de transitions. Les paramètres thermodynamiques obtenus après ajustement sont proches de ceux obtenus par la déconvolution mais rien ne nous assure que l'ensemble des paramètres thermodynamiques permettant d'ajuster les mesures DSC est unique. Par contre, la succession de transitions intermédiaires obtenues par la méthode de déconvolution après l'ajustement donne bien la même chaleur spécifique que celle que nous obtenons avec nos expériences DSC. Dans le cas du repliement des tétraèdres, on suppose que la décomposition obtenue par la déconvolution correspond bien au repliement du tétraèdre car certaines des étapes intermédiaires correspondent à des transitions réelles mesurées en DSC. Cette méthode ne pourra cependant pas être utilisée pour des structures plus complexes avec un nombre plus important d'états intermédiaires comme les origami d'ADN.

3.3.5 Coopérativité, stabilité, compétition

Lors des assemblages de tous les tétraèdres observés, la coopérativité et la stabilité semblent être incompatibles. Si on veut augmenter la stabilité de la structure, on va avoir tendance à augmenter la stabilité de chaque arête et donc à découper les brins d'ADN de manière à avoir tous les domaines les plus long possibles. Cela a pour conséquence une diminution de la coopérativité car tous les domaines peuvent alors s'hybrider de manière

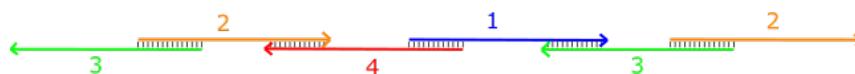


FIGURE 3.23 – Exemple de chaîne d'ADN pouvant se former lors du repliement du tétraèdre T_{top} ou T_{17} .

indépendante. On peut remarquer que la relation stabilité-coopérativité est inversée par rapport aux simples duplex d'ADN (voir chapitre 1). En effet, pour les duplex, le fait d'augmenter la longueur ou la proportion de bases GC dans un duplex va causer une augmentation des variations d'enthalpie et d'entropie ce qui mène à un repliement plus coopératif, ainsi qu'à un duplex plus stable. Cela n'est vrai que lorsque les brins ont une longueur inférieure à une longueur caractéristique de repliement coopératif de la double hélice d'ADN. Dans le cas du tétraèdre, en raison de la dépendance de l'hybridation de certains domaines de la structure, une diminution de la stabilité provoque une augmentation de la coopérativité.

La question que l'on se pose alors naturellement est lequel des repliements est préférable entre un repliement coopératif mais ayant lieu à une température de fusion plus basse ou un repliement moins coopératif ayant lieu à une température de fusion plus élevée. Il est important d'avoir une structure dont la température de fusion est suffisamment supérieure à la température à laquelle on souhaite l'utiliser. Cependant, la structure ne doit pas seulement être stable. Il est également nécessaire d'éviter les mauvais repliement et donc la présence de structures mal formées. Nous avons observé sur des gels électrophorèses effectués sur des tétraèdres T_{17} la présence de multimères composés de plus de brins que les quatre nécessaires à la formation du tétraèdre. Leur présence peut s'expliquer par la formation de chaînes de plus de quatre brins d'ADN se refermant ensuite sur elles-mêmes (voir figure 3.23). Un tétraèdre moins stable mais plus coopératif est donc certainement préférable au tétraèdre T_{top} par exemple. En effet, le fait d'avoir des étapes limitantes force le chemin de repliement et empêche la formation de multimères. Dans le cas du T_{top} le système n'est pas guidé vers un chemin de repliement précis ce qui causer des mauvais repliements et la formation de chaînes d'ADN.

Dans les cas des structures très complexes comme les origami d'ADN, un long recuit est souvent nécessaire au bon repliement de la structure. Ce recuit peut durer de quelques heures jusqu'à plusieurs jours pour les origami 3D [33, 34]. Le fait d'avoir un repliement coopératif diminue la gamme de température à laquelle la structure se replie sur elle-même ce qui permettrait donc de diminuer le temps du recuit pour les origami les plus complexes.

3.4 Conclusion

Nous avons utilisé la colorimétrie différentielle à balayage pour étudier des structures modèles qui sont des nano-cages d'ADN tétraédriques. Ainsi nous avons pu décomposer le repliement de différents tétraèdres d'ADN en une succession de transitions intermédiaires et identifier pour certains tétraèdres des étapes clés. Une modification ciblée des séquences des brins impliqués dans les étapes clés du repliement du tétraèdre nous a permis de modifier de manière importante le chemin du repliement, sa stabilité et sa coopérativité. Si l'on veut privilégier la coopérativité par rapport à la stabilité du repliement, il peut être judicieux d'inclure dans la conception de la structure des étapes limitantes permettant de forcer le chemin de repliement dans une direction bien précise. Cela aura pour conséquence une diminution de la stabilité mais permettra également de réduire le risque de mauvais repliement et d'augmenter la coopérativité réduisant ainsi le temps de recuit nécessaire à la formation de la structure.

Dans le tétraèdre T_{20} , la topologie de la structure impose des passages obligés guidant le chemin de repliement. Les étapes de pré-assemblages sont donc des étapes qui vont conditionner le repliement global de la structure. Nous avons étudié l'influence de la modification des duplex complets D_{12} et D_{34} mais nous n'avons pas effectué de modification de séquences sur les sommets du tétraèdre et notamment sur le sommet S_{12-4} que nous supposons être le troisième état limitant. Une des perspectives concernant les tétraèdres d'ADN serait donc de modifier les séquences de ce sommet afin de le stabiliser autant que les duplex complets et voir si l'on peut, de cette manière, avoir un repliement stable et coopératif. Il serait également intéressant de voir si les structures plus complexes comme les origami se comportent de la même manière que les tétraèdres, c'est à dire si l'insertion de points de passages obligés dans le repliement des origami permet d'en augmenter la coopérativité.

Chapitre 4

Repliement des origami d'ADN

Nous avons vu dans le chapitre 3 à partir des deux exemples de nanocages d'ADN qu'il est possible de décomposer le repliement en une série de réactions bi-moléculaires. L'intérêt est d'identifier précisément les états intermédiaires peuplés lors du repliement. Cependant, nous avons vu que l'identification de ces états intermédiaires reste incomplète. On peut donc imaginer que cette identification va devenir impossible pour les plus grosses structures comme les origami d'ADN qui sont composés de plusieurs centaines de brins.

Pour les origami d'ADN, il est nécessaire d'étudier le repliement de manière plus globale. Nous commencerons par étudier dans ce chapitre le repliement de structures simples à la base des origami d'ADN. Nous verrons dans un premier temps le repliement de boucles d'ADN de différentes longueurs par une agrafe d'ADN, puis nous nous intéresserons au repliement d'origami à deux agrafes. Enfin, nous verrons le repliement de différents origami en utilisant différentes stratégies pour le positionnement des agrafes.

4.1 Repliement de boucles d'ADN

L'origami d'ADN est, comme son nom l'indique, le repliement sur lui-même d'un grand brin d'ADN appelé scaffold. L'hybridation de deux domaines différents d'une même agrafe provoque la formation d'une boucle dans le scaffold ce qui permet de le replier sur lui-même. La fermeture de ces boucles sont des étapes clés. Elles sont souvent considérées comme les étapes responsables de la coopérativité lors du repliement des origami et de la présence d'hystérésis entre le repliement et la dénaturation des origami d'ADN [66, 130]. En effet, une boucle sera d'autant plus difficile à replier qu'elle est longue car la probabilité d'avoir les deux extrémités de la boucle dans un faible volume diminue lorsque la longueur de la boucle augmente. L'hybridation d'une agrafe provoquant la fermeture d'une boucle du scaffold va donc aider l'hybridation d'une agrafe voisine car la boucle à refermer par celle-ci sera alors plus petite.

Dans [66], Arbona *et al.* soulignent l'importance de la topologie de la structure lors du repliement de mini origami : en effet, dans les origami d'ADN, les agrafes sont soit positionnées dans le sens du scaffold à replier avec la jonction à l'intérieur de la boucle (position *int*), soit dans le sens opposé avec la jonction à l'extérieur (position *ext*) (voir figure 4.1). Lors de la conception des origami, on ne tient en général pas compte de la position des agrafes à l'intérieur des boucles de scaffold. Le plus souvent, la moitié des agrafes sont *int* et l'autre moitié *ext*. Pourtant, ces deux types de boucles ont des topologies très différentes et ne se comportent pas de la même façon. La position *int* a l'air nettement plus favorable car similaire à un simple renflement tandis que dans la position *ext*, lorsqu'un seul des domaines de l'agrafe est hybridé, le deuxième domaine est positionné dans la direction opposée au domaine du scaffold auquel celui-ci doit s'hybrider (figure 4.1). On s'attend donc à avoir un coût entropique plus grand pour le repliement des boucles *ext* que pour le repliement des boucles *int*. Arbona *et al.* ont effectivement montré que la topologie *int* est plus favorable que la topologie *ext* mais l'influence de la taille de la boucle n'a pas été explorée car les boucles étaient toujours de taille nulle. Nous allons donc dans cette partie nous intéresser au repliement de boucles composées de 4, 16, 32 et 64 nucléotides, repliées par des agrafes soit *int*, soit *ext*. Nous comparerons également les résultats avec une boucle infinie, composée d'un scaffold coupé en deux.

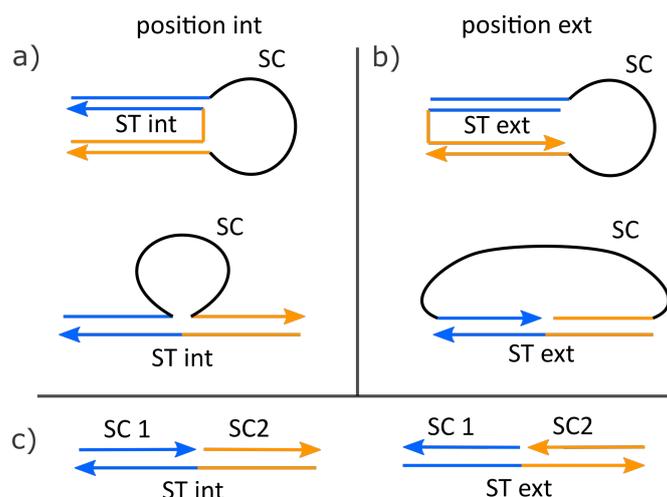


FIGURE 4.1 – Schéma représentant les différentes topologies de boucles étudiées dans cette partie : a) position *int*, b) position *ext*, c) boucles infinies.

4.1.1 Position *int*

Les boucles *int* sont composées d'une agrafe de deux domaines de 16 nucléotides et d'un scaffold composé des domaines complémentaires et d'une boucle de poly (T) d'une longueur de 4, 16, 32, ou 64 nucléotides. Les séquences sont données ci-dessous :

– ST_{int} : GGTGATTTGTCTCACATCTAGCGGTTAATGG

- SC Loop 4 : CCATTAACCGCTAGATTTTTGTGAGACAAATCAACC
- SC Loop 16 : CCATTAACCGCTAGAT - (T)₁₆ - GTGAGACAAATCAACC
- SC Loop 32 : CCATTAACCGCTAGAT - (T)₃₂ - GTGAGACAAATCAACC
- SC Loop 64 : CCATTAACCGCTAGAT - (T)₆₄ - GTGAGACAAATCAACC'
- SC1 : CCATTAACCGCTAGAT
- SC2 : GTGAGACAAATCAACC

La boucle $n = inf$ correspond à l'hybridation de l'agrafe avec les deux domaines du scaffold séparés (figure 4.1 c). Elle est réalisée par les oligonucléotides STint, SC1 et SC2. Les mesures sont effectuées dans un tampon contenant 10 mM de Tris, 1 mM d'EDTA et 12.5 mM de MgCl₂ ajusté à pH = 8.2 avec une concentration en espèce de 8 μM.

En utilisant le modèle du plus proche voisin, il est possible d'estimer les paramètres thermodynamiques de l'hybridation de chaque domaine dans nos conditions de tampon. Ainsi, pour le premier domaine (en orange) : $\Delta H_{NN} = -121.8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ et $\Delta S_{NN} = -341.2 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$; pour le second (en bleu) : $\Delta H_{NN} = -119.3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ et $\Delta S_{NN} = -334.6 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$. Enfin, les paramètres thermodynamiques obtenus par le modèle du plus proche voisin pour le duplex de 32 paires de bases composés de STint et de son complémentaire sont $\Delta H_{NN} = -249.3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ et $\Delta S_{NN} = -688.3 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$. Il est donc possible de simuler les deux cas extrêmes qui sont le repliement des deux duplex indépendants correspondant aux deux domaines de la boucle, et le repliement du duplex de 32 paires de bases composé de l'agrafe STint et de son complémentaire. La figure 4.2 représente les données obtenues par DSC pour les boucles *int* ainsi que les deux simulations des cas extrêmes obtenues avec le modèle du plus proche voisin.

Comme on pouvait s'y attendre, plus la boucle est longue, plus la température de fusion diminue. Cependant si on regarde les valeurs de variations d'enthalpie et d'entropie mesurées pour les différentes boucles, on observe que globalement les valeurs absolues des variations d'enthalpie et d'entropie diminuent lorsque la taille de la boucle augmente (figure 4.3). Cependant, la variation d'entropie diminue moins que la variation d'enthalpie ce qui explique une diminution de la température de fusion.

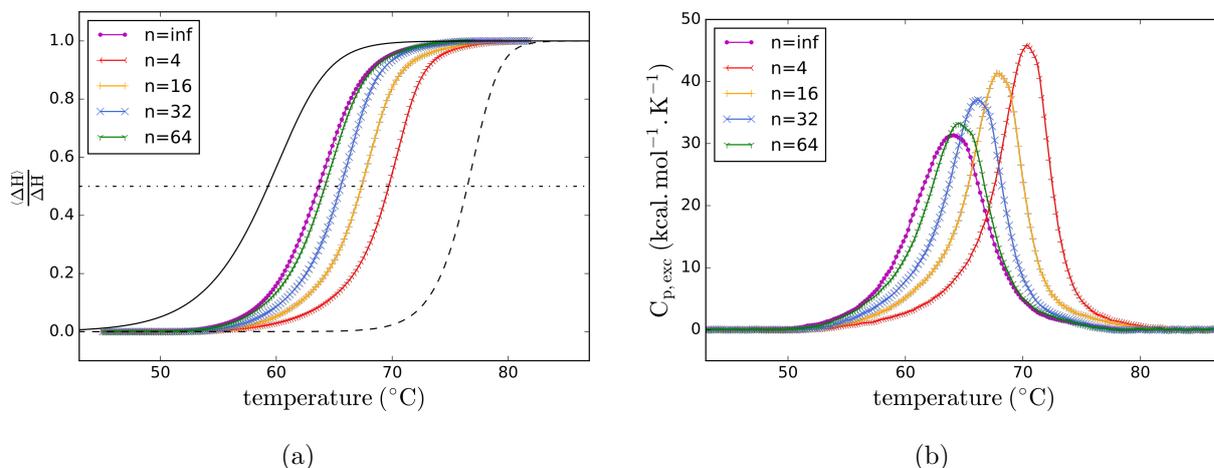


FIGURE 4.2 – Courbes de fusion (a) et chaleurs spécifiques excédentaires (b) lors du repliement des boucles *int*. Les courbes noires en trait plein et pointillé correspondent respectivement aux simulations effectuées à l'aide du modèle du plus proche voisin dans le cas où les domaines sont séparés en deux duplex indépendants et dans le cas où il n'y a qu'un duplex de 32 paires de bases.

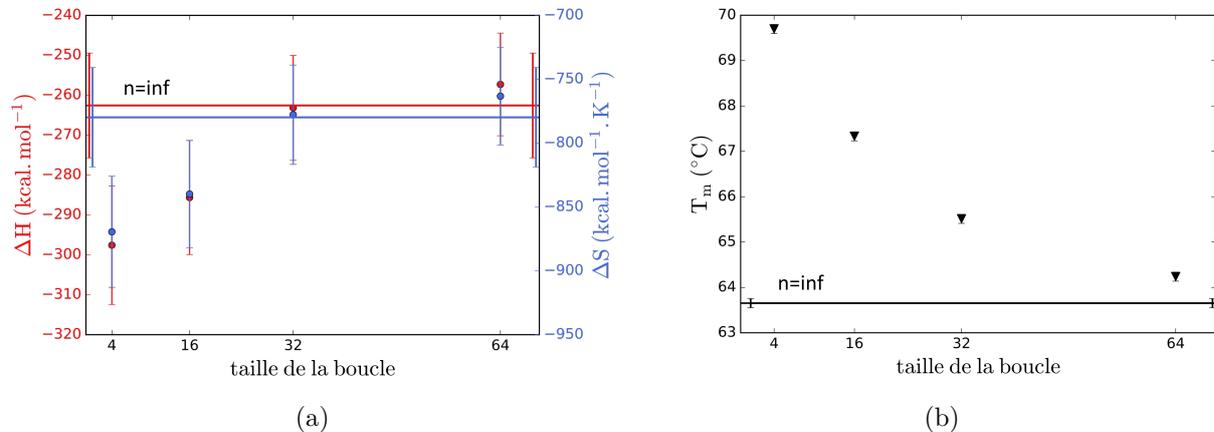


FIGURE 4.3 – a) Variations d'enthalpie et d'entropie en fonction de la longueur des boucles *int* mesurées par DSC. b) Températures de fusion mesurées par DSC pour les différentes boucles *int*. Les lignes correspondent au cas où la boucle est infinie lorsque le scaffold est coupé en deux.

4.1.2 Position *ext*

Pour les boucles de type *ext*, les séquences des boucles sont inchangées, seule l'agrafe a sa séquence modifiée. On utilise ici l'agrafe SText :

– SText : 5' - ATCTAGCGGTTAATGGGGTTGATTTGTCTCAC - 3'

Les résultats obtenus par DSC pour les boucles *ext* sont représentés sur la figure 4.4 et les variations d'enthalpie, d'entropie ainsi que les températures de fusion en fonction de la longueur de la boucle sont sur la figure 4.5.

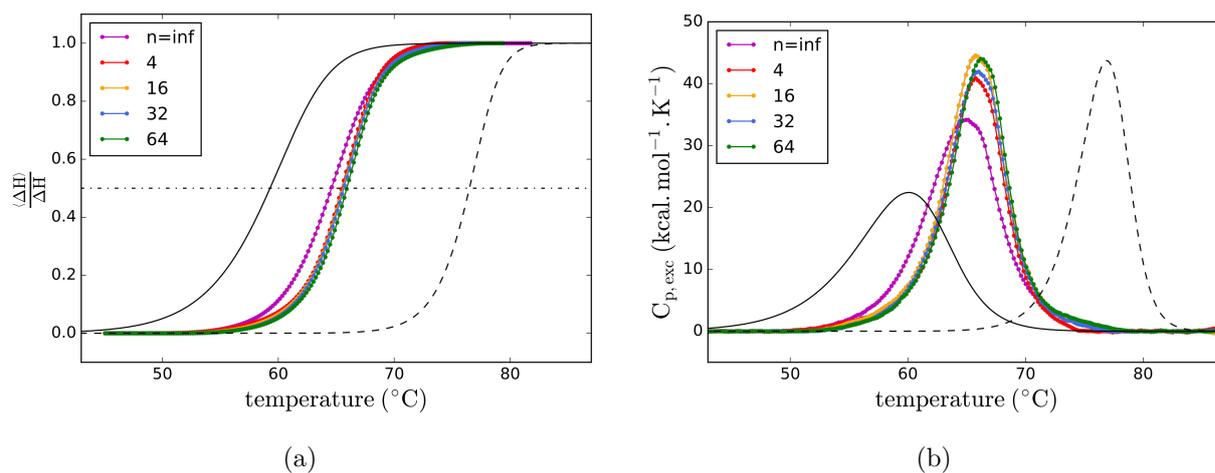


FIGURE 4.4 – Courbes de fusion (a) et chaleurs spécifiques excédentaires (b) lors du repliement des boucles *ext*. Les courbes noires en trait plein et pointillé correspondent respectivement aux simulations effectuées à l'aide du modèle du plus proche voisin dans le cas où les domaines sont séparés en deux duplex indépendants et dans le cas où il n'y a qu'un duplex de 32 paires de bases.

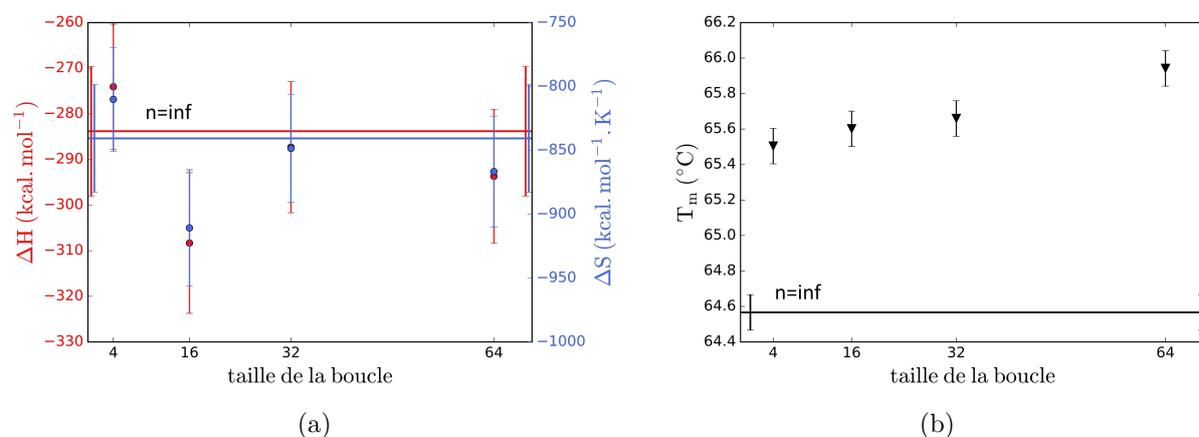


FIGURE 4.5 – a) Variations d'enthalpie et d'entropie en fonction de la longueur des boucles *ext* mesurées par DSC. b) Températures de fusion mesurées par DSC pour les différentes boucles *ext*. Les lignes correspondent au cas où la boucle est infinie.

Les résultats obtenus pour les boucles *ext* sont assez inattendus car le repliement est très peu influencé par la longueur de la boucle. De plus, contrairement aux boucles *int*, les températures de fusion associées au repliement des boucles *ext* augmentent très légèrement avec la longueur de la boucle. Cela peut s'expliquer qualitativement par le fait que dans la configuration *ext*, lorsqu'un domaine est hybridé, les extrémités du second domaine devant s'hybrider sont très éloignées car les simples brins non appariés sont de part et d'autre de la double hélice rigide déjà formée. Dans un premier temps, plus la boucle sera longue, plus la probabilité pour que les brins devant s'hybrider soient proches est grande. Une boucle plus longue réduira les contraintes dues à la fermeture de la boucle sur elle-même (figure 4.6). On s'attend par contre à ce que cette probabilité diminue à nouveau lorsque la boucle devient très longue. Nous n'avons cependant pas pu faire ces mesures sur des boucles de plus de 64 nucléotides et n'avons donc pas observé ce comportement pour les boucles très longues. Par contre, la température de fusion obtenue pour la boucle infinie est effectivement plus faible que celles obtenues pour les boucles *ext* (figure 4.5).

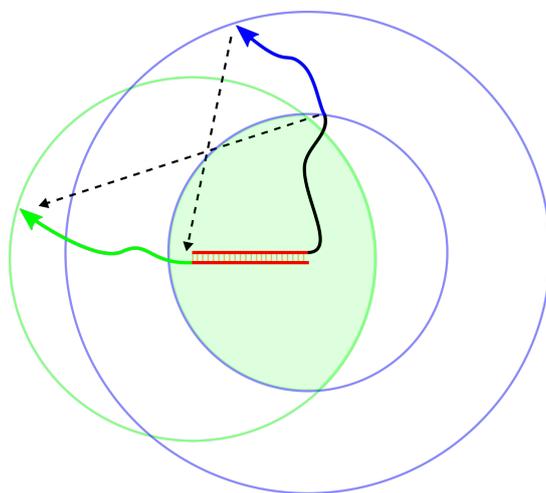


FIGURE 4.6 – Schéma représentant le repliement d'une boucle *ext*. Un des domaine est hybridé (en rouge sur le schéma) et les deux brins composants le domaine restant à s'hybrider sont positionnés de part et d'autre de la double hélice déjà formée (en bleu et en vert). Les extrémités des simples brins peuvent bouger librement à l'intérieur des cercles représentés en bleu et en vert. la zone coloré en vert correspond à la zone commune aux deux cercles dans laquelle les brins peuvent s'hybrider. On remarque que plus les brins sont longs, plus la probabilité pour que les extrémités qui doivent s'hybrider soient proche est grande. La fermeture de la boucle est donc facilitée par la longueur des brins.

4.1.3 Coopérativité

On peut estimer la coopérativité des différentes boucles en calculant la variation d'enthalpie de Van't Hoff pour chaque boucles à partir de la largeur des transitions. Les résultats

sont donnés sur la figure 4.7. On remarque que pour les boucles *int*, plus la boucle est longue, plus $|\Delta H_{VH}|$ diminue. La coopérativité diminue donc avec la longueur de la boucle. C'est un résultat qu'on pouvait déjà observer de manière qualitative sur la figure 4.2 car les transitions sont plus étroites lorsque la boucle est petite. Par contre, on n'observe pas d'influence de la taille de la boucle sur $|\Delta H_{VH}|$ pour les boucles *ext*. Toutes les boucles *ext* ont la même coopérativité quelque soit la longueur de la boucle. Les boucles infinies ont des $|\Delta H_{VH}|$ plus faibles, leur repliement est donc le moins coopératif ce qui est attendu puisque les boucles infinies sont constituées de trois et non deux brins d'ADN.

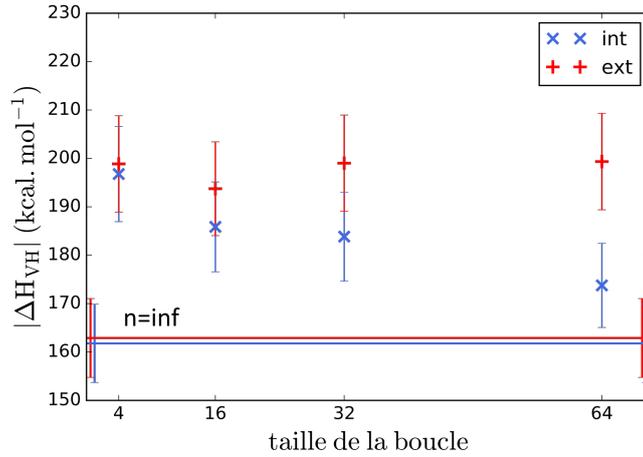


FIGURE 4.7 – Enthalpies de Van't Hoff en fonction de la taille de la boucle calculées à partir de la largeur des transitions associées aux repliement des boucles *int* et *ext*.

4.1.4 Modèle de Jacobson et Stockmayer

L'énergie libre associée à la fermeture d'une boucle a déjà été simulée pour la modélisation du repliement de structures secondaires d'acides nucléiques ou d'origami d'ADN [66, 122, 130]. Ces simulations sont basées sur le modèle de Jacobson et Stockmayer [131] et permettent l'extrapolation des valeurs de l'énergie libre en fonction de la longueur de la boucle selon l'équation suivante :

$$\Delta G_x = \Delta G_n + \gamma \times R \times T \times \ln \left(\frac{n}{x} \right) \quad (4.1)$$

avec ΔG_x l'énergie libre associée au repliement d'une boucle de x nucléotides, et ΔG_n l'énergie libre associée au repliement d'une boucle de n nucléotides. Cette expression suppose que l'enthalpie ne dépend pas de la longueur de la boucle. Le facteur γ prend en compte le fait qu'une longue boucle est plus difficile à refermer qu'une petite boucle car la probabilité pour que les deux extrémités soient proches est plus faible. Plus ce facteur est grand, plus le repliement d'une longue boucle est difficile et donc l'hybridation

d'une agrafe a alors plus d'influence sur le repliement d'une agrafe voisine. Dans [130], Dannenberg *et al.* montrent que ce facteur a une grande influence sur la coopérativité du repliement lors des simulations sur le repliement d'origami d'ADN.

Dans le cas d'une chaîne librement jointe, $\gamma = \frac{3}{2}$ [131], mais ce facteur augmente si on prend en compte les interactions de volumes exclus empêchant différentes zones de la chaîne de se recouvrir. La valeur théorique devient alors $\gamma = 1.75$ [132]. SantaLucia *et al.* [122] utilisent cependant une valeur de γ plus grande égale à 2.44 tirée de mesures cinétiques lors du repliement d'épingle à cheveux d'ADN [133].

L'équation 4.1 décrit l'augmentation de l'énergie libre associée au repliement d'une boucle en fonction de la taille de celle-ci. Lorsque la boucle augmente, l'énergie libre augmente avec le logarithme de la taille de la boucle ce qui cause une diminution de la température de fusion. Le modèle a cependant été réalisé pour la fermeture d'un polymère sur lui même ce qui est différent de ce qui se passe dans les origami d'ADN où la fermeture du scaffold se fait par l'intermédiaire d'un autre brin d'ADN qui est l'agrafe. L'hybridation de certains domaines de l'agrafe rigidifie le scaffold qui devient alors double brin. Il semble donc raisonnable de penser que la position de l'agrafe sur le scaffold va avoir une influence sur son repliement.

Dans nos mesures DSC, nous observons une tendance similaire au modèle de Jacobson et Stockmayer pour les boucles de type *int* (la température de fusion diminue avec la taille de la boucle) mais ce n'est pas le cas pour les boucles de type *ext*. Afin de voir si nos mesures sur le repliement des boucles *int* est en accord avec le modèle de Jacobson et Stockmayer nous avons préféré comparer les températures de fusions des différentes boucles plutôt que les énergies libres. En effet, la mesure de la température de fusion est plus précise en DSC que celles des variations d'enthalpies et d'entropie qui nécessitent de réaliser des intégrales et dépendent donc de l'ajustement de la ligne de base. On suppose ici que la variation d'enthalpie est indépendante de la longueur de la boucle ce qui est supposé dans la relation de Jacobson et Stockmayer. Les variations d'enthalpie que nous observons sont en effet compensées par les mêmes variations d'entropie. Ce sont les variations d'entropie supplémentaires qui sont responsables des variations des températures de fusion. L'équation 4.1 devient donc :

$$T\Delta S_n - T\Delta S_x = \gamma \times R \times T \times \ln\left(\frac{n}{x}\right) \quad (4.2)$$

or on a

$$\Delta H - T_m\Delta S = -R T_m \ln\left(\frac{C}{2}\right) \quad (4.3)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T_m} + R \ln\left(\frac{C}{2}\right) \quad (4.4)$$

L'équation 4.2 devient donc :

$$\frac{\Delta H_n}{T_{m,n}} - \frac{\Delta H_x}{T_{m,x}} = \gamma R \ln\left(\frac{n}{x}\right) \quad (4.5)$$

or $\Delta H_n = \Delta H_x$ donc

$$\frac{1}{T_{m,n}} - \frac{1}{T_{m,x}} = \frac{\gamma R}{\Delta H} \ln\left(\frac{n}{x}\right) \quad (4.6)$$

En prenant $x = 4$ et en traçant $\frac{1}{T_{m,n}}$ en fonction de $\ln\left(\frac{n}{4}\right)$ avec n la taille de la boucle, on doit donc obtenir une droite ayant comme pente $\frac{\gamma R}{\Delta H}$. La figure 4.8 donne $\frac{1}{T_{m,n}}$ en fonction de $\ln\left(\frac{n}{4}\right)$ ainsi qu'une régression linéaire de la droite. En prenant comme ΔH la valeur moyenne des ΔH obtenus pour toutes les boucles ($\Delta H_{moy} = 273 \text{ kcal.mol}^{-1}$), on obtient $\gamma = 2.5 \pm 0.15$. Cette valeur est très proche de celle utilisée par SantaLucia *et al.* dans [122], c'est également une des valeurs utilisées par Dannenberg *et al.* dans [130].

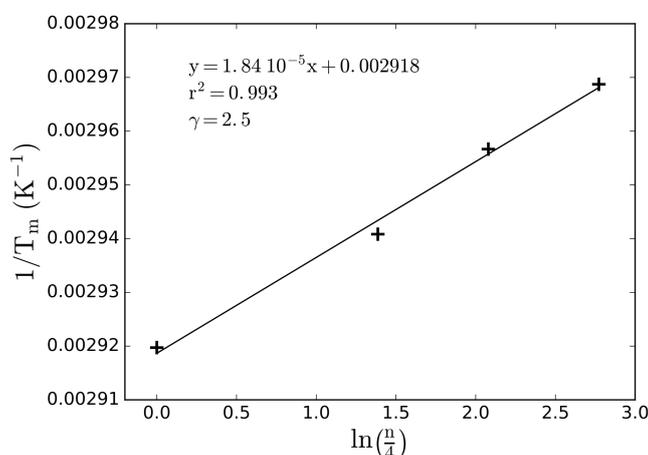


FIGURE 4.8 – $\frac{1}{T_m}$ en fonction de $\ln\left(\frac{n}{4}\right)$ pour différentes longueurs de boucles *int* avec la régression linéaire de la droite.

4.1.5 Conclusion

On a pu voir grâce à nos mesures sur les boucles d'ADN que l'orientation de l'agrafe à l'intérieur de la boucle a une importance primordiale sur le repliement de celle-ci. Les boucles *int* suivent le modèle de Jacobson et Stockmayer mais les boucles *ext* ont un comportement différent. Pour des boucles de moins de 64 nucléotides, la température de fusion dépend très peu de la taille de la boucle et augmente même légèrement lorsque la taille de la boucle augmente. La figure 4.9 résume les températures de fusions obtenues pour les deux types de boucles. On observe que les températures de fusion se croisent pour des boucles de 32 nucléotides. Les boucles *ext* de plus de 32 nucléotides sont ensuite plus stables que les boucles *int*. Il est important de noter que puisque les agrafes utilisées dans

les origami sont en général découpées en domaines de seize ou de deux fois huit nucléotides, les agrafes qui ne sont pas situées aux bords de l'origami devront systématiquement refermer des boucles d'un minimum de 32 nucléotides. Il semblerait donc que dans le cas général, la fermeture de boucles de type *ext* soit favorable à la fermeture de boucles de types *int* dans les origami d'ADN.

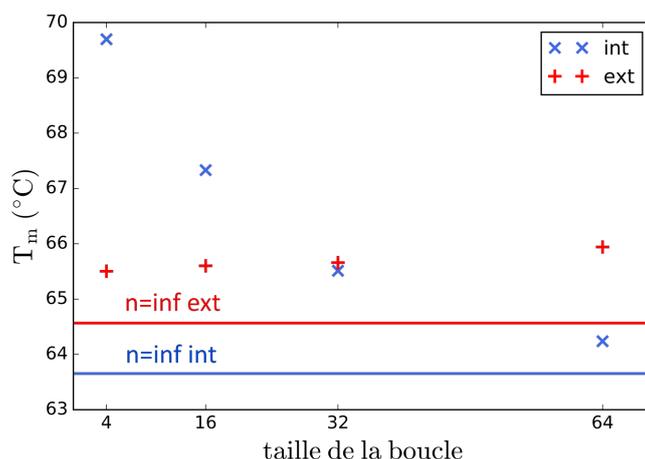


FIGURE 4.9 – Comparaison des température de fusion des boucles *int* et *ext*. La ligne noire correspond à la boucle infinie.

En raison des différences dans le repliement des deux types de boucles, il va être nécessaire de prendre en compte l'orientation des agrafes afin de simuler correctement le repliement des origami d'ADN. Les boucles d'ADN nous ont permis de voir l'influence de la longueur des boucles et de l'orientation des agrafes au sein des boucles mais ces structures ne nous permettent pas d'étudier la coopérativité entre deux agrafes et l'influence de la formation de jonctions Holliday dans un origami. Nous allons pour cela étudier d'autres structures modèles qui sont les origami à deux agrafes.

4.2 Repliement d'origami à deux agrafes

4.2.1 Réduction de la boucle et formation de jonction Holliday

Afin d'étudier l'influence de l'hybridation d'une agrafe sur l'hybridation d'une agrafe voisine, nous avons effectué des mesures DSC sur des structures modèles qui sont les origami à deux agrafes. Les systèmes que nous étudions ici sont très proches de ceux qui avaient été étudiés par Arbona *et al.* dans [66]. La différence est que dans une partie des origami, quatre nucléotides sont laissés non appariés dans le scaffold afin de séparer les effets coopératifs causés par la réduction de la taille de la boucle due à l'hybridation

d'une agrafe voisine de la formation de la jonction Holliday. La figure 4.10 représente les différents origami qui ont été étudiés par DSC. Les origami A, B et C ont quatre nucléotides non appariés entre chaque domaine alors que dans les origami D, E et F, une jonction Holliday est présente entre les deux agrafes. Dans les origami A et D, seules les agrafes ayant l'orientation *int* sont présentes (les agrafes ont la même orientation que le scaffold) alors que dans les origami B et E, les agrafes en positions *ext* sont présentes (les agrafes ont une orientation opposée à celle du scaffold). Il faut faire attention à la dénomination *int* et *ext* car dans ces origami, les agrafes *int* sont celles qui rapprochent les extrémités les plus externes du scaffold. Les séquences sont indiquées ci-dessous :

- 2 agrafes SC1 : CCATTAACCGCTAGAT - TTTT - TGCTCCCGAAGTTGCT - GGCTATATCAGTGCGT - TTTT - GTGAGACAAATCAACC
- 2 agrafes SC2 : CCATTAACCGCTAGAT - TGCTCCCGAAGTTGCT - GGCTATATCAGTGCGT - GTGAGACAAATCAACC
- 2 agrafes ST1 : GGTTGATTTGTCTCAC - ATCTAGCGGTTAATGG
- 2 agrafes ST2 : AGCAACTTCGGGAGCA - ACGCACTGATATAGCC

Les mesures en DSC ont été effectuées dans un tampon contenant 10 mM de Tris, 1 mM d'EDTA et 12.5 mM de MgCl₂ ajusté à pH = 8.2 avec une concentration en espèce de 4 μM.

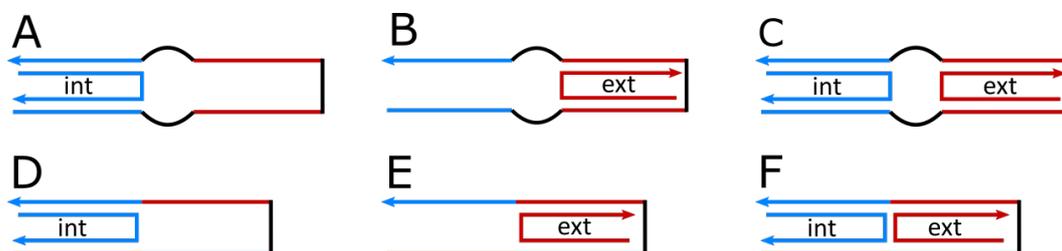


FIGURE 4.10 – Schéma représentant les origami à deux agrafes. Dans les origami A, B et C, quatre T non appariés séparent les domaines des deux agrafes alors que ceux-ci sont côte à côte dans les origami D, E et F. Dans les origami A et D, seule l'agrafe *int* est présente, dans les origami B et E, seule l'agrafe *ext* est présente et dans les origami C et F, les deux agrafes sont présentes.

Le fait d'avoir un origami avec des nucléotides non appariés et un origami sans permet de découpler les effets de la réduction de la boucle par l'agrafe voisine et la formation de la jonction Holliday. En effet, dans un origami à deux agrafes, la coopérativité peut venir de la réduction de la longueur de la boucle : par exemple, si l'agrafe *int* s'hybride, cela va causer la fermeture d'une boucle dans le scaffold et favoriser l'hybridation de l'agrafe *ext*. C'est ce qui a été observé dans [66]. Mais le fait d'avoir deux agrafes voisines ajoute également des interactions d'empilement coaxial entre les deux doubles hélices formées par ces agrafes ainsi que des contraintes liées à la jonction Holliday. Dans l'origami C,

	A	B	C	D	E	F
ΔH (kcal.mol ⁻¹)	271 ±14	270 ±14	538 ±27	280 ±14	278 ±14	606 ±30
ΔS (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	801 ±40	788 ±39	1580 ±79	826 ±41	813 ±41	1760 ±88

TABLE 4.1 – Variations d'enthalpie et d'entropie des origami à deux agrafes calculées à partir des courbes DSC.

l'effet coopératif dû à la réduction de la boucle par une agrafe voisine est toujours présent mais il n'y a pas de jonction Holliday ni d'interaction d'empilement coaxial entre les deux agrafes. La figure 4.11 donne les chaleurs spécifiques excédentaires obtenues pour ces six origami avec en orange la somme des chaleurs spécifiques excédentaires obtenues pour les deux agrafes indépendantes.

En ce qui concerne les origami à une seule agrafe (A, B, D et E), les origami avec l'agrafe *ext* (B et E) sont plus stables que les origami ayant une agrafe *int* (A et D). Cela s'explique par des différences dans le pourcentage de GC dans les deux agrafes. Il y a 53 % de GC dans l'agrafe *ext* et 44 % dans l'agrafe *int*. Les origami B et E sont très similaires et les résultats obtenus en DSC sont donc très proches. L'origami D est plus stable que l'origami A car la boucle de scaffold à refermer est plus courte ce qui est conforme aux résultats obtenus précédemment pour les boucles *int*.

L'origami C est très légèrement plus stable et plus coopératif que la somme des origami A et B ce qui confirme le fait que le repliement de l'agrafe *ext* favorise le repliement de l'agrafe *int*. Cependant, les augmentations de la coopérativité et de la stabilité du repliement sont très limitées comparé à l'effet dû à la formation d'une jonction Holliday. En effet, L'origami F est nettement plus stable et plus coopératif que l'origami C. La jonction Holliday augmente donc grandement la coopérativité (transition beaucoup plus fine) et la stabilité (température de fusion plus grande) de l'origami à deux agrafes.

Le tableau 4.1 fournit les variations d'enthalpie et d'entropie des six origami. Les variations d'enthalpie et d'entropie de l'origami C sont égales à la somme des variations d'enthalpie et d'entropie des origami A et B dans lesquels une seule des deux agrafes est présente. L'effet coopératif dû à la réduction de la boucle n'est donc pas lié à une augmentation de la variation d'enthalpie ou d'entropie. Par contre, les variations d'enthalpie et d'entropie lors de la formation de l'origami F sont bien plus importantes. La formation de la jonction Holliday cause une augmentation de la variation d'enthalpie de 48 kcal.mol⁻¹ et une augmentation de la variation d'entropie de 121 cal.mol⁻¹.K⁻¹. L'augmentation de la variation d'enthalpie est équivalent à l'hybridation de six paires de bases. Il y a donc un gain de variation d'enthalpie très important qui peut être dû aux interactions d'empilement coaxial ou à la présence de la jonction Holliday.

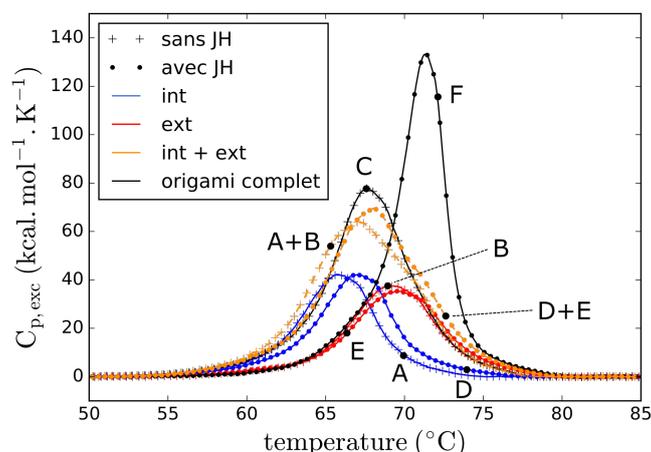


FIGURE 4.11 – Chaleurs spécifiques excédentaires obtenues lors du repliement des origami à deux agrafes par DSC. les courbes avec des points représentent les origami avec des jonctions Holliday (JH) et les courbes avec des croix représentent les origami sans jonctions Holliday. En bleu, seule l'agrafes int est présente, en rouge seule l'agrafe ext est présente, en noir les deux agrafes sont présentes. Les courbes orange représentent la somme des données obtenues pour les origami composés uniquement des agrafes *int* (A et D) et *ext* (B et E).

4.2.2 Orientation des agrafes, interaction d'empilement et jonction Holliday

Pour aller plus loin sur les effets coopératifs causés par les réductions de boucles, les interactions d'empilement ou la formation de jonction Holliday ; nous avons conçu d'autres origami à deux agrafes permettant de mieux découpler les différents effets. Ces origami sont représentés sur la figure 4.12. Ils sont proches de ceux décrit dans le paragraphe précédent. Il n'y a cependant plus que deux T non appariés entre les deux agrafes et quatre T non appariés ont été placés dans la boucle. De cette manière, l'agrafe placée à l'intérieur de la boucle peut être positionnée soit *int* soit *ext* ce qui n'était pas possible auparavant en raison des contraintes dues à l'hélicité de la double hélice d'ADN. Nous pouvons donc former les six origami présentés dans la figure 4.12.

Les séquences de ces origami sont indiquées ci-dessous :

- 2 agrafes SC3 : 5'- CCATCAGACGCTAGAT - TT - AGGAACTTCGGTAGCA - TTTT - GACCTGAAGTATGCGT - TT - GTCCGTGACAAACAGT -3'
- 2 agrafes SC4 : 5'- CCATCAGACGCTAGAT - AGGAACTTCGGTAGCA - TTTT - GACCTGAAGTATGCGT - GTCCGTGACAAACAGT -3'
- 2 agrafes ST3 int : 5'- ACTGTTTGTTCACGGACATCTAGCGTCTGATGG -3'
- 2 agrafes ST3 ext : 5'- ATCTAGCGTCTGATGGACTGTTTGTTCACGGAC -3'

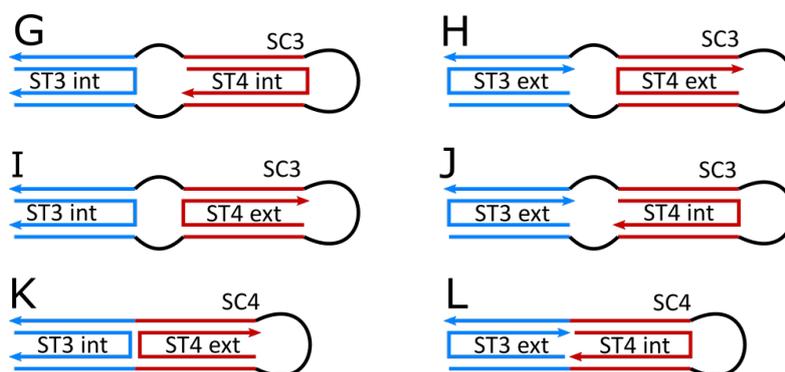


FIGURE 4.12 – Représentation schématique des origami à deux agrafes G, H, I, J, K et L.

- 2 agrafes ST4 int : 5'- **ACGCATACTTCAGGTC** - **TGCTACCGAAGTTCCT** -3'
- 2 agrafes ST4 ext : 5'- **TGCTACCGAAGTTCCT** - **ACGCATACTTCAGGTC** -3'

La figure 4.13 donne les chaleurs spécifiques obtenues pour chaque origami ainsi que dans chaque cas, les chaleurs spécifiques obtenues pour les deux agrafes indépendamment et la somme de ces deux valeurs. La comparaison des six origami est donnée dans la figure 4.14. On observe que pour les origami G, H, I et J, le repliement est similaire à la somme du repliement des deux agrafes indépendantes. Le repliement est légèrement plus coopératif surtout pour l'origami G dans lequel les deux agrafes sont *int* et l'origami I dans lequel l'agrafe interne est *ext* et l'agrafe externe est *int*. Le repliement des origami K et L sont par contre très différents du repliement des deux agrafes indépendantes avec une variation d'enthalpie correspondant à l'aire sous la courbe beaucoup plus grande et dans le cas de l'origami K un repliement plus stable et plus coopératif.

Si on compare uniquement les origami G, H, I et J, on observe que le repliement des origami G et J sont similaires. Ils sont plus stables que les origami H et I et leur repliement est moins coopératif. Dans les origami G et J, l'agrafe ST4 qui replie la boucle la plus courte du scaffold est en effet *int* et nous avons vu dans la partie 4.1 que le repliement de boucles *ext* courtes est très défavorable ce qui explique pourquoi les origami G et J sont plus stables que les origami H et I. Le repliement de ces quatre origami est en fait très proche de la somme du repliement des deux agrafes, leur stabilité et coopérativité dépend donc de la stabilité et de la coopérativité de l'hybridation de chaque agrafe. La réduction de la boucle a donc beaucoup moins d'influence sur la coopérativité du repliement d'un origami à deux agrafes que les interactions d'empilement et la formation d'une jonction Holliday.

Le tableau 4.2 donne pour chaque origami les variations d'enthalpie mesurées par DSC ainsi que la somme des variations d'enthalpie obtenues pour l'hybridation de chacune des agrafes.

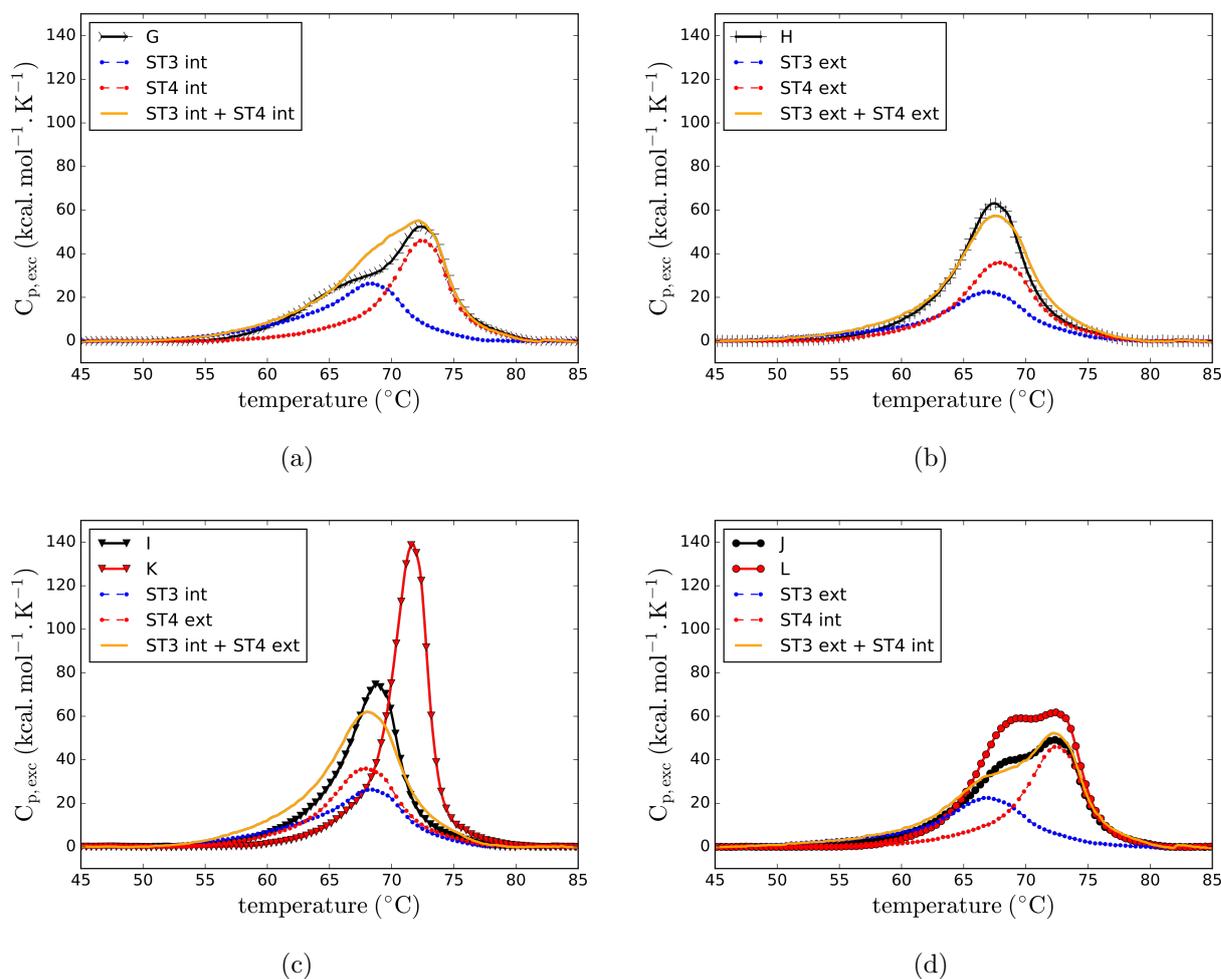


FIGURE 4.13 – Chaleurs spécifiques obtenues par DSC pour les origami G (a), H (b), I et K (c), J et L (d). Les données des origami sont en noir, les agrafes ST 3 en bleu, les agrafes ST4 en rouge et la somme des chaleurs spécifique obtenue pour les deux agrafes est en orange.

Contrairement aux résultats précédents obtenus sur les origami A, B, C, D, E et F ; la variation d'enthalpie obtenue lors du repliement des origami G, H, I et J est systématiquement inférieure à la somme des variations d'enthalpie associées aux repliement des deux agrafes. Cela peut être dû au fait que seulement deux T séparent les deux agrafes et non quatre ce qui peut provoquer des contraintes dues au non respect de l'hélicité du double brin d'ADN. Lorsque quatre nucléotides non appariés sont présents, les deux doubles hélices peuvent plus facilement pivoter l'une par rapport à l'autre ce qui diminue les contraintes. Dans le cas où seulement deux nucléotides sont présents, il est possible que certains nucléotides situés sur les extrémités des agrafes ne soient pas hybridés ce qui expliquerait la diminution du ΔH . Ces contraintes ne sont pas présentes dans les origami K et L dans lesquels le nombre de paires de bases par double hélice est bien respecté.

	G	H	I	J	K	L
$\Delta H_{ST3+ST4}$ (kcal.mol ⁻¹)	556	518	537	537	537	537
$\Delta S_{ST3+ST4}$ (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	1633	1527	1589	1571	1589	1571
ΔH_{DSC} (kcal.mol ⁻¹)	492	476	478	486	600	602
ΔS_{DSC} (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	1435	1401	1401	1417	1743	1756

TABLE 4.2 – Variations d'enthalpie et d'entropie obtenues pour les origami à deux agrafes G, H, I, J, K et L.

En ce qui concerne l'origami K, on retrouve le résultat précédent qui est une augmentation importante des variations d'enthalpie et d'entropie par rapport à l'origami I ou à la somme des deux agrafes. Sur l'origami L, qui n'avait pas été mesuré précédemment, on retrouve la même variation d'enthalpie que pour l'origami K. Dans l'origami L, les interactions d'empilement sont toujours présentes car les extrémités des deux agrafes sont placées côte à côte de manière coaxiale, mais il n'y a plus de jonction Holliday. L'apport en enthalpie est donc uniquement causé par les interactions d'empilement présentes entre les deux agrafes. On observe cependant une nette différence entre le repliement des origami K et L. En effet, le repliement de l'origami K est nettement plus stable et plus coopératif alors que dans le repliement de l'origami L, seules les variations d'enthalpie et d'entropie sont modifiées. La stabilité et la coopérativité restent les mêmes. Cela est bien visible dans la figure 4.14 b) dans laquelle les courbes ont été divisées par les variations d'enthalpie associées afin de les normaliser. Les courbes J et L sont alors quasiment confondues. La transition associée au repliement de l'origami K est cependant beaucoup plus fine que celle de l'origami I. La formation d'une jonction Holliday a donc une grande influence sur la coopérativité du repliement.

Le gain en enthalpie apporté par les interactions d'empilement est d'environ 60 kcal.mol⁻¹ ce qui est du même ordre de grandeur que celui obtenu pour l'origami F et est équivalent à l'hybridation de sept paires de bases. On peut noter que lors de l'hybridation de l'origami L, les variations d'enthalpie et d'entropie augmentent de 12 % par rapport aux valeurs obtenues par la somme des deux agrafes indépendantes, alors que lors du repliement de l'origami K, la variation d'enthalpie augmente de 12 %, mais la variation d'entropie n'augmente que de 10 %. Cela explique l'augmentation de la température de fusion du repliement de l'origami K. Les interactions d'empilements provoquent donc une augmentation des variations d'enthalpie et d'entropie mais comme celles-ci se compensent, la stabilité de l'origami n'est pas modifiée. Par contre, lorsqu'une jonction Holliday est formée, l'augmentation de la variation d'enthalpie n'est pas totalement compensée par

l'augmentation de la variation d'entropie ce qui cause une augmentation de la température de fusion. Les interactions d'empilement ont déjà été mesurées dans la littérature mais uniquement sur des doubles hélices présentant une coupure sur un brin [134]. Les interactions d'empilement mesurées ne concernent donc qu'un brin de la double hélice. Les variations d'enthalpies ainsi mesurées vont de -8 kcal/mol à -20 kcal/mol suivant les nucléotides présents de part et d'autre du nick.

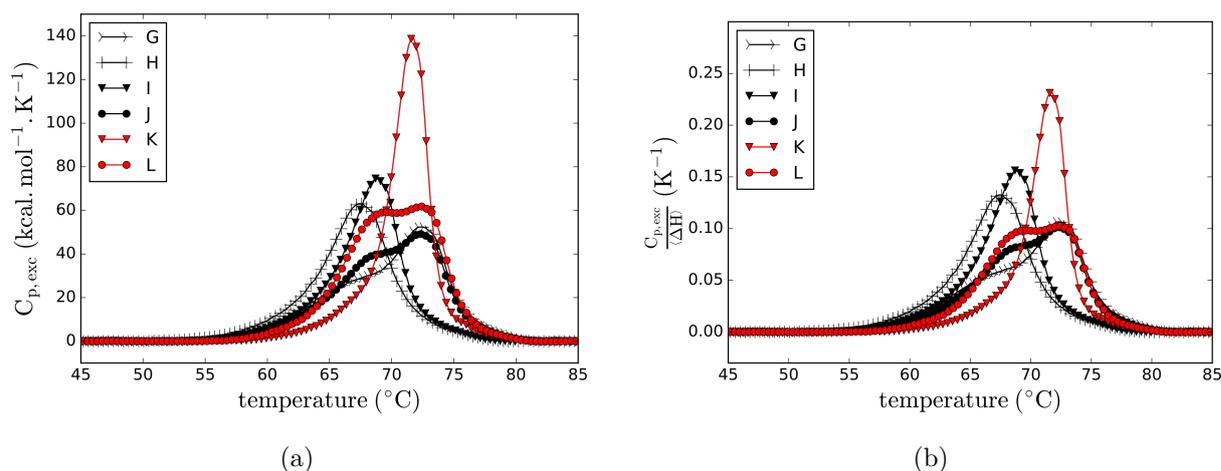


FIGURE 4.14 – (a) Chaleurs spécifiques obtenues par DSC pour les origami G, H, I, J, K et L. (b) Chaleurs spécifiques divisées par la variation d'enthalpie associée à la transformation.

4.2.3 Conclusion sur les origami à deux agrafes

Avec l'étude des origami à deux agrafes, nous avons vu que la réduction de la taille d'une boucle par une agrafe n'a que très peu d'influence sur l'hybridation d'une agrafe voisine. Lorsque deux agrafes sont accolées que ce soit par leurs extrémités (origami L) ou par leur jonction (origami K), l'apport enthalpique et entropique dû aux interactions d'empilement n'est pas négligeable puisqu'il est équivalent à l'hybridation d'environ sept paires de bases. Cependant, si les agrafes sont empilées par leurs extrémités 3' et 5', le gain en enthalpie est compensé par le gain en entropie, il n'y a pas de modification dans la stabilité de la structure. Par contre, si les agrafes sont empilées par leur jonction en formant une jonction holliday, l'élévation de la variation d'entropie ne compense pas totalement l'élévation de la variation d'entropie. La température de fusion est alors plus grande ce qui rend l'origami plus stable. La présence d'une jonction Holliday dans l'origami à deux agrafes augmente grandement la coopérativité du repliement, la transition a alors lieu dans une gamme de température beaucoup plus étroite. Les jonctions Holliday semblent donc être des éléments à favoriser dans les structures d'ADN.

4.3 Repliement des origami d'ADN

L'étude de petites structures modèles comme les boucles d'ADN et les origami à deux agrafes nous ont permis d'observer comment se replie certaines briques de bases des origami d'ADN. Nous avons ainsi pu discuter de l'influence de l'orientation des agrafes et de la formation des jonctions Holliday sur le repliement de petits origami. Nous voulons maintenant étudier le repliement des origami de manière plus globale. Les objectifs sont de déterminer si certaines agrafes ont un rôle clé dans le repliement de l'origami comme c'est le cas pour les tétraèdres et comment la stratégie utilisée pour placer les agrafes influence le repliement des origami.

Pour cela, nous avons observé le repliement de plusieurs origami d'ADN. Nous allons dans un premier temps observer la coopérativité du repliement d'origami à deux et à trois dimensions, puis nous comparerons l'importance de différents blocs d'agrafes sur le repliement d'un origami 2D rectangulaire. Enfin, nous comparerons deux stratégies permettant d'obtenir le même origami mais avec des agrafes positionnées différemment.

4.3.1 Coopérativité dans le repliement d'origami d'ADN

Origami 2D et 3D de tilibit

Les premiers origami que nous avons étudiés sont des origami 2D et 3D acheté chez tilibit (<https://www.tilibit.com/>). tilibit nous a fourni le scaffold M13mp18 de 7149 nucléotides ainsi que deux mélanges d'agrafes permettant d'assembler un origami 2D rectangulaire (PF6) et un origami 3D très asymétrique (PF5). Les deux structures sont représentées sur la figure 4.15 et les schémas caDNAno des deux origami sont sur l'annexe A.

Les origami PF6 ont été assemblés avec une concentration en scaffold de 17 nM et 8 nM et des concentrations en agrafes trois ou dix fois supérieure (51 nM, 80 nM ou 170 nM). Les origami PF5 ont eux été assemblés avec une concentration en scaffold de 20 nM et un excès en agrafe de 10 (200 nM). Les mesures ont été effectuées dans un tampon contenant 10 mM de Tris, 1 mM d'EDTA et 20 mM de $MgCl_2$ ajusté à $pH = 8.2$.

Avant chaque mesure DSC les mélanges de scaffold et d'agrafes ont été chauffés à $95^\circ C$ puis refroidis de $70^\circ C$ à $50^\circ C$ à $1^\circ C/h$ afin de minimiser l'énergie du système et de former la structure la plus stable. Des observation AFM ont ensuite été effectuées sur ces origami pour s'assurer que ceux-ci étaient bien formés. Les observations AFM ont été réalisées sur un AFM NSIV-VEECO-D3100 à l'air en mode *tapping*. Avant les observations AFM, les origami sont incubés pendant 5 min sur une plaque de mica fraîchement clivée puis ils sont rincés avec le tampon et séchés à l'azote. Les ions Mg^{2+} présents dans le tampon permettent aux origami de se fixer sur la surface du mica. Les images obtenues pour les origami PF6 et PF5 sont données sur la figure 4.16. Les origami PF5 sont beaucoup plus

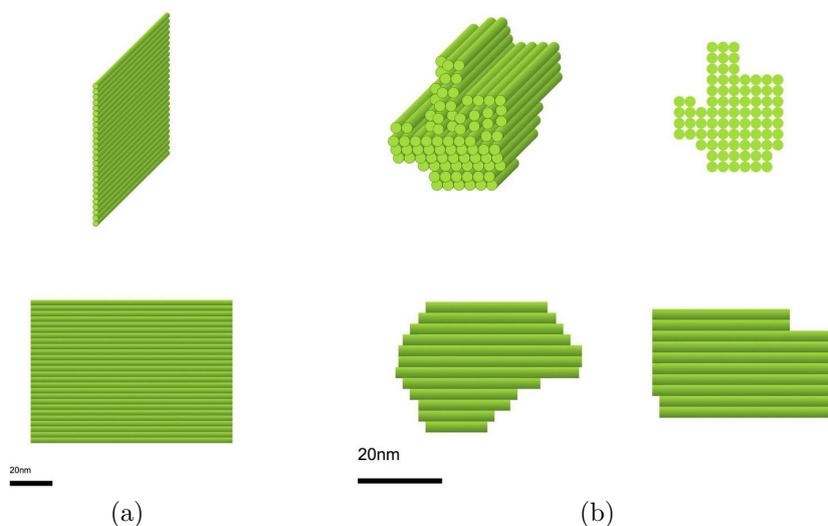


FIGURE 4.15 – Représentation schématique des origami PF6 (a) et PF5 (b) fournis par tilibit.

difficile à observer car plus petits que les origami PF6. Les PF5 ont en effet une taille d'environ 20 nm x 30 nm x 40 nm alors que les origami PF6 sont des rectangles d'environ 80 nM x 100 nM. Les images AFM permettent cependant de s'assurer que les origami PF5 et PF6 ont bien été formés.

Non réversibilité lors de l'assemblage d'origami 2D ou 3D

Les chaleurs spécifiques obtenues lors de scans successifs par DSC sont données dans la figure 4.17 avec en bleu le repliement des origami pendant les descentes en température et en rouge les dénaturations lors des montées en température.

La grande différence entre les origami d'ADN et les petites structures assemblées à base d'ADN synthétique est la présence d'une hystérésis entre la montée et la descente en température. Pour les petites structures d'ADN, les courbes obtenues pour le repliement et la dénaturation des structures étaient quasiment confondues. Ce n'est plus le cas pour les origami d'ADN ce qui indique que le repliement des origami d'ADN est un processus hors équilibre. Le chemin emprunté lors du repliement est différent de celui emprunté lors de la dénaturation des structures.

De plus, les scans successifs ne sont pas superposés, il y a une perte de signal entre les différents scans indiquant une diminution de la quantité d'origami se repliant à chaque cycle. Le repliement des origami n'est donc pas parfaitement réversible. Cette perte dépend fortement de la structure et des concentrations en scaffold et en agrafes. Le tableau 4.3 donne la diminution de la variation d'enthalpie mesurée entre les deux premières montées

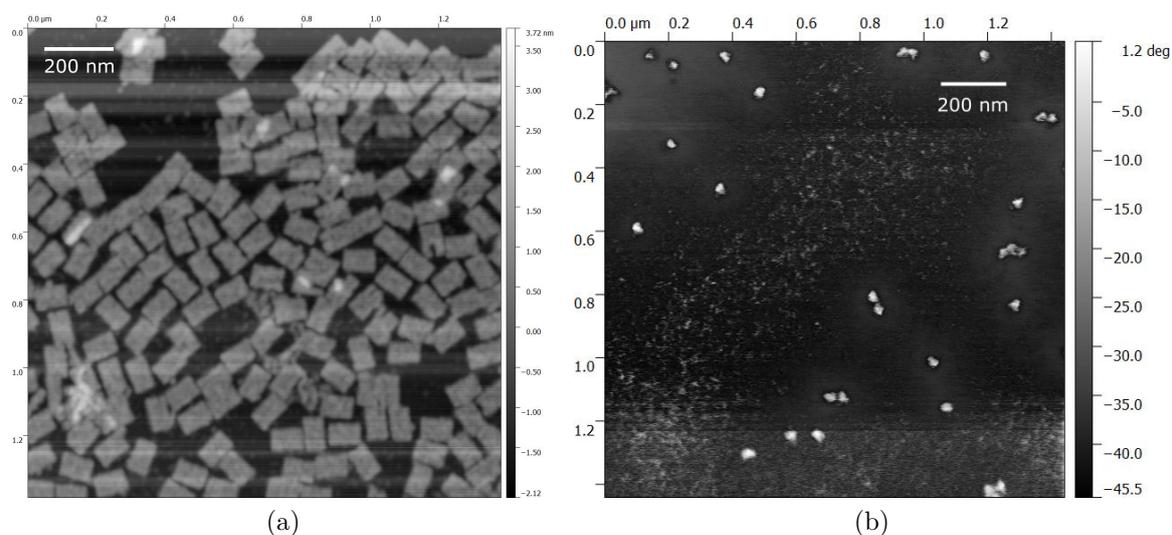


FIGURE 4.16 – Images AFM des origami PF6 (a) et PF5 (b).

en température. Il n'y a quasiment pas de perte pour l'origami PF6 à 17 nM avec un excès en agrafe de 10, mais celle-ci monte à 16% et 44% lorsque on diminue les concentrations en scaffold et en agrafe. Cette non-réversibilité devient très grande pour les origami 3D sur lesquels on ne distingue quasiment pas la transition associée au premier repliement dans le calorimètre. Cela peut être dû à la vitesse de rampe car les origami 3D nécessitent des temps de recuit beaucoup plus long que les origami 2D [34]. Il n'est cependant pas possible d'effectuer les mesures DSC à des vitesses trop lente car la sensibilité des mesures dépendent directement de la vitesse de la rampe de température. Les mesures en DSC ne sont donc pas effectuées à des vitesses de rampe inférieures à 1°C/min. la figure 4.17 (d) donne les mesures obtenues par DSC lors d'une succession de scans sur l'origami 3D PF5. Les trois premières montées et descentes ont été effectuées à 1°C/min mais la descente n°4 a été effectuée avec une vitesse de rampe beaucoup plus lente de 1°C/h. Cependant on n'observe pas de réelle augmentation du signal lors de la montée n°5 correspondant à la dénaturation des origami formés pendant la descente n°4. Les origami 3D ne se reforment donc pas à l'intérieur du calorimètre même après un recuit très lent.

Les pertes observées dépendent fortement des concentrations en scaffold et en agrafe et les concentrations utilisées pour les origami sont environ 100 fois plus faibles que celles qui avaient été utilisées auparavant pour des structures plus petites sur lesquelles aucune irréversibilité n'était observée. Une hypothèse quant à l'origine de la non-réversibilité du repliement des origami est donc qu'une partie de l'ADN vient se coller aux parois du calorimètre après la dénaturation et ne peut ensuite plus participer au repliement des structures. Plus la concentration en ADN est grande, moins ce phénomène a d'impact sur le repliement des structures augmentant donc la réversibilité du processus. Cela n'explique par contre pas pourquoi les origami 3D sont moins réversibles que les origami 2D. Nous avons mesuré une baisse de la densité optique en mesurant l'absorbance à 260 nm avant et après les mesures DSC, mais il est difficile de calculer la quantité de matériel car nous

	PF6 17 nM X10	PF6 17 nM X3	PF6 8 nM X10	PF5 20 nM X10
perte de ΔH entre les deux premières montées	3 %	16 %	44 %	65 %

TABLE 4.3 – Pertes de variations d'enthalpie entre les deux premières montées en température.

ne savons pas précisément quelle est la proportion de simples brins et de doubles brins dans le mélange. Dans la suite de cette partie, nous nous concentrerons sur le repliement des origami PF6 à 17 nM qui sont les origami pour lesquels on observe le moins de perte.

Coopérativité de l'assemblage des origami pF6

La figure 4.18 représente les chaleurs spécifiques excédentaires obtenues par DSC pour les origami PF6 à 17 nM et avec un excès en agrafe de 3 ou de 10. On observe que la dénaturation des origami est beaucoup plus coopérative que leur repliement car la transition obtenue lors de la montée en température est bien plus étroite que celle correspondant à la descente. De plus, on remarque que l'excès en agrafe n'a que peu d'influence sur la dénaturation des origami mais beaucoup sur le repliement. Lorsqu'on diminue la concentration en agrafe, la température de fusion reste similaire mais la température du repliement est plus basse ce qui augmente l'hystérésis. Le repliement est également moins coopératif lorsque l'excès en agrafe est diminué.

Pour estimer la coopérativité du repliement global des origami, nous allons utiliser le même modèle que celui que nous avons utilisé sur les tétraèdres dans la partie 3.2.3. Nous supposons que le repliement est une somme de n transitions identiques de paramètres thermodynamique ΔH_{moy} et ΔS_{moy} . Ce modèle n'est qu'une approximation du repliement et permet d'estimer en moyenne la coopérativité des différentes transitions intermédiaires présentes lors du repliement. La chaleur spécifique excédentaire peut donc s'exprimer comme :

$$C_{p,moy} = n \times C_p(\Delta H_{moy}, \Delta S_{moy}) \quad (4.7)$$

L'ajustement de ce modèle sur les données DSC avec comme paramètres n , ΔH_{moy} et ΔS_{moy} est représenté sur la figure 4.19 et les paramètres d'ajustements sont indiqués dans le tableau 4.4. Les ΔH_{moy} ont été comparés à un nombre de paires de bases équivalent s'hybridant de manière coopérative $n_{bp\ coop}$. Selon le modèle du plus proche voisin, la variation d'enthalpie est égale à :

$$\Delta H_{NN} = \Delta H_{init} + \Delta H_{ATterminal} + \Delta H_{sym} + \sum \Delta H_{stack}$$

avec ΔH_{stack} les valeurs tabulées pour chaque doublet par le modèle du plus proche voisin, $\Delta H_{ATterminal}$ un terme dû aux terminaisons AT, ΔH_{init} un terme d'initiation et ΔH_{sym} un terme de symétrie dans le cas où le duplex est auto-complémentaire. Dans le cas général, on a 50% de chance d'avoir un AT terminal sur chaque extrémité du duplex et les duplex ne sont pas auto-complémentaire donc en moyenne, pour un duplex de $n_{bp\ coop}$ paires de bases :

$$\Delta H_{NN}(n_{bp\ coop}) = \Delta H_{init} + \Delta H_{ATterminal} + (n_{bp\ coop} - 1)\Delta H_{stack,moy}$$

ce qui donne

$$\Delta H_{NN}(n_{bp\ coop}) = -8.33 \times n_{bp\ coop} + 10.73 \text{ kcal/mol} \quad (4.8)$$

et donc

$$n_{bp\ coop} = \frac{10.73 - \Delta H_{NN}(n_{bp\ coop})}{8.33}$$

avec ΔH_{NN} en kcal.mol⁻¹. La variation d'enthalpie ΔH_{NN} est ici négative car elle correspond à l'hybridation et non à la fusion du duplex.

Tous les origami mesurés ici ont le même nombre de paires de bases mais nous mesurons des variations d'enthalpie totales (ΔH_{cal}) assez différentes suivant les origami et les scans. Cela est dû soit à des différences dans les rendements d'assemblages des nano-structures, soit à des erreurs dans les concentrations, soit à la non-réversibilité de l'assemblage des nano-structures. ΔH_{moy} et ΔS_{moy} caractérisent la température de fusion et la largeur de la transition. Les erreurs sur la variation d'enthalpie totale ΔH_{cal} se retrouvent dans le nombre de transition n . Cela explique pourquoi lorsqu'on multiplie les paramètres n et $n_{bp\ coop}$, on ne retrouve pas exactement le nombre de paires de bases présentes dans l'origami. Les paramètres ΔH_{moy} , ΔS_{moy} et $n_{bp\ coop}$ sont plus pertinents que le paramètre n pour quantifier la coopérativité du repliement.

On observe que le repliement de l'origami PF6 est donc similaire à l'hybridation de domaines de 21-27 paires de bases alors que la dénaturation est similaire à la dénaturation de domaines de 42-44 paires de bases. La dénaturation est donc globalement deux fois plus coopérative que le repliement. Cela explique également pourquoi le repliement des origami est plus sensible à la concentration en agrafe que la dénaturation. En effet, si on considère que les transitions intermédiaires composant le repliement et la dénaturation des origami sont des réactions bi-moléculaires, alors pour chacune d'entre elles, la température de fusion dépend de la concentration en scaffold, de la concentration en agrafe et des variations d'enthalpie et d'entropie selon la relation :

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln \left([ST] - \frac{[SC]}{2} \right)}$$

Avec ΔH la variation d'enthalpie, ΔS la variation d'entropie, $[ST]$ la concentration en agrafe et $[SC]$ la concentration en scaffold. Plus les réactions intermédiaires composant la transformation sont coopératives, plus ΔH et ΔS sont grands et donc moins T_m varie avec la concentration en scaffold et en agrafes.

	PF6 17 nM X10		PF6 17 nM X3	
	montée	descente	montée	descente
n	154	260	127	223
ΔH_{moy} (kcal.mol ⁻¹)	341	212	353	165
ΔS_{moy} (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	973	599	1010	463
$n_{bp\ coop}$	42	27	44	21

TABLE 4.4 – paramètres n , ΔH_{moy} , ΔS_{moy} et $n_{bp\ coop}$ calculés après l'ajustement des courbes DSC de la dénaturation et du repliement de l'origami PF6 à 17 nM avec un excès en agrafe de 10 et avec un excès en agrafe de 3.

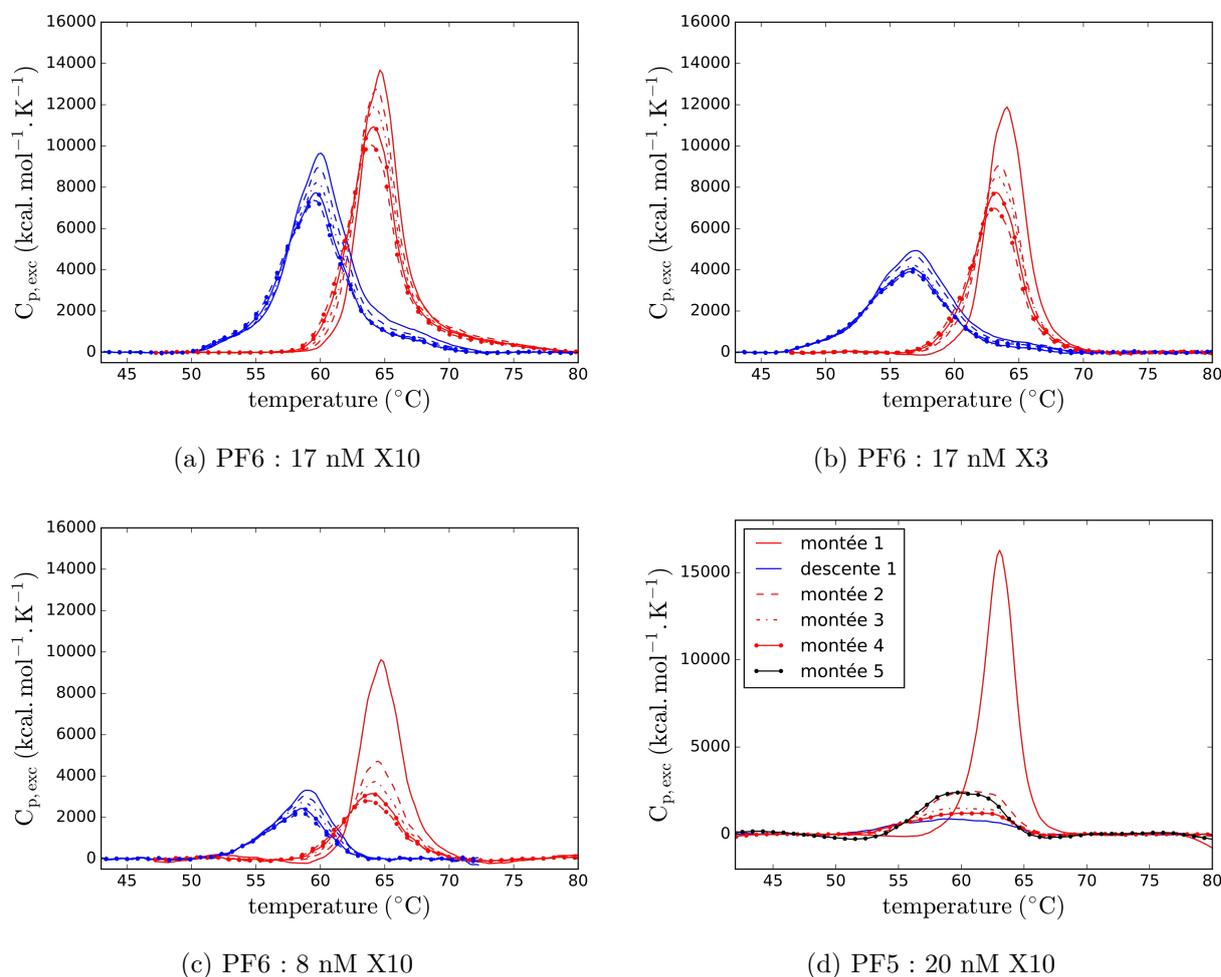


FIGURE 4.17 – a, b, c) Chaleurs spécifiques excédentaires mesurées par DSC lors de la formation et de la dénaturation de l'origami PF6 sur 10 scans successifs pour différentes concentrations en scaffold et agrafes. Les montées en température sont en rouge et les descentes en bleu. (a) La concentration en scaffold est de 17 nM avec un excès en agrafe de 10, (b) la concentration en scaffold est de 17 nM avec un excès en agrafe de 3, (c) la concentration en scaffold est de 8 nM avec un excès en agrafe de 10. d) Chaleur spécifique mesurée par DSC lors de montées et descentes en température successives sur l'origami PF5. La concentration en scaffold est de 20 nM et la concentration en agrafe de 200 nM. Les montées en température et les trois premières descentes ont été réalisés à $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, la descente n°4 a été réalisée à $1^{\circ}\text{C}/\text{h}$. Seule la descente n°2 est représentée car le signal obtenu pour les autres étant trop faible, il n'a pas été possible de traiter les données convenablement.

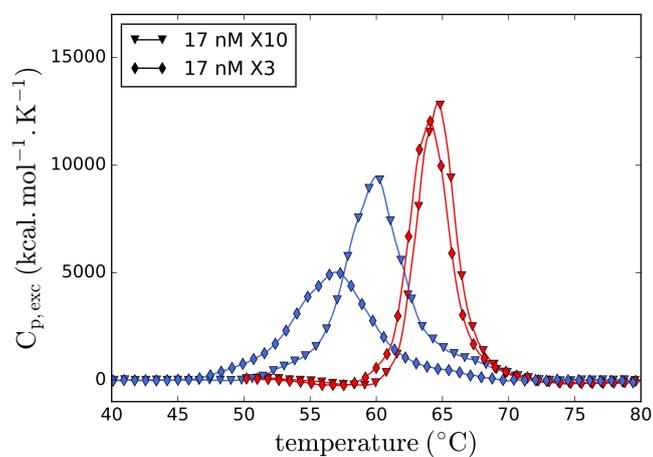


FIGURE 4.18 – Chaleur spécifiques excédentaires obtenues par DSC lors du repliement des origami PF6. Les montées en température sont en rouge et les descentes en bleu. Les mesures ont été effectuées avec une concentration en scaffold de 17 nM et un excès en agrafe de 3 (losanges) ou 10 (triangles).

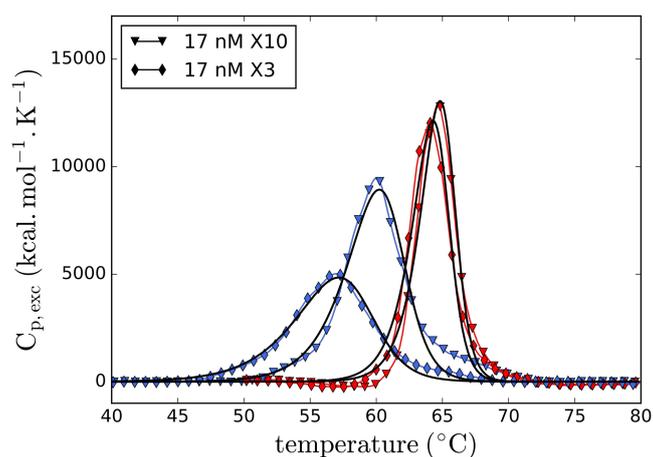


FIGURE 4.19 – Ajustement des chaleur spécifiques excédentaires des origami PF6 par le modèle décrit dans 4.3.1. Les mesures ont été effectuées avec une concentration en scaffold de 17 nM et un excès en agrafe de 3 (losanges) ou 10 (triangles).

4.3.2 Importance relative de différents types d'agrafes sur le repliement d'un origami rectangulaire 2D

Les origami achetés chez tilibit nous permettent d'étudier globalement la coopérativité du repliement mais comme les agrafes nous sont fournies dans un même mélange, nous ne pouvons pas utiliser de mélanges incomplets d'agrafes afin de voir leurs importances relatives sur le repliement. Pour cela, nous avons décidé de concevoir nous même des origami et d'utiliser nos propre mélanges d'agrafes de manière à contrôler la présence ou non de certains types d'agrafes lors du repliement des origami.

Le premier origami que nous avons conçu est un origami 2D rectangulaire très proche de l'origami fourni par tilibit et du rectangle 2D original de Rothemund. On l'appellera dans la suite m13R. Le schéma caDNAno est donné dans l'annexe A. Comme dans l'origami 2D de tilibit, il n'y a pas d'agrafes sur les cotés de l'origami afin d'éviter aux origami de se coller les uns aux autres. La différence avec l'origami de tilibit est que certains nucléotides sont retirés afin de mieux respecter l'hélicité de l'ADN et de réduire les contraintes présentes dans l'origami ce qui permet de former un rectangle plus plat. En effet, sur l'origami précédent, un tour d'hélice et demi était réalisé par un domaine de 16 paires de bases ou par deux domaines de 8 paires de bases. Il y avait donc en moyenne 10.67 nucléotides par tour d'hélice. Dans le m13R, un nucléotide est retiré tout les quatre domaines de 16 paires de bases ce qui permet de remettre à 10.5 le nombre de nucléotides par tour d'hélice.

L'origami m13R est constitué de 192 agrafes de 31 ou 32 nucléotides. Trois classes d'agrafes peuvent être distinguées. Les agrafes en S constituent le corps de l'origami et sont les plus nombreuses. Elles sont composées de trois domaines de $8 + 16 + 8$ nucléotides. Les agrafes centrales rassemblent les zones les plus éloignées de l'origami. Elles sont également composées de 3 domaines de $8 + 16 + 8$ nucléotides. Enfin, la troisième classe d'agrafe rassemble les agrafes externes situées sur les bords haut et bas de l'origami. Elles ne sont composées que de deux domaines de $24 + 8$ nucléotides. Nous avons comparé le repliement de trois origami : le m13R composé de toutes les agrafes, le m13R A sur lequel les agrafes centrales sont manquantes et le m13R B sur lequel les agrafes externes sont manquantes (voir figure 4.21). Les résultats obtenus par DSC pour les montées et descentes en température sont donnés sur les figure 4.20 et 4.22.

La signature thermique du repliement et de la dénaturation de l'origami m13R est proche de celle obtenue pour l'origami PF6 de tilibit car la forme globale et les températures de fusion et de formation des origami sont similaires. Mais on observe dans l'origami m13R des structures internes que l'on ne voyait pas sur le PF6. Le repliement et la dénaturation sont composés de trois pics bien distincts alors que pour l'origami PF6, on observait qu'un seul pic. On voit donc immédiatement que le repliement et la dénaturation sont composés d'un certain nombre de transitions intermédiaires. Les différences observées par rapport au PF6 peuvent être dues : 1 - à la suppression de certains nucléotides pour la diminution des contraintes liées à l'hélicité de l'ADN, 2 - aux différences dans

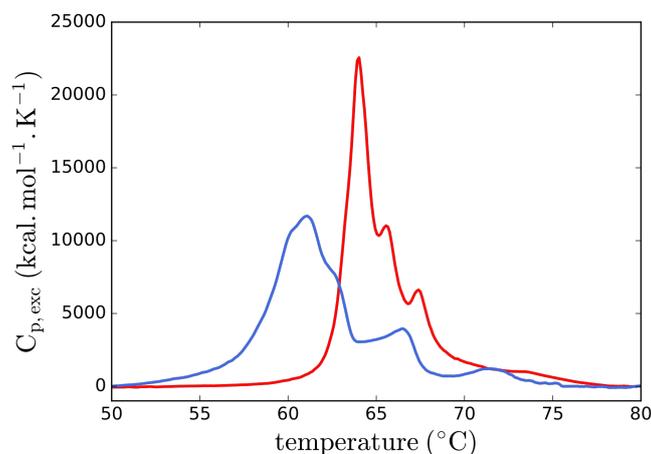


FIGURE 4.20 – Chaleurs spécifiques excédentaires mesurées par DSC lors de la dénaturation (rouge) et du repliement (bleu) de l'origami m13R.

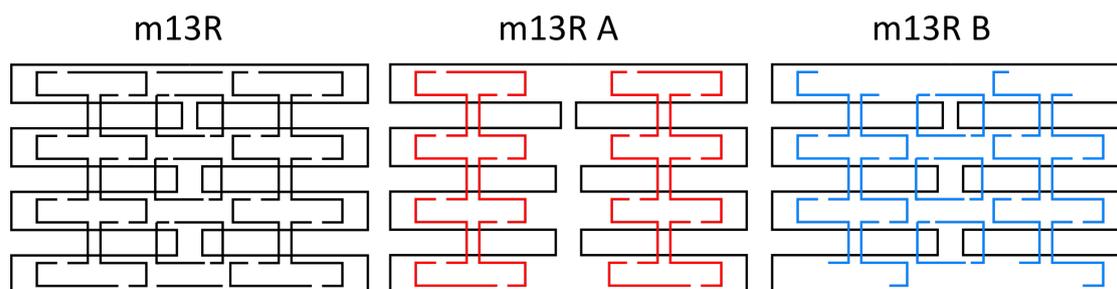


FIGURE 4.21 – Schéma représentant les origami m13R mesurés par calorimétrie avec à gauche le m13R complet, au milieu le m13R A sur lequel les agrafes centrales sont manquantes et à droite l'origami m13R B sur lequel les agrafes externes sont manquantes.

les séquences des agrafes. Certaines agrafes ne sont en effet plus composées de 32 mais de 31 nucléotides, les domaines n'ont donc plus tous la même taille ce qui peut causer la distinction de différents pics lors de l'assemblage et du désassemblage de l'origami. De plus, le point de départ pris par le scaffold est différent de celui de l'origami PF6. Les séquences sont donc toutes différentes par rotation du scaffold. La signature thermique du repliement peut donc être modifiée en raison des différences dans les séquences des agrafes même si leurs positions sont très semblables.

Lorsque les agrafes centrales ou les agrafes externes sont absentes du mélange, le repliement est modifié de manière importante. La forme des transitions ainsi que l'aire sous la courbe correspondant à la variation d'enthalpie sont différentes. La mesure de la variation d'enthalpie permet de comparer les énergies mises en jeu lors du repliement et de la dénaturation des différents origami (voir tableau 4.5). On peut voir que lorsque les agrafes centrales sont manquantes, alors que 89 % des paires de bases du m13R sont encore présentes, la variation d'enthalpie ne représente que 72 % de la variation d'enthalpie

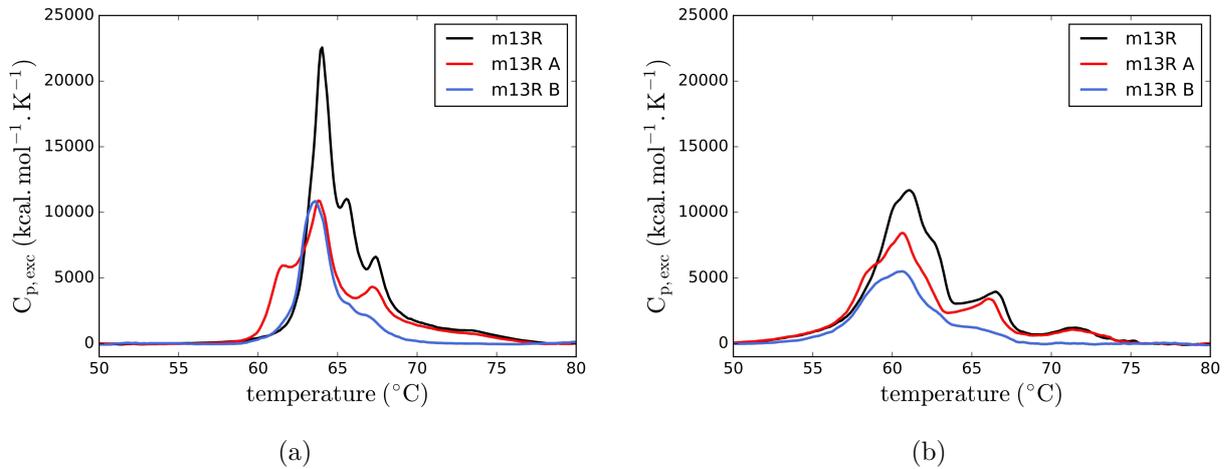


FIGURE 4.22 – Chaleurs spécifiques excédentaires obtenues lors de la dénaturation (a) et du repliement (b) des origami m13R. L'origami m13R dans lequel toutes les agrafes sont présentes est en noir, l'origami m13R A dans lequel les agrafes centrales sont absentes est en rouge, l'origami m13R B dans lequel les agrafes externes sont absentes est en bleu.

mesurée pour le m13R complet. Cela est encore plus marquant lorsque les agrafes externes sont manquantes. Alors que 92 % des paires de bases sont présentes, on ne mesure que 44 % de la variation d'enthalpie. Lorsque les agrafes externes sont absentes, la perte en énergie observée est bien plus grande que l'énergie correspondant à l'hybridation des paires de bases manquantes. Les agrafes externes permettent donc l'hybridation d'autres agrafes dans l'origami.

On observe de plus sur le graphe montrant le repliement des origami (figure 4.22 (b)) que le premier pic à 72 $^{\circ}\text{C}$ disparaît lorsque les agrafes externes sont manquantes. Cela montre que les agrafes externes sont les premières à s'hybrider dans l'origami m13R ou que leur présence est nécessaire à l'hybridation des premières agrafes repliant l'origami. On mesure aussi que l'aire sous le pic allant de 70 $^{\circ}\text{C}$ à 75 $^{\circ}\text{C}$ de la courbe de repliement de l'origami m13R représente 6.3 % de l'enthalpie totale. Vu que les agrafes externes représentent 8 % du nombre de paires de bases de l'origami, il est possible que le premier pic corresponde à l'hybridation des agrafes externes de l'origami. Ces agrafes sont situées à un emplacement stratégique car elles rapprochent des zones relativement proches du scaffold. Ce sont de plus les agrafes possédant les domaines les plus long de 24 nucléotides. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par Lee Tin Wah *et al.* qui avaient observé par AFM que le repliement d'un origami rectangulaire 2D commence par les bords [45]. La figure 4.22 (a) suggère que ces agrafes sont également les dernières à se désolidariser de la structure car le dernier pic autour de 72 $^{\circ}\text{C}$ est également absent lorsque les agrafes externes sont manquantes.

Les mesures calorimétriques que nous avons effectuées nous ont permis de voir que le repliement et la dénaturation des origami d'ADN sont complexes et composés de nombreux

	m13R	m13R A	m13R B
n_{bp}	6048	5355	5544
$\frac{n_{bp}}{n_{bp,m13R}}$	100 %	89 %	92 %
ΔH_{cal} (kcal.mol ⁻¹)	72600	52200	32100
$\frac{\Delta H_{cal}}{\Delta H_{cal,m13R}}$	100 %	72 %	44 %

TABLE 4.5 – Comparaison des origami m13R, m13R A et m13R B indiquant le nombre de paires de bases de chaque origami, le pourcentage de paires de bases par rapport à l'origami complet (m13R), la variation d'enthalpie ΔH , et le pourcentage de la variation d'enthalpie par rapport à celle du m13R.

pics témoignant d'un grand nombre d'états intermédiaires. Les mesures par DSC sur différents mélanges d'agrafes nous ont permis de voir que dans cet origami, les agrafes externes rapprochant les bords haut et bas du scaffold et composées de domaines de 8 + 24 nucléotides sont les premières à s'hybrider et que leur présence est primordiale pour le bon repliement de l'origami. Un autre objectif était de comparer plusieurs stratégies de repliement. Pour cela nous avons conçus d'autres origami qui feront l'objet de la partie suivante.

4.3.3 Comparaison de plusieurs stratégies de repliement

Afin de comparer différentes stratégies de repliement, nous nous sommes concentrés sur les origami 2D rectangulaires car ces origami sont très utilisés pour organiser précisément différents objets à l'échelle nanométrique. De plus, nous avons pu voir que leur repliement est bien plus réversible que celui des origami 3D ce qui rend leur étude par DSC plus quantitative. Les origami 2D rectangulaires les plus couramment utilisés ont une structure semblable au m13R avec des agrafes découpées en trois domaines de 8 + 16 + 8 nucléotides. Dans [47] et [130], les origami utilisés pour guider et simuler le repliement sont conçus de manières différentes. En effet, les agrafes ont une forme de U et non de S et sont composées de 2 domaines de 16 nucléotides. Il y a donc globalement plus de domaines et plus de jonctions dans les origami S mais les domaines y sont plus petits que dans les origami U. Nous avons comparé les stratégies de repliement en S et en U en observant le repliement de 6 origami rectangulaires. Trois sont formés à partir du scaffold M13mp18 et trois à partir d'un plasmide obtenu après une modification du pUC19 appelé pKD1. Le pKD1 est un scaffold de 2646 nucléotides, les origami formés à partir du pKD1 sont donc trois fois plus petits que ceux formés à partir du M13mp18. Ce scaffold a été utilisé par Dunn *et al.* dans [47] et nous a été fourni par Andrew Turberfield. La figure 4.23 représente schématiquement les deux stratégies de repliement.

Les trois origami conçus à partir du M13mp18 sont :

- le m13R : Il s'agit de l'origami qui a été étudié précédemment
- le m13R2 : il a la même structure que le m13R mais avec une rotation du scaffold. Le point de départ prit pour le scaffold est différent donc toutes les séquences des agrafes le sont également.
- le m13RU : il est basé sur le scaffold m13 mais avec une stratégie de repliement en U.

Les trois origami conçus à partir du pKD1 sont :

- le pU : origami basé sur le scaffold pKD1 avec des agrafes en U
- le pS : origami basé sur le scaffold pKD1 avec des agrafes en S
- le pUS : il reprend les agrafes de l'origami pU avec au centre, les agrafes du pS

Tous les schéma caDNAno des origami sont sur l'annexe A.

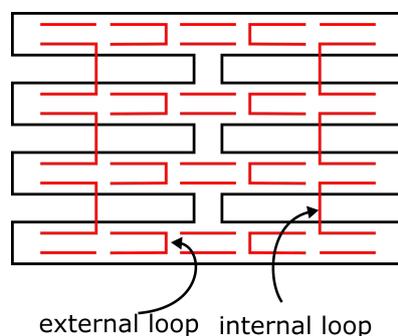


FIGURE 4.23 – Schéma représentant les stratégies de repliement en U et en S sur les origami rectangulaires à deux dimensions. L'origami S est à gauche, le U au milieu et le US à droite.

m13R2 et m13RU

Les résultats DSC comparant le repliement et la dénaturation des origami m13R2 et m13RU sont donnés sur la figure 4.24. Ici, les mesures ont été effectuées dans un tampon contenant 10 mM de Tris, 1 mM d'EDTA et 12.5 mM de $MgCl_2$. Les courbes obtenues pour l'origami m13R2 sont similaires à celles de l'origami m13R mais de même que pour l'origami PF6 de tilibit, si la forme globale est la même, les structures internes sont

différentes. Cela prouve que les séquences des agrafes ont une influence sur le repliement de l'origami. En effet, les structures des origami m13R et m13R2 sont identiques, seules les séquences en agrafes sont modifiées par une rotation du scaffold. Le repliement de l'origami m13RU est également similaire. On retrouve la présence d'une hystérésis entre la montée et la descente, et le fait que la dénaturation est plus coopérative que le repliement. Les hauteurs et les largeurs des différentes transitions sont également similaires. Mais alors que les conditions expérimentales sont les mêmes pour les deux origami, on observe que le m13RU est plus stable que le m13R2 et l'hystérésis entre la montée et la descente est plus petite.

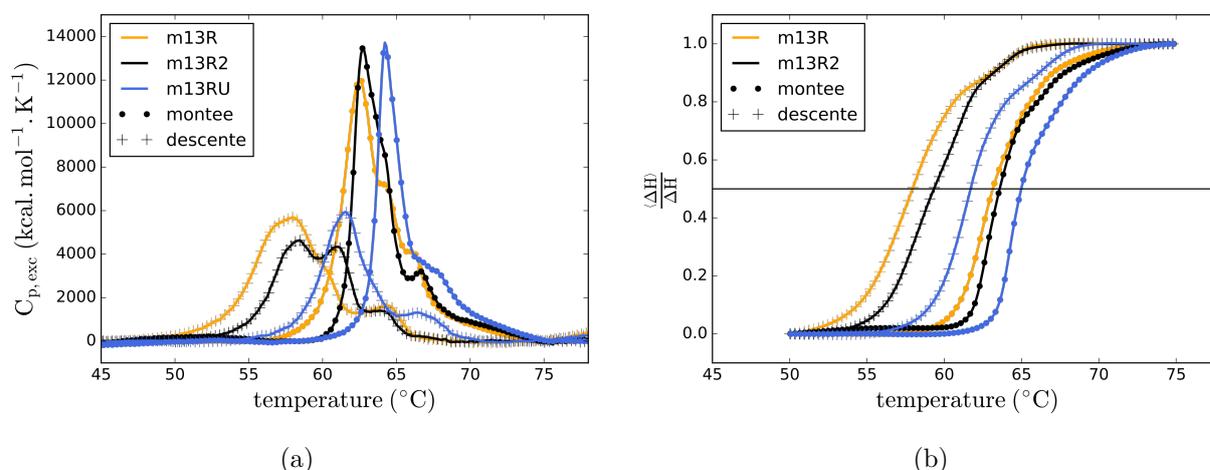


FIGURE 4.24 – Chaleurs spécifiques (a) et courbes de repliement et de fusion (b) obtenues par DSC sur les origami m13R, m13R2 et m13RU. L'origami m13R est en orange, le m13R2 est en noir et l'origami m13RU en bleu.

Ces résultats sont étonnants car nous avons vu dans la partie 4.2 que dans les origami à deux agrafes, la présence de jonction Holliday causait une augmentation de la stabilité et de la coopérativité du repliement. Alors que ces jonction Holliday sont très présentes dans le m13R2 (171 jonctions Holliday), il n'y en a que 11 dans l'origami m13RU. Les domaines de l'origami m13RU sont cependant composés de 16 nucléotides ce qui est plus long que les domaines de l'origami m13R2 qui sont en moyenne de 10.7 nucléotides. L'augmentation de la longueur des domaines compense donc ici l'absence de jonction Holliday. En effet, un domaine de 16 paires de bases va s'hybrider de manière beaucoup plus stable et plus coopérative qu'un domaine de 10.7 paires de bases.

La figure 4.25 représente une simulation du repliement de duplex de 16 ou 10.7 paire de bases en prenant comme valeur de ΔH et ΔS :

$$\Delta H_{NN}(n) = -8.33 \times n + 10.73$$

et

$$\Delta S_{NN}(n) = -22.28 \times n + 22.48$$

avec ΔH en kcal.mol⁻¹, ΔS en cal.mol⁻¹.K⁻¹ et n le nombre de paires de bases dans le duplex. Ces valeurs moyennes de variation d'enthalpie et d'entropie sont calculées à partir du modèle du plus proche voisin [122]. La figure 4.25 représente des simulations du repliement de 378 domaines de 16 paires de bases et de 565 domaines de 10.7 paires de bases. Les deux courbes ont donc la même variation d'enthalpie puisqu'elles correspondent au repliement d'environ 6048 nucléotides. Le repliement des domaines de 16 paires de bases est logiquement plus coopératif que celui des domaines de 10.7 paires de bases mais les simulations sont très éloignées des résultats obtenus pour les origami complet. Le repliement et la dénaturation des origami sont en effet bien plus coopératifs que l'hybridation des domaines moyens indépendants ce qui est une propriété commune avec l'hybridation des nano-cages.

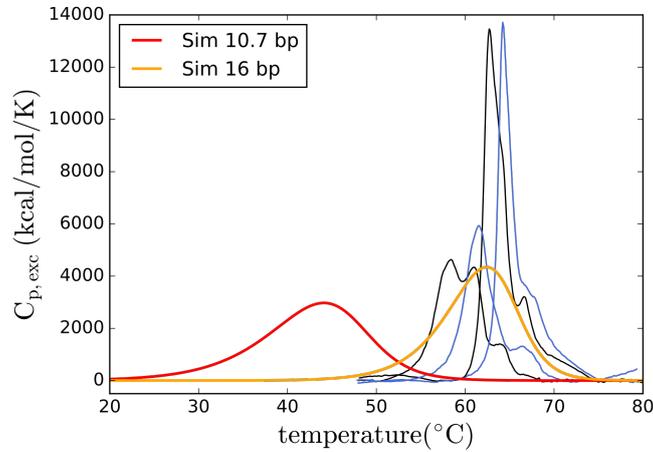


FIGURE 4.25 – Simulation du repliement de 378 duplex de 16 paires de bases (orange) et de 565 duplex de 10.7 paires de bases (rouge) avec les données obtenues par DSC pour le repliement et la dénaturation des origami m13R2 (noir) et m13RU (bleu).

Ici, il est difficile de simuler les transitions de repliements et de dénaturations pour les origami en utilisant l'approche globale comme nous l'avons fait pour l'origami PF6 car les transitions sont complexes et constituées de nombreux pics distincts. Pour calculer ΔH_{VH} et ainsi estimer la coopérativité des transitions, nous avons donc mesuré les variations de températures de fusion pour différentes concentrations en scaffold et agrafes. En effet, la température de fusion d'une réaction bi-moléculaire peut s'écrire comme :

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln \left([ST] - \frac{[SC]}{2} \right)}$$

donc

$$\frac{1}{T_m} = \frac{\Delta S}{\Delta H} + \frac{R \ln \left([ST] - \frac{[SC]}{2} \right)}{\Delta H} \quad (4.9)$$

En traçant pour chaque pic $\frac{1}{T_m}$ en fonction de $\ln \left([ST] - \frac{[SC]}{2} \right)$, on devrait donc obtenir une droite de pente $\frac{R}{\Delta H_{VH}}$. Les mesures calorimétrique ont donc été réalisées sur les

origami m13R2 et m13RU en utilisant différentes concentrations en agrafes et en scaffold. Pour le m13R2, des concentrations de 10 nM et de 20 nM (deux fois) de scaffold ont été utilisées avec des concentrations en agrafes de 100 nM, 200 nM et 400 nM. Pour le m13RU, le scaffold a toujours été utilisé à 20 nM mais avec des concentrations en agrafes de 100 nM, 200 nM et 400 nM. Comme l'excès en agrafe est toujours important, on remarque avec l'équation 4.9 que la concentration en agrafe a beaucoup plus d'influence sur la température de fusion que la concentration en scaffold. Les chaleurs spécifiques obtenues pour les différentes concentrations sont données sur la figure 4.26 et pour chaque origami, les valeurs de $\frac{1}{T_m}$ en fonction de $\ln\left([ST] - \frac{[SC]}{2}\right)$ sont sur la figure 4.27. Les températures de fusion associées à chaque pic ont été mesurées avec le maximum du pic.

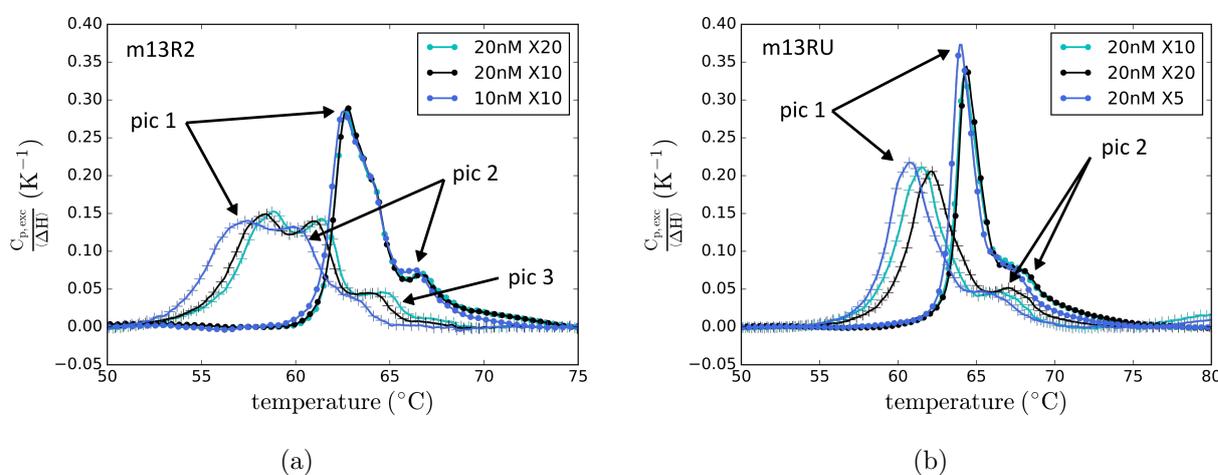


FIGURE 4.26 – Comparaison des chaleurs spécifiques excédentaires obtenues par DSC pour le repliement et la dénaturation des origami m13R2 (a) et m13RU (b) pour différentes concentrations en scaffold et différents excès en agrafes. x nM X y signifie que l'origami a été assemblé avec une concentration en scaffold de x nM et un excès en agrafe par rapport au scaffold de y.

Les valeurs de ΔH_{VH} et leur correspondance en nombre de paires de bases s'hybridant de manière coopérative sont indiquées dans les tableaux 4.6 et 4.7. Le nombre de paires de bases équivalent au ΔH_{VH} a été calculé avec la relation 4.8

Étonnamment, le repliement de l'origami m13RU semble être plus coopératif que celui de l'origami m13R2 : les ΔH_{VH} mesurés pour les différents pics sont globalement plus grands que ceux qui ont été mesurés sur l'origami m13R2. Mais pour la dénaturation, on observe l'inverse avec les transitions du m13R2 globalement plus coopératives que celles du m13RU. Le fait de positionner les agrafe en U augmente donc la coopérativité du repliement mais diminue celle de la dénaturation. Cela explique qualitativement pourquoi l'hystérésis est plus faible. En effet, La différence de coopérativité entre le repliement et la dénaturation étant moins grande, l'utilisation de faibles concentrations en agrafe et en scaffold va donc affecter les températures de fusion et de repliement de manière plus similaire diminuant ainsi l'hystérésis.

	repliement du m13R2			dénaturation du m13R2	
	pic 1	pic 2	pic 3	pic 1	pic 2
ΔH_{VH} (kcal.mol ⁻¹)	231	212	176	1062	813
$n_{bp\ coop}$	29	27	22	129	99

TABLE 4.6 – Variation d'enthalpie de Van't Hoff et nombre de paires de bases équivalent mesurés pour les différents pics du repliement et de la dénaturation de l'origami m13R2.

	repliement du m13RU		dénaturation du m13RU	
	pic 1	pic 2	pic 1	pic 2
ΔH_{VH} (kcal.mol ⁻¹)	251	197	830	558
$n_{bp\ coop}$	31	25	101	68

TABLE 4.7 – Variation d'enthalpie de Van't Hoff et nombre de paires de bases équivalent mesurés pour les différents pics du repliement et de la dénaturation de l'origami m13RU.

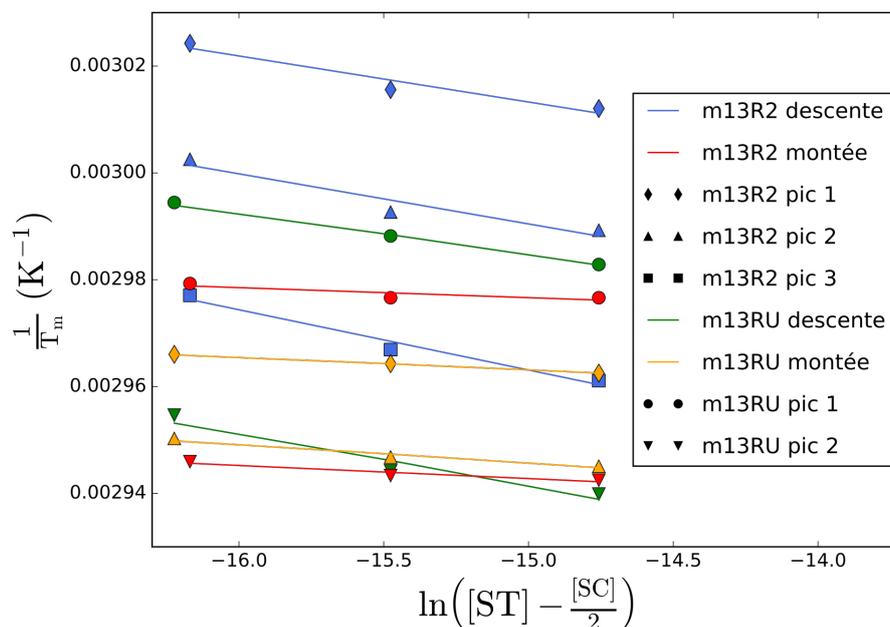


FIGURE 4.27 – $\frac{1}{T_m}$ en fonction de $\ln\left([ST] - \frac{[SC]}{2}\right)$ mesurés lors du repliement et de la dénaturation de l'origami m13R2 (bleu et rouge) et m13RU (vert et orange) pour les différents pics des transitions.

On retrouve également le fait que la coopérativité est très différente lors de l'assemblage et de la dénaturation des origami : en effet, les enthalpies de Van't Hoff mesurées pour les assemblages des origami sont similaires aux variations d'enthalpie associées à l'hybridation de domaines de 22 à 31 paires de bases, alors que les dénaturations sont similaires aux dénaturations de domaines de 68 à 129 paires de bases.

pU, pS et pUS

Les origami pU, pS et pU-S sont les derniers origami que nous avons étudié par calorimétrie. Leurs structures sont similaires à celles des origami m13R et m13RU mais le scaffold utilisé (le pKD1) est trois fois plus petit donc les origami le sont également. Le pU-S hybride les origami pU et pS en reprennant les agrafes du pU avec les agrafes centrales du pS. Les origami formés à partir du scaffold pKD1 ont l'avantage d'être plus petits, ils sont donc moins chers car composés de trois fois moins d'agrafes et plus facile à analyser. Nous avons étudié ces origami en particulier pour comparer les résultats calorimétriques avec les modélisations effectuées par Dannenberg *et al.* [130]. Les simulations des résultats calorimétriques sont toujours en cours actuellement. Les mesures ont donc été effectuées dans les mêmes conditions avec 10 mM tris, 1 mM d'EDTA et 12.5 mM de $MgCl_2$.

Les résultats DSC obtenus pour les origami pU, pS et pU-S sont sur la figure 4.28.

On retrouve globalement les mêmes résultats que pour les origami basés sur le m13, à savoir que le pU est plus stable que le pS avec une hystérésis plus petite. Le pUS se comporte globalement de la même manière que le pU mais avec des différences au niveau de la forme des transitions. On observe un unique pic principal lors de la dénaturation du pU-S alors que la transition principale de la dénaturation du pU est composée de deux pics. Inversement, la transition principale du repliement de pU-S est constituée de deux pics alors qu'on n'en distingue qu'un dans le cas du pU. Les agrafes centrales U ou S ne modifient donc pas la stabilité et la coopérativité globale du repliement mais les transitions intermédiaires sont modifiées.

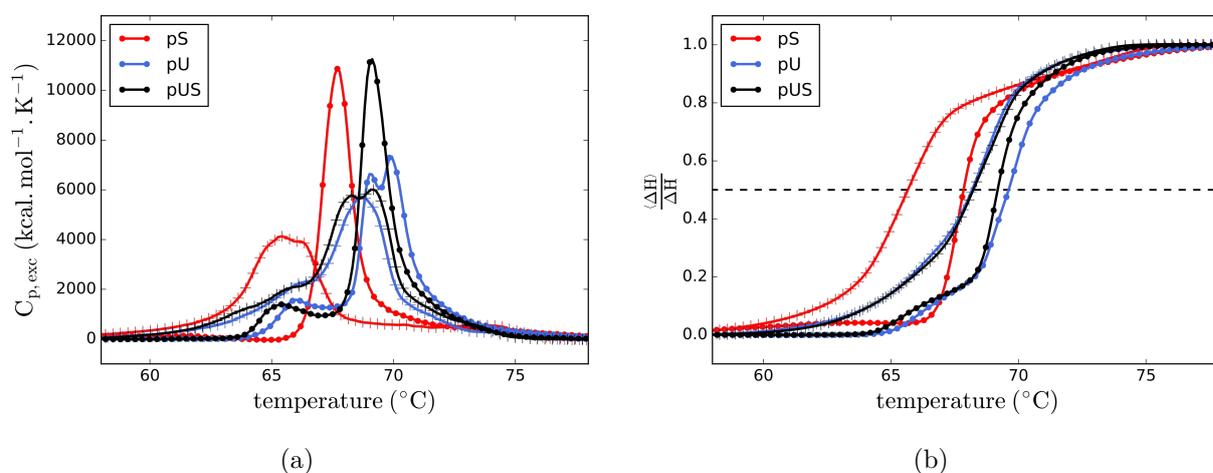


FIGURE 4.28 – Chaleurs spécifiques (a) et courbes de fusions (b) obtenues par DSC lors du repliement et de l'hybridation des origami pS (rouge), pU (bleu), et pUS (noir). Les montées en température (dénaturations) sont représentées par des points et les descentes (assemblages) par des croix.

Afin d'étudier l'influence des différents types d'agrafes sur le repliement de l'origami U, nous avons effectué, comme pour le m13R, des mesures de DSC sur des origami dans lesquels certaines agrafes étaient absentes. Il n'y a pas vraiment d'agrafes externes dans l'origami U car les agrafes situées sur les bords hauts et bas de l'origami sont composées d'un unique domaine et ne replient donc pas le scaffold. Elles servent uniquement à assurer la rigidité de la structure finale. Nous nous sommes donc intéressés au rôle des agrafes centrales, ainsi qu'aux agrafes *int* et *ext* du corps de l'origami. Dans le pU, la moitié des agrafes du corps de l'origami ont en effet une orientation *int* (en rouge dans l'annexe A), et l'autre moitié une orientation *ext* (en vert dans l'annexe). Trois origami en plus de l'origami complet pU ont été étudiés : le pU1 dans lequel les agrafes centrales sont absentes, le pU2 dans lequel seules les agrafes *int* sont présentes, le pU3 dans lequel seules les agrafes *ext* sont présentes. La somme des agrafes du pU2 et du pU3 correspond donc aux agrafes présentes dans le pU1 (voir figure 4.29). Les résultats DSC sont sur la figure 4.30. La somme des données obtenues pour les origami pU2 et pU3 est également indiquée en pointillé en noir.

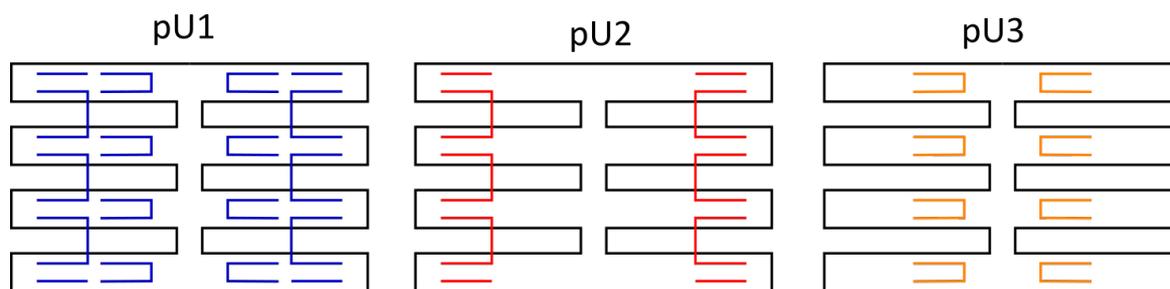


FIGURE 4.29 – Schéma représentant les origami pU mesurés par calorimétrie avec à gauche le pU1 sur lequel les agrafes centrales sont absentes, au milieu le pU2 composé uniquement des agrafes *int* et à droite le pU3 composé uniquement des agrafes *ext*.

On remarque que lorsque les agrafes centrales sont manquantes, le repliement et la dénaturation des origami sont moins stable et moins coopératifs. le pic a lieu à une température plus basse et la transition est moins large. Le repliement et la dénaturation des origami pU2 et pU3 sont caractérisés par une transition très large et de faible amplitude. La coopérativité du repliement est donc grandement diminuée lorsqu'il manque soit la moitié *int*, soit la moitié *ext* des agrafes. Les origami pU2 et pU3 possèdent le même nombre d'agrafes, l'énergie associée aux repliements devrait donc être identique pour les deux pics. On observe cependant que l'aire sous la courbe du pU2 (avec les agrafes *int*) est plus grande que celle du pU3, la variation d'enthalpie est donc plus grande pour lorsque les agrafes *int* sont présentes que lorsque les agrafes *ext* sont présentes.

On observe également que dans le cas de la montée comme de la descente, la somme des origami pU2 et pU3 est moins coopérative que l'origami pU1. Or, Si les deux blocs d'agrafes *int* et *ext* s'hybridaient de manières indépendantes, pU2 + pU3 devrait être équivalent à pU1. Tous ces résultats montrent que les agrafes des différents blocs ne sont pas indépendantes les unes des autres et que la coopérativité diminue lorsque certaines agrafes sont absentes. La somme du repliement ou de la dénaturation de deux groupes d'agrafes complémentaires est toujours moins coopérative que l'origami composé de ces deux groupes d'agrafes.

4.3.4 Conclusion et perspectives

Les mesures calorimétriques que nous avons réalisées sont les premières à ce jour à avoir été effectuées sur des origami d'ADN. La calorimétrie nous a permis d'étudier des petites structures comme les boucles d'ADN ou les origami à deux agrafes à la base des origami d'ADN ainsi que des origami complets d'ADN.

Nous avons ainsi pu observer que les boucles d'ADN ne se comportent pas de la même manière suivant qu'elles ont une orientation *int* ou *ext*. Pour les boucles *int*, lorsque la longueur de la boucle augmente, l'entropie associée au repliement augmente également en

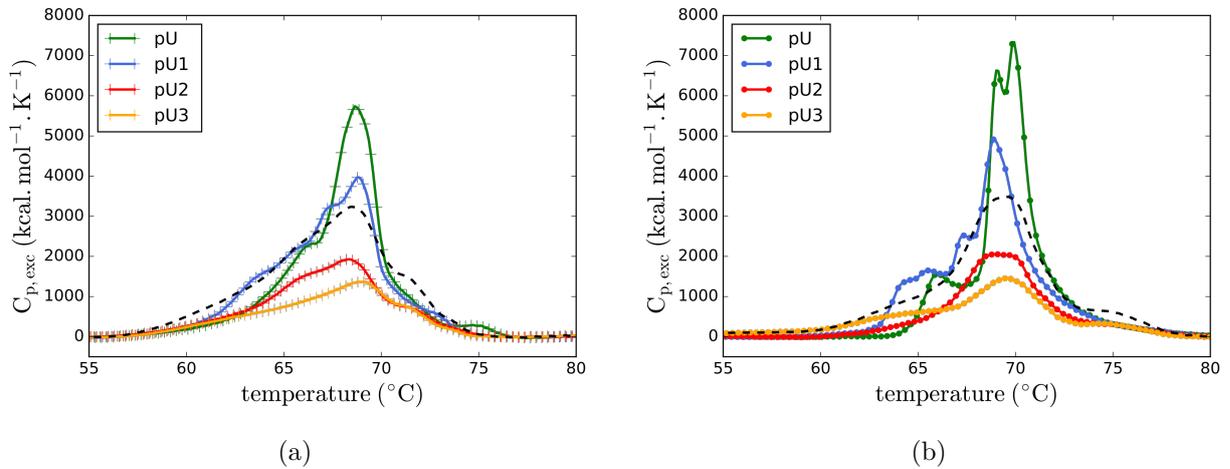


FIGURE 4.30 – Chaleurs spécifiques mesurées lors du repliement (a) et de la dénaturation (b) des origami pU avec différentes agrafes présentes. En vert l'origami est complet, en bleu les agrafes centrales sont absentes (pU1). L'origami pU2 (agrafes *int*) est en rouge et le pU3 (agrafes *ext*) en orange. La courbe noire pointillée représente la somme des données obtenues pour les origami pU2 et pU3.

suivant la relation de Jacobson et Stockmayer ce qui cause une diminution de la température de fusion. Les boucles *ext* ont un comportement inverse dans lequel la longueur de la boucle a beaucoup moins d'influence sur la température de fusion. Il faut donc chercher à minimiser la longueur des boucles *int* alors que les boucles *ext* peuvent être de taille quelconque.

L'observation d'origami à deux agrafes nous a permis de mesurer les interactions d'empilements présentes entre deux agrafes voisines d'un origami. Nous avons également observé que la formation d'une jonction Holliday augmente de manière significative la coopérativité et la stabilité du repliement.

Les mesures effectuées sur des origami d'ADN nous ont permis de comparer deux stratégies de repliements (agrafes en U et en S). Le fait de positionner les agrafe en U diminue le nombre de jonction Holliday mais augmente la longueur moyenne des domaines ce qui rend les origami U plus stables que les origami en S. Nous avons pu voir que les origami en U ont une dénaturation globalement moins coopérative que les origami en S mais un repliement plus coopératif. Cela a pour conséquence une hystérésis plus faible entre la montée et la descente en température.

Enfin, l'étude d'origami avec ou sans certains types d'agrafes nous a permis de conclure que dans l'origami m13R, les premières agrafes à s'hybrider sont les agrafes externes refermant les bords haut et bas de l'origami. Ces agrafes ont également un rôle primordial pour le repliement d'autres agrafes de l'origami. Nous avons pu observer que globalement, le repliement et la dénaturation de différents groupes d'agrafes ne sont pas indépendants

puisque les signatures thermiques de la somme de deux origami composés chacun d'un seul groupe d'agrafes est moins coopérative que la signature thermique de l'origami composé de la somme des deux groupes d'agrafes.

La calorimétrie nous a permis d'obtenir de nombreuses informations sur le repliement d'origami d'ADN mais dans tout les origami que nous avons étudiés, le scaffold était toujours positionné de la même manière. Il est en effet toujours positionné de manière linéaire, les différentes hélices étant reliées à leurs deux voisines soit au centre de l'origami, soit au niveau des bords. Une des perspective future est donc d'observer l'influence du positionnement du scaffold sur le repliement des origami. Pour cela, trois origami supplémentaires ont été conçus : l'origami LL qui est un origami 2D utilisant un repliement différents du scaffold ainsi que les origami 42lin et 42ram qui sont des origami 3D. Dans l'origami LL (LL pour little loop), le scaffold est moins linéaire et les deux moitiés de l'origami sont formées par deux boucles plus petites du scaffold. Cette conception augmente le nombre de jonctions nécessaires pour stabiliser la structure mais réduit de moitié la taille des boucles du scaffold. Les agrafes replient donc des zones du scaffold beaucoup plus proches. La figure 4.31 représente les différentes manières de positionner les scaffold avec une seule (m13R) ou deux boucles (LL).

Nous avons également conçus des origami 3D composés de 42 hélices disposées sur un réseau en nid d'abeille. Deux repliements de scaffold vont être testés avec un repliement linéaire (origami 42lin) et un repliement ramifié (origami 42ram) du scaffold. Dans l'origami 42lin, le scaffold relie les hélices les unes aux autres de manière linéaire, chaque hélice n'étant relié par le scaffold qu'à deux hélices voisines. La troisième hélice voisine est reliée grâce aux agrafes. Dans l'origami 42ram, le scaffold a une structure beaucoup plus ramifiée et relie chaque hélice à ces trois voisines. Dans l'origami 42ram, le scaffold est donc composé d'un grand nombre de petites boucles alors que l'origami 42lin est plus proche d'un tapis 2D d'ADN replié sur lui même par les agrafes de manière à former une structure 3D. Le schéma 4.32 donne la position des hélices composant la structure ainsi que le chemin parcouru par le scaffold dans les origami 42lin et 42ram. Les schéma caDNAno des trois origami sont dans l'annexe A.

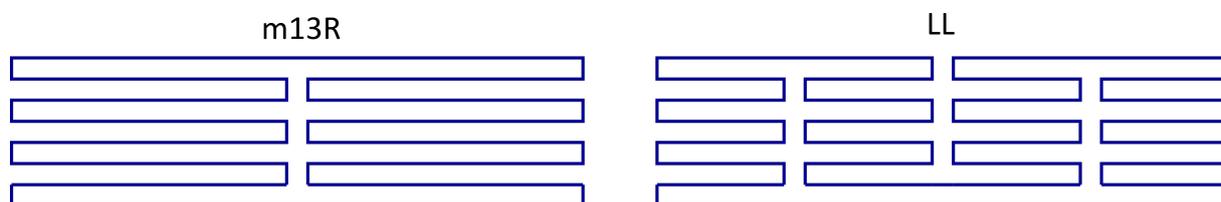


FIGURE 4.31 – Schéma représentant la position du scaffold dans les origami m13R et LL.

Il est très ambitieux d'observer ou de déduire des règles générales sur des origami de grandes tailles et il semble pertinent de poursuivre le travail initié par le groupe d'Oxford qui consiste à réduire la taille des scaffold afin de voir comment se comporte le repliement d'origami de petites tailles. Il sera intéressant de voir s'il existe une taille caractéristique à partir de laquelle des processus irréversibles apparaissent au cours de l'assemblage et s'il

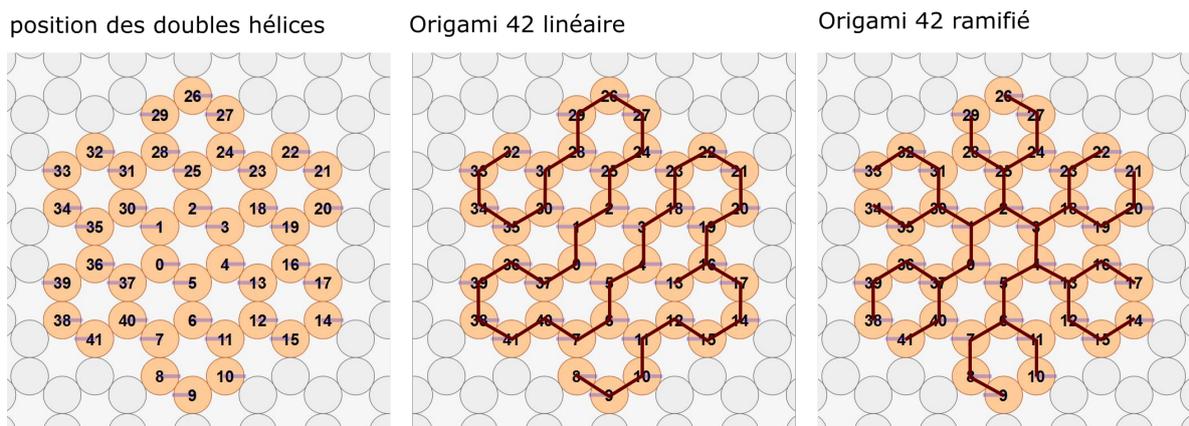


FIGURE 4.32 – Schéma caDNAno représentant la position des hélices dans les origami 42lin et 42ram. Le chemin emprunté par le scaffold est dessiné sur les hélices.

est possible pour des petits origami de décomposer l'assemblage en une succession d'états intermédiaires.

Les mesures en DSC permettent d'obtenir une signature thermique du repliement et de la dénaturation de structures d'ADN. Mais pour aller plus loin, nous allons avoir besoin d'effectuer des mesures calorimétriques complémentaires qui sont les mesures par titration calorimétrique isotherme (ITC). En effet, l'ITC devrait nous permettre de mesurer en plus des paramètres thermodynamiques, la cinétique des transformations ce que nous ne pouvons pas faire en DSC. De plus, l'ITC a l'avantage d'être une méthode de titration. On mesure donc en ITC la chaleur de réaction dégagée lors du mélange de deux réactifs différents. On peut donc, en choisissant astucieusement les deux réactifs se focaliser sur une transition intermédiaire particulière du repliement ou, en mélangeant différentes structures préformées, forcer le chemin de repliement dans une direction. Dans le cas des tétraèdres, il sera par exemple possible par ITC de choisir l'ordre d'hybridation des différents brins. On pourra aussi dans le cas des origami d'ADN observer le repliement de structures préformées auxquelles ont ajoutés les agrafes manquantes. La réalisation de mesures ITC devrait permettre de confirmer et de compléter les résultats obtenus par DSC sur les différentes structures d'ADN.

Actuellement, les calorimètres commerciaux ITC nécessitent encore plus de matériel que les calorimètres DSC (voir chapitre 2) ce qui rend l'étude des origami d'ADN par ITC très coûteuse. Une partie de la thèse a donc consisté au développement d'un nanocalorimètre à flux miniaturisé permettant d'effectuer des mesures hors équilibre sur des petits volumes de liquide. Le développement du calorimètre, du capteur micro-fluidique et les performances actuelles du calorimètre font l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 5

Développement d'un nano-calorimètre à flux

Afin de pouvoir réaliser des mesures de titration calorimétrique isotherme (ITC) sur des nano-structures d'ADN, nous avons développé un nano-calorimètre intégrant de la micro-fluidique. L'objectif de ce calorimètre est de réduire de manière significative la quantité d'ADN nécessaire à la réalisation des mesures par rapport aux calorimètres commerciaux existants. En ITC, on titre un liquide titré par un liquide titrant en effectuant une série d'injection du liquide titrant situé dans une seringue dans une cellule contenant le liquide titré. La chaleur de la réaction est mesurée lors de chaque injection ce qui permet la mesure de l'équilibre chimique, des paramètres thermodynamiques de la réaction ainsi que de la cinétique de la réaction. L'ITC est une méthode complémentaire à la DSC et elle présente les avantages suivants :

- l'ITC fournit des informations sur la cinétique de la réaction
- comme il s'agit d'une titration dans laquelle deux réactifs sont mélangés, on peut cibler une étape de repliement en choisissant des états préformés des structures comme réactifs, cela n'était pas possible en DSC où toutes les espèces sont mélangées dans une même cellule
- on peut forcer le chemin de repliement dans une direction en choisissant les réactifs de manière judicieuse

Le capteur que nous développons est différent des calorimètres ITC classiques puisqu'il n'y a pas d'injection d'un liquide dans une cellule. Les deux liquides sont mélangés dans la chambre de réaction et la titration sera réalisée par une série de mélanges dans lesquels les réactifs sont présents à différentes concentrations.

Actuellement, les calorimètres commerciaux les plus sensibles ont un volume de cellule de 200 μL , un volume de seringue de 40 μL et une stabilité en température de 120 μK

(voir chapitre 2). Le calorimètre que nous développons est bien plus petit puisque le volume de la chambre de réaction n'est que de 200 pL, ce qui est un million de fois plus petit que ce qui est fait dans les appareils commerciaux. Un petit volume de réaction a l'avantage de diminuer la masse de l'échantillon et donc sa capacité calorifique et ainsi la constante de temps thermique ($\tau = \frac{C}{K}$). On peut utiliser un capteur sur membrane ce qui permet d'avoir des fuites thermiques entre l'échantillon et l'extérieur très faibles. Cela permet, tout en réduisant les quantités de matériel nécessaires, de réaliser des mesures de températures plus précises. Le mélange des deux réactifs par diffusion se fait, de plus, beaucoup plus facilement dans un petit volume de liquide. L'objectif était de rendre le temps de diffusion des espèces le plus petit possible afin que celui-ci ne soit pas limitant par rapport à n'importe quel autre phénomène physico-chimique. Comme le temps de diffusion des espèces dans le mélange est plus petit, on peut observer la cinétique de réactions plus rapides. Cela dispense notamment de l'utilisation d'une agitation mécanique qui est source de bruits et d'échauffements mécaniques dans les mesures des ITC commerciaux. Un temps de diffusion court permet également la mesure de la cinétique des réactions chimiques.

L'équipe TPS possède une expertise dans la réalisation de capteurs sur membrane permettant la mesure de très faible dégagement de chaleur. L'expertise de l'équipe dans le développement de calorimètres à étages ayant une grande stabilité en température va également être un atout pour le développement de cet instrument.

Cependant, une telle réduction du volume réactionnel est aussi un défi puisque les puissances mises en jeu lors des réactions vont être très faibles. Le calorimètre devra donc être très sensible et placé dans un environnement très stable en température. Nous allons dans un premier temps décrire le capteur micro-fluidique, puis nous nous intéresserons au développement du calorimètre dans lequel le capteur est placé. Enfin, nous verrons quelles sont les performances actuelles du calorimètre. Nous avons utilisé le calorimètre développé pour évaluer la stabilité des thermomètres à base de NbN que nous utilisons dans les puces calorimétriques de l'équipe.

5.1 Développement du capteur microfluidique

5.1.1 Principe général de fonctionnement

Le capteur micro-fluidique est un capteur sur membrane : la mesure est réalisée sur une membrane de nitrure de silicium (Si_3N_4 ou SiN) de 100 nm d'épaisseur. L'utilisation d'une membrane permet d'isoler adiabatiquement la chambre de réaction en diminuant les fuites thermiques au niveau du silicium. Un dégagement de chaleur sur la membrane sera traduit par une variation de la température : plus la conductance thermique sera faible, plus l'élévation de la température sera importante. Le bilan en puissance est donné

par la relation :

$$P = K\Delta T + C\frac{dT}{dt}$$

où K représente la conduction thermique vers le bain et C la capacité calorifique du système (cellule de mesure et échantillon). La variation de la température lors d'une réaction chimique va donc dépendre des deux temps caractéristiques qui sont la constante de temps $\tau = \frac{C}{K}$ et le temps caractéristique de la réaction t_{reac} . Si $\tau \gg t_{reac}$, alors on observera une variation exponentielle de la température en fonction de $e^{-\frac{t}{\tau}}$. Si $\tau \ll t_{reac}$, la température augmentera également en $e^{-\frac{t}{\tau}}$ jusqu'à atteindre un régime continu dans lequel $P = K\Delta T$ (voir figure 5.1). La température mesurée va donc dépendre de la constante de temps $\tau = \frac{C}{K}$. Si τ est grand devant le temps de la réaction, on observera une décroissance exponentielle de la température, sinon, on pourra mesurer un $\Delta T = \frac{P}{K}$.

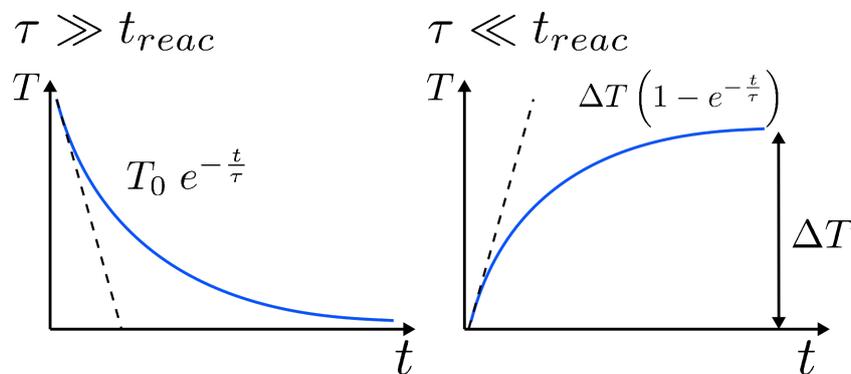


FIGURE 5.1 – Variation de la température après un dégagement de chaleur causé par une réaction chimique dans le cas où : $\tau \gg t_{reac}$ (a) et $\tau \ll t_{reac}$ (b)

On souhaite utiliser ce capteur pour mesurer la chaleur de réactions lors de l'assemblage de structures d'ADN. la chaleur dégagée lors d'une réaction est :

$$Q = \Delta H \times V \times C$$

avec V le volume de la chambre de réaction et C la concentration en espèces. La puissance dégagée est donc :

$$P = \frac{\Delta H \times V \times C}{\Delta t}$$

avec Δt le temps caractéristique de la réaction. La chambre de réaction est de 200 pL. Si l'on prend comme référence la réaction d'assemblage d'un tétraèdre d'ADN à 20 μM avec une variation d'enthalpie d'environ 800 kcal/mol et que l'on suppose que le temps caractéristique de l'assemblage est d'environ 1 s, alors on calcule une puissance dégagée de $P = 13$ nW. Cette puissance est un ordre de grandeur qui dépendra de la taille des structures étudiées, de leur concentration et du temps de la réaction. Pour pouvoir mesurer convenablement la chaleur dégagée par une réaction du type assemblage de tétraèdre d'ADN, le calorimètre doit donc permettre la mesure de puissance de l'ordre du nW.

Pour cela le capteur doit être placé dans un environnement très stable en température afin de permettre la mesure de très faibles variations de température. Il est pour cela placé au centre d'un calorimètre qui sera décrit dans la partie 5.9. La mesure et la régulation au niveau du capteur sont effectuées par un chauffage et trois thermomètres. Un thermomètre permet la mesure des variations de températures sur la membrane au niveau de la chambre de réaction : c'est le thermomètre de la membrane. Un deuxième thermomètre ayant les mêmes dimensions est situé à l'extérieur de la membrane et permet la réalisation de mesures différentielles : il s'agit du thermomètre de référence. Ce thermomètre a en effet les mêmes caractéristiques que le thermomètre de la membrane mais ne sera pas soumis à un ΔT pendant la réaction chimique. Un troisième thermomètre aux dimensions plus grandes est placé à coté du chauffage de manière à permettre la régulation au niveau du capteur : c'est le thermomètre de la ligne de base (LB).

Enfin, la particularité de ce capteur est qu'il intègre de la micro-fluidique. Trois passages de fluides sont réalisés en face arrière du capteur, deux pour injecter le liquide et un pour l'évacuer. Les canaux micro-fluidiques sont réalisés en parylène (PPX) et se rejoignent au milieu de la membrane sur le thermomètre de la membrane.

La figure 5.2 montre les différents masques utilisés lors de la fabrication du capteur. Le développement plus détaillé de chaque élément du capteur est décrit par la suite.

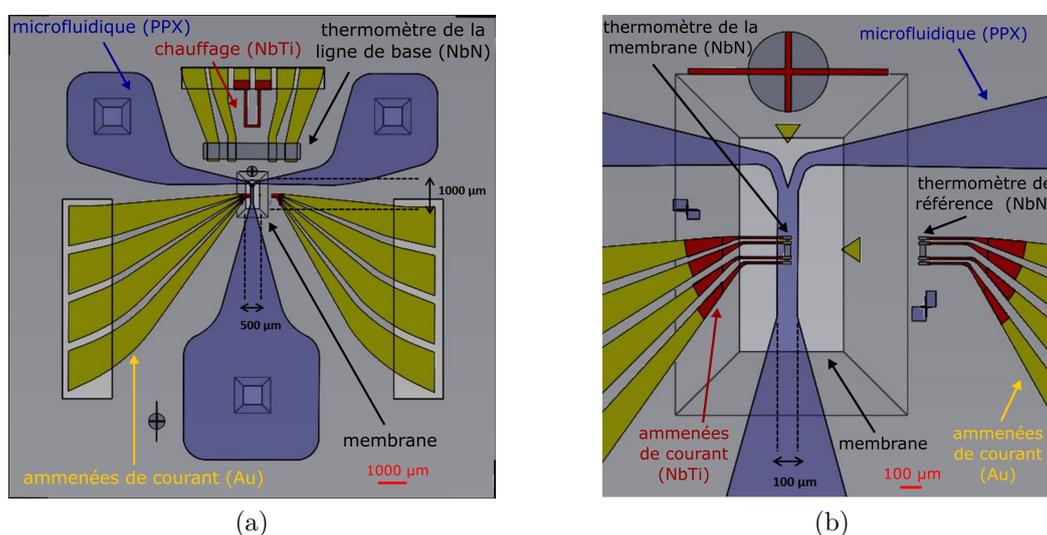


FIGURE 5.2 – Superposition des masques utilisés pour la fabrication du capteur micro-fluidique à plusieurs échelles ((a) et (b)). L'or (amenées de courant) est en jaune, le NbTi (amenées de courant et chauffage) est en rouge, le parylène (canaux micro-fluidiques) est en bleu et le NbN (thermomètres) en gris.

5.1.2 Développement du capteur

Gravure du silicium pour la réalisation de la membrane et des passages de liquide

Le capteur micro-fluidique est fabriqué à partir d'un wafer de silicium de $450\ \mu\text{m}$ d'épaisseur recouvert sur les deux faces par une couche de nitrure de silicium (Si_3N_4 ou SiN) de $100\ \text{nm}$ d'épaisseur. Les wafers sont découpés en carré de $18\ \text{mm} \times 18\ \text{mm}$ sur lesquels seront fabriqués les capteurs. Le silicium est gravé à quatre endroits sur le capteur afin de réaliser la membrane ainsi que les trois trous par lesquels le liquide sera introduit puis évacué du capteur. Pour cela, des fenêtres de SiN sont d'abord gravées en face arrière du capteur par gravure ionique réactive en présence d'ions SF_6 . Le silicium est ensuite gravé dans un bain de KOH à 60°C . La particularité de la gravure humide du silicium au KOH est qu'il s'agit d'une gravure anisotrope le long des plans (111) du silicium. Les membranes et les passages de liquide ont donc la forme d'une pyramide tronquée. Le SiN en face avant est préservé, c'est sur cette couche que seront déposés les différents éléments sur la membrane et cette couche est nécessaire à la réalisation du dépôt des canaux micro-fluidiques au niveau des passages de liquide. La figure 5.3 illustre la gravure du silicium par KOH pour la réalisation des passages de liquide et de la membrane.

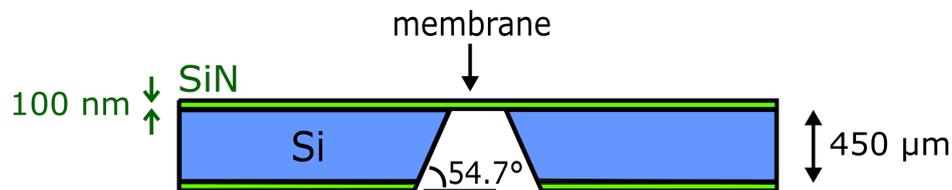


FIGURE 5.3 – Schéma représentant la structure d'un capteur composé de $450\ \mu\text{m}$ de Si et de deux couches de $100\ \text{nm}$ de SiN . Au niveau des passages de liquide et de la membrane, le SiN en face arrière ainsi que le silicium sont gravés ne laissant plus que le SiN en face avant.

Une fois la membrane et les passages de liquide réalisés, il est possible de déposer les différents éléments du capteur. Le capteur est composé d'un chauffage, de trois thermomètres, de contacts électriques, d'un isolant et de canaux micro-fluidiques. Ces éléments sont déposés au cours de cinq étapes de lithographie.

Contactes électriques en or

Les amenées de courant sont principalement réalisées en or (Au). Il y en a quatre par thermomètres de manière à pouvoir mesurer la température des thermomètres en quatre fils et deux pour alimenter le chauffage. L'or est déposé avec un évaporateur à canon à électron. Une couche de $5\ \text{nm}$ de titane est déposée sous la couche de $50\ \text{nm}$ d'or pour permettre l'adhérence de l'or sur la surface.

Contacts électriques et chauffage en niobium titane

Dans la deuxième étape de lithographie, une couche de niobium titane (NbTi) est déposée puis gravée afin de réaliser le chauffage et les amenées de courants. Le NbTi est gravé par gravure chimique avec un mélange d'acides composé de 2% de HF et de 20% de HNO₃. Le chauffage est situé en haut du capteur et permet d'ajuster la température du capteur. Les contacts électriques situés au niveau de la membrane sont également réalisés en NbTi. En effet, la conductivité thermique du NbTi calculée par la loi de Wiedemann-Franz est de 5.4 W.m⁻¹.K⁻¹ ce qui est beaucoup plus faible que celle de l'or (317 W.m⁻¹.K⁻¹). L'utilisation du NbTi permet donc de limiter les fuites thermiques pouvant avoir lieu par l'intermédiaire de l'or au niveau de la membrane. Des plots en Au sont néanmoins réalisés au centre de la membrane pour assurer une bonne qualité de contact électrique entre le thermomètre en NbN et les contacts en NbTi. L'ordre des dépôts est donc le suivant :

1. dépôt des plots et des contacts extérieurs en or
2. dépôt des contacts en NbTi
3. dépôt du thermomètre de NbN (voir figure 5.4)

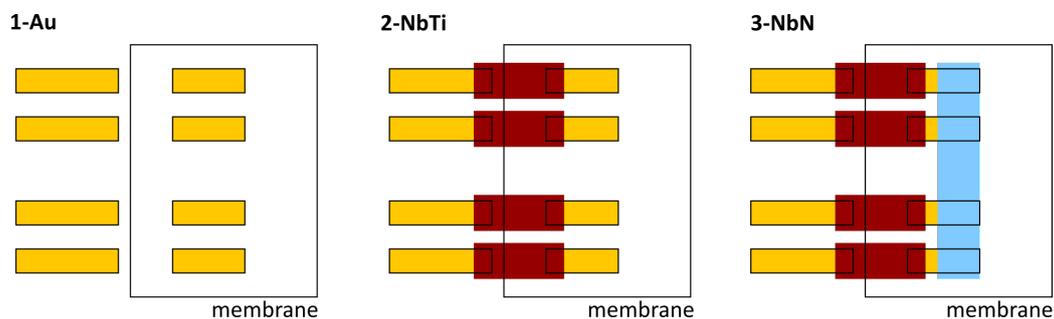


FIGURE 5.4 – Schéma représentant les étapes nécessaires aux dépôts du thermomètre et des amenées de courant au niveau de la membrane. À gauche : les plots et les contacts externes en Au sont déposés. Au milieu : les contacts en NbTi sont déposés. À droite : le thermomètre en NbN est déposé.

Thermomètres

Trois thermomètres de nitrure de niobium (NbN) sont présents sur le capteur. Le thermomètre de la membrane situé au milieu de la membrane là où les deux liquides injectés se rencontrent, un thermomètre de référence ayant les mêmes dimensions que le thermomètre de mesure est situé proche de la membrane mais à l'extérieur de celle-ci afin de permettre la réalisation de mesures différentielles avec le thermomètre de la membrane. Enfin, un troisième thermomètre est situé à côté du chauffage pour permettre le contrôle

de la température du capteur (thermomètre de la ligne de base). Les thermomètres de mesures et de références ont des dimensions de $30\ \mu\text{m} \times 60\ \mu\text{m}$ et le thermomètre du chauffage de $600\ \mu\text{m} \times 1200\ \mu\text{m}$. Leur épaisseur est de $70\ \text{nm}$.

Le NbN est un matériau à transition métal isolant à coefficient de température négatif. Il est utilisé pour des mesures allant des basses température à l'ambiante [135]. Nous avons choisi le NbN pour la réalisation des thermomètre car il peut être déposé en couche mince et les coefficients de température de thermomètres de NbN à l'ambiante peuvent atteindre les $10^{-2}\ \text{K}^{-1}$ ce qui est bien meilleur que les thermomètres de platine qui ont un coefficient de température de $4 \cdot 10^{-3}\ \text{K}^{-1}$ lorsqu'ils sont massifs et de $2 \cdot 10^{-3}\ \text{K}^{-1}$ lorsqu'ils sont déposés en couche mince.

Couche isolante

Une fois les thermomètres, les contacts et le chauffage déposés, une couche isolante de ZrO_2 est déposée par ALD (atomic layer deposition) au niveau de la membrane de manière à isoler le liquide des composants électriques. Nous avons effectué des tests en déposant plusieurs isolants (ZrO_2 , Al_2O_3 , HfO_2) puis les canaux microfluidiques par dessus. Le ZrO_2 a été choisi car le parylène adhère bien sur sa surface et il peut, de plus, être déposé à la température relativement basse de 90°C . Ces tests ont en effet permis de voir que le parylène adhère très mal sur l'alumine (Al_2O_3).

Canaux microfluidiques

La dernière étape est la réalisation des canaux micro-fluidiques. Ceux-ci sont effectués en parylène VT4. Le parylène VT4 est une variante fluoré du parylène plus classique ce qui le rend plus résistant aux solvants et à la température. Les grands avantages du parylène par rapport au PDMS qui est plus couramment utilisé pour la réalisation de canaux micro-fluidiques sont son mode de déposition et ses faibles dimensions. Pour la réalisation des canaux micro-fluidiques, de la résine S1818 est tout d'abord déposée et lithographiée au niveau des canaux micro-fluidiques. Le parylène est ensuite déposé par un procédé de dépôt chimique en phase vapeur (CVD). L'épaisseur de parylène déposée est de $3\ \mu\text{m}$. Afin de retirer la résine située à l'intérieur des canaux, le SiN encore présent sous la résine est gravé au niveau des passages de liquide par gravure ionique réactive en présence de SF_6 . La résine est ensuite retirée à l'acétone libérant les canaux micro-fluidiques. Ce processus est décrit dans la figure 5.5. La figure 5.6 fournit un schéma des différents éléments placés sur la membrane après le retrait de la résine.

L'utilisation de parylène pour la micro-fluidique permet la réalisation de canaux de très faibles épaisseurs ($3\ \mu\text{m}$) enfermant un volume de liquide lui aussi très petit. La hauteur des canaux est en fait déterminée par la hauteur de la résine S1818 déposée auparavant, elle est donc d'environ $2\ \mu\text{m}$. Les faibles dimensions des canaux micro-fluidiques permettent

de limiter les fuites thermiques à travers les canaux et le liquide ainsi que la capacité calorifique de l'ensemble. De plus, le mode de dépôt utilisant une couche sacrificielle de résine S1818 facilite grandement la réalisation des canaux. En PDMS, les canaux sont moulés à l'extérieur du capteur puis collés après un traitement plasma sur le capteur. L'alignement et le collage des canaux sont donc des étapes sensibles qui n'existent plus avec l'utilisation du parylène.

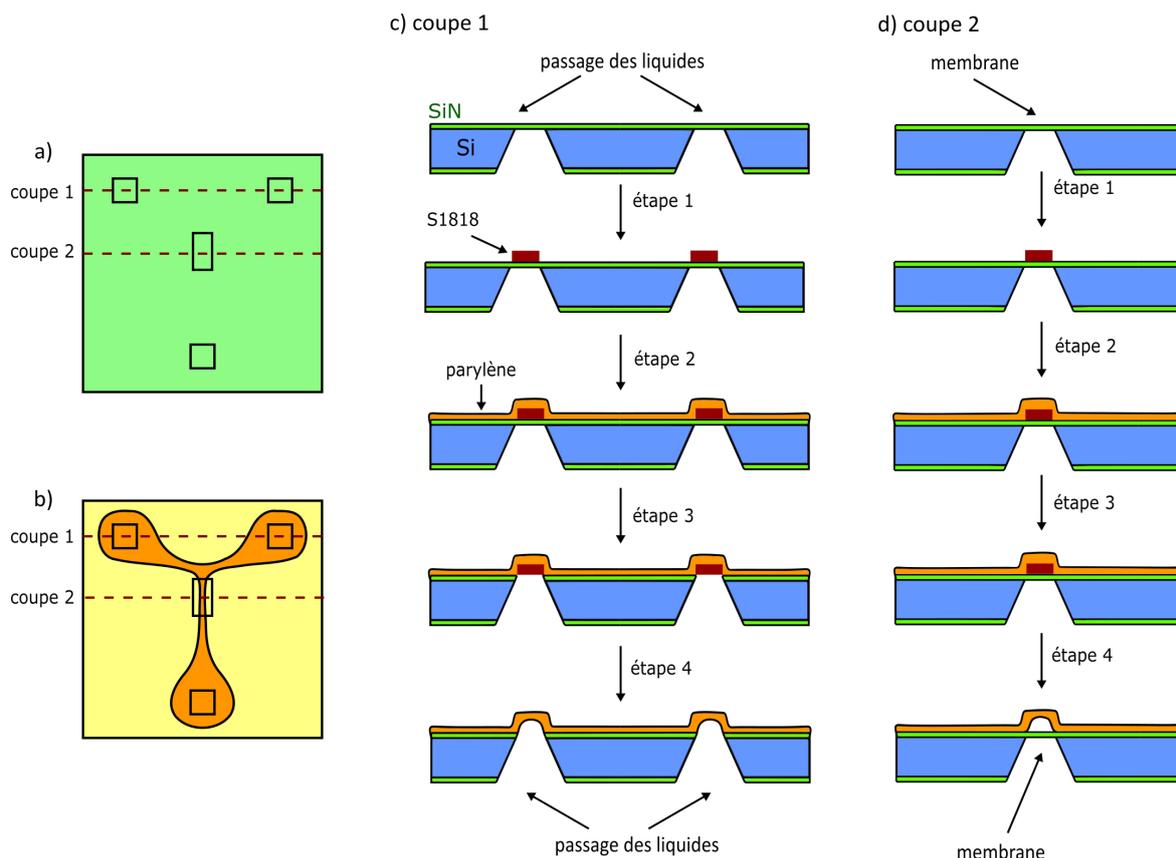


FIGURE 5.5 – Schéma du capteur avant (a) et après (b) la réalisation des canaux microfluidiques. Les lignes rouges pointillées correspondent aux coupes utilisées dans c) et d). c) Différentes étapes nécessaires à la réalisation des canaux microfluidiques au niveau des passages de liquide. d) Différentes étapes nécessaires à la réalisation des canaux microfluidiques au niveau de la membrane. Étape 1 : dépôt de la résine S1818. Étape 2 : dépôt du parylène. Étape 3 : gravure du SiN au niveau des passages de liquide. Étape 4 : retrait de la résine avec de l'acétone.

Les canaux microfluidiques ont été testés indépendamment du reste du capteur avec des liquides fluorescents afin de vérifier que les liquides peuvent être transportés sans fuite à travers les canaux. Les photos des résultats préliminaires sont sur la figure 5.7. La connectique n'a pas pu être développée et l'injection des liquides dans les canaux a été effectuée par capillarité. Des photos d'un capteur complet ainsi que d'un capteur sans microfluidique sont données sur la figure 5.8. Les capteurs sans microfluidique ont été calibrés et leurs performances seront décrites dans la partie 5.4.

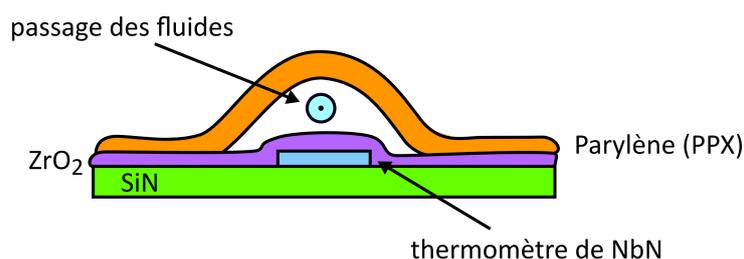


FIGURE 5.6 – Schéma représentant les différents éléments sur la membrane : le thermomètre de NbN est en bleu, la couche isolante de ZrO₂ est en violet, les canaux microfluidiques de parylène en orange.

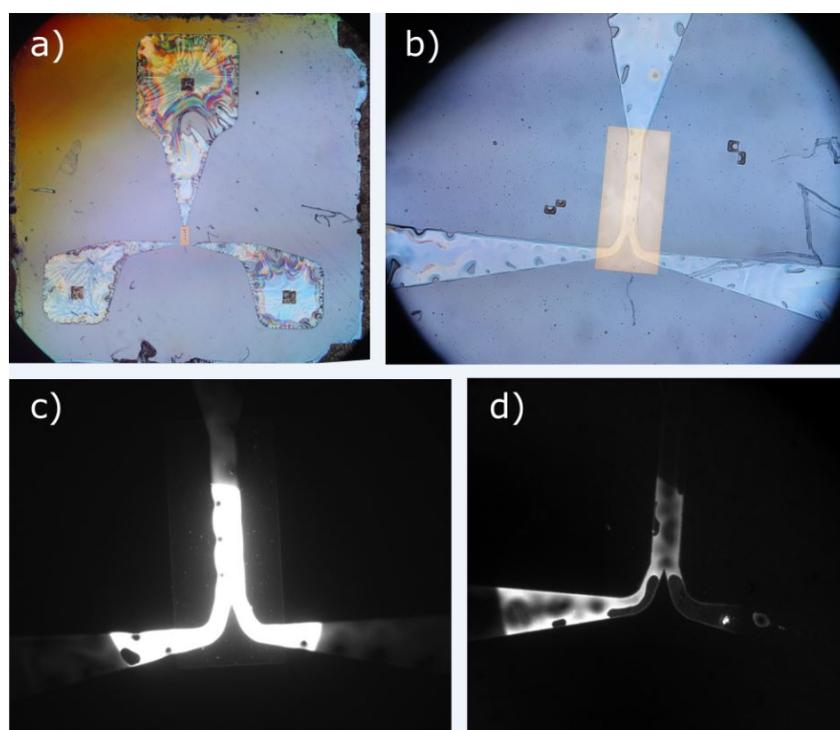


FIGURE 5.7 – Photos des canaux micro-fluidiques en parylène. a) Canaux complets remplis d'eau. b) Zoom sur la membrane. c) canaux micro-fluidiques remplis de liquide fluorescent. d) Canaux micro-fluidiques dans lesquels un liquide fluorescent a été injecté par l'un des deux passages de liquide.

Caractéristiques thermiques du capteur

Les choix qui ont été effectués concernant le développement du capteur sont globalement de minimiser les fuites thermiques entre la chambre de réaction et l'extérieur ainsi que la capacité calorifique globale du capteur. Ainsi, la mesure est effectuée sur une membrane de SiN et la micro-fluidique est réalisée en parylène. Les caractéristiques thermiques (conductivité thermiques et chaleurs spécifiques) des différents éléments placés sur la membrane

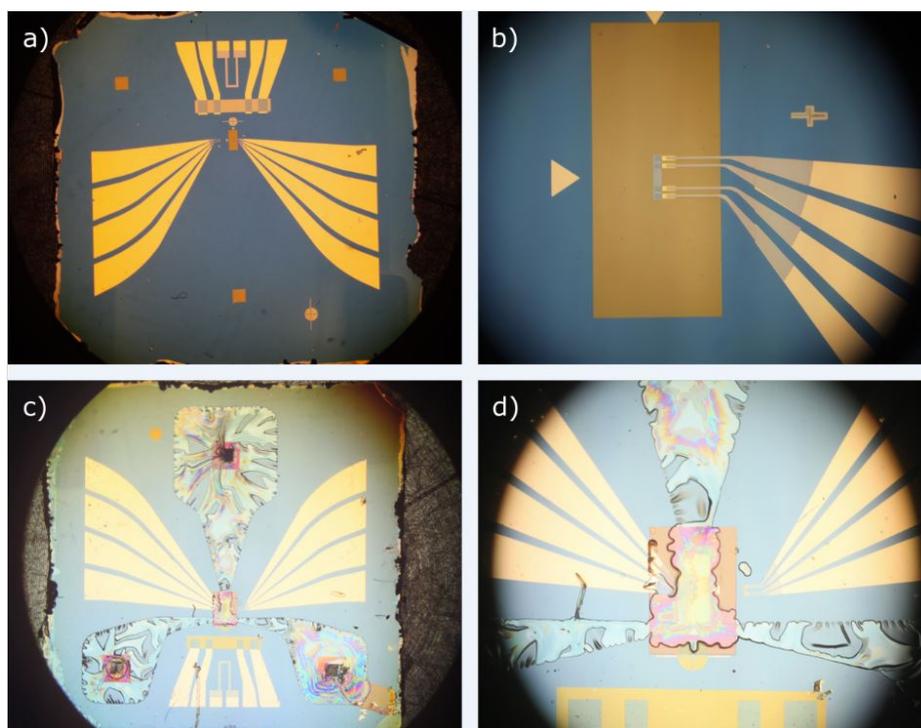


FIGURE 5.8 – Photos des capteurs. a) et b) Capteurs sans micro-fluidique. c) et d) Capteurs complets

sont indiqués sur le tableau 5.1. Les capacités calorifiques et conductances thermiques sont aussi calculées à partir des dimensions des différents éléments. De cette manière, on a pu calculer la capacité calorifique et la conductance thermique totale prenant en compte la membrane en SiN, les éléments de thermométrie ainsi que la présence d'un échantillon liquide. Si on compare les valeurs obtenues avec celles calculées pour des canaux micro-fluidiques de $50\ \mu\text{m}$ réalisés en PDMS, on remarque que l'utilisation du PDMS aurait multiplié par 10 la conductance thermique ainsi que la capacité calorifique de la cellule de mesure. L'utilisation du parylène permet de réaliser des canaux micro-fluidiques sans augmenter de manière importante la conductance thermique ainsi que la capacité calorifique du capteur.

L'objectif du capteur est d'être capable de mesurer des puissances de l'ordre du nW. Pour cela, il est nécessaire de placer le capteur dans un environnement très stable en température afin de détecter des variations de température très faibles. C'est le rôle du calorimètre à étages régulés qui a été développé au cours de cette thèse et qui va être décrit dans la suite.

	SiN	ZrO ₂	NbTi	PPx	eau	cellule de mesure	canaux en PDMS de 50 μm
λ (W.m ⁻¹ .K ⁻¹)	3.0	3.0	5.4	0.1	0.6	-	0.15
c (J.K ⁻¹ .Kg ⁻¹)	890	460	400	800	4180	-	1460
K (W.K ⁻¹)	$6.7 \cdot 10^{-7}$	$3.3 \cdot 10^{-7}$	$1.1 \cdot 10^{-8}$	$6.7 \cdot 10^{-7}$	$7.2 \cdot 10^{-7}$	$2.9 \cdot 10^{-6}$	$1.3 \cdot 10^{-4}$
C (J.K ⁻¹)	$5.8 \cdot 10^{-8}$	$6.8 \cdot 10^{-8}$	$4.7 \cdot 10^{-14}$	$1.6 \cdot 10^{-6}$	$1.3 \cdot 10^{-6}$	$2.9 \cdot 10^{-6}$	$3.5 \cdot 10^{-5}$

TABLE 5.1 – Propriétés thermiques des différents éléments du capteur et d'un canal micro-fluidique de 50 nm d'épaisseur réalisé en PDMS avec : la conductivité thermique λ , la chaleur spécifique c , la conductance thermique K et la capacité calorifique C .

5.2 Développement du calorimètre

5.2.1 Description du calorimètre

Le calorimètre a été développé et fabriqué avec l'aide des pôles Capteur et Cryogénie de l'Institut Néel. Il permet d'isoler thermiquement le thermomètre afin d'être capable de mesurer des très faibles variations de température. Il est composé de quatre étages régulés séparés les uns des autres par des écrans en cuivre à la manière d'une poupée russe. Ainsi, chaque étage possède une régulation plus sensible que le précédent. La figure 5.9 montre des photos du calorimètre et des écrans avant et après le câblage.

5.2.2 Système de pompage et micro-fluidique

La particularité de ce calorimètre est qu'il doit permettre la mesure d'échantillons liquides. Le calorimètre doit pouvoir être mis sous vide afin de limiter la conduction thermique entre les différents écrans mais le dernier étage dans lequel les mesures seront effectuées doit pouvoir être sous air ou sous atmosphère contrôlée. Il doit donc y avoir deux étages étanches dans le calorimètre (l'étage le plus externe et l'étage le plus interne) et on doit être capable d'acheminer les liquides et les fils de mesure jusqu'au dernier étage. Les socles des étages 0 et 3 sont donc plus épais et possèdent un joint torique permettant aux deux étages d'être étanches. Le pompage principal est réalisé à travers l'étage 0. Les étages 1 et 2 sont troués ce qui permet le pompage et le passages des fils à travers les étages 0, 1 et 2. Cinq passages permettent au niveau de l'étage 0 puis 3 le passage des fils, des liquides et

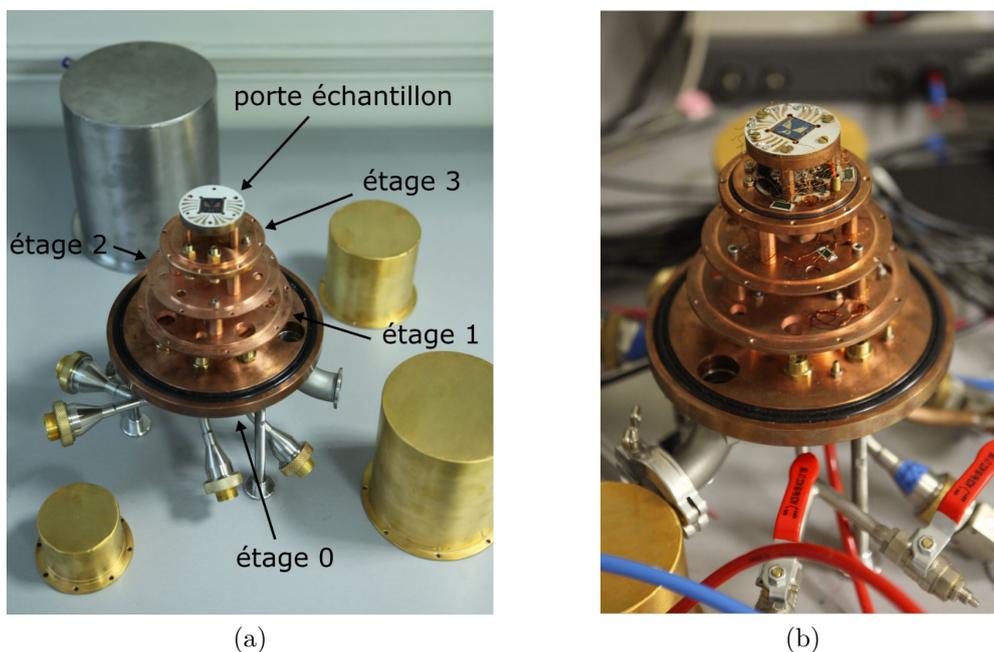


FIGURE 5.9 – a) Photo du calorimètre non câblé avec les écrans. b) Photo du calorimètre câblé avec le capteur final installé sur le dernier étage.

de l'air. Les liquides sont amenés vers le porte-échantillon dans trois tubes PEEK 1/32". Ils passent à travers les socles des étages 0 et 3 grâce à un système de presse-étoupe. Deux tubes de cuivre relient également les étages 0 et 3 de manière étanche. L'un d'entre eux est utilisé pour faire passer les fils de cuivre nécessaires aux mesures sur l'étage 3 et le deuxième est utilisé pour contrôler l'atmosphère dans le dernier étage. La figure 5.10 montre un schéma des systèmes de pompage et de fluïdique dans le calorimètre. Pour plus de clarté, seul un passage a été dessiné sur les trois nécessaires à la fluïdique et sur les deux nécessaires au passage de l'air et des fils.

5.2.3 Régulation des étages

L'étage 0 est régulé à 30°C à l'aide d'une circulation d'eau régulée en température par un bain thermostaté Julabo. L'eau circule dans le socle et dans l'écran externe en inox du calorimètre. Un module Peltier placé entre l'étage 0 et l'étage 1 est utilisé pour réguler l'étage 1 à 34°C. Ici, le module Peltier est utilisé pour chauffer l'étage 1 mais il peut également faire office de source froide dans le cas d'un dégagement de chaleur important dans les étages supérieurs.

Les étages 2 et 3 sont régulés avec des chauffages composés de quatre résistances chauffantes MSR d'une résistance totale de 200 Ω . La température est mesurée sur une résistance de platine montée dans un pont de Wheatstone. Les ponts de Wheatstone sont

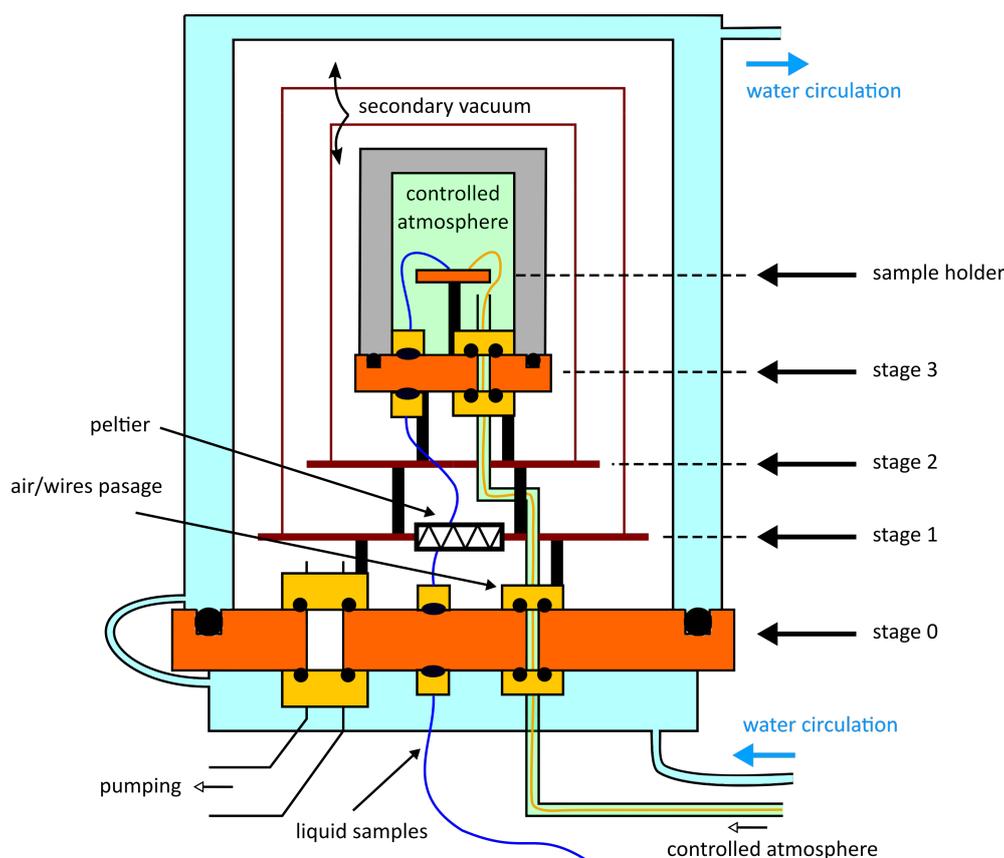


FIGURE 5.10 – Représentation schématique du calorimètre et des ouvertures permettant les passages de l'air, des liquides et des fils. Les étages 0 et 3 sont étanches. Le pompage principal est effectué sur les étages 0, 1 et 2. Trois passages permettent l'acheminement des liquides jusqu'à l'étage 3 par des presse-étoupe situés sur les étages 0 et 3. Deux tuyaux de cuivre permettent les passages de l'air et des fils entre l'étage 0 et l'étage 3. Seul un passage pour le liquide et un passage air/fil sont représentés sur le schéma.

des ponts de résistances composés d'une résistance de mesure (R_{mes} sur la figure 5.11), d'une résistance permettant d'équilibrer le pont (R_1), et de deux résistances fixes (R_2). La résistance de mesure est une thermistance dont la résistance est directement liée à la température de l'étage. Des résistances de platine Pt1000 pour l'étage 2 et Pt100 pour l'étage 3 sont utilisées. Le pont est alimenté et mesuré par une détection synchrone SR7230 (Ametek). Le schéma de la régulation des étages 2 et 3 avec le pont de Wheatstone est donné sur la figure 5.11. Dans le pont de Wheatstone, la tension V_{out} peut s'exprimer en fonction de V_{in} et des résistances du pont comme :

$$V_{out} = V_{in} \frac{R_1 R_2 - R_{mes} R_2}{(R_{mes} + R_2)(R_1 + R_2)} \quad (5.1)$$

Lorsque le pont est équilibré, alors $R_{mes} = R_1$ et $V_{out} = 0$. Le pont est régulé de manière à être à l'équilibre avec $V_{out} = 0$. La tension au borne du pont est mesurée par une détection synchrone, puis un contrôleur PID envoie une consigne à la source de courant alimentant

les chauffages de manière à avoir la température pour laquelle $R_{mes} = R_1$. La résistance R_1 est donc choisie en fonction de la température souhaitée au niveau de l'étage. Sur l'étage 2, $R_1 = 1140 \Omega$, sur l'étage 3 $R_1 = 115 \Omega$ ce qui donne comme température d'équilibre pour chaque pont $T_{\text{étage } 2} = 36^\circ C$ et $T_{\text{étage } 3} = 38.6^\circ C$.

L'utilisation de pont de Wheatstone à l'équilibre permet d'augmenter considérablement la sensibilité de la mesure. En effet, les mesures de tension obtenues par les détections synchrones sont codées en 16 bits. La sensibilité de la mesure est donc bien plus grande sur un pont à l'équilibre mesurant une tension proche de 0 que sur une mesure en quatre fils dans laquelle la tension mesurée est $U = RI$.

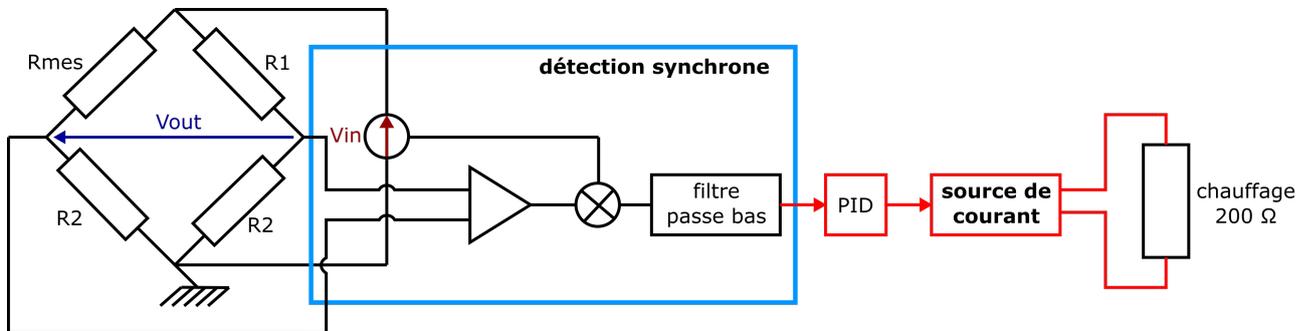


FIGURE 5.11 – Schéma représentant la régulation des étages 2 et 3 avec un pont de Wheatstone, un chauffage de 200Ω , une détection synchrone et une source de courant. La résistance de mesure est une Pt1000 sur l'étage 2 et une Pt100 sur l'étage 3. Le pont est alimenté et mesuré par une détection synchrone SR7230. Un régulateur PID envoie ensuite une consigne à la source de courant qui alimente les résistances chauffantes afin d'avoir la température pour laquelle $R_{mes} = R_1$.

Les mêmes types de régulation sont effectués au niveau de l'échantillon pour le contrôle de la température de la ligne de base et la mesure du thermomètre situé sur la membrane. Le thermomètre de NbN de la ligne de base est monté sur un pont de Wheatstone dans lequel la résistance R_1 est réalisée par une résistance variable (IET). La mesure de la température permet de contrôler une source de courant alimentant le chauffage en NbTi situé sur l'échantillon.

Pour la mesure au niveau de la membrane, la résistance de mesure est le thermomètre de NbN de la membrane, la résistance R_1 est la mise en série du thermomètre de référence de NbN avec une résistance variable.

Sur les étages 0, 1 et 2, des résistances de platines Pt1000 sont mesurées en quatre fils par le système MMR3 développé à l'Institut Néel. Ces résistances permettent de calibrer les différents ponts de régulation.

5.3 Mesures de la régulation du calorimètre

Régulation des étages 2 et 3

La température a été mesurée sur les étages 2 et 3 pendant 14 heures et les graphes correspondant au nombre de points mesurés dans une fenêtre de deux valeurs de tension mesurées sur le pont ou des deux valeurs de température correspondantes sont sur les figures 5.12 et 5.13. Les courbes obtenues peuvent être ajustées par des gaussiennes dont l'écart type nous donne le bruit de la mesure. On obtient ainsi un bruit de $\sigma = 14.3 \text{ nV}/\sqrt{\text{Hz}}$ sur l'étage 2 et de $\sigma = 9.9 \text{ nV}/\sqrt{\text{Hz}}$ sur l'étage 3 ce qui correspond à une régulation en température de $11.4 \text{ } \mu\text{K}/\sqrt{\text{Hz}}$ sur l'étage 2 et $9.7 \text{ } \mu\text{K}/\sqrt{\text{Hz}}$ sur l'étage 3. On arrive donc avec une variation de la température sur le dernier étage 10 fois plus faible que sur l'ITC commerciale.

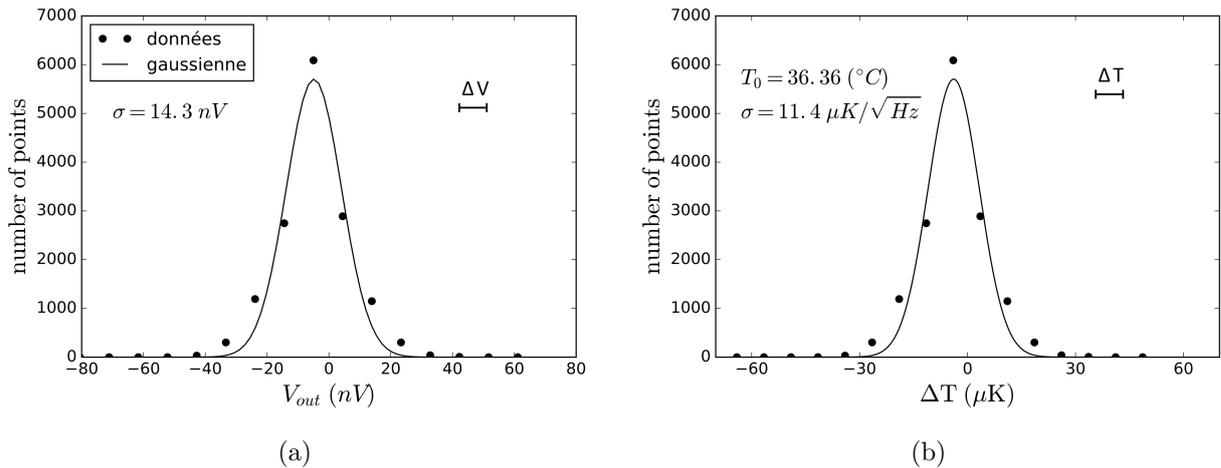


FIGURE 5.12 – Mesure du bruit lors de la régulation en température de l'étage 2. a) nombres de points au cours d'une mesure de 14 h sur la tension mesurée par le pont V_{out} . b) Correspondance en température.

Calcul du bruit

Le bruit obtenu lors de la régulation des étages 2 et 3 est un bruit blanc puisqu'il peut être ajusté par une gaussienne. Le bruit minimal que l'on peut obtenir est limité par le bruit thermique présent à l'intérieur des résistances et par le bruit des détections synchrones. Le bruit thermique ou bruit Johnson s'exprime comme :

$$V_{Johnson} = \sqrt{4k_B T R \Delta f} \quad (5.2)$$

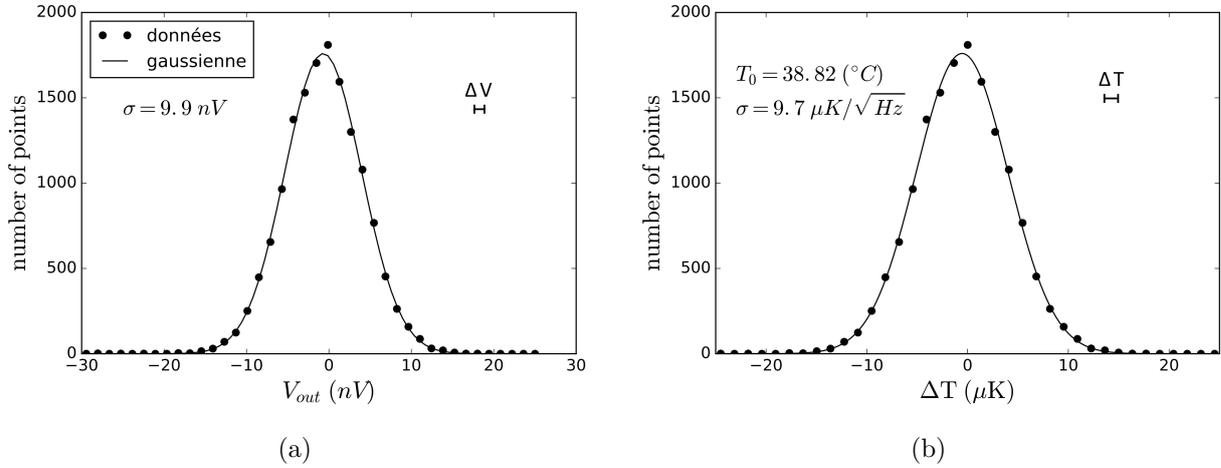


FIGURE 5.13 – Mesure du bruit lors de la régulation en température de l'étage 3. a) nombres de points au cours d'une mesure de 14 h sur la tension mesurée par le pont V_{out} . b) Correspondance en température.

avec k_B la constante de Boltzmann, T la température, R la résistance équivalente du pont, et Δf la bande passante considérée. À 300 K, on a donc :

$$V_{Johnson} = 0.13\sqrt{R} \text{ nV}/\sqrt{\text{Hz}} \quad (5.3)$$

Dans le troisième étage, la résistance équivalente du pont est de 150Ω , donc $V_{Johnson} = 1.6 \text{ nV}/\sqrt{\text{Hz}}$. À ce bruit il faut ajouter le bruit de la détection synchrone qui est indiqué être de $5 \text{ nV}/\sqrt{\text{Hz}}$. Le bruit minimal qu'on peut obtenir est donc :

$$V_{bruit} = \sqrt{1.6^2 + 5^2} = 5.25 \text{ nV}/\sqrt{\text{Hz}}$$

On obtient sur la mesure du pont un bruit d'environ $10 \text{ nV}/\sqrt{\text{Hz}}$ ce qui n'est que le double du bruit minimum que l'on peut obtenir. On pourrait donc réduire le bruit obtenu sur l'étage 3 jusqu'à $5.25 \text{ nV}/\sqrt{\text{Hz}}$ mais nous ne sommes pas loin de la limite minimale de bruit que l'on peut atteindre. Le capteur micro-fluidique va donc être placé dans un environnement régulé avec un écart type de température de $9.7 \mu\text{K}$. Nous allons maintenant voir les mesures qui ont été faites sur des capteurs à l'intérieur du calorimètre et en déduire ainsi la sensibilité du capteur.

5.4 Caractérisations des capteurs

5.4.1 Calcul des coefficients de températures

Nous profitons de la régulation ultrasensible en ΔT pour étalonner les thermomètres de NbN et mesurer leur sensibilité ainsi que leur dérive dans le temps. La dérive de thermo-

mètres en NbN n'avait en effet jamais été mesurée. Deux thermomètres ont été étudiés sur un même capteur, il s'agit du thermomètre de la membrane ainsi que du thermomètre de la ligne de base. La figure 5.14 représente schématiquement la position des deux thermomètres. Le thermomètre de la ligne de base est situé au niveau du capteur sur le silicium massif alors que le second est sur la membrane. Le thermomètre sur la membrane est le thermomètre qui sera utilisé principalement pour les mesures des échantillons alors que le thermomètre de la ligne de base sera utilisé pour réguler le capteur. Les dimensions des deux thermomètres sont très différentes : $30 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$ pour le thermomètre de la membrane et $600 \mu\text{m} \times 1200 \mu\text{m}$ pour le thermomètre de la ligne de base. De plus, le thermomètre de la membrane possède des contacts électriques plus résistifs car une partie est réalisée en NbTi.

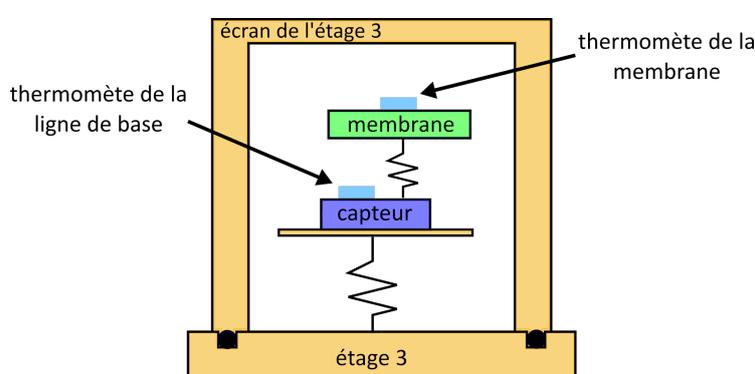


FIGURE 5.14 – Schéma représentant la position des deux thermomètres qui ont été caractérisés. Le thermomètre de la ligne de base est sur le silicium massif sur capteur lui-même installé dans l'étage 3 du calorimètre. Le second thermomètre est sur la membrane du capteur.

Les différents thermomètres ont été mesurés en pont de Wheatstone en utilisant comme résistance R_1 une résistance variable. La température de l'étage 3 a été modifiée et la résistance des thermomètres a été mesurée à chaque température. Les graphes donnant la résistance en fonction de la température de l'étage pour chaque thermomètre sont dans la figure 5.15. Le coefficient de température des thermomètres $\alpha = \frac{1}{R} \frac{dR}{dT}$ a donc pu être mesuré. On obtient $\alpha = -2.79 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ pour le thermomètre sur la membrane et $\alpha = -5.9 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ pour le thermomètre du chauffage. Pour le thermomètre de la membrane, le coefficient α a été mesuré en pont donc les résistances de contact sont prises en compte dans la mesure. Or ces résistances de contacts sont très importantes puisqu'elles représentent plus de 50% de la résistance totale. On mesure en effet en quatre fils une résistance de 1900Ω alors que la résistance totale est de 4900Ω . Si on recalcule le coefficient de température sans prendre en compte les résistances de contact, on obtient $\alpha_{\text{NbN}} = \alpha \frac{4900}{1900} = -7.20 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ ce qui est plus conforme aux valeurs habituelles des thermomètres de NbN mesurés à l'ambiante. Cependant, lorsqu'on effectue les mesures en pont, on mesure également les résistances de contacts et donc le α apparent est celui qui a été mesuré à $-2.79 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$. Il pourrait donc être plus judicieux d'utiliser plutôt qu'un montage en pont de Wheatstone, un montage en pont différentiel ce qui permettrait

de s'affranchir des résistances de contact relativement importantes. Le montage en pont différentiel est représenté sur la figure 5.16.

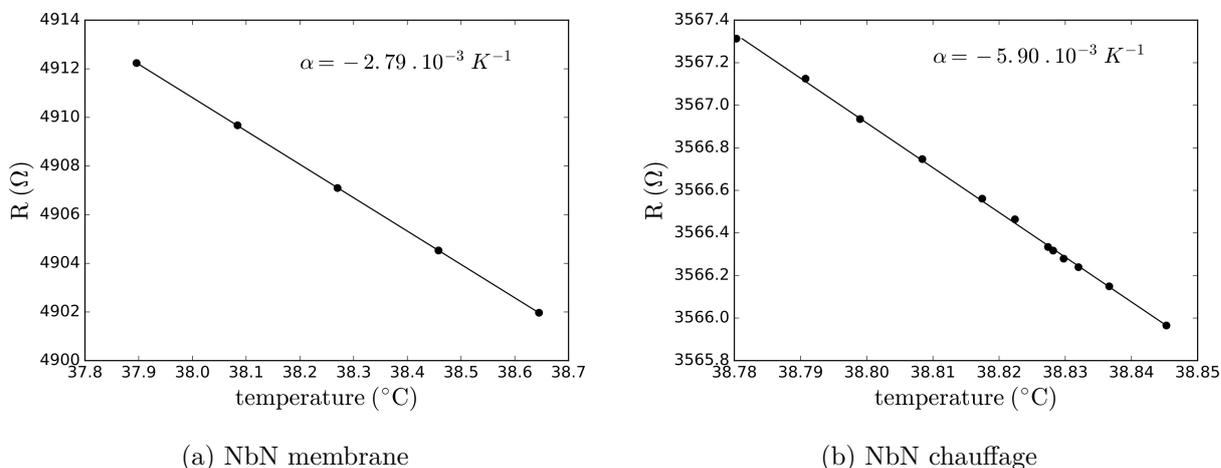


FIGURE 5.15 – Mesure de la résistance des thermomètres de la membrane (a) et de la ligne de base (b) en fonction de la température de l'étage 3. L'ajustement des données par une droite permet la mesure du coefficient de température qui est de $-2.79 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ pour le thermomètre de la membrane et de $-5.9 \cdot 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ pour le thermomètre de la ligne de base.

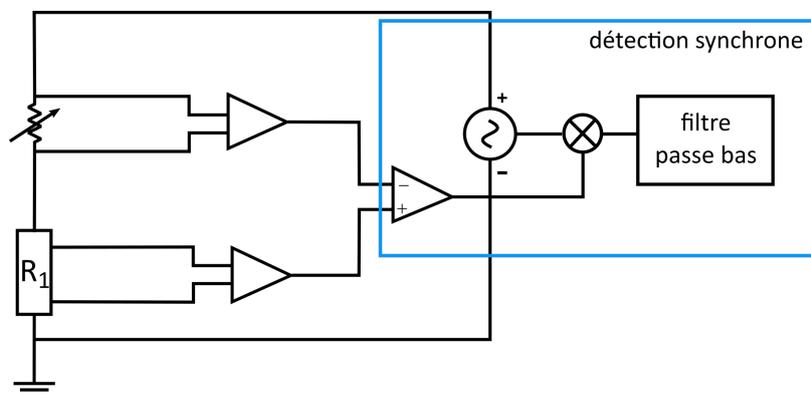


FIGURE 5.16 – Schéma d'un pont différentiel avec une résistance de mesure R_1 , une résistance variable et une détection synchrone.

5.4.2 Mesure du bruit et de la dérive des thermomètres

La dérive et le bruit des thermomètres sur la membrane et sur la ligne de base ont été mesurés pendant respectivement 170 et 120 heures. Les résultats sont sur les figures 5.17 et 5.18. Les résultats obtenus sont assez différents pour les deux thermomètres.

Pour le thermomètre situé sur la membrane, la dérive de la résistance est de $2.5 \text{ m}\Omega/\text{h}$ ce qui représente en terme de mesure de température $-184 \text{ }\mu\text{K}/\text{h}$. Pour le thermomètre de la ligne de base, la dérive est plus faible, de $210 \text{ }\mu\Omega/\text{h}$, correspondant à une dérive en température de $-10 \text{ }\mu\text{K}/\text{h}$. Les résistances augmentent au cours du temps ce qui est certainement dû à des réarrangements des contraintes à l'intérieur du NbN. On remarque que lorsque le thermomètre est de taille plus importante comme c'est le cas pour le thermomètre placé proche du chauffage, la dérive est 10 fois plus faible. Cela peut être dû au fait que les résistances de contacts sont bien plus importantes pour le thermomètre de la membrane. Un montage en pont différentiel permettrait, dans le cas du thermomètre de la membrane, de mesurer la dérive du NbN sans prendre en compte celle des résistances de contacts.

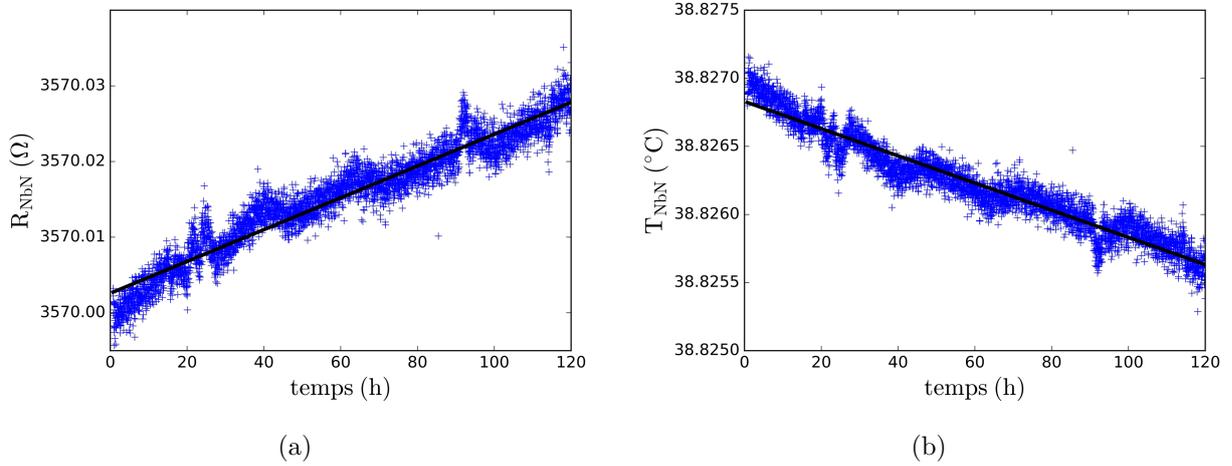


FIGURE 5.17 – Mesure de la résistance du thermomètre de NbN de la ligne de base (a) et sa correspondance en température (b) en fonction du temps pendant 120 h. Les dérivées moyennes de la résistance et de la température ont été ajustées par une ligne noire.

Les bruits des thermomètres ont été mesurés comme pour les étages 2 et 3 par un ajustement de la mesure par une gaussienne après avoir soustrait la dérive des courbes de R et de T en fonction du temps. Les résultats sont donnés sur les figures 5.19 et 5.20. Le bruit du thermomètre du chauffage est plus faible que celui du thermomètre de la membrane. Les écarts types obtenus sont pour la membrane de $\sigma_{membrane} = 4.9 \text{ m}\Omega$ correspondant à un écart type en température de $354 \text{ }\mu\text{K}$. Pour le thermomètre du chauffage, on a $\sigma_{LB} = 2.1 \text{ m}\Omega$ ce qui correspond en terme de température à un bruit de $100 \text{ }\mu\text{K}$. Le bruit correspond dans le cas du thermomètre de la membrane à 2 h de dérive et pour le thermomètre de la ligne de base à 10 h de dérive. On va donc être limité par le bruit et non pas par la dérive du NbN car les mesures seront effectuées sur un temps court allant de quelques secondes à quelques minutes. La dérive est alors, sur ces échelles de temps, bien plus faible que le bruit du thermomètre. De même, on observe que le bruit sur la régulation de l'étage 3 est 10 fois plus faible que celui sur la mesure des thermomètres. il est donc inutile d'essayer de réduire le bruit de régulation de l'étage 3. Pour avoir des

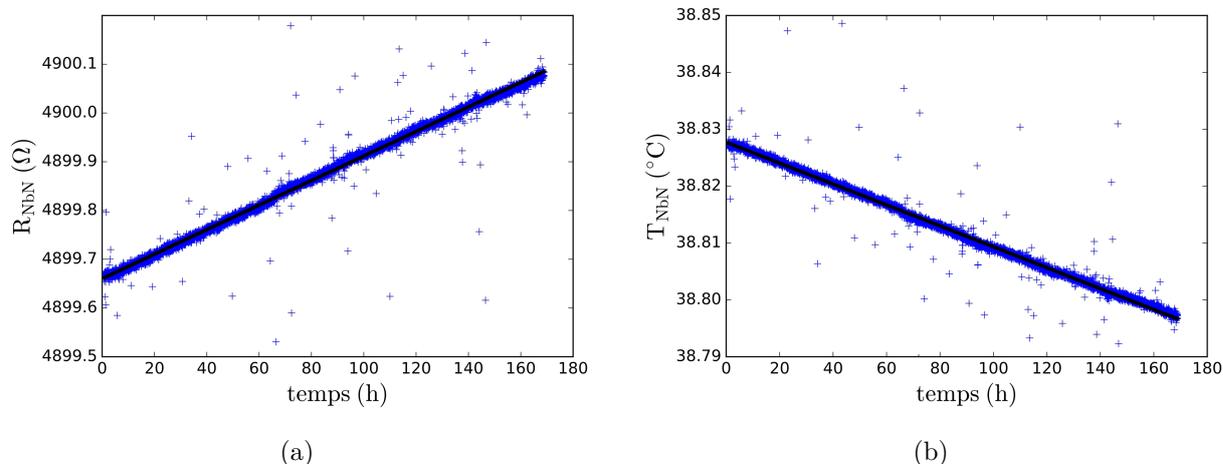


FIGURE 5.18 – Mesure de la résistance du thermomètre de NbN de la membrane (a) et sa correspondance en température (b) en fonction du temps pendant 170 h. Les dérives moyennes de la résistance et de la température ont été ajustées en noir.

mesures les plus précises possible, c'est le bruit des thermomètres de NbN qu'il va être nécessaire de réduire.

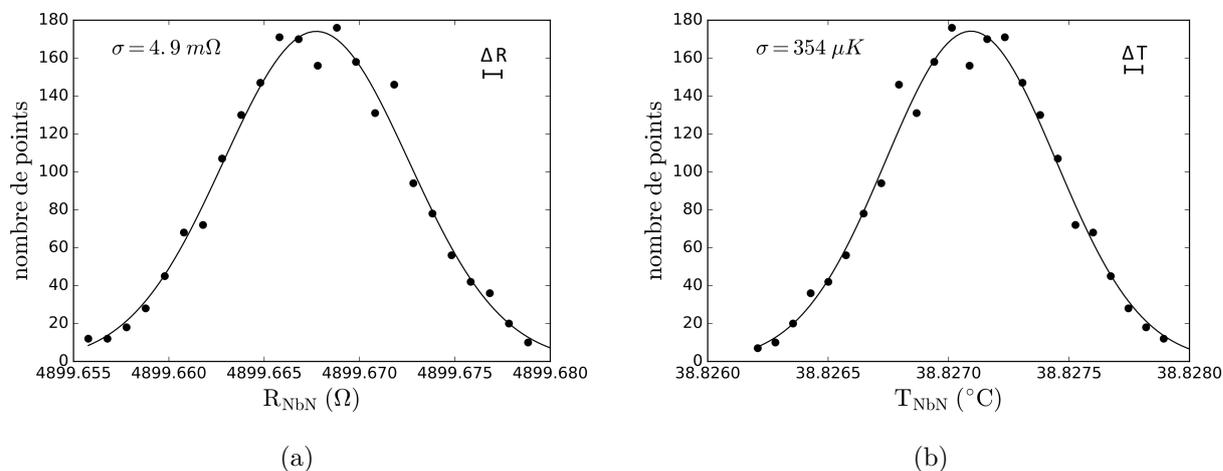


FIGURE 5.19 – Mesure du bruit de la résistance de NbN et de sa correspondance en température sur le thermomètre de la membrane. Une gaussienne (ligne noire) est ajustée pour chaque courbe.

Si on regarde le thermomètre de la membrane, on peut calculer que le bruit thermique correspondant à la résistance de 5 kΩ et à la bande passante utilisée est de 1.5 nV. Le bruit mesuré sur le thermomètre de la membrane est de 21 nV. Il est donc possible de diminuer le bruit du thermomètre de la membrane par 10 et ainsi augmenter la sensibilité

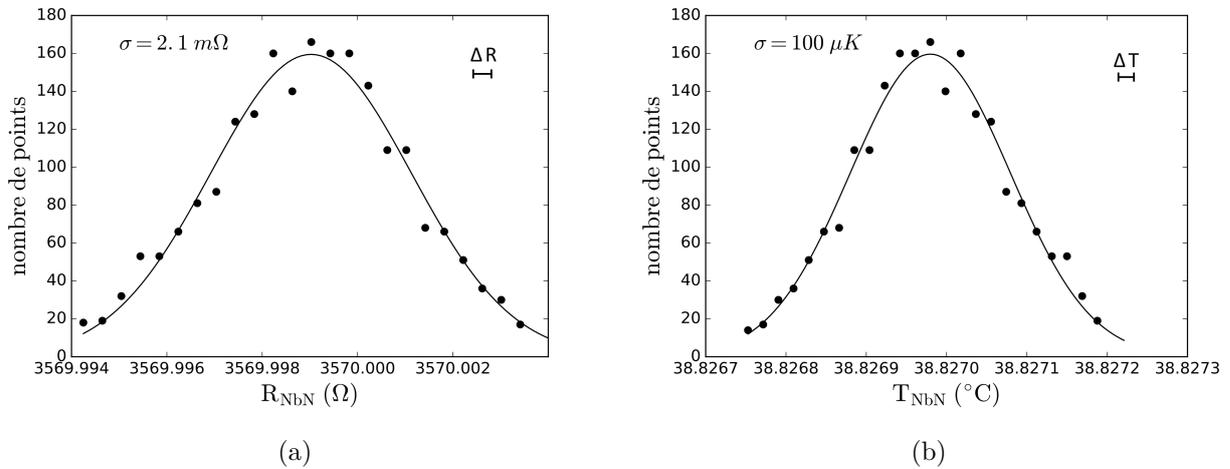


FIGURE 5.20 – Mesure du bruit de la résistance de NbN et de sa correspondance en température sur le thermomètre de la ligne de base. Une gaussienne (ligne noire) est ajustée pour chaque courbe.

du capteur. Le bruit est plus important sur le thermomètre de la membrane que sur le thermomètre de la ligne de base qui est plus gros et sans contact intermédiaire en NbTi. Le surplus de bruit sur le thermomètre de la membrane est donc certainement dû à des résistances de contact trop importantes. Il va donc être nécessaire d'améliorer les contacts au niveau de la membrane pour diminuer le bruit.

5.4.3 Mesure de la sensibilité du thermomètre

Nous avons pu mesurer le bruit de la régulation et de la mesure sur les différents thermomètres d'un capteur. Pour connaître la sensibilité du capteur, il faut ensuite mesurer la conductance thermique de la membrane. En effet, l'élévation de température causée par un dégagement de chaleur sur la membrane est directement liée à la conductance thermique de la membrane car $P = K\Delta T + C\frac{dT}{dt}$. Pour cela, la résistance du thermomètre de la membrane a été mesurée en pont de Wheatstone alors que le pont était alimenté par différentes tensions. La variation de la résistance du thermomètre peut directement être reliée à un échauffement du thermomètre. La courbe donnant la puissance en fonction de l'élévation de température est donnée sur la figure 5.21. On obtient bien une droite et la pente de cette droite correspond à la conductance thermique de la membrane puisqu'à l'équilibre, on a $P = K\Delta T$. On mesure une conductance thermique $K_{\text{membrane}} = 26.0 \text{ }\mu\text{W/K}$. Le bruit des mesures sur le thermomètre étant de $354 \text{ }\mu\text{K}$, la limite de détection est de $P = K\Delta T = 26.10^{-6} 354.10^{-6} = 9.2 \text{ nW}$. Le capteur nous permet donc de mesurer des puissance de 9 nW , ce qui est plus que l'objectif initial de 1 nW mais reste au niveau de l'état de l'art actuel en ce qui concerne la sensibilité de nano-calorimètres (voir tableaux 2.4 et 2.5).

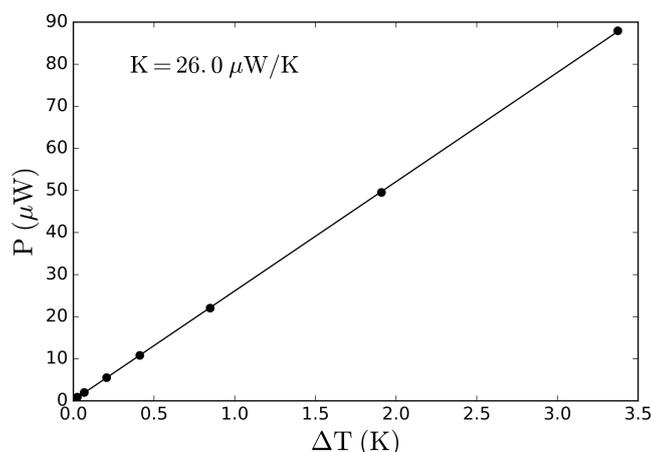


FIGURE 5.21 – Puissance dégagée par le thermomètre de la membrane en fonction de l'élévation en température mesurée par ce même thermomètre. Les données ont été ajustées par une droite dont la pente correspond à la conductance thermique de la membrane. On mesure $K_{\text{membrane}} = 26.0 \mu\text{W/K}$.

5.5 Conclusion

Le développement d'un calorimètre à flux permettant des mesures ITC sensibles est indispensable pour effectuer des mesures complémentaires à la DSC sur la cinétique du repliement de nano-structures d'ADN. Cela permettra de cibler certaines étapes du repliement ou de forcer un chemin du repliement. Pour cela, nous avons développé un capteur calorimétrique innovant intégrant de la micro-fluidique afin d'effectuer des mesures ITC sur des volumes de liquide très faibles. Le capteur est placé au centre d'un calorimètre composé de quatre étages imbriqués les uns dans les autres ce qui permet d'atteindre une régulation en température très précise de $10 \mu\text{K}$ au niveau du dernier étage.

La mesure est effectuée sur un capteur sur membrane intégrant une micro-fluidique innovante en parylène. Le parylène permet la réalisation de canaux micro-fluidiques de très faibles épaisseurs ce qui limite l'augmentation de la capacité calorifique et de la conductance thermique des addenda. Les mesures sont effectuées grâce à trois thermomètres en couches minces de NbN. Actuellement, le bruit intrinsèque des thermomètres nous permet de mesurer des variations de température au niveau de la membrane de $350 \mu\text{K}$ permettant de détecter des puissances de 9nW ce qui est à l'état de l'art en nano-calorimétrie.

L'objectif initial était la détection de puissances de l'ordre du nW . Pour y arriver, il va être nécessaire de réduire le bruit des thermomètres de NbN. Ce bruit étant certainement dû à des résistances de contact trop importantes, des tests sont actuellement en cours pour modifier les contacts permettant la mesure du thermomètre sur la membrane et ainsi améliorer la sensibilité du thermomètre. Des mesures en pont différentiel permettront également de s'affranchir des résistances de contacts. Il restera encore pour effectuer des

mesures ITC à contrôler la micro-fluidique afin d'injecter dans le capteur des débits précis de liquide. Le développement d'un tel instrument est un défi en raison du faible volume de la chambre de réaction. Il reste encore de nombreuses étapes à valider avant de pouvoir tester, à l'aide de cet instrument, les réactions chimiques qui nous intéressent. Notre choix initial de s'affranchir du mélange des liquides en se focalisant sur un tout petit volume de liquide s'est révélé être très exigeant.

Conclusion

Au cours de cette thèse, nous avons étudié par calorimétrie différentielle à balayage la thermodynamique de nanostructures d'ADN. Les systèmes étudiés allaient de nanocages tétraédriques d'ADN assemblées à partir de quatre brins aux origami issus de l'hybridation programmée de plusieurs centaines de brins. Nos objectifs étaient d'identifier lors de l'assemblage des étapes clés, points de passage obligés du processus ou des domaines caractéristiques dont le comportement serait coopératif c'est à dire avec une cohérence à l'échelle multi-moléculaire. L'objectif final étant de mieux comprendre les mécanismes de repliement afin de concevoir des nanostructures à base d'ADN de manière plus rationnelle.

Pour analyser les résultats expérimentaux nous décrivons le processus de repliement comme le passage du système par un ensemble d'états à l'équilibre thermodynamique, les états représentant différentes configurations possibles du système. Nous avons développé une méthode de déconvolution des mesures calorimétriques afin de décomposer le repliement des tétraèdres d'ADN en une succession d'étapes intermédiaires.

En appliquant la méthode à des systèmes composés d'un petit nombre de brins, il est possible d'identifier certaines étapes intermédiaires clés pour le repliement global de la structure. En modifiant par ingénierie les séquences impliquées dans ces étapes, nous avons pu modifier le repliement global de la structure, modifiant ainsi sa stabilité et sa coopérativité. Nous avons également caractérisé des mélanges partiels afin d'étudier les points d'arrêts possibles du processus. Cela est rendu possible notamment grâce à la programmabilité des nanostructures d'ADN et aux industries biotechnologiques qui ont démocratisé la synthèse à façon des oligonucléotides.

Nous avons ainsi conclu qu'il peut être préférable de favoriser la coopérativité du repliement plutôt que la stabilité de la nanostructures. Une des stratégies consiste à forcer le chemin de repliement en incluant dans la conception des étapes nécessaires à la réalisation d'autres étapes. Si ces étapes limitantes sont déstabilisées, le repliement est retardé et a lieu à une température plus basse mais de manière bien plus coopérative.

Nous avons identifié dans les structures d'origami d'ADN des éléments clés que nous avons étudié indépendamment. Le premier est la formation d'une boucle lors de l'hybridation d'une agrafe sur le scaffold. Nos résultats nous ont amené à conclure que lors de la fermeture de boucles d'ADN, l'orientation de celles-ci est primordiale. La fermeture

de boucles par des agrafes ayant la même orientation se comporte comme des épingles à cheveux d'ADN classiques : plus la boucle est longue, plus la température de fusion diminue en raison d'une augmentation du coût entropique de l'assemblage. Cependant, lorsque l'agrafe est orientée de manière opposée à la boucle, on observe un comportement inverse. La longueur de la boucle n'a que peu d'influence sur le repliement et celui-ci est même favorisé par la longueur de la boucle. Les agrafes fermant des boucles longues doivent donc avoir une orientation opposée à celle du scaffold.

Un second élément clé présent dans les origami d'ADN est la jonction Holliday. L'étude d'origami simplifiés, comportant uniquement deux agrafes nous a permis de quantifier les contributions à l'énergie libre du système des jonctions Holliday et des interactions d'empilements qui ont lieu entre deux agrafes voisines. Nos mesures indiquent que la formation de jonctions Holliday a une influence bien plus importante que le phénomène de réduction de boucle sur la coopérativité et la stabilité des origami à deux agrafes. Les jonctions Holliday semblent donc être des éléments à favoriser lorsqu'on conçoit un origami d'ADN.

En étudiant le repliement et la dénaturation d'origami d'ADN, nous avons pu comparer différentes stratégies de repliement. La première consiste à utiliser des agrafes en forme de U, composées de deux domaines et la seconde utilise des agrafes en forme de S composées de trois domaines. Nos résultats nous ont permis de conclure que les origami avec des agrafes en U ont un repliement plus coopératif que les origami en S mais une dénaturation moins coopérative. Cela a pour conséquence une hystérésis plus faible entre le repliement et la dénaturation de la structure. Pour les origami en S, nos résultats nous ont permis d'identifier les zones de l'origami qui nucléent l'assemblage. Leur présence est indispensable afin d'initier la formation de l'origami complet. Ces zones sont composées des agrafes du haut et du bas de l'origami qui sont également celles qui ont les domaines les plus longs.

Ce travail de thèse démontre qu'il est possible d'optimiser l'assemblage de nanostructures d'ADN. Les règles proposées doivent être testées sur des origami d'ADN que nous avons conçus mais que nous n'avons pas encore pu caractériser. Une des premières perspectives est donc de vérifier que ces règles permettent effectivement d'optimiser l'assemblage, ce qui pourra se mesurer par la stabilité et la coopérativité de l'assemblage ou encore par l'hystérésis entre l'assemblage et le désassemblage. Nous avons essentiellement tenté de réduire au maximum les tailles des boucles lors de nos conceptions "optimisées". Il sera également intéressant de tester l'influence du nombre de jonction Holliday.

Sur les structures comportant un petit nombre de brins comme les tétraèdres T_{20} nous sommes focalisés sur la modification de la stabilité des duplex complets D_{12} et D_{13} . Nous avons négligé la possibilité de modifier l'assemblage des sommets en optimisant les séquences. En stabilisant les sommets et en utilisant des séquences de type H pour les duplex nous devrions rendre l'assemblage coopératif et stable.

La tendance actuelle de l'assemblage de nano-structures d'ADN consiste à augmenter

la taille des nano-structures finales [136-138], nous avons proposé d'étudier des structures intermédiaires en taille entre 200 et 2000 paires de bases afin de répondre à deux questions restant en suspens :

- à partir de quelle taille de nanostructure il n'est plus possible de décomposer l'assemblage en une série d'équilibres thermodynamiques entre des états intermédiaires ?
- l'assemblage de petites structures est très reproductible alors que l'assemblage des origami ne l'est pas complètement, existe-t'il une dimension caractéristique au delà de laquelle des processus irréversibles apparaissent au cours de l'assemblage ?

Nos conclusions sont basées sur des mesures thermodynamiques à l'équilibre, or lors de l'assemblage des origami d'ADN, l'hystérésis prouve que le processus de repliement est hors équilibre. Pour aller plus loin dans la compréhension du repliement de structures d'ADN complexes, il va être nécessaire de réaliser des mesures d'échange de chaleur lorsque la composition de la solution est modifiée. Il sera pour cela nécessaire d'effectuer des mesures en ITC ce qui nous permettra : d'avoir des informations sur la cinétique des réactions, de cibler des étapes du repliement, et de forcer un chemin de repliement bien précis. Une autre partie de cette thèse a donc consisté au développement d'un nano-calorimètre innovant intégrant de la micro-fluidique afin de réaliser des mesures calorimétriques hors équilibre sur des petits volumes de liquide.

Le capteur est placé dans un calorimètre à étage permettant une régulation en température très sensible avec une stabilité en température au niveau du dernier étage de 10 μK à 38.7°C. La microfluidique est réalisée avec des canaux en parylène de très faibles épaisseur ce qui permet de limiter la conductance thermique de la cellule de mesure. La température au niveau de la chambre de réaction est mesurée par un thermomètre de NbN qui est un thermomètre de haute sensibilité, très utilisé au sein de l'équipe pour de nombreuses applications en physique du solide. La grande stabilité en température du calorimètre a permis de mesurer une dérive des thermomètres de NbN de 210 $\mu\Omega/\text{h}$. Le bruit au niveau du thermomètre de la membrane est de 350 μK . Cela permet la détection de puissances de 9 nW ce qui est l'état de l'art actuel dans les nano-calorimètres.

Nous avons trois grands chantiers de modifications qui permettraient d'améliorer le capteur calorimétrique en vue de mesures sur des petites structures d'ADN :

- diminuer le bruit dû aux résistances de contacts en modifiant les contacts électriques au niveau de la membrane ou en mesurant le thermomètre en pont différentiel plutôt qu'en pont de Wheatstone
 - intégrer de manière effective un dispositif microfluidique reste à faire. Sur le capteur actuel des réactions chimiques très énergétiques pourraient être étudiées et permettre d'établir les premiers comparatifs avec l'état de l'art académique
-

- modifier le principe même du capteur en utilisant des capteurs à base de thermopiles, plus en lien avec l'état de l'art industriel. Nous serions obligés alors de travailler sur des volumes plus importants, de l'ordre de quelques 10 μL . Ces volumes resteraient 20 fois inférieurs aux volumes standard trouvés dans les calorimètres commerciaux.
-

Bibliographie

1. SEEMAN, N. C. *Structural DNA Nanotechnology* en. Google-Books-ID : 16UTC-wAAQBAJ. ISBN : 978-0-521-76448-3 (Cambridge University Press, 2016).
 2. WATSON, J. D. & CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids : A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**, 737-738 (1953).
 3. FRANK-KAMENETSKII, M. D. & MIRKIN, S. M. Triplex DNA Structures. *Annual Review of Biochemistry* **64**, 65-95 (1995).
 4. WILLIAMSON, J. R. G-Quartet Structures in Telomeric DNA. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **23**, 703-730 (1994).
 5. CHEN, H. *et al.* Ionic strength-dependent persistence lengths of single-stranded RNA and DNA. en. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 799-804 (2012).
 6. BUSTAMANTE, C., MARKO, J. F., SIGGIA, E. D. & SMITH, S. Entropic Elasticity of lambda-phage Dna. ENGLISH. *Science* **265**, 1599-1600 (1994).
 7. BOUCHIAT, C. *et al.* Estimating the Persistence Length of a Worm-Like Chain Molecule from Force-Extension Measurements. English. *Biophysical Journal* **1**, 409-413 (1999).
 8. WELDON, C., EPERON, I. C. & DOMINGUEZ, C. Do we know whether potential G-quadruplexes actually form in long functional RNA molecules ? *Biochemical Society Transactions* **44**, 1761-1768 (2016).
 9. TYAGI, S. & KRAMER, F. R. Molecular Beacons : Probes that Fluoresce upon Hybridization. en. *Nature Biotechnology* **14**, nbt0396-303-303. ISSN : 1546-1696 (1996).
 10. LU, M., GUO, Q., MARKY, L. A., SEEMAN, N. C. & KALLENBACH, N. R. Thermodynamics of DNA branching. *Journal of Molecular Biology* **223**, 781-789 (1992).
 11. FU, T. J. & SEEMAN, N. C. DNA double-crossover molecules. *Biochemistry* **32**, 3211-3220 (1993).
 12. LABEAN, T. H. *et al.* Construction, Analysis, Ligation, and Self-Assembly of DNA Triple Crossover Complexes. *Journal of the American Chemical Society* **122**, 1848-1860 (2000).
 13. SEEMAN, N. C. Nucleic acid junctions and lattices. *Journal of Theoretical Biology* **99**, 237-247 (1982).
-

14. WINFREE, E., LIU, F., WENZLER, L. A. & SEEMAN, N. C. Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals. *Nature* **394**, 539-544 (1998).
 15. ZHENG, J. *et al.* From molecular to macroscopic via the rational design of a self-assembled 3D DNA crystal. *Nature* **461**, 74-77 (2009).
 16. YAN, H., PARK, S. H., FINKELSTEIN, G., REIF, J. H. & LABEAN, T. H. DNA-Templated Self-Assembly of Protein Arrays and Highly Conductive Nanowires. *Science* **301**, 1882-1884 (2003).
 17. SCHULMAN, R. & WINFREE, E. Synthesis of crystals with a programmable kinetic barrier to nucleation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 15236-15241 (2007).
 18. MATHIEU, F. *et al.* Six-helix bundles designed from DNA., Six-Helix Bundles Designed from DNA. *Nano letters, Nano letters* **5**, 5, 661, 661-665 (2005).
 19. YIN, P. *et al.* Programming DNA Tube Circumferences. *Science* **321**, 824-826 (2008).
 20. HE, Y. *et al.* Hierarchical self-assembly of DNA into symmetric supramolecular polyhedra. *Nature* **452**, 198-201 (2008).
 21. WEI, B., DAI, M. & YIN, P. Complex shapes self-assembled from single-stranded DNA tiles. *Nature* **485**, 623-626 (2012).
 22. KE, Y., ONG, L. L., SHIH, W. M. & YIN, P. Three-Dimensional Structures Self-Assembled from DNA Bricks. *Science* **338** (2012).
 23. MAO, C., LABEAN, T. H., REIF, J. H. & SEEMAN, N. C. Logical computation using algorithmic self-assembly of DNA triple-crossover molecules. *Nature* **407**, 35035038 (2000).
 24. CHEN, J. & SEEMAN, N. C. Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube. *Nature* **350**, 631-633 (1991).
 25. ZHANG, Y. & SEEMAN, N. C. Construction of a DNA-Truncated Octahedron. *Journal of the American Chemical Society* **116**, 1661-1669 (1994).
 26. SHIH, W. M., QUISPE, J. D. & JOYCE, G. F. A 1.7-kilobase single-stranded DNA that folds into a nanoscale octahedron. *Nature* **427**, 618-621 (2004).
 27. P. GOODMAN, R., M. BERRY, R. & J. TURBERFIELD, A. The single-step synthesis of a DNA tetrahedron. *Chemical Communications* **0**, 1372-1373 (2004).
 28. GOODMAN, R. P. *et al.* Rapid Chiral Assembly of Rigid DNA Building Blocks for Molecular Nanofabrication. *Science* **310**, 1661-1665 (2005).
 29. CHANDRASEKARAN, A. R. & LEVCHENKO, O. DNA Nanocages. *Chemistry of Materials* **28**, 5569-5581 (2016).
 30. MITCHELL, N. *et al.* A DNA Nanostructure for the Functional Assembly of Chemical Groups with Tunable Stoichiometry and Defined Nanoscale Geometry. en. *Angewandte Chemie International Edition* **48**, 525-527 (2009).
-

31. PEI, H. *et al.* A DNA Nanostructure-based Biomolecular Probe Carrier Platform for Electrochemical Biosensing. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **22**, 4754-4758 (2010).
 32. LIANG, L. *et al.* Single-Particle Tracking and Modulation of Cell Entry Pathways of a Tetrahedral DNA Nanostructure in Live Cells. en. *Angewandte Chemie International Edition* **53**, 7745-7750 (2014).
 33. ROTHEMUND, P. W. K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* **440**, 297-302 (2006).
 34. DOUGLAS, S. M., DIETZ, H., LIEDL T. and Högberg, B., GRAF, F. & SHIH, W. M. Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature* **459**, 414-418 (2009).
 35. KE, Y. *et al.* Multilayer DNA Origami Packed on a Square Lattice. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 15903 (2009).
 36. DIETZ, H., DOUGLAS, S. M. & SHIH, W. M. Folding DNA into Twisted and Curved Nanoscale Shapes. *Science* **325**, 725-730 (2009).
 37. HAN, D. *et al.* DNA Origami with Complex Curvatures in Three-Dimensional Space. *Science* **332** (2011).
 38. BAI, X.-c., MARTIN, T. G., SCHERES, S. H. W. & DIETZ, H. Cryo-EM structure of a 3D DNA-origami object. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 20012-20017 (2012).
 39. ANDERSEN, E. S. *et al.* Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature* **459**, 73-76 (2009).
 40. KUZUYA, A. & KOMIYAMA, M. Design and construction of a box-shaped 3D-DNA origami. *Chemical Communications* **0**, 4182-4184 (2009).
 41. IINUMA, R. *et al.* Polyhedra Self-Assembled from DNA Tripods and Characterized with 3D DNA-PAINT. *Science* **344**, 65-69 (2014).
 42. DOUGLAS, S. M. *et al.* Rapid prototyping of 3D DNA-origami shapes with caDNA_{no}. *Nucleic Acids Research* **37**, 5001-5006 (2009).
 43. CASTRO, C. E. *et al.* A primer to scaffolded DNA origami. *Nature Methods* **8**, 221-229 (2011).
 44. MAJIKES, J. M., NASH, J. A. & LABEAN, T. H. Competitive annealing of multiple DNA origami : formation of chimeric origami. *New Journal of Physics* **18**, 115001 (2016).
 45. LEE TIN WAH, J., DAVID, C., RUDIUK, S., BAIGL, D. & ESTEVEZ-TORRES, A. Observing and Controlling the Folding Pathway of DNA Origami at the Nanoscale. *ACS Nano* **10**, 1978-1987 (2016).
 46. SONG, J. *et al.* Direct Visualization of Transient Thermal Response of a DNA Origami. *Journal of the American Chemical Society* **134**, 9844-9847 (2012).
 47. DUNN, K. E. *et al.* Guiding the folding pathway of DNA origami. *Nature* **525**, 82-86 (2015).
-

48. KATO, T., GOODMAN, R. P., ERBEN, C. M., TURBERFIELD, A. J. & NAMBA, K. High-Resolution Structural Analysis of a DNA Nanostructure by cryoEM. *Nano Letters* **9**, 2747-2750 (2009).
 49. SOBCHAK, J.-P. J., MARTIN, T. G., GERLING, T. & DIETZ, H. Rapid Folding of DNA into Nanoscale Shapes at Constant Temperature. *Science* **338**, 1458-1461 (2012).
 50. WAGENBAUER, K. F., WACHAUF, C. H. & DIETZ, H. Quantifying quality in DNA self-assembly. *Nature Communications* **5** (2014).
 51. PINHEIRO, A. V., HAN, D., SHIH, W. M. & YAN, H. Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology. *Nature Nanotechnology* **6**, 763-772 (2011).
 52. LIU, Q., SONG, C., WANG, Z.-G., LI, N. & DING, B. Precise organization of metal nanoparticles on DNA origami template. *Methods. Nucleic Acids Nanotechnology* **67**, 205-214 (2014).
 53. KUZYK, A. *et al.* DNA-based Self-Assembly of Chiral Plasmonic Nanostructures with Tailored Optical Response. *Nature* **483**, 311-314 (2012).
 54. MAUNE, H. T. *et al.* Self-assembly of carbon nanotubes into two-dimensional geometries using DNA origami templates. *Nature Nanotechnology* **5**, 61-66 (2010).
 55. SAMANTA, A., BANERJEE, S. & LIU, Y. DNA nanotechnology for nanophotonic applications. *Nanoscale* **7**, 2210-2220 (2015).
 56. TAN, S. J., CAMPOLONGO, M. J., LUO, D. & CHENG, W. Building plasmonic nanostructures with DNA. *Nature Nanotechnology* **6**, 268-276 (2011).
 57. LIU, J. *et al.* Metallization of Branched DNA Origami for Nanoelectronic Circuit Fabrication. *ACS Nano* **5**, 2240-2247 (2011).
 58. DIAGNE, C. T., BRUN, C., GASPARUTTO, D., BAILLIN, X. & TIRON, R. DNA Origami Mask for Sub-Ten-Nanometer Lithography. *ACS Nano* **10**, 6458-6463 (2016).
 59. ERBEN, C. M., GOODMAN, R. P. & TURBERFIELD, A. J. Single-Molecule Protein Encapsulation in a Rigid DNA Cage. *Angewandte Chemie* **118**, 7574-7577 (2006).
 60. MARCHI, A. N., SAAEM, I., VOGEN, B. N., BROWN, S. & LABEAN, T. H. Toward Larger DNA Origami. *Nano Letters* **14**, 5740-5747 (2014).
 61. GERLING, T., WAGENBAUER, K. F., NEUNER, A. M. & DIETZ, H. Dynamic DNA devices and assemblies formed by shape-complementary, non-base pairing 3D components. *Science* **347**, 1446-1452 (2015).
 62. DOUGLAS, S. M., BACHELET, I. & CHURCH, G. M. A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. *Science* **335**, 831-834 (2012).
 63. WEI, X., NANGREAVE, J. & LIU, Y. Uncovering the Self-Assembly of DNA Nanostructures by Thermodynamics and Kinetics. *Accounts of Chemical Research* **47**, 1861-1870 (2014).
-

-
64. KE, Y., BELLOT, G., VOIGT, N. V., FRADKOV, E. & SHIH, W. M. Two design strategies for enhancement of multilayer–DNA-origami folding : underwinding for specific intercalator rescue and staple-break positioning. *Chemical Science* **3**, 2587-2597 (2012).
 65. FERN, J., LU, J. & SCHULMAN, R. The Energy Landscape for the Self-Assembly of a Two-Dimensional DNA Origami Complex. *ACS nano* **10**, 1836-1844 (2016).
 66. ARBONA, J.-M., AIMÉ, J.-P. & ELEZGARAY, J. Cooperativity in the annealing of DNA origamis. *The Journal of Chemical Physics* **138**, 015105 (2013).
 67. ARBONA, J.-M. *Origami d'ADN : étude des propriétés mécaniques et du processus de formation* thèse de doct. (Université Bordeaux 1, 2012).
 68. SACCÀ, B., MEYER, R. & NIEMEYER, C. M. Temperature-dependent FRET spectroscopy for the high-throughput analysis of self-assembled DNA nanostructures in real time. *Nature Protocols* **4**, 271-285 (2009).
 69. WEI, X., NANGREAVE, J., JIANG, S., YAN, H. & LIU, Y. Mapping the Thermal Behavior of DNA Origami Nanostructures. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 6165-6176 (2013).
 70. NANGREAVE, J., YAN, H. & LIU, Y. Studies of Thermal Stability of Multivalent DNA Hybridization in a Nanostructured System. *Biophysical Journal* **97**, 563-571 (2009).
 71. NANGREAVE, J., YAN, H. & LIU, Y. DNA Nanostructures as Models for Evaluating the Role of Enthalpy and Entropy in Polyvalent Binding. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 4490-4497 (2011).
 72. VAITIEKUNAS, P., CRANE-ROBINSON, C. & PRIVALOV, P. L. The energetic basis of the DNA double helix : a combined microcalorimetric approach. *Nucleic Acids Research* **43**, 8577-8589 (2015).
 73. SPINK, C. H., DING, L., YANG, Q., SHEARDY, R. D. & SEEMAN, N. C. Thermodynamics of Forming a Parallel DNA Crossover. en. *Biophysical Journal* **97**, 528-538 (2009).
 74. PAGANO, B. *et al.* Differential scanning calorimetry to investigate G-quadruplexes structural stability. en. *Methods* **64**, 43-51 (2013).
 75. GARDEN, J. L. *et al.* Thermodynamics of small systems by nanocalorimetry : From physical to biological nano-objects. *Thermochimica Acta. Calorimetry on a Nano-scale* **492**, 16-28 (2009).
 76. LAVOISIER, A.-L.d.-. *Traité élémentaire de chimie , présenté dans un ordre nouveau, et d'après les découvertes modernes ; Avec figures ; Par M. Lavoisier,...* français. (2017) (1789).
 77. QUEEN, D. R. & HELLMAN, F. Thin film nanocalorimeter for heat capacity measurements of 30 nm films. *Review of Scientific Instruments* **80**, 063901 (2009).
 78. SULLIVAN, P. F. & SEIDEL, G. Steady-State, ac-Temperature Calorimetry. *Physical Review* **173**, 679-685 (1968).
-

79. FOMINAYA, F., FOURNIER, T., GANDIT, P. & CHAUSSY, J. Nanocalorimeter for high resolution measurements of low temperature heat capacities of thin films and single crystals. *Review of Scientific Instruments* **68**, 4191-4195 (1997).
 80. LOPEANDIA, A. F., ANDRÉ, E., GARDEN, J.-L., GIVORD, D. & BOURGEOIS, O. Highly sensitive parylene membrane-based ac-calorimeter for small mass magnetic samples. *Review of Scientific Instruments* **81** (2010).
 81. MINAKOV, A. A., ROY, S. B., BUGOSLAVSKY, Y. V. & COHEN, L. F. Thin-film alternating current nanocalorimeter for low temperatures and high magnetic fields. *Review of Scientific Instruments* **76** (2005).
 82. GARDEN, J.-L., CHÂTEAU, E. & CHAUSSY, J. Highly sensitive ac nanocalorimeter for microliter-scale liquids or biological samples. *Applied Physics Letters* **84**, 3597-3599 (2004).
 83. YAO, H., EMA, K., FUKADA, H., TAKAHASHI, K. & HATTA, I. ac nanocalorimeter for measuring heat capacity of biological macromolecules in solution. *Review of Scientific Instruments* **74**, 4164-4168 (2003).
 84. BOURGEOIS, O., SKIPETROV, S. E., ONG, F. & CHAUSSY, J. Attojoule Calorimetry of Mesoscopic Superconducting Loops. *Physical Review Letters* **94**, 057007 (2005).
 85. GILL, P., MOGHADAM, T. T. & RANJBAR, B. Differential Scanning Calorimetry Techniques : Applications in Biology and Nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT* **21**, 167-193 (2010).
 86. MINAKOV, A. A., ADAMOVSKY, S. A. & SCHICK, C. Non-adiabatic thin-film (chip) nanocalorimetry. *Thermochimica Acta. Thermodynamics and calorimetry of thin films : Papers presented at the 8th Lahnwitzseminar on Calorimetry* **432**, 177-185 (2005).
 87. FREYER, M. W. & LEWIS, E. A. in (éd. BIOLOGY, B. M.i. C.) 79-113 (Academic Press, 2008).
 88. LADBURY, J. E. & DOYLE, M. L. *Biocalorimetry 2 : Applications of Calorimetry in the Biological Sciences* ISBN : 978-0-470-84968-2 (John Wiley & Sons, 2004).
 89. PRIVALOV, P. L. Thermal investigations of biopolymer solutions and scanning microcalorimetry. *FEBS Letters* **40**, S133-S139 (1974).
 90. GARDEN, D. J.-L. & BOURGEOIS, D. O. in *Encyclopedia of Nanotechnology* (éd. BHUSHAN, P. B.) 1491-1504 (2012). ISBN : 978-90-481-9750-7 978-90-481-9751-4.
 91. KHAW, M. K., MOHD-YASIN, F. & NGUYEN, N. T. Microcalorimeter : Design considerations, materials and examples. *Microelectronic Engineering. Micro and Nano Technologies for Biology and Life Sciences* **158**, 107-117 (2016).
 92. XU, J., REISERER, R., TELLINGHUISEN, J., WIKSWO, J. P. & BAUDENBACHER, F. J. A New Microfabricated Nanocalorimeter : Design, Characterization, and Chemical Calibration. *Analytical chemistry* **80**, 2728-2733 (2008).
 93. RECHT, M. I. *et al.* Enthalpy array analysis of enzymatic and binding reactions. *Analytical biochemistry* **377**, 33-39 (2008).
-

-
94. WANG, S. *et al.* Micro-differential scanning calorimeter for liquid biological samples. *Review of Scientific Instruments* **87**, 105005 (2016).
 95. DAVAJI, B., JEONG BAK, H., CHANG, W.-J. & HOON LEE, C. A novel on-chip three-dimensional micromachined calorimeter with fully enclosed and suspended thin-film chamber for thermal characterization of liquid samples. *Biomicrofluidics* **8** (2014).
 96. WANG, L., WANG, B. & LIN, Q. Demonstration of MEMS-based differential scanning calorimetry for determining thermodynamic properties of biomolecules. *Sensors and Actuators B : Chemical* **134**, 953-958 (2008).
 97. ZHURAVLEV, E. & SCHICK, C. Fast scanning power compensated differential scanning nano-calorimeter : 1. The device. *Thermochimica Acta* **505**, 1-13 (2010).
 98. TORRES, F. E. *et al.* Enthalpy arrays. en. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9517-9522 (2004).
 99. JOHANNESSEN, E. A. *et al.* Micromachined nanocalorimetric sensor for ultra-low-volume cell-based assays. eng. *Analytical Chemistry* **74**, 2190-2197 (2002).
 100. CHANCELLOR, E. B., WIKSWO, J. P., BAUDENBACHER, F., RADPARVAR, M. & OSTERMAN, D. Heat conduction calorimeter for massively parallel high throughput measurements with picoliter sample volumes. *Applied Physics Letters* **85**, 2408-2410 (2004).
 101. HIGUERA-GUISSET, J. *et al.* Calorimetry of microbial growth using a thermopile based microreactor. *Thermochimica Acta* **427**, 187-191 (2005).
 102. LEE, W., FON, W., AXELROD, B. W. & ROUKES, M. L. High-sensitivity microfluidic calorimeters for biological and chemical applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 15225-15230 (2009).
 103. BAIER, V. *et al.* Highly sensitive thermopile heat power sensor for micro-fluid calorimetry of biochemical processes. *Sensors and Actuators A : Physical. Eurosensors XVIII 2004* **123**, 354-359 (2005).
 104. ZHANG, Y. & TADIGADAPA, S. Calorimetric biosensors with integrated microfluidic channels. *Biosensors and Bioelectronics* **19**, 1733-1743 (2004).
 105. NAM, S.-K., KIM, J.-K., CHO, S.-C. & LEE, S.-K. Design and Characterization of a High Resolution Microfluidic Heat Flux Sensor with Thermal Modulation. en. *Sensors* **10**, 6594-6611 (2010).
 106. ONG, F. R., BOURGEOIS, O., SKIPETROV, S. E. & CHAUSSY, J. Thermal signatures of the Little-Parks effect in the heat capacity of mesoscopic superconducting rings. *Physical Review B* **74**, 140503 (2006).
 107. ONG, F. R. & BOURGEOIS, O. Topology effects on the heat capacity of mesoscopic superconducting disks. en. *EPL (Europhysics Letters)* **79**, 67003 (2007).
 108. BOURGEOIS, O. *et al.* A new sensor for thermodynamic measurements of magnetization reversal in magnetic nanomaterials. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials. Proceedings of the Joint European Magnetic Symposia* **316**, e94-e96 (2007).
-

109. GARDEN, J. L., RICHARD, J., GUILLOU, H. & BOURGEOIS, O. Non-equilibrium heat capacity of polytetrafluoroethylene at room temperature. *Thermochimica Acta. 9th Laehnwitzseminar 2006 Special Issue* **461**, 122-136 (2007).
 110. PARK, Y. W. & BRESLAUER, K. J. A spectroscopic and calorimetric study of the melting behaviors of a "bent" and a "normal" DNA duplex : [d(GA4T4C)]₂ versus [d(GT4A4C)]₂. en. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 1551-1555 (1991).
 111. WARTELL, R. M. & BENIGHT, A. S. Thermal denaturation of DNA molecules : A comparison of theory with experiment. *Physics Reports* **126**, 67-107 (1985).
 112. TIKHOMIROVA, A., TAULIER, N. & CHALIKIAN, T. V. Energetics of Nucleic Acid Stability : The Effect of Δ CP. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 16387-16394 (2004).
 113. MIKULECKY, P. J. & FEIG, A. L. Heat capacity changes associated with DNA duplex formation : salt- and sequence-dependent effects. eng. *Biochemistry* **45**, 604-616 (2006).
 114. ROUZINA, I. & BLOOMFIELD, V. A. Heat Capacity Effects on the Melting of DNA. 1. General Aspects. *Biophysical Journal* **77**, 3242-3251 (1999).
 115. PRABHU, N. V. & SHARP, K. A. Heat Capacity in Proteins. *Annual Review of Physical Chemistry* **56**, 521-548 (2005).
 116. MIKULECKY, P. J. & FEIG, A. L. Cold Denaturation of the Hammerhead Ribozyme. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 890-891 (2002).
 117. MIKULECKY, P. J. & FEIG, A. L. Heat capacity changes associated with nucleic acid folding. *Biopolymers* **82**, 38-58 (2006).
 118. SANTALUCIA, J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 1460-1465 (1998).
 119. ZADEH, J. N. *et al.* NUPACK : Analysis and design of nucleic acid systems. English. *Journal of computational chemistry* (2011).
 120. MARKHAM, N. R. & ZUKER, M. DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. en. *Nucleic Acids Research* **33**, W577-W581 (2005).
 121. ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* **31**, 3406-3415 (2003).
 122. SANTALUCIA, J. & HICKS, D. The thermodynamics of DNA structural motifs. en. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **33**, 415-440 (2004).
 123. ROUZINA, I. & BLOOMFIELD, V. A. Heat Capacity Effects on the Melting of DNA.2. Analysis of Nearest-Neighbor Base Pair Effects. *Biophysical Journal* **77**, 3252-3255 (1999).
 124. CHALIKIAN, T. V., VÖLKER, J., PLUM, G. E. & BRESLAUER, K. J. A more unified picture for the thermodynamics of nucleic acid duplex melting : A characterization by calorimetric and volumetric techniques. en. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 7853-7858 (1999).
-

-
125. COOPER, A. & JOHNSON, C. M. in *Microscopy, optical spectroscopy, and macroscopic techniques* 109-124 (1994).
 126. FREIRE, E. & BILTONEN, R. L. Statistical mechanical deconvolution of thermal transitions in macromolecules. I. Theory and application to homogeneous systems. en. *Biopolymers* **17**, 463-479 (1978).
 127. SPINK, C. H. The deconvolution of differential scanning calorimetry unfolding transitions. *Methods. Biocalorimetry* **76**, 78-86 (2015).
 128. MARKY, L. A. & BRESLAUER, K. J. Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves. en. *Biopolymers* **26**, 1601-1620 (1987).
 129. OWCZARZY, R., MOREIRA, B. G., YOU, Y., BEHLKE, M. A. & WALDER, J. A. Predicting Stability of DNA Duplexes in Solutions Containing Magnesium and Monovalent Cations. *Biochemistry* **47**, 5336-5353 (2008).
 130. DANNENBERG, F. *et al.* Modelling Dna Origami Self-Assembly at the Domain Level. English. *Journal of Chemical Physics* **143**. (2017) (oct. 2015).
 131. JACOBSON, H. & STOCKMAYER, W. H. Intramolecular Reaction in Polycondensations. I. The Theory of Linear Systems. *The Journal of Chemical Physics* **18**, 1600-1606 (1950).
 132. FISHER, M. E. Effect of Excluded Volume on Phase Transitions in Biopolymers. *The Journal of Chemical Physics* **45**, 1469-1473 (1966).
 133. GODDARD, N. L., BONNET, G., KRICHEVSKY, O. & LIBCHABER, A. Sequence Dependent Rigidity of Single Stranded DNA. *Physical Review Letters* **85**, 2400-2403 (2000).
 134. PEYRET, N. *Prediction of nucleic acid hybridization : Parameters and algorithms.* anglais. Thèse de doct. (Wayne State University, 2001).
 135. BOURGEOIS, O., ANDRÉ, E., MACOVEI, C. & CHAUSSY, J. Liquid nitrogen to room-temperature thermometry using niobium nitride thin films. *Review of Scientific Instruments* **77**, 126108-126108-3 (2006).
 136. WAGENBAUER, K. F., SIGL, C. & DIETZ, H. Gigadalton-scale shape-programmable DNA assemblies. En. *Nature* **552**, 78 (2017).
 137. TIKHOMIROV, G., PETERSEN, P. & QIAN, L. Fractal assembly of micrometre-scale DNA origami arrays with arbitrary patterns. En. *Nature* **552**, 67 (2017).
 138. ONG, L. L. *et al.* Programmable self-assembly of three-dimensional nanostructures from 10,000 unique components. En. *Nature* **552**, 72 (2017).
-

Annexe A

Schéma des origami

- figure A.1 : schéma caDNAno de l'origami PF6
 - figure A.2 : schéma caDNAno de l'origami PF5
 - figure A.3 : schéma caDNAno de l'origami m13R
 - figure A.4 : schéma caDNAno de l'origami m13R2
 - figure A.5 : schéma caDNAno de l'origami m13RU
 - figure A.6 : schéma caDNAno des origami pS, pU et pUS
 - figure A.7 : schéma caDNAno de l'origami LL
 - figure A.8 : schéma caDNAno de l'origami 42lin
 - figure A.9 : schéma caDNAno de l'origami 42ram
-

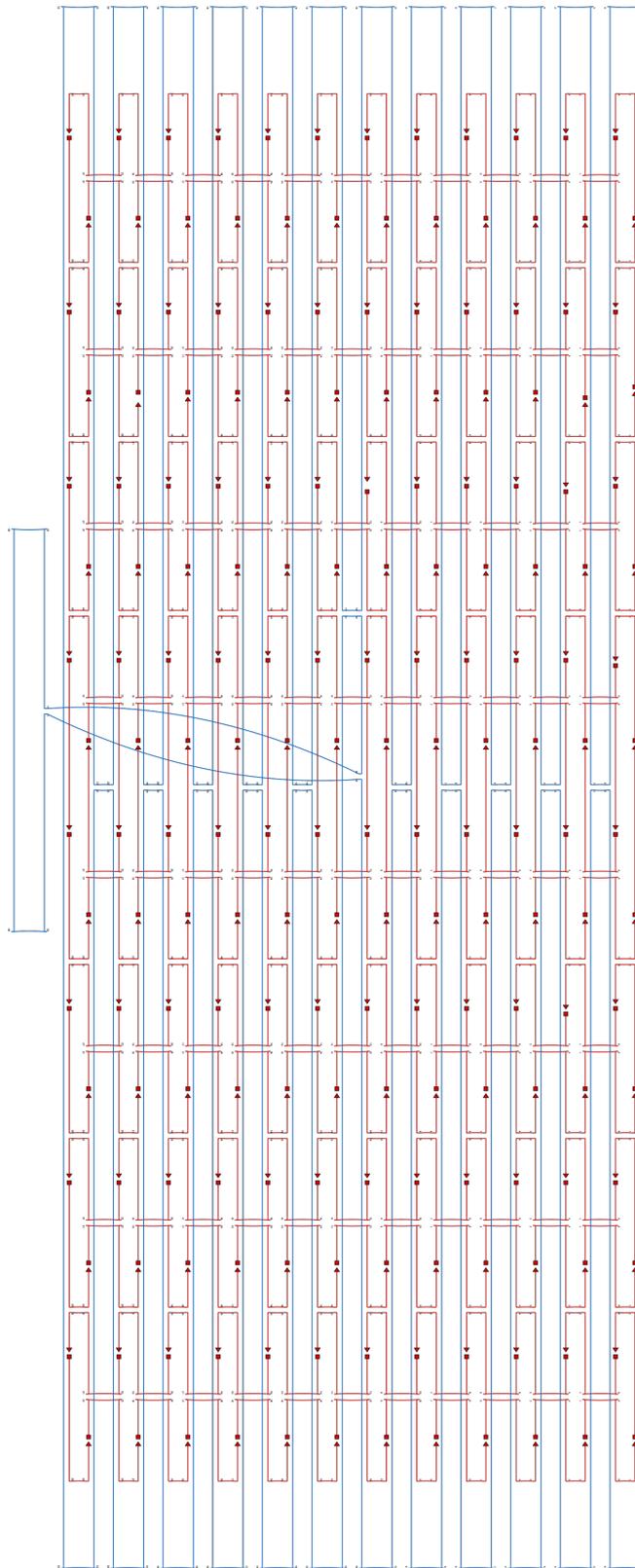


FIGURE A.1 – Schéma caDNAno de l'origami PF6.

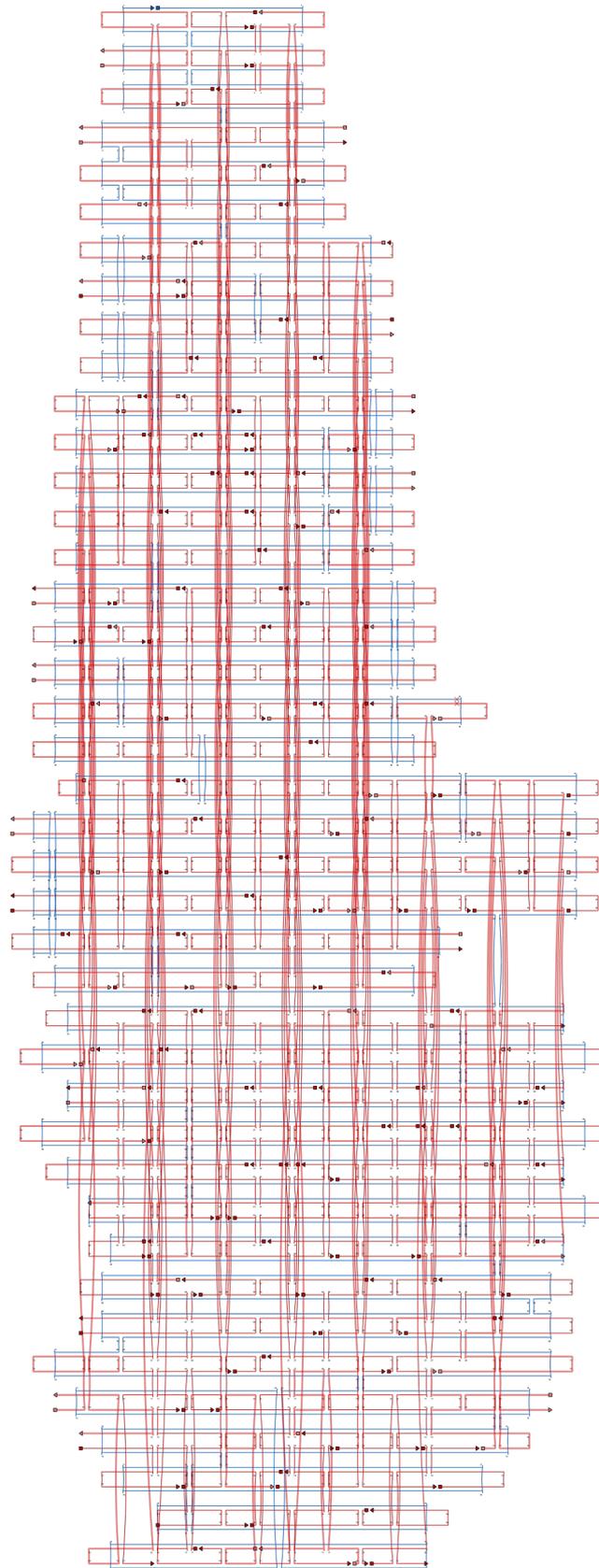


FIGURE A.2 – Schéma caDNAno de l'origami PF5.

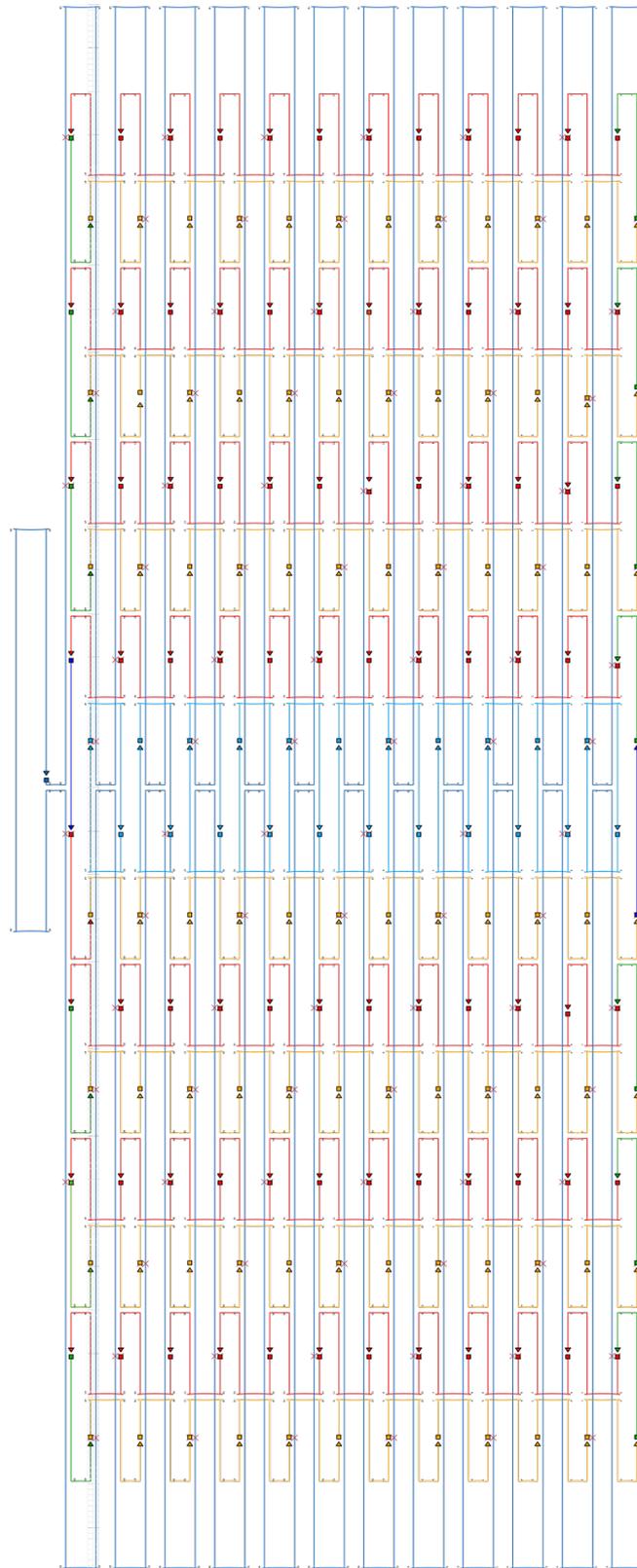


FIGURE A.3 – Schéma caDNAno de l'origami m13R.

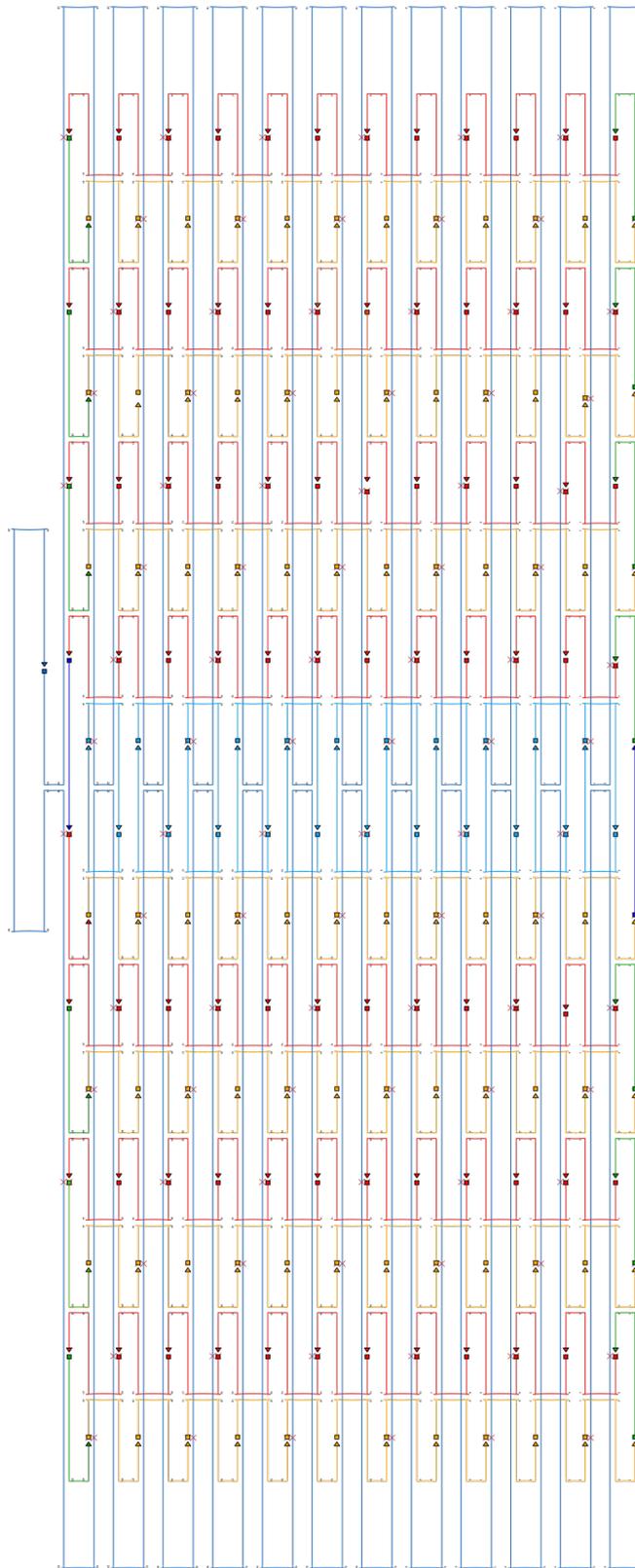


FIGURE A.4 – Schéma caDNAno de l'origami m13R2.

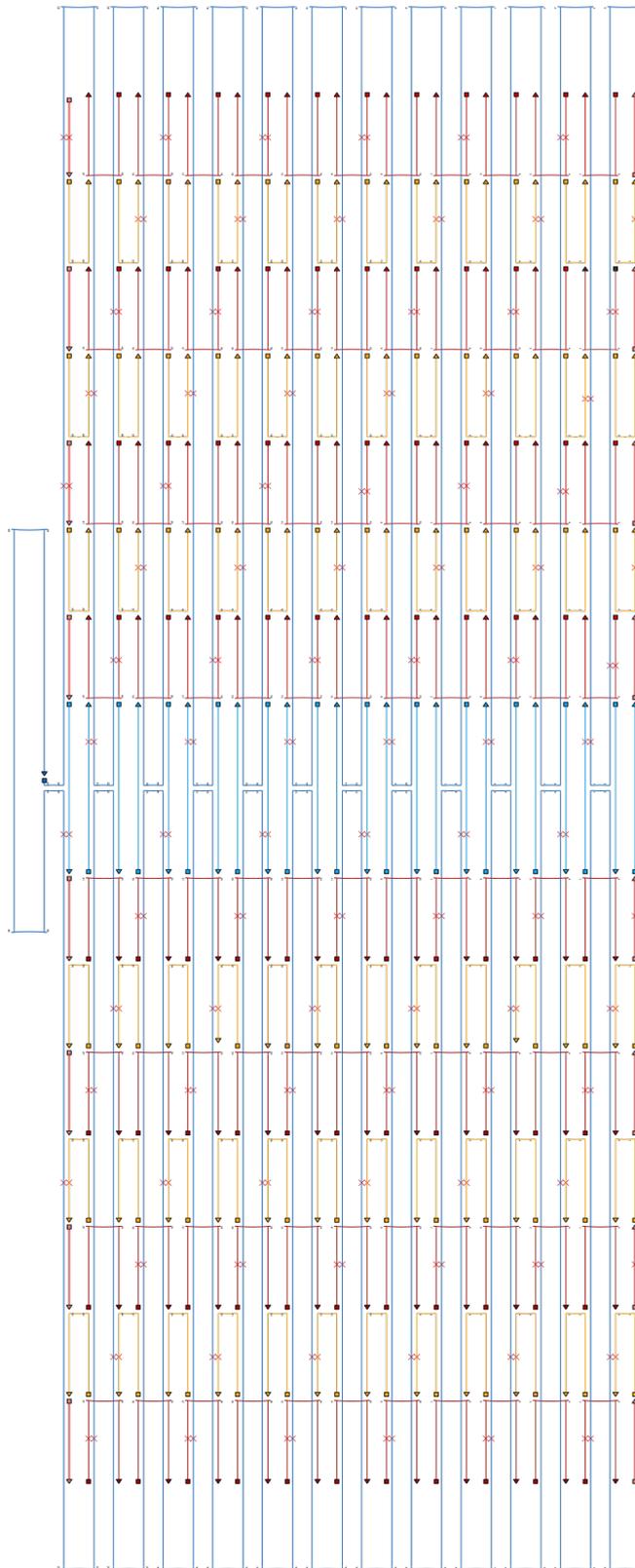
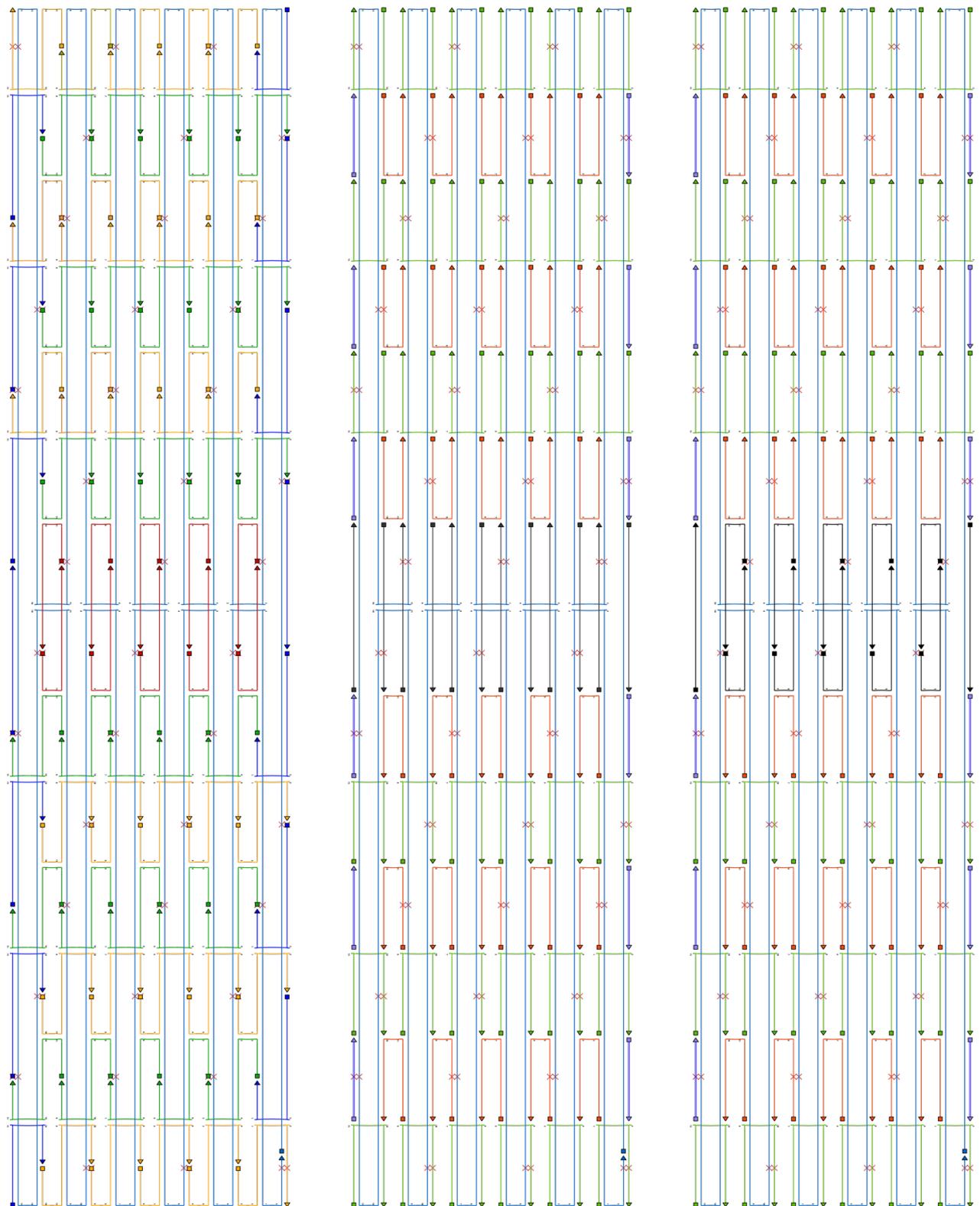


FIGURE A.5 – Schéma caDNAno de l'origami m13RU.



(a) Schéma caDNAno de l'origami pS (b) Schéma caDNAno de l'origami pU (c) Schéma caDNAno de l'origami pUS

FIGURE A.6

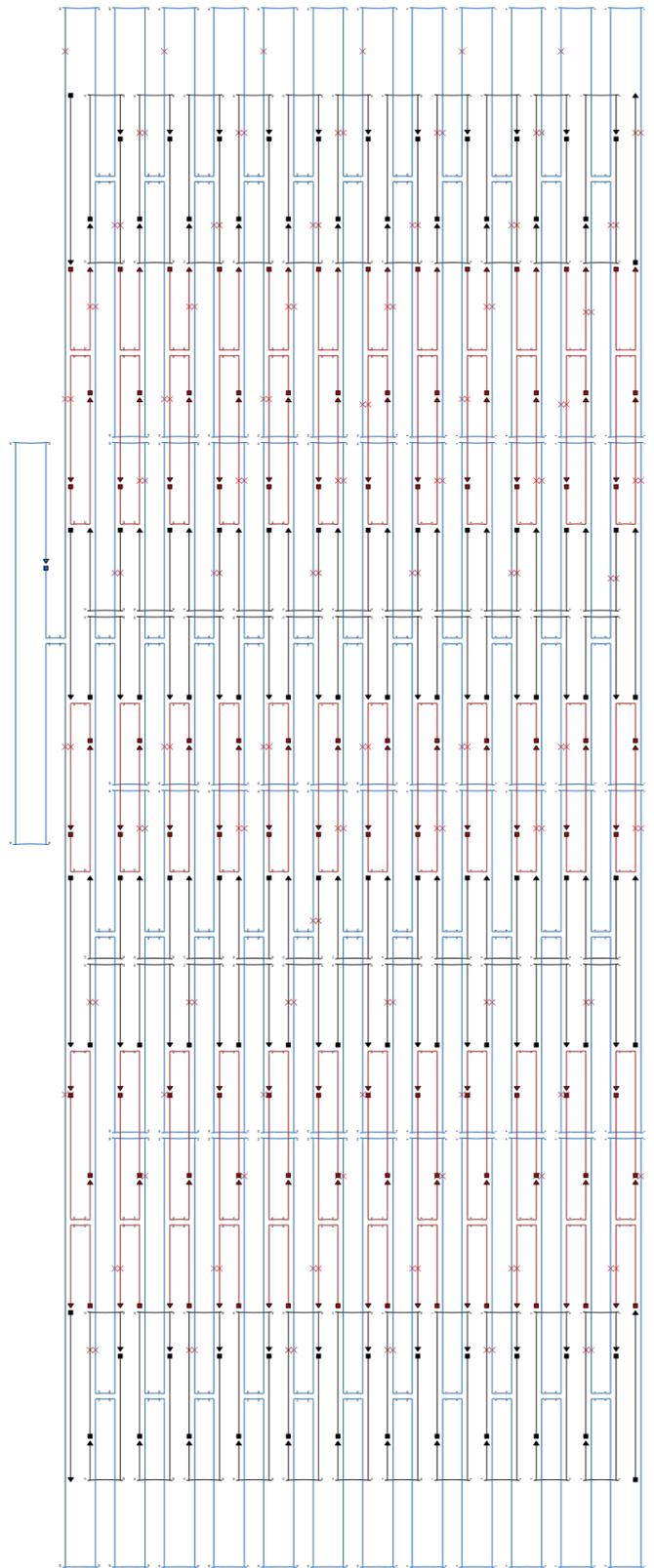


FIGURE A.7 – Schéma caDNAno de l'origami LL.

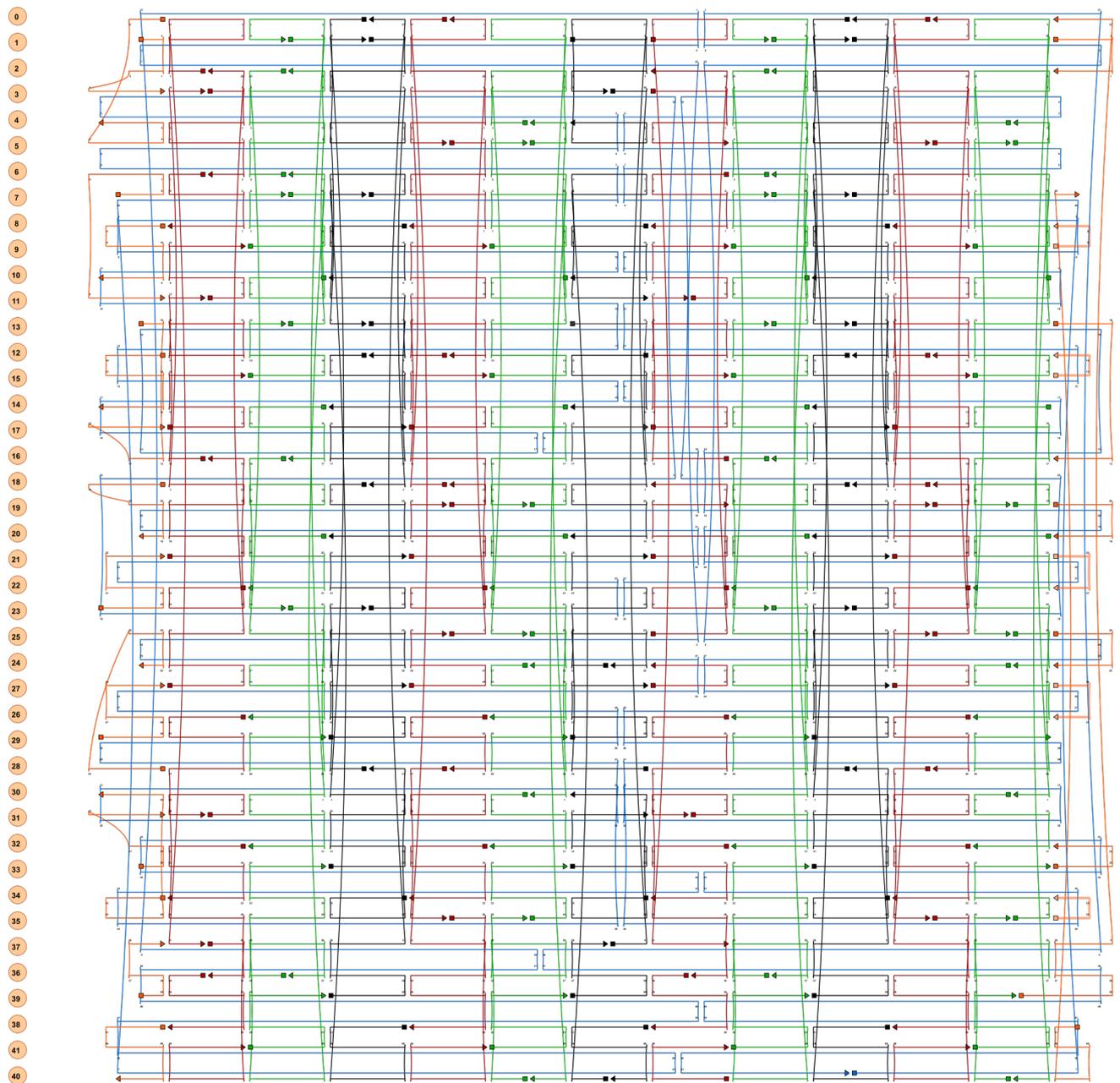


FIGURE A.8 – Schéma caDNAno de l'origami 42lin.

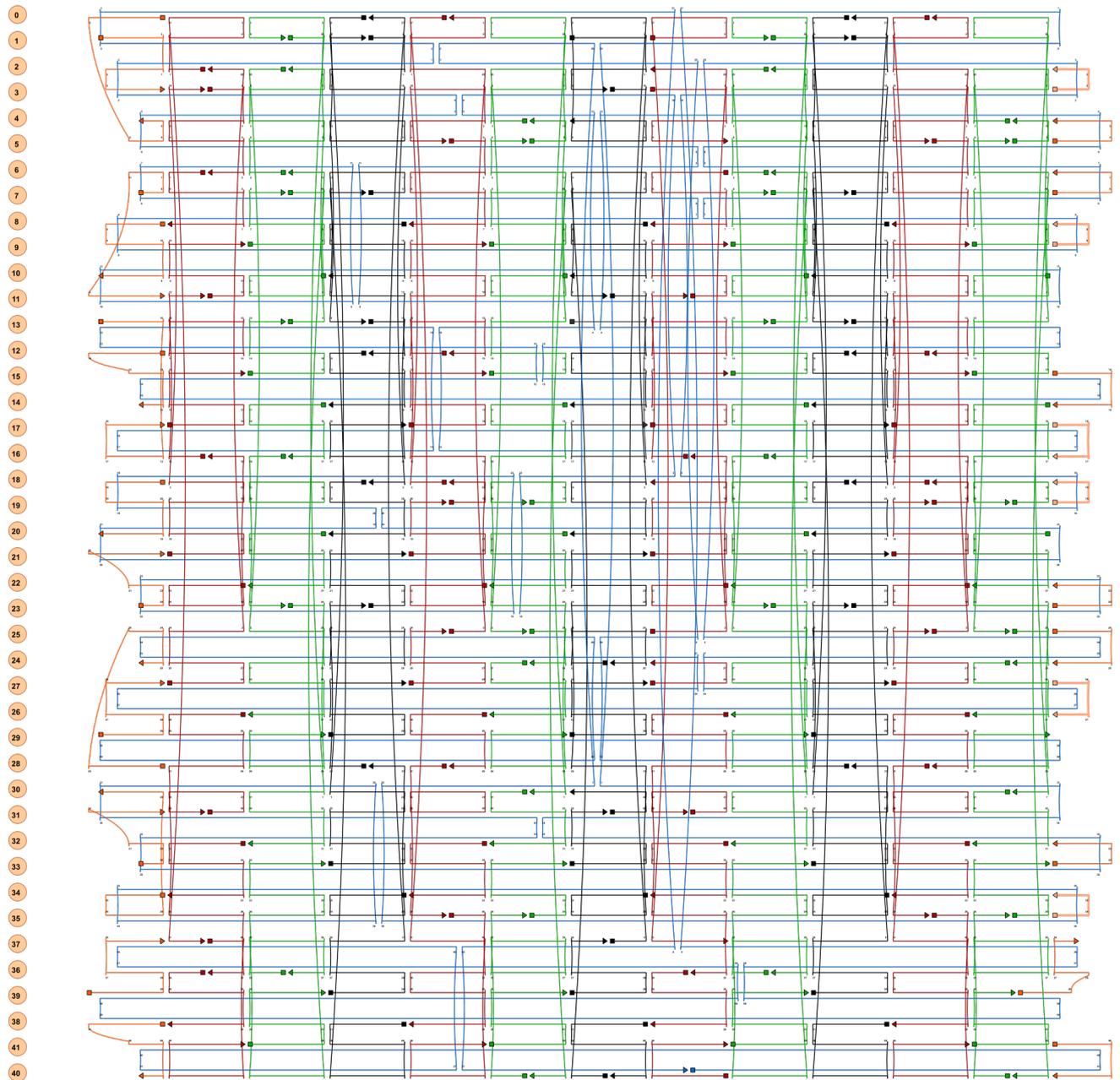


FIGURE A.9 – Schéma caDNAno de l'origami 42ram.

Annexe B

Séquences des agrafes

Séquences m13R

- TAACACTGAGTTTCGTCACCAGTAGCCCTCA
 - TAGTTAGCTTTCTTAAACAGCTTGCATCGCCC
 - ACGCATATAAAACACTCATCTTTAGTACAAC
 - GGAGATTTGCTCATTCACTGAATATAGTAAAT
 - TGGGCTTTAAGAGCAACACTATCCAAAATAG
 - CGAGAGGCAAAGACTTCAAATATCCCGGAAGC
 - AAACCTCCGTCAATAACCTGTTTAGGTGGCAT
 - CAATTCTAAAGATTCAAAAAGGTGTATGATAT
 - TCAACCGTTAAAATTCGCATTAATAGGAACG
 - CCATCAAAACCGCTTCTGGTGCCGCTGCGCAA
 - CTGTTGGGTTATCCGCTCACAATGTAAAGCC
 - TGGGGTGCCTGTTTGGCCAGCATCGGCAA
 - AATCCCTTATAAATCAAAAGAATGCAGCAA
 - GAGGTGAAGTAACGATCTAAAGTTATGTACCG
 - AATACACACCGATATATTCGGTCTTGCTTTC
 - ACAAAGCTGTATCATCGCTGATAGGCAAAAAG
 - GGCATAGGAGATGTTTAAATTTCTCAACGTA
 - GAAGCCCGTTTTGCAAAAGAAGTTAATTACGA
 - GCAAATGAACAGGTCAGGATTAGATTAAGAG
 - TGTAGGTACTAATAGTAGTAGCATTACATTTT
 - TATTTTGTCTAGCTGATAAATTGAGTAATG
 - TTTCCGGCAATAATTCGCTCTGGAACGTTAA
 - TGAAATTGAAGGGCGATCGGTGCCAGCCAGC
 - CGGTCCACCTAATGAGTGAGCTAATTCCTGTG
 - GGATAGCAAGCCCAATAGGAACCCCTTGTCGTC
 - TTTCCAGGTATCGGTTTATCAGCGCTGAGGC
 - TTGCAGGGAACCTAAAACGAAAGAAATTGTGT
 - CGAAATCATATTCATTACCCAAAAACTTTAA
 - TCATTGTGACATAACGCCAAAAGGTTGCCAGA
 - GGGGGTAGGATTCATCAAAAAGAGAGTACC
 - TTTAATTGTAGTTTGACCATTAGATAACATCC
 - AATAAATTTTAAATGCAATGCCTAATGCCGG
 - AGAGGGTAAAATATTTAAATTTGTACCTTCCTG
 - TAGCCAGCAGGAAGATCGCACTCGGGCCTCT
 - TCGCTATTTTCATGGTCATAGCTGTCTCACATT
 - AATTGCGTGGCCCTGAGAGAGTTAGCCCGAG
 - ATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTTTGCCCTT
 - TTTAATTACGTTAGTAAATGAATATTTTCAG
 - AAGGCACCAGTTAAAGGCCGCTTTAAGGAGCC
 - GAACCGGCGCGACCTGCTCCATGCCACTACG
 - ATGCAGATAATTACCTTATGCGATCTTGACAA
 - GCAAAGCATAGTAAAATGTTTAGTTCAACTA
 - AGTAGATTCTCCTTTTGATAAGAGAGTCAGAA
 - CATATATCATAACAGGCAAGGCAATGCGAACC
 - GTATAAGCGCTATTTTTGAGAGATAGAACCCT
 - TCGGCTCTTTCATCAACATTAAGGAAGATT
 - ATTCGTAAACGCCAGCTGGCGAAACGACAGTA
 - CACCGCCTTGGCTCACTGCCCGGAGCTCGA
 - CCACCCTCAGAGCCACCACCCTCTTTCTGTA
 - TGGGATTTAAAAAAAAGGCTCCAATGCGGGAT
 - CGTCACCGGTAAAATACGTAATGTTACTTAG
 - CCGGAACGCTTCATCAAGAGTAATTTTAAGAA
 - CTGGCTCATTTAGGAATACCACAACCTGGATA
 - GCGTCCAATTACCTGACTATTATGTCATTTT
 - TGCGGATAGTTGATTTCCCAATTCAGAATTAG
 - CAAAATTAAGGATAAAAAATTTTTCTACAAAG
 - GCTATCAAAAAGCCCCAAAAACAATGTGAGC
 - GAGTAACACAGTTTGAGGGGACGAGGGGGATG
 - TGCTGCAAGGATCCCCGGGTACCCTTTCCAG
 - TCGGGAAAGACGGGCAACAGCTGATGGAACAA
 - GAGTCCACTATTAAGAAGCTGGTTCTTTTC
 - AAATCTCTGTAAACAACCTTTCACAGAACC
 - TTAACGCTCAGCAGCGAAAGACCACGTTGA
 - TGGCTGACAGGCGCAGACGGTCAAAGTTTCCA
 - AGTTGAGATTATAACCAGTCAGGAGCATAGGC
 - TCAGGTCTTACTGCGGAATCGTCAGATTTCATC
 - ATATAACGGCTTAGAGCTTAATTATCAAAAA
 - TTCAACGCAGCAATAAAGCCTCAGTTTCATTCC
 - TAATCAGGGTCATTGCCTGAGAGGCCTTTAT
 - GCATCTGCACCCGTGGATTCTCCCCGGTTGA
 - ACTCTAGAGGGGATTAAGTTGGGGTAACCGT
 - ACCAGTGACCTGTCTGCCAGCTGGCAGGTCCG
 - CGCCACCCTCAGAACCGCCACCCTACAGTTTC
 - AGCGGAGCGAATAATAATTTTTTAGCATCGG
 - AACGAGGGGACTTTTTTCATGAGGATCATAAG
 - GAACCGAGGTGTACAGACCAGGCCGTTGGGA
 - AGAAAAATTTATTACAGGTAGAAATAAATATT
 - CATTGAAACGAGAATGACCATAAGCTGAATA
 - TAATGCTGTACGGTGTCTGGAAGTAGCATAAA
 - GCTAAATTACTTTTTGCGGGAGAATCTGGAGC
 - AAACAAGAGTCAATCATATGTACCGTGGGAAC
 - AAACGGCTGTAGATGGCGCATCTAACGCCA
 - GGGTTTTCCCAAGCTTGCATGCCCTCATTAATG
 - AATCGGCGGCGCCAGGGTGGTTTACTCCAAC
 - ACTTCTTTGATTAGTAATAACATAGCGTAAG
 - TGGAAAGCCATACATGGCTTTTGACCGGAATA

- TTTAGCGCGGTTCATAGCCCCCTTAGCCAGAA
 - GACACCACAATTCATATGGTTTACAGTTTGCC
 - GAGGGTAAAGAATFGAGTTAAGCAACGCAAA
 - ACCTCCCATTAGTTGCTATTTTGCAAAGTCA
 - ACATGTTAATAGATAAGTCCTGATTTAGCGA
 - CCTAAATTAAGGCGTTAAATAAGAAATAACA
 - ACATAAAGTAAATCGTCGCTATTTCTTCTGA
 - GAACCTACTAAAGAAATFGCGTAGGAAACAGT
 - AATATCTCGTCAATAGATAATACAAGGGTTA
 - AATACGTGTTAATGCGCGAACTGTTATCTAA
 - CGAGAGGGTTGATATAAGTATAGCTGATACAG
 - GAGTGTAATAAATCCTCATTAATTAAGCGT
 - TTGCCATCAGTAGCGACAGAATCACAGCGCCA
 - AAGACAAGGCAACATATAAAGACCAATAAT
 - AAGAGCAAACTGAACACCCTGAACACCAGC
 - TACAATTTAAGAACGCGAGGCGTACAAGAAA
 - AATAATATCTGTCCAGACGACGACATAAACAC
 - CGGAATCATTTTAGTTAATTTCAAAATTAATT
 - TTCCCTTAATTACCTTTTTTAATGATTTTCAG
 - GTTTAACTACTTCTGAATAATGGATTTGAGG
 - ATTTAGAAAAGGAATTGAGGAAGGATAGCCCT
 - AAAACATAACCCTTCTGACCTGAACACTTGCC
 - TGAGTAGAAGAACTCAAACCTATCGGCCAACAG
 - ACAAACACTGGTAATAAGTTTAAAGTGCCGT
 - CCGTAATCTTTTATAATCAAAATTTGATATTC
 - TAAAGGTAAGGCGACATTCAACTAGCAGCA
 - GGAGAATTGAAACAATGAAATAGCTACATACA
 - GGTATTCTTATCCTGAATCTTACATTAGACG
 - AAGTAATCCCATCCTAATTTACGGCTTATCC
 - CAAATATATAATTACTAGAAAAAAAAGGTA
 - TCATTTGAGAATCCTTGAAAACATAACTTTTT
 - TGGATTAGTCAGATGAATATACATAACAATF
 - ACAGTTGAGTATTAGACTTTACAATGATTTGTT
 - AGATAGACGCCATTAATAACCGCAAATCA
 - TTTTGCTCAGTACCAGGCGGATAACGGGGTC
 - AGTGCCTTGTFCAGACGATTGGCCTCACGGGAA
 - CCAGAGCCCAATGAAACCATCGACGATTGAG
 - GGAGGGAATAGCAAACGTAGAAAAAATAGCTA
 - TCTTACCAAAAACAGGGAAGCGCCAACGCTA
 - ACGAGCGTAAATCAGATATAGAAGAGCATGTA
 - GAAACCAAAATATAAAGTACCGACGCTGTTT
 - AGTATCATACAAAGAACGCGAGAAAGCGATAG
 - CTTAGATCAAAATTAATTACATTTGTAACAGT
 - ACCTTTTATTCATCAATATAATCCACAATTCG
 - ACAACTCAATATCTGGTCAGTTGGAACGAAC
 - CACCAGCATAAAAGGGACATTCTGGCCTTGCT
 - GGTAATATCCAGAACAATATTACGTACACCG
 - TGAGGCAGGAGTAACAGTGCCCGTTAGCGGGG
 - AACGTACACACCACCGGAACCGCCAGGAGGT
 - CAGTATGTGGTAAATATTGACGGAAGGCCGGA
 - ATAACATGAAGCCCTTTTTAAGATTATTACG
 - TAGCAAGCCTTTCCAGAGCCTAATCAGAGAGA
 - ATAAGAGATCAATAATCGGCTGTGCGCCCAA
 - ATCGCAAGATGCGTTATACAAATTAGCCAGTA
 - AAGAAAATAAGACGCTGAGAAGACAAATCCA
 - GATGGCAACATCGGGAGAAACAATCAAACATC
 - CTCAATCGTATTAATCCTTTGCTATCAGAT
 - ACCAGTAAGAAGATAAAAACAGAGGATCAAACC
 - ACTCCTCAAGAGAAGGATTAGGATATAAACAG
 - TTAATGCCCCGCGCCAGCATTGATCCCTCAG
 - AGCCGCCAACCAATTACCATTAGCAAATTATTC
 - ATTAAGGCATGATTAAGACTCCAAAGTAAG
 - CAGATAGCAAAATAGCAGCCTTTATTGCCAGT
 - TACAAAACGTAGGAATCATTACCCCTTCTCTT
 - ATCATTCCGGCAGAGGCATTTTCGCTTACCAG
 - TATAAAGTATGTAAATGCTGATGGTCAATAG
 - TGAATTTAAAAGAAGATGATGAAAAACGGATT
 - CGCCTGATCATCATATTCCTGATCCGAACGT
 - TATTAATTTTCTGCTGAACCTCAAATGAGGCGG
 - TCAGTATATTGGCAGATTACCACGCCAGCC
 - ATTGCAACAGGAAAAACGCTCATGAAATGGAT
 - ACCAGAGCCCCTGCCTATTTCCGGAGGCTGAG
 - CCAGTAGCCCCCTCAGAACCACCACGAACCACC
 - AGAACTGGTGAATTATCACCGTCCAAAATCA
 - CAAAAATGCGAACAAAGTTACCAGTACCCAAA
 - TTTTCATTAACAGCCATATTATTTTAAACGT
 - GTAATTTAAAGAACGGGTATTAACGTTTTTA
 - ATAACTACCAACGCTCAACAGTAGCCAACAT
 - CCTGAGCATCAAAATCATAGGTCTTGGGTTAT
 - GGAATTATTGCTTTGAAATACCAATTCAAATTA
 - GCATCACCTTAAAAGTTTGAGTAAGAAGGAGC
 - TATTTACTAACACCGCCTGCAACAATCTAAA
 - GGTGTATCACCGTACTCAGGAGGTTTAGTAC
 - GGAATTGTGAGAATAGAAAGGAACCGTTCCA
 - GGACTAAAATAGCAACGGCTACAGATTTTCATCG
 - GATGAACACTGACCAACTTTGAAGTCACAAT
 - GAACAACACTACGTAAATAAAAACGAGAGAGAT
 - TCAGAAATCCCCCTCAAATGCTTGAAGCCTT
 - AACTAAAGTAGCTCAACATGTTTTCGCCTGTT
 - CCTGTAACGGTTGTACCAAAAACCGACCGGT
 - ACTAGCATGAATCGATGAACGGTAAATAACCT
 - ACGTTGGGGATTGACCGTAATGGGCACGTAA
 - GGCCAGTGCCAGTCACGACGTTGTCTAATAGA
 - CGTATTGCAACGCGCGGGGAGAGTGAATGGC
 - GTAAGCGTGCAGTCTCTGAATTTACAACATAA
 - GCATTTTTCAGACTGTAGCGCGTGGCTTTGA
 - CAATAGAAGGAATAAGTTTATTTTAGAGGACA
 - AACCCACATTGAGCGCTAATATCAACTAACG
 - AAATCAAGACTTGCGGGAGGTTTTTAAACAGT
 - TATCAACCAGCTAATGCAGAACGAAATATGC
 - TGATAAATTAATGGTTTTGAAATACATTATGAC
 - TGCTTCTTCAATATATGTGAGTGATCGTAAA
 - AACAGAAACATATCAAAATTTATTTGATAGTTC
 - TATTAGTCGCACAGACAATTTTTGCGGTTTG
 - TTAGAGCTTAGGAGCACTAACAAAAACGAC
 - GTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATGTAGCAAT

Séquences m13R2

- TCCGGCTAAATTCTTACCAGTATGAATCGCC
- ACCTGCTCAGGCGCATAGGCTGGCTGTGAATT
- TCTGAATAATTTGCACGTAAAAACATTGAATTA
- TAGTAAATTTTTACGTTGAAAATAGGGAGTT
- TAAAATGTATAAATCAAAAATCAGATTGCTCC
- ATATATTCAATGCCACTACGAAGGATTTGTAT
- AATCAAAAAGAATAGCCCGAGATAGGTGAGACG
- TTTTGATGAAGTTTCATTCATAAAAATCATA
- GAGCCGCCCCGTATAAACAGTTATGAAACAT
- CAGCTGGTGCCTGCAGGTCGACTTGCGTTGC
- ACCAACTGTCAATCATAAGGGAACCACGGAA
- GCGAGCTGGCCTGAGTAATGTGTAGACAGTCA
- CTCAATCAGAGGTGAGGCGGTCAAGAGCCAG
- GCGACATTTCTCTTATTACGCAAGTGAAGAAA
- GGAATCATTTACCAACGCTAACGAAATGAAAA
- ATCATATGAGATCTACAAAGGCTGTAATACT
- AGCGCGAACAATCAACGTAACAAACGAGAAA
- ACCGGAACCCAGCAAAATCACCAGGGAAGGTA
- AACGCGAGTTTTGAAGCCTTAAATAATTAAT
- TAGAGCTTTTTTAAATATGCAACTATTAAGCA
- AAGCGAATTAGATACATTTTCGATTTGGGGC
- GCAGACGTTGAAAGAGGACAGATGCTCATT
- TTGACCACCAGACCGGAAGCAAAAAGCGGAT
- ACATATAATTTGTACAAATCAATAATCAGTA
- CATCGCCGTAATCTTGACAAGAAGCTTGAGA
- CATGGCTGGCCTTGATATTCACATTTTCGGT
- AACGCCAACGAGTAGTAAATTTGGCCGGATAT
- TCATTACCACAAAGTACAACGGAGCACCACCC
- TAGTTAATATACCGACCGTGTGATAATTTCTG
- GCGCGGAGCTGCATTAATGAATCGTGACAC
- ATCGTCGCCATTTAACAATTTTCATGAAATAAA
- CAATGAACTTTACAGAGAGAATAAATTTTAT
- ATAAAACGTCTGAAATGGATTATAATATCCA
- GACGATAAAAAGATTAAGGAAGGAGCTTCA
- GATGGCGTTAAATGTGAGCGAGTGCATGTCA
- GATGAATATGATTATCAGATGATGAGAAGTAT
- GTCGGATAATGGGATAGGTCACGTGCAAGGC
- ACTGTAGAATCAAGTTTGCCTTTAGGGTAGC
- CCCTTTTTTTTTGTTAACGTCAAAGCGTCTTT
- TAGCAGCATAGCAATAGCTATCTACTGGCAT
- TAATAATTGAATTTTCTGTATGGGACCCCTCAG
- GGCGATCGTACCGAGCTCGAATTCGTGCCTAA
- GCGGAATTGCTTTAAACAGTTCAGGATGGCT
- TAAGTTTAAAGAAACGCAAAGACACCCGAATG
- CTCAAACATCGGCCCTTGCTGGTTTTACATTTG
- ATAATCGGCAACGCCAACATGTAATCATATGC
- CATCAACACATCGTAACCGTGCATTTATACGC
- TTACTAGAGATGCAAAATCCAATCGTTAGAAT
- TTTTTTAAACTCCAGCCAGCTTTCAGCGCCAT
- CCAGAGCCAAGCCGTTTTTATTTACCAATCA
- AATATTGCGGAATACCCAAAAGATACCGAAG
- CCTGAGAGAAGTGTAAGCCTGGGGTAATCAT
- CGGTTTATAGACAGCCCTCATAGTAGCAAGCC
- ATTAATTATATTAATTAATTTTCCCAAGACAA
- ATTAATAAAACCAGTACACGACCATAGAAGAA
- GTTAATAAAGGACGTTGGGAAGAAGGTAATTG
- GGTGAGGAAATCTGCGAACGAGTATCTACTAA
- ATTGAGTTGCGCATTAGACGGGAGCAAGATTA
- CCTCAAACGTCATAAATATTCATCCCGACTT

- TCACGACGTGGGTAACGCCAGGGTATCTTTAG
- AACGATTTAAGAAAAGTAAGCAGAGAAAACGCA
- ATAAAAAAGCATTAACATCCAATTAACAGTT
- TCAATATCGTAGATTTTTCAGGTTAAAAACAAA
- TTTTTGAGTACCCCGTTGATAACCAGCTTT
- CACCAGAAAAGGAATTACGAGGCTACCAGAC
- AACGGCTAAGACAGCATCGGAACGAGCGTCA
- GAAGCATAAGTTGCAGCAAGCGGTTGTTTGTAT
- TCCCCGGGGTGCAGGCTCTTCGCTGCCAGT
- GATTAAGACAACCGATTGAGGGAGTAGCACCA
- AGGGACAACTGATAGCCCTAAAAATCAATA
- ACGCTGAGTCATTTCAATTACCTGTTTACATC
- GAACACCATATCAGAGAGATAACAGGTGGCA
- GGCAACAGCTAACTACATTAATCTAGAGGA
- CATATTCCTACAGTAACAGTACCTAGCAAAAAG
- ATTCGCGGACGACGACAGTATCGTTGGGAAG
- TTGAGGGTCTGGCCTTTCCTGTAGTCAGAAAA
- TGAACCTTACAAAACAATTCGACAATTATCAT
- AATTAGAGCGCTCCCTCAGAGCCACCCTCA
- AAACGTATTTACCAGCGCCAAAGGTCACCAA
- CGATCTATCCAAAAGGAGCCTTTCATAACCG
- TAGTAGTTTTTTAGAACCCCTCATACCGTTCT
- ATTTAAAATCAATATGATATTTCAATTTTTTA
- ATATTTAACTGTCTTTTCTTATCATCATCGA
- GAACAATATTACCGCCAGCCATTGTTTTGACG
- AGCTGATAAACAGGAAGATTGTATCAAAAATA
- CCAGACGGAACGCGCCTGTTTATATTCTAAG
- CAGGCAAGAGAAGCCTTTATTTTCAGGTAGCTA
- GCAGATTCTACCGAACGAACCACCCACCTTGC
- TAATAAGTTTTGACAGGAGGTTGAGCATCTTTT
- GGTATATCAGGCTGCGCAACTGGCCTCAGG
- AATAGATAGTTGGCAAATCAACAGAGTCTTTA
- CAGATATTTTTGCACCCAGCTACACATAAAA
- TACAGGTGCGATTTTAAAGAACTGGAACGGTG
- TACCAGTCAACGAACTAACGGAACCCAACTACT
- GTGTCTGAAGAGGTCATTTTTGCGAAAAACGA
- GAAAGTATTAAGAGGCTGAGACTCCCTTGAGT
- ATTGCTGGGTAATCGTAAAACATAAACACCC
- GCGACAGCGCTTTTCATCGGCAAAACAAAATA
- AAACAACAGGAACAACATAAAGGACACCCCTCA
- AAAGGCCGAGGAAGTTTCCATTAATCCGCG
- ATGCGCTTCTGGCCAACAGAGATCTTTGAT
- GTTGCTAAGAAGGCTTATCCGGTCAACAATA
- AAGATCGCCCAATAGGAACGCCATAAGCAAAT
- AAGATGAAACATAGCGATAGCTTACTATATG
- TAAATGCTAAAAGCCTGTTTAGTATTTAGGCA
- GCAAAAAGATTATAGTCAGAAGCACTCCAACA
- AGAACGCTAAGAATAAACACCGGAGAGAATA
- AATAGAATTTCAACAGTTTCAGCAAGCGCAG
- GGTTTGAATTCATCTTCTGACCTAAAATCGGT
- TGTACCACTCAGAGCATAAAGCTAATTTAAT
- TTCTGACCTTTTTGAATGGCTATTTTGAAGG
- TAAAGTACCTGAACAAGAAAAATAAAGCAAAT
- CAATAGGAACCCATGTACCGTAAGCCTGTAG
- ACAGGGAAAAGCCCAATAATAAGAATGTTAGC
- GAATGACCTTAGACTGGATAGCGTAACATTAT
- TGACCGTTCTCCGTGGGAACAAAACACTACATA
- TGAAACCACCTTATTAGCGTTTGGCGAGGTCA
- TAAATCCTGAAAAATCTAAAGCATAGCAGAAG

- GCAGCGAACAGAGGCTTTGAGGACAACGAGGC
 - TATAAGTATAGCCCGGAATAGGTGTATCACC
 - AGGAATACTTTCAACTTTAATCATTGACCTTC
 - TGCATCAAAAACCAAAATAGCGAGAGATACAT
 - AATGCAATAAAAAGGTGGCATCAATGATTTAGT
 - ATCAAGATGATAAATTGTGTGCGAAACGGGTA
 - TCGTGCCGAGAGCGGTTTTGCGTTCCACTAT
 - ATAATAAACGGAAATTATTCATTCATTTGGG
 - GTTATACTAGGTTGGGTTATATAAGATTAAG
 - GAGCACTGAAGGTTATCTAAAATTTCCCGAG
 - TAATGCAACGACAATAAACAACAGCTGTAGC
 - GCGGGAGGGCGTTTTAGCGAACCTTGAATCCC
 - GACGATTTTTGATGATACAGGAGTGCTCAGT
 - CGCCAGCATTAAACGGGGTTCAGTGCTCAAGAG
 - TACAGACCCATGTTACTTAGCCGGTAAAGACT
 - CATAGCCCTCGATAGCAGCACCCGTAGAAAATT
 - GAACAAGCTAATTTGCCAGTTACAAATAAGA
 - TTTTCATGCTTTTGGCGGATCGTATTGCGAA
 - GATTAAGTTTGTAACGACGGCCGAAACCTG
 - TCTCTGAATTAAGCCAGAATGGAGGAGTGAG
 - ACCTTATAGAAAAGATTCATCAGTGGTAATAG
 - TAGTAATAACATCACTTGCCTGAGGTAATAAA
 - CATATGGGAAAATACATACATAACCACAAGA
 - AAAAAGGCAAGTTTTGTGCTCTTTCCCTCAGA
 - AAATACGTGGTCGCTGAGGCTTGCCTCCAAA
 - GATTTCCATTAGAGAGTACCTTTAGTCTTTAC
 - CATAATCTAGCAAGGCCGAAACACAAAAGG
 - GAAATTGAATCCTGATTGTTTGGGAGCCGTC
 - TCTGGTCAATACATTTGAGGATTTGCAATTCA
 - CCTGACTAAGTTTTGCCAGAGGGTGAGATTT
 - AATCACCTTGTAACGTTAATATTCAGCTCA
 - AATTGAGAACAATAATAGATTAATTATACT
 - GCCCCAAAATTAATGCCGGAGAGACGCAAGG
 - CGAATTATAAGAGTCAATAGTGAATTTAACC
 - AGCGCTACTGAACAAAAGTCAGAGAAATCTAC
 - AGACAATATGAAAGCGTAAGAATACGGCCAAC
 - GCTTGCACGAAAGGGGGATGTGCTTGGTGTA
 - GCTCACTGGTTTTTCTTTTACCAGGTTGAGT
 - TCGCCATGCTGTTTCTGTGTGAACGAGCCG
 - CGTTAAAGAGAAAACCTTTTTCAATTCTGTAA
 - GGTGGTTCCGAAATCGGCAAAATCGCCTGGC
 - TCAACATGAATTGCTGAATATAATTGTTTCAGC
 - GTTGTTCAGTTTGGAAACAAGAGATTGGGGC
 - GGGAGAACACCAGAAGGAGCGGAACCTCGTAT
 - ATAAAGCAAAAACATTATGACCCTATCAGGTC
 - AATGACAAAAGAGGCAAAAAGAATTTATACCA
 - AATCCTCATTACCGTTCCAGTAAAGGTTGA
 - CCTGAATCTACCGCGCCAATAGCATATCCCA
 - AACAGTGCACCAGAACCACCACCGAGCCACC
 - CCTTTTTGAGTGAATAACCTTGCATATATTT
 - ACCAGGCGGATAAGTGCCGTCGAGGGCTCATA
 - CGATGAACAGAGTCTGGAGCAAATAAATCAA
 - GATAAGTCCGACAAAAGGTAAAGTAAATAAGG
 - CAGCAAATTTGCCCGAACGTTATTGCGGAACA
 - TAGACTTCAAATATCAAACCTCACATCGCC
 - AAGAAACACAATAACGGATTCCGCCGAGAGG
 - GCCACCACCCTCATTTTCAGGGATTAGCGTAA
 - TAAAGAACGTGGACTCCAACGTCACATCACGC
 - TCCTAATTTTCGAGCCAGTAATAAATCATAA
 - GAGGCATTTACGAGCATGTAGAATCATCGTA
 - TGGTTTTAACACATTCAACTAATGCAGGCTTTT
 - TGAGTGAGCTGATTGCCCTTCACCCCTTATA
 - CCAGGGTGCCCGCTTTCCAGTCGGAGTGCCAA
 - TAAAACGACAACCATCGCCACGAATTGTAT
 - TTTGCGGGCAAAGAATTAGCAAAAAAGTACG
 - AAATTAACCGTTGTAGCAATACTTAGAACCC
 - AAGGATTAGGATTAGCGGGGTTTTGTACTGG
 - TCAAAAATTATGGAAGGGTTAGAACCAGCGGAT
 - TATATGTTAATGGAAACAGTACAAAGAGAAT
 - GTACTCAGGAGGTTTAGTACCGCCATTTTGCT
 - AACCGCCACCCTCAGAACCAGCCACCAGACGT
 - CCTTGAATGAAACAAACATCAAGTAACGTCA
 - CATTCCACCAGCTTGCTTTCGAGGGCGCCGAC
 - TTACCATAAAATCACCGGAACCAAGAGCCGC

Séquences m13RU

- GGAATAAGTTTATTTTATAGAGGACAGATGAAC
- GCACAGACAATATTTTGCAGTTTGCATATTG
- GAAACAGTACATAAAGTAAATCGTCGCTATT
- TTTAACGTCAAAAATGCGAACAAAGTTACCAG
- ATTGAGCGCTAATATCAACTAACGGAACAACA
- TTATCTAAAATATCTCGTCAATAGATAATAC
- AGCCAGAATGGAAAGCCATACATGGCTTTTGA
- AATAAATCCTCATTAAATTAGCGTTTGCCATC
- CAGCTAATGCAGAACGAAATATGCAACTAAAG
- AGCATCGGAACGAGGGGACTTTTTTCATGAGGA
- TAACATCCAATAAATTTTAAATGCAATGCCT
- AGAATTAGCAAAATTAAGGATAAAAATTTTT
- GCATGATTAAGACTCCAAAGTAAGCAGATAGC
- TAACGCCAGGGTTTCCCAAGCTTGCAATGCCT
- AGCGCAGACGGTCAAAGTTTCCATTAAGC
- TATAAATCAAAAGAATGCAAGCAAGCGGTCCAC
- TGGGTTATATAACTACCAACGCTCAACAGTA
- CTCAGCAGCGAAAGACCACGTTGAAAATCTCC
- TATGTAATGCTGATGGTCAATAGTGAATTTA
- GCAGTCTCTGAATTTACAACATAAAGGAATTG
- CTTTCCAGTCGGGAAAGACGGGCAACAGCTGA
- TAGCAACGGCTACAGATTTTCATCGGCATTTT
- AACGCAAAGACACCACAATTCATATGTTTAC
- AATATCTGGTCAGTTGGAACGAACCACCAGCA
- CATACAGGCAAGGCAATGCGAACGAGTAGATT
- TGATTGTTTGGATTAGTCAGATGAATATACA
- CACCGTACTCAGGAGTTTGTAGTACCGCCACCC
- CAAAATCACCAGTAGCCCTCAGAACCAGCCAC
- TACATACATAAAGGTAAGGGCGACATTC AAC
- GAAGGGCGATCGGTGCCAGCAGTTTCCGGC
- CAGGAGGTTGAGGCAGGAGTAACAGTGCCCGT
- CATATCAAAATTTTGTAGGTCACGTTGG
- CCAATGAAACCATCGCAGATTGAGGGAGGGAA
- CCGGAATAGGTGAT
- GAAGGAGCGGAATTTATGCTTTGAATACCAA
- TTGATATAAGTATAGCTGATACAGGAGTGTA
- ATAGTAAAATGTTTGTACTAACTAATGCAGAT
- ACCATTACCATTAGCAAAATTTTCATTAAG
- AGGAAAAACGTCATG
- AAGGGTTAGAACCTACTAAAGAAATTTGCGTAG
- AGCCCAATAGGAACCC
- AAAGAAGATGATGAAAAACGGATTTCGCCTGA
- GTAACGATCTAAAGTTATGTACCGTAACACT
- AAATGGATTATTTACTAACACCCGCTGCAAC
- TAGCAAACGTAGAAAAAATAGCTATCTTACC
- AGGCCGGAACGTCACACCACCGGAACCGCC
- TTTCTGTATGGGATTTAAAAAAAAGGCTCCAA
- CAGAGCCACCACCTC
- TTGTGCTCTTTCCAGGTATCGGTTTATCAGC
- CGTTTTTATTTTTCATTAACAGCCATATTAT
- TTTTGCAAAAGAAGTTAATACGAGGCATAG
- CTGCGCAACTGTTGGGTTATCCGCTCACAAT
- TGGAACAAGAGTCCA
- TGAGAATAGAAAGGAACCGTTCCAGTAAGCGT
- AGCCCTCATAGTTAGCTTTCTTAAACAGCTTG
- TAGCAGCACCGTAATCTTTTCATAATCAAAAT
- AAAAGGTAAGTAATCCCATCTAATTTACG
- ACAGTTTCAGCGGAGCGAATAATAATTTTTT
- CAAAATAGCGAGAGGCAAAGACTTCAAATATC
- GGCAACATATAAAAAGACCAATAATAAGAGCAA
- GTCATTTTTGCGGATAGTTGATCCCAATTC
- TCAGAACCGCCACCCT
- GGATTGACCGTAATGGGCACGTAAAACAGAAA
- TACTTCTGAATAATGGATTTGAGGATTTAGAA
- CCTGTGCTGCCAGCTGGCAGGTGACTCTAG
- TAATGGTTTGAATACATTATGACCCGTGAA
- AATTGTGTGAAATCATATTCATTACCCAAA
- CTGTCCAGACGACGACATAAACACCGGAATC
- AGTACAACGGAGATTTGCTCATTTCAGTGAATA
- AATAATTCGCGTCTGGAACGTTAATTTTTG
- TCATAAGGGAAACCGAGGTGTACAGACCAGGC
- TGATATTCACAAACACTGGTAATAAGTTTTA
- AATTACCTTATGCGATCTTGACAAGAACCAG
- TAAGAACGCGAGGCGTACAAGAAAAATAATAT
- TAGGAACGCCATCAAACCGCTTCTGGTGCCG
- AGCCCGAGATAGGGTT
- GAGTTTCGTCACCAGT
- AATGCCGAGAGGGTAAAATTTTAAATTGTA
- GTATCATCGCCTGATAGGCAAAAGAATACAC
- TAGCTCAACATGTTTTCGCCTGTTTATCAAC
- AAAATAGCAGCCTTTATTGCCAGTTACAAA
- TCTGGAGCAAACAAGAGTCAATCATATGTACC
- AGAACTCAAACATATCG
- ACCGATATATTCGGTCTTGCTTTTCGAGGTGAA
- TAGTAAATTGGGCTTTAAGAGCAACACTATC
- GAGATGGTTTAAATTTCTCAACGTAACAAAGCT
- TGCGGATCGTCACCGGTAAAATACGTAATG
- TTTAGCGAACCTCCCGATTAGTTGCTATTTTG
- GCTTATCCGGTATTCTTATCCTGAATCTTAC
- TGATTAGTAATAACAT
- GTGGGAACAAACGGCTGTAGATGGGCGCATC
- CATCGCCACGATATAAAAACACTCATCTTT
- AAATCAGATATAGAAGAGCATGTAGAAACCA
- GGGCCTCTTCGCTATTTTCATGGTCATAGCTGT
- AGAGAAGGATTAGGATATAAACAGTTAATGC
- CTAATGAGTGAGCTAATCTCTGTGTGAAATTT
- TTTACTTAGCCGGAACGCTTTCATCAAGAGTAAT
- ATTTTGTAAATTTCAAATTAATTTTCCCTTA
- CTACGTTAATAAAAACGAGAGATAACCCAC
- CGTTGGGAAGAAAAATTTATTACAGGTAGAAA
- GTAAAGCCTGGGGTGCCTGTTTGCCCCAGC
- TAGCGGGGTTTTGCT
- CAAAATTAATTACATTGTAACAGTACCTTTTA
- CGGTTGTACCAAAAACCGACCGTGTGATAAAT
- GAACCACCACCAGAGCCCTGCCTATTTCCG
- ATGTGAGCGAGTAACACAGTTTGGGGGACGA
- TTGCGCTCACTGCCCGGAGCTCGAATTCGTAA
- ATTATACCAGTCAGGAGCATAGGCTGGCTGAC
- CCGCCGCCAGCATTGATCCCTCAGAGCCGCCA
- AGTTAAAGGCCGCTTTAAGGAGCCTTTAATTT
- CTAATAGTAGTAGCATTACATTTTCGCAAATG
- GTCACACGACCAGTAAGAAGATAAAAACAGAGG
- GGTGGCATCAATTTCTAAAGATTCAAAAGGGTG
- GCTGAATATAATGCTGTACGGTGTCTGGAAGT
- TAAATATTCATTGAAACGAGAATGACCATAA
- ACGTTAGTAAATGAATATTTTCAGGGATAGCA
- TACCCAAAAGAACTGGTGAATTTACCCGTC
- TTTAAGAAGCTGGCTATTAGGAATACCACA

```

- CCAGTTCACGACGTTGTCTAATAGATTAGAGC
- ACTTGCGGGAGGTTTTTAAACAGTTCAGAAA
- CCTTCCTGTAGCCAGCAGGAAGATCGCACTC
- AACTGAACACCCTGAACACCCAGCTACAATT
- ATTGGCAGATTCACCACGCCAGCCATTGCAAC
- AGAGTACCTTTAATTGTAGTTTGACCATTAGA
- CTCCTTTTGATAAAGAGAGTCAGAAGCAAAGC
- AACAGGTCAGGATTAGATTAAGAGGAAGCCCG
- TTCAATTACCTGAGCATCAAAATCATAGGTCT
- GTCAGACGATTGGCCTCACCGGAACCAGAGC
- GCCAACAGAGATAGACGCCATTAAAAATACC
- CTTTCATCAACATTAAGGAAGATTGTATAAGC
- ACCCTTCTGACCTGAACACTTGCCCTGAGTAGA
- ATTACCTTTTTTAATGATTTTTAGGTTTAA
- GGCAGAGGCATTTTCGCTTACCAGTATAAAG
- AGCGTAAGAATACGTGTTTAAATGCGCGAECTG
- AAGGAATTGAGGAAGGATAGCCCTAAAACAT
- ATCAAACCCTCAATCGTATTAAATCCTTTGC
- TTGCTGAACCTCAAAATGAGGCGGTGAGTAT
- CGTAGGAATCATTACCCTTTTCCTTATCATTCC
- TAACAATTTTCATTTGAGAATCCTTGAAAACAT
- GCGAAAAACCGTCTATGTAGCAATACTTCTT
- AATAAACAACATGTTAATAGATAAGTCCTGA
- TCCAGAACAATATTAC
- TGCTAAACAACCTTTCACAGAACCGCCACCCT
- GCTATTTTTGAGAGATAGAACCCTCATATAT
- TTCTAGCTGATAAATTGAGTAATGTGTAGGTA
- AATCTAAAGCATCACCTTAAAAGTTTGAGTAA
- GCGCCCAATAGCAAGCCTTTCCAGAGCCTAAT
- AATATAAAGTACCGACGCTGTTTAGTATCAT
- CAACGCGCGGGGAGAGTGAATGGCTATTAGTC
- TCAATATATGTGAGTGATCGTAAAACCTAGCAT
- AGTTTGCCTTTAGCGCGGTGATAGCCCCCTT
- AGCCAGTAATAAGAGATCAATAATCGGCTGT
- GGGGGATGTGCTGCAAGGATCCCCGGGTACC
- AAAAAACAGGGAAGCGCCAACGCTAACGAGCGT
- AGTGCCGTGAGAGGG
- TTATTACGCAGTATGTGGTAAATATTGACGGA
- GCAAATCAACAGTTGAGTATTAGACTTTACAA
- CTTCTGACCTAAATTAAGGCGTTAAATAAGA
- CGCGACCTGCTCCATGCCACTACGAAGGCACC
- GAATCGATGAACGGTAAATAACCTTGCTTCT
- GAGTGTGTTCCAGTTTTGCCCCTTACCGCC
- TATGATATTCAACCGTTAAAATTCGCATTAA
- AGCATAAAGCTAAATTACTTTTGCGGGAGAA
- ACTGACCAACTTTGAAGTCACAATCAATAGAA
- CAAACATCAAGAAAATAAGACGCTGAGAAGA
- AGTAGCGACAGAATCACAGCGCCAAAGACA
- GGTCAATTGCCTGAGAGGCCCTTTATTTCAACGC
- TCAGACTGTAGCGGTGGCTTTGAGGACTAAA
- AGCAATAAAGCCTCAGTTCATTCCATATAAC
- CTATTAAGAACGTGGTCTTTTACCAGTGA
- AGGCGATTAAGTTGGGGTAACCGTGCATCTGC
- AGGCTGAGACTCCTCA
- ATTAGACGGGAGAATTGAAACAATGAAATAGC
- GCCAACATGTAATTTAAAGAACGGGTATTTAA
- GGCTTAGAGCTTAATTATCAAAAAATCAGGTCT
- ACCCGTCGGATTCTCCCCGTTGATAATCAG
- CAAATCCAATCGCAAGATGCGTTATACAAATT
- ACGCCAGCTGGCGAAACGACAGTATCGGCCCT
- TTAGGAGCACTAACAAAAAACGACGGCCAGTG
- TCCCCCTCAAATGCTTGAAGCCTTAAATCAAG
- CAAAGTCAGAGGGTAAAGAATTGAGTTAAGC
- CAGTACCAGGCGGATAACGGGGTCAGTGCCTT
- CAGAGAGAATAACATGAAGCCCTTTTTAAGA
- TTCATCAATATAATCCACAATTCGACAACTC
- TATCAGATGATGGCAACATCGGGAGAAAACAT
- ACTCCAACGTCAAAGG
- CTCACATTAATTGCGTGGCCCTGAGAGAGTT
- TTGCCAGAGGGGGTAGGATTGCATCAAAAAG
- ACTGGATAGCGTCCAATTACCCTGACTATTAT
- ACAAAGAACGCGAGAAAAGCGATAGCTTAGAT
- TACTGCGGAATCGTCAGATTCATCAGTTGAG
- TCGGCAAAATCCCT
- CTACAAAGGCTATCAAAAAGCCCCAAAAACA
- CATTAAATGAATCGGCGGCCAGGGTGGTTT
- CCGGAAGCAAACCTCCGTCAATAACCTGTTTA
- GCTGAGGCTTGACGGGAACCTAAAACGAAAGA
- AACTTTAATCATTGTGACATAACGCCAAAAGG
- AACTTTTTCAAAATATATAATTACTAGAAAAA
- TAAAAGGGACATTCTGGCCTTGCTGGTAATA
- TCATCATATTTCTGATCCGAACGTTATTAATT

```

Séquences pS

- GCCATTGGTTAATAGTTTGGCGCACTTTCCAG
 - AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGT
 - GCGCTTTGCCTTTCTCCCTTCGGCTGACGCT
 - CGTATTGGCCGGAAGCATAAAGTGAGGAGCT
 - ATCCTTTGACGAAAACTCACGTTATTCGTTCA
 - TAAGATGCATTCTTACTGTCATAAAGTTGGG
 - GACACATGTACCGCACAGATGCGTCATTCAGG
 - ACCTGTCCCTCATAGCTCACGCTGGGATTAGC
 - AAGTGTCCAAAAAAGGGAATAAGTCCTTTTT
 - TGTCTGTGTACTGAGAGTGCACCATCGGTGC
 - AGAAGAACAGTATTTGGTATCTGAGCAGCAG
 - GGGGGATGGGTTTTCCAGTCACTCACAT
 - AGGCCAGGACATGTGAGCAAAAGGCGTGTAGA
 - GGAAGAAACCCTAAAAAGGCCGTACCGGAT
 - TGGCGTAAACTGTGGGAAGGGCGATATGCGG
 - CACCTATCCTGCAATGATACCGCGTCCAGTCT
 - TAGAAAAATAAACAAATAGGGTTCCGCGCA
 - CCCAGTGTACGCGATCTGTCTATAGGGATTT
 - GTAGCGGTTTTTAAATTAATAATGAACTTGG
 - TAGATCCGGTTTTTTGTTTTGCACGCTCTGC
 - CAATATTATTGAAGCATTATCAGAAGGCAA
 - CTGCATATTTCTGTGACTGGTGGCTGTTGA
 - AGCATCACTATCAGCTCACTCAAAGCGTTTTG
 - TCCATAGATACGGGAGGGCTTACAGTAAGTA
 - CGAGCGAAAAATCGACGCTCAAAAGATACC
 - TAACTACGTTGCCTGACTCCCCGTCCAGCAA
 - CTGCGCATCATGGTCATAGCTGTTCCACACA
 - TACGGTTATCCATAGGCTCCGCCCTCGTGCGC
 - GAAACCATTATTATCATGACATTTACAGCT
 - GATCCAGTCTTCAGCATCTTTTACAATGTATT
 - ATTAATTGGTATGGCTTCATTCATAAGTTGG
 - CCGCAGTGCATTCTGAGAATAGTGCTTCGGGG
 - CGAAAACGGGTGAGCAAAAACAGGGGTTATT
 - CCATGTTGCCGGAAGGGCCGAGCGCAATAAAC
 - GAGTCCAACCCGGTAAGACACGACCAAGCTG
 - TAATTGCGACCTGTGCTGCCAGCTATAACGCA
 - AAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTAAACCTCT
 - GACCGAGTCGATCGTTGTCAGAAGGCTCCGGT
 - TGTGAAAACAGCTCCCGGAGACGGAACCTATA
 - CCCGTCAGGCTGGCTTAACTATGCTGGCGAAA
 - TGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAACACCGCTG
 - GCTCACCGGTTACCAATGCTTAATTCTTCACC
 - CACTGGCAGCAGCCACTGGTAACATAGGTATC
 - CTGACTCGGTTATCCGCTCACAAATTCCTGTG
 - ACCGCTGCACCCGACAGGACTATAGTCAGAGG
 - TGGGGTGCAACGCGCGGGGAGAGGGCGGTAA
 - GCCTTATCCGGTAACTTCAGCCCC
 - ATTACGCAGATTATCAAAAAGGACAGTGAGG
 - TCGGGAATTGCGCTCACTGCCCGACGTTGTT
 - GTCCTGCAGATCAAGGCGAGTTACGCTCCTTC
 - GCGTTTTCTTCAAGGATCTTACCAGTACTCA
 - TGAATACTCATACTCTGGCGCAC
 - AATGCCGATCATTGGAAAAACGTTTATGCGGC
 - TCTGACAGCTCCAGATTTATCAGCAGAAGTG
 - TGGTCATGGCAGAAAAAAGGATCGCTACACT
 - TAACGCCAGTGCTGCAAGGCGATTGCCATCCG
 - CATTCCCCGAAAAAGTGCCACCTGCAGACAAG
 - AATCAATCGATCCGGCAAACAAACGAGTTGGTAGCTCTT
 - AATACCGCTCGGTGATGACGGTGATTCGTCTCGCGGTT
 - ACATACGAGGCGCTCTTCCGCTTCGGCTGCGG
 - GGTCCCTCTGCTCTTGCCCGGCGTAACCTTAA
 - GGGCCTCTCGGCCAGTGAATTGCTGTAAAGCC
 - TCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGTCAAGAAG
 - GTCTCATGAGCGGATACATATTTGTTTCACCA
 - TGTCGGGGGCGCGTACAGCGGGTGGTGCACCC
 - AGCAGATTAAGCGGATGCCGGGAGACGCTTAA
 - GGAAATGTCCGCGCCACATAGCAGCAATACGG
 - GATAATATGCAAAAAAGCGGTTAATGATCCC
 - GAATCGGCCCTAATGAGTGAGCTAGACGTTGT
 - TCCCAACACTTTATCCGCTCCAAGACCCAC
 - AAAACGATCGCTATTACGCCAGCGGCATCAG
 - GTTCGCCACTACAGGCATCGTGGTTGGCAGCA
 - TCAGTTCGTTCCGACCCTGCCGCTCGTTGCTG
 - CGTCGTTTTGTTGCCGGGAAGCTAGCATCTGGC
 - AGGCGTTTTGTCACGAACCCCGTATCGTCTT
 - TCTCCTGGTGTAGGTCGTTTCGCTCTTATCGC
 - GGCTGTGCCCCCTGGAAGCTCCCCCTGACG
 - ACCAAGTTTATCACTCATGGTTAGTCACGCT
 - TGGCGAACTGCGCTCGGTGCTTCTCGCTCA
 - GCGTTTTTCCACAGAATCAGGGGGCATTAAAT
 - CAGCCAGTAAAGTATATATGAGTAAGTTTTA
 - AACTGATTCGATGTAACCCACTTTGGCGGG
 - CAGTGGAATCTTTCTACGGGGTGAAGCGTG
 - TGAAATTATCAGGCGCCATTTCGCAAGGAGAA

Séquences pU

- AGCGGATACATATTTGTTTCACCAGCGTTTCT
 - AGCAGCAGATTACGCAGATTATCAAAAAGGA
 - GGTATGTAGGGCGTGCTACAGAGTTCTTGAAG
 - TAAGTTGGCCGCAGTGCATTCTGAGAATAGTG
 - ATCAGGGCCATTTCGCAAGGAGAAAATACCGC
 - AAGCGGATGCCGGGAGACGTCTAAGAAACCA
 - GCCTTTCTCCCTTCGGCTGACGCTCAGTGGA
 - TCCACAGAATCAGGGGGCATTAAATGAATCGGC
 - TCCTTTTTCAATATT
 - GGCTGCGGCGAGCGGAAAAATCGACGCTCAA
 - CGTATCACGAGGCCCT
 - TATCAGCTCACTCAAAGCGGTTTGCCTATTG
 - TCTCAAGGATCTTACCAGTACTCAACCAAGT
 - ATCTCTTACTGTCTATAAGTTGGGTAACGCCA
 - TGGTGGCCTAAGCTG
 - TCGATGTAACCCACTCTTGGCGGGTGTCCGG
 - TTGCCTGACTCCCCGTCCAGCAAAAGGCCAGG
 - AACTTTAAAAGTGCTCCAAAAAAGGGAATAAG
 - AATGTATTTAGAAAA
 - TAAAGTATATATGAGTAAGTTTTAAATCAATC
 - ACCCGACAGGACTATAGTCAGAGGTGGCGAA
 - ATTGAAGCATTTATCAGAAGGCAAAATGCCG
 - CACCGCTGGTAGCGGTTTTTAAATTAATAATG
 - CTGCGCTCGGTCGTTCCCTCGCTCACTGACTCG
 - ACATGTGAGCAAAAGGCGGTGATAGATAACTACG
 - GCCTTATCCGGTAACTTCAGCCCGACCGCTGC
 - ACTCACATTAATTGCGACCTGTCGTGCCAGCT
 - TTATTATCATGACATT
 - CATTCAAGGCTGCGCATCATGGTCATAGCTGT
 - GGCGCGTCAGCGGGTGGTGCACCCAACTGAT
 - ATCATTGGAAAACGTTTATGCGGCGACCGAGT
 - TTCGTTTCATCCATAGATACGGGAGGGCTTAC
 - ATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCC
 - AAACCTGGTCTGACAGCTCCAGATTTATCAG
 - GCAGCCACTGGTAAACATAGGTATCTCAGTTCCG
 - GTAAAGCCTGGGGTGCAACGCGGGGAGAG
 - GGGTTATTGTCTCATG
 - CCCCTGGAAGCTCCCCCTGACGAGCATCAC
 - CCTAATGAGTGAGCTAGACGTTGTAAAACGA
 - GCTCCTTCGGTCCCTCTGCTCTTGCCCCGGCT
 - ATCGTCTTGAGTCCA
 - TCGCTATTACGCCAGCGGCATCAGAGCAGATT
 - GGATTAGCAGAGCGA
 - CAGTATTTGGTATCTG
 - TACCGGATACCTGTCCCTCATAGCTCACGCTG
 - TGAATACTCATACTCTGGCGACACGGAAATGT
 - GTTACCAATGCTTAATTTCTTACCTAGATCC
 - TGCAAAAAAGCGGTTAATGATCCCCCATGTTG
 - CAGTGAGGCACCTATCCTGCAATGATACCGCG
 - ATCGGTGCGGGCCTCTCGGCCAGTGAATTGCT
 - TCAGCGATCTGTCTATAGGGATTTTGGTCATG
 - CGATCGTTGTCAGAAGGCTCCGGTTCCCAAC
 - ATAACGCAGGAAAAGAAACCGTAAAAAGGCCG
 - TCGGTGATGACGGTGATTTCGTCTCGCGGTT
 - GTTAATAGTTTGGCGACTTTCAGTCCGGAA
 - GCCGGAAGCATAAAGTGAGGAGCTTGGCGTAA
 - AAGATAACCAGGCGTTTGCACGAACCCCCGT
 - TCAAGAAGATCCTTTGACGAAAACCTCACGTTA
 - TTCCGACCCTGCCGCTCGTTGCTGGCGTTTT
 - TCGTGCGCTCTCCTGGTGTAGGTCGTTGCT
 - TCACAGCTTGTCTGTACTGAGAGTGCACC
 - GTTATCCGCTCACAATTTCTGTGTGAAATT
 - TTGGCGTCACTGCCCCGACGTTGTTGCCATTG
 - CTTATCGCCACTGGCA
 - GATCCGGCAAACAAACGAGTTGGTAGCTCTT
 - CTTCGGGGCGAAAACGGGTGAGCAAAAACAG
 - TGGCGAAAGGGGATGGGTTTTCCAGTCAC
 - GTTACCTTCGGAAAA
 - CCGGAAGGGCCGAGCGCAATAAACCCAGCCAG
 - CAGACAAGCCCGTCAGGCTGGCTTAACTATGC
 - ACTGTTGGGAAGGGCGATATGCGGTGTGAAA
 - CGAAAAAGTGCCACCTG
 - GTTGCCGGGAAGCTAGCATCTGGCCCCAGTG
 - CAGCTCCCGGAGACGGAACCTATAAAAATAGG
 - GGCGGTAATACGGTTATCCATAGGCTCCGCCC
 - ACCCGGTAAGACACGACCAAGCTGGGCTGTG
 - GCAGAAAAAAGGATCGCTACACTAGAAGAA
 - GTGCTGCAAGGCGATTGCCATCCGTAAGATGC
 - TTATCACTCATGGTTAGTCAAGCTCGTCGTTT
 - CAGAAGTGGTCCCTGCAGATCAAGGCGAGTTAC
 - GGTTTTTTTGTTTGCACGCTCTGCTGAAGCCA
 - GCTGTTGAGATCCAGTCTTCAGCATTTTTAC
 - AAACCTCTGACACATGTACCGCACAGATGCGT
 - TCCAGTCTATTAATTGGTATGGCTTCATTCA
 - CCGCGCCACATAGCAGCAATACGGGATAATA
 - AGTAAGTAGTTTCGCCACTACAGGCATCGTGGT
 - TGGCAGCACTGCATATTTCTGTGACTGGTG
 - TCCACACAACATAACGAGGCGCTCTTCCGCTTC
 - ACTTTATCCGCTCCAAGACCCACGCTCACCG
 - ATCTTTTTCTACGGGGTGAAGCGTGGCGCTTT

Résumé

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est le support de notre génome, c'est aussi un biopolymère dont les propriétés d'hybridation de deux simples brins complémentaires en une double hélice permettent son utilisation comme brique élémentaire pour l'auto-assemblage de structures avec une résolution de quelques nanomètres. Parmi les différentes méthodes d'assemblage développées, l'origami d'ADN dans lequel un simple brin d'ADN issu du génome d'un phage est replié de manière programmable par un ensemble de brins synthétiques plus petits appelés agrafes, permet l'assemblage de structures bi ou tri-dimensionnelles de manière très robuste. La conception de ces origami est basée sur la thermodynamique à l'équilibre, c'est à dire sur l'optimisation de l'appariement complémentaire des bases. Cependant, bien que des outils interactifs qui facilitent la conception de structures aient été développés, très peu de recherches se sont focalisées sur le processus du repliement et sur son optimisation. Notre travail a consisté à étudier la thermodynamique de nanostructures d'ADN afin de mieux comprendre le processus d'assemblage et d'en identifier des étapes clés.

Nous avons effectué des mesures en calorimétrie différentielle à balayage (DSC) sur des structures modèles et des origami d'ADN. Ainsi, nous avons pu identifier la présence d'étapes clés dans le repliement de nanostructures comportant un petit nombre de brins d'ADN. Nous montrons qu'en modifiant les séquences il est possible de changer la coopérativité et la stabilité de l'assemblage des nanostructures et donc de modifier le chemin de repliement.

L'étude d'origami simplifiés comportant une ou deux agrafes nous a permis de mesurer l'influence de la position des agrafes, de la taille des boucles et de l'orientation des brins d'ADN sur la thermodynamique du repliement. Enfin, les mesures calorimétriques effectuées sur des origami d'ADN nous ont permis de résoudre l'hybridation collective d'ensembles d'agrafes. Cela nous permet de hiérarchiser l'assemblage de l'origami en domaines distincts.

Ce travail de thèse a également consisté au développement de méthodes innovantes de nanocalorimétrie ultrasensible intégrant de la microfluidique. Ces méthodes calorimétriques permettront d'accéder aux paramètres cinétiques de l'assemblage en plus des paramètres thermodynamiques à l'équilibre.

Nos résultats obtenus sur les nanostructures modèles montrent qu'il est possible d'optimiser la conception des nanostructures d'ADN en intégrant dans la conception le processus d'assemblage. Des nanostructures d'ADN à l'assemblage performant permettront peut-être à l'avenir le développement d'automates moléculaires synthétiques qui sont une des applications très prometteuses de ces systèmes.