



**HAL**  
open science

# Etude des interactions origami d'ADN/surface pour des applications en lithographie

Ludwig Rotsen

► **To cite this version:**

Ludwig Rotsen. Etude des interactions origami d'ADN/surface pour des applications en lithographie. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALT015 . tel-04116889

**HAL Id: tel-04116889**

**<https://theses.hal.science/tel-04116889>**

Submitted on 5 Jun 2023

**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 L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

École doctorale : EEATS - Electronique, Electrotechnique, Automatique, Traitement du Signal (EEATS)

Spécialité : Nano électronique et Nano technologies

Unité de recherche : Laboratoire d'Electronique et de Technologie de l'Information (LETI - CEA)

**Etude des interactions origami d'ADN/surface pour des applications en lithographie**

**Study of the DNA origami/surface interactions for lithographic applications**

Présentée par :

**Ludwig ROTSEN**

Direction de thèse :

**Raluca TIRON**

Directrice de recherche, CEA-LETI à Grenoble

Directrice de thèse

**Gaëtan BELLOT**

Chargé de recherche, INSERM, CBS à Montpellier

Co-directeur de thèse

**Guido RADEMAKER**

Ingénieur de recherche, CEA-LETI à Grenoble

Co-encadrant de thèse

Rapporteurs :

**Yann CHEVOLOT**

Directeur de recherche, CNRS, INL à Ecully

**Nicolas SCHABANEL**

Directeur de recherche, CNRS, ENS de Lyon

Thèse soutenue publiquement le **22 février 2023**, devant le jury composé de :

**Raluca TIRON**

Directrice de recherche, CEA-LETI à Grenoble

Directrice de thèse

**Nicolas SPINELLI**

Maître de conférences HDR, Université Grenoble Alpes

Président du Jury

**Yann CHEVOLOT**

Directeur de recherche, CNRS, INL à Ecully

Rapporteur

**Nicolas SCHABANEL**

Directeur de recherche, CNRS, ENS de Lyon

Rapporteur

**François MORVAN**

Directeur de recherche, INSERM, IBMM à Montpellier

Examineur

Invités :

**Guido RADEMAKER**

Ingénieur de recherche, CEA-LETI à Grenoble

**Gaëtan BELLOT**

Chargé de recherche, INSERM, CBS à Montpellier





---

« La densité de l'Histoire ne détermine aucun de mes actes. Je suis mon propre fondement. Et c'est en dépassant la donnée historique, instrumentale, que j'introduis le cycle de ma liberté ».

---

*Frantz Fanon, Peau noire, masques blancs, 1952*



# Remerciements

Voici venu l'occasion pour moi de remercier celles et ceux qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ces trois années de thèse.

Je souhaite tout d'abord exprimer ma gratitude à Yann Chevolut et Nicolas Schabanel d'avoir accepté de rapporter ce manuscrit de thèse ainsi qu'à François Morvan et Nicolas Spinelli d'avoir accepté d'être examinateur.

Je souhaiterais remercier Raluca. Merci à toi pour ton encadrement tout au long de ces trois ans. Merci de m'avoir soutenu dans toutes mes idées et d'avoir pris le temps de discuter avec moi de mes résultats et de mes analyses. Ces petites sessions de discussions ont été essentielles pour moi. Tu as su trouver le temps pour tout cela malgré ton emploi du temps très chargé.

Un grand Merci à toi Gaëtan. Tout d'abord, merci pour ton accueil au CBS et pour l'apprentissage des méthodes de design et de synthèse des origamis d'ADN. Je te remercie pour ton soutien lors des premiers mois de confinement liés au COVID et des mois qui ont suivi. Ça a été un réel plaisir pour moi de travailler avec toi surtout lors de nos créneaux de TEM lorsque nous découvrons nos premiers résultats prometteurs. Je souhaite par la même occasion remercier Allan et Nesrine pour l'aide à la compréhension des différentes méthodes et bases du domaine. Je remercie aussi tout le CBS et plus particulièrement l'équipe IBM. Je souhaite dire un grand merci à Joséphine pour son aide avec le TEM.

Je te remercie Guido, pour ton soutien et pour tes encouragements tout au long de la thèse. Merci de ton aide avec l'administratif et pour tes corrections lors de la rédaction du manuscrit. Merci aussi pour ton aide avec le logiciel Python et la méthode de détection des centres. Tout cela m'a permis d'aller plus loin dans l'analyse de mes résultats.

Je souhaite remercier, Juan Elzegaray et Pascal Mailley pour leurs conseils et encouragements au cours de nos différents CSI. Ces différents échanges ont été pour moi l'occasion de m'assurer de la qualité de mon travail.

Merci à Denis Mariolle pour l'apprentissage de l'AFM qui aura été l'un des outils principaux de ce travail de thèse. Merci pour le temps que tu as pris pour me former mais aussi le temps que nous avons passé à essayer de réaliser les expériences d'AFM liquide. Je te remercie pour ta patience et ton enthousiasme. Merci à Guillaume Freychet pour ses analyses aux rayons X qui nous ont permis d'entrevoir de nouvelles perspectives de travail.

Je souhaite aussi remercier Christine Saint-Pierre et Didier Gasparutto pour leur accueil sur la plateforme Biomade et pour leur gentillesse.

Je remercie tous les membres du LLIT et surtout l'équipe ALPS (OPER'ALPS) pour les nombreux échanges que nous avons pu avoir. Merci pour votre bonne humeur. Je remercie particulièrement mes co-bureaux. Les anciennes Marie et Aurélie qui m'ont accueilli et m'ont donné de nombreux conseils et les nouveaux Raphaël et Diana. Merci pour les discussions, les conseils et le soutien surtout pendant

les périodes les plus délicates. Je vous remercie tous les deux pour votre disponibilité, votre patience et votre gentillesse lors de mes nombreuses répétitions de conférence et de soutenance. J'en profite pour remercier les personnes qui ont participé aux dernières répétitions : Chiara, Marie-Line, Ivanie et Nicolas. Je remercie aussi Jorge, Isabelle et Api qui se sont proposés pour la relecture d'une partie de mon manuscrit mais que je n'ai pas eu le temps de solliciter.

Je tiens à remercier Julie pour son aide précieuse concernant les démarches administratives pour la préparation des conférences. Merci pour ton écoute et ta gentillesse. Merci aussi à Jumana pour son aide, surtout lors des démarches pour la préparation de la soutenance.

Un grand Merci à Jérôme pour ton aide sur une partie importante du projet. Tu m'as permis d'avancer à un moment crucial de ma thèse. Merci aussi pour la relecture d'une partie de mon manuscrit et pour tes conseils pour la préparation de la soutenance. Ton aide m'a permis d'avoir un peu plus de recul sur mon travail afin de pouvoir aller plus loin.

Enfin je souhaite remercier du fond du cœur ma famille sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Tout d'abord ma mère et mon père. Je vous remercie de tout mon cœur pour votre éducation, votre aide, vos conseils et votre soutien dans les moments difficiles. Sans vous, je ne serai jamais arrivé jusqu'ici. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Je remercie mes frères et ma sœur pour leur présence et leur soutien. Je souhaite que vous puissiez tous les trois vous construire et faire ce que vous souhaitez. Merci infiniment à toi Carla, ma compagne, pour ta présence, ton soutien et ta gentillesse. Toi aussi, tu m'as permis d'avoir la force de pouvoir finir ce projet. Merci pour tes nombreux conseils et mots gentils. Merci d'avoir été toi. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté et plus particulièrement pour votre amour.

## Table des matières

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>I</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>3</b>
<b>TABLE DES SYMBOLES.....</b>	<b>4</b>
<b>CHAPITRE I- ETAT DE L'ART : L'ADN ET LA NANOSTRUCTURATION DE SURFACE.....</b>	<b>6</b>
I.1 AUTO-ASSEMBLAGE SUPRAMOLECULAIRE A BASE D'ADN .....	7
<i>I.1.1 Introduction .....</i>	<i>7</i>
<i>I.1.2 Evolution des nanotechnologies de l'ADN.....</i>	<i>9</i>
<i>I.1.3 Applications des origamis d'ADN.....</i>	<i>20</i>
I.2 LA MICROELECTRONIQUE ET LA NANOSTRUCTURATION DE SURFACE.....	23
<i>I.2.1 Introduction .....</i>	<i>23</i>
<i>I.2.2 Les méthodes de lithographie.....</i>	<i>24</i>
<i>I.2.3 La gravure.....</i>	<i>26</i>
I.3 LES ORIGAMIS D'ADN ET LA NANOSTRUCTURATION DE SURFACE.....	27
<i>I.3.1 Le transfert des nanostructures d'ADN dans des substrats par gravure.....</i>	<i>27</i>
<i>I.3.2 Les interactions entre les origamis d'ADN et les substrats d'oxyde.....</i>	<i>30</i>
I.4 OBJECTIFS DE LA THESE.....	44
<i>I.4.1 Contexte .....</i>	<i>44</i>
<i>I.4.2 Problématique .....</i>	<i>44</i>
<b>CHAPITRE II- AUTO-ASSEMBLAGE SUPRAMOLECULAIRE A BASE D'ORIGAMIS D'ADN</b>	<b>49</b>
II.1 DESIGN, SYNTHÈSE, PURIFICATION ET AUTO-ASSEMBLAGE A GRANDE ECHELLE DE DIFFERENTS TYPES D'ORIGAMIS D'ADN .....	50
<i>II.1.1 Objectifs.....</i>	<i>50</i>
<i>II.1.2 Matériel et méthodes.....</i>	<i>50</i>
<i>II.1.3 Auto-assemblage par appariement de base de microfilaments en origamis d'ADN .....</i>	<i>57</i>
<i>II.1.4 Auto-assemblage par complémentarité de forme de suprastructures d'ADN .....</i>	<i>80</i>
<b>CHAPITRE III- APPLICATION DES ORIGAMIS D'ADN AU MONDE DE LA NANOSTRUCTURATION DE SURFACE .....</b>	<b>106</b>

III.1 OBJECTIFS.....	107
III.2 MATERIELS ET METHODES.....	108
III.2.1 Auto-assemblage assisté par substrat des origamis sur la surface SiO <sub>2</sub> .....	108
III.2.2 Méthodes de caractérisation.....	110
III.2.3 Traitement d'images.....	112
III.3 AUTO-ASSEMBLAGE ASSISTE PAR SUBSTRAT DES RESEAUX 2D EN ORIGAMIS D'ADN ..	123
III.4 CONCLUSION DU CHAPITRE.....	155
III.4.1 L'auto-assemblage assisté par substrat en présence de MgCl <sub>2</sub> .....	155
III.4.2 L'auto-assemblage assisté par substrat en présence de MgCl <sub>2</sub> et de NaCl .....	156
<b>CHAPITRE IV- CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>158</b>
IV.1 CONCLUSION GENERALE .....	159
IV.2 PERSPECTIVES .....	164
IV.2.1 Design, synthèse et purification des origamis d'ADN .....	164
IV.2.2 Auto-assemblage assisté par substrat des réseaux 2D en origamis d'ADN .....	165
<b>ANNEXES.....</b>	<b>170</b>
STRUCTURES CADNANO .....	171
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>177</b>

# Introduction générale

La description de la structure de la double hélice d'acide désoxyribonucléique (ADN) par Watson et Crick en 1953 a permis l'émergence du domaine des nanotechnologies de l'ADN et la mise en avant de nombreuses applications. En 1982, Nadrian Seeman propose d'utiliser les propriétés de complémentarité de la molécule d'ADN afin de permettre la réalisation de nanostructures 2D ou 3D.

Dès lors, les nanostructures d'ADN, et plus précisément les origamis d'ADN sont devenus des briques élémentaires de choix pour le transfert de motifs dans des substrats d'oxyde très utilisés en microélectronique tels que le dioxyde de silicium ou encore le dioxyde de titane.

Le diamètre de 2 nm de la double hélice d'ADN autorise l'obtention de motifs de très petite dimension que les techniques de lithographie conventionnelle ne peuvent pas atteindre. En outre, la méthode des origamis d'ADN, permet la création de structures hiérarchiques très complexes telles que des réseaux 2D ou des cristaux photoniques 3D.

Ainsi, le CEA-Leti a développé des méthodes de nanostructuration de surface par gravure afin de permettre le transfert des motifs d'ADN dans le silicium. En parallèle, des méthodes de positionnement déterministe ont été mise en place pour garantir le dépôt précise des origamis sur les substrats.

L'utilisation de l'ADN pour la nanostructuration de surface nécessite le contrôle des interactions électrostatiques entre ces deux matériaux. Depuis le début des années 2000, de nombreuses études se sont intéressées à l'étude des interactions ADN-mica en présence de cations monovalents et/ou divalents. Par la suite, la compréhension de ces phénomènes a engendré l'obtention de réseaux 2D en origamis d'ADN via l'utilisation substrats de mica.

L'objectif de cette thèse est de mettre en place le design et le protocole d'assemblage d'un réseau 2D en origami d'ADN. Il devra servir de masque de gravure pour la réalisation d'un réseau 2D de qubits sur silicium. Les origamis exploiteront la complémentarité de forme afin de créer les réseaux 2D en solution. Ensuite, nous développeront des méthodes d'auto-assemblage assisté par substrat de SiO<sub>2</sub> afin de garantir la formation de large réseaux 2D directement sur le substrat.

Le **premier chapitre** s'articulera autour de la présentation du contexte de l'étude. Nous présenterons un état de l'art traitant de l'évolution des nanostructures d'ADN et de leurs applications. Ensuite, nous parlerons succinctement des méthodes des techniques de lithographie conventionnelle et quelques méthodes alternatives et de l'utilisation des origamis d'ADN dans ce domaine. Nous discuterons des interactions attractives et répulsives entre deux surfaces chargées et de leur application dans le cas des interactions origami d'ADN-surface. Enfin, les objectifs de la thèse seront présentés.

Le **deuxième chapitre** s'intéressera à la mise de deux systèmes de design d'origamis d'ADN. Dans un premier temps, nous présenterons un origami pouvant s'auto-assembler en microfilaments par appariement de bases et devant servir pour des applications en cryo-TEM. La deuxième partie du chapitre sera tournée vers la mise en place d'un système d'origamis d'ADN s'auto-assemblant par

complémentarité de forme en réseaux 2D. La dernière partie présentera trois types de nanostructures hiérarchiques originaux que nous avons mis en œuvre.

Le **troisième chapitre** portera sur l'élaboration de procédés d'auto-assemblage assisté par substrat des réseaux 2D. Dans ce chapitre nous présenterons les différents protocoles et méthodes de traitements utilisés. Ensuite, nous discuterons des résultats obtenus en fonction des différents paramètres d'expériences.

Enfin, la conclusion portera sur les principaux résultats obtenus lors de la thèse et nous présenterons quelques perspectives.

# LISTE DES ABBREVIATIONS

1D	1 Dimension
2D	2 Dimensions
3D	3 Dimensions
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Atomic Force Microscopy - Microscope à Force Atomique
ALD	Atomic Layer Deposition - Dépôt de couche atomique
ARNt	ARN pré-transfert
ATP	Adénosine triphosphate
CD	Critical Dimension - Dimension critique
CD-SEM	Critical-Dimension Scanning Electron Microscopy - Microscopie Electronique à Balayage à Dimension Critique
CVD	Chemical Vapor Deposition
DLC	Diamond Like Carbon
DLVO	Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek
DSA	Directed Self-Assembly - Auto-assemblage dirigé
e-beam	Electron Beam Lithography - Lithographie par faisceau d'électrons
EDTA	EthylèneDiamineTétraAcétique
EUV	Lithographie Extrême UV
FFT	Fast Fourier Transform - Transformation de Fourier Rapide
FRET	Förster resonance energy transfer
FWHM	Full Width at Half-Maximum - Largeur à mi-hauteur
HF	Acide fluorhydrique
HMDS	Hexaméthylidisilazane
NIL	Nano-imprint Lithography - Lithographie par nanoimpression
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction - Réaction de polymérisation en Chaîne
PSD	Power Spectrum density
RNase P	Ribonucléase P
RX	Rayon X
SEM	Scanning Electron Microscopy - Microscope Electronique à Balayage
SiO <sub>2</sub>	Dioxyde de silicium
TBE	Tris Borate EDTA
TEM	Transmission Electron Microscopy
TMS	Triméthylsilyle
u.a	Unité arbitraire
UV	Ultra Violet

## TABLE DES SYMBOLES

Nom	Description	Valeur	Unité
$R$	Constante des gaz parfaits	8.3145	J.mol <sup>-1</sup>
$N_A$	Nombre d'Avogadro	6.02.10 <sup>23</sup>	mol <sup>-1</sup>
$NA$	Ouverture de la lentille		
$T$	Température		°C
$\lambda$	Longueur d'onde		nm
nm	nanomètre		
$\mu\text{m}$	micromètre		
mM	Milli molaire		$\mu\text{mol/L}$
nM	Nano molaire		nmol/L
$\xi$	Longueur de corrélation		nm
$\mu$	Moment dipolaire		C.m
$\alpha_e$	Polarisabilité électronique		C.m <sup>2</sup> .V <sup>-1</sup>
$\mathcal{A}$	Energie d'extraction d'un électron		J
$\epsilon_0$	Permittivité diélectrique du vide		F.m <sup>-1</sup>
$A$	Constante d'Hamaker		
$I$	Force ionique		mol/L
$D$	Constante diélectrique de l'eau	78	
$e$	Charge élémentaire	1.6.10 <sup>-19</sup>	C



# Chapitre I- Etat de l’art : L’ADN et la nanostructuration de surface

---

*L’objectif de ce chapitre est de démontrer la possibilité d’utiliser les origamis d’ADN comme outils de réponse à des problématiques technologiques en micro/nanoélectronique ou encore en analyse structurale de suprastructures biologiques.*

*La première partie de ce chapitre sera consacrée à l’évolution du domaine des Nanotechnologies de l’ADN avec un fort accent mis sur la description de la méthode des origamis d’ADN et des applications liées.*

*Ensuite, nous présenterons les différentes techniques de lithographie conventionnelle et alternative et nous parlerons de l’utilisation des origamis d’ADN pour la nanostructuration de surface. Il sera nécessaire de présenter la théorie derrière les interactions entre deux surfaces chargées sur laquelle est basée la description des interactions ADN-surface.*

*Enfin, nous présenterons le contexte et les objectifs de la thèse.*

---

## I.1 Auto-assemblage supramoléculaire à base d’ADN

### I.1.1 Introduction

L’auto-assemblage est défini comme étant le processus d’assemblage de sous-éléments désordonnés en une structure ordonnée sans intervention extérieure (humaine ou machinale). Ce phénomène se retrouve dans la nature à différentes échelles comme : La formation des régimes climatiques ou encore la réplication cellulaire. Dans le dernier cas nous parlerons d’auto-assemblage supramoléculaire <sup>[1]</sup>.

L’auto-assemblage supramoléculaire est basé sur l’auto-organisation de sous-unités moléculaires formant des structures hiérarchiques à grande échelle. Ce mécanisme est rendu possible grâce à la présence de différentes interactions moléculaires tels que : **les liaisons ioniques, les liaisons hydrophobes, les liaisons de Van der Waals, les liaisons hydrogène (liaison H) ou encore les liaisons de coordinations** <sup>[2]</sup>. Par exemple, l’actine, et plus précisément l’actine globulaire (actine G), une protéine présente dans le cytosquelette des cellules eucaryotes peut, par polymérisation, former des microfilaments unidimensionnel (1D) nommés actines filamenteuses (actine F) (voir la Figure I-1-A). Ces derniers participent à certains mécanismes biologiques tels que l’organisation et la mobilité cellulaire durant la division des cellules ou encore la contraction des muscles <sup>[3,4]</sup>. Cette polymérisation est amorcée par une phase de nucléation, suivi d’une phase d’élongation puis d’un état stationnaire. L’actine G étant polaire, le mécanisme de polymérisation met en jeu des interactions faibles de Van der Waals <sup>[3,5]</sup>.

Des suprastructures plus complexes bidimensionnelles (2D) ou tridimensionnelles (3D) peuvent aussi être observées. C’est notamment le cas des capsides de virus (Figure I-1-B). Ces dernières sont des ensembles de protéines auto-assemblés par nucléation sous forme de cristaux symétriques <sup>[6-8]</sup>. Ses suprastructures possèdent de très bonnes propriétés de symétrie, d’uniformité de taille, d’uniformité de forme et de chimie de surface <sup>[8]</sup>. Un fort intérêt s’est donc porté sur leur utilisation afin de créer des matériaux avec des propriétés physico-chimiques uniques. Nous pouvons en effet citer le cas des microtubules. Ces derniers sont des assemblages de dimères appelés tubulines, eux-mêmes constitués de deux sous-unités : la tubuline  $\alpha$  et la tubuline  $\beta$ . Leur assemblage est assurée par des liaisons non-covalentes. Les microtubules sont des structures dynamiques pouvant se polymériser et se dépolymériser en continu. L’étude des propriétés d’auto-réparation des microtubules a été réalisée par Tricilin Schaedel *et al.* <sup>[9]</sup>. Il a été question d’y exercer des contraintes mécaniques et d’ajouter au système réactionnel des dimères de tubulines. Cela a permis d’observer l’insertion de dimères additionnels dans la structure des microtubules leur permettant de recouvrer leur structure sans défaut à la suite de l’application d’une contrainte mécanique. Il a aussi été possible d’observer des échanges spontanés entre la tubuline libre et celle de structures non soumises à des contraintes mécaniques.

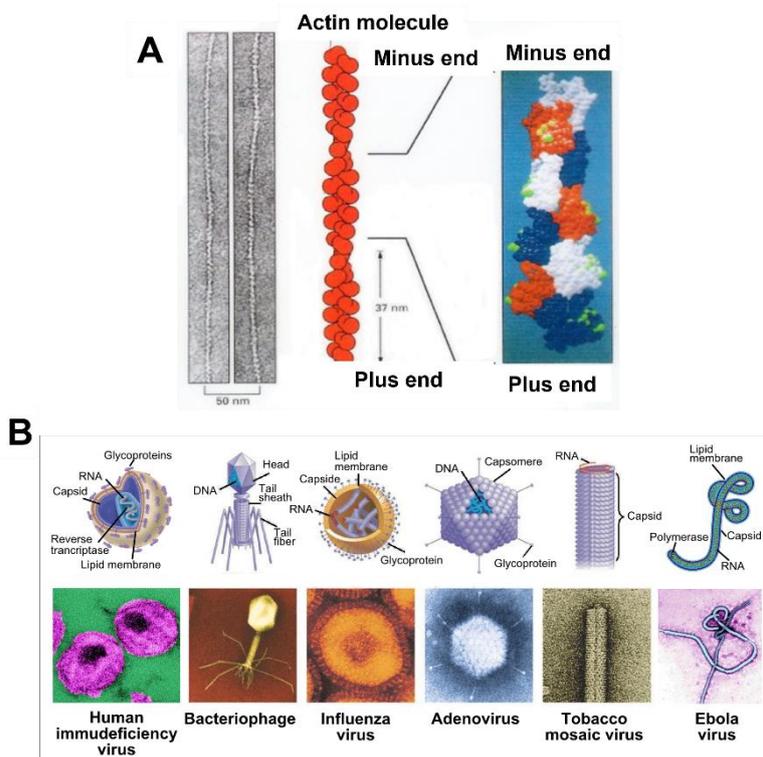


Figure I-1 : A) Filament d'actine [10]. B) Différentes structures de capsides de virus [11].

D’autres types de suprastructures synthétiques symétriques ont pu être conçues et étudiées tels que des nanoparticules, des nanorings et des cages polyédriques imitant la structure des capsides de virus. Ces structures se trouvent être des candidates de choix pour la délivrance de traitements thérapeutiques. En effet, nous pouvons prendre l’exemple de nanorings (Figure I-2-A) possédant des antigènes sur une de leurs faces et qui sont très sensibles aux anticorps.

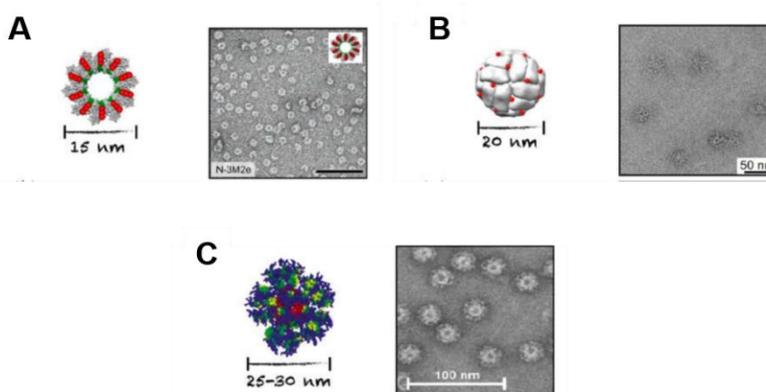


Figure I-2 : Représentations schématiques et images TEM des anneaux et des nanocages protéiques synthétiques [12]. A) Nanorings N-3M2e. B) Cages octaédriques de D123-Ferritin. C) Cages icosaédriques eOD-GT6 60-mer lumazine synthase [12].

D’un point de vue macroscopique, des domaines tels que l’architecture se sont inspirés des processus d’auto-assemblage afin de créer des assemblages et des constructions innovantes. Un projet d’envergure nommé « The Self-Assembly Line » a été présenté à la conférence TED de 2012 par Skyllar Tibbits et Arthur Olson <sup>[13]</sup>. Ce projet consistait en la réalisation d’une ligne d’auto-assemblage grandeur nature imitant un module d’auto-assemblage de virus. Le principe de cette ligne est de permettre l’auto-assemblage progressif de sous-unités préalablement conçues afin de permettre leur interaction et la formation d’une structure hiérarchique macroscopique. Cette prouesse technologique biomimétique se trouve être très prometteuse quant à l’auto-assemblage de structures architecturales à grande échelle telles que des objets ou encore des bâtiments.

## I.1.2 Evolution des nanotechnologies de l’ADN

### I.1.2.1 Avancée dans le domaine des nanotechnologies de l’ADN

#### I.1.2.1.1 Qu’est-ce que l’ADN ?

L’acide désoxyribonucléique est un polymère composé de différents nucléotides composés d’une base, d’un sucre et d’un groupe phosphate. Rosalind Franklin a, par l’utilisation de la diffraction des rayons X <sup>[14]</sup>, posé les fondations de la découverte de la structure en double hélice de l’ADN par James Watson et Francis Crick <sup>[15]</sup>. Leurs travaux ont permis de mettre en évidence la structure en double hélice de l’ADN. Cette structure en double hélice est permise par l’appariement de base dit de Watson-Crick. Ce dernier est basé sur les propriétés de complémentarités entre les bases de la molécule d’ADN : L’Adénine (A) qui peut réaliser deux liaisons hydrogène avec la Thymines (T) et la Guanine (G) qui peut réaliser trois liaisons hydrogène (liaisons H) avec la Cytosine (C).

Les trois formes principales de l’ADN sont : l’ADN-B, l’ADN-Z et l’ADN-A. L’ADN-B est la conformation qui se retrouve le plus dans la nature et c’est celle-ci qui nous intéressera dans cette thèse. En solution, cette structure possède un pas de 3,4 nm, 10,5 paires de bases par tour d’hélice et 2 nm de diamètre. Elle possède aussi deux sillons appelés sillons mineurs et sillons majeurs dus au décalage présent entre les brins. La stabilisation de la structure en double hélice de l’ADN est permise par une association entre différents types d’interactions. En effet, outre l’appariement de bases, il existe un autre type d’interaction : l’empilement de base. Ce dernier est basé sur les interactions attractives et non-covalentes  $\pi$ - $\pi$  entre les cycles aromatiques présents au sein de la double hélice d’ADN. L’énergie de liaison de l’appariement est considérée comme forte. En effet, sa valeur est comprise entre 10 kcal/mol et 20 kcal/mol alors que celle de l’empilement de base est d’environ 8,6 kcal/mol pour un triple empilement <sup>[16]</sup>.

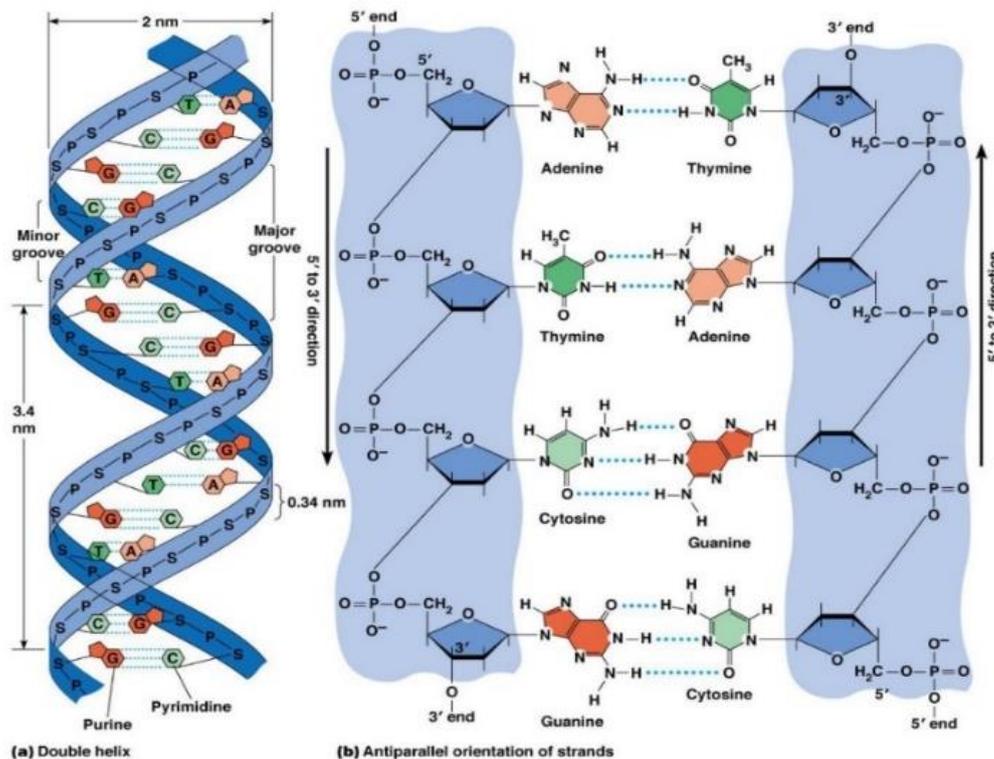


Figure I-3: Structure de l'ADN [17]

Les molécules d'ADN sont considérées comme des polymères rigides en raison des empilements  $\pi$ - $\pi$  de leurs cycles aromatiques et des répulsions électrostatiques ayant lieu le long de leur squelette sucre-phosphate. Cependant, l'ADN double brin est plus rigide que l'ADN simple brin. L'ADN double brin possède une longueur de persistance de 50 nm (correspondant à 160 nucléotides) alors que celle de l'ADN simple brin est comprise entre 1 nm et 2 nm [18].

La dénaturation de l'ADN est un processus consistant en la séparation des brins d'une double hélice. Elle a lieu via la rupture des liaisons hydrogène présent au sein de la double hélice d'ADN. Ce processus peut se réaliser sous l'effet de différents paramètres :

- Une température élevée,
- Une faible salinité,
- En présence d'une solution acide ou basique.

Lorsque 50% de la double hélice d'ADN est passé sous forme d'ADN simple brin, la température caractéristique est appelée température de fusion ( $T_m$ ). Cette dernière dépend du nombre de liaisons hydrogène présent dans la structure de l'ADN double brin et donc de sa longueur. En effet, plus une double hélice est longue, plus elle possède des liaisons hydrogène. De plus, les liaisons d'empilement entre les paires  $G \equiv C$  mais aussi les liaisons d'appariement entre les nucléotides G et C sont plus fortes que celles des paires  $A=T$ . Cela entraîne donc une stabilité plus élevée de la double hélice d'ADN. La

dénaturation de l'ADN est un processus réversible. En effet, en redescendant sous cette température, il est possible de reformer la double hélice.

Les molécules d'ADN sont des particules chargées négativement à cause de leur squelette phosphate. Cette charge est de  $2 e^-/\text{nm}$  pour un brin simple d'ADN et de  $6 e^-/\text{nm}$  pour une double hélice d'ADN <sup>[19]</sup>.

La charge de l'ADN étant négative, le maintien de la structure en double hélice nécessite l'utilisation d'ions métalliques afin de permettre l'atténuation des répulsions électrostatiques entre les groupements phosphates. Cependant, la valence des ions doit être prise en compte. En effet, les cations monovalents et les cations divalents interagissent différemment avec les molécules d'ADN.

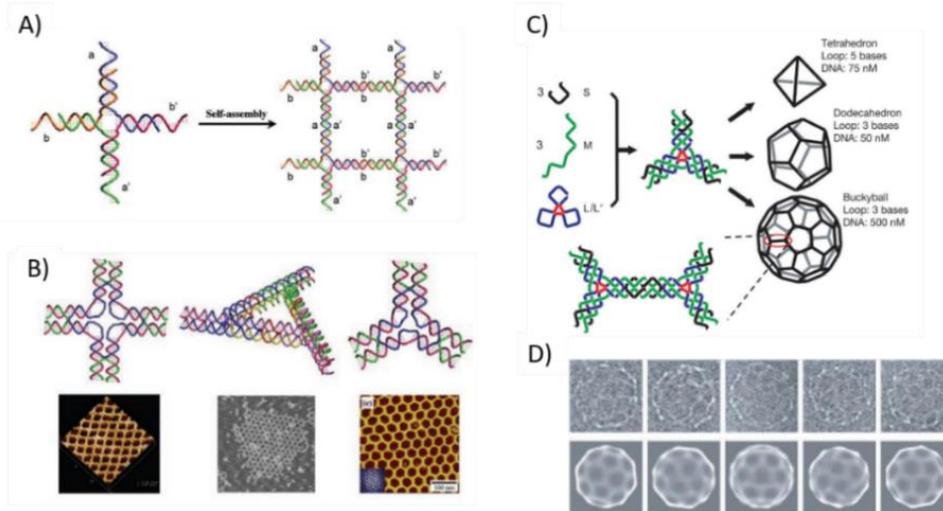
Les cations monovalents, et plus précisément les cations de sodium ( $\text{Na}^+$ ), ne se lient pas directement à l'ADN. Ils vont se placer préférentiellement dans le sillon mineur de l'ADN et ne participent pas à la stabilisation de la double hélice. A contrario, les cations divalents, et plus précisément les cations de magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ), sont plus réactifs que les cations monovalents. Leur interaction avec l'ADN se fait via des coordinations avec des ligands mono et bi-dentés avec les groupements phosphates de l'ADN <sup>[20]</sup>. La présence de  $\text{Mg}^{2+}$  permet donc la neutralisation de la charge négative de l'ADN et la stabilisation de sa structure.

### **I.1.2.1.2 Les différentes méthodes de nanostructuration de l'ADN**

#### **I.1.2.1.2 Les DNA-tiles**

Les DNA-tiles sont des types de nanostructures d'ADN réalisés grâce à l'utilisation de motifs de ramification mise au point à partir d'oligonucléotides <sup>[21]</sup>.

En 1982, Nadrian Seeman propose d'exploiter les propriétés de complémentarité présentes au sein de la double hélice d'ADN dans le but de créer des cristaux périodiques 2D ou 3D <sup>[22]</sup>. Sa méthode de structuration consiste à créer des jonctions immobiles pouvant se lier entre elles grâce à l'utilisation d'extrémités collantes. Cette dernière est possible via l'exploitation de l'appariement des bases de Watson-Crick et en créant des séquences permettant l'extension d'un brin simple au-delà de la structure pouvant s'assembler avec une extension complémentaire. Les premiers assemblages basés sur cette méthode ont été réalisés en 1998 par Winfree *et al.* <sup>[23]</sup>. Ensuite, différentes études ont mis en évidence l'utilisation de cette méthode afin de créer divers motifs de DNA-tiles tels que des réseaux en deux dimensions (2D) mais aussi des polyèdres d'ADN en trois dimensions (3D) (Figure I-4).

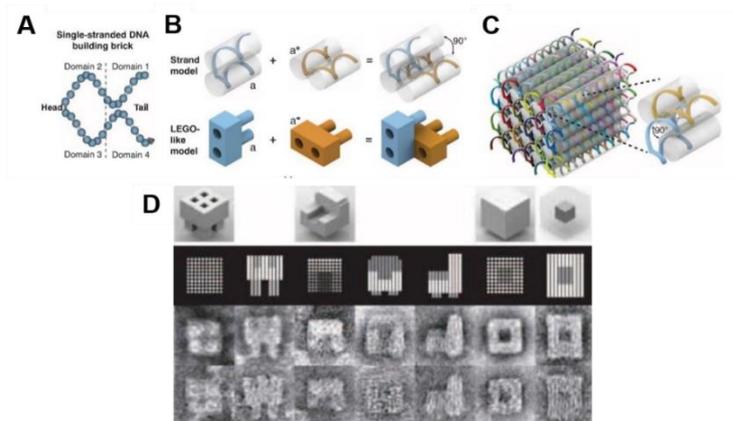


**Figure I-4 : A) Principe de l’auto-assemblage des DNA-tiles afin de former des réseaux 2D. B) Images AFM de différents types de réseaux 2D formés avec des DNA-tiles [24]. C) Schéma de principe de l’auto-assemblage de polyèdres d’ADN 3D. D) Images TEM et classes 2D d’une boule de cristal en DNA-tile [25].**

Deux autres méthodes de nanostructuration ont été mises en place : **Les briques d’ADN** [21,26,27] et les **origamis d’ADN** [21,28,29].

### I.1.2.1.2 Les briques d’ADN

La méthode des briques d’ADN est une extension de celle des DNA-tiles du 2D vers le 3D. Cette méthode permet la création de nanostructures 3D à l’aide de tuiles d’ADN. Elle a été mise au point en 2012 par Yonggang Ke *et al.* [26]. Dans cette étude, les chercheurs ont utilisé des motifs d’ADN simple brin composés de 32 bases chacune et possédant des extrémités collantes leur permettant de s’associer à quatre voisins locaux au cours de l’auto-assemblage [21].



**Figure I-5 : Principes de la conception de structures en briques d’ADN [26].**

### I.1.2.1.2 Les origamis d'ADN

En exploitant les propriétés de complémentarité de l'ADN et la formation de jonctions Holliday, une étude menée par Paul Rothemund [28] a permis de mettre en place une méthode d'assemblage de l'ADN afin de réaliser différentes structures en 2D. Cette technique nommée « méthode de l'origami d'ADN » est basée sur le pliage d'un long simple brin d'ADN circulaire nommé « brin échafaudage » (ou « scaffold » en anglais) à l'aide d'oligonucléotides courts nommés « brins agrafes » (ou « staples » en anglais) grâce à un recuit en température (Figure I-6) Le scaffold est produit grâce au bactériophage M13. Il contient 7560 paires de bases. Les staples, quant à eux, ont une taille comprise entre 18 et 60 bases.

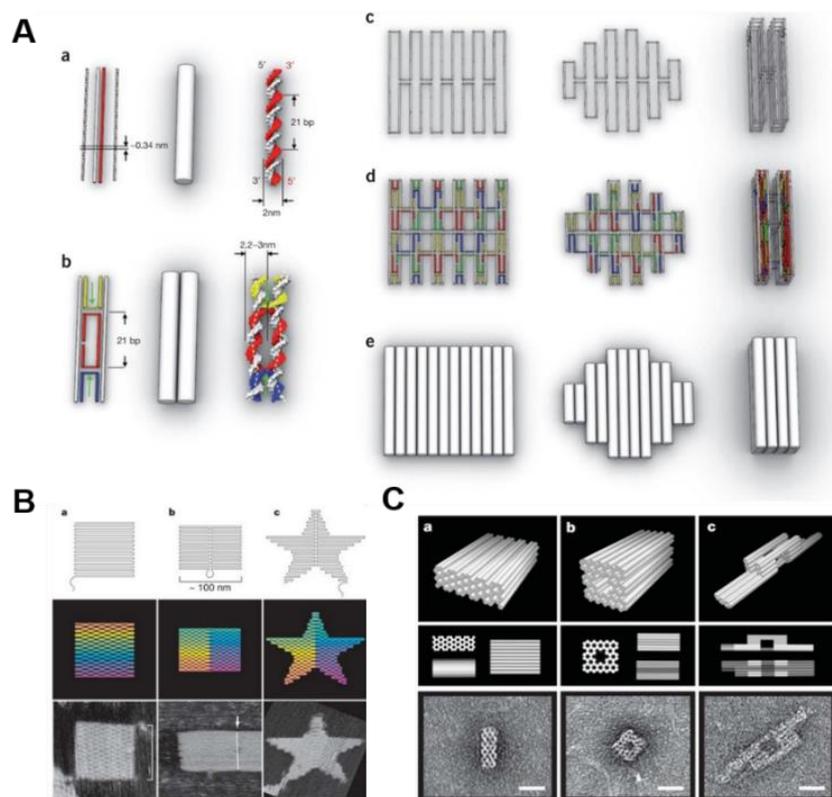


Figure I-6: A) Schéma de principe de la conception d'un origami d'ADN [30]. B) Exemples d'origamis d'ADN 2D [28]. C) Exemples d'origamis d'ADN 3D [31].

Il est aujourd'hui possible, grâce à l'évolution de cette technique, de fabriquer des structures 3D plus ou moins complexes de dimensions nanométriques telles que des structures en formes de monolithes, de bouteilles ou encore de croix [31]. L'épaisseur de ces motifs varient entre 10 nm et 100 nm.

Le processus de création d'un origami d'ADN dépend de plusieurs étapes importantes (Figure I-7 : Les différentes étapes de préparation et de contrôle des origamis d'ADN [30]. :

- **Etape 1 : Conception du design de la nanostructure souhaitée**

Cette étape permet de choisir la forme de l’origami que nous souhaitons réaliser. En fonction de l’application visée, il sera nécessaire de réfléchir à la meilleure forme de nanostructure pouvant y répondre.

- **Etape 2 : Conception de la forme souhaitée du brin échafaudage (scaffold) à l’aide du logiciel CaDNAno 2 <sup>[32]</sup>**

Lors de cette étape, il est nécessaire de choisir le type de réseaux des doubles brins d’ADN (monocouche ou multicouche, réseau carré ou en nid d’abeille). Ensuite, les séquences et le chemin des brins agrafes sont déterminés. En général, la taille des brins agrafes se situe entre 18 et 60 nucléotides. La forme des nanostructures peut être ensuite prédite grâce au logiciel CanDO <sup>[33]</sup>.

- **Etape 3 : Synthèse des brins échafaudages et des brins agrafes.**

Les brins échafaudages sont issus du bactériophage simple M13mp18. Ce bactériophage infecte la bactérie Escherichia coli et emballage son génome sous forme d’ADN simple brin. Dans notre cas, nous avons acheté nos brins échafauds auprès de l’entreprise Tilibit Nanosystems. Les brins agrafes ont été fournis par IDT.

- **Etape 4 : Préparation des solutions d’assemblages.**

Les solutions d’assemblages sont préparées en mélangeant dans le même tube les différents oligonucléotides, les brins échafauds et la solution tampon (en général composé de tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris), d’acide éthylènediaminetétracétique (EDTA) et d’ions Na<sup>+</sup> et contenant une certaine concentration en ions Mg<sup>2+</sup>).

- **Etape 5 : Recuit en température**

Le rôle de cette étape est de permettre à la réaction d’auto-assemblage d’atteindre un minimum d’énergie correspondant à la nanostructure ciblée. Pour ce faire, la solution préparée lors de l’étape 4 subit une dénaturation thermique puis un recuit en température.

Dans le cas d’une structure monocouche, l’assemblage est possible en réalisant une première étape de dénaturation, puis en recuisant la solution à température ambiante. Le repliement des structures multicouches est plus long que celui des structures monocouches du fait d’un assemblage pouvant suivre plusieurs chemins thermodynamiques afin d’atteindre le minimum d’énergie de la réaction. Ces chemins peuvent ainsi mener à des pièges cinétiques limitant la vitesse d’assemblage.

- **Etape 6 : Purification des nanostructures sur gel d’agarose**

La purification sur gel d’agarose est une méthode d’électrophorèse permettant la séparation des origamis correctement repliés, des origamis d’ADN mal repliés, des agrégats et des oligonucléotides libres. Les origamis d’ADN possédant le moins de défauts migrent plus vite dans le gel que les agrégats et les origamis défectueux. De plus, ce sont les oligonucléotides mal repliés qui migrent le plus rapidement. Cela permet donc d’extraire les origamis ciblés purifiés en excisant la bande d’intérêt. En général, cette méthode de purification permet d’obtenir des rendements de purification de 2% en sortie de gel. D’autres méthodes, telles que la précipitation au polyéthylène glycol (PEG) ou encore l’ultracentrifugation, peuvent être utilisées et permettent d’obtenir des rendements de purification plus élevés. Cependant, elles sont moins efficaces pour la séparation des différents types d’objets présent dans les échantillons et peuvent aussi favoriser l’agrégation des nanostructures entre elles.

- **Etape 7 : Caractérisation des nanostructures au TEM ou en AFM**

L’intégrité structurale des nanostructures peut être caractérisée en microscopie électronique à transmission cryogénique (cryo-TEM), en microscopie électronique à transmission (TEM) par coloration négative (à l’aide d’une solution d’acétate d’uranyle à 2%) ou encore par microscopie à force atomique (AFM). Il est possible, avec les images de TEM, de réaliser des classifications 2D ou reconstructions 3D des nanostructures en passant par une analyse particule par particule en utilisant le logiciel EMAN 2 [34,35].

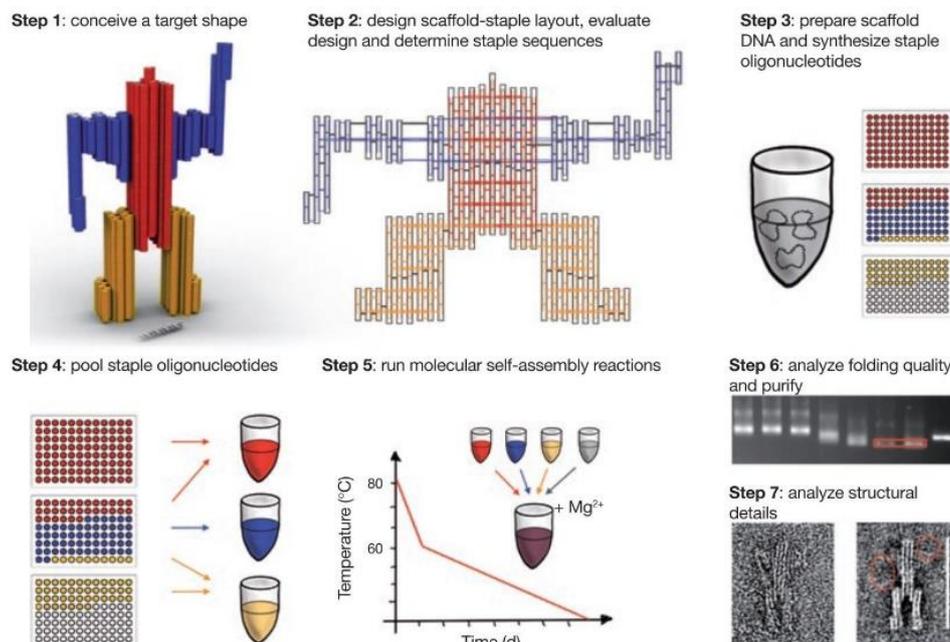


Figure I-7 : Les différentes étapes de préparation et de contrôle des origamis d’ADN [30].

❖ Créations d’origamis d’ADN courbés et tordus

Lors de la conception d’un origami d’ADN, il est possible de contrôler sa torsion interne et sa courbure afin de réaliser des formes complexes. Cela est possible en modulant le nombre de délétions et/ou d’insertions de paires de bases dans la structure de l’ADN.

Selon Dietz *et al.* [36], la suppression d’une paire de bases dans une double hélice d’ADN provoque une contrainte de traction sur la partie où se trouvait les paires de bases supprimées. Cela entraîne une torsion à gauche de la double hélice (Figure I-8). A contrario, l’insertion d’une paire de base provoque une contrainte de compression là où se trouvent les paires de bases insérées. Cela induit une torsion à droite de la double hélice d’ADN [36]. Il est donc possible de supprimer une contrainte de traction par l’insertion de paires de bases. Inversement, il est possible de supprimer une contrainte de compression par la suppression de paires de bases.

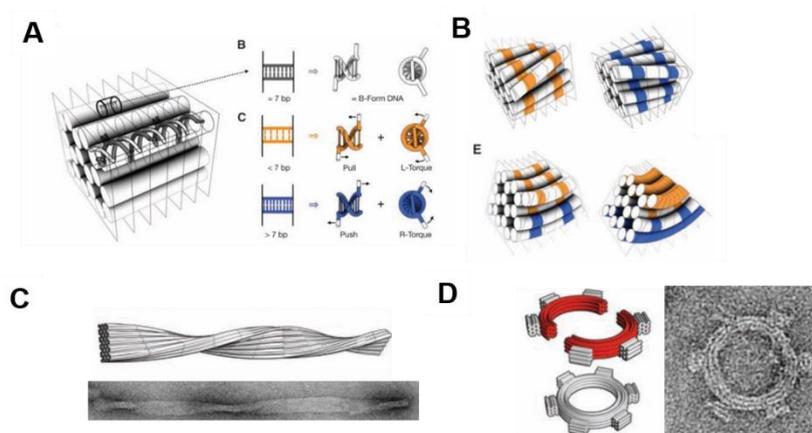


Figure I-8 : Principes de conception pour contrôler la torsion et la courbure dans les faisceaux d’ADN [36].

En exploitant ces propriétés, Dietz *et al.* [36] ont démontré la possibilité de créer des origamis d’ADN de forme complexes possédant des torsions et des courbures à l’échelle nanométrique [36]. Dans cette étude, ils ont présenté l’effet de la modification de l’hélicité sur le degré de torsion de filaments. En partant d’une hélicité de 10,5 pb/tour (sans torsion), ils sont parvenus à augmenter le taux de torsions de leur origami en augmentant ou en diminuant le nombre de paires de bases supprimées. En effet, pour une hélicité de 10 pb/tour, ils ont obtenu des filaments tordus à gauche avec des demi-tours tous les  $235 \pm 32$  nm. Dans le cas d’une hélicité de 11 pb/tours, les filaments étaient tordus à droite avec des demi-tours tous les  $286 \pm 48$  nm.

Cette étude a aussi fait état de la possibilité de coupler l’ajout d’insertions et l’ajout de délétions. Cela dans l’optique de réaliser des origamis d’ADN courbés avec des valeurs d’angles différents dépendant du nombre d’insertions et de délétions. L’idée étant que le gradient d’insertions soit plus élevé que le gradient de délétions afin de permettre la courbure de la structure.

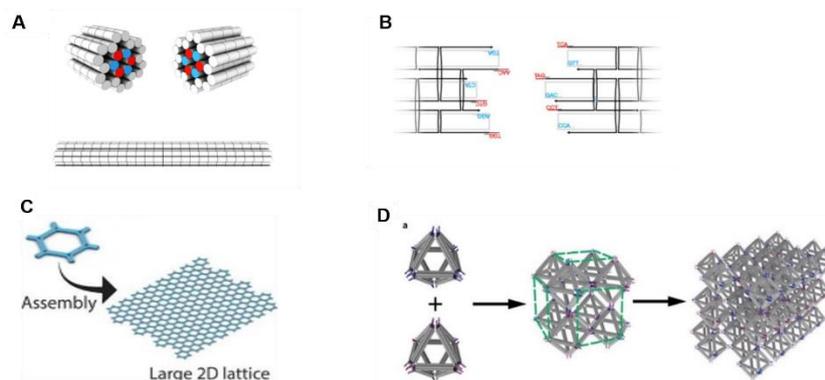
Une autre méthode de courbure a été présentée par Wagenbauer *et al.*<sup>[37]</sup>. Elle est basée sur la suppression des paires de bases dans les couches intérieures de l’angle du design. Cette méthode sera discutée plus en détail dans la section II.2.2.1.1.

### I.1.2.1.2 Les assemblages hiérarchiques d’origamis d’ADN

Afin de créer des suprastructures à partir de nanostructures d’ADN tels que des microfilaments unidimensionnels (1D), des réseaux 2D, ou même 3D deux méthodes principales de polymérisation d’origamis d’ADN ont été mises en place : **L’auto-assemblage par appariement de base par l’intermédiaire d’extrémités cohésives** (interactions fortes-irréversibles) et **l’auto-assemblage par complémentarité de forme via des interactions par empilement  $\pi$ - $\pi$  des bases** (interactions faibles-réversibles).

#### ❖ L’auto-assemblage par appariement de base, interactions fortes et assemblages irréversibles

L’auto-assemblage par appariement de bases consiste à utiliser des extrémités collantes complémentaires (Figure I-9) pour permettre l’assemblage des nanostructures d’ADN de façon programmée et précise<sup>[38]</sup>. Cette stratégie d’auto-assemblage est basée sur les liaisons hydrogène formées entre les bases nucléiques perpendiculairement aux doubles hélices de l’ADN<sup>[39]</sup>. Ces liaisons, étant fortes, permettent la formation de réseaux 2D et 3D (Figure I-9) périodiques rigides et irréversibles qui pourraient être utilisées en microélectronique<sup>[38] [40]</sup>.

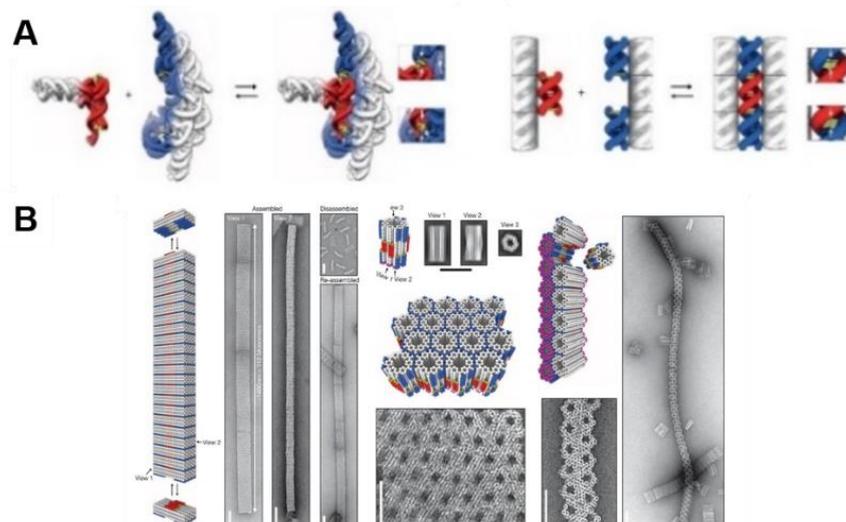


**Figure I-9 : A) Modèle 3D du principe de l’auto-assemblage par appariement de base<sup>[37]</sup>. B) Principe de l’auto-assemblage par appariement de base dans le logiciel CaDNAno<sup>[37]</sup>. C) Structures hexagonales monomères monocouches<sup>[41]</sup>. D) Réseau 3D d’ADN réalisé grâce à la méthode des extrémités collantes<sup>[40]</sup>.**

L’énergie de liaison de l’appariement de base est 10 – 20 kcal/mol selon le nombre de paires de bases et la séquence des brins <sup>[16]</sup>, d’où leur caractère irréversible.

❖ L’auto-assemblage par complémentarité de forme, interactions faibles et assemblages réversibles

L’auto-assemblage par complémentarité de forme a été présentée par Thomas Gerling *et al.* en 2015 <sup>[42]</sup>. Cette méthode a été mise en place afin de permettre l’assemblage de structures d’ADN complexes dynamiques et réversibles <sup>[42]</sup> (Figure I-10). Elle est basée sur le principe de reconnaissance entre la Ribonucléase P (RNase P) et l’ARN pré-transfert (ARNt). Ce dernier subit un clivage de son brin 5’ pour former un ARNt mature <sup>[42]</sup>. L’ARNt dont la forme est semblable à une boucle en T se lie à la RNase P en forme de pli ternaire par complémentarité. Les interactions mises en jeu dans ce mécanisme sont des interactions plus faibles que celles de l’appariement de bases. En effet, l’assemblage est rendu possible grâce à l’exploitation des interactions d’empilement  $\pi$ - $\pi$  ayant lieu entre les systèmes aromatiques des bases nucléiques parallèlement aux doubles hélices d’ADN <sup>[39]</sup>. Par exemple pour un triple empilement, l’énergie de liaison mesurée est de 8,6 kcal/mol <sup>[43]</sup>. Ces liaisons ayant une énergie plus faible que celles des liaisons hydrogène, les nanostructures créées peuvent être désassemblées en diminuant la concentration en  $Mg^{2+}$  ou en augmentant la température du milieu réactionnel <sup>[42]</sup>.



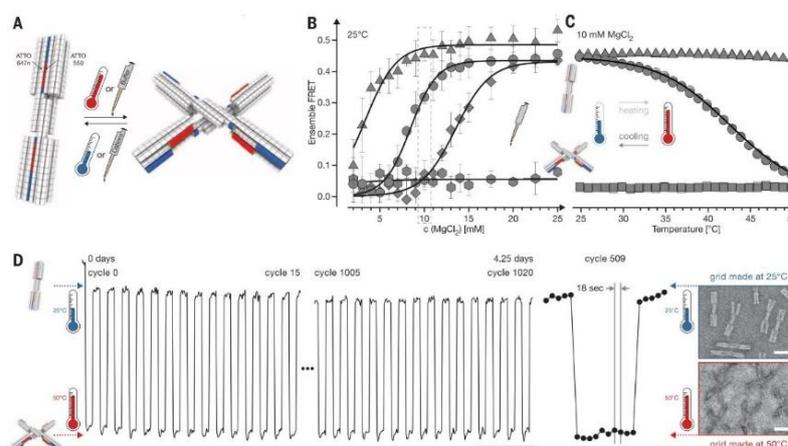
**Figure I-10 : A) Schéma de principe de l'auto-assemblage par complémentarité de forme. B) Exemples d'auto-assemblages hiérarchiques par complémentarité de forme <sup>[42]</sup>.**

Des analyses de transfert d’énergie par résonance de type Förster (FRET) d’ensemble ont permis de mettre en évidence les phénomènes de réversibilité de cette méthode d’assemblage

hiérarchique [42]. A l’aide d’un origami d’ADN en forme de commutateur pouvant passer de l’état ouvert à l’état fermé (Figure I-11), ils ont mis en évidence l’influence de la température sur l’auto-assemblage par complémentarité de forme. A concentration en  $MgCl_2$  constante, l’augmentation de la température a fait passer de façon réversible l’équilibre conformationnel de l’état ouvert à l’état fermé.

La transition entre l’état ouvert et l’état fermé dépend aussi de la force d’interaction entre les interfaces complémentaires de forme. En effet, plus cette interaction est forte et plus la concentration en cations permettant la stabilisation de l’état fermé du commutateur est faible. Les analyses de FRET d’ensemble ont permis de mesurer les différences d’énergie libre pour des commutateurs possédant différents nombres de liaisons d’empilement. Dans le cas d’un commutateur avec 12 liaisons, la différence d’énergie libre est de +2,8 kcal/mol à 5 mM en  $MgCl_2$  et de +1,6 kcal/mol pour les versions avec 16 liaisons d’empilement. Cette énergie libre varie de -0,36 kcal/mol après chaque augmentation de 1 mM de  $MgCl_2$  pour la version avec 12 contacts et de -0,42 kcal/mol pour la version avec 16 contacts. Cela démontre que l’augmentation de la concentration en  $MgCl_2$  permet une meilleure efficacité de fermeture pour la version avec 16 liaisons que celle avec 12 liaisons. De plus, pour une version possédant trois sites d’hybridation à la place des liaisons d’empilement, la transition de l’état fermé à l’état ouvert s’est faite entre 4 mM et 7 mM en  $MgCl_2$ . Dans le cas d’une version statique dans l’état ouvert, il n’y a aucune transition vers l’état fermé, comme attendu [42].

L’effet réversible de la température sur la transition de l’état fermé vers l’état ouvert a été étudié à  $[MgCl_2] = 10$  mM entre 25°C et 50°C pour la version avec les sites d’hybridation, la version avec 16 liaisons d’empilement et la version statique dans l’état ouvert. Seule la nanostructure avec 16 liaisons d’empilement possède cette transition réversible avec la variation de la température. Cette dernière est de plus cyclique. En effet, elle a pu être mise en évidence sur 1020 cycles de température entre 25°C et 50°C en 4,25 jours [42].



**Figure I-11: A) Modélisation d’un origami d’ADN reconfigurable exploitant la complémentarité de forme. Analyses FRET des origamis reconfigurables : B) Par titrage de la concentration en  $MgCl_2$ . C) Par variation de**

**la température. D) Analyse cyclique de la réversibilité des états ouverts et fermés des origamis entre 25°C et 50°C [42].**

Cette méthode rend donc la réalisation de structures dynamiques réversibles possibles et permet d’envisager la possibilité d’étudier l’auto-réparation des assemblages d’origamis d’ADN. Cela étant impossible avec l’auto-assemblage par appariement de base.

Un récapitulatif des deux méthodes d’assemblage hiérarchique est présentés dans le Tableau I-1.

<b>Méthode d’auto-assemblage</b>	<b>Activation de la réaction</b>	<b>Réversibilité</b>	<b>Conditions de réversibilité</b>	<b>Energie d’interaction (kcal/mol)</b>
<b>Appariement de bases</b>	Montée en température  Augmentation de la concentration en sels	Non	Aucune	10 – 20 kcal/mol selon le nombre de paires de bases [16]
<b>Interactions d’empilement <math>\pi</math>-<math>\pi</math></b>	Augmentation de la concentration en sels  Incubation à température intermédiaire (20°C-37°C)	Oui	Diminution de la concentration en sels  Augmentation de la température	8,6 kcal/mol pour un triple empilement [43]

**Tableau I-1 : Tableau comparatif des deux méthodes d’assemblage hiérarchiques.**

### I.1.3 Applications des origamis d’ADN

La polyvalence de la méthode des origamis d’ADN offre des possibilités dans de nombreux domaines tels que la nanophotonique [44-49], la nanomédecine [50-56] mais aussi le domaine de la nanoélectronique.

La vectorisation contrôlée des médicaments vers des cellules cibles est un des principaux défis de la nanomédecine. Afin de faciliter l’administration des médicaments et donc l’efficacité de

traitement, il est nécessaire de réfléchir à une méthode de vectorisation de qualité. Pour ce faire, l’utilisation de différents types de nanovecteurs tels que des liposomes, des micelles ou encore des nanoparticules polymères ou inorganiques a été étudiée. Néanmoins, tous ces types de nanovecteurs possèdent une faible sélectivité pour les cellules malades, une géométrie non homogène et une faible biocompatibilité [50].

La réalisation de nombreuses formes complexes à l’aide des origamis d’ADN et leur possibilité de fonctionnalisation diverses a permis de les envisager comme nanovecteurs. Par exemple, la doxorubicine (DOX), une molécule anti-tumorale pouvant provoquer des lésions de l’ADN et l’élimination des cellules cancéreuses [50]. Cette molécule peut s’intercaler entre les paires G-C ou interagir avec le sillon mineur de l’ADN double brin. Il est ainsi possible de l’incorporer dans un origami 2D ou 3D qui pourra, par fonctionnalisation, se fixer à des cellules cibles. Une étude, démontrant l’efficacité thérapeutique de l’utilisation des origamis d’ADN comme nanovecteurs de DOX pour le traitement de cellules tumorales mammaires chez des souris, a été réalisée par Qian Zang *et al.* en 2014 [57]. Ils ont montré que l’utilisation de l’origami d’ADN comme nanovecteur du DOX permet une meilleure accumulation des anti-tumoraux dans les zones contaminées et donc une meilleure efficacité antitumorale et sans effets secondaires (Figure I-12).

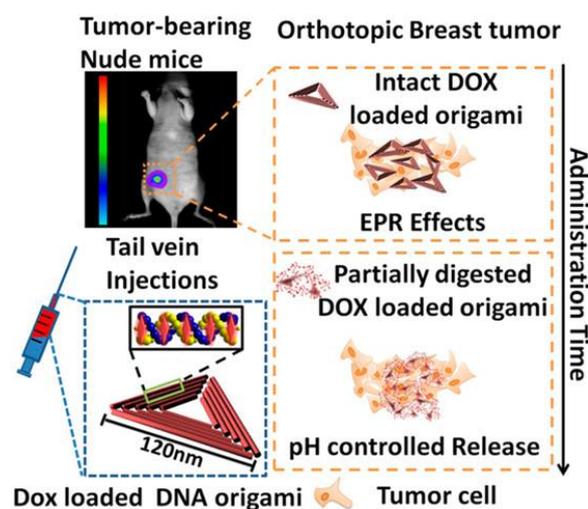


Figure I-12: Schéma de principe du traitement anti-tumoral via l’utilisation d’origamis d’ADN chez la souris [57].

L’avantage des origamis d’ADN pour la délivrance des traitements est qu’il est possible de contrôler la forme du nanovecteurs et sa taille. Des géométries diverses et variées ont permis la création d’un vaste catalogue de nanovecteurs afin d’améliorer la sélectivité des traitements et de fait leur efficacité. Par exemple, une idée intéressante est d’utiliser des nanodispositifs dynamiques pouvant se reconfigurer suite à des stimuli physiologiques (variation du pH, de la température, de la concentration en sels, etc.). En 2021, une étude menée par Engelen *et al.* [58] a démontré la possibilité de contrôler l’état de nanovecteurs en origamis d’ADN en forme de capsides de virus icosaédriques. Ils ont pu maintenir les nanovecteurs dans des états métastables en incorporant dans leur structure

des anticorps IgC. La reconfiguration a été permise par l’ajout d’antigènes solubles permettant le déplacement des anticorps. Ainsi, ils ont montré que les anticorps permettent de stabiliser la structure sous forme de capsides et que l’ajout d’antigènes entraînent le désassemblage des structures (Figure I-13). Un autre fait notable est qu’ils ont aussi démontré la possibilité de fonctionnaliser, avec des molécules d’ADN monocaténaire, l’intérieur des monomères afin de permettre la création de capsides contenant des particules centrales du virus de l’Hépatite B. Ces dernières ont été préalablement fonctionnalisées avec des brins d’ADN complémentaires.

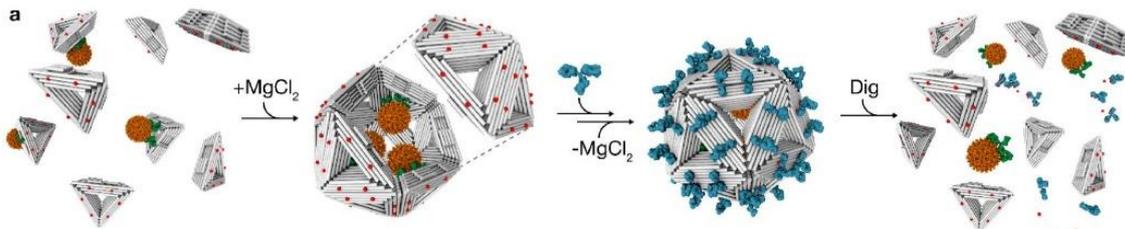


Figure I-13: Schéma de principe de la libération de la charge virale déclenchée par l’antigène [58].

La détection plasmonique est aussi un des domaines phares intéressant pour l’utilisation des origamis d’ADN. En effet, les possibilités de fonctionnalisation des structures d’ADN avec des brins adaptés permettent la création de nanostructures hiérarchiques composées de nanoparticules métalliques [59]. Par exemple en 2014, Thacker *et al.* [60] ont mis en place une plateforme en origami d’ADN possédant deux rainures. Ces dernières permettent le placement de deux nanoparticules d’or, fonctionnalisées avec des brins thiols, à 5 nm d’écart. Ils ont montré, via des mesures Spectroscopie Raman Améliorée par la Surface (SERS pour Surface Enhanced Raman Spectroscopy), que ce dispositif permet un fort couplage plasmonique. Ils ont pu aussi mettre en évidence le fait que l’utilisation de la plateforme pour la réalisation du dimère de nanoparticules d’or permet l’amélioration de ses propriétés plasmoniques [60].

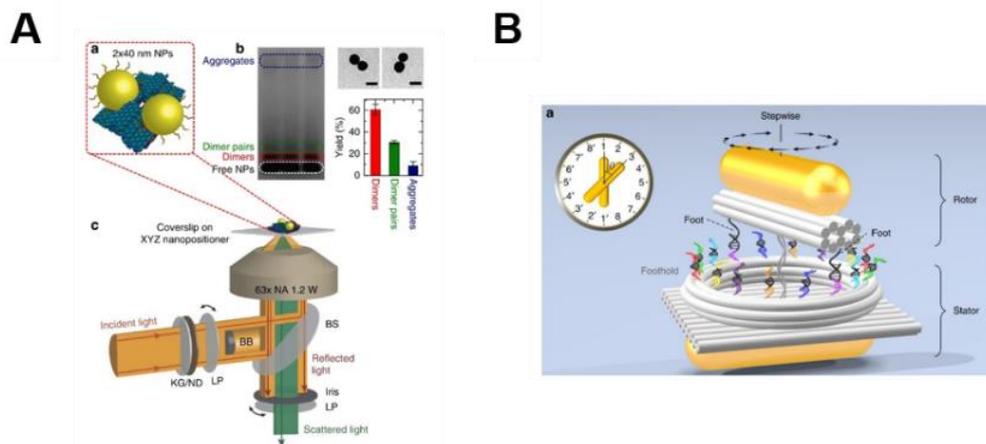


Figure I-14 : A) Schéma de principe des mesures SERS sur la plateforme plasmonique en origami d’ADN. [60]. B) Schéma de principe de la nanoserrure rotative [48].

Des nanostructures plasmoniques dynamiques ont aussi été mises au point dans l’optique d’avoir un contrôle spatio-temporel nanométrique et réversible de nanoparticules métalliques. Dans ce sens, une nanoserrure plasmonique rotative à 360° (Figure I-14) a été créée par Ling Xin *et al.* [48] en 2019. Le principe de ce dernier est basé sur l’ATP synthase. La partie supérieure du dispositif est composée d’un nanorod d’or servant de rotor fixé sur un origami d’ADN en forme de nanotube. Des extensions de brins agrafes sont disposées sous le nanotube. La partie inférieure du dispositif contient un nanorod d’or supportant une plateforme en origami rectangulaire et un anneau en origami. Les parties inférieure et supérieure sont liées entre elles par deux brins d’ADN et l’anneau est fonctionnalisé avec des extensions de brins agrafes. L’ensemble de ces extensions permet la reconfiguration du rotor suite à l’ajout de brins de blocage et d’enlèvement (appelés enzymes d’ADN) et d’une lumière incidente polarisée circulairement.

## I.2 La microélectronique et la nanostructuration de surface

### I.2.1 Introduction

Les transistors jouent un rôle essentiel dans l’industrie de la microélectronique. En effet, ils permettent de contrôler le courant électrique traversant un matériau semi-conducteur via l’application d’une tension. Aujourd’hui, ils sont présents dans tous les composants électroniques de notre quotidien (les smartphones, les ordinateurs, les voitures, etc.).

Le premier transistor a été inventé en 1947 par William Shockley, John Bardeen et Walter Brattain permettant l’émergence du domaine de la microélectronique. Suite à cette invention, le premier circuit intégré sur du germanium, a été mis au point en 1958 par Jack Wilby, chercheur à Texas Instrument. En 1959, Robert Noyce a créé un circuit intégré planaire permettant, ensuite, la création d’un système de transistors interconnectés sur une puce de silicium monolithique [61].

En 1965, le physicien Gordon Moore, cofondateur de l’entreprise Intel a énoncé la « loi de Moore ». Cette loi prédisait la diminution par deux de la taille des transistors sur les puces de silicium tous les deux ans. Il a ainsi prédit que cette croissance continuerait sur une période d’environ dix ans [61].

Afin de suivre cette prédiction, de nombreuses améliorations dans les processus de conception des circuits intégrés ont été réalisées. Ces améliorations sont supervisées et planifiées par l’International Roadmap for Devices and Systems (IRDS), un consortium créé en 2016 [62]. Tout ceci est fait pour permettre la coordination de tous les acteurs du domaine de la microélectronique tels que les laboratoires de recherche nationaux, les fabricants, etc.

## I.2.2 Les méthodes de lithographie

### I.2.2.1 La lithographie par approche descendante

La lithographie est un procédé dans lequel des motifs d’un support sont transférés dans un substrat donné. Aujourd’hui, la méthode de lithographie la plus utilisée en microélectronique est la photolithographie. Le principe de cette dernière est basé sur l’exposition d’une résine photosensible à un rayonnement lumineux afin de permettre sa scission ou sa déprotection. Pendant cette exposition, la solubilité de la résine évoluera selon son type. Les résines négatives deviennent insolubles après exposition et les parties non exposées de la résine vont être dissoute pendant l’étape de développement. Dans le cas des résines positives, c’est le processus inverse qui a lieu. En effet, la résine devient soluble après exposition et est donc retirée pendant l’étape de développement (Figure I-15) [63]. Ensuite, le motif de la résine est transféré dans le substrat par gravure. Enfin la résine est retirée par voie humide. C’est l’étape de « stripping ».

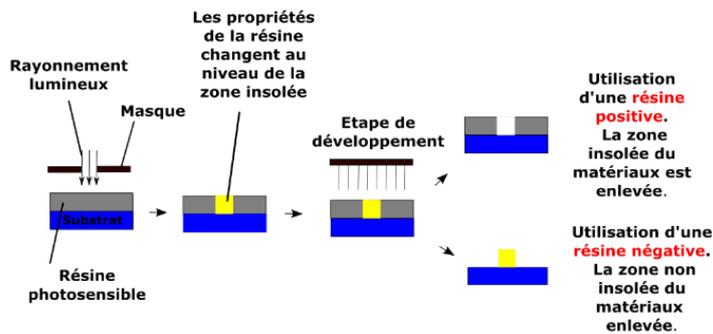


Figure I-15 : Schéma de principe du procédé de lithographie [63].

Cette méthode de lithographie présente cependant des limites en termes de résolution. Ces limites sont données par le **critère de Rayleigh** décrivant la résolution ou la dimension critique minimale pouvant être atteinte par le procédé :

$$CD = k_1 \frac{\lambda}{NA} \quad (I.1)$$

Avec,

$$NA = n \sin(\alpha) \quad (I.2)$$

Avec  $CD$  la résolution minimale atteignable,  $k_1$  une constante dépendante du procédé,  $\lambda$  la longueur d’onde de la source lumineuse,  $NA$  l’ouverture numérique du système optique,  $n$  l’indice de réfraction du milieu et  $\alpha$  le demi-angle maximal fait par la lumière en sortie de la lentille [64].

Afin de diminuer la limite de résolution, il est possible dans un premier temps, de changer la **longueur d’onde  $\lambda$** . La longueur d’onde utilisée aujourd’hui est de 193 nm et **les résolutions atteintes sont de 58 nm**. La valeur de la constante  $k_1$ , généralement supérieure ou égale à 0,28, est aussi

modifiable. Cela est possible en augmentant la sensibilité des résines. Enfin, **l'indice de réfraction  $n$**  du milieu peut aussi être modifié pour l'amélioration de la résolution. En effet, classiquement, le milieu où est réalisé le procédé de lithographie optique est l'air ( $n = 1$ ). Il est donc possible de changer de milieu et de se placer dans l'eau ( $n = 1,44$ ). Nous l'appelons la lithographie optique 193 nm à immersion ou encore 193i. Cette dernière technique a permis d'atteindre des **résolutions de motifs de 40 nm**.

La **diminution des résolutions sous les 15 nm**, a été possible par le développement de la **lithographie Extrême Ultra-Violet (ou EUV)** <sup>[65]</sup>. Cette méthode est basée sur l'utilisation de longueurs d'onde plus faibles que celles de la lithographie optique classique. En effet, la plus utilisée aujourd'hui est **de l'ordre de 13,5 nm** (proche de la gamme des rayons X mous). A cette longueur d'onde, les matériaux sont quasiment tous absorbants. Dans cette technique le système optique en transmission est remplacé par un système en réflexion nécessitant l'utilisation de miroirs de Bragg.

En utilisant un faisceau d'électron comme source, il est possible de se dissocier de l'utilisation de masques pour la réalisation des motifs. Dans ce cas, nous parlons de **lithographie électronique (e-beam)**. Cette méthode a permis l'obtention de motifs de formes et de tailles variées avec des résolutions de **moins de 10 nm** <sup>[66]</sup>. L'inconvénient de cette méthode est le temps d'écriture élevé. Elle est en général utilisée pour la réalisation des masques servant pour les autres méthodes de lithographie.

Une autre technique nommée **lithographie par nanoimpression (NIL) a été mise en place en 1995 par Chou et al.** <sup>[67]</sup>. Son principe est d'imprimer les motifs d'un moule sur une fine couche de résine polymère thermoplastique (**La nanoimpression thermique**) ou sensible aux UV (**nanoimpression assistée par UV**) déposée sur un substrat.

Ces méthodes de lithographie dites par **approche descendante (top-down)** consistent donc à la réduction des dimensions d'un motif jusqu'à atteindre celles souhaitées. Une autre approche est plutôt basée sur l'assemblage moléculaire afin de créer des systèmes à plus grandes échelles. Dans ce cas nous parlons d'**approche ascendante (bottom-up)**.

### I.2.2.2 La lithographie par approche ascendante

Comme nous l'avons signifié dans la partie précédente, certaines méthodes de lithographie sont basées sur l'assemblage moléculaire. C'est notamment le cas de **l'auto-assemblage dirigé (Directed Self-Assembly en anglais ou DSA) des copolymères à blocs**. Cette méthode permet de guider l'auto-assemblage des copolymères en exploitant les propriétés physico-chimiques et thermodynamiques de ces matériaux. En effet, ces derniers peuvent se séparer à l'échelle nanométrique du fait des affinités différentes qu'ils possèdent. Ainsi, il est possible de réaliser des motifs périodiques de l'ordre d'une dizaine de nanomètres. La variation des fractions volumiques des différents copolymères à blocs entraîne l'obtention de motifs en forme de lamelles, de sphères et de cylindres. Le guidage à longue distance de l'auto-assemblage des copolymères est rendu possible en le couplant à une nanostructuration chimique (par chemo-épitaxie) ou topographique (par grapho-

épitaxie). Même si cette méthode de lithographie permet aujourd'hui d'atteindre des **périodes de moins de 20 nm**, elle n'autorise la réalisation que **de motifs lignes/espaces ou contacts**.

Afin de permettre la diversification de la forme et de la complexité des motifs, différentes recherches se sont tournées vers l'auto-assemblage des protéines. Elles ont effet la possibilité de former des assemblages organisés à grande échelle. Nous pouvons citer les travaux d'Elise Jacquier *et al.* <sup>[68]</sup>. Dans cette étude, les chercheurs ont étudié l'assemblage de réseaux 2D en nid d'abeille avec une période de 8 nm et des pores 2D de 5 nm de diamètre. Ce réseau 2D a été formé en utilisant un domaine d'oligomérisation de la protéine Ginkgo Biloba. Ils ont aussi montré que cet assemblage peut avoir lieu sur différents types de surfaces telles que les grilles de TEM et sur des surfaces de Si. Malgré les résolutions atteintes, cette technique n'offre pas, pour l'instant, beaucoup de marge quant à la forme et à la complexité des assemblages réalisables.

De la même façon, l'auto-assemblage des nanostructures d'ADN est aussi une méthode très prometteuse pour la formation de nanostructures d'intérêt pour la microélectronique. Contrairement à l'auto-assemblage des protéines, le domaine des nanotechnologies de l'ADN est plus mature et permet la réalisation de nanostructures de forme et de complexité variées avec des résolutions minimales de 2 nm (le diamètre de la double hélice).

### I.2.3 La gravure

La gravure permet, après l'étape de lithographie, de transférer les motifs réalisés dans les substrats inorganiques (silicium, silice, etc.). Il existe deux types de gravures différentes : la gravure humide et la gravure sèche.

Le principe de **la gravure humide** est basé sur la dissolution de matériaux à graver par réaction avec une solution réactive (en général acide ou basique). Cette méthode possède une bonne sélectivité mais une anisotropie limitée.

La **gravure sèche** consiste au bombardement du substrat par un plasma. Un plasma est un gaz composé de particules neutres (atomes ou molécules) ou de particules chargées électriquement (ions). Ce type de gravure est anisotrope. **La gravure ionique réactive (Reactive Ion Etching ou RIE)** est le type de gravure sèche le plus utilisé aujourd'hui. Elle possède une meilleure sélectivité.

## I.3 Les origamis d’ADN et la nanostructuration de surface

### I.3.1 Le transfert des nanostructures d’ADN dans des substrats par gravure

Aujourd’hui, il est possible de graver des motifs dans le silicium à l’aide de masque en origamis d’ADN. Ce procédé est découpé en six étapes clés <sup>[69,70]</sup> :

- **L’adsorption des origamis d’ADN sur le substrat de SiO<sub>2</sub> thermique** en présence de Mg<sup>2+</sup> dont une étape de séchage avec une solution composée d’eau et d’éthanol permettant de retirer les ions en excès de la surface du substrat et d’un rinçage avec un flux d’argon.
- **Le transfert du motif en ADN dans le SiO<sub>2</sub>** à l’aide d’une gravure HF en phase vapeur.
- **Le transfert du motif masque dur en SiO<sub>2</sub> dans le Si** à l’aide d’une gravure HBr/O<sub>2</sub>.
- **Le retrait du masque dur** avec une gravure HF vapeur.

En premier lieu Surwade *et al.* <sup>[71]</sup> ont développé une méthode de gravure permettant l’obtention de formes triangulaires par tonalité positive ou négative dans le dioxyde de silicium en fonction des taux d’humidité dans la chambre réactionnelle (Figure I-16) <sup>[71]</sup>. Cette méthode est réalisée par gravure HF (acide fluorhydrique) en phase vapeur. Elle est généralement utilisée dans le cadre de la gravure sélective de différents substrats inorganiques. L’avantage est qu’elle peut être utilisée dans des conditions douces, permettant ainsi de garder les nanostructures d’ADN intactes <sup>[71]</sup>.

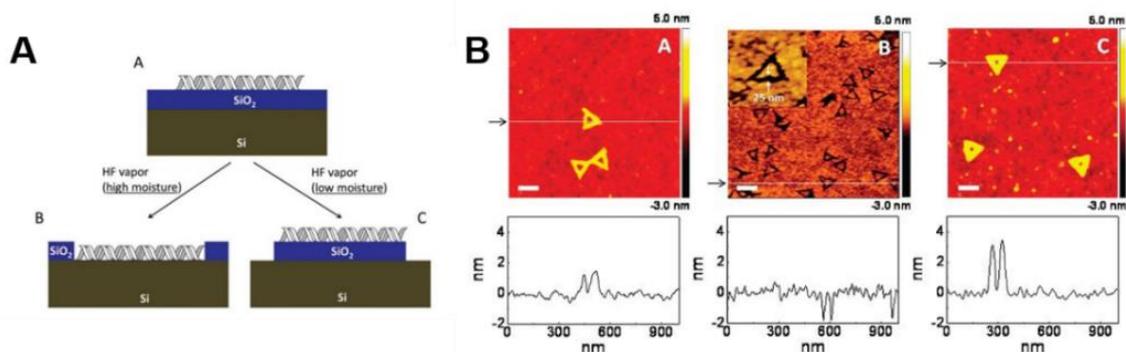
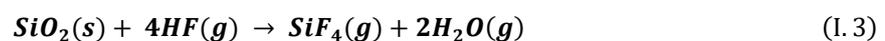


Figure I-16 : A) Schéma de principe de la méthode de gravure HF vapeur afin de transférer des motifs d’ADN dans du SiO<sub>2</sub>. B) Transfert de motifs d’origamis d’ADN dans du SiO<sub>2</sub> par gravure HF vapeur <sup>[71]</sup>.

La réaction chimique mise en jeu dans ce procédé est la suivante :



En effet, le SiO<sub>2</sub> réagit avec le gaz HF afin de produire du SiF<sub>4</sub> et H<sub>2</sub>O <sup>[71]</sup>. Grâce à ce procédé de gravure, Surwade *et al.* ont pu obtenir des profondeurs de gravures comprises entre 2 et 4 nm.

Par la suite, différentes études réalisées par le CEA-Leti de Grenoble <sup>[69,70,72]</sup> se sont enchaînées. Dans un premier temps, les travaux de recherche réalisés par Diagne *et al.* <sup>[72]</sup> se sont intéressés au transfert dans du dioxyde de silicium de 200 nm d’épaisseur d’un trou de 9 nm x 14 nm situé au sein d’un origami d’ADN cubique par gravure HF vapeur. Ils ont pu observer qu’après 600 s de gravure, la hauteur du motif obtenue de  $16,6 \pm 5,3$  nm est sept fois moins élevée que celle attendue. Cela s’expliquerait par la formation de difluorure de magnésium ( $MgF_2$ ), un produit insoluble, formé par la réaction entre le  $Mg^{2+}$  sur la surface et l’acide fluorhydrique dans le milieu de gravure et agissant comme un masque ralentissant la cinétique de gravure.

Des origamis d’ADN plus complexes ont été utilisés afin d’être aussi transférés dans le silicium tel qu’un motif en forme de «Monster Munch» (Figure I-17) <sup>[69,70]</sup>. Des gravures avec des motifs d’une épaisseur de plus de 60 nm dans le Si ont pu être obtenues.

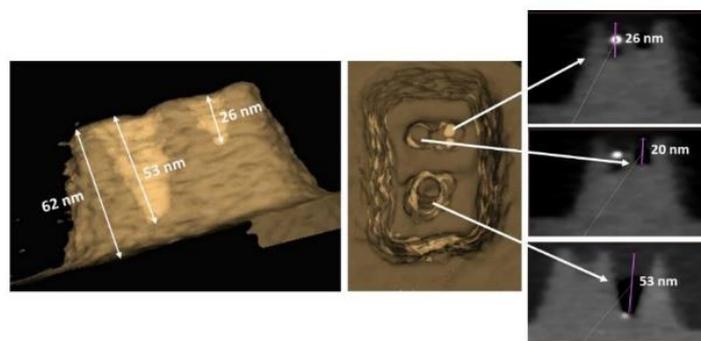


Figure I-17 : Reconstruction 3D d’un motif d’ADN transféré dans le Si <sup>[69]</sup>.

Dans ces procédés de gravure, différents paramètres influant sur la qualité des gravures obtenues ont pu être mis en évidence <sup>[69]</sup> :

- **La purification des origamis d’ADN après leur synthèse** : Il a été démontré que la présence de brins en excès dans la solution d’origamis pouvait entraîner une augmentation de la rugosité de surface après l’étape de gravure HF vapeur <sup>[69]</sup>.
- **La composition en eau et en EtOH de la solution de rinçage** : La solution de rinçage sert à retirer les ions  $Mg^{2+}$  en excès à la surface de l’oxyde avant les étapes de gravure. Un faible taux en EtOH entraîne la déstructuration et la désorption des structures de la surface du substrat. Cependant, un fort taux en EtOH favorise les interactions attractives entre le  $Mg^{2+}$  et la surface du substrat durant le rinçage <sup>[70]</sup> et donc le maintien des structures sur la surface. Cet effet a été attribué au fait que l’EtOH possède une polarité plus faible que celle de l’eau permettant la réduction de l’état de solvatation du  $Mg^{2+}$  <sup>[69,73,74]</sup>.
- **Le temps de gravure HF/vapeur** : Il été démontré que le temps de gravure HF vapeur est un paramètre clé dans l’obtention de motif bien définie. En effet, un temps trop court de gravure entraîne l’obtention d’une épaisseur de gravure trop faible et un temps trop long provoque l’élimination du masque en ADN et la perte du motif de  $SiO_2$  <sup>[69,72]</sup>.

- **Le temps de gravure HBr/O<sub>2</sub>** : L’augmentation du temps de gravure HBr/O<sub>2</sub> permet l’obtention de motif dans le silicium de plus en plus épais [69,70].

Outre la gravure HF vapeur des motifs en origamis d’ADN dans le silicium, d’autres méthodes de structuration de surface ont pu être utilisées afin de réaliser des nanostructures plasmoniques. Nous pouvons notamment citer la méthode BLIN (Biotemplated Lithography of Inorganic Nanostructures) mise en place par Piskunen *et al.* [75] et dérivée de la technique DALI (DNA-Assisted Lithography) [76]. Le procédé BLIN est composé de différentes étapes permettant la réalisation des structures plasmoniques. Dans un premier temps, une couche sacrificielle de PMMA (polyméthacrylate de méthyle acrylique) est déposée sur le substrat d’intérêt. Ensuite, une couche de silicium amorphe est réalisée sur le PMMA par une étape de dépôt chimique en phase vapeur (PECVD pour Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition). La surface de silicium est par la suite traitée par une gravure plasma O<sub>2</sub> afin de la rendre hydrophile et de chargée électriquement dans le but de permettre le dépôt des origamis. Une étape de croissance sélective d’un masque de SiO<sub>2</sub> est ensuite réalisée par dépôt chimique en phase vapeur (CVD pour Vapor Phase Deposition). S’en est suivie une gravure par RIE afin de permettre le transfert des motifs dans le PMMA et dans le silicium amorphe. Les matériaux d’intérêt (or, argent, titane, germanium ou aluminium) sont ensuite déposés en phase vapeur afin de permettre la réalisation des structures plasmoniques. Enfin, la couche de PMMA est retirée à l’aide de l’acétone permettant la révélation des motifs. Le principe de la méthode est présenté sur la Figure I-18.

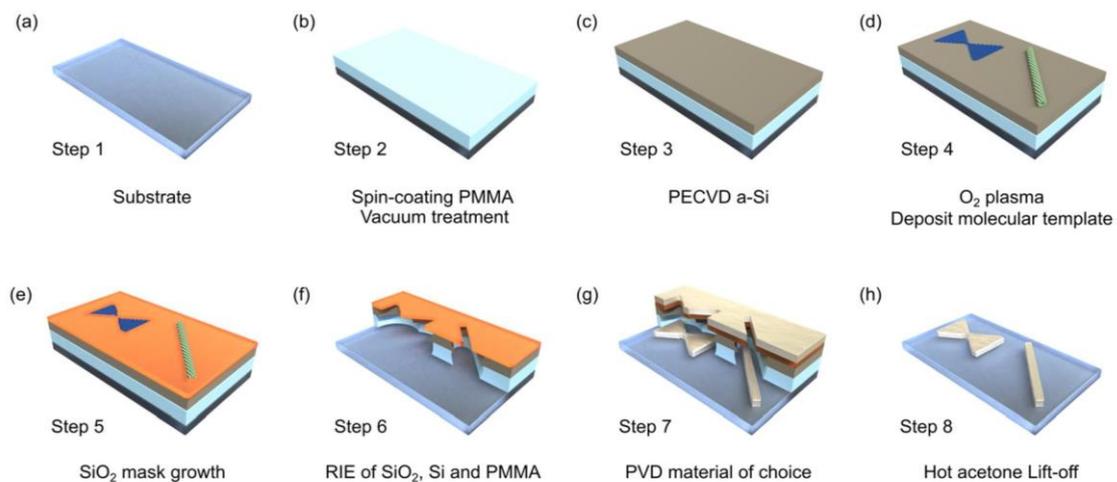


Figure I-18: Schéma de principe de la méthode BLIN [75].

## I.3.2 Les interactions entre les origamis d’ADN et les substrats d’oxyde

L’utilisation des origamis d’ADN pour la nanostructuration de surface nécessite le dépôt des nanostructures sur les surfaces et donc la compréhension des interactions ayant lieu les deux. Cette section sera donc consacrée à la présentation de la théorie descriptive entre deux surfaces chargées : la théorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek). Ensuite, nous présenterons les cas des interactions entre les origamis d’ADN et les surfaces d’oxyde que sont le mica et le SiO<sub>2</sub>. Enfin nous présenterons les applications

### I.3.2.1 Les interactions attractives et répulsives ayant lieu entre deux surfaces chargées : La théorie DLVO

La théorie DLVO est un modèle mis en place par Derjaguin et Landau dans les années 1940 et développé par la suite par Verwey et Overbeek. Elle permet de décrire les phénomènes de stabilisation ayant lieu au sein d’un système colloïdal. Ce phénomène de stabilisation peut être décrit au travers de cette théorie par les forces attractives de Van der Waals et les forces répulsives électrostatiques [77].

Cette théorie peut aussi être utilisée afin de décrire les forces entre des interfaces de différentes formes et le dépôt de particules sur des surfaces planes [78].

La courbe descriptive des énergies DLVO correspond à la somme des énergies de Van der Waals ( $E_{vdw}$ ) et des énergies répulsives ( $E_{rép}$ ). Elle peut donc être écrite comme suit :

$$E_{DLVO} = E_{vdw} + E_{rép} \quad (I.4)$$

#### I.3.2.1.1 Les interactions attractives : Les interactions de Van der Waals

Les forces de Van der Waals sont des forces attractives présentes entre les molécules considérées comme des dipôles. Il existe trois types d’interactions de Van der Waals (VdW) :

- Les forces de Keesom : Ces forces mettent en jeu des dipôles permanent-permanent et s’expriment comme suit :

$$E_K = - \frac{\mu_1^2 \mu_2^2}{3(4\pi\epsilon_0)^2 k_B T d^6} \quad (I.5)$$

- Les forces de Debye : Dans ce cas, ce sont des dipôles permanent-induit qui sont exploités. L’équation descriptive de ces forces est la suivante :

$$E_D = -\frac{\alpha_{e2}\mu_1^2 + \alpha_{e1}\mu_2^2}{(4\pi\epsilon_0)^2 d^6} \quad (I.6)$$

- Les forces de London : Ici, les dipôles sont des dipôles induit-induit et l’équation descriptive est la suivante :

$$E_D = -\frac{3\Delta\alpha_{e1}\alpha_{e2}}{4(4\pi\epsilon_0)^2 d^6} \quad (I.7)$$

L’énergie de Van der Waals est donc la somme de ces trois énergies :

$$E_{VdW} = E_K + E_D + E_L = -\frac{C}{d^6} \quad (I.8)$$

Avec,  $\mu$  le moment dipolaire,  $\epsilon_0$  la permittivité diélectrique du vide,  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température,  $d$  la distance interdipôles,  $\alpha_e$  la polarisabilité électronique et  $\Delta$  l’énergie d’extraction d’un électron.

Il est à noter que ces expressions ne sont valables que pour des interactions entre molécules. La description des énergies de Van der Waals dans le cas de surfaces solides n’est possible qu’en insérant la constante d’Hamaker  $A$ . Ainsi, dans le cas de deux particules sphériques de rayons  $r_1$  et  $r_2$  distantes de  $d$  (avec  $d \ll r_1$  et  $d \ll r_2$ ), l’énergie de Van der Waals s’exprime :

$$E_{VdW} = -\frac{-Ar_1r_2}{6d(r_1 + r_2)} \quad (I.9)$$

La forme de cette expression est dépendante de la géométrie des particules. Si on considère le cas de l’interaction entre un cylindre (modèle représentant un brin d’ADN) (de rayon  $r$  et de longueur  $L$ ) et une surface plane (la surface d’un substrat) (voir Figure I-19) , l’expression de l’énergie de VdW est <sup>[79-82]</sup> (Figure I-19) :

$$E_{VdW} = -\frac{\pi r^2 L \epsilon_0 k_B T}{4d\lambda_D} (\Delta_{cm}^{\parallel} + \Delta_{cm}^{\perp} + \Delta_{sm}^{\parallel}) \quad (I.10)$$

Avec,

$$\Delta_{cm}^{\parallel} = \frac{\epsilon_c^{\parallel} - \epsilon_m}{2\epsilon_m} \quad (I.11)$$

$$\Delta_{cm}^{\perp} = \frac{\epsilon_c^{\perp} - \epsilon_m}{\epsilon_c^{\perp} + \epsilon_m} \quad (I.12)$$

$$\Delta_{cm}^{\perp} = \frac{\epsilon_s^{\perp} - \epsilon_m}{\epsilon_s^{\perp} + \epsilon_m} \quad (I.13)$$

Avec  $\epsilon_c^{\parallel}$  la permittivité diélectrique du cylindre dans la direction parallèle à l’axe du cylindre,  $\epsilon_c^{\perp}$  la permittivité diélectrique du cylindre dans la direction perpendiculaire à l’axe du cylindre,  $\epsilon_s^{\perp}$  la permittivité diélectrique du substrat et  $\lambda_D$  la longueur de Debye. Cette dernière sera définie dans la section I.3.2.1.2.

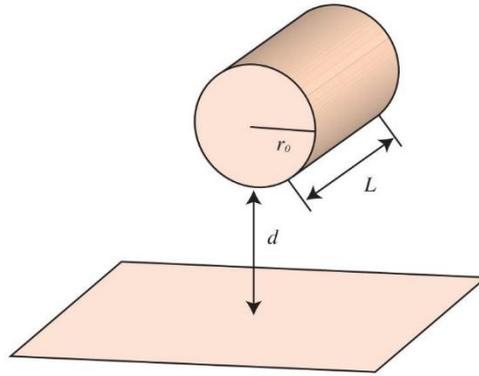


Figure I-19 : Schéma d’une molécule d’ADN interagissant avec une surface plane [79].

### I.3.2.1.2 Les interactions électrostatiques

Dans le cas d’une surface chargée en contact avec un électrolyte, les ions se répartissent de façon non uniforme. Cela entraîne la création d’un potentiel électrostatique. Le premier modèle descriptif de ce phénomène a été introduit par Helmholtz en 1879. Selon cette théorie, les ions vont former une seule couche et venir se placer parallèlement à la surface chargée et compenser la charge de cette dernière. C’est la couche de Stern.

Un modèle complémentaire est mis en place par Gouy (1910) et Chapman (1913). Il introduit l’agitation thermique au sein de l’électrolyte. Cette agitation thermique est considérée comme étant responsable de la mobilité des ions et à l’apparition d’une couche diffusive dans la région adjacente à la couche de Stern. L’association de ces deux couches est nommée la double couche. Cette distribution de charge est représentée sur la Figure I-20. L’épaisseur de la double couche électrique se nomme la longueur d’écran de Debye et s’exprime comme suit :

$$\lambda_D = \kappa^{-1} = \sqrt{\frac{D\epsilon_0 RT}{2e^2 I N_A}} \quad (\text{I. 14})$$

Avec,  $D$  la constante diélectrique de la solution ( $D = 78$  dans le cas de l’eau),  $N_A$  le nombre d’Avogadro,  $e$  la charge électrique élémentaire,  $\epsilon_0$  la permittivité du vide,  $R$  la constante des gaz parfaits et  $T$  la température.  $I$  est la force ionique et est défini comme suit :

$$I = \frac{1}{2} \sum_{n=i}^n c_i z_i^2 \quad (\text{I. 15})$$

Avec,  $c_i$  la concentration molaire de l’ion  $i$  et  $z_i$  le nombre de charge de l’ion  $i$ .

L’équation de Poisson Boltzmann permet de décrire le potentiel électrique d’une distribution de charges. Elle s’exprime comme suit :

$$\left(\frac{d\psi}{dz}\right)^2 = \frac{2k_B T}{\epsilon_0 \epsilon_r} \sum_i n_{i\infty} \left[ \exp\left(-\frac{z_i e \psi}{k_B T}\right) - 1 \right] \quad (\text{I. 16})$$

Avec  $\epsilon_r$  la permittivité relative et  $\psi$  le potentiel de Nernst.

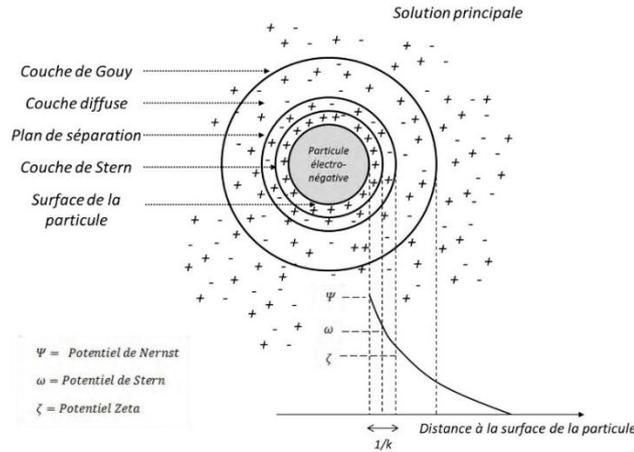


Figure I-20: Schéma de la double couche électrique [83,84].

Concernant l'énergie répulsive pour une molécule d'ADN en interaction avec une surface plane, elle s'exprime :

$$E_{rép}(d) = 2\pi r L \int_d^{\infty} \left(\frac{d\psi}{dz}\right)^2 dz \quad (\text{I. 17})$$

### I.3.2.2 Dépôt de l'ADN sur des substrats d'oxyde

Diverses études se sont intéressées à le dépôt des origamis sur des substrats d'oxyde (mica ou dioxyde de silicium) afin de permettre l'association des techniques top-down et bottom-up pour la fabrication de dispositifs en nanoélectronique [70,72,85-88].

Le dioxyde de silicium étant l'un des substrats les plus utilisés dans le domaine, il a été important de s'intéresser aux paramètres influençant le dépôt des origamis d'ADN sur ce substrat. Les interactions attractives entre l'ADN et le  $\text{SiO}_2$  sont permises par des ponts électrostatiques ayant lieu entre les ions  $\text{Mg}^{2+}$  et les groupements silanol de la surface du substrat et des ponts électrostatiques ayant lieu entre ces mêmes ions et le squelette phosphate de l'ADN. En 2010, Björn *et al.* [88] proposent une étude portant sur les effets de la concentration en  $\text{Mg}^{2+}$  et du pH sur les interactions ADN-surface. Ce travail a été réalisé sur du  $\text{SiO}_2$  natif, pour des concentrations en  $\text{Mg}^{2+}$  comprises entre 20 mM et 150 mM et pour des valeurs de pH comprises entre 7,7 et 8,3. D'après leurs travaux, le nombre d'origamis d'ADN adsorbés sur la surface a augmenté avec la hausse de la concentration en ions  $\text{Mg}^{2+}$  à un pH de 8,3.

L’élévation de la valeur du pH favorise la déprotonation des groupements silanol présent à la surface du SiO<sub>2</sub>. Cela permet l’augmentation de la charge négative de cet oxyde. Ainsi, cette étude a permis de mettre en évidence l’amplification du nombre d’origamis attaché à la surface avec l’augmentation du pH du tampon de dépôt à une concentration en Mg<sup>2+</sup> de 100 mM.

Le dépôt des origamis sur d’autres types de surface, comme par exemple le graphène et l’oxyde de graphène [89], le mica ou encore les bicouches lipidiques [16], a été étudié. Les deux derniers cas seront présentés dans la section I.3.2.4.

### I.3.2.3 Le positionnement déterministe

Dans le domaine de la nanoélectronique, il est important de contrôler le positionnement des origamis d’ADN afin de permettre la réalisation de réseaux périodiques de dimensions nanométriques. Diverses méthodes de contrôle du positionnement ont été étudiées [90–94]. Nous pouvons dans un premier temps parler de la création de zones hydrophiles et hydrophobes grâce à l’utilisation de HMDS (hexaméthylsilylène). Ce dernier permet l’adsorption sélective des origamis d’ADN sur les zones qui n’en contiennent pas (soit des zones de SiO<sub>2</sub>) [69,86,95].

Une étude menée par Kershner *et al.* en 2009 [86] a mis en évidence la possibilité de contrôler le positionnement des origamis sur des substrats de Si ou de SiO<sub>2</sub> en modifiant la chimie ou la structuration de surface (Figure I-21). Pour ce faire, deux types de structuration ont été réalisées par lithographie e-beam. En effet, dans le premier cas, la lithographie e-beam a permis la création de motifs dans une monocouche de HMDS devenue une monocouche de triméthylsilyle (TMS) après une réaction de silylation. Les zones oxydées de TMS sont hydrophiles, du fait de la présence de groupements silanol. Les origamis d’ADN peuvent s’y adsorber (en présence de 100 mM de Mg<sup>2+</sup>) au contraire des zones non-oxydées. Concernant la deuxième méthode, un film de DLC (Diamond Like Carbon) a été déposé sur la surface d’un substrat de silicium puis a été gravé par lithographie e-beam. Les motifs réalisés sont en DLC sur un fond DLC (d’où l’appellation « DLC/DLC »).

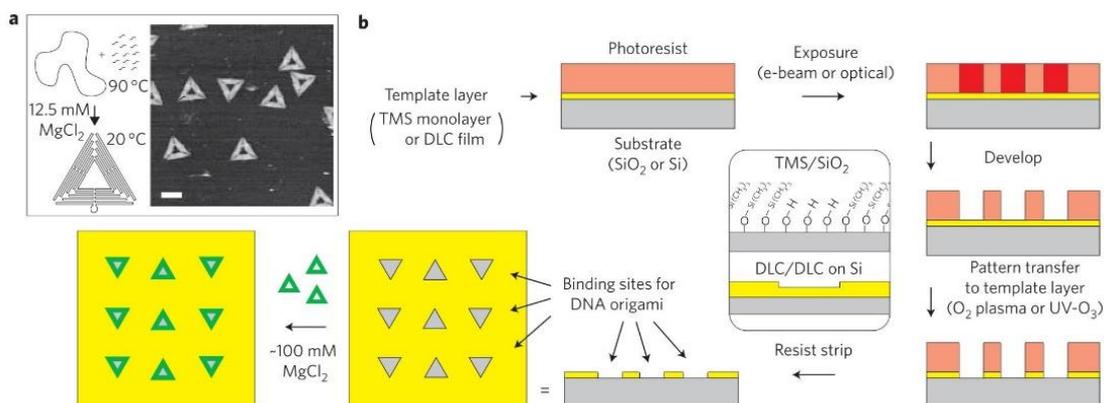


Figure I-21: Schéma de principe du positionnement d’origamis d’ADN par contraste chimique ou topographique sur une surface de SiO<sub>2</sub> ou de DLC [86].

Une autre méthode a été initiée en 2011 par Penzo Wang *et al.* [95]. Elle a offert la possibilité de contrôler le positionnement des origamis d’ADN grâce à un procédé de lithographie par nanoimpression. Cette méthode consiste à la réalisation d’un moule de nanolithographie par nanoimpression via l’utilisation de la lithographie e-beam. Cela est permis par l’utilisation d’une résine à ton négatif à base d’hydrogène silesquinoxane (HSQ). Ensuite, le moule est répliqué par nanoimpression thermique [95].

Dans une autre étude menée par Scheible *et al.* [96], des nanoparticules d’or ont été déposées sur les zones ne contenant pas de HMDS afin que les origamis d’ADN, fonctionnalisés avec des brins thiols, puissent y être adsorbés. En effet, les brins thiols peuvent s’associer aux nanoparticules d’or et permettre la création de réseaux périodiques. Les zones dont le SiO<sub>2</sub> est apparent sont appelées des sites de fixation (Figure I-22).

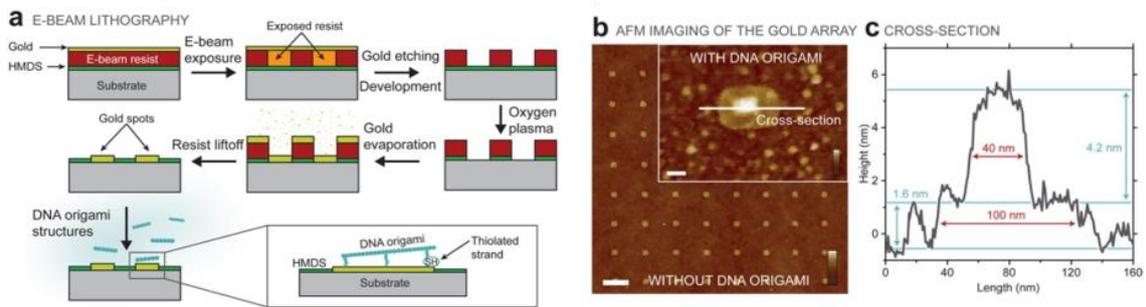


Figure I-22 : Fabrication d’une micro-puce avec des origamis d’ADN [96].

### I.3.2.4 L’Auto-assemblage-assisté par substrat des origamis d’ADN

En parallèle des travaux sur le positionnement déterministe, un fort intérêt s’est porté sur la réalisation de systèmes nanostructurés complexes organisés à grande échelle directement sur les substrats. Pour ce faire, l’auto-assemblage assisté par substrat de nanostructures d’ADN s’est trouvé être un bon candidat.

Dans un premier temps, il est important de signifier que différents groupes de chercheurs se sont intéressés aux interactions entre l’ADN et le mica (substrat le plus utilisés pour l’analyses dans le domaine des nanotechnologies de l’ADN) en présence de cations divalents et de cations monovalents [80,97,98]. Afin de comprendre le détail de ces études, il est important de bien définir certains paramètres clés.

Premièrement, le paramètre  $\tilde{n}_{sz}$  correspond à la densité de surface des cations possédant une valence Z. Ce paramètre s’exprime de la façon suivante [99] :

$$\tilde{n}_{sz} = \frac{n_{sz}}{n_s} \quad (I. 18)$$

Avec la concentration surfacique totale,  $n_{s2}$  la concentration surfacique des cations ayant une valence  $Z$ ,  $\tilde{n}_{s1}$  et  $\tilde{n}_{s2}$  les densités de surface fractionnaires des cations monovalents et divalents. Les deux derniers paramètres présentés sont liés par la relation :

$$\tilde{n}_{s1} + \tilde{n}_{s2} = 1 \quad (I. 19)$$

La compétition entre les cations monovalents et divalents au-dessus d’une surface chargée négativement est modélisée par l’équation de Poisson-Boltzmann. Cette dernière permet de calculer les concentrations effectives en surface pour les cations monovalents ( $n_{s1}$ ) et les cations divalents ( $n_{s2}$ )<sup>[99]</sup> :

$$n_{s1} = n_{b1} \exp\left(-\frac{e\Psi}{k_B T}\right) \quad (I. 20)$$

Et,

$$n_{s2} = n_{b2} \exp\left(-\frac{2e\Psi}{k_B T}\right) \quad (I. 21)$$

Avec  $e$  la charge élémentaire,  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température et  $n_{b1}$  et  $n_{b2}$  les concentrations globales en cations monovalents et en cations divalents respectivement.

En résolvant l’équation quadratique pour  $\tilde{n}_{s2}$ , nous obtenons<sup>[99]</sup> :

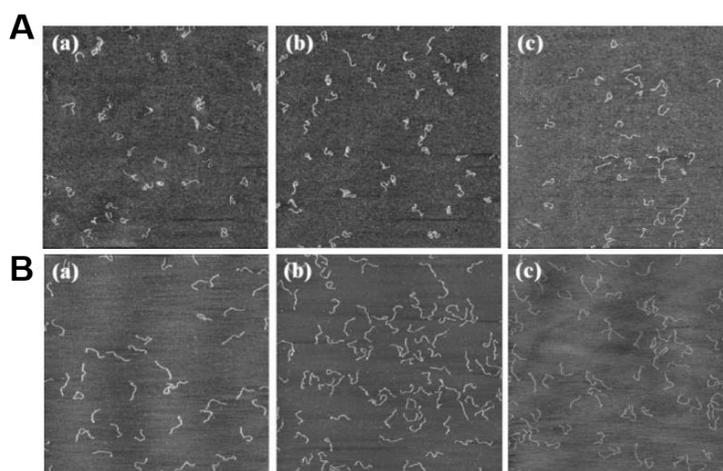
$$\tilde{n}_{s2} = \frac{(2Y + 1) - \sqrt{(4Y + 1)}}{2Y} \quad (I. 22)$$

Avec

$$Y = \frac{n_{b2} \times n_s}{n_{b1}^2} \quad (I. 23)$$

Ce dernier calcul permet de montrer que le paramètre  $\tilde{n}_{s2}$  dépend du ratio entre la concentration en ions  $Mg^{2+}$  et la concentration en ions  $Na^+$  ( $[Mg^{2+}]/[Na^+]$ ).

Nous pouvons maintenant mentionner l’étude réalisée par Pastré *et al.*<sup>[98]</sup> dans laquelle les auteurs ont démontré l’influence du ratio cations monovalents/cations divalents. Pour ce faire, ils ont réalisé des dépôts d’ADN sur des surfaces de mica en présence de  $Mg^{2+}$  et de  $Na^+$ . En modifiant le ratio  $[Mg^{2+}]/[Na^+]$ , c’est-à-dire pour deux valeurs de  $n_{s2}$  différentes (0,65 et 0,95), ils ont pu, en mesurant la distance bout-à-bout des brins d’ADN déposés, montrer l’effet de la variation de ce ratio. D’après les résultats obtenus, avec un  $n_{s2} = 0,95$ , un fort taux de brins d’ADN sont présents à la surface du mica mais ceux-ci forment des croisements les uns avec les autres. La diminution de la valeur du  $n_{s2}$  entraînent par la même occasion la diminution du taux de croisements. Cela montre que la diminution du  $n_{s2}$  favorise le rééquilibrage des brins à la surface du mica à la suite du dépôt.



**Figure I-23:** Déposition de brins d’ADN sur des substrats de mica en présence de différentes valeurs de  $n_{s2}$  [98]. **A)** Pour un  $n_{s2}$  de 0,95 (a)  $[MgCl_2] = 6 \text{ mM}$  et  $[NaCl] = 9 \text{ mM}$ , (b)  $[MgCl_2] = 20 \text{ mM}$  et  $[NaCl] = 15 \text{ mM}$ , (c)  $[MgCl_2] = 60 \text{ mM}$  et  $[NaCl] = 30 \text{ mM}$ . **B)** Pour un  $n_{s2}$  de 0,65 (a)  $[MgCl_2] = 6 \text{ mM}$  et  $[NaCl] = 90 \text{ mM}$ , (b)  $[MgCl_2] = 20 \text{ mM}$  et  $[NaCl] = 150 \text{ mM}$ , (c)  $[MgCl_2] = 60 \text{ mM}$  et  $[NaCl] = 300 \text{ mM}$ .

En 2006, une étude complémentaire a été réalisée par Maria Sushko *et al.* [80]. Dans cette dernière, les chercheurs proposent un modèle descriptif des interactions entre des brins d’ADN et une surface de mica, en présence de cations monovalents et divalents, basée sur la théorie DLVO à champs moyen. Ce modèle leur a permis de montrer que les sels monovalents ont une influence sur les interactions répulsives entre les brins d’ADN et la surface de l’oxyde. Cette étude théorique a pu être liée à des résultats expérimentaux. Par exemple, à une concentration en NaCl constante égale à 100 mM, le pourcentage de recouvrement de la surface a pu être augmenté avec l’augmentation de la concentration en  $Mg^{2+}$  entre 0 mM et 50 mM dans solution (Figure I-23). De la même façon, ils ont mis en évidence qu’en faisant varier la concentration en  $MgCl_2$  de 0 mM à 50 mM, ils ont pu augmenter le pourcentage de recouvrement de la surface par les molécules d’ADN et que l’adsorption est plus efficace qu’en présence de NaCl.

L’ensemble de ces études sur les interactions entre l’ADN et le mica en présence de cations monovalents et/ou divalents a été utilisé par la suite pour mettre en place une méthode d’assemblage des nanostructures d’ADN directement sur les surfaces d’oxyde. On parle « **d’auto-assemblage assisté par substrat** ».

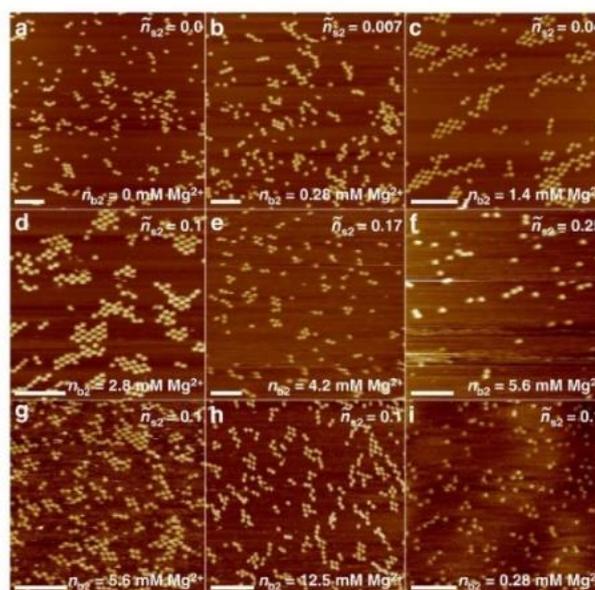
Cette méthode permet la réalisation de motifs structurés à grande échelle tels que des réseaux 2D à base d’ADN. Elle met en jeu des interactions électrostatiques ayant lieu entre les molécules d’ADN, mais aussi celles ayant lieu entre les molécules d’ADN et le substrat utilisé [79]. Cependant, elle nécessite l’utilisation de contre-ions comme les ions monovalents (chlorure de sodium). La présence d’ions divalents ( $Mg^{2+}$ ) engendre une forte interaction entre l’ADN et le substrat (adsorption). L’ajout d’ions monovalents ( $Na^+$ ) permet la diminution des interactions attractives et favorise les effets de diffusion.

Afin de mieux comprendre les interactions entre l’ADN et les surfaces d’oxyde (mica,  $SiO_2$ ) et de démontrer l’efficacité de la méthode d’auto-assemblage par substrat, une étude a été réalisée en

2012 par Shogo Hamada *et al.* [79]. Elle a eu pour but de mettre en place une simulation de l’auto-assemblage assisté par substrat basée sur la théorie DLVO adaptée par Sushko *et al.* [80,81] avant d’être convertie en un modèle cinétique quasi-statique.

Pour ce faire, la structure utilisée est en forme de T et peut se polymériser par appariement de bases pour former des anneaux fermés. Cette structure été mise en place par Hamada Murata *et al.* en 2009 [100]. Ce modèle a ainsi permis de mettre en évidence, par simulation numérique, l’amélioration du rendement de formation des anneaux en utilisant un substrat de mica (en présence de 12,5 mM de  $MgCl_2$ ) par rapport à un assemblage en solution. En effet, à la suite de la simulation cinétique, l’assemblage a un rendement de 54 % en solution et de 74 % sur le substrat de mica. Ces résultats ont ensuite été validés par des mesures spectroscopiques de l’assemblage en solution libre et assisté par un substrat de mica.

Les concentrations en sels divalents (par exemple  $MgCl_2$ ) et en sels monovalents (par exemple NaCl) sont des paramètres importants dans l’étape d’adsorption et celle de diffusion du procédé d’auto-assemblage assisté par substrat de mica. Une étude menée par Sungwook Woo *et al.* [99] en 2014 s’est intéressée à l’influence de la concentration en ions magnésium et en ions sodium sur l’efficacité d’assemblage des origamis d’ADN sur du mica (Figure I-24).



**Figure I-24 : Formation du réseau en fonction des concentrations variables de  $Mg^{2+}$  et  $Na^+$  pendant l’étape de diffusion de surface [99].**

Il a pu être observé que jusqu’à  $\tilde{n}_{S2} = 0.1$ , la taille des treillis augmente rapidement jusqu’à  $\tilde{n}_{S2} = 0.25$ . Cela démontre qu’une faible concentration en  $MgCl_2$  permet la formation des treillis du fait du confinement des tuiles à la surface du mica empêchant leur mobilité. Cependant, une trop forte

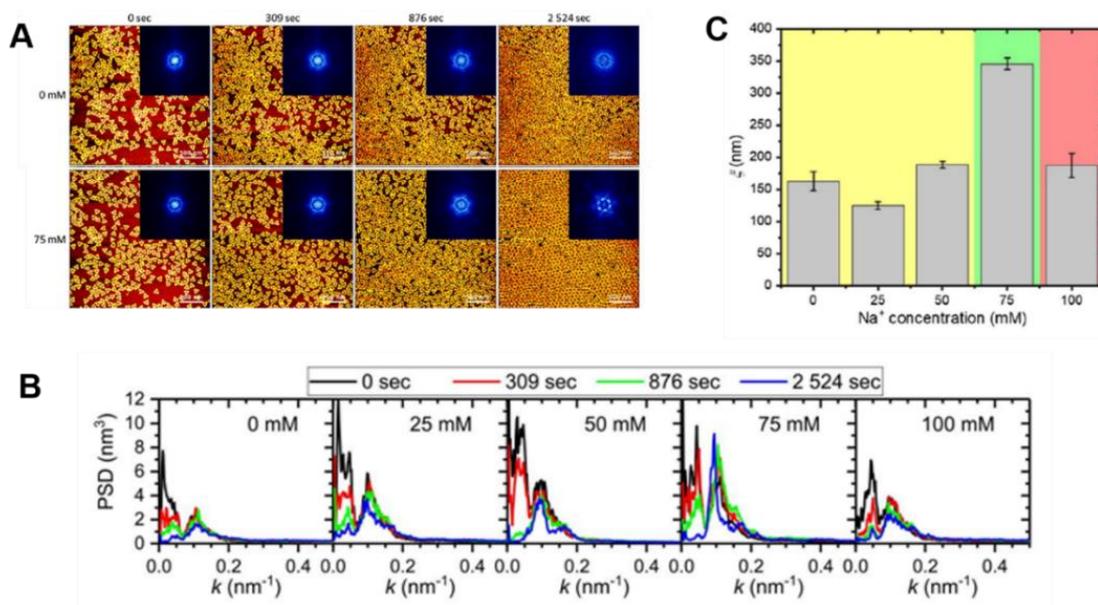
augmentation de cette concentration (équivalente à  $\tilde{n}_{s2} > 0.1$ ) provoque l’immobilité des tuiles à la surface du mica empêchant la formation des réseaux<sup>[99]</sup>.

Diverses études se sont intéressées à la réalisation de réseaux 2D serrés en origamis d’ADN en utilisant différentes formes de motifs<sup>[101-104]</sup>. Ces études se sont surtout tournées vers la compréhension du rôle de la compétition entre les différents types d’ions et du temps d’incubation sur l’ordre au sein des réseaux.

L’étude menée par Charlotte Kielar *et al.*<sup>[105]</sup> a permis de montrer l’effet du ratio en cations monovalents et en cations divalents sur la qualité des assemblages sur une surface de mica. Ainsi, pour une concentration fixe en  $Mg^{2+}$  (10 mM) il a pu être observé que l’absence de  $Na^+$  (voir la Figure I-25) entraîne une forte adsorption des origamis sur le substrat et donc une faible diffusion de surface. Cela entraîne la formation d’une monocouche avec un faible degré d’ordre. Pour une concentration en  $Na^+$  de 25 mM, il est possible d’observer la formation d’une monocouche présentant plusieurs domaines très organisés mais séparés par des régions riches en défauts après 2524 s d’incubation. Cela est attribué au fait que l’augmentation de la concentration en  $Na^+$  favorise les effets de diffusion de surface entraînant une meilleure organisation hexagonale<sup>[105]</sup>. En outre, pour une concentration de  $Na^+$  de 75 mM un très haut degré d’ordre a pu être obtenu. Néanmoins, à partir de  $[Na^+] = 100$  mM, il est possible d’observer une augmentation des défauts et des trous dans les réseaux. Cela montre qu’à partir de 100 mM en  $Na^+$ , les interactions attractives entre le mica et les origamis d’ADN sont trop faibles provoquant une diffusion très importante et la désorption des origamis de la surface après adsorption. Cela favorise la formation de défauts au sein des réseaux formés. Cette observation est validée par le cas où  $[Na^+] = 125$  mM. En effet, à cette concentration, aucune monocouche n’est formée, illustrant la diffusion rapide des origamis sur la surface<sup>[105]</sup>.

Des données quantitatives ont pu être tirées des images obtenues en calculant les fonctions de densité spectrale (PSD) radiale des images AFM. Une fonction de densité spectrale radiale permet de représenter la répartition fréquentielle de la puissance d’un signal en fonction des fréquences le composant. Elle permet donc de montrer des fréquences qui se répètent sur une image.

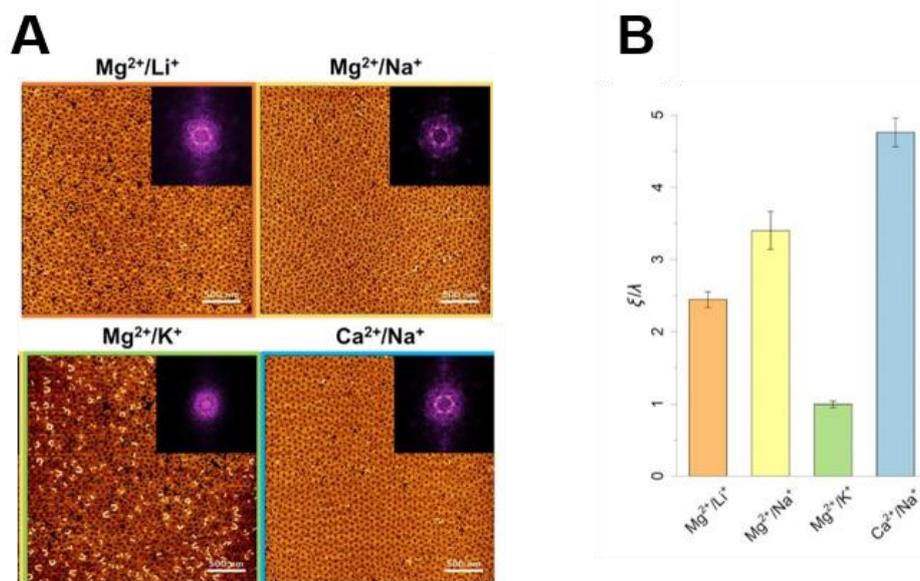
Ainsi, un pic caractéristique à  $\sim 0,1$  nm<sup>-1</sup> (correspondant à une longueur caractéristique  $\lambda \approx 65$  nm) peut être observé sur chaque image de la Figure I-25. La largeur à mi-hauteur de ces pics permet de remonter à une longueur de corrélation ( $\xi$ ). La meilleure longueur de corrélation ( $\xi \approx 350$  nm soit une taille de domaine moyenne d’environ  $5\lambda$ ) a été obtenue pour une concentration en NaCl de 75 mM<sup>[105]</sup>.



**Figure I-25 :** A) Images HS-AFM des échantillons auto-assemblés sur des surfaces de mica en présence de différents ratio  $Mg^{2+}/Na^{+}$ . B) PSD des images des échantillons réalisés aux différentes conditions en sels et en temps d’incubation. C) Longueurs de corrélation calculée suite à la mesure de la largeur à mi-hauteur des échantillons en présence de 10 mM  $Mg^{2+}/75$  mM  $Na^{+}$  incubés pendant 2524 s <sup>[105]</sup>.

Par la suite, une étude de Xin Martinez *et al.* <sup>[103]</sup> a permis de montrer l’influence des types de cations utilisés sur l’ordre au sein des monocouches (Figure I-26). Ici ; afin de caractériser ce degré d’ordre, une méthode informatique basée sur la détection des centres des origamis, une triangulation Delaunay et des tracés de Lemaître a permis de remonter à des valeurs de longueurs de corrélation en fonction des conditions en sels. Un tracé de Lemaître est un diagramme permettant la représentation de la variance de la distribution des voisins proches en fonction de la proportion relative de d’origamis d’ADN ayant le nombre maximum de voisins proches <sup>[103]</sup>.

Cette étude a été réalisée en présence de  $Na^{+}$ ,  $Li^{+}$  ou de  $K^{+}$  pour les cations monovalents et de  $Mg^{2+}$  ou de  $Ca^{2+}$  pour les cations divalents. Ainsi, il a pu être démontré que l’ordre au sein des monocouches est lié aux types de cations utilisés. En gardant le ratio cations monovalents/divalents constants, il a été observé que pour les couples de cations  $Mg^{2+}/Li^{+}$ ,  $Mg^{2+}/Na^{+}$  et  $Mg^{2+}/K^{+}$ , les cations  $Na^{+}$  permettent de former des monocouches mieux ordonnées que les autres cations monovalents avec l’obtention d’une taille de domaine moyenne de  $3,4\lambda$ . Dans le cas de l’étude de l’influence des cations divalents, deux couples différents ont été utilisés :  $Mg^{2+}/Na^{+}$ ,  $Ca^{2+}/Na^{+}$ . Dans ce cas l’ordre le plus important a été obtenu avec les cations  $Ca^{2+}$  avec une taille de domaine moyenne de  $5,8\lambda$ .



**Figure I-26: A) Auto-assemblage assisté par substrat d’origami d’ADN en présence de différents couples de cations monovalents et divalents. B) Longueurs de corrélation correspondantes déterminées à partir de la méthode de triangulation Delaunay [103].**

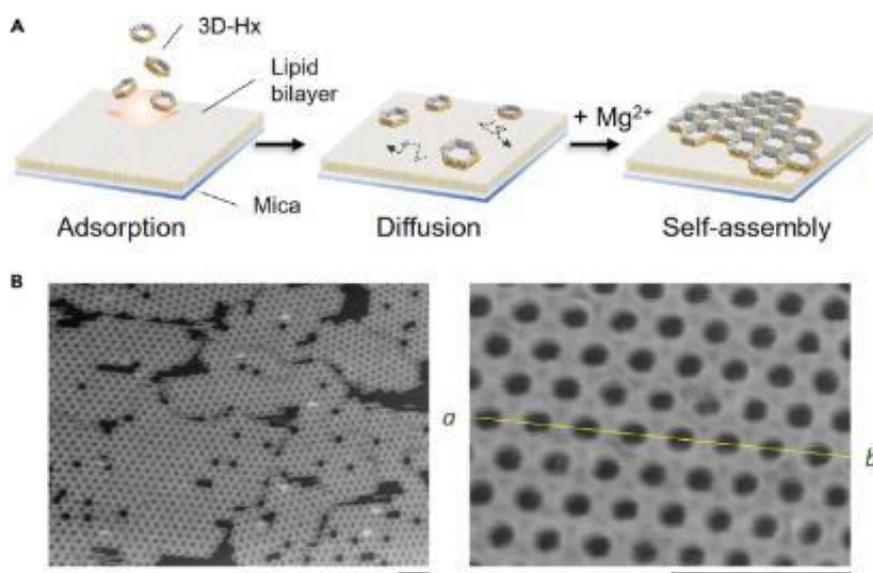
Les ions  $Li^+$  et les ions  $Na^+$  interagissent tous avec les groupes phosphates de l’ADN [106]. La plus faible longueur de corrélation dans le cas des ions  $Li^+$  a ainsi été attribué à leur plus faible rayon atomique provoquant une plus forte densité de charge pour  $Li^+$  et entraînant une plus forte hydratation [103,107]. Cette dernière permet une meilleure attraction avec les origamis d’ADN et donc une plus faible probabilité d’être adsorbée sur la surface de mica et de remplacer les cations divalents.

Les ions  $K^+$  possèdent quant à eux les mêmes propriétés d’hydratation que les ions  $Na^+$  [103,108,109]. Cependant, les auteurs ont observé une monocouche peu ordonnée, la formation de multicouches et une plus faible longueur de corrélation. Cela a été expliqué par le fait que ces ions monovalents interagissent préférentiellement avec les nucléobases de la molécule d’ADN. La compétition entre les ions  $K^+$  et les ions  $Mg^{2+}$  sur le squelette phosphate de l’ADN est donc moins importante entraînant la réduction de la répulsion électrostatique entre les origamis d’ADN.

Enfin, concernant les cations divalents  $Ca^{2+}$ , leur meilleure efficacité comparée aux ions  $Mg^{2+}$  est due au fait que le  $Ca^{2+}$  interagit moins avec les molécules d’ADN que les ions  $Mg^{2+}$  permettant un meilleur remplacement par les cations  $Na^+$  [103,110].

Afin d’éviter l’utilisation d’ions monovalents pour permettre la mobilité des origamis d’ADN sur les substrats, plusieurs travaux sur l’utilisation d’une fonctionnalisation de surface par des bicouches lipidiques zwitterioniques ont été réalisées [111–115]. **Dans ce cas, nous parlerons d’auto-assemblage assisté par membrane.** Ces surfaces ont la particularité d’avoir une faible force d’attraction avec les nanostructures d’ADN. Cette faible interaction attractive permet donc les phénomènes de diffusion et l’ajout de  $Mg^{2+}$  permet les interactions attractives entre les monomères.

En 2015, Suzuki *et al.* [113] ont montré l’efficacité de cette méthode pour différents types de nanostructures possédant différents types de méthodes d’assemblages hiérarchiques (Auto-assemblage par empilement à bout émoussé, des origamis sans interactions spécifiques). Dans les deux cas, des réseaux 2D hautement ordonnés à grandes distances ont pu être obtenus. Cette méthode a permis en 2022 (Figure I-27) [116], l’auto-assemblage assisté par membrane monomères hexagonaux s’auto-assemblant en réseaux 2D. Ils ont pu mettre en évidence l’auto-assemblage par diffusion des réseaux en présence uniquement de 50 mM de  $Mg^{2+}$ .



**Figure I-27: Auto-assemblage assisté par une bicouche lipidique d’un réseau en nid d’abeille (A) Schéma de la procédure expérimentale. (B) Images AFM des réseaux obtenus [116].**

Un récapitulatif des différentes méthodes d’auto-assemblage sur surface est présentés dans le Tableau I-2.

Références	Méthodes d’auto-assemblage des origamis	Types de cations monovalents	Types de cations divalents	Méthodes de caractérisation de l’ordre	Substrats utilisés
[79,100,117]	<ul style="list-style-type: none"> <li>Appariement de bases</li> </ul>	Aucun	$Mg^{2+}$	Aucun	Mica
[101]	<ul style="list-style-type: none"> <li>Empilement de bases</li> <li>Par emballage rapproché</li> </ul>	$Na^+$	$Mg^{2+}$	Tracer de la Transformée de Fourier (FFT) et des histogrammes	Mica

					des orientations des origamis
[99]	<ul style="list-style-type: none"> <li>Empilement de bases</li> </ul>	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Comptage des unités dans les réseaux 2D formés	Mica
[105]	<ul style="list-style-type: none"> <li>Emballage rapproché</li> </ul>	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Tracer de la Transformée de Fourier (FFT) et des PSD radiales (Calcul des longueurs de corrélation)	Mica
[103,118]	<ul style="list-style-type: none"> <li>Emballage rapproché</li> </ul>	Na <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	Calcul des longueurs de corrélation avec la méthode de la triangulation Delaunay et le Tracé de Lemaître	Mica
[113]	<ul style="list-style-type: none"> <li>Empilement de bases</li> <li>Par emballage rapproché</li> </ul>	Aucun	Mg <sup>2+</sup>	Aucune	Mica fonctionnalisé avec une bicouche lipidique de DOPC
[116]	Complémentarité de forme	Aucun	Mg <sup>2+</sup>	Aucune	Mica fonctionnalisé avec une bicouche lipidique de DOPC

**Tableau I-2 : Tableau récapitulatif principales études réalisée sur l’auto-assemblage par complémentarité de forme de monomères en structures hiérarchiques à grandes échelles.**

## I.4 Objectifs de la thèse

### I.4.1 Contexte

Parmi les différentes méthodes d’auto-assemblages supramoléculaires hiérarchiques des nanostructures à base d’ADN, il y a une méthode qui est couramment utilisée :

- L’auto-assemblage via des interactions fortes au sein des molécules d’ADN : L’auto-assemblage par appariement de bases.

Il existe également une autre méthode introduite dans le domaine des origamis :

- L’auto-assemblage mettant en jeu des interactions faibles d’empilement  $\pi$  : L’auto-assemblage par complémentarité de forme.

Notre but, ici, est d’explorer différents designs d’origamis d’ADN utilisant l’une ou l’autre des méthodes d’assemblage hiérarchique, afin d’évaluer les principales caractéristiques de chacune des méthodes qui permettront potentiellement de répondre aux problématiques de différents domaines technologiques. Dans cette thèse nous sommes intéressés à l’utilisation des origamis d’ADN pour la nanostructuration de surface visant la mise en œuvre d’ordinateurs quantiques et de la cryo-TEM.

### I.4.2 Problématique

#### I.4.2.1 Application dans la caractérisation des biomolécules au cryo-TEM

La Cryo-Microscopie électronique (Cryo-TEM) est une technique permettant de déterminer les caractéristiques structurales biomoléculaires et supra-assemblages biologiques. Elle permet par exemple la caractérisation à haute résolution de particules uniques de type protéines. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés uniquement à l’analyse structurale par cryo-TEM de particules isolées de type protéines. Je discuterai donc seulement de cet aspect en cryo-TEM. La méthode de cotent de particules uniques est basée sur la vitrification à basse température de 3  $\mu\text{L}$  de particules ayant été déposée sur une grille de Cryo-Microscopie. Elles se retrouvent donc en suspension dans la couche de glace vitrifiée <sup>[119,120]</sup>. Cette technique permettrait d’obtenir des résolutions structurales d’environ 2-3 Å. Cependant, la qualité de la couche de glace est un paramètre clé dans l’obtention de très bonnes résolutions. En effet, lors de la congélation, il y a plusieurs paramètres physico-chimiques qui peuvent conduire à une qualité de glace non compatible avec une analyse structurale des particules uniques. Par exemple, un des phénomènes le plus fréquemment

observé dans le domaine est l’apparition d’un ménisque de glace voir Figure I-28. Cela a pour effet d’induire une superposition des particules sur le bord du trou, limitant drastiquement le nombre de particules isolées observable compromettant l’analyse structurale des biomolécules <sup>[120]</sup>.

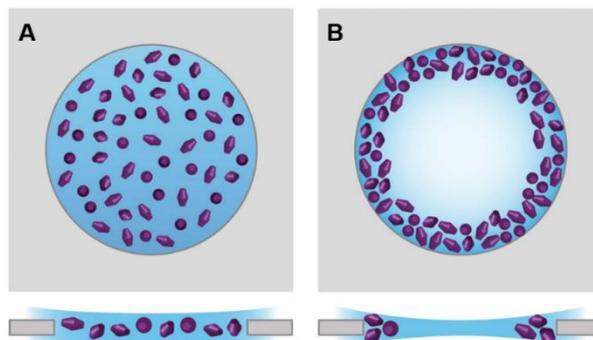


Figure I-28 : A) Dispersion des particules parfaites sur la grille de Cryo-TEM. B) Agrégation des particules sur les bords du trou de la grille de cryo-TEM à cause du ménisque de glace <sup>[120]</sup>.

**Solution proposée :**

La solution que nous proposons est d’utiliser des microfilaments formés à l’aide de la polymérisation d’origamis d’ADN afin de les déposer à la surface des trous pour limiter la formation des ménisques de glace (Figure I-29).

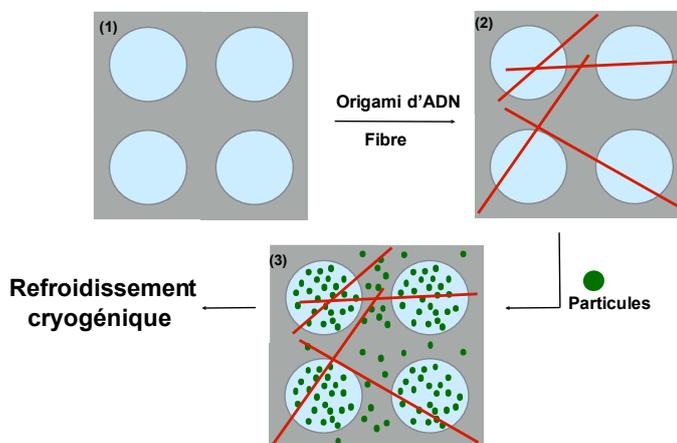


Figure I-29 : Schéma de principe du dépôt des origamis d’ADN sur les grilles de Cryo-TEM.

**I.4.2.2 Applications dans les ordinateurs quantiques**

Les ordinateurs classiques sont très présents dans notre quotidien sous différents aspects : les smartphones, les centres de données, les ordinateurs individuels, etc. <sup>[121]</sup>. Néanmoins, un problème

d’efficacité se pose. En effet, ces machines sont limitées quant à la résolution de problèmes très complexes. Ainsi, diverses études se sont tournées vers le développement d’ordinateurs quantiques. Ces derniers peuvent, par l’intermédiaire d’algorithmes quantiques, résoudre plus efficacement les problèmes complexes en comparaison avec les ordinateurs classiques <sup>[122]</sup>.

### ❖ Les quantum bits (qubits)

Contrairement aux ordinateurs conventionnels qui stockent les informations en bits (1 ou 0), les ordinateurs quantiques le font en bits quantiques (qubits).

Un bit classique est une unité d’information qui permet de stocker les données au sein des ordinateurs classiques. Il peut prendre deux valeurs possibles : soit 0 soit 1. Il est possible de matérialiser ces valeurs en y appliquant ou non une tension, une charge ou un courant.

Dans le cas des ordinateurs quantiques le bit est remplacé par un qubit. Ces derniers, possède deux états quantiques « propres » notés  $|0\rangle$  et  $|1\rangle$  <sup>[123]</sup>. La particularité des qubits est qu’ils peuvent exister dans une superposition des deux états propres :

$$|\psi\rangle = \alpha |0\rangle + \beta |1\rangle \quad (\text{I. 24})$$

Avec  $\alpha$  et  $\beta$  des nombres complexes.

### ❖ Les qubits dans les technologies SOI CMOS

Différentes études se sont intéressées à l’utilisation du silicium pour la réalisation de qubits de spin. Ces qubits auraient un long temps de cohérence de rotation. Ainsi, c’est en 2012 que le premier qubit simple confiné dans le silicium a été réalisé (Figure I-30-A) <sup>[124]</sup>.

En 2016, Maurand *et al.* <sup>[125]</sup> créent un dispositif de double qubits en utilisant un procédé en général utilisé pour la fabrication de transistors CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) (Figure I-30-B). Il est composé de deux quantum dots situés à l’intérieur d’un transistor en silicium de type p avec deux portes. Le premier quantum dot sert à encoder un qubit de spin à trou et le second sert pour la lecture du qubit. Ces dispositifs présentent, cependant, des limitations en termes d’évolutivité du fait que la réalisation des mesures ne peut se faire que par la présence de deux réservoirs en série.

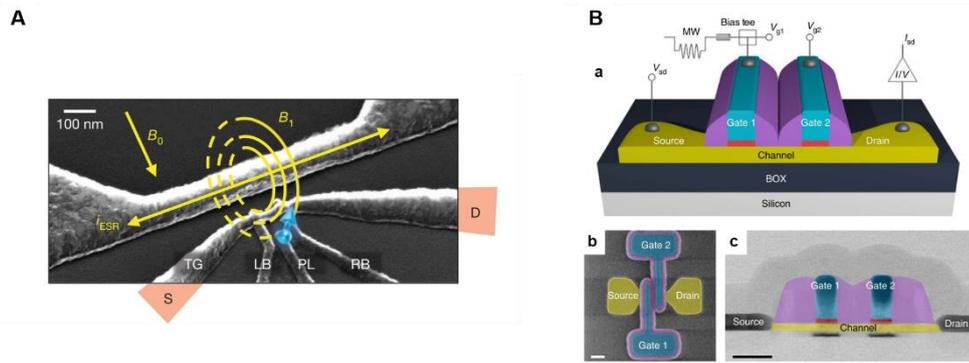


Figure I-30 : A) Image MEB du premier qubit simple confiné dans le silicium <sup>[124]</sup>. B) a- Représentation 3D Dispositif qubit CMOS représentant un transistor à effet de champs à nanofils en silicium sur un isolant avec deux portes. b- Vu supérieure prise au SEM. c- Vue en coupe prise au TEM <sup>[125]</sup>.

Afin d’aller au-delà de cette limite d’évolutivité, la solution est de réaliser un réseau 2D permettant l’implémentation de codes de corrections d’erreurs nécessaire afin de limiter la perte d’information quantique et la réalisation de calculs quantiques complexes. Ainsi, en 2017, Louis Hutin *et al.* <sup>[126]</sup>, dépose un brevet d’invention proposant la mise en place d’un dispositif à qubits de spin en trois dimensions (Figure I-31). Ce dernier est composé de deux plans reliés entre eux par des piliers en silicium. Le premier plan correspond à un réseau 2D de qubits de données et des qubits de mesure reliés entre eux par des barrières tunnels adressées en ligne/colonne. Celui-ci sert à coder l’information quantique. Le deuxième plan est composé des points de détection et est nécessaire pour lecture des qubits du premier plan. Cette architecture sur trois niveaux permettrait d’augmenter le nombre de qubits dans le réseau et donc d’améliorer les capacités de calculs et de corrections <sup>[127]</sup>. Ce type d’architecture nécessite une couche de réseaux 2D uniforme et une variabilité faible à grande échelle.

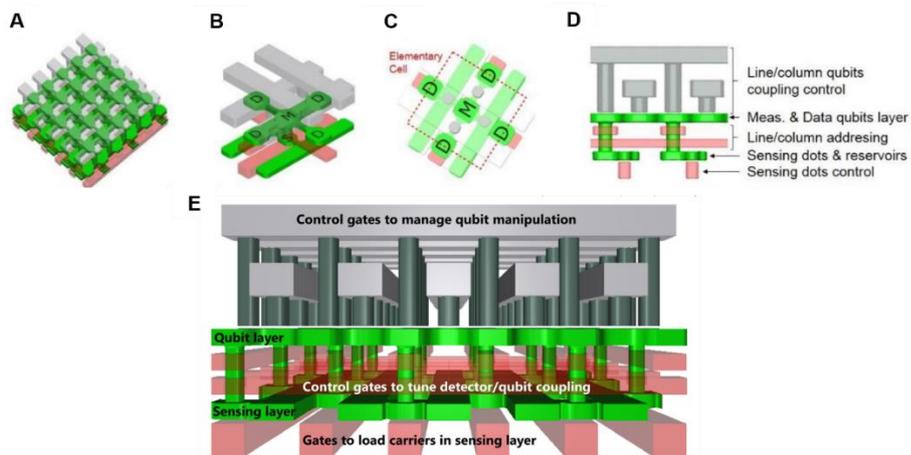


Figure I-31: Schéma du réseau 3D de qubits en deux couches. (A) Vue du dessus. B) Vue 3D de l’unité élémentaire. C) Vue du dessus de l’unité élémentaire. (D) Vue de profil de l’unité élémentaire. E) Schéma d’un réseaux 3D de qubits sur silicium <sup>[128]</sup>.

**Solution proposée :**

Nous proposons donc de réaliser un réseau bidimensionnel en origamis d’ADN qui servira de masque de gravure dans le but de mettre en place le premier plan de ce dispositif soit le réseau 2D de qubits sur silicium. Le réseau 2D en ADN sera former par la polymérisation d’une structure unitaire en forme de carré.

Ce travail de thèse sera divisé en deux parties. En premier lieu, le design, la synthèse et la purification des origamis d’ADN seront réalisés au Centre de Biochimie Structurale de Montpellier au sein de l’équipe de Biophysique Intégratives des Membranes. Le développement du procédé de préparation d’échantillon de cryo-TEM sera lui aussi mis en place au sein de cette équipe.

Les dimensions théoriques des réseaux 2D souhaitées seront proposées par le Départements Composants Silicium (DCOS) du CEA-LETI. Le stockage des origamis et leur utilisation pour l’auto-assemblage sur surface seront faites au laboratoire Biomade de l’IRIG, les mesures CD-SEM seront faites dans la salle blanche du CEA et les caractérisations AFM seront réalisées sur la Plateforme de Nano Caractérisation (PFNC).

## Chapitre II- Auto-assemblage supramoléculaire à base d'origamis d'ADN

---

*L'objectif de ce chapitre est d'explorer les différentes méthodes d'assemblage hiérarchiques de nanostructures permettant d'obtenir des supra-assemblages à l'échelle du micromètre.*

*Nous avons, dans une première partie, utilisé une méthode classique d'assemblage supramoléculaire par appariement de bases pour former des microfilaments d'une taille de l'ordre du micromètre. Ces filaments ont été développés pour des applications en Biologie Structurale. Plus particulièrement, ils seront destinés à la préparation d'échantillons de protéines pour une visualisation en cryo-TEM. Ceci dans l'objectif de faciliter la caractérisation structurale des protéines et de permettre une reconstruction 3D des protéines ciblées.*

*La seconde partie du chapitre se concentre sur une deuxième méthode d'assemblage développée récemment dans le domaine des origamis-ADN. Cette méthode utilise des principes de complémentarité de forme et présente l'avantage d'être réversibles. Nous allons explorer ces nouvelles propriétés d'assemblage supramoléculaire pour former des réseaux 2D d'origamis. Ces réseaux ont pour objectifs d'être utilisés comme masques de gravure pour la réalisation de réseaux 2D sur silicium pour les ordinateurs quantiques. D'autres types de nanostructures exploitant cette méthode ont aussi été mises en place.*

---

## II.1 Design, synthèse, purification et auto-assemblage à grande échelle de différents types d'origamis d'ADN

### II.1.1 Objectifs

L'objectif de ce chapitre est de proposer des designs d'origamis d'ADN pouvant répondre aux problématiques posées dans la section I.4.2. Nous avons ciblé deux applications intéressantes :

- La préparation de grilles de cryo-TEM pour la caractérisation de protéines,
- La réalisation de réseaux 2D en origamis d'ADN pour la nanostructuration de surface.

Dans un premier temps, nous souhaitons créer un origami d'ADN monomérique qui aura la capacité de former des microfilaments par appariement de bases. Ces microfilaments seront destinés à être utilisés en cryo-TEM.

Ensuite, nous voulons mettre en place le design de deux monomères carrés s'auto-assemblant en réseaux 2D. Ces structures seront utilisées par la suite comme masque de gravure pour la création des réseaux 2D de qubits de silicium.

Enfin, nous présenterons trois autres designs d'origamis d'ADN complémentaires de forme, qui nous permettront de créer des structures hiérarchiques de différentes complexités.

### II.1.2 Matériel et méthodes

Pour rappel, la réalisation d'un origami d'ADN se déroule en cinq étapes distinctes :

- ❖ **Étape 1 :** La conception du design de la nanostructure souhaitée.
- ❖ **Étape 2 :** La réalisation de la forme souhaitée du brin échafaud à l'aide du logiciel CaDNAo 2<sup>[32]</sup>. Lors de cette étape, il est aussi nécessaire de choisir le type de réseaux des doubles brins d'ADN (monocouche ou multicouche, réseau carré ou en nid d'abeille). Ensuite, les séquences et le chemin des brins agrafes sont déterminés. En général, la taille des brins agrafes se situe entre 18 et 60 nucléotides. La forme des nanostructures peut être ensuite prédite grâce au logiciel CanDO.
- ❖ **Étape 3 :** La synthèse des brins échafauds et des brins agrafes. Les brins échafauds peuvent être synthétisés dans de l'ADN plasmidique double brin ou par séparation d'amplicons PCR. Ils sont issus du bactériophage simple M13mp18. Dans notre cas, nous avons acheté nos brins échafauds auprès de l'entreprise Tilibit Nanosystems. Les brins agrafes ont eux aussi été fournis par cette entreprise.

- ❖ **Etape 4 :** La purification des origamis synthétisés par électrophorèse sur gel d'agarose ou par précipitation au polyéthylène glycol (PEG).
  
- ❖ **Etape 5 :** La caractérisation des nanostructures au TEM.

## II.1.2.1 Design d'un origami d'ADN

### II.1.2.1.1 Le logiciel CaDNAno 2

Le logiciel CaDNAno 2 <sup>[32]</sup> est un outil d'aide à la conception des origamis d'ADN. Grâce à ce logiciel, il est possible de positionner le brin échafaud pour obtenir la forme souhaitée et de déterminer les séquences des brins agrafes. Ces derniers permettront le repliement du brin échafaud dans la forme ciblée (Figure II-1).

Il existe différentes règles à respecter afin de réaliser le design d'un origami d'ADN à l'aide de ce logiciel <sup>[129]</sup>:

- Il existe deux types de réseaux qu'il est possible d'utiliser : le réseau carré et le réseau en nid d'abeilles.
- La taille des agrafes doit être comprise entre 18 et 60 bases. La limite inférieure est pour éviter les problèmes d'association. En effet, des tailles de brins trop courtes diminueraient la probabilité d'appariement des brins lors de l'assemblage et diminuerait par conséquent la stabilité des nanostructures. La limite haute sert à limiter les coûts de synthèse des brins mais aussi éviter les erreurs de synthèse.
- Il est important de considérer le nombre de « cross-over » au sein des structures :
  - Un nombre de « cross-over » optimisé favorise le repliement et la stabilité structurale de l'objet.
  - Plus le nombre de « cross-over » est élevé, plus les contraintes et les déformations internes peuvent être élevées.

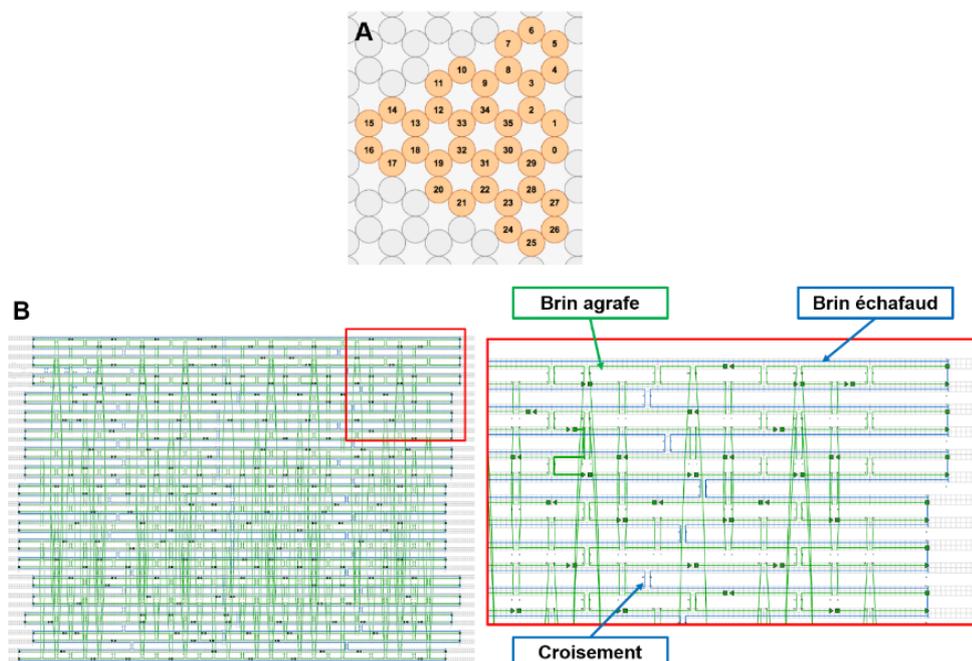


Figure II-1 : Schéma descriptif d'un design sous caDNAno.

Il est possible de prédire la forme et la flexibilité des nanostructures d'ADN en fonction de leur design CaDNAno en utilisant l'outil de simulation par éléments finis CanDO.

Dans l'outil CanDO, les doubles hélices d'ADN sont considérées comme des faisceaux élastiques isotropes contraints par leurs voisins les plus proches. Différents paramètres pour chaque double-hélice sont nécessaires afin de permettre la modélisation des nanostructures (Les valeurs présentées sont celles par défaut) <sup>[129]</sup> :

- La rigidité à l'étirement dont la valeur standard pour l'ADN-B est de 1100 pN.
- La rigidité à la flexion qui est de 230 pN.nm<sup>2</sup>.
- La rigidité à la torsion qui est de 460 pN.nm<sup>2</sup>.
- Le diamètre d'une double hélice d'ADN qui est de 2,25 nm.
- L'hélicité qui est de 10,5 pb/tour.
- L'élévation axiale qui est de 0,34 nm par paires de bases.

Via cet outil, la forme prédite de la structure est calculée grâce au logiciel d'éléments finis ADINA (Automatic Dynamic Incremental Non-linear Analysis, ADINA R&D Inc., Watertown, MA, USA). Il donne aussi accès aux fluctuations quadratiques moyennes (Root-Mean-Square Fluctuation ou RMSF) des paires de bases calculées à 298 K. Cet outil nous permettra donc de contrôler la forme de nos nanostructures avant les essais d'assemblage. Les valeurs de RMSF obtenues seront données à titre indicatif. Pour des modélisations plus précises, des études plus poussées devront être réalisées. Ce ne sera pas le cas dans cette thèse.

## II.1.2.2 Synthèse et purification des origamis d'ADN

### II.1.2.2.1 Le recuit en température

Afin de permettre le repliement des origamis d'ADN, il est nécessaire de passer par une étape de recuit en température. Pour ce faire, nous devons mélanger dans un tube Eppendorf ©, tous les éléments nécessaires :

- Une solution tampon (en général composé de Tris [pH = 8] et de EDTA).
- Une certaine concentration de brins échafauds composé de 7560 (p7560) ou 8064 (p8064) bases et issus du bactériophage M13.
- Une certaine concentration de brins agrafes.
- Une concentration de  $MgCl_2$  (à définir pour chaque objet) issus d'une solution mère de 1 M en  $MgCl_2$ .

#### ❖ Préparation de la solution tampon concentrée 20 fois (FB 20X):

La solution tampon est composée de :

- 100 mM de Tris-HCl (pH=8)
- 20 mM de EDTA

#### ❖ Préparation de la solution tampon de repliement :

La solution tampon de repliement est composée de :

- 20 nM de brins échafauds.
- 200 mM de brins agrafes.
- Un certain volume de FB 20X afin de permettre une dilution de 20 (FB 1X).
- Un volume d'eau ultrapure (18 M $\Omega$ .cm) afin de compléter la solution.

Une fois la solution prête, le tube est placé dans un thermocycleur PCR Biorad©. Le programme en température est composé de trois étapes :

- Une montée rapide en température jusqu'à 65 °C et un palier de 15 min à cette même température afin de dénaturer tous les brins d'ADN.
- Une rampe en température dans une gamme comprise entre 60 °C et 40 °C. Dans ce projet, elle est en général de 1 h/°C, 2 h/°C et 3 h/°C.
- Un refroidissement rapide jusqu'à 10 °C et un stockage à cette température jusqu'à la récupération des échantillons.

## II.1.2.2 Techniques de purification

### ❖ La purification sur gel d'agarose

La purification sur gel d'agarose est une méthode d'extraction physique permettant la séparation des origamis d'ADN intacts, des origamis d'ADN défectueux, des agrégats et des oligonucléotides libres. Cette séparation se fait à l'aide d'une méthode d'électrophorèse permettant la diffusion des espèces dans une matrice polymère en agarose. Tout ceci est permis grâce à la charge négative de l'ADN et à l'application d'un champ électrique dans un banc d'électrophorèse.

Cette méthode se déroule en différentes étapes. Dans un premier temps, il faut verser dans un flacon de 100 ml, 1,2 g d'Agarose en poudre, 24 g d'eau ultrapure, 120 g de solution de 5X TBE (Tris, Borate, EDTA). Ensuite le flacon est chauffé pendant environ 1 min. Une solution de 1 M de  $MgCl_2$  est utilisée afin d'atteindre une concentration de 11 mM. La solution est ensuite déposée dans le trail d'électrophorèse en présence de 12  $\mu$ l de SYBR SAFE. Ce dernier est un intercalant utilisé pour la révélation de l'ADN sous UV lors du procédé d'électrophorèse.

L'échantillon d'ADN à analyser est ensuite mélangé avec une solution loading dye 6X qui permet le maintien des échantillons sous la surface du gel d'agarose.

Après la solidification du gel d'agarose, 10  $\mu$ l de marqueurs de tailles de 1 kb (Gene Ruler) sont placés dans le premier puit du gel. Ceci permet d'évaluer le bon déroulement de l'électrophorèse et de référence sur le profil de migration des nanostructures. Les solutions à purifier sont placées dans les autres puits (entre 20 et 50  $\mu$ l).

A la fin du procédé d'électrophorèse, les parties intéressantes du gel (observé sous un rayonnement UV) sont coupées et placées dans des tubes filtrants. L'extraction de l'ADN du gel d'agarose est réalisée par centrifugation pendant 5 min à 5000 g à 4 °C.

Le schéma de principe de la méthode de purification sur gel d'agarose est présenté sur la Figure II-2.

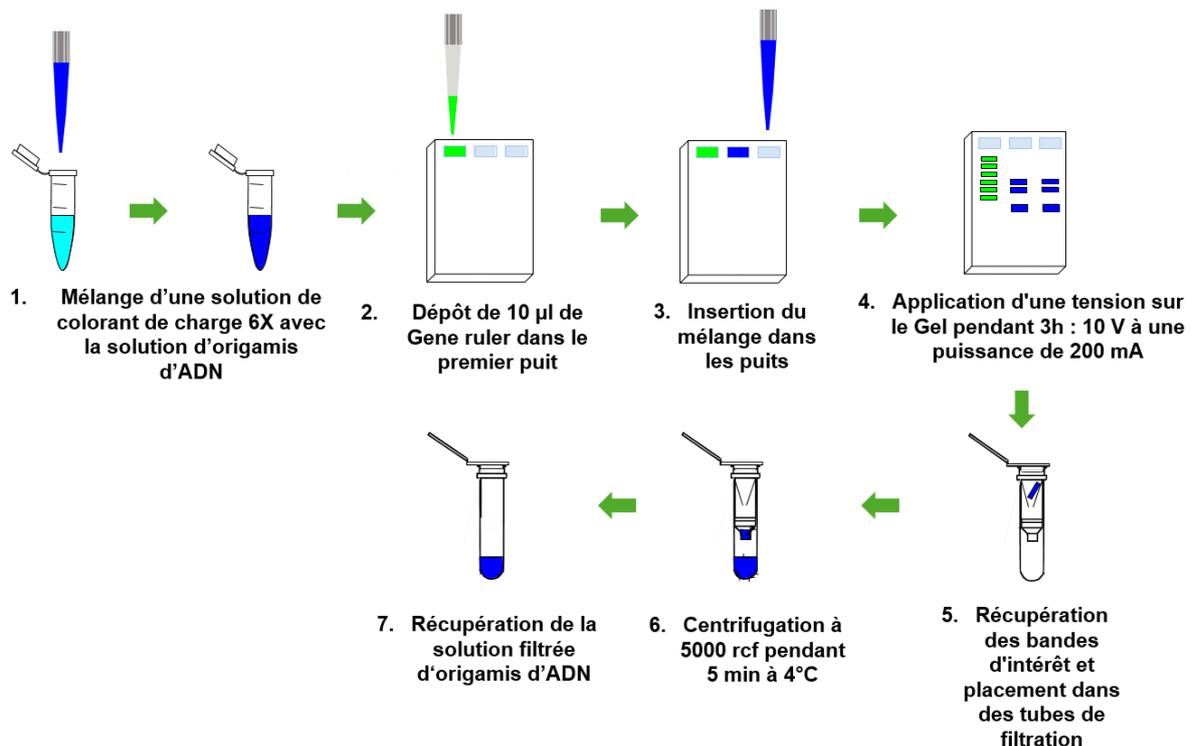


Figure II-2 : Schéma de principe de la purification sur gel d'agarose.

### ❖ La purification par précipitation au PEG

La précipitation au PEG est une technique permettant la séparation des protéines en fonction de leur solubilité. Ici, le PEG permet la réduction de la disponibilité du solvant.

Cette méthode, dans le cas des origamis d'ADN, se déroule en 5 étapes (voir Figure II-3):

1. Il faut d'abord mélanger la solution d'origamis d'ADN avec une solution de précipitation, composée de 15% volumique de PEG-8000, 5mM de Tris-HCl (pH=7,8), 505 mM de NaCl et 1 mM de EDTA, avec un volume équivalent.
2. Ensuite la solution est centrifugée à 16000 g pendant 25 min à 8 °C.
3. Le surnagent est retiré.
4. Le culot re-suspendu dans une solution tampon contenant 5 mM de Tris-HCl, 5 mM de NaCl, 1 mM EDTA et 11 mM de MgCl<sub>2</sub>. Les étapes 2, 3 et 4 peuvent être répétées plusieurs fois. Dans notre cas, nous effectuerons en général 3 cycles de précipitations.
5. La re-suspension finale est faite avec un tampon 0,5X TBE contenant 11 mM de MgCl<sub>2</sub>.

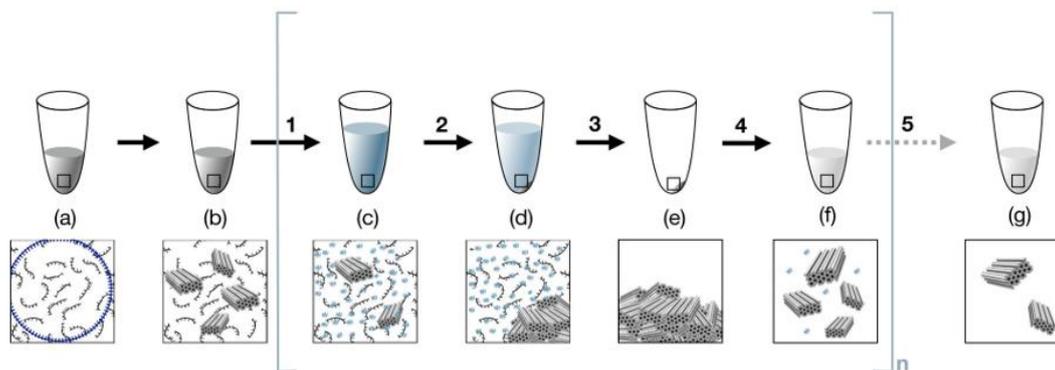


Figure II-3 : Schéma de principe de la méthode de purification par précipitation au PEG <sup>[130]</sup>.

Il est possible de mesurer la concentration en origamis d'ADN à la suite des étapes de purification. Cela se fait grâce à des mesures d'absorbance de l'échantillon à 260 nm (Valeur d'absorbance caractéristique de l'ADN). La concentration en ADN est ensuite estimée grâce à la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon l C$$

Avec  $A$  l'absorbance,  $\epsilon$  le coefficient d'atténuation molaire,  $l$  la longueur parcourue par la lumière dans le milieu et  $C$  la concentration de l'ADN.

### II.1.2.2.3 Caractérisation des origamis d'ADN : Le TEM

Suite à la purification des origamis d'ADN et aux différents protocoles d'assemblage hiérarchique, les nanostructures ont été observées grâce à la microscopie électronique à transmission (TEM). Cette technique de caractérisation morphologique est basée sur l'irradiation d'un échantillon par un faisceau d'électrons de densité de courant uniforme émis par un canon à électrons par émission thermo-ionique, Schottky ou par émission de champ. L'échantillon est déposé sur une grille de carbone préalablement déchargée, puis est recouvert de colorant ; en général de l'acétate d'Uranyle (Coloration négative). Le TEM est aussi composé d'un système de condenseur-lentille permettant la variation de l'ouverture d'illumination. Des capteurs situés à l'arrière du support de l'échantillon permettent la détection des électrons transmis suites à l'interaction entre le faisceau et la surface de l'échantillon.

L'équipement utilisé pour ces analyses est un microscope JEOL 2200 FS FEG à 200 kV équipé d'une caméra CDD 4k x 4k à faible scan. Cet équipement permet aussi de réaliser des analyses de cryo-TEM. Dans ce cas, contrairement à la coloration négative, l'échantillon est dans des conditions hydratées. En effet, les échantillons à observer sont au préalable vitrifiés sur une grille de carbone grâce à l'utilisation d'azote liquide. Cela permet de garder l'intégrité des nanostructures en évitant leur déshydratation.

Il est possible d'utiliser le logiciel EMAN 2 afin de réaliser des traitements d'image en niveaux de gris à large base avec les images provenant des analyses au MET ou eu cryo-MET. Cet outil permet,

ainsi, de réaliser des reconstructions 2D des images TEM mais aussi 3D des images prises avec le cryo-TEM.

❖ **Protocole de préparation des grilles de TEM**

1. 3  $\mu\text{l}$  d'échantillons sont déposés sur la grille de carbone de TEM déchargée par incandescence (Qunatifoil Micro tools GmbH Germany) et laissés pendant 2 min à l'air.
2. Dépôt de 9  $\mu\text{l}$  de solution de 2% volumique d'acétate d'Uranyle en 2 fois :
  - a. Pour le premier dépôt, une goutte de solution est déposée puis aspirée avec un papier absorbant
  - b. Ensuite, nous réalisons le second dépôt et nous laissons reposer pendant 1 min

La seconde goutte est ensuite aspirée pendant 10 s.

❖ **Protocole de préparation des grilles de cryo-TEM**

1. Dépôt de 3  $\mu\text{l}$  d'échantillon sur les grilles de cryo-TEM déchargée par incandescence (Quantifoil Micro Tools GmbH, Germany) R0,6 ou R1,2.
2. La solution est ensuite absorbée pendant 1s à l'aide d'un papier filtre.
3. Congélation de la grille dans de l'éthane liquide à l'aide d'un dispositif semi-automatique de vitrification par plongeon.

## II.1.3 Auto-assemblage par appariement de base de microfilaments en origamis d'ADN

Dans cette partie, nous souhaitons réaliser un origami en forme de « Toblérone » pouvant se polymériser par appariement de bases en microfilaments (Figure II-4). Ici, le choix de la structure 3D de l'origami d'ADN est guidé par les propriétés mécaniques et la taille de l'objet que nous souhaitons obtenir. Ces deux paramètres sont dépendant de la longueur de persistance du filament final. La longueur de persistance d'un polymère est un paramètre mécanique permettant la caractérisation de sa rigidité. Elle correspond à la longueur en dessous de laquelle une chaîne devient rigide. L'idée étant d'avoir un filament avec une longueur de persistance supérieure à 1  $\mu\text{m}$ . Ce paramètre est directement relié au nombre d'hélices impliqué dans l'origami, il est donc important de contrôler le nombre d'hélices du design. Un nombre trop important peut pénaliser et limiter le rendement d'assemblage. La longueur de persistance peut être calculée comme suit <sup>[131]</sup>:

$$P = \frac{E_{ADN}nbI}{k_B T}$$

Avec,

$$I = \left( \frac{2}{\pi^2} n^3 + n \right) \frac{\pi}{4} r^4$$

Avec  $I$  le second moment d'inertie,  $r = 1$  nm le rayon d'une double hélice,  $E_{ADNdb} = 3.10^8$  Pa le module d'Young en compression de l'ADN double brin,  $n$  le nombre d'hélices,  $k_B$  la constante de Boltzmann et  $T$  la température.

Nous avons décidé de réaliser un origami monomère en forme de « Toblérone » (filaments avec une section triangulaire) composé de 18 hélices. Cela correspond à une longueur de persistance théorique de 68,7  $\mu\text{m}$ . Cela signifie que tous les filaments avec une taille en dessous de cette valeur pourront être considérés comme étant rigide. Cela nous permet d'obtenir des monomères avec une longueur de 209 paires de bases (soit  $209 \times 0,34$  nm = 71,1 nm). Les dimensions latérales des faces triangulaires sont de 3 réseaux en nids d'abeilles (soit  $3 \times 6$  nm = 18 nm). L'épaisseur de la structure est de 15,6 nm.

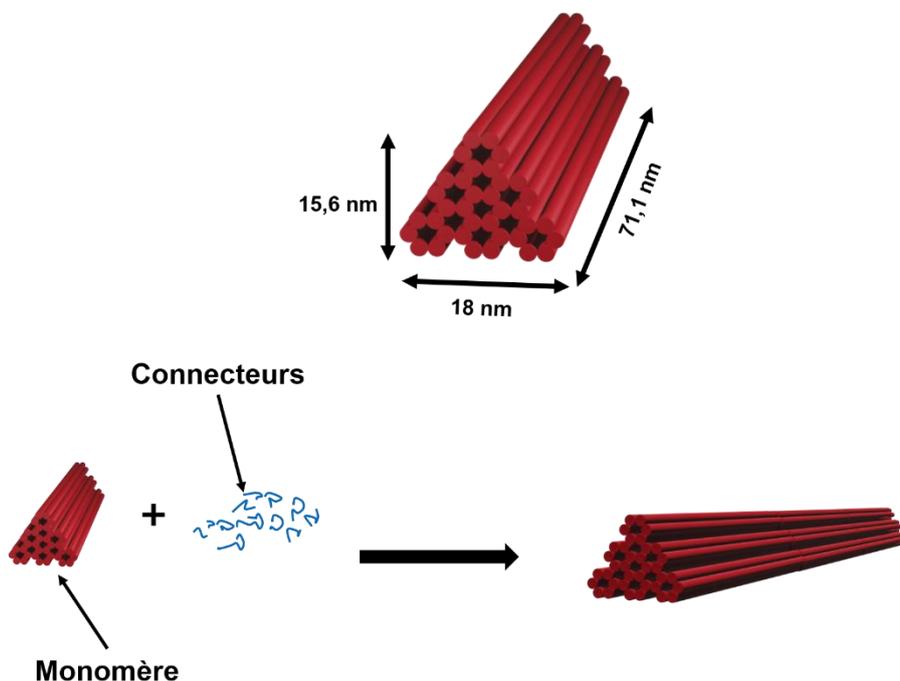


Figure II-4 : Modélisation 3D des microfilaments à la suite de la polymérisation par appariement de bases des monomères en forme de Toblérone.

### II.1.3.1 Design, synthèse et purification des origamis d'ADN en forme de prisme triangulaire

Après le choix du type de réseau à utiliser et de la forme de la nanostructure, nous allons détailler le procédé de conception des Toblérone. Pour rappel, quatre autres étapes sont nécessaires pour y parvenir :

- **Etape 2** : Le design de l'origami d'ADN à l'aide du logiciel CaDNAno 2,
- **Etape 3** : L'assemblage des origamis à l'aide d'un recuit en température,
- **Etape 4** : La caractérisation et la purification des origamis d'ADN sur gel d'agarose,
- **Etape 5** : Le contrôle de l'intégrité des structures par TEM.

Le schéma de principe peut être retrouvé sur la Figure II-5.

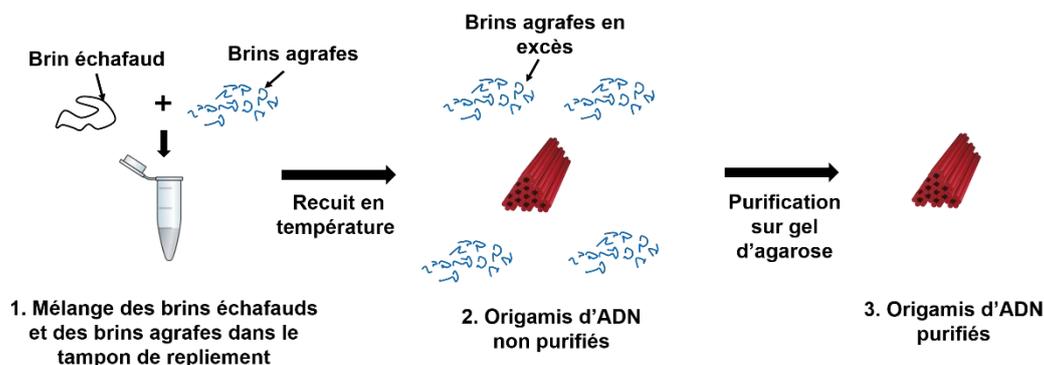


Figure II-5 : Protocole de synthèse des origamis d'ADN en forme de Toblérone.

#### ❖ Etape 2 : Design des origamis d'ADN

A l'aide du logiciel CaDNAno 2, nous avons programmé l'enchaînement des nucléotides permettant la réalisation de la forme ciblée. Le design de la nanostructure dite « monomère » est illustré sur la Figure II-6. Afin de permettre la polymérisation des monomères, des oligonucléotides connecteurs ont été ajoutées aux extrémités de la nanostructure garantissant leur assemblage par appariement de bases.

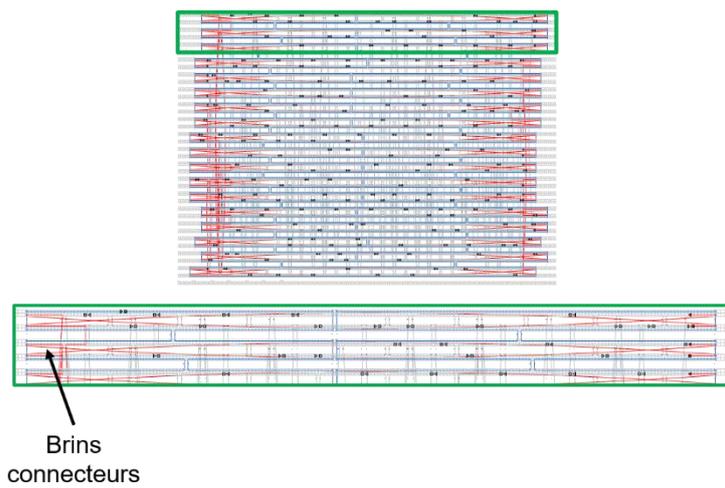
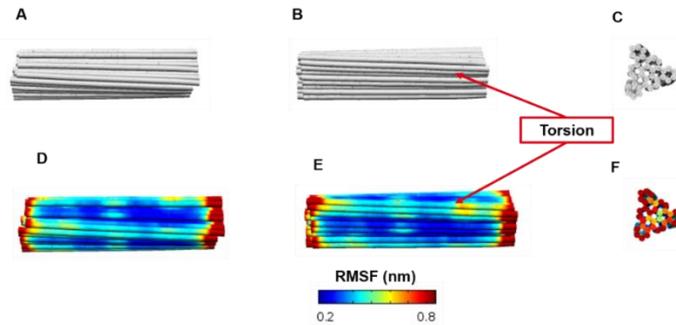


Figure II-6 : Schéma CaDNAno des Toblérone.

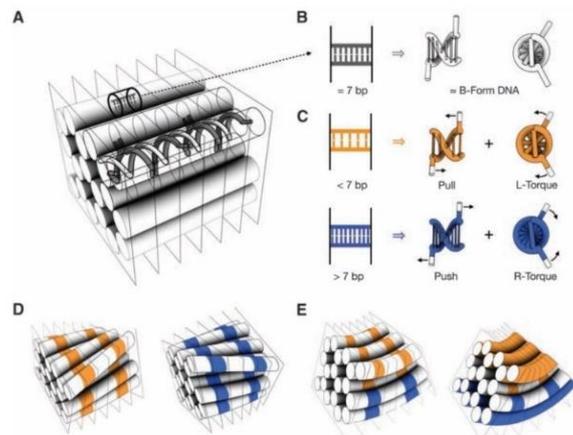
D'après la modélisation CanDO (Figure II-7), cette structure possède une bonne stabilité. En effet, elle a un RMSF minimum de 0,15 nm, un RMSF à 95% de 0,64 nm et un RMSF maximum de 1,89 nm. Cette modélisation nous permet aussi de constater qu'une torsion est présente. Cette torsion, indésirable, est due au fait que le calcul réalisé dans le logiciel CaDNA 2 est fait en considérant qu'il y a 10,5 paires de bases pour chaque tour d'hélice alors qu'en réalité il y a 10,34 paires de bases par tour d'hélice.



**Figure II-7 : Modélisations CanDO du ToBlérone 10,5 pb/tour. A) Vue de côté, B) Vue de haut. C) Vue de la face triangulaire. D-F) Modélisation CanDO prenant en compte les valeurs RMSF de la structure.**

Selon Dietz *et al.* [36], la suppression d'une paire de bases provoque une contrainte de traction sur la partie où se trouvait les paires de bases supprimées. Cela entraîne une torsion à gauche de la double hélice (Figure II-8). A contrario, l'insertion d'une paire de base provoque une contrainte de compression là où se trouvent les paires de bases insérées. Cela induit une torsion à droite de la double hélice d'ADN [36].

Il est donc possible de supprimer une contrainte de traction par l'insertion de paires de bases. Inversement, il est possible de supprimer une contrainte de compression par la suppression de paires de bases.



**Figure II-8 : Principe de conception pour contrôler la torsion et la courbure dans les faisceaux d'ADN [36].**

Nous présenterons, dans la partie II.1.3.3, l'application de ces principes de torsion et de compression afin de supprimer la torsion présente dans la structure du monomère.

### ❖ Etape 3 : Synthèse des origamis : Mélange des réactifs et recuit en température

Pour la synthèse des monomères, nous avons mélangé dans un tube Eppendorf, une solution tampon TE (composé de 10 mM de Tris et de 1 mM d'EDTA à pH= 8), 20 nM de brin échafaud nommé « p7560 » composé de 7560 bases, 200 nM de brins agrafes et entre 12 mM et 20 mM en MgCl<sub>2</sub>. Le reste de la solution a été complété avec de l'eau ultrapure. Ici les ions Mg<sup>2+</sup> ont pour rôle de stabiliser les jonctions Holliday mais aussi d'écranter les charges négatives des brins d'ADN afin de permettre leur assemblage.

Le tube est ensuite placé dans un thermocycleur PCR afin de procéder à l'auto-assemblage. Pour cela, un palier en température est réalisé à 65 °C pendant 15 min. Cette étape permet de dénaturer l'ADN et d'éliminer les hybridations non-spécifiques afin de maintenir l'ADN simple brin. Ensuite, une rampe en température (1 h/°C, 2 h/°C ou 3 h/°C) de 60 °C à 40 °C est réalisée pour permettre les hybridations spécifiques. A la fin de la rampe en température, nous avons ajouté un palier en température à 10 °C afin de stocker les échantillons.

### ❖ Etape 4 : Caractérisation de l'efficacité de l'auto-assemblage et purification : Gel d'agarose

À la suite de cette étape d'auto-assemblage, la solution contient, en général, des nanostructures avec des défauts d'assemblage, des agrégats et des oligonucléotides en excès. Il est donc nécessaire de passer par une étape de purification afin de ne garder que les objets correctement assemblés. Différentes méthodes de purification ont été mises en place telles que la purification sur gel d'agarose, la purification par polyéthylène glycol (PEG) ou encore l'ultrafiltration [37]. Dans notre cas, nous purifions les origamis d'ADN à l'aide de l'électrophorèse sur gel d'agarose. Cette dernière est aussi utilisée afin de vérifier la qualité de l'auto-assemblage.

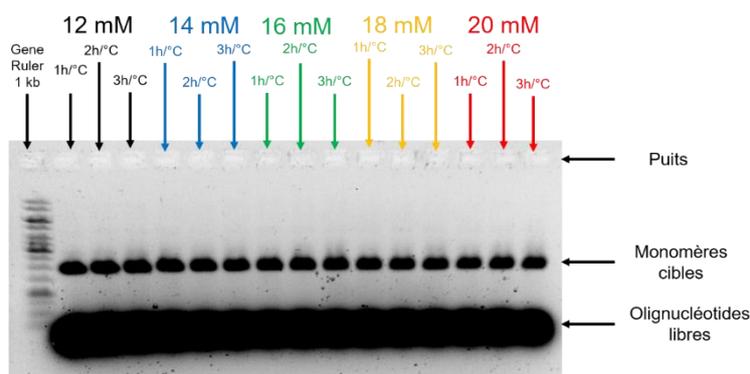


Figure II-9 : Gel d'agarose à 1% des monomères 1D.

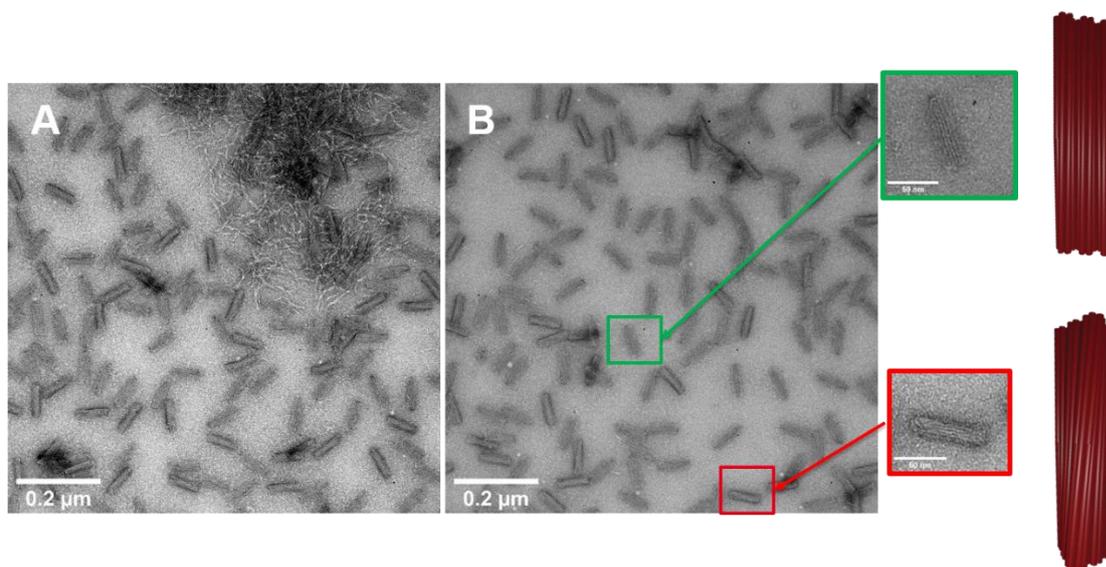
Dans la Figure II-9 nous pouvons observer que des bandes bien définies caractéristiques de structures compactes et correctement auto-assemblés et une faible intensité de trainée indiquant un faible taux d'agrégats.

❖ **Etape 5 : Caractérisation des objets auto-assemblés : Microscopie électronique à Transmission (TEM)**

Les observations faites sur le gel d'agarose sont complétées par des caractérisations au TEM (Figure II-10). Cette dernière montre que les structures sont déjà bien définies avec une rampe à 1 h/°C. De plus, entre 12 mM et 18 mM, la stabilité de la structure n'est pas impactée. Elle est donc stable avec les rampes à 1 h/°C, 2 h/°C et 3h/°C et entre 12 mM et 20 mM en MgCl<sub>2</sub>. Nous pouvons aussi observer la torsion présente dans la structure du monomère, déjà observée sur la modélisation CanDO (Figure II-7).

Nous avons aussi réalisé des classifications 2D des monomères en utilisant plusieurs images (Figure II-10). Cela nous permet d'observer plus précisément les détails des nanostructures. Grâce au logiciel Image j nous avons pu mesurer les dimensions caractéristiques des monomères :

- **Longueur** : 70,94 nm ± 0,97 nm
- **Largeur** : 19,60 ± 0,34 nm



**Figure II-10 : Images TEM des monomères auto-assemblés à 1h/ °C et 12 mM en MgCl<sub>2</sub> (A) et 18 mM MgCl<sub>2</sub> (B).**

Au regard des résultats obtenus, la suite des expérimentations a été réalisée avec une rampe en température de 2 h/°C en présence de 18 mM de MgCl<sub>2</sub>.

Nous avons mis en évidence, via les modélisations et l'imagerie TEM, que les monomères possèdent une torsion au sein de leur structure. Par la suppression de paires de bases, il est possible de la supprimer. Nous traiterons de cela dans la partie II.1.3.3.

### II.1.3.2 Auto-assemblage de suprastructures 1D en forme de microfilaments

Afin de permettre la formation des microfilaments, nous avons procédé de deux façons distinctes :

- **La polymérisation directe** des microfilaments, consistant à l'ajout des connecteurs directement lors de l'étape d'auto-assemblage des monomères.
- **La polymérisation en deux étapes** des microfilaments consistant, dans un premier temps, en l'assemblage des monomères sans les connecteurs. Ensuite, nous réalisons une incubation à température constante en présence des connecteurs.

#### II.1.3.2.1 Polymérisation directe des microfilaments

Dans le cas de la polymérisation directe des filaments en origamis d'ADN, **les brins échafauds et les brins agrafes (dont les brins connecteurs) ont été mélangés dans le même tube** en présence de **18 mM de MgCl<sub>2</sub>**. Ensuite, nous avons réalisé **le recuit en température (2 h/°C)** comme pour la synthèse des monomères. Le schéma de principe de cette méthode est présenté en Figure II-11.

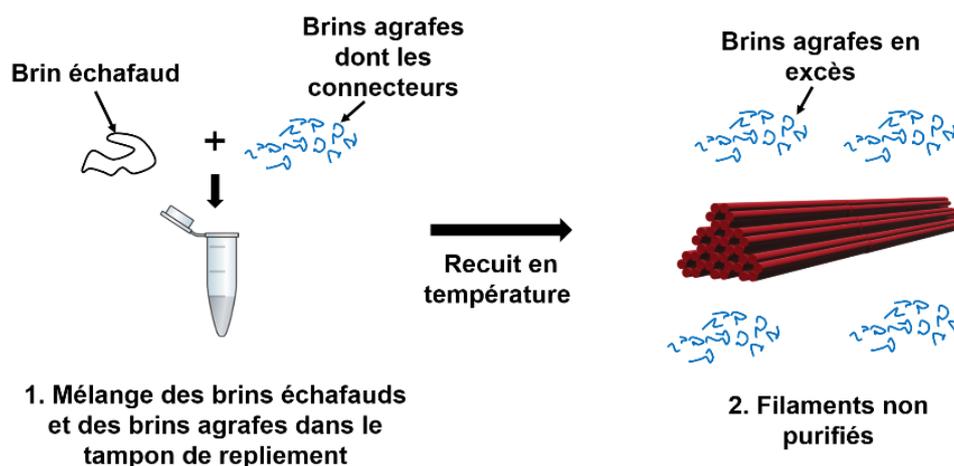
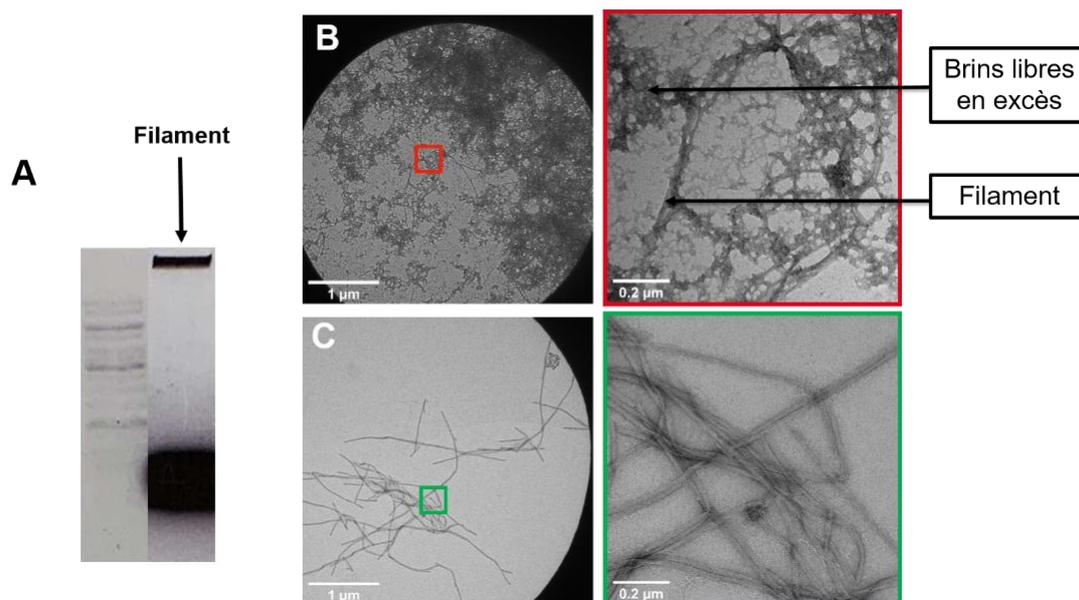


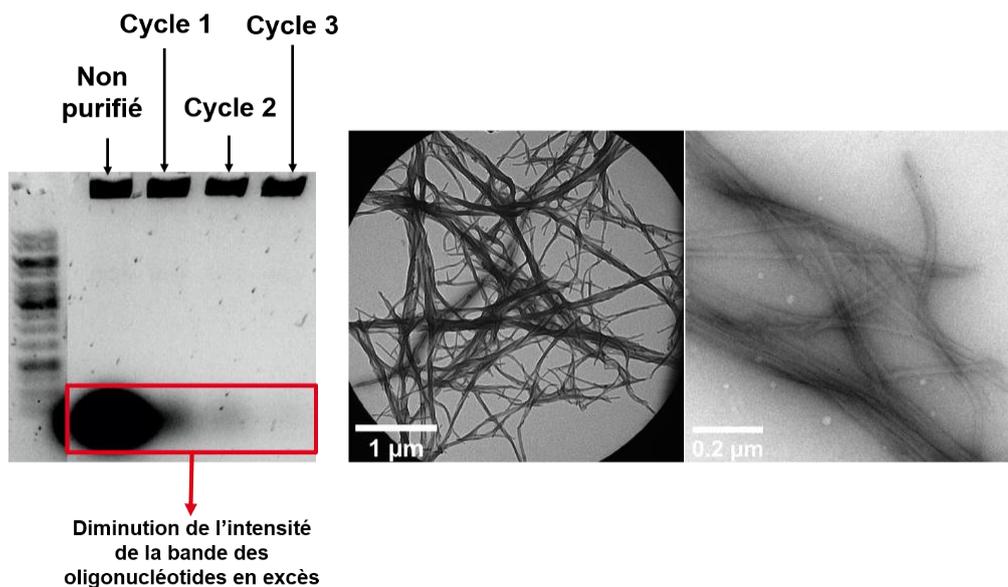
Figure II-11 : Schéma de principe de la polymérisation directe des filaments.



**Figure II-12 : A) Gels d'agarose à 1% des filaments. B) Images TEM des filaments formés à 18 mM en  $MgCl_2$  et avec une rampe en température de 2 h/°C. C) Images TEM des filaments récupérés dans le puit.**

L'ajout de connecteurs a provoqué la non-migration des origamis d'ADN dans le gel d'agarose. Cela nous donne quelques éléments concernant la polymérisation des nanostructures. En effet, les chaînes de polymères ont un poids moléculaire plus élevé que les monomères et ne peuvent donc pas diffuser à l'intérieur du gel d'agarose lors de l'électrophorèse (Figure II-12-A). En observant directement au TEM les échantillons après l'assemblage (Figure II-12-B), nous remarquons quelques filaments, mais ces derniers sont mélangés aux oligonucléotides en excès du fait de l'absence de purification. Ainsi, en récupérant la solution directement dans l'un des puits, nous pouvons observer des filaments (Figure II-12-C).

En prenant en compte le fait que nous synthétisons des filaments de grandes tailles, ne pouvant pas être purifiés sur gel d'agarose, nous avons fait un essai de purification par précipitation au PEG. Nous avons réalisé une électrophorèse sur gel d'agarose de l'échantillon sans purification, mais aussi du même échantillon à la suite de chaque cycle de purification (Figure II-13). Cette électrophorèse nous permet de mettre en évidence l'efficacité de cette méthode de purification afin de supprimer les oligonucléotides en excès. En effet, nous pouvons observer la diminution de l'intensité de la bande des brins libres en excès avec l'augmentation du nombre de cycles de purification. Cependant, l'observation au TEM de l'échantillon après le 3<sup>ième</sup> cycle met en évidence l'enchevêtrement et l'agrégation des filaments les uns avec les autres. Ces phénomènes d'agrégation et d'enchevêtrement sont caractéristiques de la méthode de purification au PEG.



**Figure II-13 : A) Gels d'agarose à 1% des filaments après chaque étape de purification au PEG. B) Images TEM des filaments après la dernière étape de purification.**

### ❖ Synthèse

Les résultats obtenus montrent que ces méthodes de polymérisation ne sont pas adaptées à ce type de nanostructures :

- Dans le cas de purification sur gel d'agarose, les filaments sont trop longs pour diffuser dans le gel d'agarose et restent piégés dans le puit.
- Dans le cas de la purification au PEG, les filaments s'agrègent lors de l'étape de précipitation.

#### II.1.3.2.2 Polymérisation en deux étapes des microfilaments

Une autre méthode de polymérisation est, de former les monomères, de les purifier par électrophorèse sur gel d'agarose, de rajouter les connecteurs et de les laisser en incubation à une température donnée (Figure II-14).

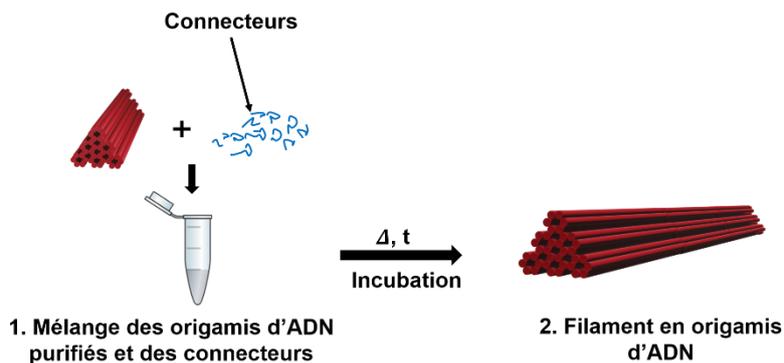


Figure II-14 : Schéma de principe de la polymérisation en deux étapes des filaments.

Différents paramètres ont été étudiés :

- Le temps d'incubation,
- La concentration en connecteurs,
- La température d'incubation,
- La concentration en  $MgCl_2$ .

❖ Influence du temps d'incubation et de la concentration en connecteurs

Nous avons mis en incubation à 37°C environ 3 nM de solution de monomères. Ces monomères ont été mis en présence de différentes concentrations en connecteurs (50 nM, 100 nM, 200 nM) pendant différents temps (1 h, 2 h, 5 h et 10 h).

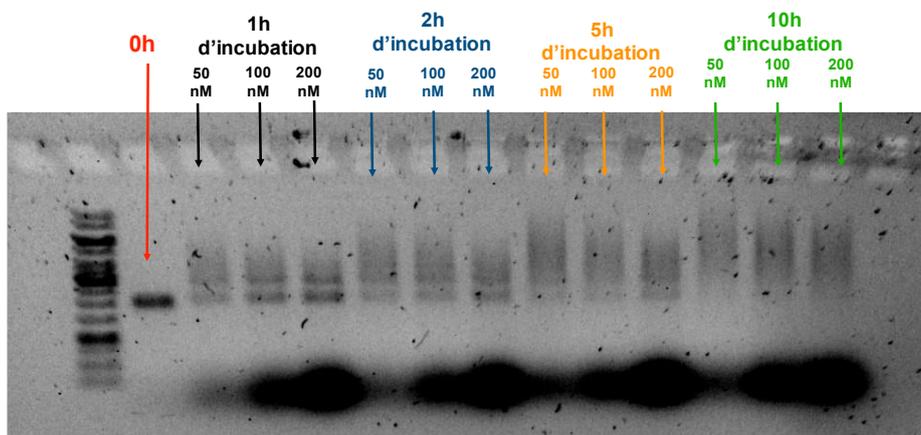


Figure II-15 : Gel d'agarose à 1% des monomères incubés à 37°C avec une variation de la concentration en monomères et du temps d'incubation.

L'intensité de la bande des monomères diminue avec l'augmentation du temps d'incubation (Figure II-15). Cela nous donne déjà une première indication sur le mécanisme de polymérisation. En

effet, plus le temps d'incubation est long et plus la longueur des filaments augmentent. De plus, nous remarquons l'apparition de traînées avec l'augmentation du temps d'incubation. Ces deux phénomènes montrent que la taille des filaments devient de plus en plus importante avec l'augmentation du temps. En effet, plus la taille des filaments est importante et moins le taux de monomères disponible dans le milieu est important. La bande des monomères est donc de moins en moins intense au cours du temps. De plus, les filaments de grande taille auront plus de difficulté à diffuser dans le gel ; d'où l'apparition de la traînée.

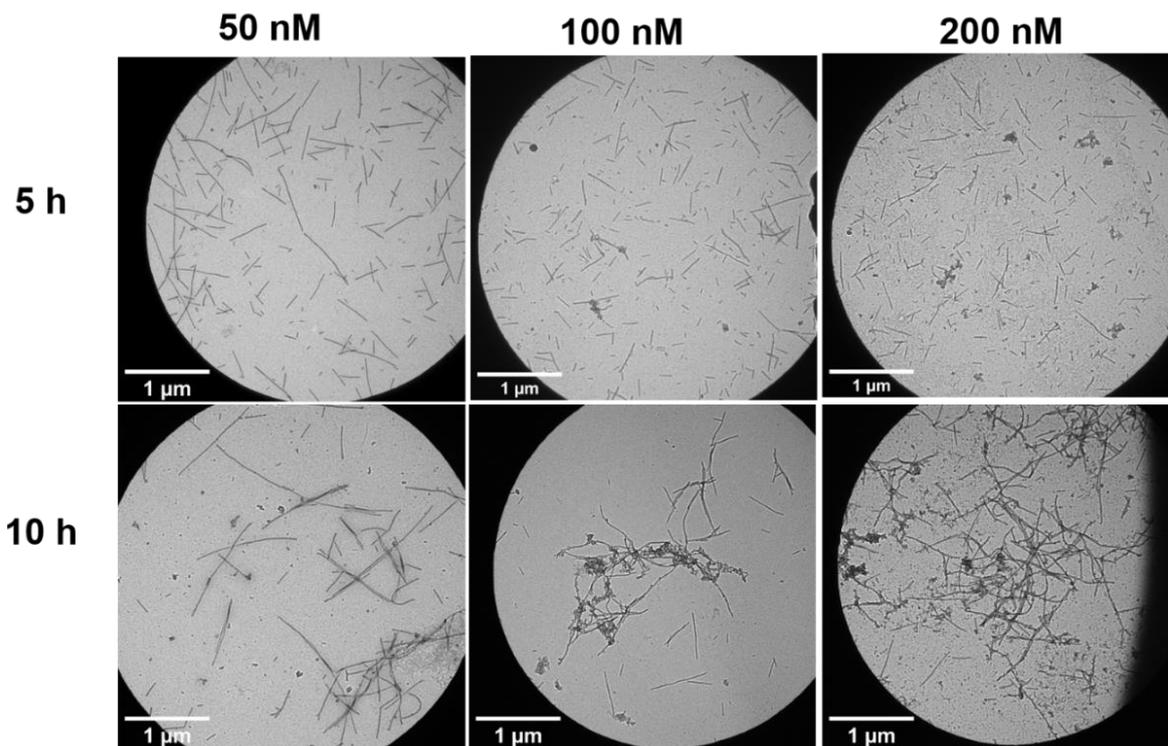
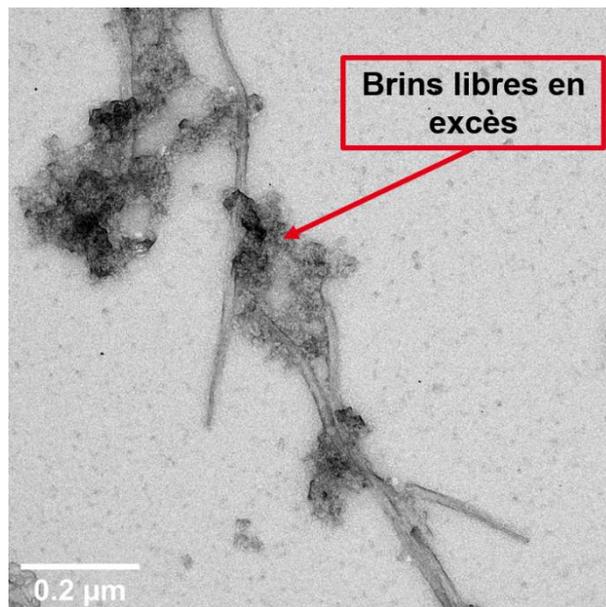


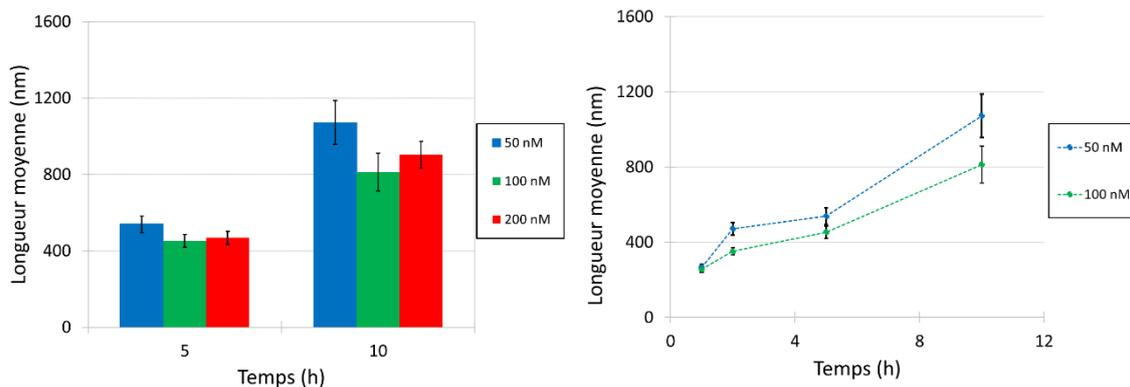
Figure II-16 : Images TEM des filaments après une incubation de 10h et avec différentes concentrations en connecteurs : 50 nM en connecteurs ; 100 nM en connecteurs ; 200 nM en connecteurs.



**Figure II-17 : Image TEM de filaments formés en présence de 100 nM de connecteurs.**

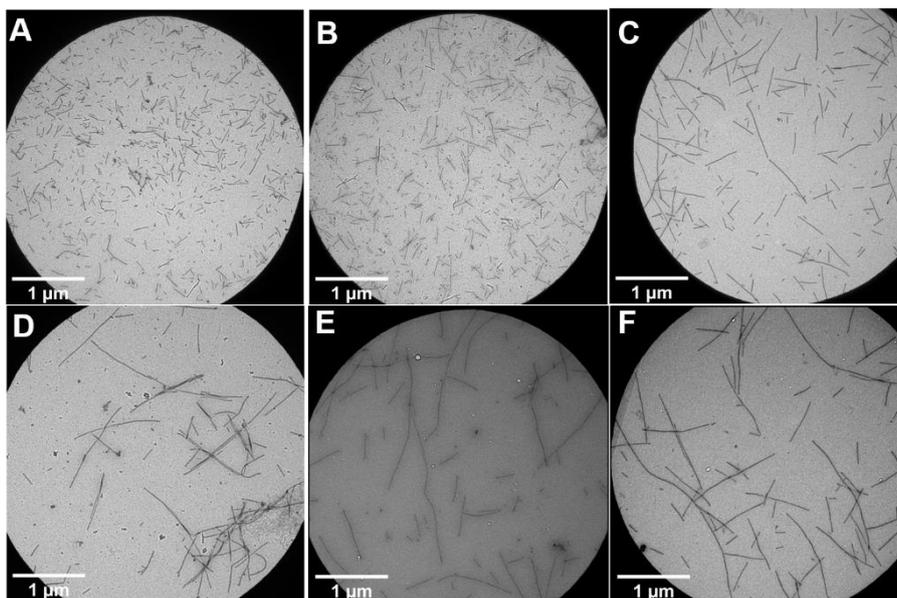
Nous avons observé certains échantillons au TEM (Figure II-16). D'après les images TEM, le temps d'incubation et la concentration en connecteurs exercent une influence sur la taille des filaments. En effet, dans le cas de la concentration en connecteurs, nous observons qu'une forte concentration entraîne l'apparition de brins en excès dans l'échantillon (Figure II-17). Ce résultat est complémentaire des observations faites sur le gel d'agarose avec l'augmentation de l'intensité de la bande des brins libres en fonction de l'augmentation de la concentration en connecteurs. De plus, la hausse de cette concentration favorise aussi l'agrégation des filaments lors du processus de polymérisation.

En mesurant la taille des filaments à l'aide du logiciel image j (Figure II-18), nous remarquons que l'augmentation de la concentration en connecteurs ralentit la cinétique de polymérisation des filaments. Les barres d'erreurs présentées correspondent aux écart-type calculé entre les différentes mesures. En effet, nous observons que pour des temps d'incubation de 5 h et 10 h, la longueur moyenne des filaments est plus importante à une concentration en connecteurs de 50 nM qu'à 100 nM et 200 nM. En complément, la longueur moyenne des filaments est inférieure à 100 nM en connecteur qu'à 50 nM entre 1 h et 10 h. Cela signifie qu'une concentration en connecteurs trop importante entraîne un blocage cinétique de la polymérisation des filaments.



**Figure II-18 : Longueurs moyennes des microfilaments en fonction du temps d'incubation à 37°C et avec 50 nM et 100 nM en connecteurs.**

Partant de ces différentes observations, nous avons réalisé des incubations sur des temps supérieurs à 10 h (24 h et 30 h) avec un faible excès en connecteurs (50 nM) et à 37°C. Après observation au TEM (Figure II-19) et la mesure de la longueur des filaments (Figure II-20), nous observons un ralentissement et une stagnation de leur croissance. Leur longueur moyenne est cependant supérieure à 1 µm.



**Figure II-19 : Images TEM des filaments sans Poly-T après une incubation à 37°C pendant 1h (A), 2h (B), 5h (C), 10h (D), 24h (E), 30h (F) avec 50 nM en connecteurs.**

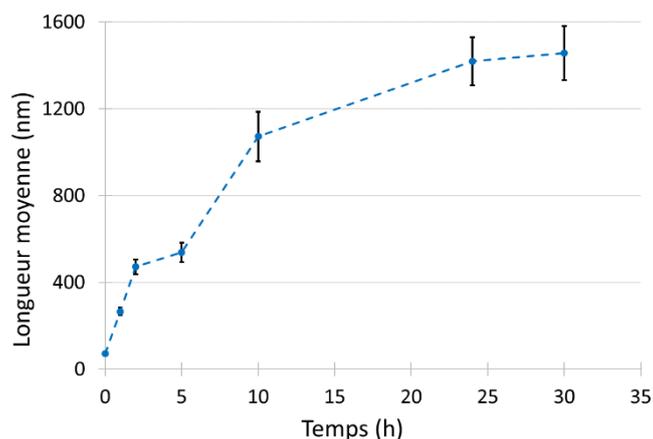


Figure II-20 : Mesure des filaments après différents temps d'incubation à 37°C.

#### ❖ Influence de la température d'incubation et de la concentration en $MgCl_2$

Dans le but d'améliorer l'assemblage des filaments, la concentration en  $MgCl_2$  et la température lors de l'étape d'incubation ont été modifiées. Les incubations ont été réalisées à **25°C et 30°C pendant 12 h et 15 h** avec les monomères avec une torsion de **10,5 pb/tour**. La concentration de ces derniers est de **2 nM** ici. Les images TEM (Figure II-21) nous montrent que la diminution de la température a entraîné le ralentissement de la cinétique de croissance des filaments. Cela est confirmé par la mesure de la longueur moyenne des filaments (Figure II-22). En effet, nous observons des petits filaments inférieurs à 350 nm à 25°C et 30°C et des filaments supérieurs à 1  $\mu m$  à 37°C.

**Les variations de concentration en  $MgCl_2$**  ont, elles, été réalisées en utilisant les monomères avec un paramètre de **10,34 pb/tour**.

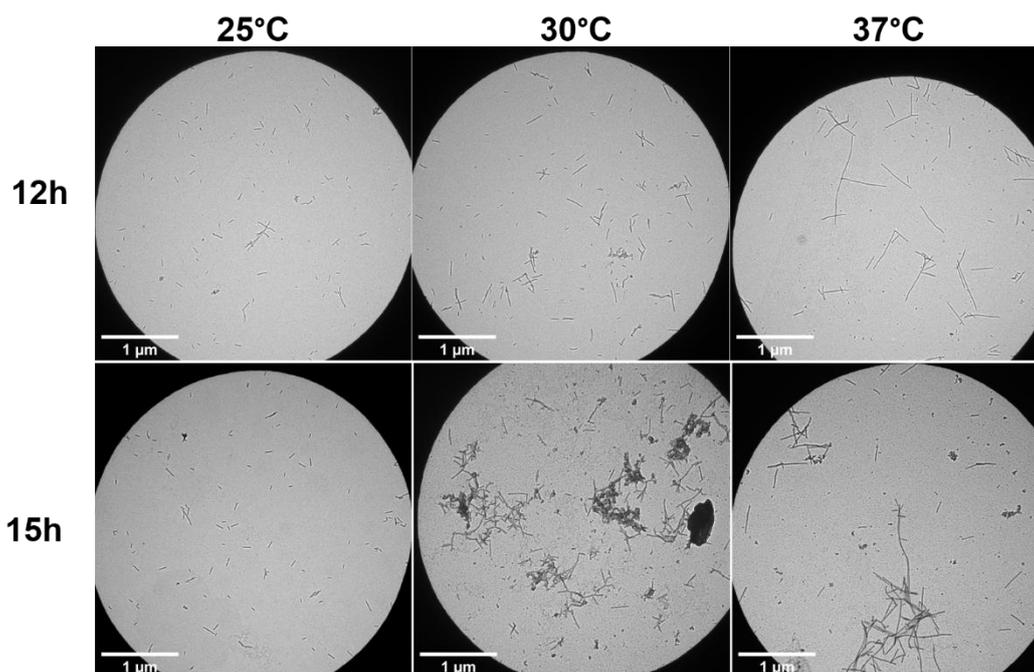


Figure II-21 : Images TEM des filaments 10,5 pb/tour sans Poly-T après une incubation à 25°C, 30°C et 37°C pendant 12h et 15h.

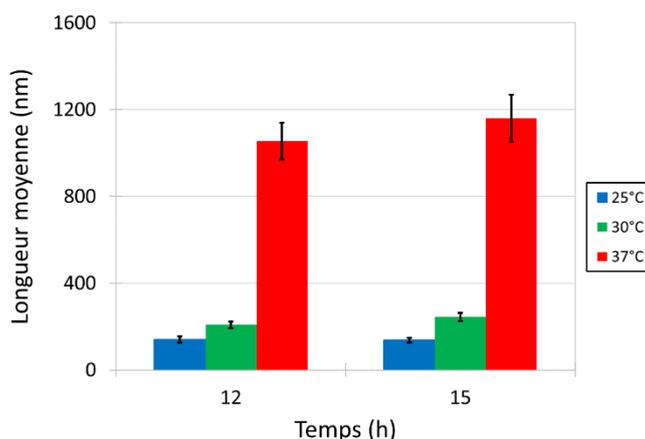


Figure II-22 : Longueurs moyennes des microfilaments en fonction de la température d'incubation.

Le gel d'agarose présenté sur la Figure II-23 montre que l'augmentation de la concentration en ions magnésium augmente la cinétique de formation des filaments. En effet, à partir d'une heure d'incubation pour des concentrations en  $MgCl_2$  supérieures ou égales à 20 mM, nous n'observons pas de trainées. Cependant, en observant les images TEM (Figure II-24), nous remarquons que l'échantillon incubé pendant 5 h avec 25 mM de  $MgCl_2$  et celui incubé pendant 2 h avec 20 mM de  $MgCl_2$  présentent des filaments enchevêtrés les uns aux autres. L'augmentation de la concentration en  $MgCl_2$  favorise les interactions ADN-ADN dans la solution ce qui entraîne l'augmentation de la cinétique d'assemblage

des filaments. Dans le même temps, cela favorise aussi les interactions entre les filaments et donc leur agrégation et leur enchevêtrement.

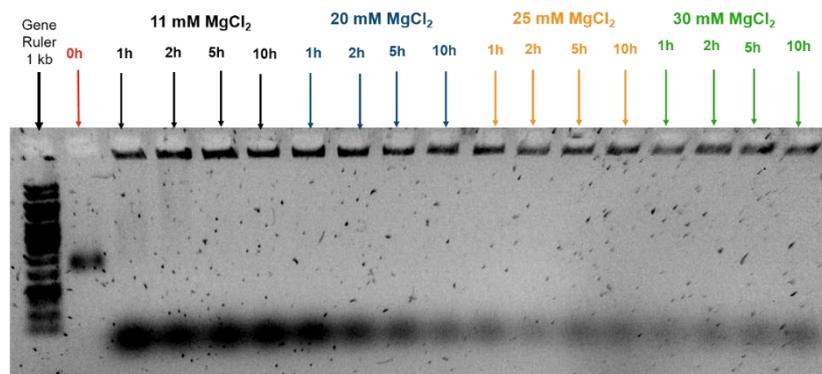


Figure II-23 : Gel d'agarose à 1% des monomères 10,34 bp/tour incubés à 37 °C avec une variation de la concentration en  $MgCl_2$  et du temps d'incubation.

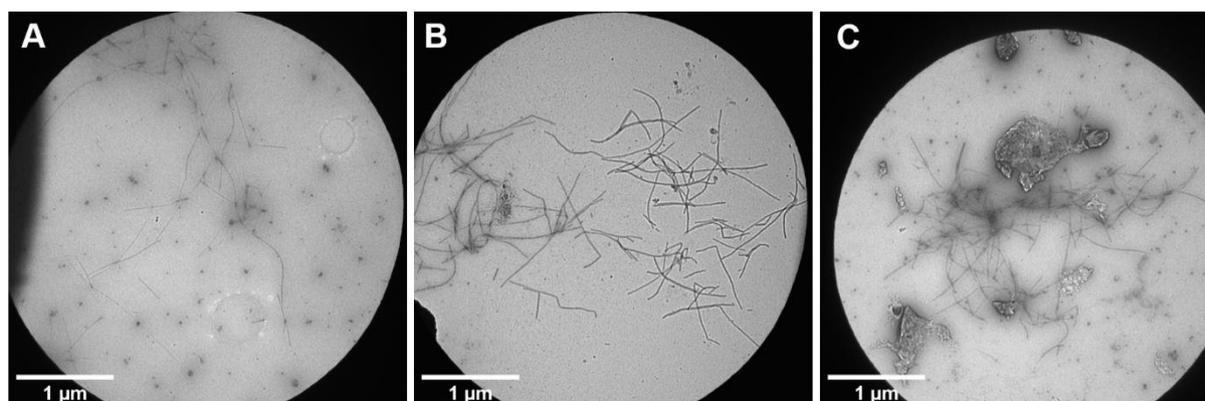


Figure II-24 : Images TEM des filaments 10,34 bp/tour. A) Incubation pendant 5 h avec 11 mM  $MgCl_2$ . B) Incubation pendant 5 h avec 25 mM  $MgCl_2$ . C) Incubation pendant 2 h avec 30 mM  $MgCl_2$ .

### ❖ Synthèse

En conclusion, nous avons mis en évidence que cette méthode de polymérisation en deux étapes est la plus adaptée pour nos applications. En effet, la purification des monomères avant l'étape de polymérisation permet de limiter le taux de brins libres en excès dans les échantillons.

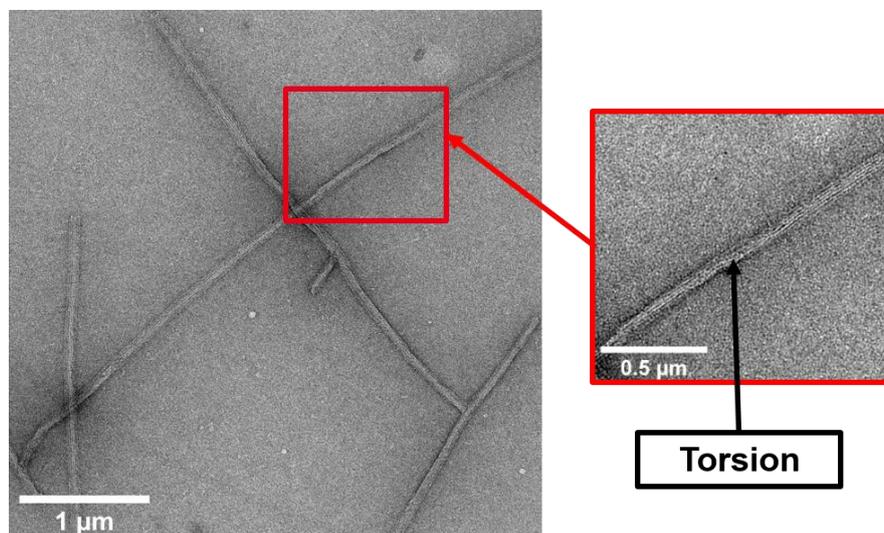
Dans cette partie nous avons mis en évidence l'influence de différents paramètres (concentration en connecteurs, temps d'incubation, température d'incubation, concentration en  $MgCl_2$ ). Ainsi, nous pouvons conclure sur le fait que :

- **L'augmentation de la concentration en connecteurs** favorise l'augmentation du taux de brins libres dans les échantillons mais aussi l'agrégation et une légère baisse de la cinétique de polymérisation des filaments.

- **La hausse du temps d'incubation** permet de former des filaments de plus en plus longs. Pour des temps d'incubation inférieurs à 10 h, la taille moyenne des filaments évolue linéairement avant un ralentissement et une stagnation à partir de ce temps. Nous avons pu former des filaments de plus de 1  $\mu\text{m}$  à 24 h et 30 h d'incubation.
- **La température d'incubation** a aussi une influence sur la taille des filaments. En effet, plus la température est faible et plus la cinétique de polymérisation est faible. Pour former des filaments de l'ordre du micromètre, il est nécessaire de travailler avec une température « assez élevée » soit 37°C dans notre cas.
- **L'augmentation de la concentration en  $\text{MgCl}_2$**  favorise l'écrantage des charges négatives du squelette phosphate de l'ADN et donc l'agrégation des filaments même si ces derniers semblent assez longs en présence de 25 mM et de 30 mM de  $\text{MgCl}_2$ . La meilleure solution est donc de rester à une concentration de 11 mM en  $\text{MgCl}_2$ .

### II.1.3.3 Suppression des torsions indésirables des monomères

Comme évoqué dans la partie précédente, une légère torsion est présente dans la structure du monomère (Figure II-7). Cela induit la présence de plusieurs torsions dans la structure des filaments (Figure II-25).



**Figure II-25 : Images TEM des filaments 10,5 pb/tour après une incubation de 24h à 37°C. Exemple de torsion au sein des filaments.**

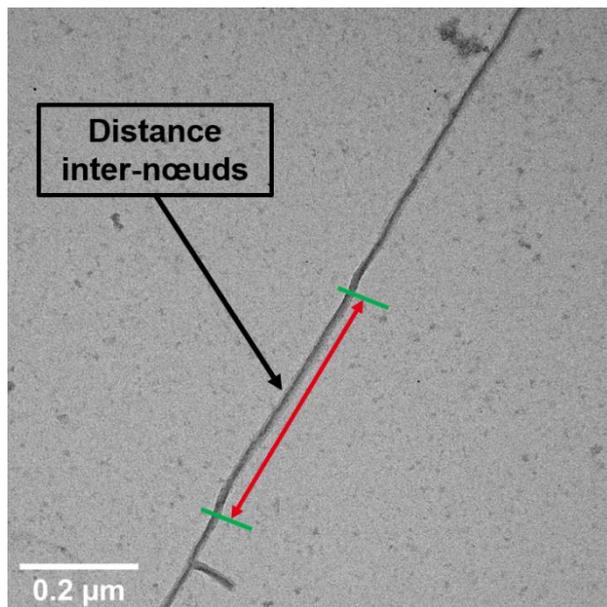


Figure II-26 : Méthode de mesure de la distance inter-nœuds des filaments.

Afin de caractériser la fréquence de torsion des filaments, la distance moyenne entre deux nœuds consécutifs a été mesurée (Figure II-26 et Figure II-27). Cette dernière a une valeur moyenne de  $429 \pm 15$  nm. En considérant le fait que la rotation par paire de bases de l'ADN-B est de  $34,3^\circ$  et que la longueur d'une base est de 0,34 nm. Il est possible de remonter à la valeur de la torsion globale par tour d'hélice. Cette dernière est de  $4,25 \pm 0,07^\circ$ .

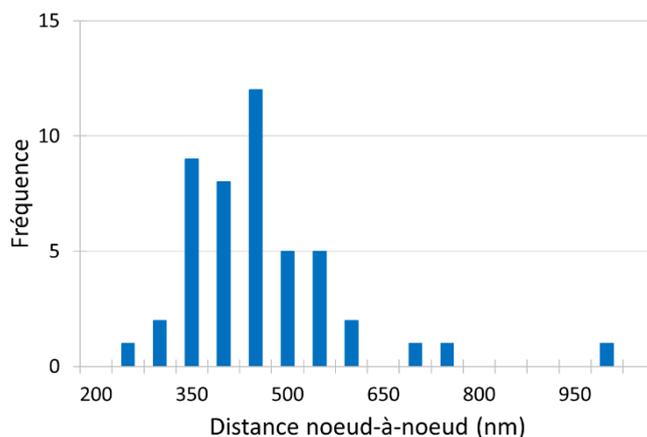


Figure II-27 : Histogramme des distances nœud-à-nœud des filaments 10,5 pb/tour.

Notre objectif a été d'éliminer ces torsions indésirables afin d'avoir des monomères et des filaments droits pouvant être utilisés en cryo-TEM et pour la gravure. Ces torsions pourraient induire des irrégularités ou des défauts lors du processus de transfert dans le silicium, d'où la nécessité de les supprimer.

Afin de compenser cette torsion, il est nécessaire de supprimer des paires de bases dans la structure des monomères. Pour ce faire, nous avons considéré un fragment de double hélice composé de 6 tours d'hélice avec un paramètre de 10,5 pb/tour. L'objectif était donc de calculer le nombre de paires de bases à supprimer afin de permettre d'arriver à un paramètre de 10,34 pb/tour.

Le calcul permettant de connaître le nombre de paires de base à supprimer est donc le suivant :

- $10,5 \times 6 = 63$  pb.
- $10,34 \times 6 = 62$  pb.
- Nombre de paires de base à supprimer =  $63 - 62 = 1$  pb.

Ainsi, il est nécessaire de supprimer une paire de bases toutes les 63 paires afin de passer d'un paramètre de 10,5 pb/tour à un paramètre de 10,34 pb/tour, et ainsi de supprimer la torsion indésirable de la structure. Cela nous a amené à la réalisation de trois zones de suppressions de paires de base le long de la structure (Figure II-28). Nous avons aussi ajouté une double hélice supplémentaire dans la structure afin de compenser le manque de bases et d'atteindre 7560 pb (taille du brin échafaudage). La modélisation associée (Figure II-29) permet de montrer que nous avons bien supprimé la torsion indésirable. De plus, elle nous indique que le RMSF minimum est de 0,15 nm, le RMSF à 95% est de 0,88 nm et le RMSF maximum est de 1,96 nm.

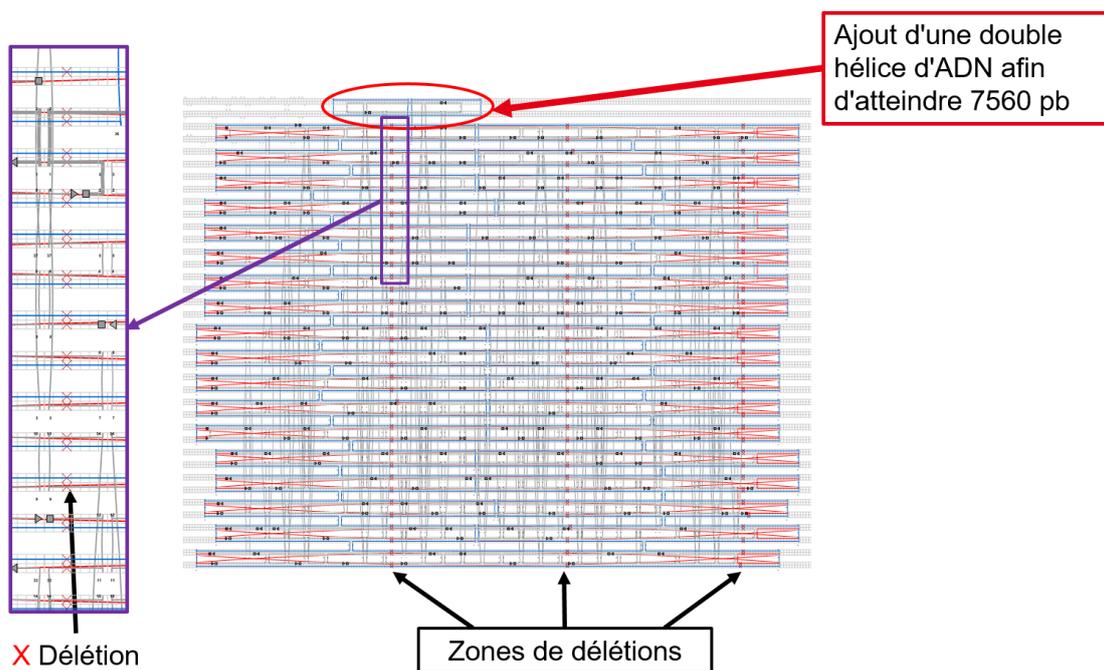
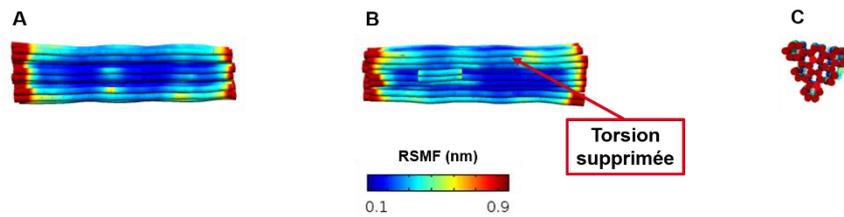
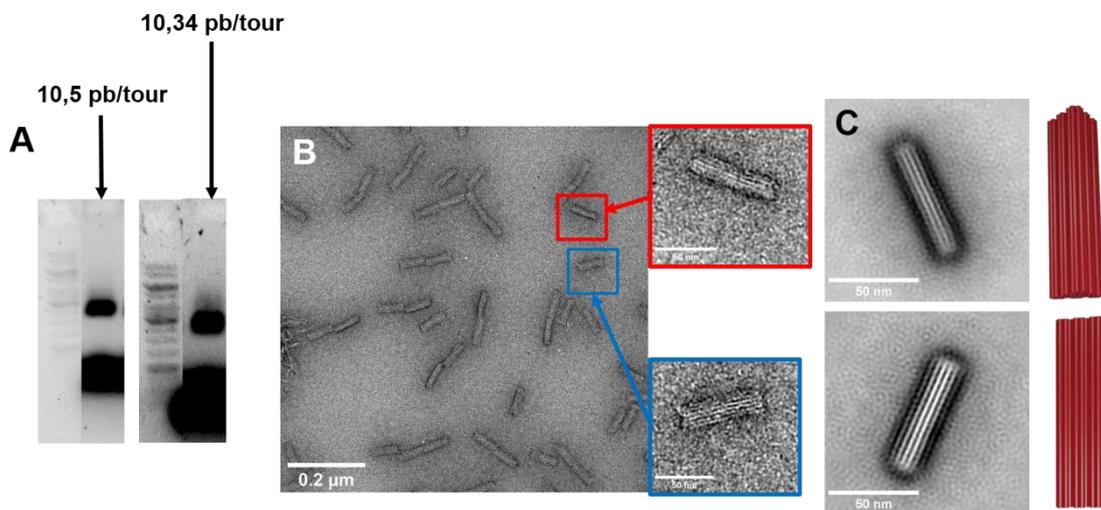


Figure II-28 : Structure CaDNAno du Tobliérone de paramètre 10,34 pb/tour.



**Figure II-29 : Modélisations CanDO du Toblérone 10,34 pb/tour. A) Vue de côté, Vue de haut. C) Vue de la face triangulaire.**

La synthèse des nouvelles nanostructures a été réalisée avec 18 mM en  $MgCl_2$  et avec une rampe en température de  $2h/^\circ C$  comme dans le cas du Toblérone de paramètre 10,5 pb/tour.



**Figure II-30 : A) Gels d'agarose des monomères 10,5 pb/tour et de 10,34 pb/tour. B) Image TEM des monomères 10,34 pb/tour auto-assemblés à  $2h/^\circ C$  en présence de 18 mM  $MgCl_2$  (B). C) Classifications 2D des monomères.**

L'image TEM des monomères (Figure II-30) nous permet de confirmer la bonne suppression de la torsion dans la structure simulée avec CanDO (Figure II-29).

Enfin un test d'assemblage a été réalisé à une température de  $37^\circ C$  pendant environ 20 h. L'image TEM des filaments obtenus se trouve sur la Figure II-31.

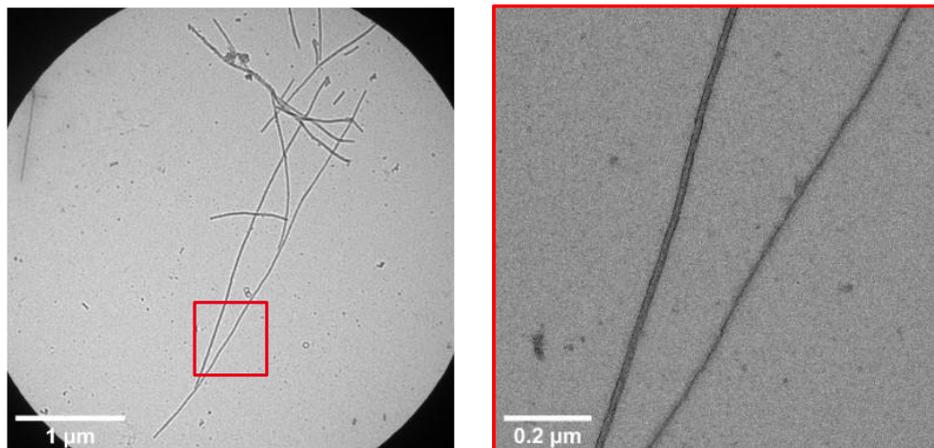


Figure II-31 : Images TEM des filaments 10,34 pb/tour après une incubation de 20 h à 37 °C.

### ❖ Synthèse

En conclusion, nous avons pu compenser la torsion présente au sein des monomères en supprimant des paires de bases dans leurs structures. Nous sommes passés d'un paramètre de 10,5 pb/tour à 10,34 pb/tour pour les monomères. Cette suppression a ainsi permis la disparition des torsions présentes dans les filaments permettant, ainsi, d'envisager leur utilisation dans des procédés lithographiques ou en gravure. Cette méthode pourra être utile pour les autres types de structures que nous souhaitons réaliser.

## II.1.3.4 Conclusion et perspectives

### II.1.3.4.1 Conclusion

Dans cette partie nous avons mis en place une méthode de polymérisation « en deux étapes » de monomère en forme de prisme triangulaire en exploitant la méthode de l'appariement de base. Lors de la synthèse et la caractérisation des monomères de paramètre 10,5 pb/tour d'hélice, nous avons observé une torsion au sein de leur structure, préalablement simulés grâce à CanDO. Elle se retrouve aussi dans la structure des filaments. Un autre design a été fait en réalisant trois zones de suppression de paires de bases afin de passer à un paramètre de 10,34 pb/tour et supprimer cette torsion.

Pour la polymérisation des microfilaments, l'influence de différents paramètres a été étudiés :

- La concentration en connecteurs,
- Le temps d'incubation,
- La température d'incubation,
- La concentration en  $MgCl_2$ .

Dans un premier temps, nous avons observé que plus la concentration en connecteurs est élevée et plus la croissance des filaments est défavorisée. De plus nous observons aussi que cette augmentation a entraîné la présence d'une forte présence de brins libres en excès dans les échantillons. La concentration la plus adaptée est de 50 nM en connecteurs pour une température de 37 °C. Dans ce cas, nous avons pu obtenir des filaments de plus de 1 µm pour des temps d'incubation compris entre 10 h et 30 h.

Concernant la température d'incubation, seule la température de 37 °C nous a permis de former des filaments de plus de 1 µm pour une gamme comprise entre 25 °C et 37°C.

Enfin, dans le cas de la concentration en MgCl<sub>2</sub>, nous avons observé que plus elle est importante et plus nous favorisons l'agrégation des microfilaments lors de la polymérisation. Il est donc préférable de travailler avec une concentration de 11 mM en MgCl<sub>2</sub>.

Ainsi, pour obtenir des filaments de bonne qualité de plus de 1 µm, nous avons décidé de réaliser les incubations en présence de 50 nM en connecteurs à 37 °C pendant plus de 24 h et en présence de 11 mM en MgCl<sub>2</sub>.

#### II.1.3.4.2 Perspectives

En dehors de la microélectronique et de la lithographie, une des applications visées est la préparation de grilles de cryo-TEM pour l'imagerie à haute résolution de protéines. Pour cela, nous avons mis en place un protocole de préparation d'échantillons de cryo-TEM (Figure II-32). Ce dernier se compose de plusieurs étapes :

- La première étape consiste à former les filaments à une température de 37°C pendant 20h à 30 h.
- La deuxième étape consiste à déposer les filaments en origami d'ADN sur la grille de cryo-TEM.
- Après une incubation des filaments sur la grille de cryo-TEM pendant 5 min à température ambiante vient l'étape de dépôt des protéines sur la grille. Dans notre cas, la protéine est une protéine membranaire nommée CXCR4. La protéine CXCR4 est un récepteur membranaire de la protéine CXCL12. Cette dernière intervient dans la réponse immunitaire.
- Enfin, après une nouvelle incubation de 5 min à température ambiante, la grille est plongée dans un bain d'éthane liquide afin de permettre sa vitrification.

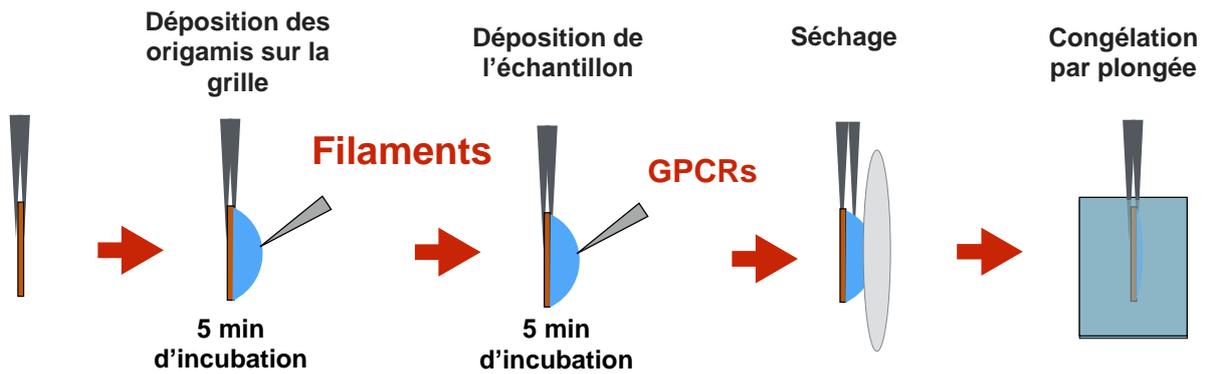


Figure II-32 : Protocole de dépôt des origamis d'ADN et des protéines GPCRs sur les grilles de cryo-TEM.

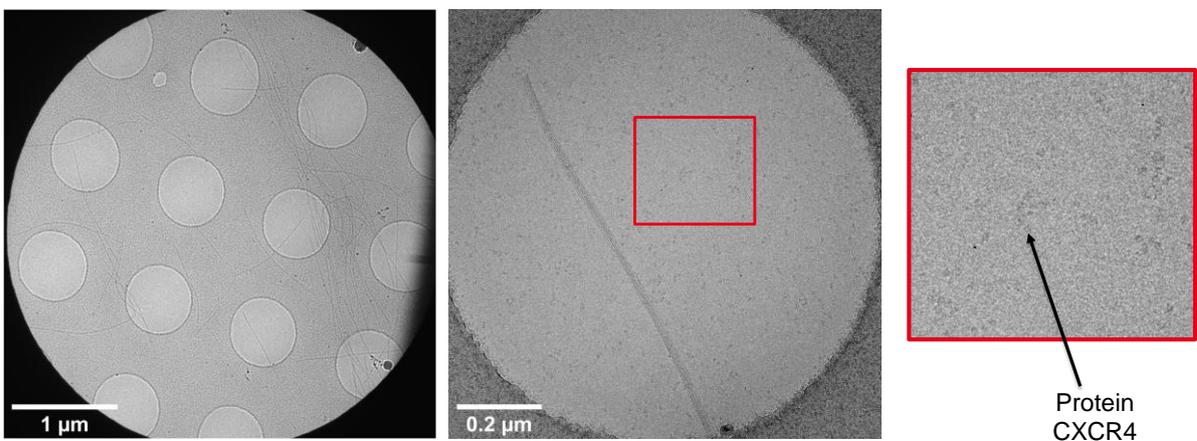


Figure II-33 : Images de cryo-TEM des Filaments d'ADN et des protéines CXCR4 déposés sur une grille R0.6.

Les images de cryo-TEM présentées sur la Figure II-33 présentent les résultats obtenus avec le protocole de préparation d'échantillons mis en place. Nous pouvons remarquer que les protéines sont réparties de façon homogène dans les trous de la grille. De plus, nous n'observons pas d'agrégation des protéines sur le bord des trous. Les filaments en origamis d'ADN ont ainsi permis d'empêcher la formation du ménisque lors de l'étape de vitrification.

Dans un second temps, nous avons procédé à l'acquisition de centaines d'images dans l'objectif de réaliser des classes 2D des protéines sur un grand nombre de protéines. Le résultat de cette étape est présenté sur la Figure II-34. A partir de ces classes 2D nous avons pu modéliser la structure 3D de la protéine. Cette dernière est en forme d'ellipsoïde. Les vues rondes mesurent environ 10 nm et les vues allongées environ 14 nm de diamètre.

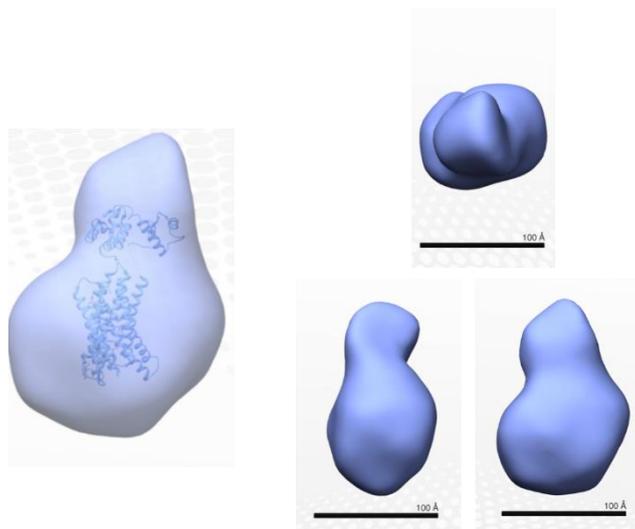


Figure II-34 : Modélisation 3D de la protéine CXCR4.

La protéine imagée possède une structure ellipsoïdale avec une densité additionnelle. L'objet complet possède des dimensions de 10 nm x 14 nm et 520 kDa. La partie micellaire a un poids moléculaire de 380 kDa et une densité supplémentaire de 140 kDa.

En conclusion, cette méthode semble être adaptée afin de permettre la bonne répartition des protéines lors de la préparation des grilles de cryo-TEM. En effet, elle semble garantir la bonne qualité de la glace formée en empêchant la formation de ménisques.

## II.1.4 Auto-assemblage par complémentarité de forme de suprastructures d'ADN

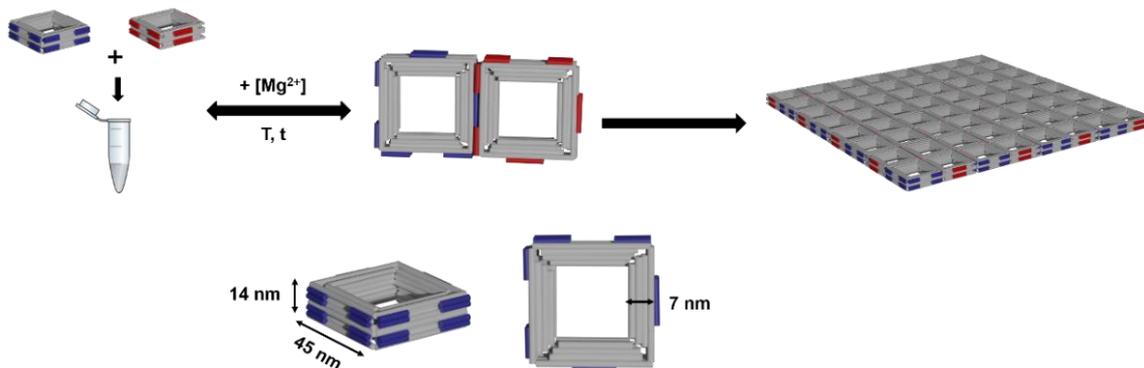
### II.1.4.1 Design, synthèse, purification et auto-assemblage d'un réseau 2D en origamis d'ADN

Pour rappel, nous souhaitons réaliser un masque de gravure en origamis d'ADN (Figure II-35) afin de créer des réseaux 2D de qubits sur silicium. Pour y parvenir, nous avons mis en place deux nanostructures monomères en forme de carrés pouvant se polymériser par complémentarité de forme (Interaction faible réversible) grâce à l'ajout de  $Mg^{2+}$  ou à la diminution de la température d'incubation.

Les dimensions des monomères ont été déterminées après des discussions avec le Département Composants Silicium (DCOS) du CEA-LETI. En effet, afin de permettre de bonnes performances de calculs et de correction d'erreurs, les qubits sur silicium doivent avoir des dimensions avec une faible variabilité. Dans la modélisation de leur procédé de conception, les qubits ont une période de 80 nm, une dimension critique de 20 nm et une épaisseur comprise entre 10 nm et 15 nm.

Les valeurs de période et de dimension critique ont été déterminées du fait des limites dimensionnelles imposées par les méthodes de lithographie. En utilisant des origamis d'ADN, il est possible de créer des structures avec des périodes plus faibles. Dans notre cas, les dimensions ciblées des deux monomères seront les suivantes :

- Epaisseur : 14 nm,
- Longueur des côtés : 45 nm,
- Dimension critique : 7 nm (Afin d'avoir une dimension critique de 14 nm pour les réseaux 2D)



**Figure II-35 : Modélisation 3D des deux monomères complémentaires pouvant se polymériser afin de former des réseaux 2D par auto-assemblage par complémentarité de forme.**

La première étape a eu pour objectif de réaliser le design des structures monomères grâce au logiciel CaDNAo 2 (Figure 0-1, Figure 0-2 et Figure 0-3).

#### II.1.4.1.1 Mise en place des structures monomères

Lors de la première étape nous avons réalisé le design des structures monomères. Pour cela, nous avons décidé d'utiliser la méthode présentée par Wagenbauer *et al.* [37] (Figure II-36). Cette méthode est principalement basée sur la suppression de paires de bases dans les couches intérieures de l'angle du design. La longueur des segments supprimés doit être égale à un multiple entier de la répétition de la double hélice soit environ 10,5 pb. Cette longueur doit correspondre à la distance entre la couche pliée et la couche la plus extérieure divisée par la tangente de la moitié de l'angle de pliage souhaitée [37]. La longueur de suppression est dépendante du diamètre hélicoïdal.

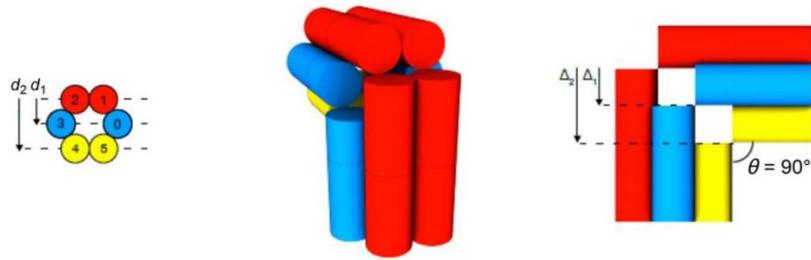


Figure II-36 : Méthode de réalisation d'angles dans le cas d'un réseau en nid d'abeille à six hélices <sup>[37]</sup>.

La Figure II-36 présente le schéma de principe de la méthode permettant la création d'angles dans la structure d'origamis d'ADN dans le cas d'un faisceau à six hélices. En considérant la distance de pliage  $d_i$  entre les doubles hélices d'ADN adjacentes,  $\Delta_i$  correspond au nombre d'hélices devant être supprimées afin d'obtenir l'angle visé. Le calcul à réaliser est le suivant :

$$\Delta_i = \frac{d_i}{\tan(\frac{\theta}{2})}$$

Avec  $\theta$  l'angle désiré.

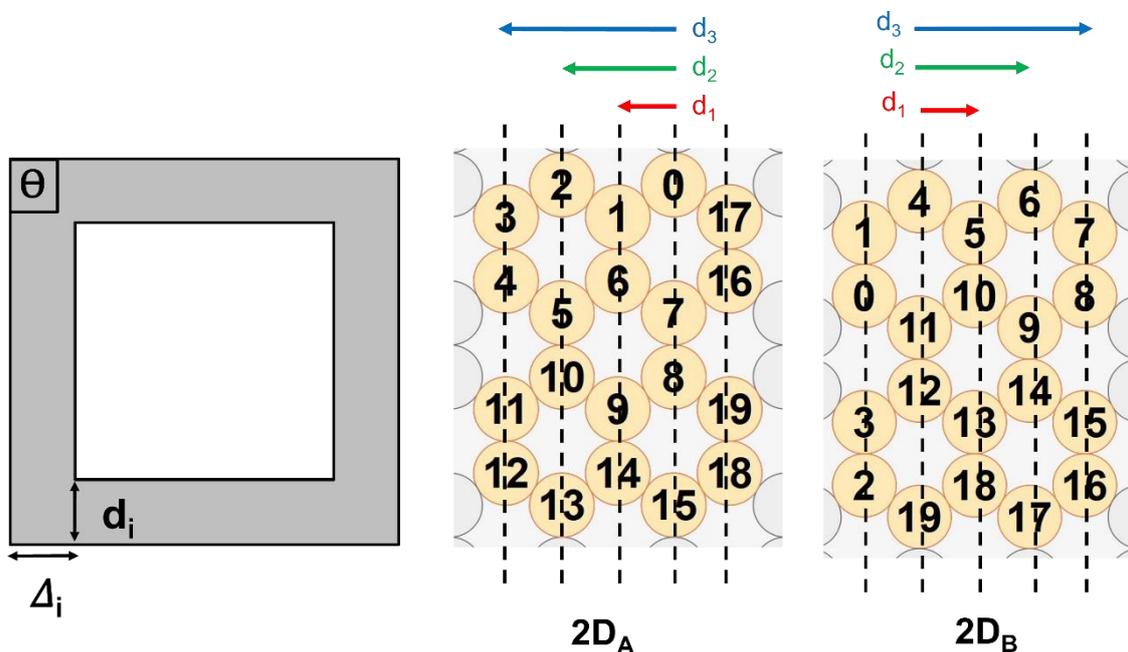


Figure II-37 : Méthode de création d'angle adaptée aux deux types de monomères carrés.

Dans le cas de nos nanostructures, nous souhaitons réaliser le pliage suivant le plan des hélices 0, 7, 8 et 15 pour  $2D_A$  et 6, 9, 14, 17 pour  $2D_B$  et  $2D_{BV2}$  (Figure II-37). Dans la méthode présentée par Wagenbauer *et al* <sup>[37]</sup>, la distance entre deux hélices considérées est de 2,6 nm. Pour des raisons de design, nous avons considéré que la distance entre deux hélices adjacentes  $d_1$  est de 2 nm. Ainsi nous obtenons :

- $d_1 = 2$  nm,
- $d_2 = 4$  nm,
- $d_3 = 6$  nm.

Soit pour un angle de  $90^\circ$ ,

- $\Delta_1 \approx 6$  pb,
- $\Delta_2 \approx 12$  pb,
- $\Delta_3 \approx 18$  pb.

En suivant le protocole de création d'angles précédemment cité, nous avons réalisé deux monomères de forme carrés complémentaires de forme nommés  $2D_A$  et  $2D_B$  (Figure 0-1 et Figure 0-2 respectivement). Ces deux structures sont composées de 524 paires de base soit 178 nm au total ou encore environ 131 paires de base de côté soit environ 45 nm. Elles possèdent aussi un système de protubérances et de cavités (Figure II-38). Les protubérances de  $2D_A$  s'insèrent dans les cavités de  $2D_B$  et vice-versa.

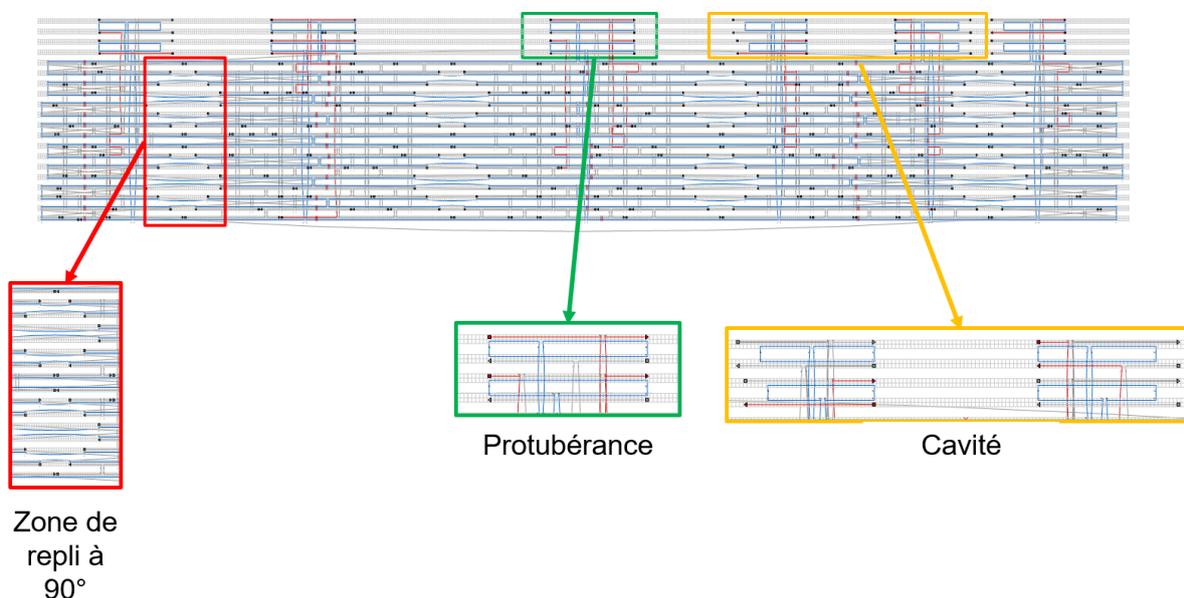


Figure II-38 : Structure CaDNANO du monomère  $2D_A$ .

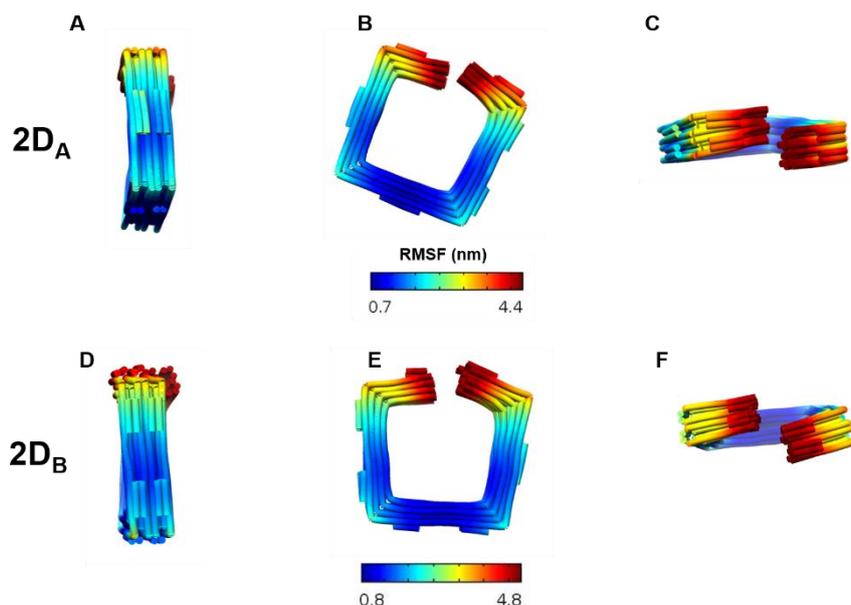


Figure II-39 : Modélisation CanDO des structures  $2D_A$  et  $2D_B$ .

D'après les modélisations CanDO des structures  $2D_A$  et  $2D_{BV2}$  (Figure II-39), nous obtenons les formes attendues. Les valeurs de RMSF sont présentées dans le Tableau II-1.

Type d'origami	RMSF minimum (nm)	RMSF à 95 % (nm)	RMSF maximum (nm)
$2D_A$	0,71	4,37	5,99
$2D_B$	0,75	4,79	6,56

Tableau II-1 : Valeurs de RMSF obtenues pour  $2D_A$  et  $2D_{BV2}$ .

La structure  $2D_B$  a été modifiée pour des raisons que nous détaillerons dans la partie II.1.4.1.2. Elle sera nommée  $2D_{BV2}$ .

#### II.1.4.1.2 Auto-assemblage des monomères $2D_A$ , $2D_B$ et $2D_{BV2}$

Afin de réaliser les monomères, nous avons procédé comme dans le cas des filaments avec la réalisation de tests d'assemblage avec différents programmes en température (1 h/°C ; 2 h/°C ; 3 h/°C) et différentes concentrations en  $MgCl_2$  (12 mM ; 14 mM ; 16 mM ; 18 mM ; 20 mM). La seule différence est la longueur du brin échafaud utilisé. En effet, ici, nous utiliserons un simple brin appelé « p8064 » composé de 8064 bases.

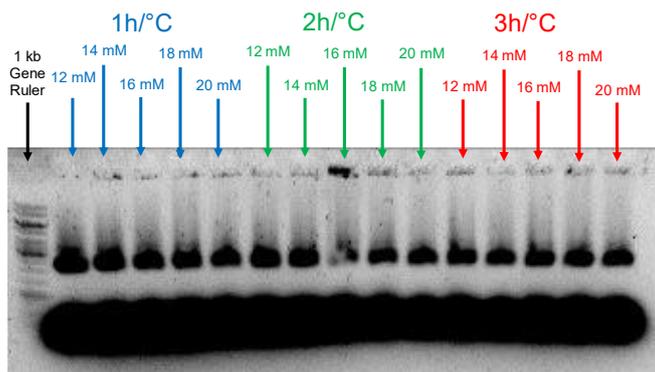


Figure II-40 : Gel d'agarose à 1% des monomères 2D<sub>A</sub>.

D'après le gel d'agarose sur la Figure II-40, nous remarquons que toutes les conditions en température et en MgCl<sub>2</sub> semblent être idéales pour la réalisation de l'assemblage de la structure 2D<sub>A</sub>. Afin de valider cette observation, nous avons observé au TEM la condition à 2 h/°C et 18 mM MgCl<sub>2</sub> (Figure II-41-A). Nous avons réalisé des classes 2D de la structure de 2D<sub>A</sub>. (Figure II-41-B). Cette dernière nous permet de contrôler les dimensions moyennes de l'origami d'ADN qui sont de :

- 12,3 ± 0,3 nm d'épaisseur,
- 47,7 ± 0,7 nm de côté,
- 7,9 ± 0,4 nm de dimension critique.

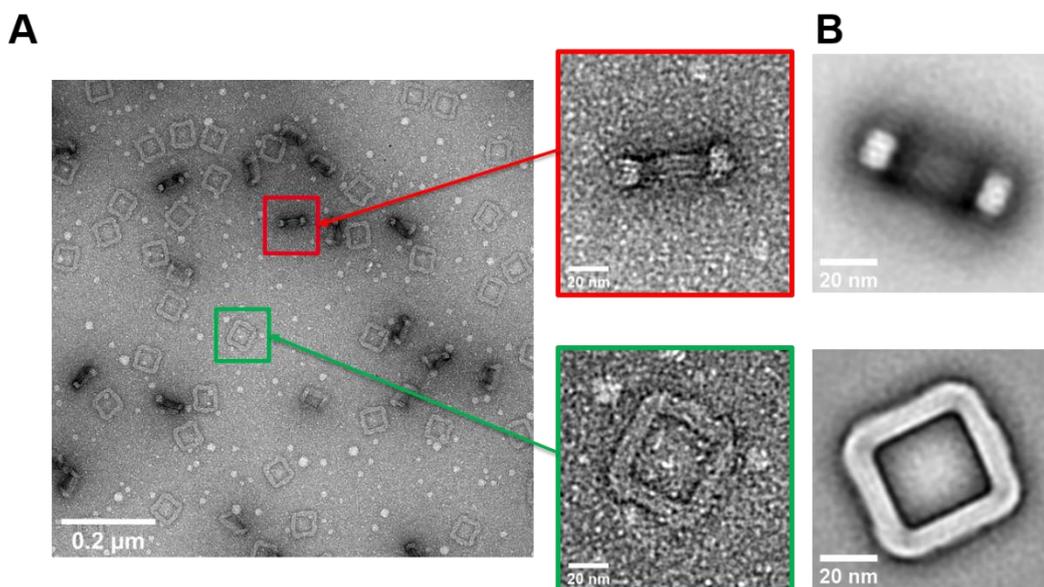


Figure II-41 : A) Images TEM de 2D<sub>A</sub> auto-assemblé à 2h/°C avec 18 mM MgCl<sub>2</sub>. B) Classes 2D de carrés 2D<sub>A</sub>.

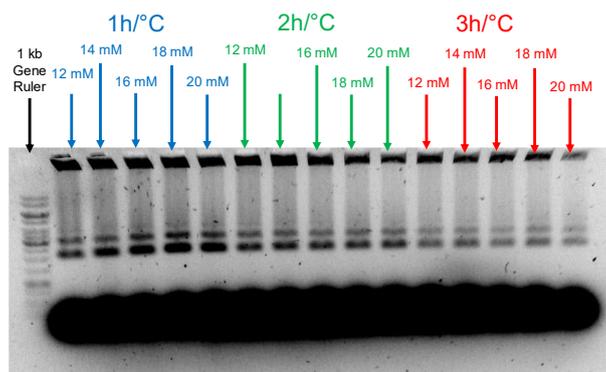


Figure II-42 : Gel d'agarose à 1% des monomères 2D<sub>B</sub>.

La synthèse de la structure 2D<sub>B</sub> (Figure II-42) génère beaucoup d'agrégats. En effet, de l'ADN est présent dans les puits du gel. Ces molécules d'ADN n'ont, en effet, pas migré à l'intérieur du gel du fait du phénomène d'agrégation. Nous observons aussi la formation de dimères pour chaque condition. La condition à 1 h/°C et 18 mM MgCl<sub>2</sub> a été observé au TEM (Figure II-43).

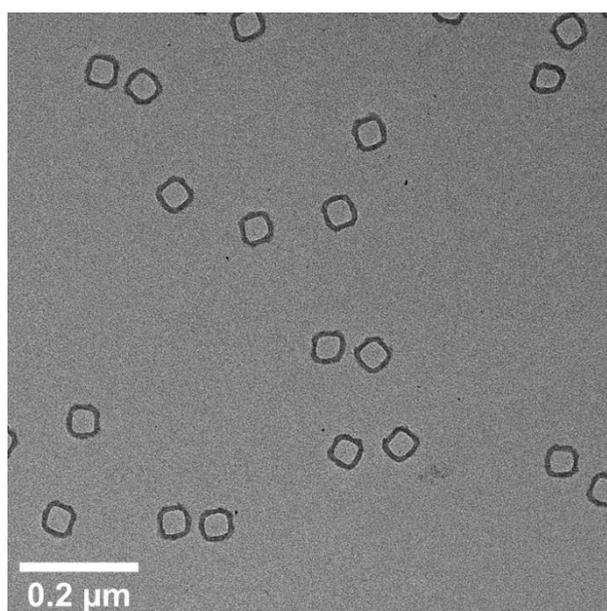


Figure II-43 : Images TEM de 2D<sub>B</sub> auto-assemblé à 1h/°C avec 18 mM MgCl<sub>2</sub>.

Pour limiter cette agrégation nous avons optimisé la longueur moyenne des brins agrafes composants la structure 2D<sub>B</sub> en ciblant **ceux proches des zones de courbures** (structure 2D<sub>BV2</sub>). Nous sommes donc passés d'une structure avec une taille moyenne de brins agrafes d'environ **39 paires de bases** (2D<sub>B</sub>) à une taille moyenne d'environ **33 paires de bases** pour la structure 2D<sub>BV2</sub>. (Figure II-44-A). Après simulation sur CanDO, nous remarquons que l'optimisation du design a une légère influence sur la stabilité de la structure. En effet, pour 2D<sub>B</sub>, le RMSF minimum est de 0,75 nm, le RMSF à 0,95% est de 4,79 nm et le maximum est de 6,56 nm. Dans le cas de 2D<sub>BV2</sub>, ces trois valeurs sont de : 0,64 nm

pour le RMSF minimum, 4,01 nm pour le RMSF à 0,95% et 5,61 nm pour le RMSF maximum (Figure II-44-B). Nous pouvons quand même signifier que

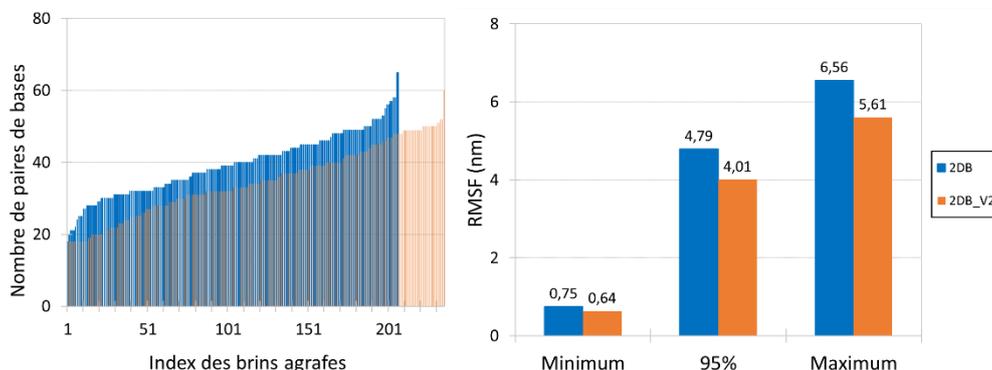


Figure II-44 : A) Histogrammes de taille des brins agrafes des monomères  $2D_B$  et  $2D_{BV2}$ . B) Histogramme des valeurs de RMSF des deux versions de monomères.

L'auto-assemblage de cette structure a été réalisé à  $2h/^\circ C$  et à différentes concentrations en  $MgCl_2$  (entre 12 mM et 20 mM). Le gel d'agarose est présenté sur la Figure II-45-A. Cette dernière nous permet d'observer que dans le cas de la structure  $2D_{BV2}$ , il n'y a pas de formation d'agrégats restant piégés dans les puits du gel. Cependant, nous observons toujours la formation de dimères. Des images TEM des monomères  $2D_{BV2}$  sont présentées sur la Figure II-45-B. La diminution des agrégats peut être liée à l'augmentation de la stabilité de la structure.

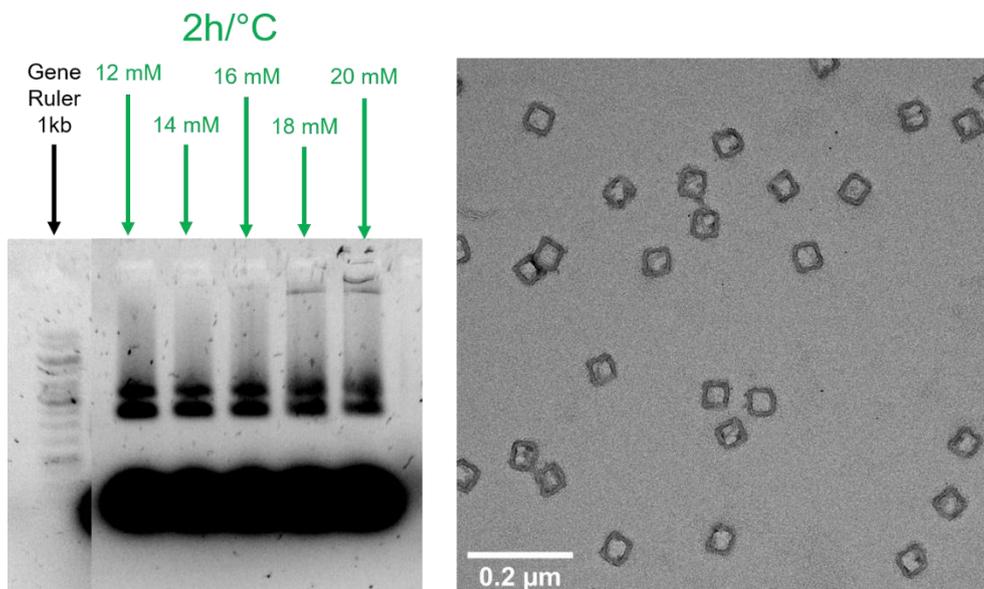


Figure II-45 : A) Gel d'agarose à 1% et Images TEM des monomères  $2D_{BV2}$  auto-assemblé à  $2h/^\circ C$  avec 18 mM. B) Image TEM des monomères.

### ❖ Synthèse

Nous avons réalisé l'assemblage des deux monomères complémentaires qui nous permettrons de former les réseaux 2D. Cela est possible grâce à un système de cavités et de récessions présent sur les deux monomères complémentaires. Ce système permettant leur assemblage complémentaire. Nous avons, de plus, modifier la séquence CaDNA<sub>no</sub> de la structure 2D<sub>B</sub> afin d'obtenir un meilleur assemblage des monomères (2D<sub>BV2</sub>). En diminuant la taille moyenne des brins agrafes et en ciblant ceux présents au niveau des angles, nous avons diminué la formation des agrégats lors de l'assemblage des monomères (disparition de la traînée dans le gel d'agarose). Pour donner suite à l'observation des résultats, nous avons décidé d'assembler les monomères 2D<sub>A</sub> et 2D<sub>BV2</sub> en présence de 18 mM de MgCl<sub>2</sub> et avec une rampe en température de 2 h/°C. Le monomère 2D<sub>B</sub> sera quant à lui assemblé à 1 h/°C.

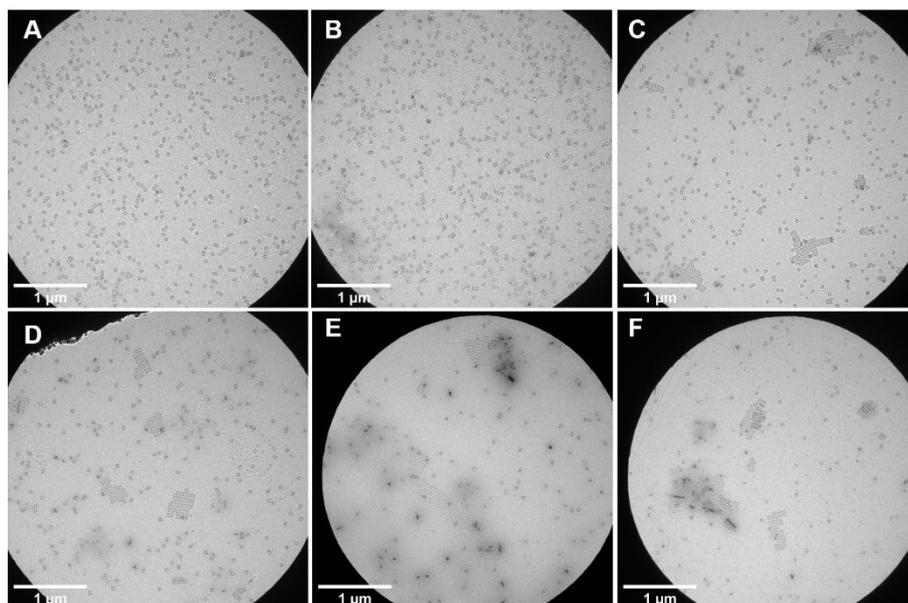
#### II.1.4.1.3 Auto-assemblage des monomères en réseaux 2D

Après la synthèse des monomères, notre objectif a été de réaliser l'assemblage des réseaux 2D en solution.

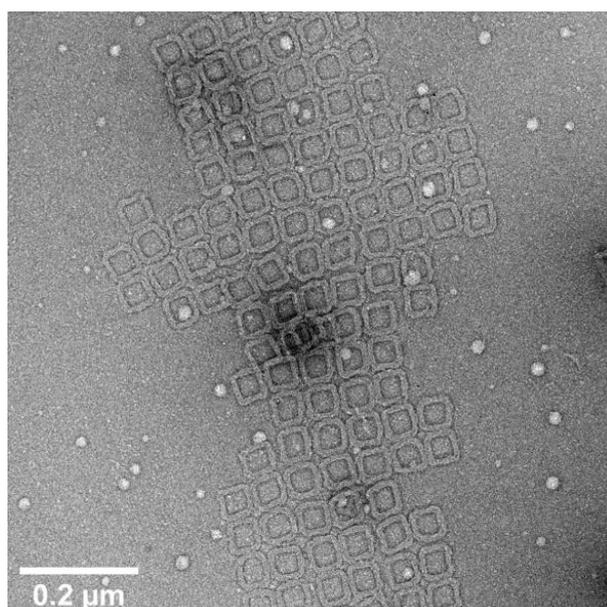
L'auto-assemblage par complémentarité de forme est dépendant de la concentration en cations (monovalents ou divalents) ou de la température du milieu réactionnel. En effet, la formation des assemblages hiérarchique dans ce cas est possible en augmentant la concentration en cations. A contrario il est possible d'avoir la réaction inverse en diminuant la concentration en cations ou en augmentant la température d'incubation (voir la section I.1.2.1.2).

### ❖ Influence de la concentration en MgCl<sub>2</sub>

Les premières expériences d'auto-assemblage ont été réalisées à l'aide des structures 2D<sub>A</sub> et 2D<sub>B</sub>. Afin d'y parvenir, les monomères ont été formés avec 18 mM en MgCl<sub>2</sub> et avec des rampes en température de 1 h/°C dans le cas de 2D<sub>B</sub> et 2 h/°C dans le cas de 2D<sub>A</sub>. Ensuite, l'étape de formation des réseaux 2D a été réalisée grâce à une incubation à 20 °C pendant 2 jours avec différentes concentrations en MgCl<sub>2</sub> (27 mM ; 35 mM ; 42 mM ; 50 mM ; 60 mM ; 70 mM). Tous les assemblages ont été réalisés avec une concentration de 1,6 nM pour chaque monomère.



**Figure II-46 : Images TEM des réseaux 2D formés à 20 °C pendant 2 jours avec différentes concentrations en  $MgCl_2$  : A) 27 mM ; B) 35 mM ; C) 42 mM ; D) 50 mM ; E) 60 mM ; F) 70 mM.**



**Figure II-47 : Image TEM d'un réseau 2D formé en présence de 60 mM en  $MgCl_2$  à 20 °C pendant 2 j.**

D'après la Figure II-46 et la Figure II-47, la concentration en  $MgCl_2$  a une influence sur la taille des réseaux formés au bout de deux jours d'incubation à 20 °C. En effet, plus la concentration en  $MgCl_2$  augmente et plus la taille des réseaux formés est importante. Nous passons d'un système exclusivement composé de monomères à 27 mM en  $MgCl_2$  à des réseaux de l'ordre du  $\mu m$  à partir de 50 mM en magnésium. L'aire moyenne des réseaux 2D a été mesurée pour chaque condition (Figure II-48 et Figure II-49). Ces mesures montrent l'évolution de la taille des réseaux en fonction de la

concentration en  $\text{MgCl}_2$ . Le paramètre mesuré augmente avec l'augmentation de la concentration en sels divalents. Cependant, il commence à se stabiliser et à stagner à partir d'une concentration de 50 mM en  $\text{MgCl}_2$ . Il y a donc un ralentissement de la croissance des réseaux 2D aux fortes concentrations en  $\text{MgCl}_2$  ( $> 50$  mM). Un exemple de réseau 2D formé à 60 mM de  $\text{MgCl}_2$  est présenté sur la Figure II-47.

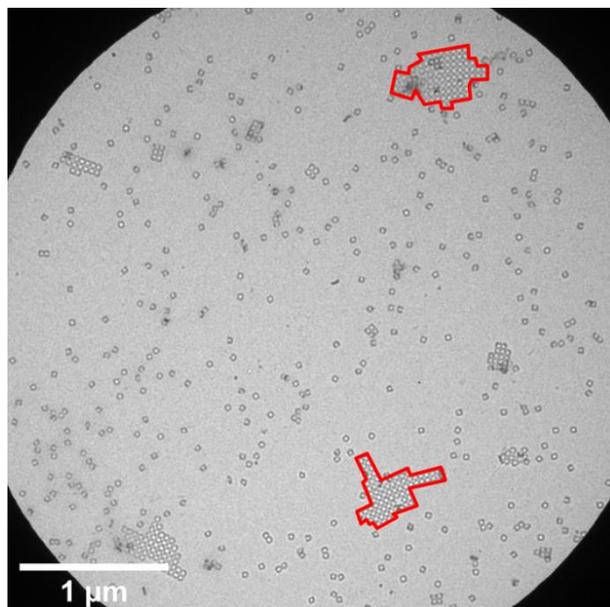


Figure II-48 : Exemple de mesure de l'aire des réseaux 2D.

**Remarque :** Afin de mesurer l'aire moyenne occupée par les réseaux 2D, les cavités présentes dans les monomères ne sont pas prises en compte. Les origamis sont donc considérés comme des carrés pleins.

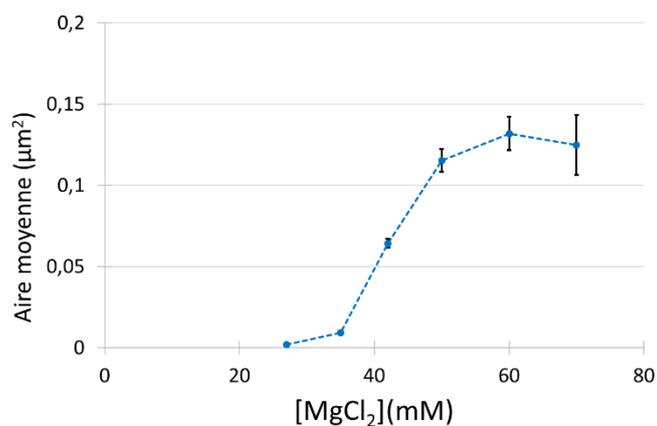
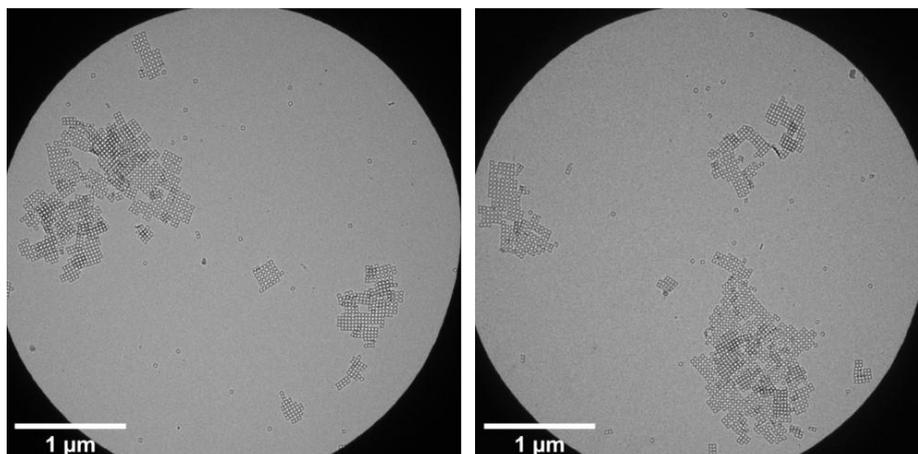


Figure II-49 : Evolution de l'aire moyenne occupé par les réseaux 2D en fonction de la concentration en  $\text{MgCl}_2$ .

Nous avons aussi vérifié l'efficacité de formation des réseaux 2D en utilisant cette fois la structure 2D<sub>BV2</sub>. Après une incubation de 48h en présence de 60 mM de MgCl<sub>2</sub> (Figure II-50)

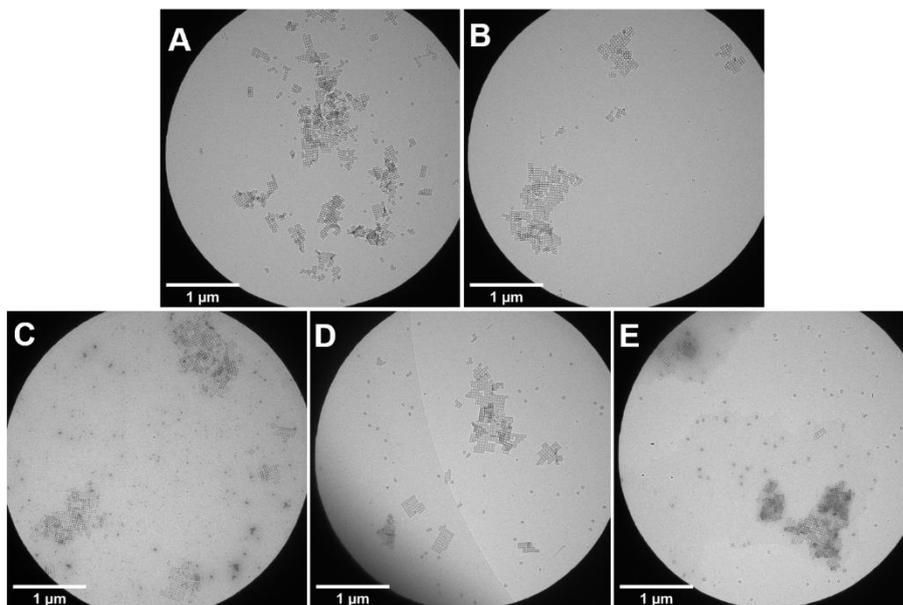


**Figure II-50 : Réseaux 2D formés avec les structures 2D<sub>A</sub> et 2D<sub>BV2</sub> à 20 °C pendant 2 jours avec 60 mM MgCl<sub>2</sub>.**

#### ❖ Influence du temps et de la température d'incubation

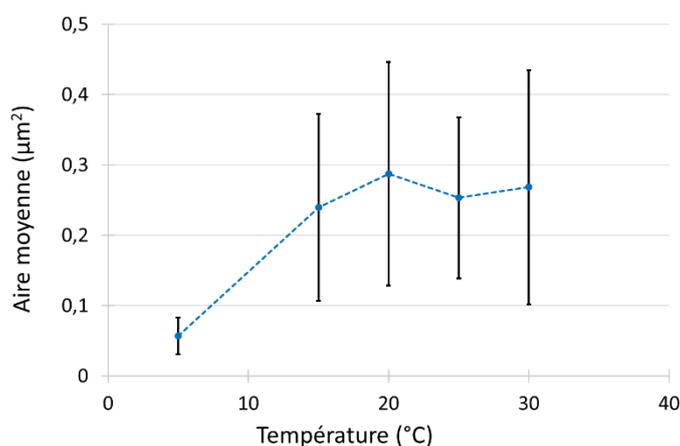
L'influence du temps d'incubation et de la température a aussi été étudiée. Concernant l'étude du temps d'incubation, les réseaux ont été assemblés en présence de 60 mM en MgCl<sub>2</sub> à 20 °C pendant 1 h, 2 h, 1 j, 2 j, 3 j et 18 j (Figure II-51).

Dans le cas de l'étude de l'influence de la température d'incubation, les réseaux 2D ont été assemblés pendant 3 j en présence de 60 mM de MgCl<sub>2</sub> à 5 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C et 30 °C (Figure II-53).

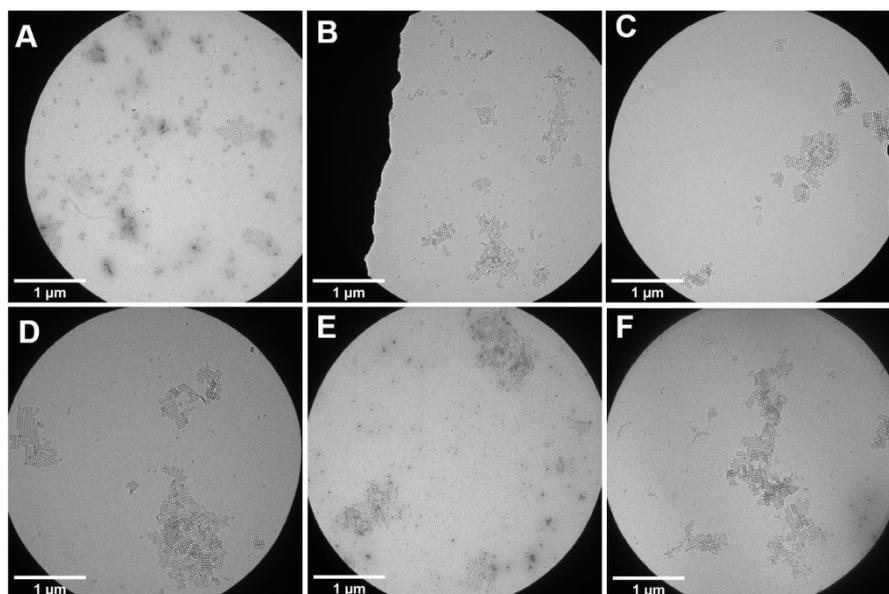


**Figure II-51 : Réseaux 2D formés avec les structures 2D<sub>A</sub> et 2D<sub>BV2</sub> à 5 °C (A), 15 °C (B), 20 °C (C), 25 °C (D) et 30 °C (E) pendant 3 jours avec 60 mM MgCl<sub>2</sub>.**

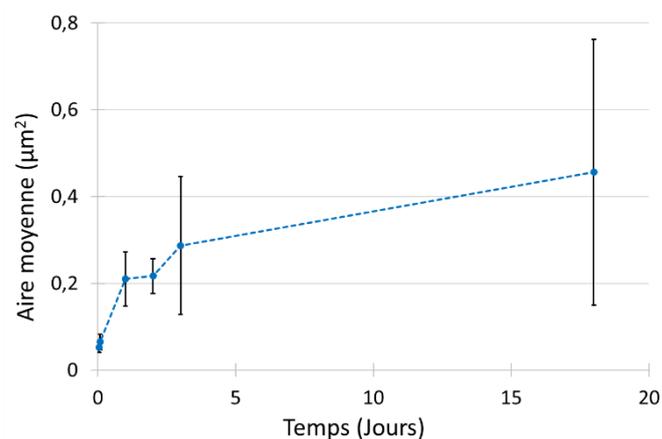
A 5 °C, nous observons des réseaux 2D de petites dimensions. Ces réseaux 2D sont de plus agrégés les uns aux autres. Avec l'augmentation de la température ( $\geq 15$  °C), nous pouvons aussi observer une augmentation de la dimension des réseaux 2D. Cela signifie qu'à faible température, la formation de nucléi est favorisée. Ces derniers vont ensuite s'assembler les uns aux autres. Pour des températures comprises entre 15 °C et 20 °C, l'aire moyenne des réseaux augmente puis stagne entre 20 °C et 30 °C (Figure II-52).



**Figure II-52 : Evolution de l'aire moyenne des réseaux 2D en fonction de la température d'incubation.**



**Figure II-53 : Réseaux 2D formés avec les structures  $2D_A$  et  $2D_{BV2}$  pendant 1h (A), 2h (B), 1j (C), 2j (D) et 3j (E) et 18j (F) avec 60 mM  $MgCl_2$ .**



**Figure II-54 : Evolution de l'aire moyenne des réseaux 2D en fonction du temps d'incubation.**

Les images TEM (Figure II-53) nous montrent que l'augmentation du temps d'incubation entraîne la formation de réseaux de plus en plus grands. De plus, nous observons que plus ce temps augmente et plus les réseaux semblent être agrégés entre eux. L'augmentation de leur taille est aussi validée par la mesure de l'aire moyenne des clusters (Figure II-54). Ainsi, nous remarquons que l'aire moyenne obtenue augmente linéairement avec le temps entre 1 h et 1 j et commence à ralentir pour des temps d'incubation de 2 j, 3 j et 18 j.

Nous avons donc mis en évidence l'influence de la concentration en  $MgCl_2$ , de la température et du temps d'incubation sur la formation des réseaux 2D. Concernant la concentration en  $MgCl_2$ , nous

avons montré que plus elle augmente et plus nous favorisons les interactions ADN-ADN et donc la formation des réseaux 2D par complémentarité de forme. En effet, pour des concentrations entre 27 mM et 35 mM en  $MgCl_2$ , le système est dans un état monomérique. Néanmoins, à partir de 42 mM, nous pouvons observer des réseaux 2D dont la taille augmente jusqu'à 50 mM avant de se stabiliser entre 50 mM et 70 mM en  $MgCl_2$ .

### ❖ Synthèse

En conclusion, en adaptant la méthode de design des angles des structures d'origami à base d'ADN, nous avons pu faire la conception de deux monomères carrés. Ces deux carrés ont été conçus avec des systèmes de complémentarité de forme sur chaque côté des deux origamis ( $2D_A$  et  $2D_B$ ). Ceci dans l'objectif de contrôler leur auto-assemblage en réseaux 2D. Cette complémentarité de forme a été réalisée grâce à l'insertion, sur chaque monomère, d'un système de cavités et de protubérances (Figure II-38).

Dans cette partie, nous avons montré qu'il est possible d'améliorer la qualité de l'assemblage des origamis en modifiant le design des brins agrafes ( $2D_{BV2}$ ). En effet, en diminuant la taille moyenne des brins agrafes (passant de 39 paires de bases à 33 paires de bases), nous avons pu limiter la formation d'agrégats lors de la synthèse.

Concernant la formation des réseaux 2D, nous avons étudié l'influence de différents paramètres : la concentration en  $MgCl_2$ , la température d'incubation et le temps d'incubation.

Nous avons mis en évidence que l'augmentation de la concentration en  $MgCl_2$  permet de passer d'un système monomérique à un système composé exclusivement de réseaux 2D. Cela s'explique par le fait que le  $MgCl_2$  permet d'écranter les charges négatives des molécules d'ADN et par conséquent de permettre les interactions attractives entre les monomères. Dans notre cas, nous avons observé des associations à partir de 35 mM en  $MgCl_2$  mais ce n'est qu'à partir de 42 mM en  $MgCl_2$  que nous avons observé des réseaux 2D de taille conséquente.

Concernant la température d'incubation, nous avons montré qu'à « faible » température (5 °C), nous favorisons la formation de nucléi qui vont ensuite s'agglomérer aléatoirement. En augmentant cette température (entre 15 °C et 30 °C), nous obtenons des réseaux 2D de taille plus importante et nous limitons la formation d'agrégats désorganisés. Ici, il est donc plus intéressant de travailler avec des températures comprises entre 15 °C et 30 °C.

Enfin, lors de l'optimisation du temps d'incubation, nous avons observé que l'aire moyenne des réseaux 2D évolue linéairement entre 1 h et 1 j. Cette variation ralentit entre 1 j et 18 j.

Une étude quantitative grâce à l'utilisation de la technique de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) pourrait être envisagée.

## II.1.4.2 Conception de supra-assemblages métastables d'origamis via la méthode de complémentarité de forme

Dans la nature, les supra-assemblages moléculaires sont formés via des interactions réversibles permettant de corriger une éventuelle erreur. Ces structures métastables prennent différentes formes, des assemblages finis par exemple des capsides de virus ou infinis. Parmi les assemblages infinis, nous pouvons prendre l'exemple des cellules eucaryotes possédant un cytosquelette composé de trois éléments (Figure II-55) <sup>[132]</sup> :

- Les microtubules,
- Les filaments d'actines,
- Les filaments intermédiaires.

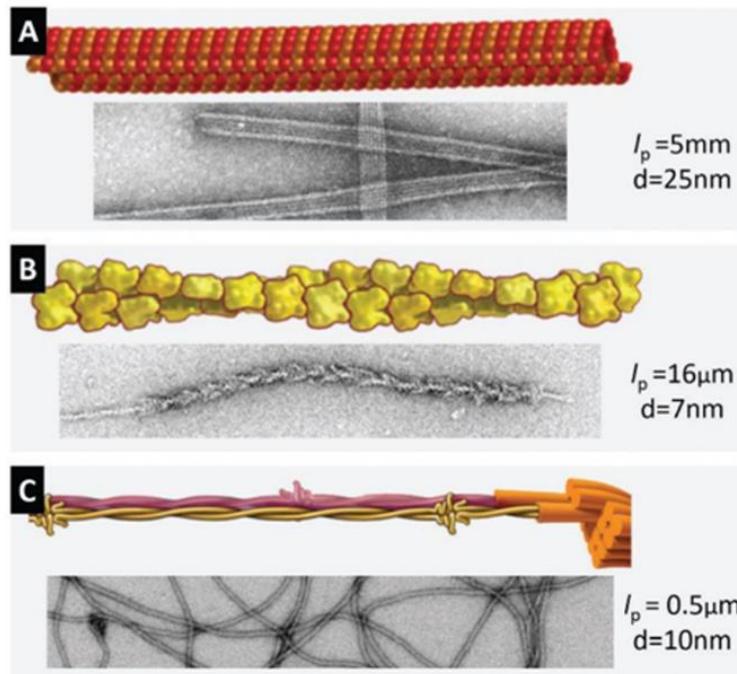
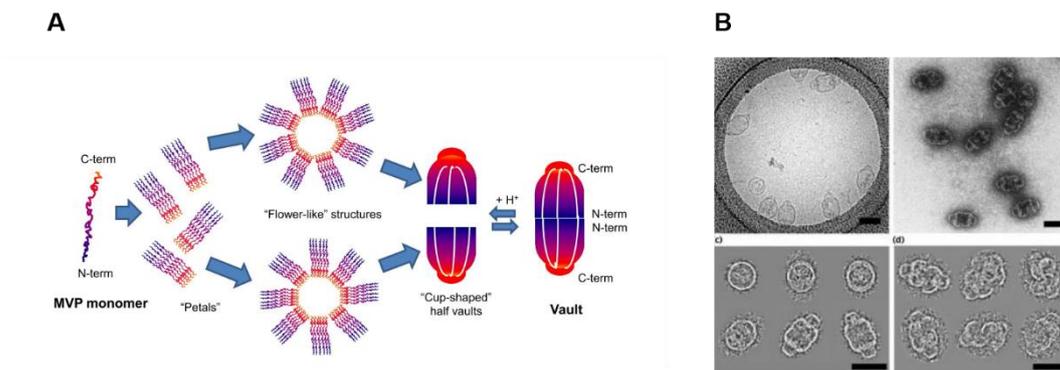


Figure II-55 : A) Microtubules. B) Filaments d'actine. C) Filaments intermédiaires <sup>[132]</sup>.

Il est aussi possible de retrouver des nanostructures plus complexes comme dans le cas des capsides de virus ou des particules en forme de « Vault » (Figure II-56).



**Figure II-56 : A) Schéma de principe de l'auto-assemblage des protéines en forme de « Vault » <sup>[133]</sup>. B) Images TEM et classifications 2D des protéines vault <sup>[134]</sup>.**

Les particules en forme de « Vault » ont été découvertes en 1986 par Kedersha et Rome. Ces particules sont des grands complexes ribonucléiques en forme de tonneaux que l'on retrouve en général dans les cellules eucaryotes <sup>[135]</sup>.

Elles ont une masse de 13 MDa et sont composées d'au moins 3 protéines différentes :

- La protéine majeure du « Vault » (MVP),
- La poly(ADP-ribose) polymérase du Vault (VPARP),
- La protéine 1 associée à la télomérase (TEP 1),
- Plusieurs copies de petits ARN non traduits (ARNv).

Les tonneaux créés peuvent contenir de petites molécules et donc servir de vecteur de médicaments.

L'objectif de cette partie est de créer de nouveaux origamis d'ADN pouvant s'auto-assembler par complémentarité de forme afin de former de plus grandes structures avec des complexités différentes.

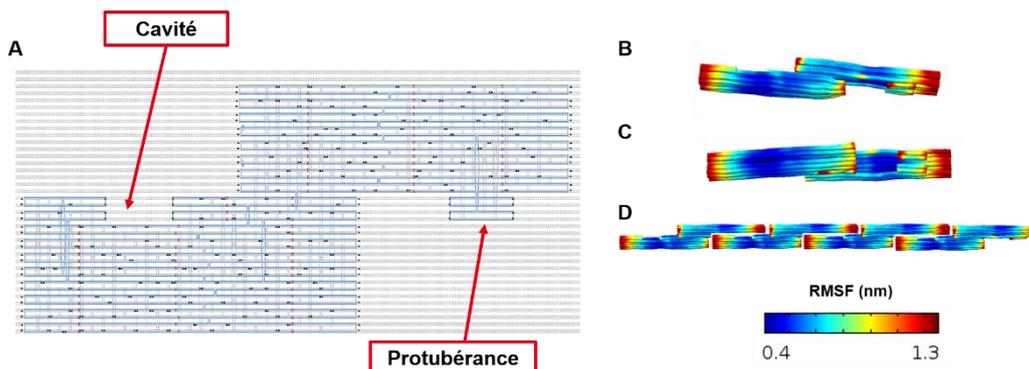
Ainsi, nous avons mis en place trois types de motifs différents :

- Un monomère en forme de Z pouvant former des microfilaments 1D,
- Des monomères carrés pouvant se polymériser dans une seule direction afin d'être utilisés en microélectronique,
- Des monomères pouvant se trimériser afin de former des structures 3D fermées inspirées des protéines en forme de « Vault ».

### II.1.4.2.1 Microfilaments 1D

La structure présentée dans cette partie est un monomère en forme de Z pouvant s'auto-assembler afin de former des microfilaments.

Le modèle CaDNAo de la structure est présenté et la modélisation CanDO obtenue sont présentées sur la Figure II-57.



D'après la modélisation CanDO obtenue, la structure semble être stable. Nous pouvons observer la présence d'une légère déformation sur l'une des extrémités de la structure. Elle ne semble cependant pas gêner le bon assemblage de la nanostructure. Afin de la valider, l'assemblage des monomères et celui des filaments (Figure II-58 et Figure II-59) a été réalisé :

- Les monomères ont été assemblés à l'aide d'une rampe en température de 2 h/°C en présence de concentration en MgCl<sub>2</sub> comprises entre 12 et 18 mM. L'échantillon traité en présence de 18 mM en MgCl<sub>2</sub> a été observé au TEM.
- Les filaments ont été formés à l'aide d'une incubation de 2 jours en présence de 70 mM de MgCl<sub>2</sub> à 20 °C.

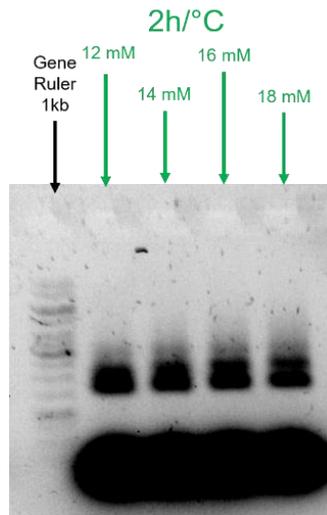


Figure II-58 : Gel d'agarose des monomères en forme de Z après synthèse.

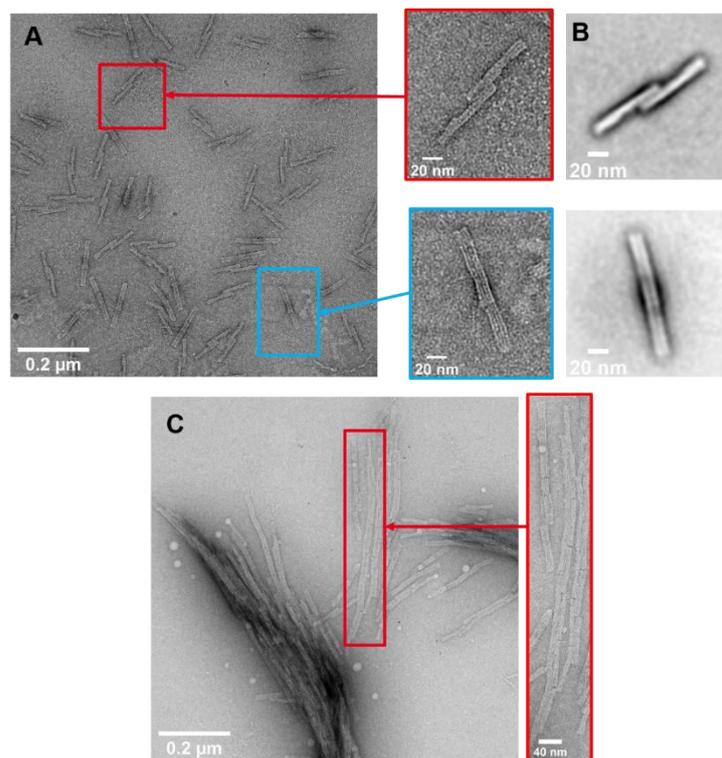
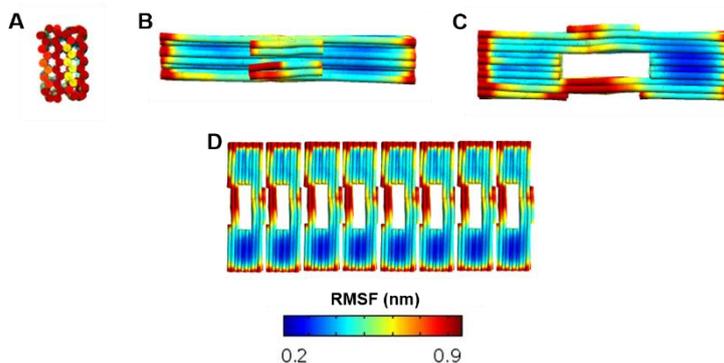


Figure II-59 : A) Image TEM des monomères en forme de Z après un rampe de 2h/°C en présence de 18 mM de  $MgCl_2$ . B) Image TEM des filaments après une incubation de 2 jours en présence de 70 mM de  $MgCl_2$  à 20 °C.

### II.1.4.2.2 Réseaux rectangulaires s'auto-assemblant en 1D

La structure présentée dans cette partie est un monomère en forme de rectangle s'auto-assemblant dans une direction afin de former des microfilaments.

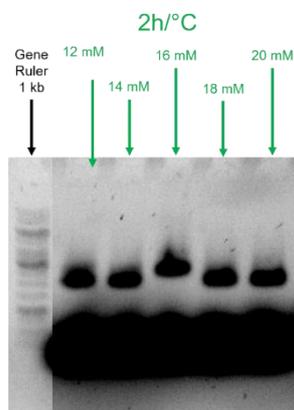
Le modèle CaDNAo de la structure est présenté en Annexes sur la Figure 0-5 et la modélisation CanDO obtenue est présentée sur la Figure II-60.



**Figure II-60 : Modélisation CanDO du monomère en forme de rectangle se polymérisant en 1D. A) Vue du côté court, B) Vue du côté long, C) Vue du dessus.**

Cette modélisation nous permet de vérifier la stabilité de notre nanostructure. Cette dernière semble stable. Seules ses extrémités présentent un RMSF élevé (~ 0.9 nm). L'assemblage des monomères et celui des filaments sont présentés sur la Figure II-61 et la Figure II-62.

Pour cette nanostructure, les monomères ont été assemblés à l'aide d'une rampe en température de 2 h/°C en présence de concentration en MgCl<sub>2</sub> comprises entre 12 et 20 mM. L'échantillon traité en présence de 18 mM en MgCl<sub>2</sub> a été observé au TEM. Les filaments ont été formés à l'aide d'une incubation de 2 jours en présence de 50 mM de MgCl<sub>2</sub> à 20 °C.



**Figure II-61 : Gel d'agarose des monomères en forme de rectangle.**

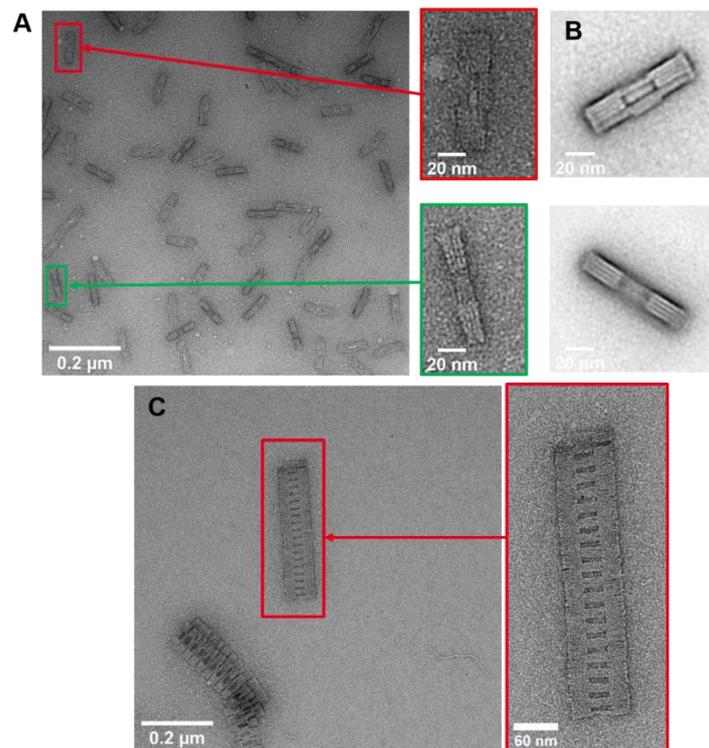


Figure II-62 : Images TEM des monomères rectangulaires se polymérisant en 1D après une rampe de 2h/°C en présence de 18 mM de MgCl<sub>2</sub>.

### II.1.4.2.3 Des nanocapsules inspirées des protéines Vault

Ici, Le motif présenté est un monomère pouvant se trimériser afin de former des nanocapsules possédant une cavité d'environ 10 nm de diamètre.

Le modèle CaDNAo de la structure est présenté en Annexes sur la Figure 0-6 et la modélisation CanDO obtenue est présentée sur la Figure II-63.

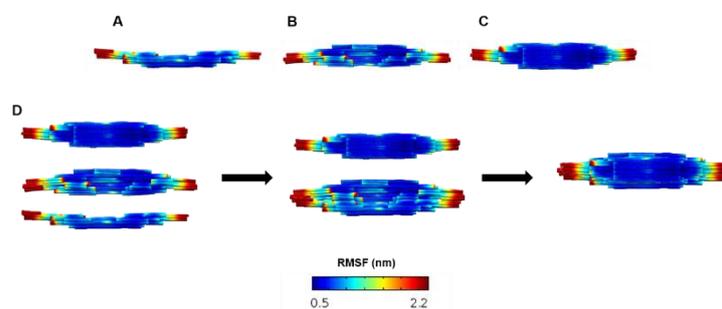


Figure II-63 : Modélisation CanDO du monomère composant la nanocapsule en origami d'ADN. A) Vue de côté. B) Vue de l'intérieur, C) Vue de l'extérieur. D) Assemblage de l'origami en forme de « Vault ».

Tout comme les nanostructures précédentes, la modélisation CanDO permet de mettre en évidence la stabilité du monomère. Le gel d'agarose des monomères est présenté sur la Figure II-64 et les images TEM des monomères et des trimères sont présentés sur la Figure II-65.

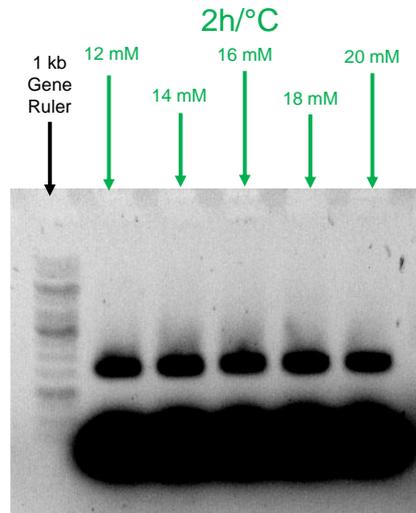


Figure II-64 : Gel d'agarose des monomères DNA-Vault.

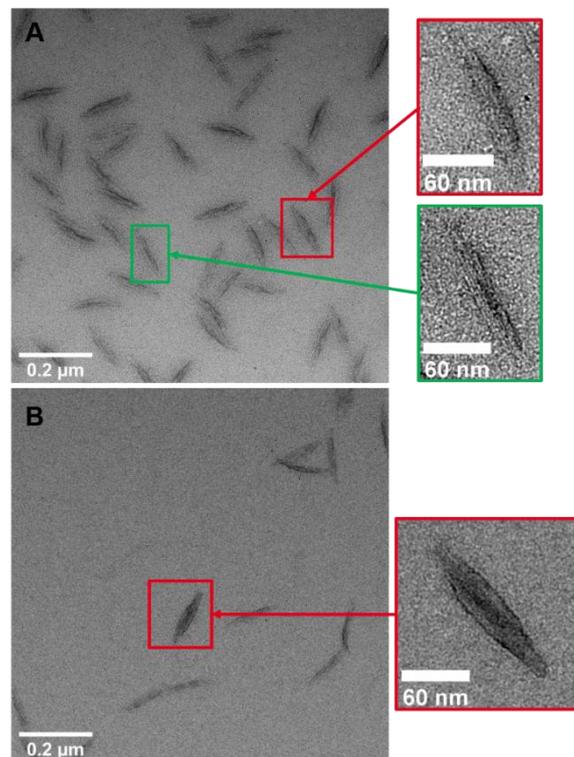


Figure II-65 : A) Image TEM des monomères de la structure Vault après une rampe en température de 2h/°C et en présence de 18 mM de  $MgCl_2$ . B) Image TEM des nanocapsules formées avec une incubation de 2 jours en présence de 50 mM de 60 mM de  $MgCl_2$  à 20°C.

### ❖ Synthèse

En conclusion, nous avons réalisé des nanostructures d'ADN possédant différentes complexités. Tous ces origamis, dont les monomères carrés s'auto-assemblent en 1D, possèdent des systèmes de cavité et de protubérance permettant leur assemblage hiérarchique.

Ainsi, nous avons mis en place :

- Un origami en forme de Z formant des microfilaments 1D,
- Un origami rectangulaire pouvant former des réseaux linéaires,
- Un origami se trimérisant en nanocapsules inspiré des protéines en forme de « Vault ».

Ces différentes structures pourraient être utilisées pour différentes applications comme la nanoélectronique pour les deux types de filaments ou encore la nanomédecine dans les cas des nanocapsules.

### II.1.4.3 Conclusion générale du chapitre

Ce chapitre est focalisé sur l'utilisation des origamis d'ADN afin d'apporter des solutions visant à résoudre différentes problématiques : La préparation d'échantillons pour la cryo-TEM et la réalisation de masque en origamis d'ADN pour la réalisation de qubits sur silicium. Deux méthodes d'assemblage ont été explorées : l'auto-assemblage par appariement de base et l'auto-assemblage par complémentarité de forme.

Dans la première partie, nous avons présenté la conception et synthèse de microfilaments en origamis d'ADN en forme de prismes triangulaires. Ces microfilaments ont été formés en utilisant une méthode d'auto-assemblage par appariement de bases. Cette méthode nous a permis de créer des microfilaments qui ont directement été utilisés pour l'optimisation d'échantillons de protéines analysées via cryo-TEM. La présence de ces microfilaments lors de la préparation des grilles cryo-TEM a pour objectif de supprimer la formation d'un ménisque. Nous avons ainsi mis au point le design de la structure monomère avec un paramètre 10,5 pb/tour, réalisé la synthèse et la purification et mis en place une stratégie de polymérisation « deux étapes » des microfilaments.

Lors des caractérisations au TEM, nous avons mis en évidence la présence d'une torsion au sein de la structure du monomère entraînant la formation de plusieurs zones de torsion au sein des microfilaments. Pour résoudre ce problème, il a fallu supprimer des paires de bases dans le design des monomères afin de compenser et de supprimer cette torsion. Ainsi, en passant à un paramètre de 10,34 pb/tour, nous avons pu supprimer cette torsion et obtenir des microfilaments exempts de zones de torsion.

L'influence de différents paramètres a été étudiée : La concentration en connecteurs, le temps d'incubation, la température d'incubation et la concentration en  $MgCl_2$ . Nous avons ainsi montré que dans le cas des connecteurs, plus leur concentration est élevée et plus nous limitons la croissance des microfilaments et nous favorisons la présence de brins libres en excès. Nous avons donc choisi de travailler en présence de 50 nM en brins connecteurs. Concernant le temps d'incubation, nous avons montré que pour une température de 37 °C, nous obtenons des filaments de plus de 1  $\mu m$  pour des temps d'incubation de plus de 10 h. Pour la température d'incubation, en prenant en compte trois températures différentes (25 °C, 30 °C, 37 °C), nous avons montré que la cinétique de polymérisation est plus importante à 37°C. Enfin, nous avons mis en évidence le fait qu'une augmentation de concentration en  $MgCl_2$  entraîne l'agrégation des microfilaments lors de la polymérisation.

Ainsi, pour obtenir des filaments de bonne qualité et d'une longueur supérieure à 1  $\mu m$ , il est préférable de réaliser les incubations en présence de 50 nM en connecteurs à 37°C pendant plus de 24 h et en présence de 11 mM en  $MgCl_2$ .

La seconde partie de ce chapitre présente la réalisation de deux origamis d'ADN  $2D_A$  et  $2D_B$  conçus pour s'auto-assembler par une deuxième méthode appelée « complémentarité de forme ». L'auto-assemblage en 2D est initié en présence de  $MgCl_2$  permettant d'obtenir des réseaux 2D. Ces

réseaux 2D serviront de masque de gravure pour la création de réseaux 2D de silicium pour les ordinateurs quantiques.

Lors de la synthèse des monomères, nous avons observé un faible rendement de synthèse de la version B, avec la présence importante d'agrégats et de dimères ; que nous ne retrouvons pas dans le cas de la version A. Nous avons attribué ces défauts de synthèse au fait, qu'en moyenne, la taille des brins agrafes est plus faible pour  $2D_A$  que pour  $2D_B$  diminuant la stabilité de ces derniers. Afin de limiter la formation de ces défauts, nous avons optimisé le design des agrafes en diminuant la taille moyenne des brins agrafes de  $2D_B$  (passant de 39 paires de bases à 33 paires de bases) en ciblant ceux proches des angles de la structure ( $2D_{BV2}$ ). Ainsi, nous avons pu limiter la formation des agrégats.

Nous avons pu mettre en évidence que la concentration en  $MgCl_2$ , la température d'incubation et le temps d'incubation sont des paramètres clés dans la formation des réseaux 2D. En effet, dans le cas de la concentration en  $MgCl_2$ , ce n'est qu'à partir de 35 mM que nous avons observé des associations de monomères et à partir de 42 mM que nous avons observé des réseaux de taille significative.

Concernant la température d'incubation, nous avons montré qu'à « faible » température (5°C), nous favorisons la formation de nucléi qui vont ensuite s'agglomérer aléatoirement. En augmentant cette température (entre 15 °C et 30 °C), nous obtenons des réseaux 2D de taille plus importante et nous limitons la formation d'agrégats désorganisés. Ici, il est donc plus intéressant de travailler avec des températures comprises entre 15 °C et 25 °C.

Enfin, dans le cas du temps d'incubation, nous avons observé que l'aire moyenne des réseaux 2D évolue linéairement entre 1 h et 1 j. Cette variation ralentie entre 1 j et 18 j.

Il est possible de quantifier les énergies d'association et de dissociation des monomères en fonction des conditions expérimentales grâce à l'utilisation de la technique de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET).

Il serait aussi intéressant d'étudier les propriétés d'autoréparation des réseaux 2D par l'exploitation des propriétés de réversibilité des assemblages formés par complémentarité de forme. Une étude similaire a déjà été faite sur l'autoréparation de microtubules suite à l'application d'une contrainte mécanique <sup>[9]</sup>. Cette étude pourra ensuite nous servir afin de mettre en œuvre l'autoréparation de réseaux 2D déposés sur des substrats de  $SiO_2$  thermique.

Dans le Chapitre III nous nous intéresserons à l'utilisation de ces réseaux 2D pour la nanostructuration du silicium.

Enfin la troisième partie de ce chapitre a été consacrée à la réalisation de différents types de structures monomères exploitant la complémentarité de forme pour la création de structures hiérarchiques de différentes complexités. Nous avons créé, synthétisé et polymérisé trois structures différentes :

- Un origami en forme de Z formant des microfilaments 1D,
- Un origami rectangulaire pouvant former des réseaux linéaires,
- Un origami se trimérisant en nanocapsules inspiré des protéines en forme de « Vault ».

Cette partie nous a ainsi permis de montrer la polyvalence de cette méthode d'assemblage hiérarchique.

## Chapitre III- Application des origamis d'ADN au monde de la nanostructuration de surface

---

*Le but de ce chapitre est d'étudier l'auto-assemblage assisté par substrat de SiO<sub>2</sub> des réseaux 2D en origamis d'ADN.*

*Tout d'abord, nous présenterons les différents protocoles et outils de caractérisations utilisés dans ce chapitre. Ensuite, nous parlerons des méthodes de traitements d'image utilisées afin de permettre l'analyse des images AFM et CD-SEM réalisées.*

*La seconde partie du chapitre sera consacrée à la présentation des résultats d'auto-assemblage sur surface obtenus. Elle sera divisée en deux sous-parties :*

- L'auto-assemblage assisté par substrat des origamis d'ADN en présence de MgCl<sub>2</sub>,
- L'auto-assemblage assisté par substrat des origamis d'ADN en présence de MgCl<sub>2</sub> et de NaCl.

Dans chaque cas, nous analyserons l'influence des conditions expérimentales sur le recouvrement de surface et sur l'ordre d'assemblage observé.

---

### III.1 Objectifs

Pour rappel, des études ont été réalisées afin de démontrer la possibilité d'utiliser les origamis d'ADN comme outils de nanostructuration de surface. Les énergies d'interactions origamis d'ADN-surface ont été exploitées afin de permettre la réalisation de réseaux 2D organisés à grandes échelles sur des surfaces de mica. Les chercheurs ont étudié le rôle des cations monovalents et divalents sur la réorganisation des structures formées.

Les cations monovalents ont la capacité de remplacer les cations divalents sur certains sites de fixation de la surface de l'oxyde. Cet échange permet la diminution du nombre de ponts salins entre les origamis et l'oxyde induisant une augmentation des effets de diffusion des origamis sur le substrat (Figure III-1). Dans cette partie, le cation divalent utilisé sera le dichlorure de magnésium et le cation monovalent sera le chlorure de sodium (NaCl).

Toutes les études portant sur ce sujet ont été réalisées sur des surfaces de mica ou des surfaces de mica fonctionnalisées à l'aide d'une bicouche lipidique. L'objectif de ce chapitre est d'étudier la possibilité d'utiliser le SiO<sub>2</sub> afin de permettre l'auto-assemblage assisté par substrat de nos origamis d'ADN complémentaires de forme.

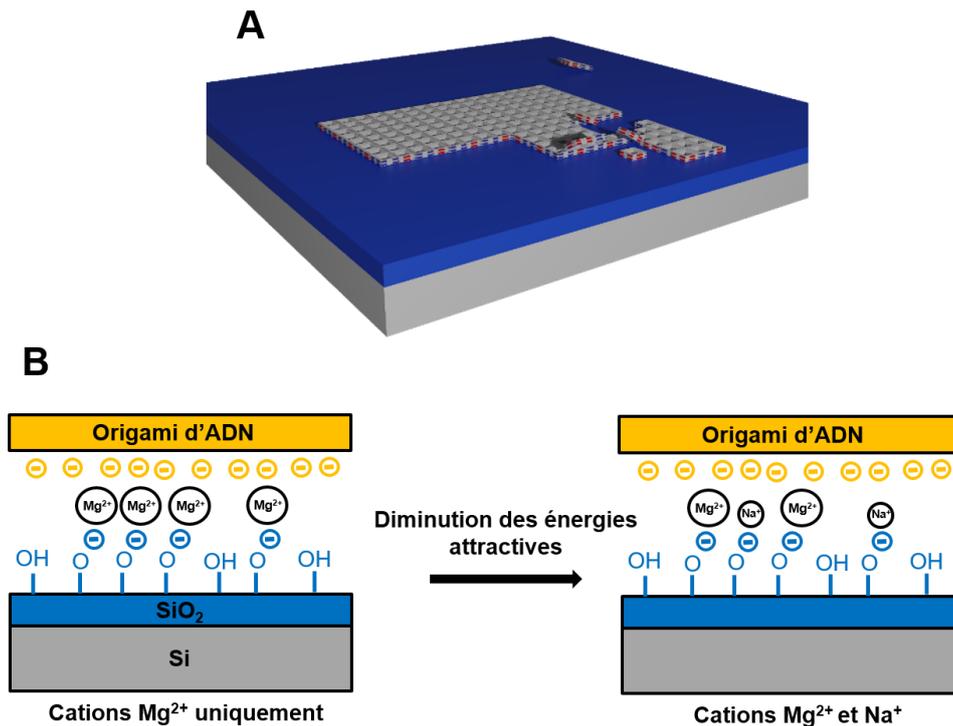


Figure III-1 : A) Schéma de l'auto-assemblage des réseaux 2D sur une surface de SiO<sub>2</sub>. B) Schéma de principe du remplacement de cations Mg<sup>2+</sup> par des cations Na<sup>+</sup> à la surface du SiO<sub>2</sub>.

Dans une première partie, nous décrivons les protocoles de dépôt et d'assemblage sur surface que nous avons utilisé. Ensuite, nous présenterons trois méthodes d'analyses d'images que nous avons exploitées afin de permettre le traitement des images AFM et CD-SEM.

La seconde partie du chapitre s'intéressera aux différents résultats d'auto-assemblage assisté par substrat obtenus. Cette partie s'articulera autour de deux axes d'études :

- L'auto-assemblage assisté par substrat des réseaux 2D en **présence de MgCl<sub>2</sub>**,
- L'auto-assemblage assisté par substrat des réseaux 2D en **présence de MgCl<sub>2</sub> et de NaCl**.

## III.2 Matériels et méthodes

### III.2.1 Auto-assemblage assisté par substrat des origamis sur la surface SiO<sub>2</sub>

#### III.2.1.1 Auto-assemblage en présence de MgCl<sub>2</sub>

Après la synthèse et la purification, les deux types d'origamis d'ADN ont été concentrés à l'aide d'une méthode de centrifugation. Pour ce faire nous avons utilisé des filtres de centrifugation Eppendorf® 100 kDa. La centrifugation a été réalisée à 4 °C à une vitesse de rotation de 5000 g pendant 8 min. Les deux types de monomères ont été ensuite mélangés dans le même tube Eppendorf à une concentration équimolaire en présence de MgCl<sub>2</sub>. En général, la concentration en monomères donnée est celle d'un type d'un monomère. La concentration totale en origamis sera donc le double de celle indiquée.

Le protocole de dépôt sur le SiO<sub>2</sub> est similaire à celui utilisé par Marie Marmiesse<sup>[69]</sup> et par Guillaume Thomas *et al.*<sup>[70]</sup>. Dans un premier temps, 5 µl du mélange préparé sont déposés sur le substrat de SiO<sub>2</sub> thermique de 5 nm d'épaisseur préalablement placé dans une enceinte humide pour éviter l'évaporation. L'humidité à l'intérieur de l'enceinte est garantie par l'introduction d'une lingette imbibée d'eau et d'un réservoir d'eau. Ensuite, une incubation est réalisée afin de permettre l'auto-assemblage sur substrat. La température d'incubation est contrôlée par l'utilisation d'une étuve. Le schéma de principe de la méthode peut être retrouvé sur la Figure III-2.

Après l'étape d'incubation, l'échantillon est rincé pendant 30 s à l'aide d'une solution eau-EtOH afin d'enlever les sels en excès de la surface. Il est ensuite séché sous un flux d'argon.

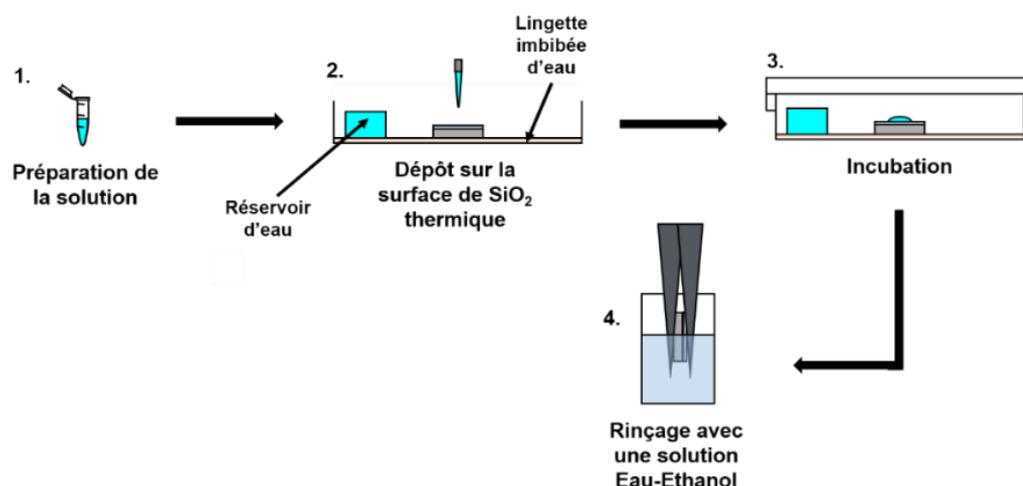


Figure III-2 : Schéma de principe de l'auto-assemblage des réseaux 2D en présence de  $MgCl_2$ .

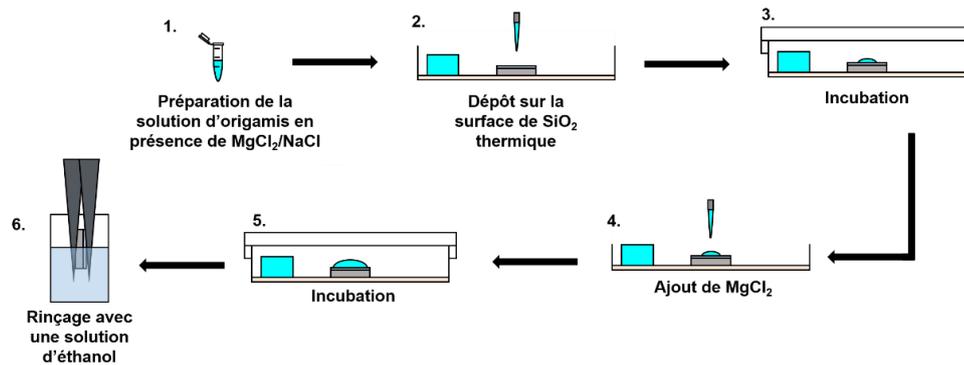
### III.2.1.2 Auto-assemblage en présence de $MgCl_2$ et de $NaCl$

Dans le but de contrôler les interactions attractives entre le  $SiO_2$  et les origamis d'ADN, il est possible de rajouter des cations monovalents à la solution de dépôt. Cet ajout a pour conséquence d'augmenter les propriétés de diffusion des origamis sur la surface et donc de permettre la formation de larges réseaux 2D en évitant la formation de multicouches. Il a été nécessaire de rajouter une étape supplémentaire afin de permettre la « re-fixation » des réseaux 2D. Au cours de cette étape, nous avons rajouté plus d'ions magnésium dans la goutte déposée sur la surface. Le protocole dans ce cas est le suivant (Figure III-3) :

Dans un premier temps, une solution de 5  $\mu l$  solution d'origamis d'ADN est préparée en présence d'une certaine concentration en  $MgCl_2$  et de  $NaCl$  Ici, nous travaillerons avec une concentration de 4 nM pour chaque type de monomère ( $2D_A$  et  $2D_{BV2}$ ).

La solution est déposée sur une surface de  $SiO_2$  thermique de 5 nm d'épaisseur, elle-même située dans une chambre humide close. Une incubation est réalisée pendant 24 h à 25 °C (utilisation d'une étuve) afin de permettre l'auto-assemblage.

A la suite de cette incubation, 15  $\mu l$  d'une solution de 0,5X TBE complétée avec du  $MgCl_2$  est déposée par-dessus la première goutte afin de permettre la fixation des réseaux sur la surface. L'échantillon est rincé dans une solution d'éthanol afin d'éviter la désorption des réseaux de la surface et séché par un flux d'argon.



**Figure III-3 : Schéma descriptif du protocole d'auto-assemblage assisté par substrat des réseaux 2D en présence de  $MgCl_2$  et de  $NaCl$ .**

Les plaques de  $SiO_2$  thermique sont préparées à l'aide de plaques de silicium de 200 mm de diamètre. Ces dernières sont alors oxydées afin d'obtenir différentes épaisseurs d'oxyde. Les deux épaisseurs utilisées dans cette thèse sont 5 nm et 10 nm par oxydation thermique  $O_2 + HCl$  à 800 °C et 900 °C respectivement. Les substrats oxydés sont ensuite protégés grâce à l'utilisation d'un capot. Ce capot a été réalisé par le collage hydrophile d'un autre substrat de silicium. Pour nos expériences des coupons de 1 cm x 1 cm ou de 2 cm x 2 cm ont été utilisés.

## III.2.2 Méthodes de caractérisation

Après les étapes de dépôt des origamis sur le substrat, de séchage et de rinçage deux méthodes de microscopies différentes ont été utilisées : La Microscopie Electronique à Balayage (*Scanning Electron Microscopy* ou SEM) et la Microscopie à Force Atomique (*Atomic Force Microscopy* ou AFM).

### III.2.2.1 La Microscopie à Force Atomique

La Microscopie à Force Atomique est une technique d'analyse permettant la représentation de la microstructure de la surface des matériaux. La résolution est de l'ordre du nanomètre dans le plan latéral de la surface et de l'ordre de la centaine de picomètres dans le plan perpendiculaire à la surface.

Cette méthode est basée sur l'exploitation des forces attractives et répulsives ayant lieu entre la surface de l'échantillon et d'une pointe montée sur un levier. La topographie de surface détectée est intimement liée à la flexion de ce levier. En effet, le levier peut se déplacer dans toutes les directions de l'espace avec une précision nanométrique grâce à un tube piézoélectrique. De plus, les interactions pointe-surface induisent la modification de la déflexion du levier. Cette modification est quantifiée via la déviation d'un faisceau lumineux (diode laser) incident au levier et l'utilisation d'un détecteur

(photo-diode). L'imagerie AFM peut être aussi réalisée en milieu aqueux, à l'air libre ou sous ultravide <sup>[136]</sup>. Un schéma de principe de cette méthode est présenté sur la Figure III-4. Deux modes différents ont été utilisés au cours de cette thèse :

- **Le mode contact intermittent (Tapping Mode)** qui est basé sur le balayage de la surface de l'échantillon par le levier. Ce dernier oscille à une fréquence proche de sa fréquence de résonance <sup>[136]</sup>. Ici, ce sont les forces attractives entre la surface et la pointe qui sont utilisées pour réaliser la caractérisation. La force d'interaction entre la surface et la pointe entraîne une variation de l'amplitude de la fréquence d'oscillation. Afin de la garder constante, la fréquence d'oscillation est constamment réajustée. Cette méthode est adaptée pour la caractérisation d'échantillon présentant une surface fragile car elle permet d'éviter le contact entre la pointe et l'échantillon <sup>[136]</sup>.
- **Le mode Peak Force Tapping** qui est basé sur le même principe de contact intermittent que le mode Tapping. La différence réside dans le fait que, dans ce cas, la fréquence d'oscillation est inférieure à la fréquence de résonance du levier. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet un contrôle direct des forces d'interactions entre la surface et la pointe via la mesure de la force maximale exercée. Cela permet de contrôler et de minimiser les interactions entre la pointe et la surface et l'obtention d'une meilleure résolution <sup>[137,138]</sup>.

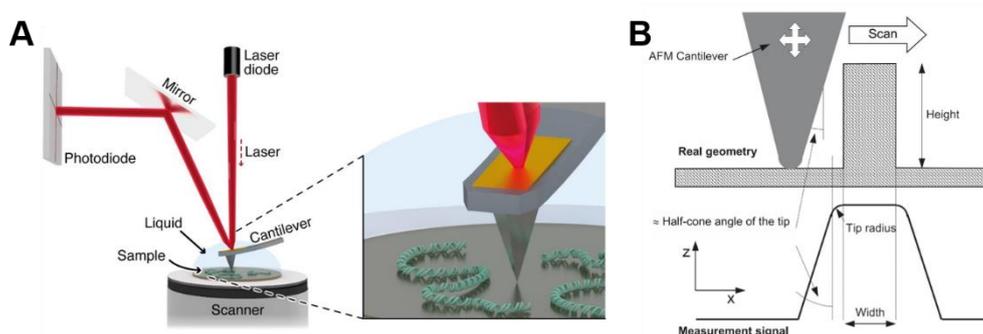


Figure III-4: A) Schéma de principe de l'AFM en milieu humide <sup>[139]</sup>. B) Effet de la convection de la pointe sur les dimensions des motifs observés <sup>[140]</sup>.

Dans cette thèse, l'équipement généralement utilisé est le Bruker Dimension Icon. L'imagerie a été réalisée à l'aide de pointe VTESPA-300 en mode Tapping à l'air. Cette pointe possède une fréquence de résonance de 300 kHz, un rayon nominal de 5 nm et une constante de raideur de 42 N/m.

Certains cas ont été analysés en milieu aqueux à l'aide d'un équipement FastScan. Dans ce cas, nous avons utilisé une pointe FastScan C en mode PeakForce Tapping. Cette pointe possède une fréquence de résonance de 300 kHz, un rayon nominal de 5 nm et une constante de raideur de 0,8 N/m.

Les images AFM obtenues ont été remises à plat à l'aide d'une approximation polynomiale d'ordre 6 de type « Plane Fit ». Ce degré de d'approximation a été choisi afin de permettre une bonne remise à plat des images AFM même en présence d'une forte densité d'origamis d'ADN sur la surface d'oxyde.

### III.2.2.2 La Microscopie Electronique à Balayage

La Microscopie Electronique à Balayage est une technique d'imagerie basée sur l'exploitation des interactions électron-matière. En effet, un faisceau d'électrons est focalisé sur le substrat et balayé sur la surface du substrat permettant l'émission d'électrons secondaires. Ces derniers sont détectés par des détecteurs situés au-dessus du porte-échantillon. L'intensité du signal est dépendant du type de matériau observé et de la topographie de surface. Cette méthode permet l'obtention d'images à haute résolution (~2-3 nm). Le schéma de principe de cette méthode est présenté sur la Figure III-5.

Pour l'étude des origamis déposés sur le SiO<sub>2</sub>, nous avons utilisé un Microscope Electronique à Balayage à Dimension Critique (CD-SEM pour *Critical Dimension Scanning Electron Microscopy*). Ce type de microscope électronique permet de mesurer les dimensions critiques des motifs observés.

Dans ce projet, l'équipement généralement utilisé est un CD-SEM Hitachi CG9300 à une énergie primaire de 300 eV.

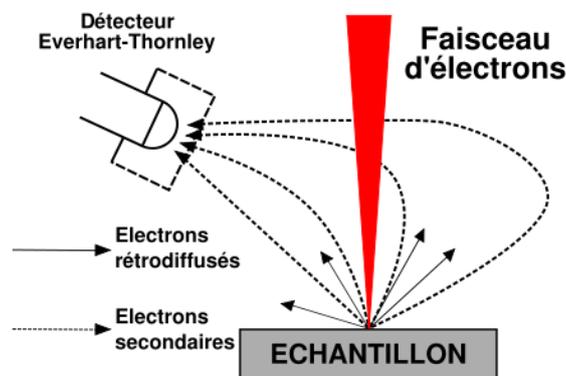


Figure III-5 :Schéma de principe de la Microscopie Electronique à Balayage <sup>[141]</sup>.

### III.2.3 Traitement d'images

Les images AFM et CD-SEM peuvent être analysées en utilisant différentes méthodes de traitement. Ces dernières seront dépendantes du type d'imagerie utilisées mais aussi des informations recherchées. Dans cette thèse trois méthodes différentes seront utilisées :

- Le tracé des histogrammes des hauteurs des images AFM,

- L'analyse de l'ordre des réseaux 2D avec le tracé des fonctions de densité spectrale de puissance radiale des images AFM et CD-SEM,
- L'analyse de l'ordre des réseaux 2D avec la détection des centres des origamis sur les images AFM et CD-SEM.

La suite de ce chapitre va donc porter sur la description des ces méthodes de traitement.

### III.2.3.1 Histogrammes des hauteurs

Une image AFM peut être décrite en utilisant la fonction de distribution des hauteurs  $p(h)$ . Cette fonction décrit la probabilité d'une hauteur de surface comprise entre  $h$  et  $h + dh$  en tout point d'une surface  $p(h)dh$  <sup>[142]</sup>. Cette distribution est normalisée de telle sorte que <sup>[142]</sup>:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} p(h)dh = 1$$

Un exemple de tracé d'historgramme des hauteurs d'une image AFM (Figure III-6-A) est présenté sur la Figure III-6-B. Sur cette figure, différents pics significatifs peuvent être observés. On les associe à la surface de SiO<sub>2</sub>, aux monocouches d'origamis ou encore aux multicouches d'origamis. Ces dernières correspondent à des origamis empilés ou agrégés.

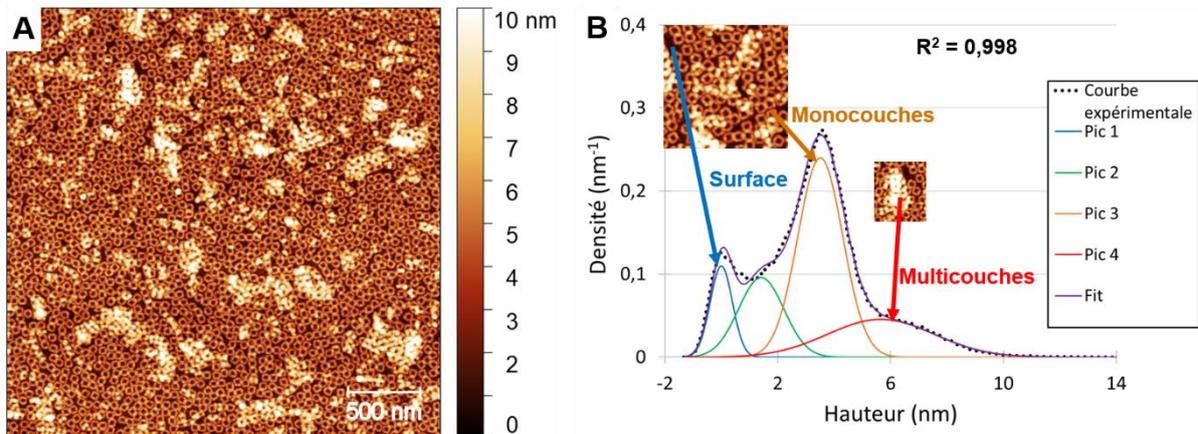


Figure III-6 : A) Image AFM de réseaux 2D auto-assemblés sur une surface de SiO<sub>2</sub>. B) Histogramme des hauteurs et décomposition correspondante.

L'historgramme des hauteurs de l'image AFM a été décomposé à l'aide de trois gaussiennes de la forme :

$$f(x, x_0, FWHM) = \frac{2\ln(2)}{\pi \times FWHM} \exp\left(-\ln(2) \left(\frac{x - x_0}{FWHM/2}\right)^2\right)$$

Avec  $x_0$  le centre de la gaussienne et FWHM la largeur à mi-hauteur (Full Width at Half-Maximum) de la courbe.

Après décomposition, nous observons qu'un pic n'est associé à aucune des caractéristiques réellement présentes sur la surface (le pic vert sur la Figure III-6-B). Ce pic est dû au fait que l'entrée de la pointe dans le trou central de l'origami n'est pas complète. Cela entraîne la détection d'une hauteur de surface plus élevée au centre de l'origami. Ce pic ne sera pas pris en compte dans le calcul des taux de présence. Le centre de la gaussienne nous permet de remonter à la hauteur des motifs, et son aire permet de calculer le taux de présence du composant considéré. Les données qu'il est possible de déterminer avec cette méthode sont présentées dans le Tableau III-1. L'erreur communiquée correspond à l'écart-type déterminé lors de l'approximation.

	Hauteur (nm)	Taux de présence (%)
Surface	0,0 ± 0,1	13,4 ± 0,6
Monocouches	3,5 ± 0,1	59,6 ± 0,6
Multicouches	5,7 ± 0,1	27,0 ± 0,2

**Tableau III-1 : Tableau récapitulatif des hauteurs et des taux de présence issus de la décomposition des histogrammes des hauteurs.**

### III.2.3.2 Densité spectrale de puissance radiale (PSD radiale)

#### III.2.3.2.1 Méthode de traitement

La densité spectrale de puissance est une fonction permettant de représenter la distribution des différentes fréquences spatiales composant un signal. Cette fonction est en fait la transformée de Fourier de la fonction d'auto-covariance. L'expression de la densité spectrale de puissance est <sup>[142]</sup> :

$$PSD(k) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} G(\rho) \exp(-ik\rho) d\rho$$

Avec  $k$  le vecteur d'onde et  $G(\rho)$  la fonction d'auto-covariance <sup>[142]</sup>.

Pour une surface bidimensionnelle  $h(m, n)$  de taille  $N_x \times N_y$ , la fonction de densité spectrale  $PSD(k_x, k_y)$  s'exprime cette fois-ci <sup>[142]</sup> :

$$PSD_s(k_x, k_y) = \frac{1}{N_x N_y} \left| \sum_{m=1}^{N_x} \sum_{n=1}^{N_y} h(m, n) \exp(-imk_x \Delta x - ink_y \Delta y) \right|^2$$

Pour une surface isotrope,

$$PSD_s(k) = \frac{1}{N_k} \sum_k P_s(k_x, k_y) \Big|_{k \leq \sqrt{k_x^2 + k_y^2} \leq k + dk}$$

Avec  $N_k$  le nombre de points à un vecteur d'onde constante  $k$ . Ce dernier est lié à la longueur d'onde  $\lambda$  par la relation <sup>[142]</sup> :

$$k = \frac{2\pi}{\lambda}$$

Ici, nous parlerons de densité spectrale de puissance radiale (PSD radiale). Ce type de PSD nous permettra d'avoir une distribution des différentes fréquences spatiales dans toutes les directions. Ainsi, nous pourrons prendre en compte les effets de la rotation des structures sur les images obtenues.

Les PSD peuvent prendre différentes formes en fonction du type de surface. Dans notre cas, une surface recouverte d'origamis d'ADN sera considérée comme une surface dite « bosselée » <sup>[142]</sup>. Une surface bosselée présente des monticules de tailles caractéristiques. Cela signifie que leurs PSD présentent des pics caractéristiques à certaines valeurs de  $k$ . Dans ce cas, la PSD radiale s'exprime <sup>[142]</sup> :

$$PSD(k) = \begin{cases} \frac{\omega^2 \xi}{2\sqrt{2}} \left[ \exp\left(-\left(k - \frac{2\pi}{\lambda}\right)^2 \frac{\xi^2}{4}\right) + \exp\left(-\left(k + \frac{2\pi}{\lambda}\right)^2 \frac{\xi^2}{4}\right) \right], & \text{pour } 1 + 1 \text{ dimensions} \\ \frac{\omega^2 \xi^2}{2} \left[ \exp\left(-\frac{4\pi^2 + k^2 \lambda^2}{4\lambda^2} \xi^2\right) J_0\left(\frac{\pi k \xi^2}{\lambda}\right) \right], & \text{pour } 2 + 1 \text{ dimensions} \end{cases}$$

Avec  $\xi$  une longueur de corrélation,  $\omega$  la largeur de l'interface,  $\lambda$  une distance caractéristique et  $J_0(x)$  la fonction de Bessel d'ordre 0.

La longueur de corrélation du système permet de déterminer le caractère aléatoire de la répartition des monticules sur la surface <sup>[142]</sup>. En d'autres termes, plus la valeur de ce paramètre est importante et plus les objets observés sont ordonnés à grande distance.

Il a été démontré que la longueur de corrélation du système est inversement proportionnelle au FWHM de la PSD d'une surface bosselée <sup>[142]</sup>.

$$\xi \propto \frac{2\pi}{\text{FWHM}} = \xi'$$

Nous avons ici une relation de proportionnalité. Cela signifie que la valeur de longueur de corrélation obtenue ne sera pas une valeur absolue. Dans la suite de nos travaux, nous présenterons la longueur de corrélation  $\xi'$ .

Afin de tracer la PSD radiale d'images AFM ou CD-SEM, nous avons mis au point un code Python. Dans un premier temps, les images sont mises à plat à l'aide d'un fit polynomial. Ensuite, la suppression du bruit sur l'image est rendue possible par l'utilisation d'une convolution gaussienne. Les niveaux de gris des centres des origamis sont modifiés via la réalisation d'une convolution avec un filtre

« chapeau mexicain »<sup>[143]</sup>. Ceci, afin de rendre l'identification des centres des origamis plus aisée. L'image est ensuite binarisée. Enfin, nous traçons l'amplitude de la FFT 2D de l'image binaire et la PSD radiale correspondante.

### III.2.3.2 Validation de la méthode de traitement

Dans le but de valider notre méthode de traitement, nous avons créé une image binaire (Figure III-7) d'un origami avec des dimensions se rapprochant de celles que nous avons mesurer avec le TEM et ce, à l'échelle du nanomètre. A l'aide de Python nous avons pu simuler l'assemblage des origamis d'ADN avec différentes probabilités d'association  $P$ . Elle correspond à la probabilité qu'un origami puisse s'associer à un autre origami ( $0 \leq P < 1$ ). Cela nous permettra de simuler les effets de l'assemblage des réseaux 2D en origamis d'ADN sur la forme des PSD radiales obtenues.

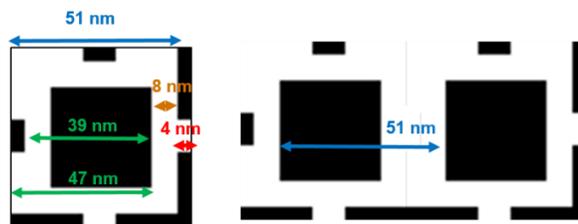


Figure III-7 : Schéma de l'origami d'ADN utilisé pour les simulations d'assemblage.

Un réseau parfait a aussi été créé (Figure III-8-A) et analysé avec la méthode de la PSD radiale afin d'observer les pics caractéristiques de la période des réseaux 2D.

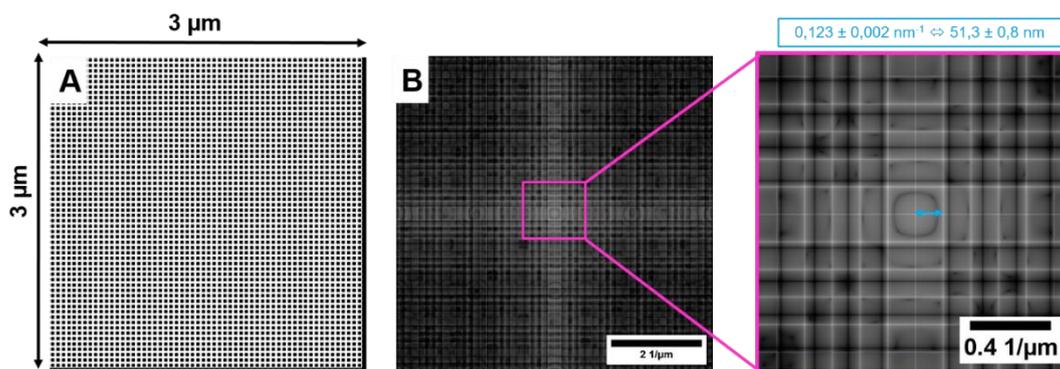


Figure III-8 : A) Réseau parfait créé à partir du schéma de l'origami d'ADN. B) Image de l'amplitude de la FFT 2D correspondant au réseau parfait. C) PSD radiale correspondante au réseau.

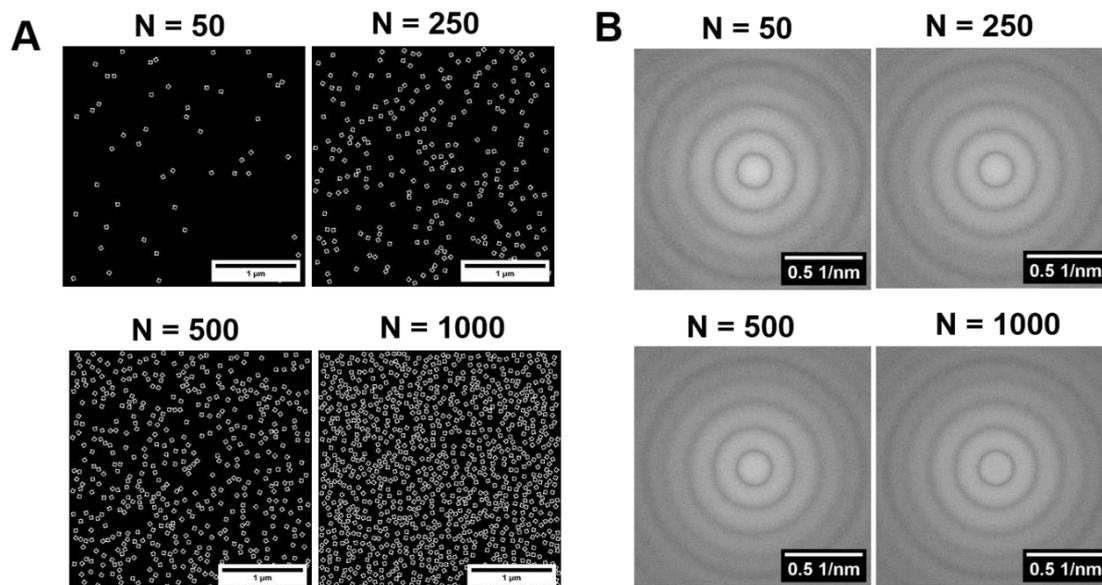


Figure III-9 : A) Images représentant différentes densité d'origamis déposés sur une surface. B) Images de l'amplitude des FFT 2D correspondants à chaque cas.

En approximant la PSD radiale du réseau parfait (Figure III-10-A) à l'aide de deux gaussiennes, nous observons un pic caractéristique à  $51,8 \pm 0,1$  nm et un autre pic caractéristique à  $36,7 \pm 0,1$  nm. La longueur caractéristique du premier pic est proche de la période du réseau 2D et celle du deuxième pic est proche d'une des dimensions interne au monomère (39 nm). De plus, le premier pic possède une longueur de corrélation  $\xi'$  de  $2,78 \pm 0,01$   $\mu\text{m}$  et le second une valeur de  $1,94 \pm 0,09$   $\mu\text{m}$ .

Toutes les PSD ont été normalisées par rapport à la densité d'origamis présents sur l'image. Ceci afin d'éviter que le nombre d'origamis n'influe sur l'intensité des pics caractéristiques de la PSD. Avec une probabilité d'association  $P = 0$  (i.e. sans assemblage entre les origamis), nous avons réalisé cinq images avec différents nombres d'origamis  $N \in \{50, 150, 250, 500, 1000\}$ . Les images sont présentées sur la Figure III-9-A, l'amplitude des FFT 2D correspondantes est observable sur la Figure III-9-B et les PSD associées sur la Figure III-10.

Comme visible sur la Figure III-10, pour chaque PSD d'image sans assemblage, présente un pic situé entre  $0,1 \text{ nm}^{-1}$  et  $0,2 \text{ nm}^{-1}$  a pu être observé. Il est caractéristique des dimensions de l'origami (Les distances de 39 nm et de 45 nm). Nous notons que l'intensité du pic caractéristique ne varie pas avec la variation de la densité d'origamis avec la normalisation. Cela valide la normalisation des PSD par la densité d'origamis sur la surface et nous permettra de ne détecter que les variations dues à l'assemblage des origamis d'ADN en réseaux 2D.

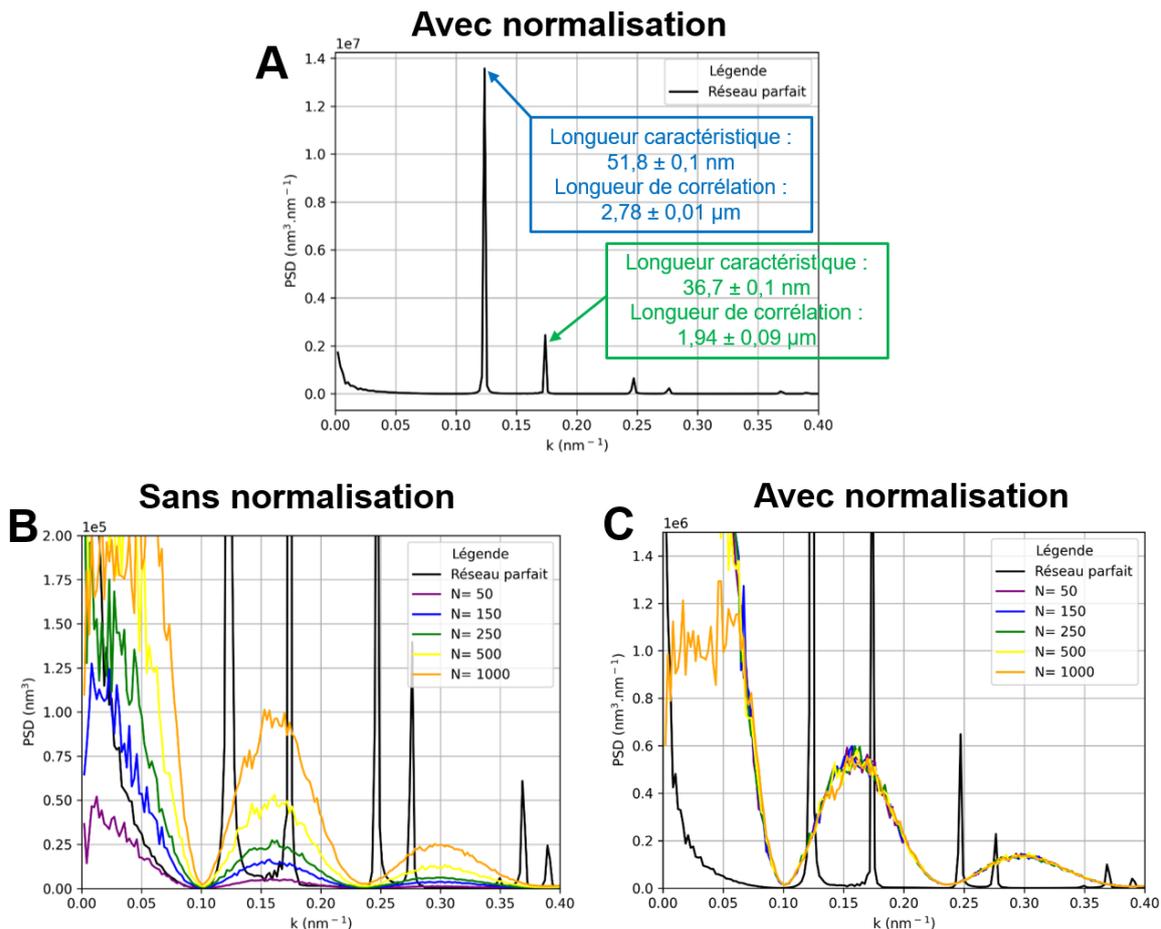
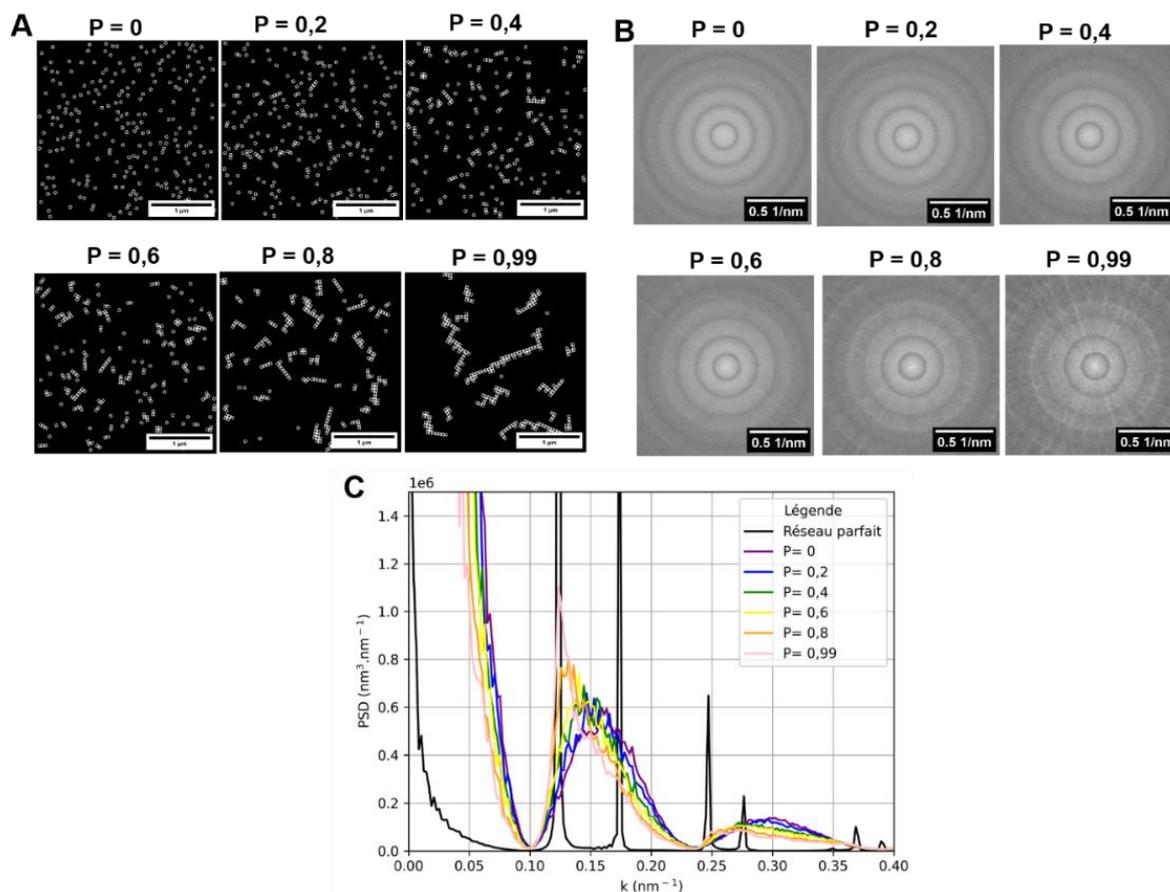


Figure III-10 : PSD radiales des images avec les différentes densités d'origamis A) sans normalisation, B) avec normalisation.

Dans le cas des PSD radiales associées aux images avec différentes probabilités d'association (Figure III-11), les pics ont été décomposés à l'aide de deux courbes gaussiennes (Figure III-12-A et Figure III-12-B). L'évolution de la position des pics ( $x_0$ ) et de leur longueur de corrélation  $\xi'$  sont présentées sur la Figure III-12-C. Dans un premier temps, nous observons que la position des deux pics varie avec l'augmentation de la probabilité d'association. En effet, à  $P = 0$ , la longueur caractéristique associée au pic d'assemblage est de  $44,1 \pm 1,2$  nm alors qu'à  $P = 0,99$  elle est de  $50,7 \pm 1,2$  nm. Dans le premier cas, cette valeur correspond au monomère alors que dans le second cas, elle proche de la période des réseaux 2D. Concernant le pic des monomères, la longueur caractéristique associée passe d'une valeur de  $37,2 \pm 3,5$  nm ( $P = 0$ ) à une valeur de  $41,0 \pm 0,3$  nm. Ici, les valeurs obtenues sont des longueurs caractéristiques issues du monomère. Leur évolution en fonction de la probabilité d'association n'est due qu'à l'interaction entre les deux gaussiennes de l'approximation.



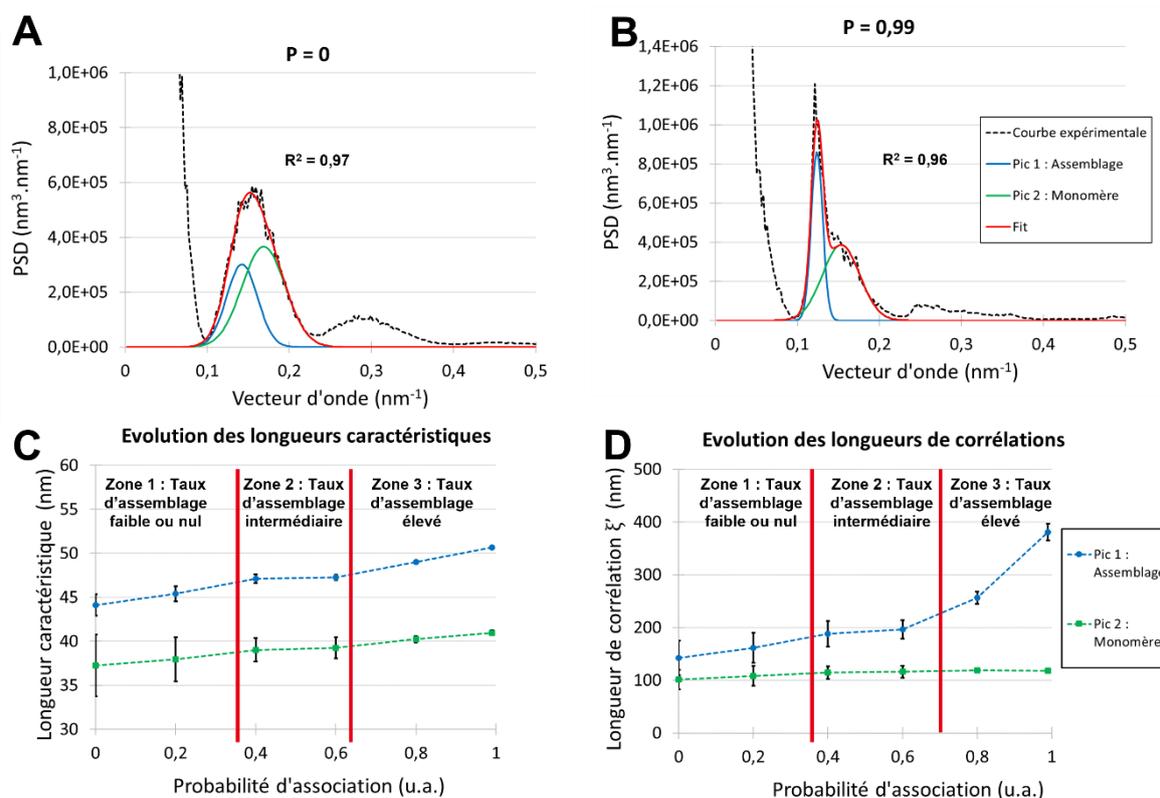
**Figure III-11 : A) Images synthétiques représentant des origamis déposés sur une surface avec différentes probabilités d'assemblage. B) Images de l'amplitude des FFT2D correspondantes. C) PSD radiales correspondantes.**

Concernant les longueurs de corrélation  $\xi'$ , nous observons que celle du pic 1 augmente avec la hausse de la probabilité d'association. Cela est synonyme d'une augmentation de l'ordre au sein des nanostructures. Celle associée au pic 2 reste constante quel que soit la probabilité.

Finalement, trois zones différentes peuvent être observées sur les graphiques de la Figure III-12-C et de la Figure III-12-D :

- **La zone 1 ( $0 \leq P < 0,4$ )** qui correspond à un **taux d'assemblage faible ou nul**. Dans cette zone, la longueur caractéristique associée au pic d'assemblage varie de  $44,1 \pm 1,2$  nm à  $47,1 \pm 0,5$  nm. La longueur de corrélation, elle, passe de  $142 \pm 32$  nm à  $188 \pm 24$  nm.
- **La zone 2 ( $0,4 \leq P \leq 0,6$ )** qui correspond à un **taux d'assemblage intermédiaire**. Ici la longueur caractéristique du pic d'assemblage est stable. En effet, elle est de  $47,1 \pm 0,5$  nm pour  $P = 0,4$  et de  $47,3 \pm 0,3$  nm à  $P = 0,6$ . Concernant la longueur de corrélation associée au pic 1 elle est de  $188,1 \pm 24$  nm à  $P = 0,4$  et de  $197 \pm 18$  nm à  $P = 0,6$ .
- **La zone 3 ( $0,6 < P < 1$ )** correspondant à un **taux d'assemblage élevé**. Dans ce cas, les différents paramètres augmentent de façon significative. La valeur de la longueur de corrélation varie de  $197 \pm 18$  nm ( $P = 0,6$ ) à  $380 \pm 16$  nm ( $P = 0,99$ ). La longueur caractéristique associée au pic

d'assemblage augmente entre  $P = 0,6$  et  $P = 0,99$  pour des valeurs de  $47,3 \pm 0,3$  nm à  $50,7 \pm 0,1$  nm respectivement.



**Figure III-12 : Double approximation gaussienne réalisée sur les images avec les probabilités  $P=0$  (A) et  $P=0,99$  (B). Evolution des paramètres d'ordre en fonction de la probabilité d'association. C) Les longueurs caractéristiques. D) Les longueurs de corrélation. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types déterminés lors de l'approximation.**

La Figure III-13 présente l'utilisation de cette méthode pour une image AFM d'origamis déposés sur une surface de  $\text{SiO}_2$  et les paramètres d'ordre déterminés peuvent être retrouvés dans le Tableau III-2.

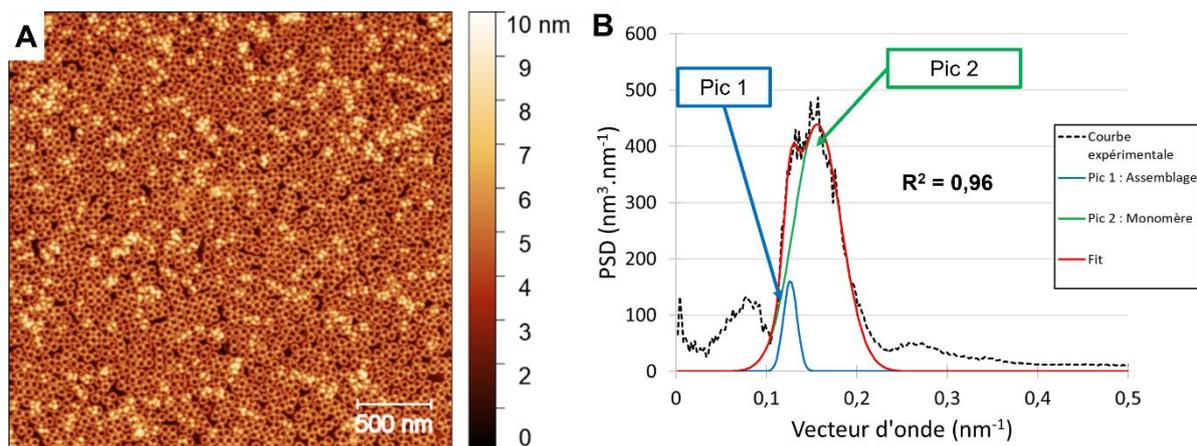


Figure III-13 : A) Image AFM de réseaux 2D en origamis d'ADN auto-assemblés sur une surface de SiO<sub>2</sub>. B) Décomposition de la PSD radiale correspondante.

	Longueur caractéristique (nm)	Longueur de corrélation $\xi'$ (nm)
Pic 1 : Assemblage	49,6 ± 0,3	384 ± 73
Pic 2 : Monomère	40,4 ± 0,3	96,9 ± 3,3

Tableau III-2 : Tableau récapitulatif des longueurs caractéristiques et des longueurs de corrélation associées à chaque pic.

### III.2.3.3 Détection des centres des origamis

Nous avons mis au point, en interne, un code Python permettant la détection des centres des origamis afin de déterminer différents paramètres d'ordre. Le principe de cette méthode de traitement repose sur différentes étapes. Dans un premier temps, les images (AFM ou CD-SEM) sont traitées de la même façon que la méthode de la PSD avec l'aplanissement, les méthodes de convolution et la binarisation.

Ensuite, une zone de détection est paramétrée afin de pouvoir choisir les dimensions des structures à détecter<sup>[144]</sup>. Une fois cette étape réalisée, les centres repérés sont connectés les uns aux autres à l'aide d'une méthode de triangulation Delaunay<sup>[143]</sup> et d'un filtrage des distances de connexions. Enfin un second filtrage sur les angles des connexions est réalisé afin d'éviter les fausses liaisons. La Figure III-14 présente les différentes étapes de la méthode de détection des centres sur une image CD-SEM d'origamis d'ADN déposés sur une surface de SiO<sub>2</sub>.

Via cette méthode, différents paramètres d'ordre peuvent être déterminés :

- **Le taux d'organisation** : ce paramètre correspond au nombre d'origamis connectés divisé par le nombre d'origamis détectés sur la surface.
- **Le taux de carrés** : cette donnée est calculée en divisant le nombre de carrés détectés par le nombre d'origamis présent sur la surface. La détection des carrés a été rendue possible en utilisant la méthode « Depth First Search limité en profondeur » [145].
- **La connectivité moyenne** : elle correspond au nombre moyen de voisins proches de chaque origami. Dans un cas parfait, ce paramètre est de 4.

Les valeurs déterminées avec cette méthode pour l'image CD-SEM de la Figure III-14 sont présentées dans le Tableau III-3.

Taux d'organisation (%)	Taux de carrés (%)	Connectivité moyenne
91,1 %	11,9 %	2,2

Tableau III-3 : Tableau récapitulatif des paramètres d'ordre issus de la méthode de détection des centres.

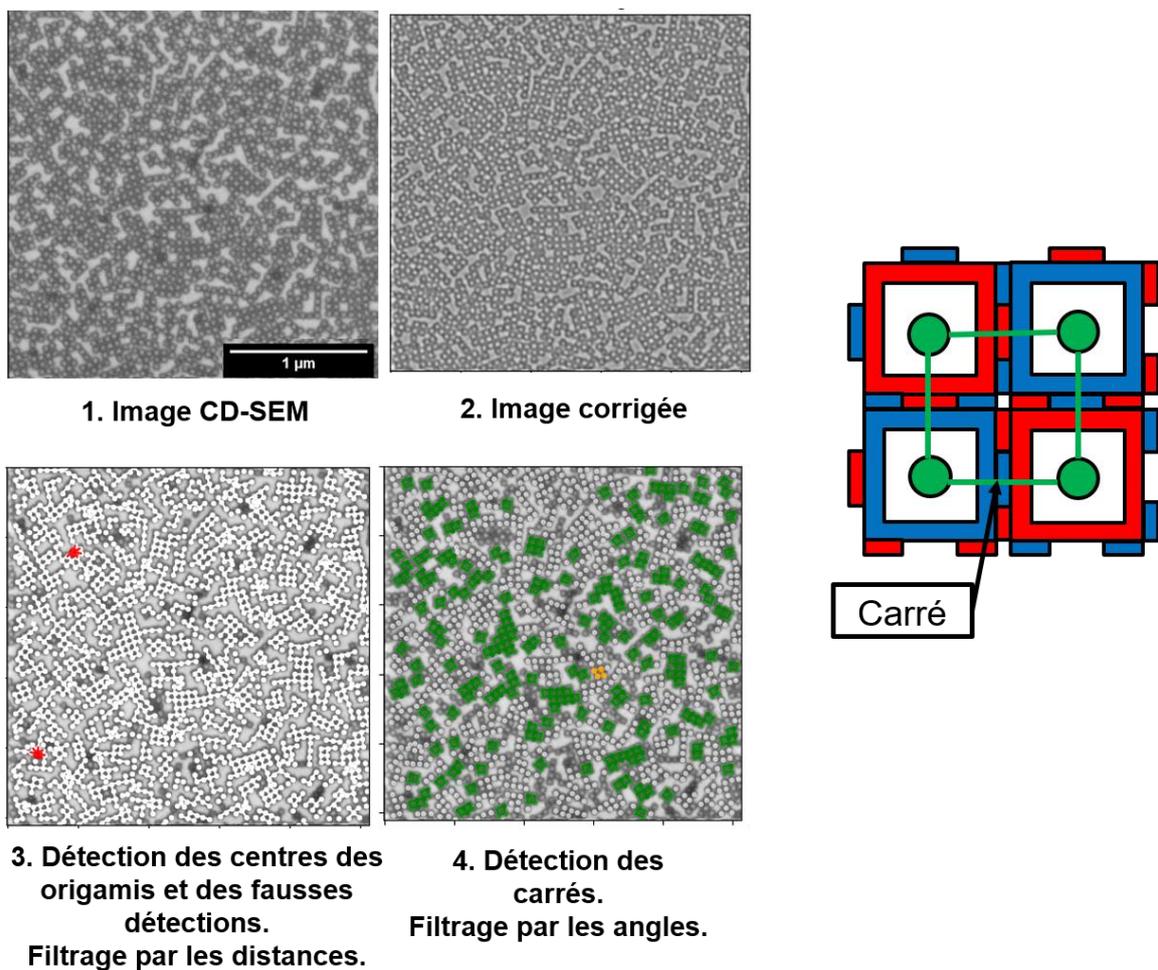


Figure III-14 : Schéma descriptif de la méthode de détection des centres.

## III.3 Auto-assemblage assisté par substrat des réseaux 2D en origamis d'ADN

### III.3.1.1 Auto-assemblage assisté par substrat des réseaux 2D en présence de $MgCl_2$

Dans un premier temps, mon objectif a été d'étudier l'auto-assemblage des réseaux 2D uniquement en présence de  $MgCl_2$ . Différents paramètres ont été étudiés :

1. La composition de la solution de rinçage eau-EtOH,
2. La concentration en  $MgCl_2$ ,
3. La concentration en monomères.

#### ❖ Influence de la composition de la solution de rinçage

Comme nous l'avons évoqué dans la section I.3.1, la composition de la solution de rinçage (eau-EtOH) a une forte influence sur la désorption des origamis d'ADN de la surface du substrat de  $SiO_2$ . Lors de sa thèse, Marie Marmiesse <sup>[69]</sup> a pu mettre cela en évidence en utilisant des réseaux 2D hexagonaux auto-assemblés par appariement de bases. La diminution de la proportion volumique ( $x_{EtOH}$ ) en EtOH de  $x_{EtOH} = 1$  à  $x_{EtOH} = 0$  a provoqué la baisse du taux de présence de la surface et la dépolymérisation des réseaux 2D. Cela a été attribué au fait que la première sphère de coordination de  $Mg^{2+}$  possède quatre molécules d'éthanol pur. En sachant que le nombre moyen de coordination de l'eau pour  $Mg^{2+}$  est de 6 <sup>[73]</sup>, une solution de rinçage composé d'eau et d'éthanol provoque la liaison du  $Mg^{2+}$  avec une molécule d'eau et trois molécules d'éthanol <sup>[74]</sup>. L'état de solvation de ce dernier est donc réduit <sup>[69]</sup>. La présence d'un fort taux d'EtOH dans la solution de rinçage a donc pour conséquence de permettre la stabilisation des origamis sur la surface du  $SiO_2$  durant le rinçage.

Il est important pour nous de faire cette caractérisation dans le cas de nos nanostructures. En effet, la complémentarité de forme exploite des interactions faibles. Il est donc nécessaire d'avoir une idée de l'influence de l'EtOH sur la stabilisation des réseaux 2D sur le substrat.

Afin de mettre en évidence cela, nous avons déposés les origamis ( $[2D_A] = [2D_B] = 6$  nM) sur les substrats en présence de 40 mM de  $MgCl_2$ . L'incubation a été de 24 h à 25 °C. La proportion volumique en EtOH ( $x_{EtOH}$ ) dans la solution de rinçage a été variée de  $x_{EtOH} = 0,1$  à  $x_{EtOH} = 1$ . Les images AFM des échantillons sont présentées sur la Figure III-15.

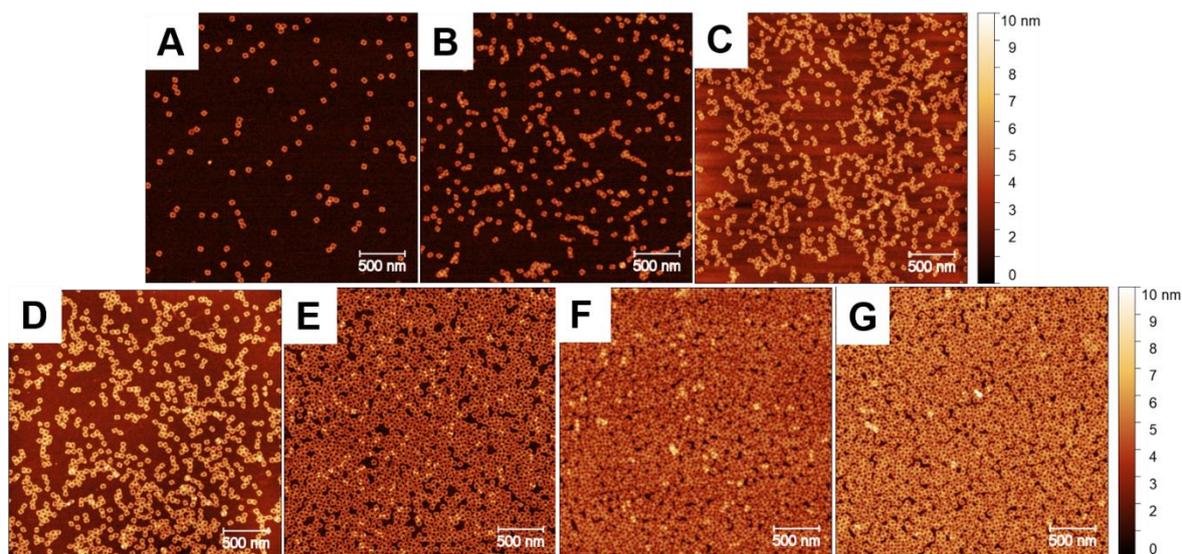


Figure III-15 : Images AFM des échantillons rincés avec différentes proportions en eau et en éthanol : A)  $x_{EtOH} = 0,1$ , B)  $x_{EtOH} = 0,5$ , C)  $x_{EtOH} = 0,6$ , D)  $x_{EtOH} = 0,7$ , E)  $x_{EtOH} = 0,8$  et F)  $x_{EtOH} = 0,9$ , G)  $x_{EtOH} = 1$ .

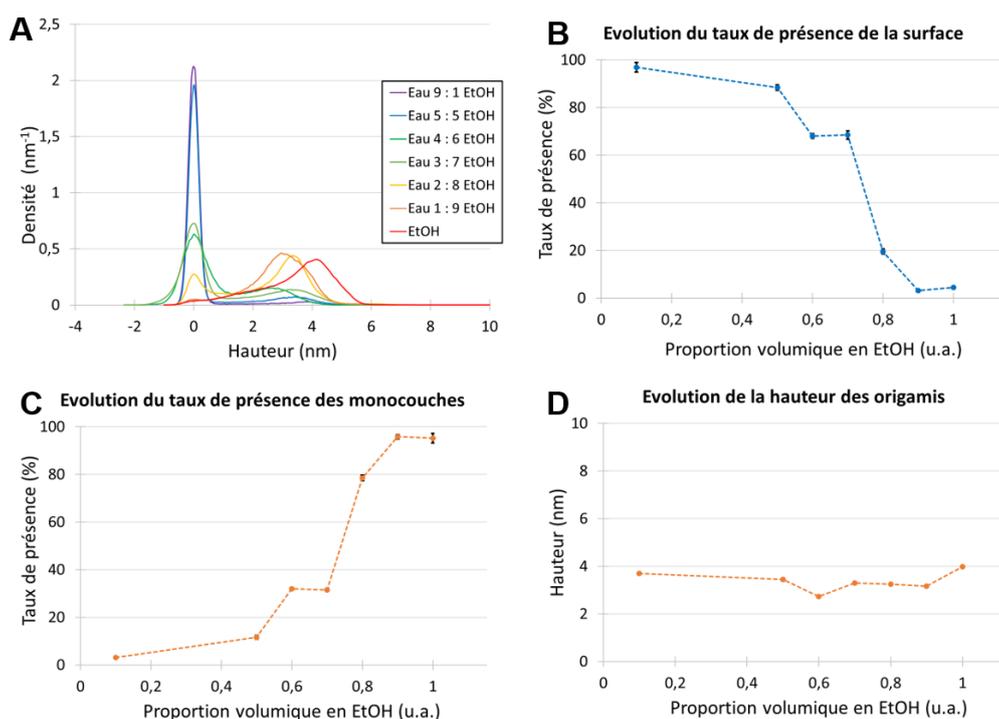


Figure III-16 : A) Histogrammes des hauteurs des échantillons rincés avec différentes proportions en EtOH. B) Evolution du taux de présence de la surface en fonction de la composition de la solution de rinçage. C) Evolution du taux de présence des monocouches en fonction de la composition de la solution de rinçage. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types déterminés lors de l'approximation.

La Figure III-16-C nous montre que le taux de présence des monocouches augmente avec la hausse de la proportion en EtOH dans la solution de rinçage. Cette augmentation est assez lente entre  $x_{EtOH} = 0,1$  et  $x_{EtOH} = 0,7$  puis nous observons une très forte montée du taux de présence des monocouches à partir de  $x_{EtOH} = 0,8$ . Cela veut donc dire que **la présence d'EtOH** dans la solution de rinçage **limite la désorption des réseaux** sur la surface du  $SiO_2$ . Nous pouvons aussi remarquer que l'épaisseur des nanostructures se situe entre 2,7 et 4,0 nm (Figure III-16-D). Cette épaisseur est différente de celle observée en TEM dans la section II.1.4.1.2 ( $12,3 \pm 0,3$  nm). L'erreur correspond à l'écart-type.

L'épaisseur des motifs a été mesurée de façon plus précise avec une pointe Ultrasharp et le mode Peak Force Tapping. L'image obtenue est présentée sur la Figure III-17. Des sections ont été tracées sur les origamis afin de connaître leur épaisseur (hauteur de la gaussienne) et les dimensions critiques des bords (largeur à mi-hauteur de la gaussienne). Ces dernières ont été déterminées en approximant chaque pic par une courbe gaussienne. Les origamis ont donc une épaisseur de  $5,1 \pm 0,7$  nm ( $N = 16$ ) et la dimension critique des bords est de  $16,6 \pm 2,1$  nm ( $N = 16$ ). Cette perte d'épaisseur est associée aux conditions à sec menant à une déshydratation des molécules d'ADN <sup>[146]</sup>.

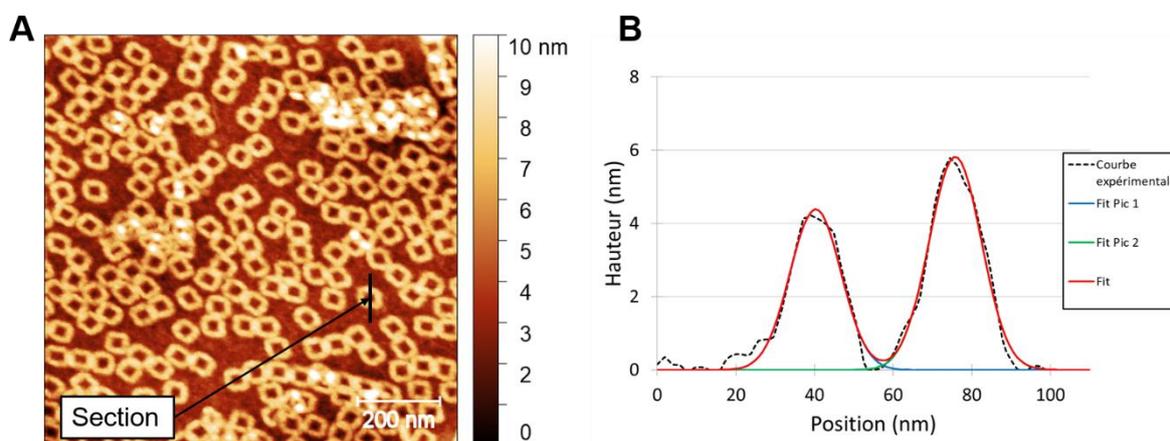
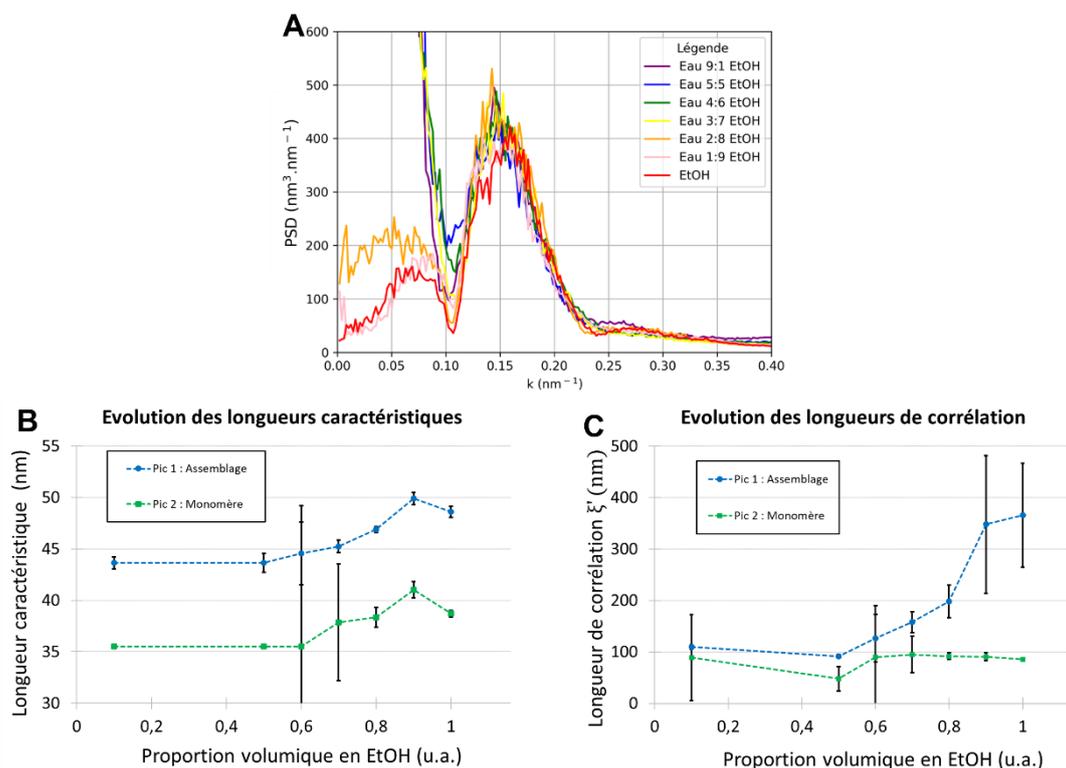


Figure III-17 : A) Image AFM d'origamis d'ADN déposés sur une surface de  $SiO_2$  en présence de 40 mM de  $MgCl_2$ . B) Distribution des hauteurs retrouvées sur un origami à l'aide de la coupe en section.

Dans le cas des longueurs caractéristiques, nous observons qu'elles sont stables entre  $x_{EtOH} = 0,1$  et  $x_{EtOH} = 0,5$ . Dans cette gamme, la longueur caractéristique associée au pic d'assemblage est d'environ 45 nm et celle associée au pic des monomères est d'environ 36 nm. D'après la méthode présentée dans la section III.2.3.2 les valeurs trouvées sont caractéristiques des périodes internes au monomère sans assemblage. Les mesures de ces périodes sur les images binarisées n'a pas été possible car il est difficile de différencier les différents composants au sein des origamis. Néanmoins, la période moyenne, sans prendre en compte la dissymétrie du monomère, est de  $38,9 \pm 3,4$  nm ( $N = 25$ ). Entre  $x_{EtOH} = 0,5$  et  $x_{EtOH} = 0,9$ , la dimension caractéristique associée au pic d'assemblage augmente et atteint une valeur maximale de  $49,9 \pm 0,6$  nm. Celle associée au pic des monomères atteint une valeur maximale de  $41,0 \pm 0,8$  nm. Concernant la longueur de corrélation, celle associée au pic des monomères

est quasiment stable à toutes les conditions. Dans le cas du pic d'assemblage, la longueur de corrélation associée est stable entre  $x_{EtOH} = 0,1$  et  $x_{EtOH} = 0,5$  avec une valeur autour de 100 nm. A partir de  $x_{EtOH} = 0,5$ , le paramètre augmente jusqu'à  $x_{EtOH} = 1$  avec une valeur de  $366 \pm 101$  nm. Les paramètres d'ordre obtenus permettent d'observer le passage d'un système faiblement assemblé à un système avec un taux d'assemblage élevé avec l'augmentation de la proportion en EtOH. Autrement dit, l'augmentation de la proportion en eau dans la solution de rinçage favorise la dépolymérisation des réseaux 2D en plus des effets de désorption de la surface.



**Figure III-18 :** A) PSD radiales des images AFM des échantillons en fonction de la composition de la solution de rinçage. Evolution des paramètres d'ordre en fonction de la composition de la solution de rinçage. B) La longueur caractéristique. C) La longueur de corrélation  $\xi'$ . Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types déterminés lors de l'approximation.

Les observations faites avec la décomposition des PSD radiales des images AFM ont été complétées avec la méthode de détection des centres des origamis d'ADN (voir la Figure III-19). Dans un premier temps, nous observons que la hausse de la proportion volumique en EtOH entraîne l'augmentation du taux d'organisation à la surface du substrat. Nous observons que le taux d'organisation s'intensifie entre  $x_{EtOH} = 0,1$  et  $x_{EtOH} = 1$  avec des valeurs respectives de 5,7 % et de 55,4 %. Dans le cas du taux de carrés, nous observons qu'il augmente entre  $x_{EtOH} = 0,1$  et  $x_{EtOH} = 1$  avec des taux passant de 0,4 % et 2,3 %. Cependant, nous observons un point particulier pour  $x_{EtOH} = 0,7$  avec une valeur de 1,1 %. A cette condition, il y a assez d'EtOH dans la solution de rinçage afin de garantir la fixation des origamis sur la surface lors du rinçage. De plus, la structure des réseaux 2D est stabilisée.

Cela permet de mettre en évidence que ce sont les nanostructures désorganisées qui se désorbent préférentiellement de la surface d'où l'augmentation du taux de carrés de  $x_{EtOH} = 0,6$  à  $x_{EtOH} = 0,7$  et sa diminution de  $x_{EtOH} = 0,7$  à  $x_{EtOH} = 0,8$ . Dans le cas de la connectivité moyenne nous observons qu'elle s'amplifie entre  $x_{EtOH} = 0,1$  et  $x_{EtOH} = 1$ , la valeur maximale atteinte étant de 1,7. Cela valide la désorganisation des réseaux avec la baisse de la proportion volumique d'EtOH dans la solution de rinçage.

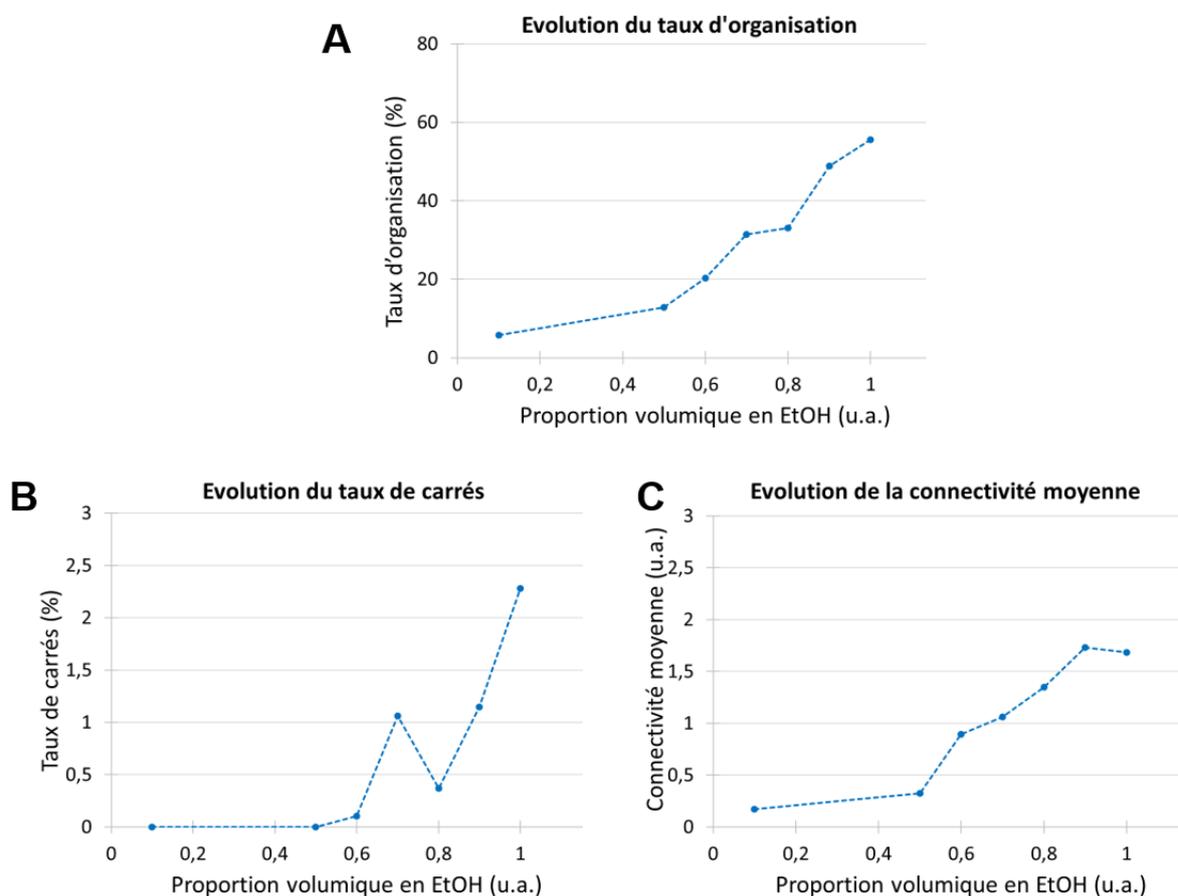


Figure III-19 : Evolution des paramètres d'ordre en fonction de la proportion volumique en EtOH. A) Le taux d'organisation. B) Le taux de carrés. C) La connectivité moyenne.

#### ❖ Influence de la concentration en $MgCl_2$

En solution, la concentration en  $MgCl_2$  permet la formation des réseaux. Lors de l'auto-assemblage sur surface d'oxyde, cette concentration garantie la fixation des nanostructures sur le substrat. Afin d'autoriser l'auto-assemblage sur surface il est donc primordiale de contrôler à la fois les interactions ADN-surface et les interactions ADN-ADN.

Pour mettre en évidence l'influence de la concentration en  $MgCl_2$ , nous avons réalisé le protocole d'auto-assemblage avec des concentrations comprises entre 20 mM et 100 mM en  $MgCl_2$ . La concentration en origamis est de 6 nM pour chaque type de monomère. Les échantillons ont ensuite

été observés à l'AFM (Figure III-20). L'analyse des images a été réalisée en calculant les histogrammes des hauteurs (Figure III-21 ), mais aussi les PSD radiales (Figure III-23).

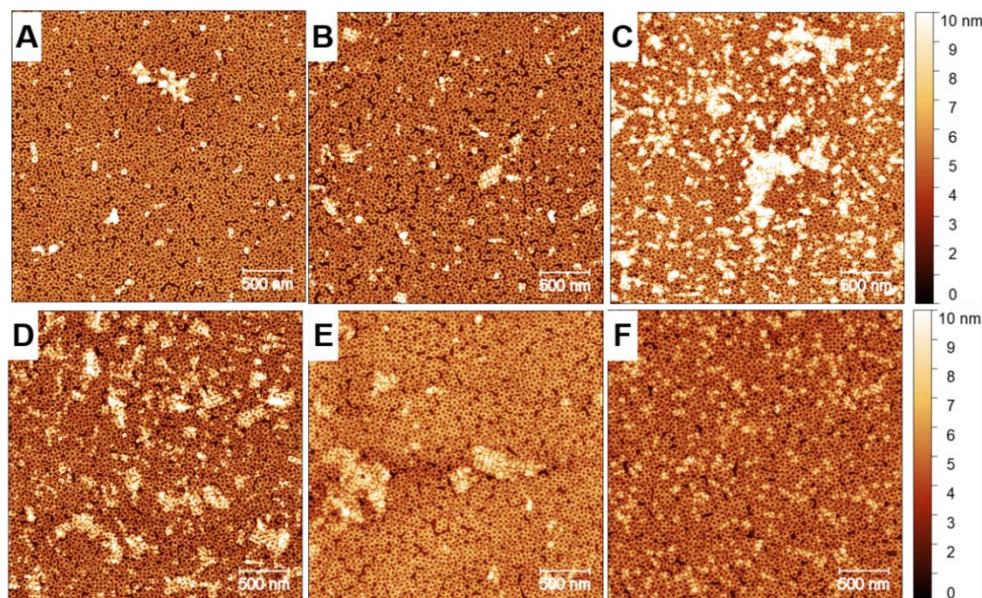


Figure III-20 : Images AFM des réseaux 2D auto-assemblés sur surface en fonction des différentes concentrations en  $MgCl_2$ . A) 20 mM. B) 30 mM. C) 40 mM. D) 60 mM. E) 80 mM. F) 100 mM.

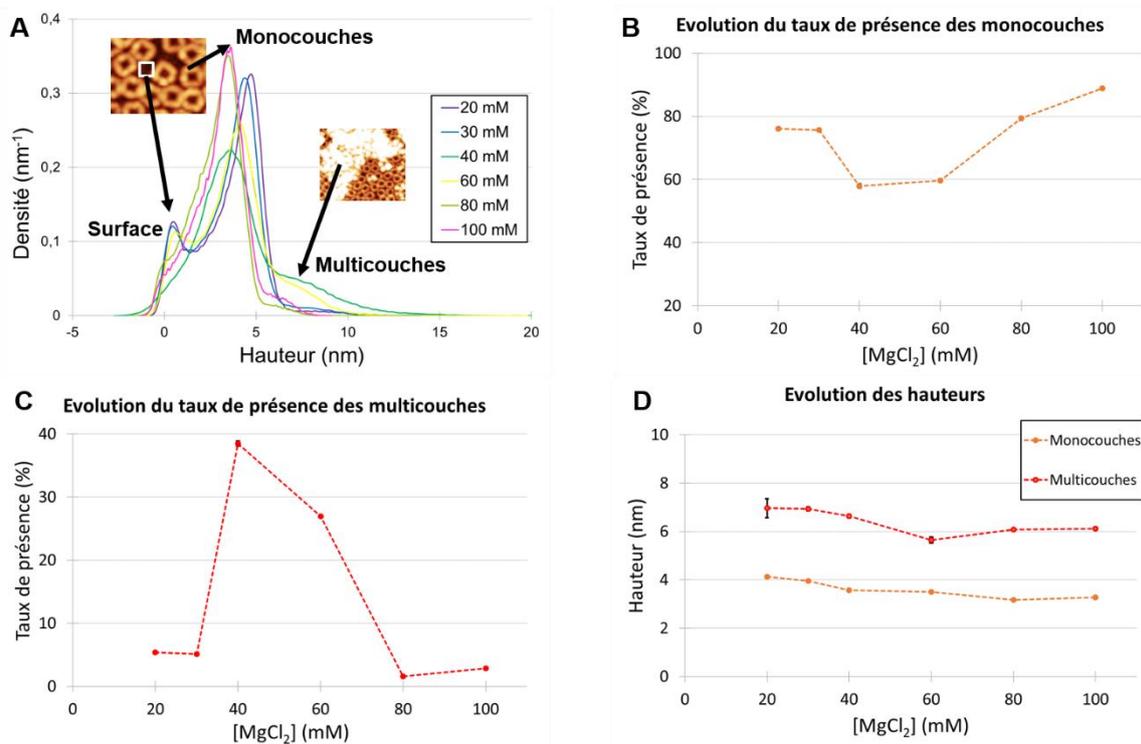
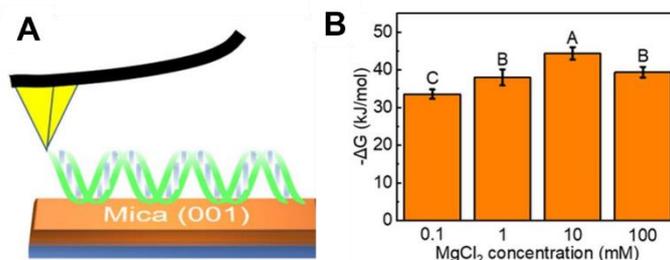


Figure III-21 : A) Histogrammes des hauteurs des images AFM des échantillons auto-assemblés sur surface en présence de  $MgCl_2$ . Evolution des paramètres en fonction de la concentration en  $MgCl_2$ . B) Le taux de

**présence des monocouches à la surface du substrat de SiO<sub>2</sub>. C) Le taux de présence des multicouches à la surface du substrat de SiO<sub>2</sub>. D) La hauteur des motifs.**

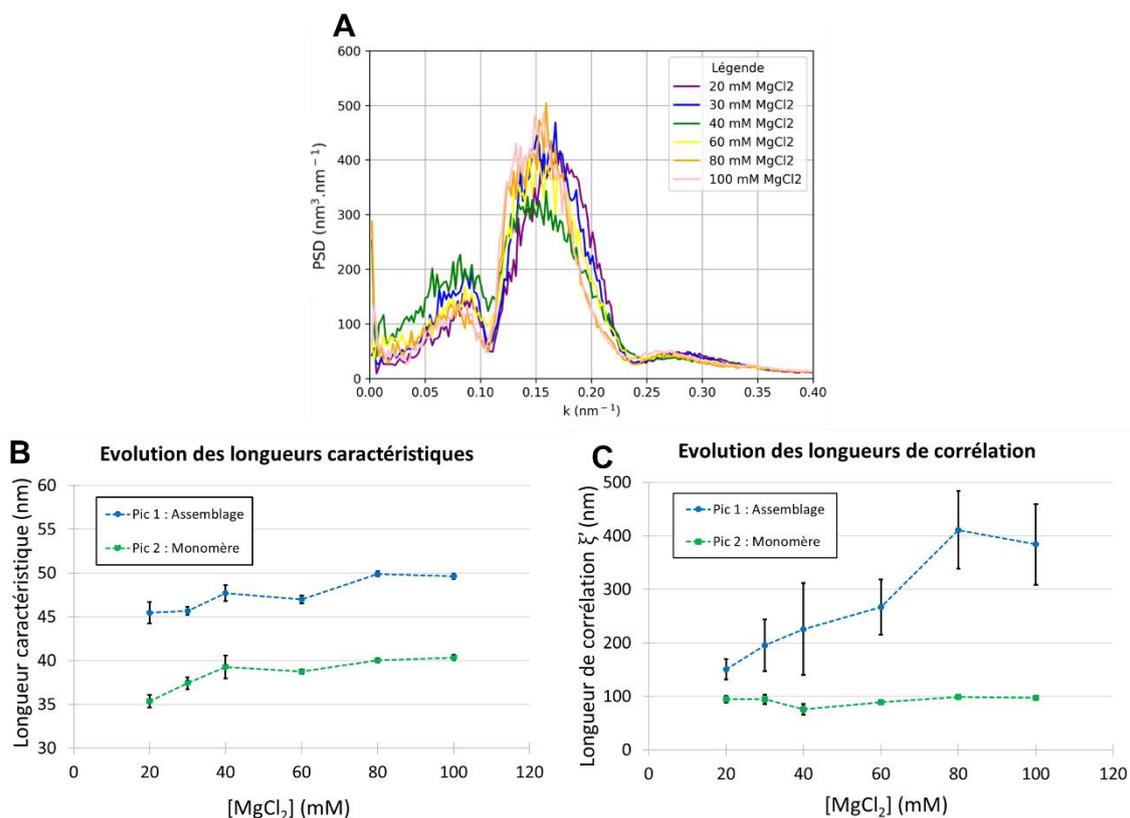
Dans un premier temps, les images AFM des échantillons (Figure III-20) permettent d'observer la formation de multicouches en fonction de la concentration en MgCl<sub>2</sub>. En traçant les histogrammes des hauteurs des échantillons et en décomposant les courbes obtenues (Figure III-21), nous avons pu mettre en évidence le fait que le taux présence des multicouches augmente entre 20 mM et 60 mM en MgCl<sub>2</sub>. Cependant, il diminue étonnement entre 40 mM et 100 mM. Ce résultat s'explique par le fait que l'interaction ADN-SiO<sub>2</sub>, se fait aussi via la formation de liaisons hydrogène entre les nucléotides de l'ADN et les groupements silanol du substrat [147].

En outre, une étude menée par Hang Zhai *et al.* [148] a permis de montrer que la formation de ces liaisons hydrogène pouvait être limitée par l'augmentation de la concentration en MgCl<sub>2</sub>. Un dépôt d'ADN double brin a été réalisé sur une surface de mica avec des concentrations en MgCl<sub>2</sub> comprises entre 0,1 et 100 mM (voir la Figure III-22). En mesurant l'énergie libre de liaison pour chaque cas à l'aide de l'AFM, ils ont montré qu'elle augmentait entre 0,1 mM (33,57 kJ/mol) et 10 mM (44,36 kJ/mol) en MgCl<sub>2</sub> et qu'elle diminuait entre 10 mM et 100 mM en MgCl<sub>2</sub> (38,58 kJ/mol). Cette observation a aussi été faite dans le cas du piégeage de la minocycline au sein d'un double brin d'ADN [149]. Cette molécule peut se lier aux brins d'ADN par l'utilisation de MgCl<sub>2</sub> et la formation de ponts électrostatiques entre ces deux éléments. Pour une concentration en MgCl<sub>2</sub>, ils ont montré que le pourcentage d'efficacité de piégeage augmentait entre 0 mM et 8 mM en MgCl<sub>2</sub> puis diminuait pour des concentrations plus élevées. Cela a été attribué au fait que l'augmentation de la concentration en MgCl<sub>2</sub> favorisait une accumulation des ions dans la structure de la double hélice. Ce phénomène a entraîné une diminution de l'interaction électrostatique entre la minocycline et l'ADN [149].



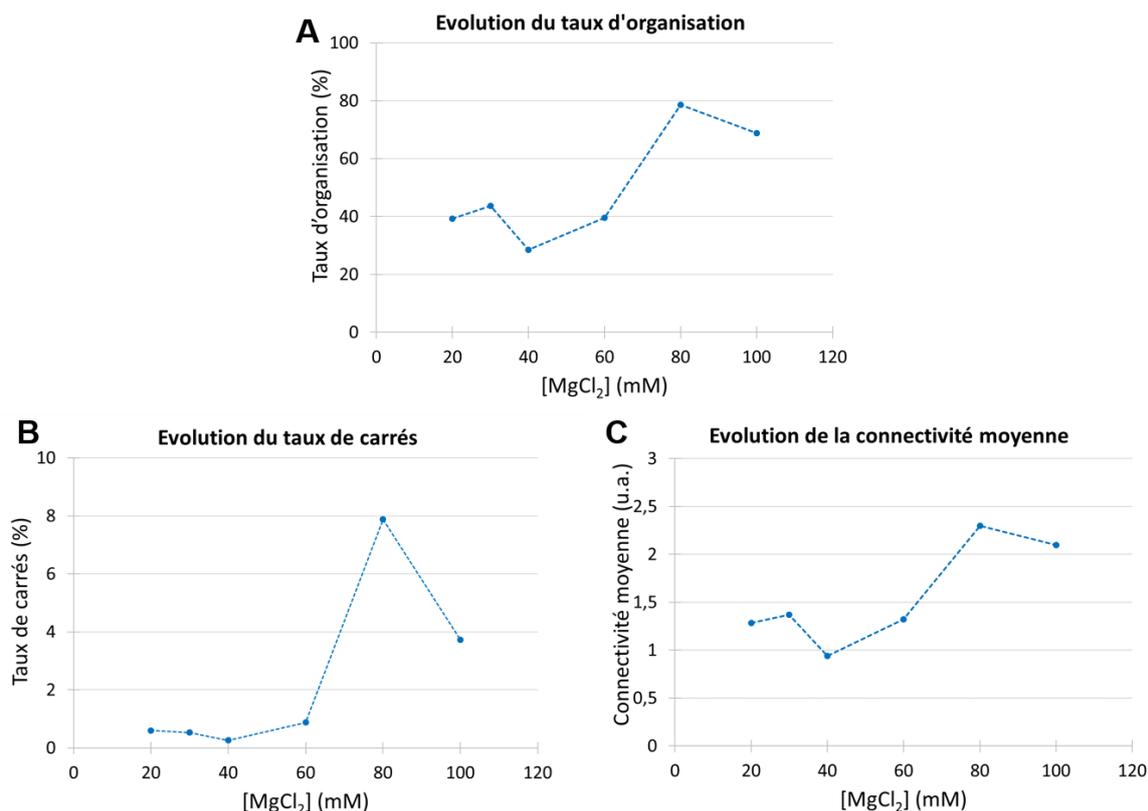
**Figure III-22 : A) Schéma de principe de la méthode de mesure des forces de rupture avec l'AFM. B) Evolution des forces de rupture entre des molécules d'ADN déposées sur une surface de mica en fonction de la concentration en MgCl<sub>2</sub> [148].**

Dans notre cas, nous pouvons donc attribuer la baisse du taux de présence de multicouches à partir de 40 mM en MgCl<sub>2</sub> à une accumulation des ions Mg<sup>2+</sup> dans les origamis. Cela aurait pour conséquence d'empêcher la formation de liaisons hydrogène entre les origamis et la surface et de diminuer les interactions attractives entre ces deux surfaces chargées négativement.



**Figure III-23 :** A) PSD radiales des images AFM des images AFM en fonction de la concentration en MgCl<sub>2</sub>. Evolution des paramètres d'ordre en fonction de la concentration en MgCl<sub>2</sub>. B) Les longueurs caractéristiques C) Les longueurs de corrélation.

Sur la Figure III-23-C, nous observons qu'entre 20 mM et 80 mM en MgCl<sub>2</sub>, la longueur de corrélation  $\xi$  associée au pic d'assemblage augmente. Elle passe de  $150 \pm 19$  nm à  $411 \pm 73$  nm. Nous observons une légère baisse à 100 mM en MgCl<sub>2</sub> avec une valeur de  $384 \pm 76$  nm. Ainsi, aux faibles concentrations en MgCl<sub>2</sub> (à 20 mM et 30 mM), les origamis sont déposés aléatoirement sur la surface. Un ordre plus important apparaît pour les concentrations plus élevées (à partir de 40 mM). Selon nous, à 20 mM et 30 mM nous favorisons les interactions ADN-surface par rapport aux interactions ADN-ADN. Cela entraîne la formation de monocouches d'ADN peu organisées qui sont ensuite recouvertes par des multicouches. L'établissement de ces multicouches est favorisé par l'augmentation de la concentration en MgCl<sub>2</sub>. Entre 40 mM et 100 mM en MgCl<sub>2</sub>, nous permettons les interactions ADN-ADN par rapport aux interactions ADN-surface. Ainsi, des réseaux 2D se forment dans la goutte de tampon avant de se déposer sur la surface de l'oxyde d'où l'organisation plus importante<sup>[101]</sup>. Au vu des résultats obtenus, nous pouvons dire que nous passons d'un système peu organisé à un système hautement organisé.



**Figure III-24 : Evolution des paramètres d'ordre en fonction de la concentration en  $MgCl_2$ . (A) Le taux d'organisation, (B) Le taux de carrés, (C) La connectivité moyenne.**

Les résultats de la détection des centres sont montrés dans la Figure III-24. Nous remarquons que le taux d'organisation est d'environ 40 % à 20 mM, 30 mM et 60 mM en  $Mg^{2+}$  avec un décrochage à 28,5% pour 40 mM en  $Mg^{2+}$ . Ce décrochage peut être attribué à la forte présence de multicouches. Ce paramètre augmente à 78,5 % pour 80 mM en  $Mg^{2+}$  et diminue légèrement à 100 mM avec une valeur de 68,8 %. Dans le cas du taux de carré, nous observons des valeurs inférieures à 1 % pour les concentrations comprises entre 20 mM et 60 mM en  $MgCl_2$ . Une forte augmentation est observée en présence de 80 mM en  $Mg^{2+}$  avec une valeur de 7,9 %. Cette valeur est de 3,7 % à une concentration de 100 mM. Concernant la connectivité moyenne, nous observons qu'elle est de 1,3 à 20 mM et de 1,4 à 30 mM en  $MgCl_2$ . Elle passe à 0,9 pour une concentration de 40 mM et augmente jusqu'à 2,3 en présence de 80 mM en  $MgCl_2$ . Cependant elle repasse à 2 pour 100 mM en  $MgCl_2$ . Toutes ces observations montrent que la hausse de la concentration en  $MgCl_2$  favorise la formation des réseaux 2D à la surface du substrat. Nous observons que la présence de multicouches entraîne la détection de paramètres d'ordre plus faibles que celles attendues (à 40 mM et 60 mM en  $MgCl_2$ ). Outre ces deux conditions, l'augmentation de la concentration en  $Mg^{2+}$  de 20 mM à 80 mM permet de favoriser les interactions ADN-ADN et donc de former des réseaux 2D plus larges. Concernant les valeurs obtenues à 100 mM, nous attribuons cela à une plus forte répulsion entre les nanostructures d'ADN provoquée par l'écrantage des charges des molécules d'ADN par les cations divalents. Dans ce cas, l'organisation totale est sensiblement la même mais les carrés sont moins présents.

❖ Influence de la concentration en monomère

Nous avons montré que l'augmentation de la concentration en  $Mg^{2+}$  de 20 mM à 40 mM permet de favoriser les interactions attractives ADN- $SiO_2$ . Cependant, en augmentant cette concentration de 40 mM à 60 mM, la formation des liaisons hydrogène entre l'ADN et le substrat est limitée. Afin de mettre en évidence ce phénomène, nous avons étudié l'influence de la concentration en monomère et de la concentration en  $MgCl_2$  sur le recouvrement de surface et sur l'ordre observé. Pour ce faire, nous avons fait varier **la concentration en monomères** (2 nM ; 4 nM et 6 nM pour chaque type de structure) et **la concentration en  $Mg^{2+}$**  (40 mM ; 80 mM et 100 mM). Les images AFM des échantillons sont présentées sur la Figure III-25.

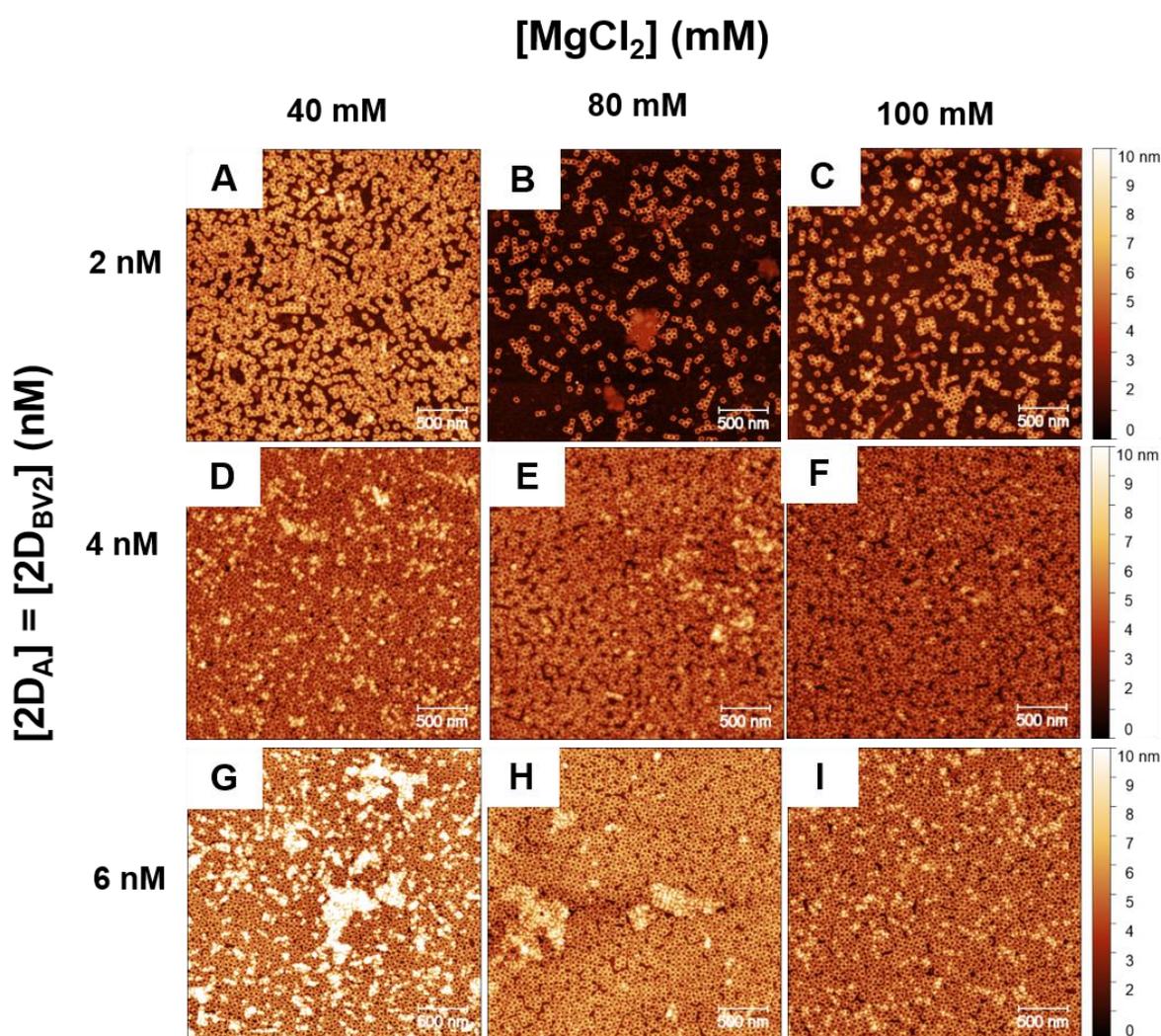
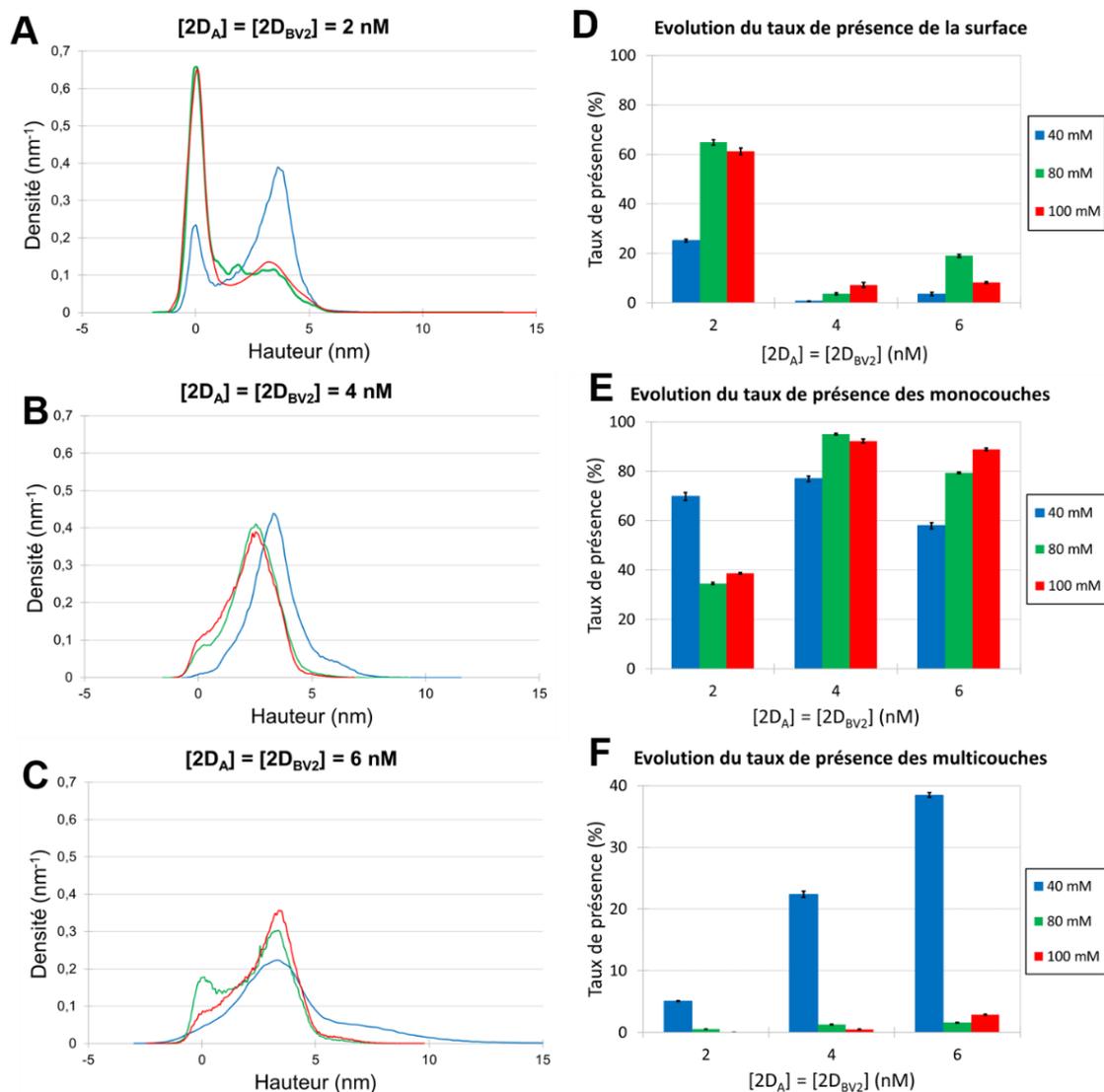


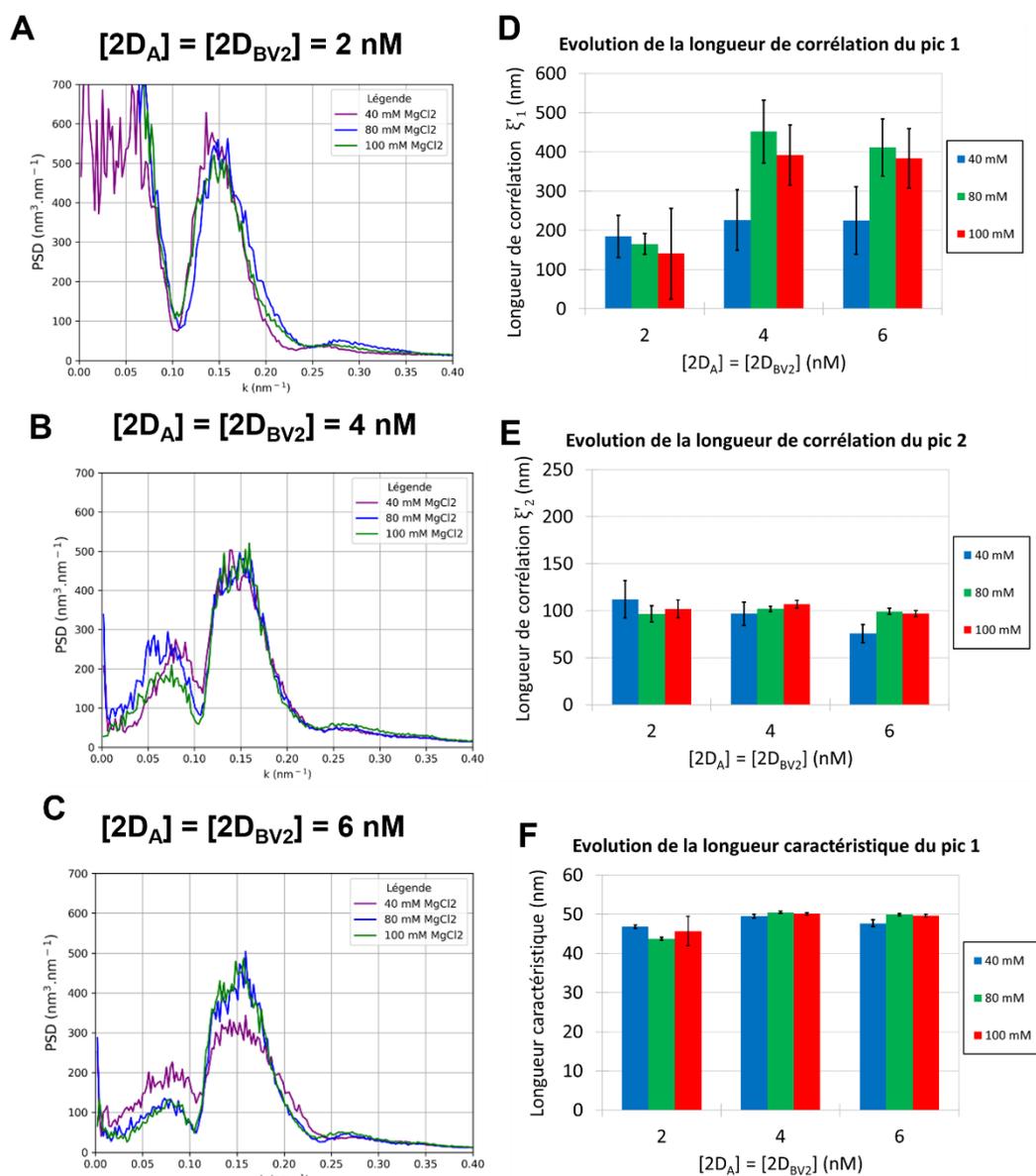
Figure III-25 : Images AFM des réseaux auto-assemblés sur la surface de  $SiO_2$  en présence de différentes concentrations de monomères et de  $MgCl_2$ .

La mesure du taux de présence de chaque composant des images est présentée sur la Figure III-26. Dans un premier temps, nous observons qu'à 2 nM pour chaque monomère, le taux de présence des monocouches maximum est atteint en présence de 40 mM de  $Mg^{2+}$  avec une valeur de  $69,8 \pm 1,7$  %. Elle est de  $34,6 \pm 0,4$  % à 80 mM et de  $38,7 \pm 0,4$  % à 100 mM. A 4 nM pour chaque monomère, nous observons une augmentation du taux de présence des monocouches. Cependant, nous remarquons aussi une augmentation du taux de multicouches surtout dans le cas à 40 mM en  $MgCl_2$  (avec une valeur de  $22,4 \pm 0,5$  %). Cette valeur passe à  $38,5 \pm 0,4$  % pour la même concentration en  $MgCl_2$  mais pour une concentration de 6 nM pour chaque monomère. Pour les autres concentrations en monomère, le taux de présences des multicouches reste faible ( $< 3$  %) en présence de de 80 mM et 100 mM en  $MgCl_2$ . Toutes ces observations nous permettent de valider le fait que l'augmentation de la concentration en ions magnésium limite la formation des liaisons H entre les origamis et la surface. Ainsi, pour des concentrations supérieures à 40 mM, le recouvrement de surface sera plus faible. De plus, pour de fortes concentrations en origamis, nous notons des taux de présence des multicouches plus élevés à 40 mM qu'à 80 mM et 100 mM. Il est donc possible de dire que la formation des monocouches est favorisée par rapport à celle des multicouches.



**Figure III-26 : A-C) Histogrammes des hauteurs des images AFM des réseaux auto-assemblés sur la surface de  $\text{SiO}_2$  en présence de différentes concentrations en  $\text{MgCl}_2$  et en monomères. Evolution des taux de présence de la surface (D), des monocouches (E) et des multicouches (F) en fonction de la concentration en  $\text{MgCl}_2$  et en monomères.**

L'étude des PSD radiales (Figure III-27) permet de voir que la longueur de corrélation à 2 nM pour chaque type de monomère est similaire pour chaque concentration en  $\text{MgCl}_2$ . Elle inférieure à 190 nm pour cette concentration en monomères. Cependant nous observons qu'en augmentant la concentration en  $\text{MgCl}_2$  (4 nM et 6 nM) nous amplifions grandement la valeur de ce paramètre d'ordre à 80 mM et 100 mM en  $\text{MgCl}_2$ . Nous obtenons, en effet, des longueurs de corrélation supérieures à 380 nm avec un maximum à  $451,7 \pm 80,5$  nm pour 80 mM en  $\text{MgCl}_2$  et 6 nM pour chaque monomère.



**Figure III-27 : A-C) PSD radiales des images AFM des réseaux 2D auto-assemblés sur le  $\text{SiO}_2$  en présence de différentes concentrations en  $\text{MgCl}_2$  et en monomères. E-F) Evolution des longueurs de corrélation et de la longueur caractéristique associée au pic 1. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types déterminés lors de l'approximation.**

Nous obtenons les mêmes tendances avec la méthode de détection des centres (Figure III-28). En effet, concernant le taux d'organisation, les valeurs à 2 nM en monomères sont très proches. Elle varie entre 50% et 42%. En augmentant la concentration en monomères, la différence d'organisation est plus marquée entre 40 mM et 80 mM en  $\text{MgCl}_2$ . Entre 80 mM et 100 mM nous avons sensiblement le même taux d'organisation à 4 nM et 6 nM en  $\text{MgCl}_2$ . Pour le taux de carrés nous observons qu'à 2 nM en monomère, sa valeur croît entre 1 % et 3,7% entre 40 mM et 100 mM en  $\text{MgCl}_2$ . En augmentant la concentration en monomères, nous notons la hausse des valeurs de ce paramètre d'ordre. Les

variations les plus significatives se trouvent à 80 mM et 100 mM en  $MgCl_2$  et à 4 nM en monomères. Cependant, le cas à 6 nM en monomères est un peu différent. En effet, pour 100 mM en  $MgCl_2$ , nous observons une valeur égale à celle à 2 nM. Cela signifie qu'à cette concentration en monomères, la formation de réseaux 2D est plus limitée. Cela est sûrement due à la saturation de la surface par les origamis d'ADN provoquant à 100 mM en  $MgCl_2$  une légère désorganisation des réseaux 2D. Concernant la connectivité moyenne, à 2 nM les valeurs sont comprises entre 1,2 et 1,4. A 4 nM en monomères elles sont comprises entre 1,9 et 2,4. Le cas particulier se trouve à 6 nM en monomères. En effet, à 40 mM en  $MgCl_2$  la connectivité moyenne est de 0,9 et passe au-dessus de 2 pour les concentrations en  $MgCl_2$  plus élevées. Cette faible valeur observée à 40 mM peut être attribuée au fort taux de présences des multicouches pouvant gêner la détection des centres et diminuer les paramètres d'ordre obtenus.

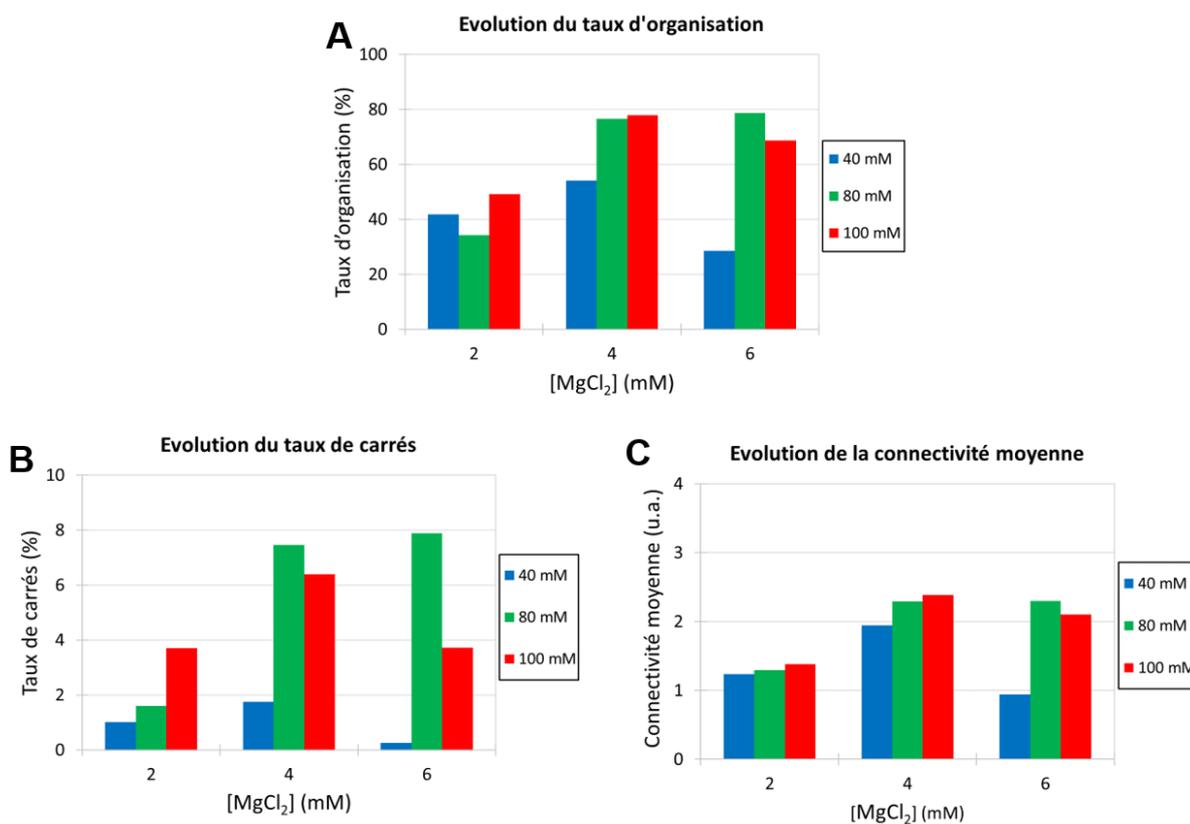


Figure III-28 : Evolution des paramètres d'ordre en fonction de la concentration en  $MgCl_2$  et de celle en monomères. A) Le taux d'organisation. B) Le taux de carrés. C) La connectivité moyenne.

### ❖ Synthèse

Dans un premier temps, nous avons montré l'influence de la composition de la solution de rinçage eau-EtOH sur la dépolymérisation des réseaux 2D et sur la désorption de la surface des

origamis de la surface. En présence de 40 mM de  $MgCl_2$ , nous avons pu observer que le taux de présence des monocouches augmentent avec l'élévation de la proportion volumique en EtOH dans la solution de rinçage. En effet, ce paramètre est passé de 3 % à  $x_{EtOH} = 0,1$  à plus de 60 % à partir de  $x_{EtOH} = 0,8$ . Concernant l'évaluation des paramètres d'ordre, les deux méthodes utilisées (PSD radiales et détection des centres) nous ont permis de montrer que la présence d'EtOH dans la solution de rinçage permet de stabiliser la structure interne des réseaux 2D et d'éviter leur dépolymérisation. Ainsi les meilleurs paramètres d'ordre ont été obtenus pour des proportions volumiques en EtOH supérieures 0,9. Cela montre l'effet couplé de la dépolymérisation des réseaux 2D et de la désorption des origamis de la surface et donc le passage d'un système ordonné à un système peu ou pas ordonné.

Ensuite, nous avons mis en évidence **l'effet de la concentration en  $MgCl_2$  et en monomères** sur le taux de présence et sur les paramètres d'ordre. Nous avons observé que l'augmentation de la concentration en  $MgCl_2$  entre 20 mM et 40 mM favorise la formation de multicouches. Nous l'avons attribué à l'amplification du nombre de ponts électrostatiques entre les origamis d'ADN et la surface de  $SiO_2$  avec l'ajout d'ions  $Mg^{2+}$ . Cependant, pour des concentrations supérieures à 40 mM, le taux de présence des multicouches a diminué. Cela est dû au fait que l'interaction ADN- $SiO_2$  se fait aussi via des liaisons hydrogène. La formation de ces dernières peut être limitée par une trop forte augmentation de la concentration en  $MgCl_2$ . Ainsi, cela permet d'expliquer la baisse des multicouches avec la hausse de la concentration en  $MgCl_2$  au-dessus de 40 mM. Cependant, nous avons montré que les paramètres d'ordre ont augmenté entre 20 mM et 100 mM en  $MgCl_2$ . Cette observation a mis en évidence que l'enrichissement de la solution en  $MgCl_2$  a permis l'écrantage des charges des molécules d'ADN et permis une meilleure interaction entre les origamis. Une légère décroissance a pu être observée entre 80 mM et 100 mM en  $MgCl_2$ . Cela peut être dû à une trop forte présence d'ions  $Mg^{2+}$  provoquant une légère inversion de charge des molécules d'ADN et donc une légère amplification de la répulsion. **L'augmentation de la concentration en  $MgCl_2$  a permis le passage d'un taux d'assemblage faible à un taux d'assemblage élevé.** Ces observations ont été validées par les résultats obtenus en couplant la variation de la concentration en monomères et de la concentration en  $MgCl_2$ . En effet, en présence de 2 nM pour chaque type de monomère, le taux de présence le plus important a été observée en présence de 40 mM en  $MgCl_2$ . A 4 nM en monomères, tous les échantillons ont présenté des monocouches avec un faible taux de présence de multicouches. A 6 nM en monomères seul le cas à 40 mM a présenté un très fort taux de présence des multicouches. Cela nous oriente vers le fait que la formation des monocouches est favorisée par rapport à celles des multicouches. De plus, cela valide nos observations quant à la limitation de la formation des liaisons hydrogène entre l'ADN et le  $SiO_2$  et la diminution des interactions attractives entre les deux surfaces aux fortes concentrations en  $MgCl_2$ .

### III.3.1.2 Auto-assemblage assisté par substrat des réseaux 2D en présence de $MgCl_2$ et de $NaCl$

Pour rappel, les ions  $Na^+$  possèdent la propriété de remplacer les cations  $Mg^{2+}$  sur certains sites de fixation à la surface du substrat de  $SiO_2$ . Cela permet la baisse des interactions attractives entre le substrat et les origamis d'ADN garantissant une plus forte diffusion des nanostructures et donc des assemblages de meilleure qualité.

La méthode d'imagerie par AFM demande beaucoup de temps pour l'acquisition d'une image. Dans cette partie, l'imagerie a été réalisée à l'aide du CD-SEM afin de permettre l'acquisition de plusieurs images par échantillon et d'augmenter la statistique. Le taux de présence des monocouches et des multicouches a été mesuré à l'aide du logiciel Image J. Les barres d'erreur dans ce cas seront déterminées en calculant l'écart-type entre les différentes mesures.

Concernant l'analyse de l'ordre au sein des échantillons, nous avons montré que la méthode de la PSD radiale peut être utilisée avec ce type d'image. Dans ce cas, nous utilisons la PSD radiale moyenne de plusieurs images pour un seul et même échantillon avant de passer par l'étape de décomposition. La Figure III-29 montre les résultats obtenus à partir des PSD radiales des échantillons rincés avec différentes proportions volumiques en EtOH. Dans ce cas, ce sont les PSD radiales moyennes des échantillons qui ont été tracées et décomposées. Nous observons que la longueur de corrélation associée au pic 1 pour les images CD-SEM varie avec la même tendance que celle des images AFM avec l'augmentation de la proportion en EtOH. Tout comme pour les images AFM, la longueur de corrélation associée au pic 2 ne varie quasiment pas. Enfin, les mêmes tendances sont aussi observées concernant la position des pics. Nous avons donc pu mettre en évidence que cette méthode de caractérisation de l'ordre est aussi adaptée à l'utilisation d'image CD-SEM.

Dans le cas de l'analyse des centres, nous n'avons pas comparé les résultats obtenus pour les deux types d'image. Dans les deux cas, nous sommes parvenus à détecter les centres des origamis. Les barres d'erreur présentées seront aussi obtenues grâce aux calculs des écart-types entre chaque mesure.

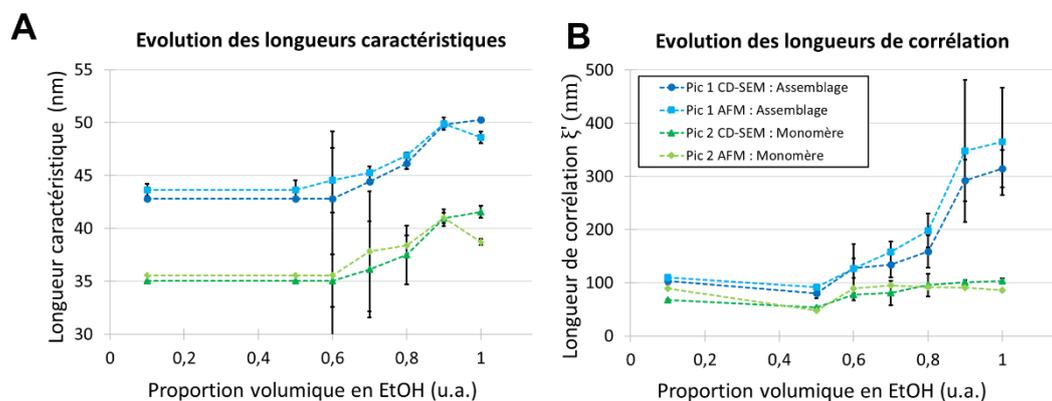
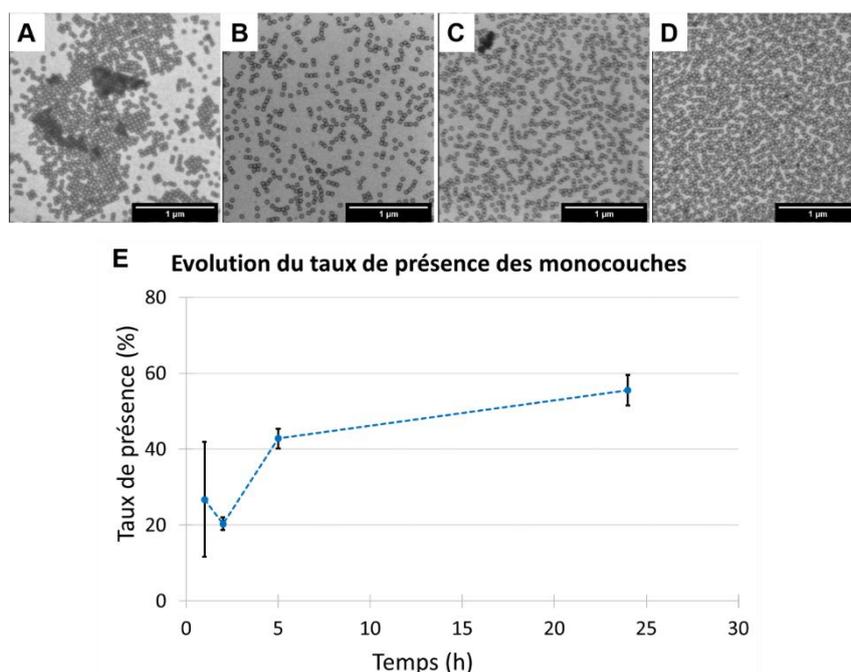


Figure III-29 : Comparaison de l'évolution des longueurs caractéristiques (A) et des longueurs de corrélation (B) obtenues avec les images AFM et avec les images CD-SEM des échantillons rincés avec différentes solutions de rinçage. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types déterminés lors de l'approximation.

### ❖ Influence du temps d'incubation lors de l'étape d'auto-assemblage

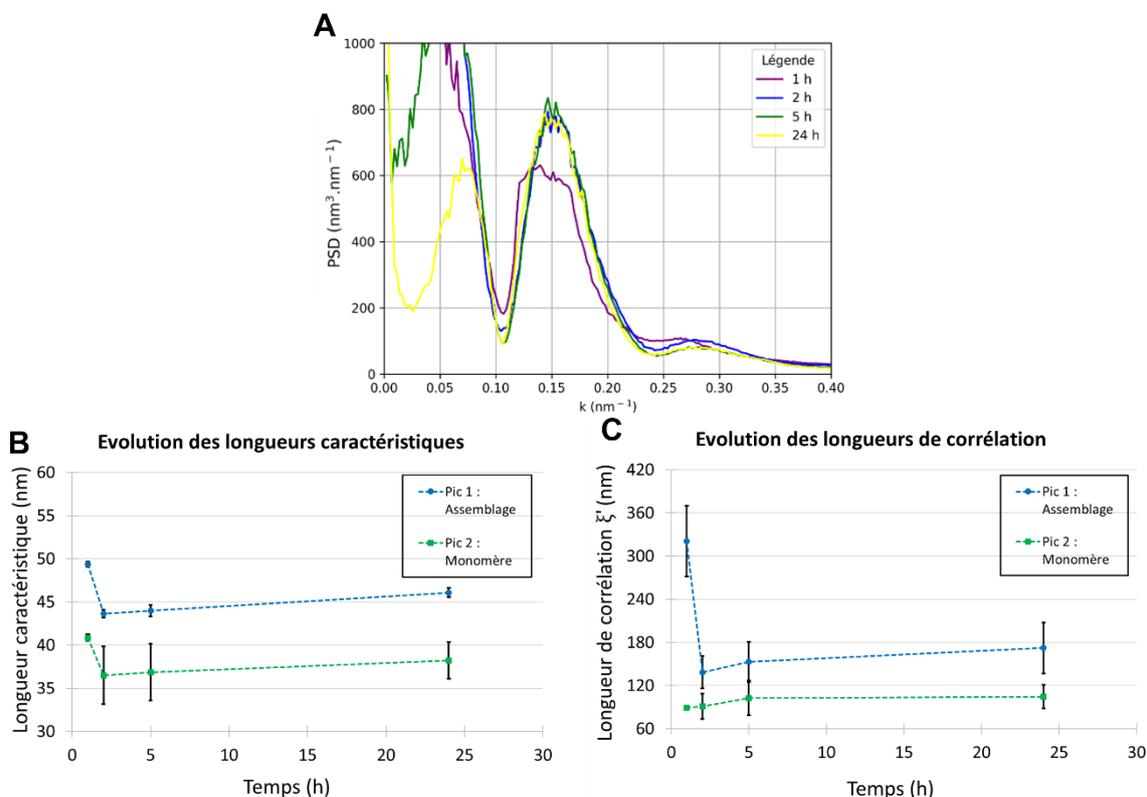
Nous avons réalisé la première incubation en présence de 20 mM en  $MgCl_2$  et de 256 mM en NaCl ; des conditions proches de celles rencontrées dans la littérature. Ces conditions ont été choisies afin de permettre la diffusion des réseaux sur la surface du substrat. L'incubation est réalisée à 25 °C pendant 1 h, 2 h, 5 h et 24 h. Ensuite, une solution de 15  $\mu$ l de 40 mM de  $MgCl_2$  est ajoutée afin d'éviter la désorption des origamis de la surface lors du rinçage. Cette incubation dure 24 h toujours à 25 °C. Les images CD-SEM des images obtenues sont présentées sur la Figure III-30.



**Figure III-30 : Images CD-SEM des réseaux en origamis d'ADN auto-assemblés en présence de 20 mM en  $MgCl_2$  et de 256 mM en NaCl à 25 °C pendant : A) 1 h, B) 2 h, C) 5 h et D) 24 h, et fixés avec 40 mM en  $MgCl_2$  pendant 24 h. E) Evolution du taux de présence des réseaux 2D en fonction du temps d'auto-assemblage. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types entre les différentes mesures.**

A 1 h d'incubation, la Figure III-30 nous permet d'observer des réseaux 2D de l'ordre du micromètre à la surface du substrat. Cependant, entre 2 h et 24 h d'incubation nous n'observons plus ces réseaux. Nous attribuons cela à la réorganisation des réseaux à la surface du substrat. En effet, les réseaux 2D présent à la surface du substrat à 1 h se sont formés dans le liquide surnageant avant de se déposer sur la surface du substrat. Ensuite, ils se déstructurent et se réorganisent afin de recouvrir toute la surface du substrat sous forme de réseaux plutôt linéaires. Ces observations seront validées lors de l'analyse de l'ordre.

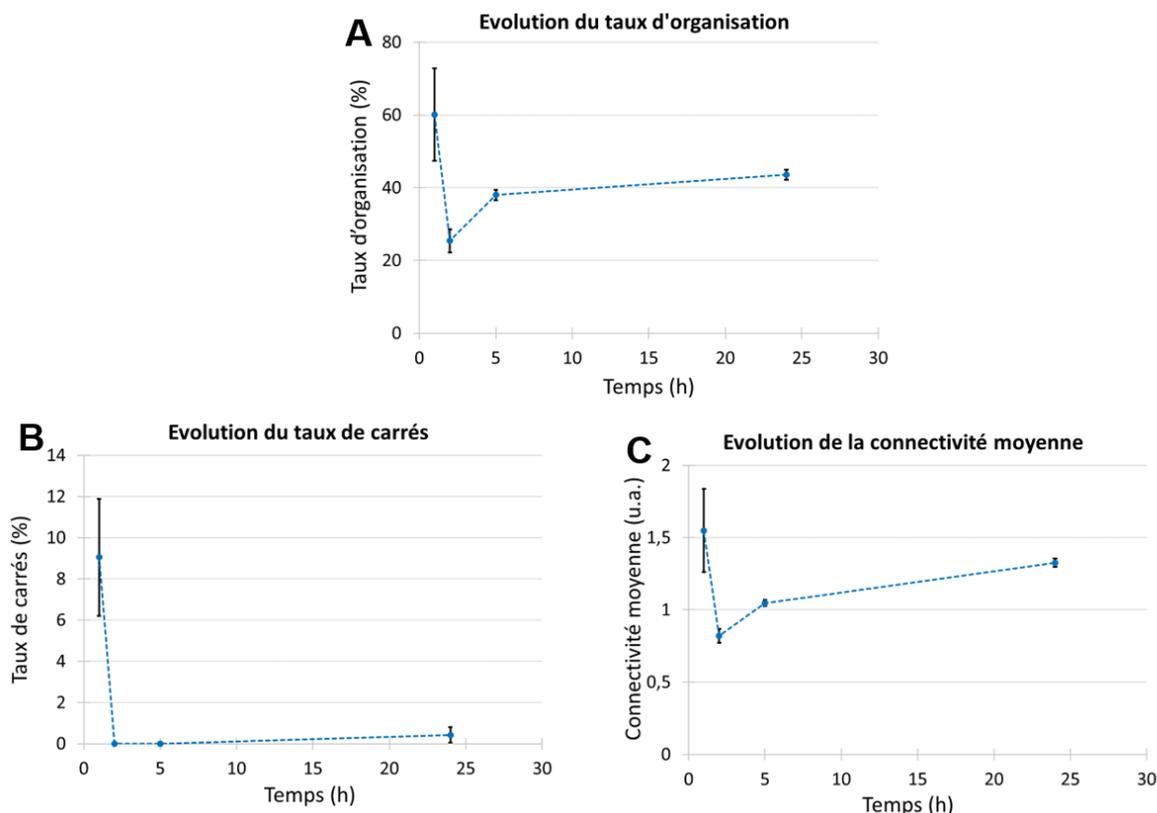
Nous avons mesuré le taux de présence des monocouches en fonction du temps d'assemblage (voir Figure III-30-E). Nous passons, de  $27 \pm 15 \%$  à  $55,6 \pm 4,0 \%$  de taux de présences des monocouches. Afin d'expliquer cela, il est nécessaire de quantifier les différents paramètres d'ordre.



**Figure III-31 :** A) PSD radiales des échantillons formés après différents temps d'auto-assemblage. B) Evolution des longueurs caractéristiques correspondantes. C) Evolution des longueurs de corrélations correspondantes. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types déterminés lors de l'approximation.

Dans la Figure III-31, nous observons que la longueur de corrélation du pic d'assemblage à 1 h d'incubation est la plus élevée. Elle est de  $321 \pm 49$  nm. Cette valeur diminue à  $139 \pm 23$  nm à 2 h et remonte à  $172 \pm 36$  nm à 24 h. Malgré le taux de présence des monocouches très bas à 1 h, nous observons un ordre plus élevé. Cela signifie que des réseaux se sont formés dans la goutte avant de se déposer sur la surface. La diminution de cette valeur à 2 h puis sa hausse jusqu'à 24 h, nous indique qu'à la suite du dépôt des réseaux sur la surface ces derniers se réorganisent par diffusion sur la surface. Cette réorganisation nous permet d'expliquer les valeurs de taux de présence obtenues. En effet, à 1 h d'incubation, des réseaux sont observés sur une faible partie de la surface. Cela s'explique par le fait que les origamis sont en majorité sous forme de petites structures ou de monomères. Ainsi, lors du rinçage, seuls les réseaux très organisés restent sur la surface. Avec la hausse du temps d'incubation, la surface est de plus en plus couverte par les origamis d'ADN mais avec une diminution de la taille des réseaux (d'où la diminution de la longueur de corrélation).

La méthode de détection des centres (Figure III-32) nous a permis d'étudier la morphologie des structures de façon plus précise. En effet, le taux d'organisation le plus élevé se situe à 1 h d'incubation avec une valeur de  $60,1 \pm 2,8$  %. Nous observons une diminution à 2 h avec une valeur de  $25,4 \pm 3,2$  % et une augmentation à  $43,5 \pm 1,4$  % à 24 h. Dans le cas du taux de carrés, à 1 h, la valeur est de  $9,1 \pm 2,8$  %. Elle est nulle à 1 h et 2 h et de  $0,4 \pm 0,4$  % à 24 h. Cela signifie que pour des temps supérieurs ou égaux à 2 h, les réseaux observés sont en majorités linéaires.



**Figure III-32 : Evolution des paramètres d'ordre en fonction du temps de l'étape d'auto-assemblage. A) Le taux d'organisation. B) Le taux de carrés. C) La connectivité moyenne. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types entre les différentes mesures.**

### ❖ Influence de la variation de la concentration en $MgCl_2$ lors de l'étape de fixation

En 2021, Shuo Yang *et al.* [150] ont montré que l'étape de fixation est essentielle quant à l'intégrité des nanostructures observées sur la surface. Les auteurs ont étudié le transfert, dans un milieu sec, de réseaux 1D en origamis d'ADN préalablement formés sur des surfaces de mica via des interactions par empilement  $\pi$ - $\pi$ . Pour ce faire, à la suite de la formation des réseaux 2D, des solutions tampons, contenant entre 5 mM et 40 mM de  $MgCl_2$ , ont été ajoutées afin de permettre la fixation des réseaux sur le substrat avant une étape de rinçage à l'eau ultrapure. Il a été observé que plus la

concentration en  $MgCl_2$  diminue et plus l'étape de rinçage entraîne la dépolymérisation des réseaux et la désorption des origamis de la surface du substrat.

Dans notre cas, l'étape de fixation permet d'augmenter la concentration en  $MgCl_2$  tout en diminuant celle en  $NaCl$ . Nous nous sommes aussi intéressés à l'influence de la concentration en  $MgCl_2$  dans la solution de fixation sur la deuxième étape d'incubation. La première incubation a été faite en présence de 20 mM en  $MgCl_2$  et de 256 mM en  $NaCl$  durant 24 h à 25 °C. La seconde étape d'incubation a été faite durant 1 h à 25 °C avec des solutions de fixation composées de 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 160 mM et 320 mM en  $MgCl_2$ . Les images CD-SEM sont présentées sur la Figure III-33.

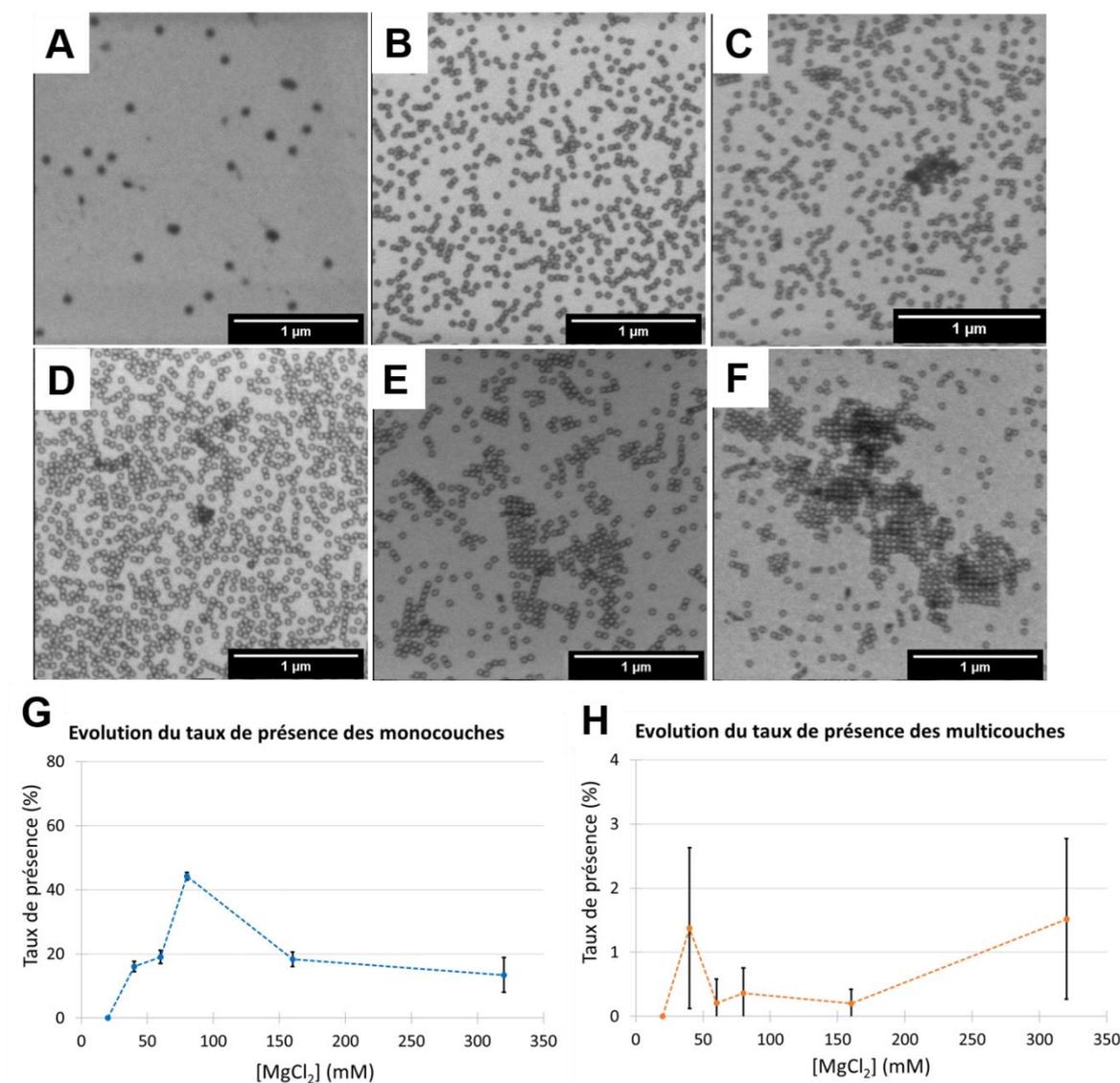
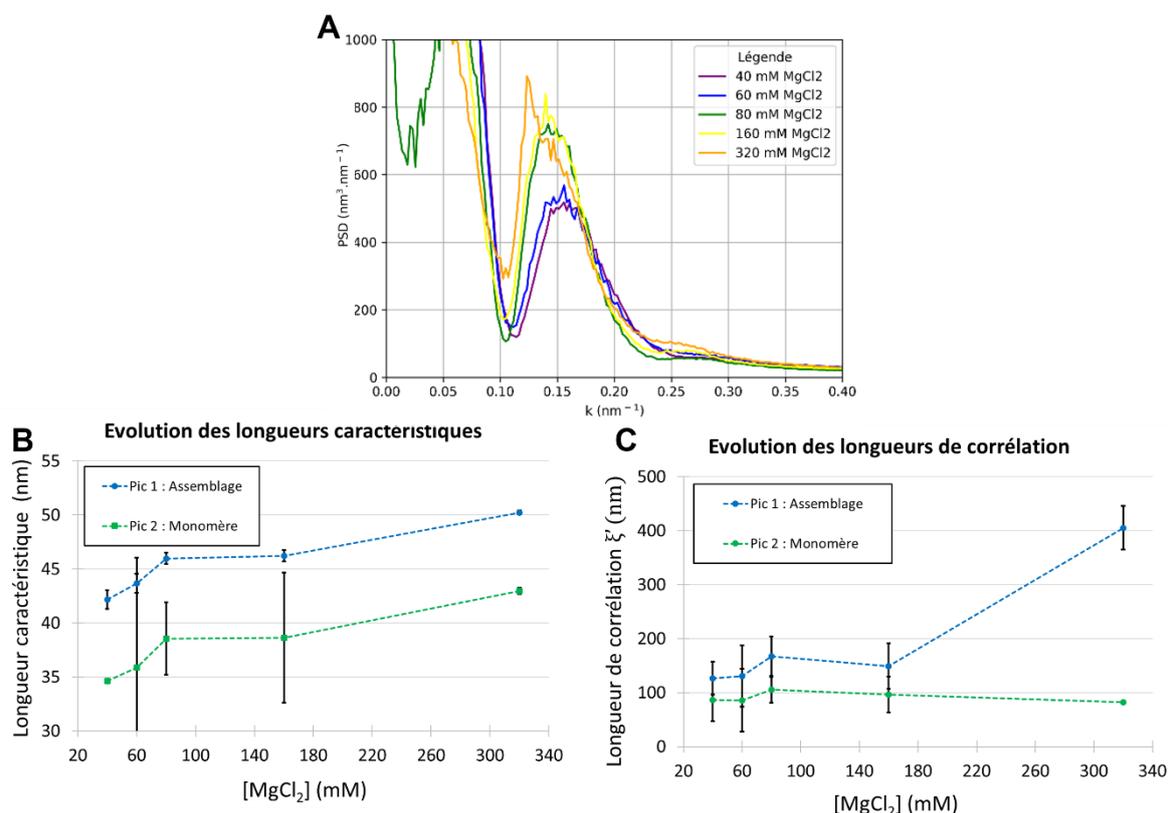


Figure III-33 : Images CD-SEM des réseaux en origamis d'ADN auto-assemblés en présence de 20 mM en  $MgCl_2$  et de 256 mM en  $NaCl$  durant 24 h à 25°C pendant 24 h et fixés en présence de : A) 20 mM, B) 40 mM, C) 60 mM, D) 80 mM, E) 160 mM et F) 320 mM de  $MgCl_2$ . Evolution du taux de présence des monocouches (G) et des multicouches (H) en fonction de la concentration en  $MgCl_2$  de l'étape de fixation.

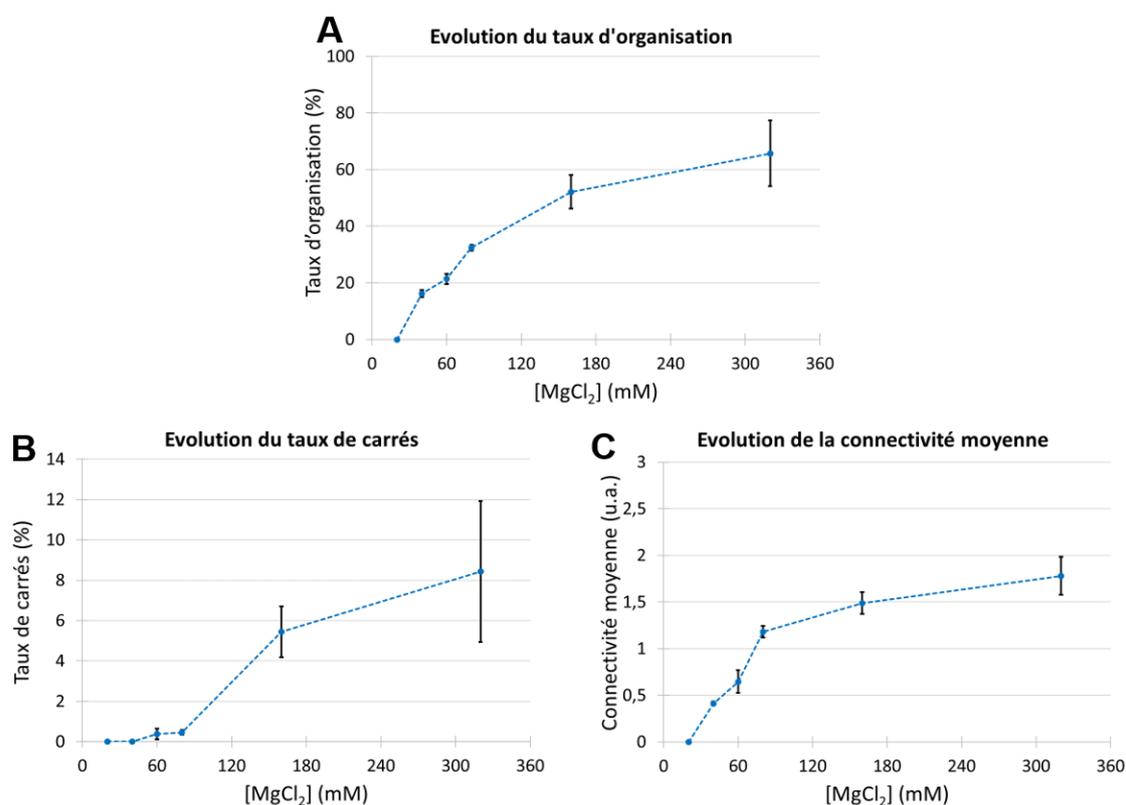
La mesure du taux de présence des monocouches (Figure III-33) nous montre que l'adsorption des structures sur la surface du substrat augmente entre 20 mM et 80 mM en  $MgCl_2$ . Cependant, ce pourcentage diminue entre 80 mM et 320 mM. Cela peut être attribué au fait qu'à 160 mM et 320 mM en  $MgCl_2$  nous favorisons un écrantage des charges des molécules d'ADN et de celle de la surface du  $SiO_2$  entraînant ainsi des effets de répulsions entre les deux objets. Cet écrantage de charges peut être couplé à la limitation de la formation des liaisons hydrogène entre le  $SiO_2$  et les nanostructures d'ADN gênant l'établissement des interactions attractives.



**Figure III-34 :** A) Evolution des PSD radiales des échantillons en fonction de la concentration en  $MgCl_2$  de l'étape de fixation. B) Evolution des longueurs caractéristiques correspondantes. C) Evolution des longueurs de corrélation correspondantes.

En complément des taux de présence, nous observons, sur la Figure III-34, que la longueur de corrélation associée au pic d'assemblage augmente avec la concentration en  $MgCl_2$ . Elle est stable entre 20 mM et 60 mM en  $MgCl_2$  avec une valeur d'environ 130 nm dans les deux cas. Cette valeur hausse entre environ 150 nm et 167 nm en présence de 80 mM en  $MgCl_2$  et 160 mM en  $MgCl_2$ . Une forte augmentation est observée à 320 mM en  $MgCl_2$  avec une valeur de  $405 \pm 40$  nm. Ces valeurs permettent de mettre en évidence l'amélioration de l'ordre avec l'augmentation de la concentration en  $Mg^{2+}$ . Cela est dû aux plus fortes interactions entre les origamis d'ADN du fait de l'écrantage de leur charge négative. La structure des réseaux 2D est donc plus stable.

Dans le cas de la méthode de détection de centres (voir la Figure III-35), les valeurs obtenues nous permettent de valider les observations précédentes. En effet, dans un premier temps, le taux d'organisation augmente de façon linéaire entre 20 mM et 80 mM en  $MgCl_2$  en passant de 0 % à  $32,4 \pm 1,1$  %. Sa valeur passe ensuite à  $52,1 \pm 5,9$  % à 160 mM et à  $66 \pm 12$  % en présence de 320 mM de  $MgCl_2$ . Concernant le taux de carrés, il est quasiment nul entre 20 mM et 80 mM en  $MgCl_2$  avant d'augmenter et d'atteindre une valeur de  $8,4 \pm 3,5$  % avec 320 mM en  $MgCl_2$ .

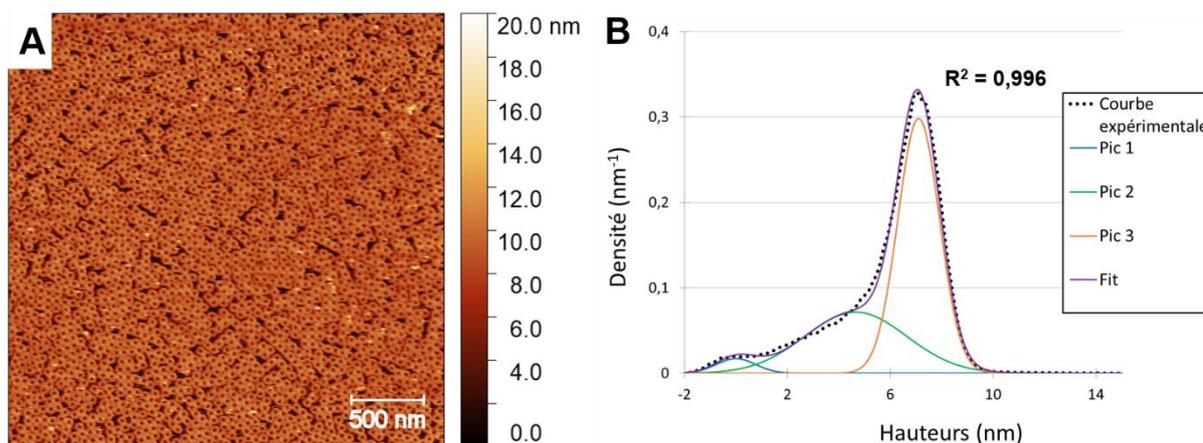


**Figure III-35 : Evolution des paramètres d'ordre en fonction de la concentration en  $MgCl_2$  de l'étape de fixation. A) Le taux d'organisation. B) Le taux de carrés. C) La connectivité moyenne.**

Au final, nous avons décidé de nous placer à 80 mM en  $MgCl_2$  car à c'est à cette condition que nous obtenons le meilleur taux de présence des monocouches.

Nous avons fait une analyse d'AFM liquide afin de vérifier la morphologie des nanostructures en milieu liquide et sans étape de rinçage. Pour ce faire, nous avons réalisé l'étape d'auto-assemblage en présence de 20 mM et de 256 mM de NaCl pendant 24 h à température ambiante. L'étape de fixation a été réalisée avec l'ajout d'une solution de 80 mM de  $MgCl_2$ . Une image AFM de l'échantillon et l'histogramme des hauteurs associée peuvent être retrouvés sur la Figure III-36. La décomposition nous a permis de remonter à une valeur de taux de présence des monocouches de  $94,8 \pm 0,8$  % avec

une hauteur de motifs de  $7,1 \pm 0,1$  nm. Nous pouvons remarquer que l'épaisseur obtenue ici est supérieure à celle observée à sec. Ce point sera discuté plus loin dans cette partie.



**Figure III-36 : A) Image AFM en milieu liquide de réseaux 2D auto-assemblés par substrat en présence de 20 mM de MgCl<sub>2</sub> et de 256 mM de NaCl pendant 24 h et fixés à l'aide d'une solution de 80 mM de MgCl<sub>2</sub> pendant 1 h. B) Histogrammes des hauteurs correspondants.**

En traçant la PSD de plusieurs images de cet échantillon, nous avons mis en évidence que l'étape de rinçage entraîne la dépolymérisation des réseaux 2D et la désorption des origamis de la surface. Le Tableau III-4 recense les différentes valeurs de paramètres issues de la méthode de décomposition des PSD radiales.

	Longueur caractéristique (nm)	Longueur de corrélation (nm)
<b>Pic 1 : Assemblage</b>	48,4 ± 0,3	285 ± 52
<b>Pic 2 : Monomère</b>	39,5 ± 0,4	95,2 ± 3,4

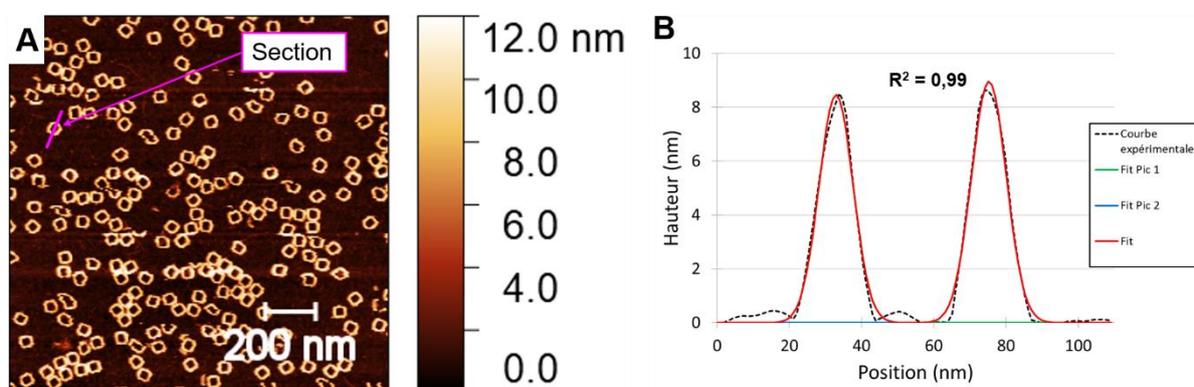
**Tableau III-4 : Tableau récapitulatif des paramètres d'ordre obtenus avec la méthode la PSD suite à l'analyse d'AFM liquide.**

La valeur de la longueur de corrélation associé au pic d'assemblage montre qu'il y a de l'assemblage sur la surface malgré l'ajout de NaCl dans la solution. Cette observation est de plus complétée par la méthode de détection des centres. Les valeurs mesurées sont présentées dans le Tableau III-5.

Taux d'organisation (%)	Taux de carrés (%)	Connectivité moyenne
$74,8 \pm 1,2$	$4,9 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,1$

**Tableau III-5 : Tableau récapitulatif des paramètres d'ordre obtenus avec la méthode de détection des centres suite à l'analyse d'AFM liquide.**

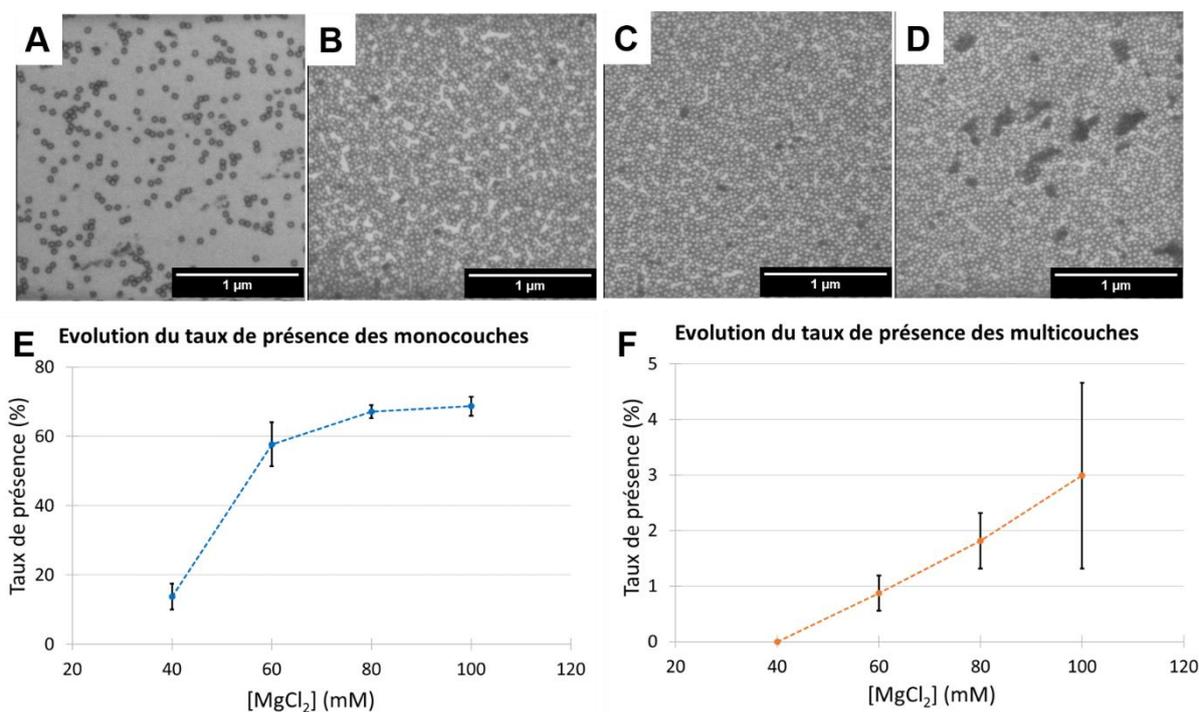
Un volume de 200  $\mu$ l de solution composée de 4 nM de monomères 2D<sub>A</sub> et de 40 mM de MgCl<sub>2</sub> a été déposé sur la surface d'un substrat de SiO<sub>2</sub>. L'échantillon a ensuite été mis en incubation pendant 1 h à température ambiante. La Figure III-37 montre une image AFM de l'échantillon obtenue ainsi que le tracé des hauteurs suivant la coupe d'un monomère. Ainsi, nous avons obtenu une épaisseur de motif de  $8,5 \pm 0,9$  nm ( $N = 39$ ) et une dimension critique de  $12,9 \pm 2,4$  nm ( $N = 39$ ). Il est intéressant de noter, même si les techniques de mesures sont différentes, que l'épaisseur des monomères obtenue en phase liquide est plus élevée que celle à sec. Des observations similaires ont été rapportées par Sonderskov *et al.* [146]. Dans cette étude, ils ont pu mettre en évidence les différences de structure d'origamis planaires triangulaires dans des conditions humides et dans des conditions à sec. Ainsi, ils ont montré qu'à sec, l'épaisseur des origamis a diminué de moitié par rapport au cas en solution. Ils ont aussi montré que les dimensions critiques des bords de la structure ont augmenté. Cette diminution de l'épaisseur a été accompagnée d'une légère augmentation des dimensions critiques des bords de la structure d'ADN. Ces observations vont donc dans le sens d'un affaissement de la structure d'ADN sur elle-même à sec. Ces modifications de morphologies ont été attribuées à la déshydratation des molécules d'ADN avec le passage à l'état à sec.



**Figure III-37 : Image AFM en milieu liquide d'origamis d'ADN déposés sur du SiO<sub>2</sub> en présence de 40 mM de MgCl<sub>2</sub> B) Distribution des hauteurs retrouvées sur un origami à l'aide de la coupe en section.**

❖ Influence de la variation de la concentration en  $MgCl_2$  lors de l'étape d'auto-assemblage

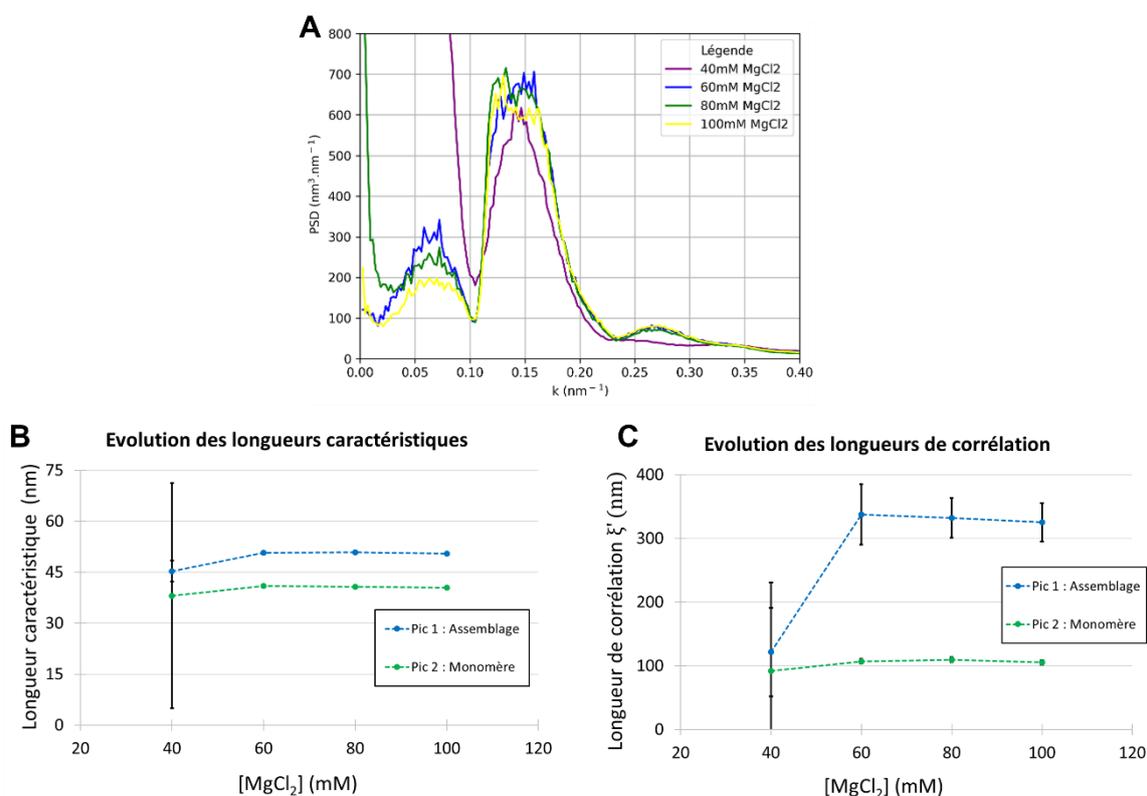
Dans cette partie nous nous sommes intéressés à l'influence de la variation de la concentration en  $MgCl_2$  sur l'auto-assemblage. Contrairement aux précédentes conditions. **La concentration en NaCl a été largement abaissée** afin de permettre une **réduction des forces répulsives** et **d'éviter la dissociation des réseaux formés lors du rinçage**. Ainsi, l'étape d'auto-assemblage a été réalisée en présence de 35 mM en NaCl avec une concentration en  $MgCl_2$  de 40 mM, 60 mM, 80 mM ou 100 mM. Les images CD-SEM sont présentées sur la Figure III-38.



**Figure III-38 : Images CD-SEM des réseaux 2D formés en présence de 35 mM de NaCl et de différentes concentrations de  $MgCl_2$  : A) 40 mM, B) 60 mM, C) 80 mM, D) 100 mM. Evolution du taux de présence des monocouches (E) et des multicouches (F) en fonction de la concentration en  $MgCl_2$  de l'étape d'auto-assemblage.**

Nous observons sur la Figure III-38 que l'élévation du taux présence des monocouches avec l'augmentation de la concentration en  $MgCl_2$ . En présence de 40 mM en  $MgCl_2$ , elle est de  $13,8 \pm 3,5$  % et passe à  $57,7 \pm 1,7$  % à 60 mM en  $MgCl_2$ . Un phénomène de saturation commence à partir de cette concentration et nous aboutissons à un taux de présence de de  $68,7 \pm 2,6$  % avec 100 mM en  $MgCl_2$ . Cette saturation s'accompagne d'une hausse du taux de présence des multicouches avec une valeur nulle à 40 mM et de  $3,0 \pm 1,7$  % à 100 mM en  $MgCl_2$ . En enrichissant la solution de dépôt ions magnésium, nous avons permis l'amplification des interactions attractives entre la surface d'oxyde et

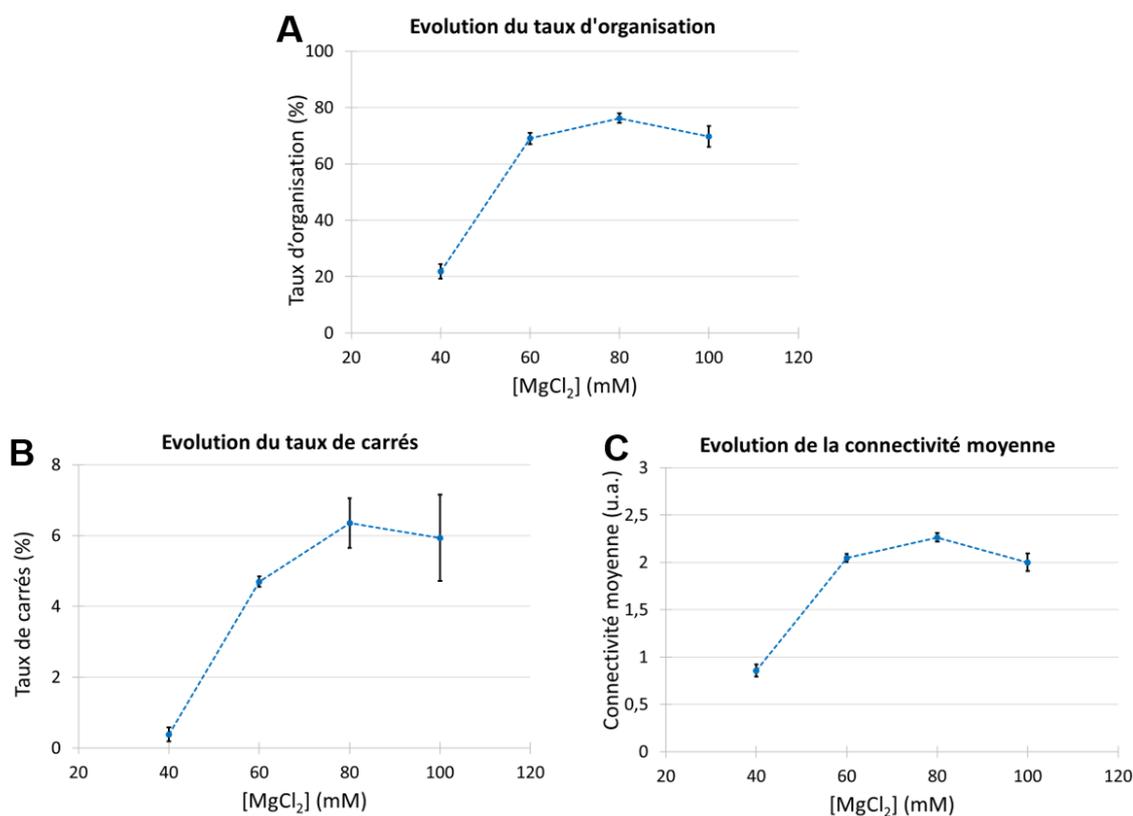
l'ADN. Cela a permis une meilleure accroche des origamis sur la surface lors de l'étape de rinçage. Cependant, cela s'accompagne d'une amplification du taux de multicouches.



**Figure III-39 :** A) PSD radiales des échantillons préparés en présence de 35 mM de NaCl et de différentes concentrations en MgCl<sub>2</sub> lors de l'étape d'auto-assemblage. B) Evolution des longueurs caractéristiques correspondantes. C) Evolution des longueurs de corrélation correspondantes.

Nous nous sommes intéressés à l'influence de la variation de la concentration en MgCl<sub>2</sub> sur la valeur de la longueur de corrélation associée au pic d'assemblage (Figure III-39). Nous remarquons que cette dernière augmente avec cette concentration. La valeur est de 122 ± 69 nm à 40 mM en MgCl<sub>2</sub>. Entre 60 mM et 100 mM, ce paramètre d'ordre atteint une valeur comprise entre 325 et 338 nm caractéristique d'un taux d'assemblage élevé. Cela signifie que l'amplification de la concentration en MgCl<sub>2</sub> a permis l'augmentation de l'ordre présent mais aussi une meilleure attraction avec la surface. Ce dernier point permettant de modérer la dépolymérisation des réseaux et la désorption des origamis de la surface.

Nous avons validé ces observations avec la méthode de détection des centres (Figure III-40). Le taux d'organisation est faible à 40 mM en MgCl<sub>2</sub>. En effet, sa valeur est de 21,9 ± 2,6 % à 40 mM en MgCl<sub>2</sub>. Ce taux d'organisation augmente au-dessus de 69 % pour des concentrations comprises entre 60 mM et 100 mM en MgCl<sub>2</sub>. Le taux maximum (76,2 ± 1,6 %) se situe à 80 mM en MgCl<sub>2</sub>. Concernant le taux de carrés, il croît aussi avec la concentration en MgCl<sub>2</sub> avec une valeur supérieure à 6 % à partir de 80 mM en MgCl<sub>2</sub>.

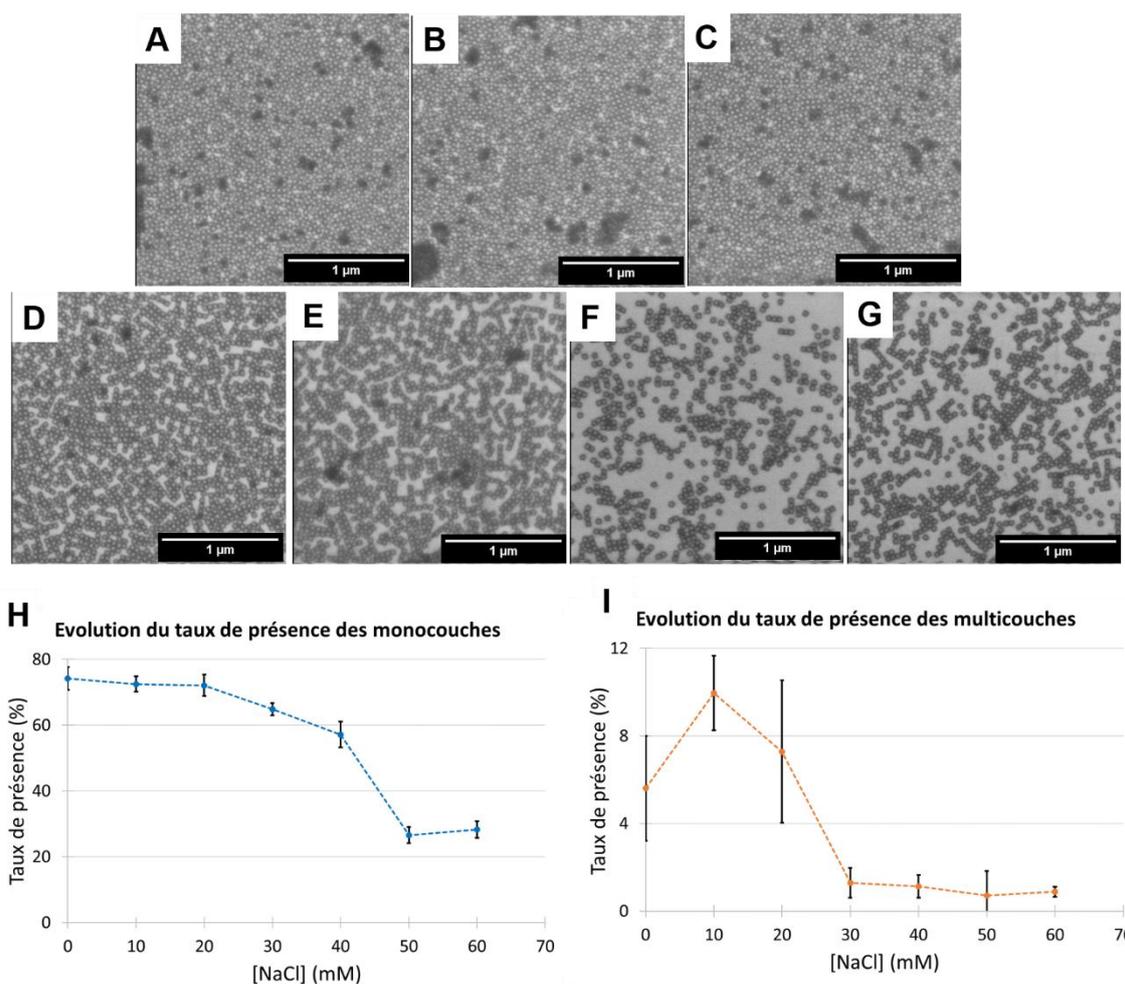


**Figure III-40 : Evolution des paramètres d'ordre en fonction de la concentration en  $MgCl_2$  de l'étape d'auto-assemblage et de 35 mM de NaCl. A) Le taux d'organisation. B) Le taux de carrés. C) La connectivité moyenne.**

❖ **Influence de la variation de la concentration en NaCl lors de l'étape d'auto-assemblage**

Dans cette partie, nous avons étudié l'influence de la concentration en  $MgCl_2$  sur l'auto-assemblage assisté par substrat des réseaux 2D. En contrôlant la concentration en NaCl, l'objectif est de permettre une bonne mobilité de surface afin de permettre la formation de large réseaux 2D en évitant la formation des multicouches. De plus, il faut bien prendre en compte le fait qu'une faible énergie attraction entre l'ADN et le substrat entrainera la dépolymérisation et la désorption de origamis de la surface.

Les conditions initiales de la purification des origamis ont été modifiées. Les résultats obtenus dans cette partie ne sont donc pas directement comparables avec ceux obtenus précédemment. Ici la concentration en  $MgCl_2$  a été gardée constante à une valeur de 74 mM et la concentration en NaCl a été variée entre 0 mM et 60 mM avec un incrément de 10 mM. Concernant la concentration en  $MgCl_2$ , une valeur de 80 mM était visée, cependant du fait du changement des conditions initiales de la purification, sa valeur a été finalement estimée à environ 74 mM. Les images CD-SEM des échantillons sont présentées sur la Figure III-41.

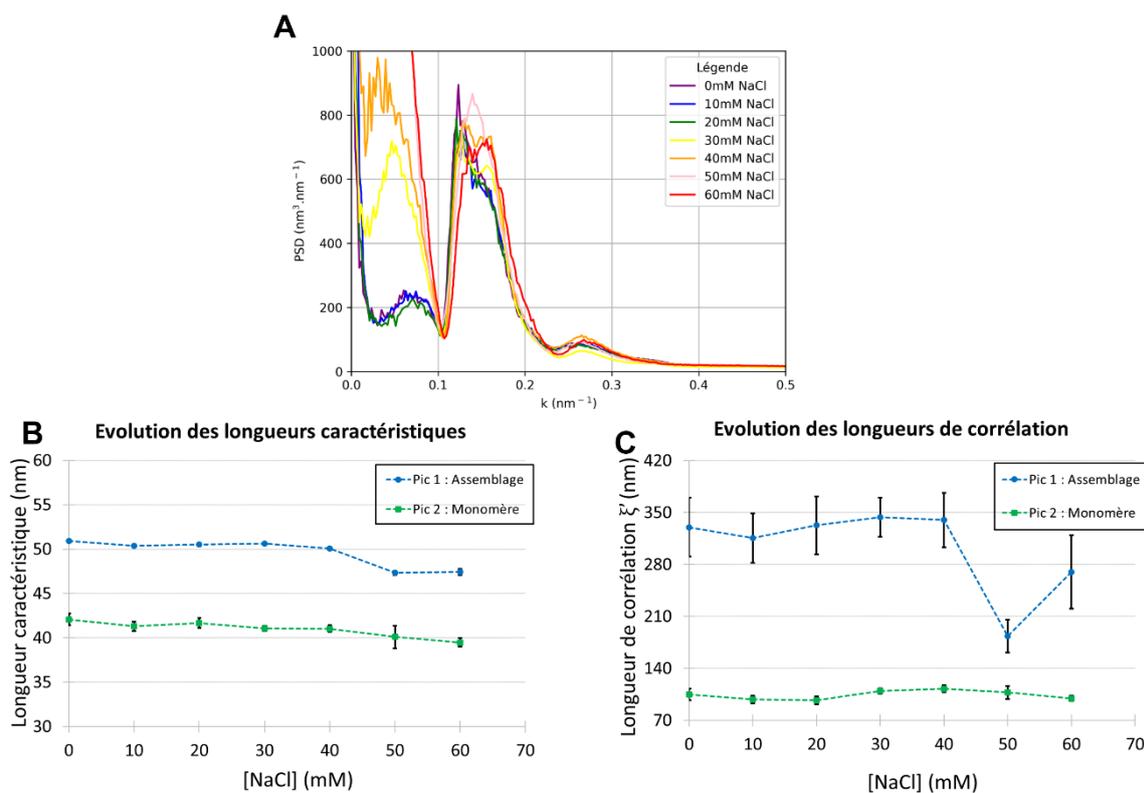


**Figure III-41 : Images CD-SEM des réseaux 2D formés en présence de 74 mM de  $MgCl_2$  et de différentes concentrations de NaCl : A) 0 mM, B) 10 mM, C) 20 mM, D) 30 mM, E) 40 mM, F) 50 mM, G) 60 mM. Evolution du taux de présence des monocouches (H) et des multicouches (I) en fonction de la concentration en  $MgCl_2$  de l'étape d'auto-assemblage.**

Nous observons sur la Figure III-41 la baisse du taux de présence des monocouches avec l'élévation de la concentration en NaCl. Cette augmentation s'accompagne de la décroissance du taux de présence des multicouches. A partir de 30 mM en NaCl, cette valeur est inférieure à 2 %. Cela montre qu'en augmentant la concentration en ion sodium, nous avons favorisé l'établissement des interactions répulsives entre les nanostructures et la surface du substrat. Cela entraîne une plus forte désorption des origamis de la surface lors du rinçage.

Au-delà des variations de taux de présence des monocouches, les résultats les plus intéressants concernent l'influence de la variation de la concentration en NaCl sur les différents paramètres d'ordre. Le tracé des PSD et la méthode de décomposition (Figure III-42) nous ont permis d'observer qu'entre 0 mM et 30 mM en NaCl, la longueur de corrélation associée au pic d'assemblage

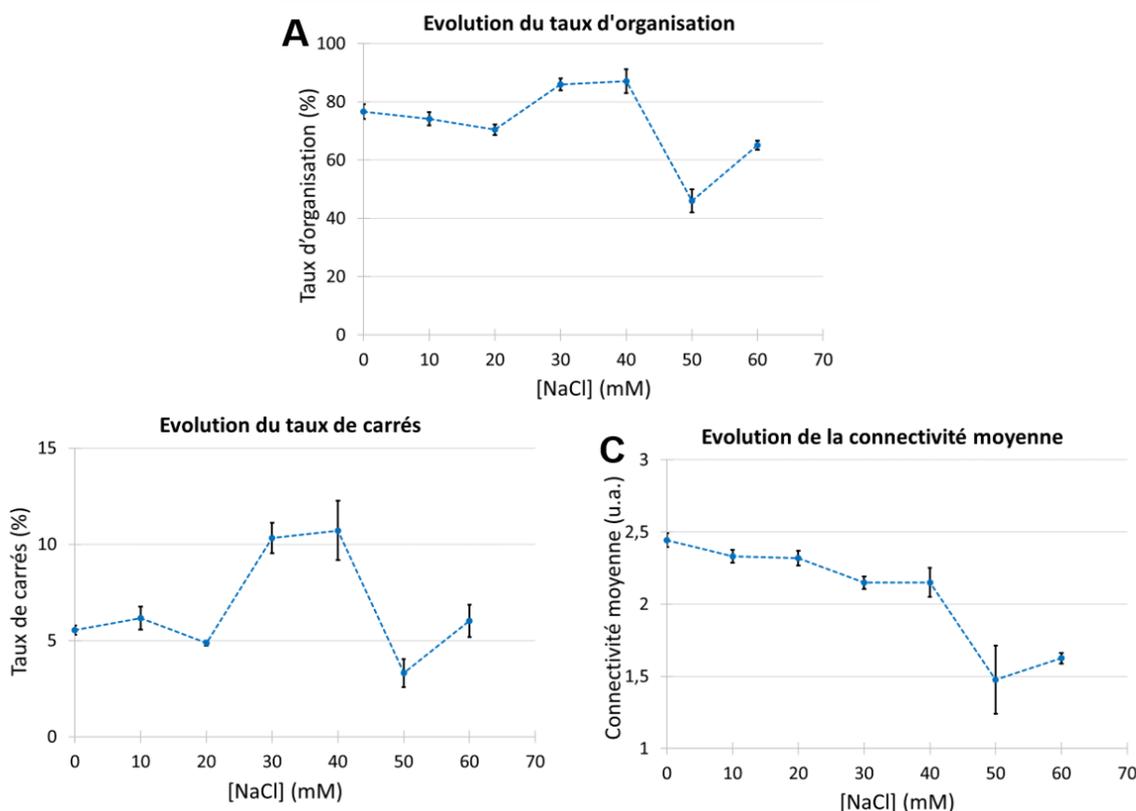
augmente légèrement. Elle passe de  $330 \pm 40$  nm à  $340 \pm 49$  nm pour 0 mM et 40 mM de NaCl respectivement. A 50 mM en NaCl, une forte diminution de longueur de corrélation est observée avec une valeur de  $183 \pm 22$  nm. Le cas à 60 mM en  $MgCl_2$  possède une valeur plus élevée ( $270 \pm 49$  nm) que celle à 50 mM. Ces résultats permettent de mettre en évidence le rôle du NaCl sur la qualité des assemblages. En effet, malgré la désorption lors du rinçage, nous avons pu obtenir des longueurs de corrélation élevées. Cela traduit l'existence d'ordre important à ces conditions. De plus les valeurs plus élevées obtenues à 30 mM et 40 mM permettent de dire qu'il y a eu un meilleur assemblage en amont du fait d'une meilleure mobilité des origamis lors de l'étape d'assemblage sur substrat. Globalement, entre 0 mM et 40 mM en NaCl, le taux d'assemblage peut être considéré comme élevé et entre 50 mM et 60 mM, il peut être considéré comme intermédiaire.



**Figure III-42 :** PSD radiales des échantillons préparés en présence de 74 mM de  $MgCl_2$  et de différentes concentrations en NaCl lors de l'étape d'auto-assemblage. B) Evolution des longueurs caractéristiques correspondantes. C) Evolution des longueurs de corrélation correspondantes.

Grâce à la détection des centres (Figure III-43), nous avons pu mettre en valeur les meilleurs paramètres d'ordre obtenus à 30 mM et 40 mM en NaCl. En effet, le taux d'organisation est le plus élevé à ces conditions en sels avec des valeurs supérieures à 85 %. Ce taux évolue entre 70 et 77 % pour des concentrations en  $MgCl_2$  comprises entre 0 mM et 20 mM en NaCl. Les valeurs les plus faibles ont été obtenues à 50 mM et 60 mM en NaCl. Concernant le taux de carrés, les valeurs les plus hautes sont à 30 mM et 40 mM et sont supérieures à 10 %. Les autres conditions en NaCl ont des valeurs entre

3 et 7%. Cela permet de dire qu'aux faibles concentrations en NaCl (inférieures à 30 mM), les interactions attractives sont très élevées et limite le réarrangement des origamis sur la surface. Pour les concentrations supérieures à 30 mM, l'augmentation des interactions répulsives permet l'augmentation de la diffusion de surface et donc de meilleurs assemblages. Cependant, Pour des concentrations supérieures à 40 mM, la désorption lors du rinçage est plus forte provoquant une importante désorption des structures de la surface.



**Figure III-43 : Evolution des paramètres d'ordre en fonction de la concentration en NaCl de l'étape d'auto-assemblage et en présence de 74 mM de MgCl<sub>2</sub>. A) Le taux d'organisation. B) Le taux de carrés. C) La connectivité moyenne (C)**

### ❖ Synthèse

Dans cette partie, mon objectif était de mettre en place un protocole permettant l'utilisation simultanée de MgCl<sub>2</sub> et de NaCl pour l'auto-assemblage sur surface des réseaux 2D en origamis. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence l'influence de différents paramètres sur les pourcentages de présence (monocouches et multicouches) et sur l'ordre observé sur la surface. Les différents paramètres étudiés sont :

- Le temps de l'étape d'auto-assemblage,

- La concentration en  $MgCl_2$  de l'étape de fixation,
- La concentration en  $MgCl_2$  de l'étape d'auto-assemblage,
- La concentration en  $NaCl$  de l'étape d'auto-assemblage.

Dans le cas du temps de l'étape d'auto-assemblage, les analyses ont permis de mettre en évidence la modification de la morphologie des réseaux 2D à la surface du substrat. En effet, nous avons observé que le taux de présence associé aux monocouches a augmenté avec la hausse du temps d'incubation entre 1 h ( $27 \pm 15 \%$ ) et 24 h ( $56 \pm 4 \%$ ). Cette élévation est accompagnée d'une modification des différents paramètres d'ordre obtenus avec la méthode de la PSD radiale et avec la méthode de la détection des centres. Concernant la longueur de corrélation associée au pic 1, sa valeur est au maximum à  $321 \pm 49$  nm. Ensuite sa valeur diminue entre 2 h et 24 h avec des valeurs situées entre 138 nm et 173 nm. Cela démontre dans un premier temps que lors de l'assemblage, des réseaux 2D se forment dans la goutte avant de se déposer aléatoirement sur la surface. Puis, l'accroissement du temps d'incubation permet une réorganisation des réseaux sur la surface. Néanmoins, nous supposons qu'une forte proportion de monomère est toujours présente pour les faibles temps d'assemblage. Le rinçage entraîne la désorption préférentielle des monomères de la surface expliquant le faible recouvrement de surface à 1 h et 2 h et 5 h d'incubation. A 24 h d'incubation le recouvrement est plus élevé du fait d'une forte présence de réseaux assemblés sur la surface. Ces observations ont, bien entendu, pu être validées par la méthode de détection des centres. En effet, le taux d'organisation a une valeur maximale à 1 h d'incubation ( $60,1 \pm 2,8 \%$ ), diminue à 2 h d'incubation ( $25,4 \pm 3,2 \%$ ), et réaugmente jusqu'à 24 h ( $43,5 \pm 1,4 \%$ ). Cette tendance peut aussi être observée pour la connectivité moyenne. Un autre fait intéressant concerne le taux de carrés qui est de  $9,1 \pm 2,8 \%$  à 1 h et quasiment nul ensuite. Cela montre qu'à 1 h d'incubation une forte proportion de réseaux est présent sur la surface, ce qui n'est pas le cas pour les autres temps d'incubation. Ces résultats font ainsi ressortir la réorganisation des réseaux sur la surface.

Le temps de d'incubation de l'étape de fixation avait été fixé à 24 h. Afin de minimiser ce temps à 1 h, j'ai fait varier la concentration en  $MgCl_2$  de la solution tampon de fixation entre 20 mM et 320 mM. Dans un premier temps, nous avons pu observer que le taux de présence des monocouches était maximum en présence de 80 mM en  $MgCl_2$  ( $44,2 \pm 1,2 \%$ ). Entre 20 mM et 80 mM, l'augmentation de la concentration en  $MgCl_2$  a favorisé le remplacement de certains ions  $Na^+$  à la surface du  $SiO_2$ . Cela a entraîné une amplification des forces attractives électrostatiques entre la surface et le substrat et donc une meilleure accroche <sup>[150]</sup>. Cependant, entre 80 mM et 320 mM, la formation des liaisons hydrogène entre l'ADN et le  $SiO_2$  a été défavorisée entraînant un abaissement des forces attractives malgré la hausse de la concentration en  $MgCl_2$ . Cependant, en nous intéressant aux valeurs des différents paramètres d'ordre, nous avons pu montrer qu'avec l'élévation de la concentration en  $MgCl_2$  nous augmentions leurs valeurs. Cela nous a informé du fait que nous favorisons les interactions ADN-ADN et le maintien de certains réseaux sur la surface.

Malgré les effets observés, les conditions en sels utilisées pour l'étape d'auto-assemblage n'ont pas permis une bonne fixation des réseaux 2D sur la surface lors du rinçage. Afin d'y remédier, nous avons choisi de diminuer la concentration en chlorure de sodium lors de l'auto-assemblage. Ainsi pour une concentration fixe en  $NaCl$  de 35 mM et pour des concentrations en  $MgCl_2$  (entre 40 mM et 100 mM), la morphologie des structures observées était différente des précédentes. Nous avons pu

remarquer que pour une concentration croissante de la concentration en  $MgCl_2$  nous avons dans un premier temps augmenté le taux de présence des monocouches et aussi celui en multicouches. En parallèle, cela a aussi eu une influence sur les valeurs des paramètres d'ordre mesurées. En effet, concernant la longueur de corrélation associée au pic d'assemblage, cette dernière a augmenté avec l'augmentation de la concentration en  $MgCl_2$  en passant de  $122 \pm 69$  nm (40 mM en  $MgCl_2$ ) à  $337 \pm 47$  nm (60 mM en  $MgCl_2$ ). Cette dernière reste assez stable entre 60 mM et 100 mM en  $MgCl_2$ . Avec la méthode de détection des centres, nous avons pu mettre en évidence que le pourcentage d'organisation a augmenté entre 40 mM et 60 mM puis est resté quasiment stable entre 60 mM et 100 mM en  $MgCl_2$ . La même observation a pu être faite pour la valeur de la connectivité moyenne. Dans le cas du taux de carrés, il a crû entre 40 mM et 80 mM puis sa valeur a stagné entre 80 mM et 100 mM en  $MgCl_2$ . Cela valide le fait que la hausse de la concentration en  $MgCl_2$  a permis d'augmenter les interactions ADN-ADN permettant de favoriser la formation des réseaux 2D et leur stabilisation sur la surface lors de l'étape de rinçage.

Notre dernière expérience a été de mettre en évidence l'influence de la concentration en NaCl, sur le taux de présence des monocouches et des multicouches ainsi que sur les paramètres d'ordre. Nous avons observé que le taux de présence des monocouches a progressivement diminué entre 0 mM et 40 mM en NaCl avant une baisse drastique à 50 mM. En parallèle, nous avons aussi observé une diminution du taux de multicouches avec l'augmentation de la concentration en NaCl. Elle a entraîné une décroissance des interactions répulsives entre l'ADN et la surface du  $SiO_2$  limitant la formation des multicouches. Cependant, cela a aussi entraîné la désorption des origamis de la surface lors du rinçage. L'augmentation des forces répulsives a autorisé l'observation d'une meilleure organisation de surface. En effet, la longueur de corrélation est restée stable même entre 0 mM et 40 mM, même avec la désorption de la surface. Cela a montré que, malgré la désorption, les réseaux ne se sont pas beaucoup désassemblés. Cela n'a pas été le cas pour une trop grande concentration en NaCl (à partir de 50 mM en NaCl). La méthode de détection des centres nous a permis de mettre en évidence une zone de concentration en NaCl (entre 30 mM et 40 mM en NaCl). En effet, dans le cas du taux d'organisation, la valeur est supérieure à 80 % à 30 mM et 40 mM en NaCl, ce qui n'est pas le cas pour les autres conditions. Entre 0 mM et 20 mM, les valeurs sont comprises entre 70 % et 77 %. Cela a accentué la meilleure qualité d'assemblage à 30 mM et 40 mM. Ces réseaux 2D n'ont pas pu être entièrement observés à 50 mM et 60 mM du fait de la désorption de surface. Les mêmes tendances ont pu être mises en évidence avec le taux de carrés faisant ressortir une forte proportion de réseaux 2D pour toutes les conditions.

## III.4 Conclusion du chapitre

Ce chapitre a permis de montrer la mise en place d'un protocole d'auto-assemblage assisté par substrat de SiO<sub>2</sub> de réseaux 2D. Ce protocole a été adaptée suivant deux cas :

- L'auto-assemblage en présence de MgCl<sub>2</sub>,
- L'auto-assemblage en présence de MgCl<sub>2</sub> et de NaCl.

Afin de pouvoir caractériser et analyser les différentes images obtenues au CD-SEM et à l'AFM nous avons développé et exploité plusieurs méthodes de traitement d'images :

- Une méthode basée sur les histogrammes des hauteurs images AFM,
- Une méthode de quantification de l'ordre via le calcul des PSD radiales des images AFM ou CD-SEM et la décomposition des courbes obtenues,
- Une autre méthode de quantification de l'ordre basée sur la détection des centres des origamis déposés sur la surface.

### III.4.1 L'auto-assemblage assisté par substrat en présence de MgCl<sub>2</sub>

Dans le cas du système avec seulement du MgCl<sub>2</sub>, notre objectif a été de mettre en évidence le rôle de différents paramètres (composition de la solution de rinçage eau-EtOH, concentration en Mg<sup>2+</sup>, concentration en monomères) sur le recouvrement de surface et sur l'ordre observé.

Concernant la composition de la solution de rinçage, comme attendu, nous avons observé que la diminution de la proportion volumique en EtOH entraînait la dépolymérisation des réseaux de la surface mais aussi leur désorption de la surface du substrat. Cela s'est illustré par une baisse du taux de présence des monocouches entre  $x_{EtOH} = 1$  et  $x_{EtOH} = 0,1$  avec des valeurs de  $95,2 \pm 2,0 \%$  et de  $3,1 \pm 0,1 \%$  respectivement. La dépolymérisation a, elle, été mise en avant avec la diminution de la longueur de corrélation associé au pic 1 (lié à l'assemblage des réseaux 2D) mais aussi avec la baisse de la longueur caractéristique associée aussi au pic 1 avec une valeur passant de  $48,6 \pm 0,5$  nm à  $43,7 \pm 0,6$  nm. Ces observations ont pu être faites de façon plus précise à l'aide la méthode de détection des centres. Nous avons pu donc mettre en évidence la baisse du taux d'organisation et de la connectivité moyenne entre  $x_{EtOH} = 1$  et  $x_{EtOH} = 0,1$ . L'évolution du taux de carrés nous a permis d'observer que la dépolymérisation et la désorption des origamis de la surface pouvait être deux phénomènes en compétition. En effet, nous avons observé une diminution entre  $x_{EtOH} = 1$  et  $x_{EtOH} = 0,8$ . Cependant, ce paramètre augmente à  $x_{EtOH} = 0,7$  et baisse de nouveau entre  $x_{EtOH} = 0,7$  et  $x_{EtOH} = 0,1$ . Ainsi, pour des proportions en EtOH supérieures à 0,7, le phénomène de dépolymérisation des réseaux est présent mais la désorption des origamis de la surface est faible. Cette désorption commence à être plus importante à  $x_{EtOH} = 0,7$  car moins d'origamis sont présent sur la surface du substrat. Entre  $x_{EtOH} = 0,7$

et  $x_{EtOH} = 0,1$ , la désorption devient de plus en plus importante ce qui explique le fait que le taux de carrés soit quasiment nul.

Dans un deuxième temps, nous avons mis en évidence le rôle de la concentration en cations  $Mg^{2+}$  sur l'auto-assemblage pour des concentrations comprises entre 20 mM et 100 mM. Ainsi nous avons observé que pour des concentrations situées entre 20 mM et 40 mM en  $MgCl_2$  le taux de présence des monocouches d'ADN mais aussi celui des multicouches ont augmenté. Nous avons attribué cela une augmentation des ponts électrostatiques entre les origamis et la surface du substrat. Ainsi nous avons conclu que dans cette gamme de concentrations, les origamis ont formé des monocouches qui ont ensuite été recouvertes de multicouches. Ces dernières se forment préférentiellement pour une concentration en  $MgCl_2$  de 40 mM. Cependant, le taux de présence des multicouches a diminué entre 40 mM et 100 mM en  $MgCl_2$ . Cela est dû au fait que l'interaction ADN-surface se fait aussi via des liaisons H entre l'ADN et les groupements silanol de la surface. Cette interaction diminue avec la hausse de la concentration en  $MgCl_2$  entraînant une baisse des interactions attractives.

Outre l'interaction ADN-surface, nous avons mis en évidence l'effet de la concentration en  $MgCl_2$  sur l'ordre au sein des réseaux 2D déposés sur la surface. En effet, la longueur de corrélation associée au pic 1 a augmenté avec l'élévation de la concentration en  $MgCl_2$ . La valeur de ce paramètre est passé de  $150 \pm 19$  nm pour 20 mM en  $MgCl_2$  à  $384 \pm 75$  nm pour 100 mM en  $MgCl_2$ . Avec la méthode de détection des centres, nous avons pu mettre en évidence le fait que l'ordre le plus élevé se trouvait à 80 mM en  $MgCl_2$ . En effet, tous les paramètres d'ordre ont atteint leur valeur maximale à cette concentration. Pour nous, cela est dû à l'inversion de charge qu'il peut avoir lieu sur la molécule d'ADN lorsque que l'on augmente la concentration en  $MgCl_2$ . Cela induit une augmentation de la répulsion entre les origamis d'ADN pouvant limiter leur association. Ces observations ont été validées en modifiant la concentration de chaque type de monomère (2 nM, 3 nM et 6 nM) en présence de 40 mM, 80 mM ou 100 mM en  $MgCl_2$ .

### III.4.2 L'auto-assemblage assisté par substrat en présence de $MgCl_2$ et de NaCl

Afin de permettre une meilleure diffusion de surface, nous avons ajouté à la solution d'assemblage des cations  $Na^+$ . Ces derniers ont la particularité de remplacer les cations divalents sur certains sites de fixation à la surface de l'oxyde.

Du fait de la diminution des énergies attractives avec l'ajout du NaCl, nous avons dû ajouter une étape de « re-fixation » avec l'ajout d'une solution de  $MgCl_2$  afin de garantir l'intégrité des réseaux à la surface du substrat lors du rinçage.

Dans un premier temps, nous avons observé que le taux de présence des monocouches a augmenté avec le temps d'incubation de l'étape d'auto-assemblage. Passant d'une valeur de  $27 \pm 15$  % à 1 h à une valeur de  $56 \pm 4$  % à 24 h. En liant ces résultats aux différents paramètres d'ordre, nous

avons remarqué que, malgré un plus faible recouvrement de surface, l'ordre le plus élevé était observé à 1 h d'incubation. Leur valeur diminue à 2 h avant de ré-augmenter jusqu'à 24 h. Cette tendance a été observée dans le cas du taux de présence des monocouches. Nous avons attribué cela au fait que lors de l'assemblage, des réseaux se forment au préalable dans la goutte avant d'interagir avec la surface. Une réorganisation de ses réseaux à lieu. Cependant, l'étape de rinçage, qui désorbe en priorité les monomères, entraîne un faible recouvrement de surface aux faibles temps d'incubation.

Afin de faciliter la réalisation des expériences, nous avons décidé de réduire le temps d'incubation pour l'étape de fixation de 24 h à 1 h. Dans ce sens, il nous a fallu trouver la meilleure concentration en  $MgCl_2$  afin de permettre de garder l'intégrité des réseaux formés sur la surface. Pour des concentrations comprises entre 20 mM et 320 mM en  $MgCl_2$ . Nous avons observé une augmentation du taux de présence des monocouches entre 20 mM et 80 mM puis une diminution des valeurs de ce paramètre jusqu'à 320 mM. Comme dans le cas avec le  $MgCl_2$ , la hausse de la concentration en  $MgCl_2$  a limité la formation des liaisons H entre les origamis et les surface du  $SiO_2$ . Cela a donc entraîné une baisse des interactions attractives entre l'ADN et la surface. Concernant les paramètres d'ordre, ces derniers ont progressé entre 20 mM et 320 mM. Ainsi, en intensifiant la concentration en  $MgCl_2$  nous avons favorisé les interactions ADN-ADN, expliquant les tendances observées.

La suite des travaux de ce chapitre s'est tournée sur l'étude de la variation de la concentration en  $MgCl_2$  de l'étape d'auto-assemblage. Nous avons réalisé cela pour des concentrations comprises entre 40 mM et 100 mM. Dans ce cas, nous avons observé que le taux de présence des monocouches a augmenté avec la hausse de la concentration entre 40 mM et 60 mM. Ce paramètre a ensuite été légèrement amplifié entre 40 mM et 60 mM en  $MgCl_2$ . En parallèle, le taux de présence des multicouches a augmenté de façon continue dans cette gamme de concentrations. Concernant les paramètres d'ordre, les valeurs les plus élevées ont été obtenues entre 60 mM et 100 mM en  $MgCl_2$ . Cependant, aucune différence notable n'a pu être mise en exergue malgré l'apparition des multicouches. Cela s'expliquant par la hausse des énergies attractives limitant les effets de diffusion et la réorganisation de surface.

Dans l'optique de moduler la diffusion de surface, nous avons fait varier la concentration en NaCl lors de l'étape d'auto-assemblage entre 0 mM et 60 mM en présence d'une concentration fixe de  $MgCl_2$  (74 mM). Lors de cette expérience, nous avons montré que le taux de présence de monocouches a diminué légèrement entre 0 mM et 40 mM avant une baisse drastique à partir de cette dernière. Dans le même temps, le taux de présence de multicouches a suivi la même tendance. Concernant l'ordre au sein de ces réseaux, la valeur de la longueur de corrélation associé au pic d'assemblage est resté stable entre 0 mM et 40 mM et a diminué entre 40 mM et 60 mM. Cependant, c'est avec la méthode de détections des centres que nous avons pu détecter une gamme de concentration permettant une très forte organisation. En effet entre 30 mM et 40 mM en NaCl, le taux d'organisation était supérieur à 80 %. Cela s'est aussi retrouvé dans le cas du taux de carrés avec des valeurs supérieures à 10 % dans cette gamme de concentrations.

## **Chapitre IV- Conclusion générale et perspectives**

## IV.1 Conclusion générale

L'objectif de cette thèse a été de proposer des origamis d'ADN pouvant être utilisés dans deux domaines d'applications pré-déterminés :

1. La préparation d'échantillons de cryo-TEM afin de permettre l'analyse structurale de supra-assemblages biologiques.
2. La réalisation de réseaux 2D de qubits sur silicium destinés à la fabrication d'ordinateurs quantiques.

### ❖ La préparation d'échantillons de cryo-TEM :

Dans la première partie du chapitre II, nous avons mis en place un origami en forme de prisme triangulaire pouvant former des filaments par appariement de base. Nous avons établi les paramètres de synthèse des origamis monomères avant leur purification et la caractérisation au TEM. Ensuite, nous avons comparé deux méthodes de polymérisation afin de permettre la formation des microfilaments. Dans le premier cas, la **polymérisation dite « directe »** a consisté à mélanger le scaffold et les staples (dont les brins connecteurs) dans le tube Eppendorf. Le but était de réaliser la synthèse des filaments directement pendant le recuit en température. Le deuxième cas consiste en une **polymérisation en deux étapes**. Dans ce cas, le scaffold a été mélangé avec les staples (sans les brins connecteurs) afin de permettre la formation des monomères. Ensuite, une incubation à température constante a été réalisée en présence des brins connecteurs et des monomères afin de former les microfilaments. Différents paramètres tels que la concentration en connecteurs, la concentration en  $MgCl_2$ , le temps d'incubation ou encore la température d'incubation ont été étudiés.

Dans le cas de la concentration en connecteurs, nous avons montré qu'une concentration de 50 nM (considérée comme modérée) était suffisante pour obtenir des filaments de bonne qualité et avec une présence d'oligonucléotides en excès limitée. L'élévation du temps d'incubation nous a permis de mettre en exergue l'amplification de la longueur des filaments entre 1 h et 30 h en présence de 50 nM de connecteurs et de 11 mM de  $MgCl_2$  à une température de 37 °C.

Concernant la température d'incubation, nous avons fait ressortir son influence sur la taille des filaments obtenus. En effet, pour trois températures différentes (25 °C, 30 °C et 37 °C) nous avons constaté que les filaments les plus longs ont été formés à 37 °C avec des longueurs supérieures à 1  $\mu m$  après 12 h et 15 h d'incubation.

Le dernier paramètre que nous avons étudié est la concentration en  $MgCl_2$ . L'idée était d'amplifier la vitesse de polymérisation avec l'augmentation de cette concentration (entre 11 mM et 30 mM). Nous avons observé que la hausse de la concentration en ions magnésium au-dessus de 11 mM a entraîné l'agrégation des filaments. Ce phénomène est attribué au renforcement de l'écrantage des charges négatives de l'ADN avec l'augmentation de la teneur en  $MgCl_2$ .

Lors de nos expériences, nous avons observé une torsion dans la structure des monomères se répercutant sur celle des microfilaments. Afin de supprimer cette torsion, nous avons supprimé des paires de bases sur trois zones des filaments toutes les 63 paires de bases. Cela nous a permis de passer d'une hélicité de 10,5 pb/tour d'hélice à une hélicité de 10,34 pb/tour. La suppression des torsions a ainsi pu être effective dans la structure des monomères et donc dans celle des microfilaments.

#### ❖ Les réseaux 2D de qubits sur silicium destinés aux ordinateurs quantiques

Dans la seconde partie du chapitre II, nous avons pour objectif de proposer un masque de gravure en origamis d'ADN permettant la création de réseaux 2D de qubits sur silicium. Afin d'y parvenir, nous avons réalisé deux origamis d'ADN de forme carrés complémentaires l'un de l'autre et s'auto-assemblant en réseaux 2D en présence de  $MgCl_2$ . Après les étapes de synthèse et de purification des monomères, nous avons fait varier différents paramètres, que sont la concentration en  $MgCl_2$ , le temps d'incubation et la température d'incubation, afin de permettre la formation de larges réseaux 2D.

Concernant la concentration en  $MgCl_2$ , nous avons noté des premières associations de monomères à partir de 35 mM. Des réseaux 2D de taille plus importante ont commencé à être observés à partir de 42 mM en  $MgCl_2$ .

Dans le cas de la température d'incubation, nous montrons la formation de nucléi à faible température (5 °C) agglomérés les uns avec les autres. L'élévation de la température (de 15 °C à 30 °C) a provoqué l'obtention de plus larges réseaux 2D.

Enfin, la hausse du temps d'incubation a entraîné une augmentation linéaire de l'aire moyenne des réseaux 2D entre 1 h et 1 j suivie d'un fort ralentissement entre 1 j et 18 j avec une évolution quasi-stable.

#### ❖ Des designs d'origamis originaux s'auto-assemblant par complémentarité de forme

La dernière partie du Chapitre II a été consacrée à la réalisation de trois designs d'origamis originaux pouvant former des structures hiérarchiques par complémentarité de forme. Nous avons mis en place :

- Un origami en forme de Z formant des microfilaments 1D,
- Un origami rectangulaire s'auto-assemblant en réseaux linéaires,
- Un origami se trimérisant en nanocapsules ressemblant à des protéines en forme de « Vault ».

De nombreuses recherches ont été réalisées pour permettre le transfert des motifs des origamis d'ADN dans des substrats d'oxyde pour la microélectronique. Dans notre cas, nous nous sommes plutôt intéressés au contrôle de l'auto-assemblage des réseaux 2D sur des substrats de  $SiO_2$

thermique. Dans l'idée, nous souhaitons contrôler les énergies d'interactions attractives et répulsives entre les origamis et la surface de l'oxyde en utilisant un mélange de cations monovalents et divalents. C'est ce travail que nous avons réalisé dans le Chapitre III. Nous avons mis en place des protocoles permettant l'auto-assemblage assisté par substrat des réseaux 2D, leur caractérisation par AFM et CD-SEM et leur analyse par traitement d'image (les histogrammes des hauteurs, Image J, les PSD radiales et la méthode de détection des centres). Deux cas ont été étudiés pour l'auto-assemblage sur substrat : Avec du  $MgCl_2$  et avec un mélange de  $MgCl_2$  et de  $NaCl$ .

#### ❖ L'auto-assemblage assisté par substrat en présence de $MgCl_2$

Ici, nous nous étions placés dans le cas de l'auto-assemblage sur surface en présence uniquement de  $MgCl_2$ . Les différents paramètres étudiés étaient, la composition de la solution de rinçage en eau et en EtOH, la concentration en  $MgCl_2$  et la concentration en monomères.

La solution de rinçage est un des paramètres les plus importants concernant la morphologie des nanostructures observés sur la surface. En effet, l'EtOH permet de fixer les origamis sur la surface lors de l'étape de rinçage. Une faible proportion en EtOH entrainera donc une désorption des nanostructures de la surface. Dans notre cas, nous nous sommes intéressés à ce phénomène mais aussi à la dépolymérisation des réseaux 2D lors du rinçage. Pour des proportions volumiques en EtOH comprises entre  $x_{EtOH} = 1$  et  $x_{EtOH} = 0,1$  nous avons pu observer une diminution du taux de présence des monocouches avec une valeur passant de  $95,2 \pm 2,0 \%$  et de  $3,1 \pm 0,1 \%$  respectivement. Cela a mis en évidence la désorption des origamis de la surface. Concernant l'évolution des paramètres d'ordre, nous l'avons identifié grâce à la méthode des PSD radiales et celle de la détection des centres. Pour les PSD radiales nous avons observé la décroissance de la longueur de corrélation associé au pic 1 (pic lié à l'assemblage). En effet, à  $x_{EtOH} = 1$  la longueur de corrélation était de  $366 \pm 101$  nm pour une valeur autour de 100 nm entre  $x_{EtOH} = 0,5$  et  $x_{EtOH} = 0,1$ . Les paramètres obtenus avec la détection des centres sont allés dans le même sens. En effet, dans le cas du taux d'organisation, il est passé de 55,4 % pour  $x_{EtOH} = 1$  à 5,7 % pour  $x_{EtOH} = 0,1$ . Ces informations permettent de mettre en avant la dépolymérisation des réseaux entre eux en complément de la désorption de la surface. Un autre phénomène a pu être notée avec l'évolution du taux de carrés. En effet, ce paramètre diminue entre  $x_{EtOH} = 1$  et  $x_{EtOH} = 0,8$ . Il augmente à  $x_{EtOH} = 0,7$  puis baisse de nouveau entre  $x_{EtOH} = 0,7$  et  $x_{EtOH} = 0,1$ . Cela démontre que la désorption et la dépolymérisation sont deux phénomènes en compétitions. Nous avons pu, en effet, observer une faible désorption de surface mais une désorganisation entre  $x_{EtOH} = 1$  et  $x_{EtOH} = 0,7$  et de fortes désorptions de surface et dépolymérisation pour  $x_{EtOH} < 0,7$ .

En solution, le  $MgCl_2$  sert à écranter la charge négative des molécules d'ADN afin de permettre les assemblages. Sur une surface, une partie des sels de magnésium vont interagir avec les groupements silanols du substrat et garantir la formation de ponts salins avec les origamis d'ADN. La concentration en  $MgCl_2$  a été variée entre 20 mM et 100 mM de  $MgCl_2$ . Nous avons observé que le taux de présence des monocouches et celui des multicouches ont augmenté entre 20 mM et 40 mM. Cependant, nous avons mis en évidence que le taux de présence des multicouches a diminué entre 40 mM et 100 mM en  $MgCl_2$ . Cela a été attribué au fait qu'entre 20 mM et 40 mM en  $MgCl_2$  nous avons

favorisé la formation de ponts salins entre la surface et les nanostructures d'ADN permettant la fixation des origamis sur la surface et, par la suite, la formation de multicouches. Néanmoins, entre 40 mM et 100 mM, un autre type d'interactions attractives a été pris en compte afin d'expliquer les résultats. En effet, des liaisons H peuvent se former entre l'ADN et les groupements silanol de la surface. La formation de ces liaisons peut être limitée par une trop forte augmentation de la concentration en  $MgCl_2$ . Cela a pour effet de diminuer les forces attractives. Concernant les paramètres d'ordre, nous avons observé une amplification de leur valeur avec l'augmentation de la concentration en  $MgCl_2$ . Cette évolution est liée à la hausse de l'écrantage de la charge de surface autorisant une plus forte attraction entre les nanostructures d'ADN.

L'ensemble de ces observations a été validé en modifiant la concentration en monomères (entre 2 nM et 6 nM) et celle en  $MgCl_2$  (entre 40 mM et 100 mM).

#### ❖ **L'auto-assemblage assisté par substrat en présence de $MgCl_2$ et de NaCl**

Dans cette partie, nous avons ajouté dans la solution d'auto-assemblage du NaCl pour permettre une meilleure diffusion des origamis sur la surface et donc de meilleurs assemblages. Une étape de « re-fixation » a été ajoutée avec l'insertion d'une solution de  $MgCl_2$  dans le but de stabiliser les réseaux sur la surface lors du rinçage. Différents paramètres ont été étudiés afin d'améliorer le procédé d'auto-assemblage : le temps d'incubation de l'étape d'assemblage sur surface, la concentration en  $MgCl_2$  de l'étape de fixation, la concentration en  $MgCl_2$  et celle en NaCl de l'étape d'auto-assemblage assisté par substrat.

Concernant le temps d'incubation de l'étape d'auto-assemblage sur surface, nous avons observé une augmentation du taux de présence des monocouches entre 1 h et 24 h d'incubation avec des valeurs respectives de  $27 \pm 15 \%$  et de  $56 \pm 4 \%$ . Dans le cas de la longueur de corrélation associé au pic 1 caractéristique de l'assemblage nous avons observé la valeur maximum à 1 h d'incubation. Cette valeur a ensuite diminué à 2 h et à ré-augmenté légèrement jusqu'à 24 h. Cette tendance a aussi été observé avec le taux d'organisation, le taux de carrés et la connectivité moyenne. Cela a permis de mettre en évidence le fait que des réseaux se sont formés dans la goutte avant de se déposer sur la surface du substrat et de se réorganiser avec le temps d'incubation.

Afin d'éviter la désorption des réseaux de la surface et leur dépolymérisation lors du rinçage nous avons fait varier la concentration en  $MgCl_2$  de l'étape de fixation. Le meilleur taux de présence des monocouches a été obtenu en présence de 80 mM en  $MgCl_2$  pour un temps d'incubation d'une heure. Les paramètres d'ordre les plus élevés ont été obtenus à 160 mM et à 320 mM en  $MgCl_2$ . Dans ces deux derniers cas, nous avons favorisé les interactions ADN-ADN. Cependant les fortes concentrations en  $MgCl_2$  ont limité la formation des liaisons H empêchant l'adsorption des origamis sur la surface. Le reste des expériences ont été réalisées avec une étape de fixation d'une durée d'une heure en présence de 80 mM en  $MgCl_2$ .

A cette concentration, même si les origamis sont fixés à la surface et se désorbent peu, la structure des réseaux 2D est désorganisée sous l'effet de la dépolymérisation. Afin de garantir une meilleure stabilité des réseaux 2D, nous avons décidé de réduire la concentration en NaCl utilisée.

Dans un premier temps, nous avons fixé cette concentration à une valeur de 35 mM et fait varier la concentration en  $MgCl_2$  de 40 mM à 100 mM. Nous avons observé que le taux de présence des monocouches a augmenté avec la concentration en  $MgCl_2$ . Une hausse des paramètres d'ordre a aussi pu être notée. Cependant, le taux de présence des multicouches a augmenté. Cela montre que malgré l'amplification de l'ordre, nous favorisons quand même la formation de multicouches dans ces conditions.

Afin de limiter la formation des multicouches, nous avons décidé de faire varier la concentration en NaCl entre 0 mM et 60 mM en présence de 74 mM de  $MgCl_2$ . Dans ce cas, nous avons observé que le taux de présence de monocouches, après une stagnation entre 0 mM et 30 mM, une décroissance est présente entre 30 mM et 60 mM en NaCl. Le plus intéressant est au niveau du taux de présence des multicouches. En effet, nous avons noté une baisse du taux avec la hausse de la concentration en NaCl. De plus, les paramètres d'ordre mesurés avec les deux méthodes nous ont permis de montrer que l'ordre le plus important se situe à 30 mM et à 40 mM en NaCl.

Ces expériences ont permis de montrer qu'il est possible, à partir d'origamis monomériques complémentaires de forme, de réaliser des assemblages à grande échelle sur des surfaces en  $SiO_2$  en contrôlant les interactions ADN-surface. L'optimisation de la concentration en  $MgCl_2$  et de celle en NaCl dans la solution d'assemblage a permis d'éviter la formation des multicouches, la désorganisation des réseaux 2D et la désorption des origamis de la surface lors du rinçage. Cela nous a permis de faire un grand pas sur la compréhension des assemblages sur le  $SiO_2$  et sur son intégration dans des protocoles de transfert dans le Si par gravure et d'atteindre les principaux objectifs fixés au début de la thèse.

## IV.2 Perspectives

### IV.2.1 Design, synthèse et purification des origamis d'ADN

#### IV.2.1.1 Les Toblérone pour la cryo-TEM

Au cours de cette thèse nous avons mis en place un protocole de synthèse de microfilaments en solution destinés à être utilisés pour la préparation d'échantillons de cryo-TEM pour des analyses structurales de suprastructures biologiques. Au cours du procédé de préparation, des ménisques de glace se forment généralement lors de l'étape de vitrification entraînant une baisse de la résolution. Nous avons pu observer que la présence des microfilaments en origamis d'ADN limite la formation de ces ménisques non désirés. Nous avons présenté les premiers résultats de préparation de grilles de cryo-TEM obtenus et les premières reconstitutions 3D de protéines issus de cette méthode. Pour la suite, il serait intéressant de réaliser des analyses en tomographies afin de mettre en évidence le rôle de la forme des microfilaments sur l'épaisseur de glace obtenue.

En 2016, Thomas Martin *et al.* <sup>[151]</sup> ont démontré qu'il est possible de contrôler l'orientation des nanostructures d'ADN en les fonctionnalisant avec des brins thymines. Ces derniers étant hydrophiles, ils ont la capacité de s'orienter vers l'interface air-eau avant le processus de vitrification <sup>[151]</sup>. Cette propriété permettrait le contrôle de l'épaisseur de glace formé en fonction du sens d'orientation des microfilaments.

#### IV.2.1.2 Les réseaux 2D en origamis d'ADN

Avec les nombreuses avancées quant à l'utilisation des origamis dans le domaine de la micro/nanoélectronique, nous avons souhaité cibler une application dans le domaine du calcul quantique.

Ainsi, deux monomères carrés complémentaires de forme ont été créés dans le but de réaliser les réseaux 2D souhaités. En présence de  $MgCl_2$ , nous avons pu, à partir des deux types de carrés, former les réseaux en solution. Différents paramètres ont été étudiés tels que la concentration en  $MgCl_2$ , le temps d'incubation ou encore la température d'incubation. Ces études nous ont donné une bonne indication des effets de ces différents paramètres sur les réseaux 2D formés en solution. Des analyses plus précises peuvent être envisagées à l'aide de mesures FRET. C'est notamment le cas de l'étude réalisée par Gerling Thomas *et al.* en 2015 <sup>[42]</sup> qui a permis de montrer l'effet de la température et de la concentration en  $MgCl_2$  sur les assemblages hiérarchiques mais aussi sur leurs propriétés de réversibilité de ce type d'assemblages

## IV.2.2 Auto-assemblage assisté par substrat des réseaux 2D en origamis d'ADN

Des protocoles d'auto-assemblage sur surface ont été mis en place pour permettre l'auto-assemblage des réseaux sur les substrats de SiO<sub>2</sub>. Deux cas ont été étudiés : L'auto-assemblage en présence de MgCl<sub>2</sub> et celui en présence de MgCl<sub>2</sub> et de NaCl. Dans le second cas, une étape de « fixation » a été ajoutée dans le but d'éviter la dépolymérisation des réseaux et les effets de désorption de la surface.

### IV.2.2.1 Etude de l'épaisseur des origamis en fonction de l'environnement

Au cours de nos expériences, nous avons pu observer une diminution de l'épaisseur des origamis dans des conditions dites « à sec » par rapport à celles attendues et mesurées au TEM. Cela a été attribuée à une déshydratation des brins d'ADN lors de l'étape de séchage. Il serait intéressant de réaliser une étude sur l'influence des conditions du milieu environnant sur l'épaisseur des origamis observés (à sec, en milieu liquide, en fonction de la concentration en MgCl<sub>2</sub> ou encore du temps d'incubation) avec le même instrument de mesure.

### IV.2.2.2 Amélioration du procédé d'auto-assemblage assisté par substrat

Nous avons mis en évidence l'importance de la concentration et du type de sels utilisés sur le l'auto-assemblage sur surface des réseaux 2D et sur l'ordre observé.

Dans le cas du système en présence de MgCl<sub>2</sub> et de NaCl, nous avons montré l'importance de la concentration en MgCl<sub>2</sub> sur la morphologie des réseaux observé à la fin du procédé. Plusieurs études ont fait état de d'autres types de cations divalents pouvant plus facilement remplacer les cations Mg<sup>2+</sup> et Na<sup>+</sup> de la surface lors de l'étape de fixation. C'est en effet le cas des cations de métaux de transition tels que le Zn<sup>2+</sup> ou encore le Ni<sup>2+</sup> qui interagissent moins avec les molécules d'ADN et ont donc une meilleure affinité avec la surface. Il pourrait donc être intéressant d'étudier la fixation en utilisant ces cations. Cela permettrait une meilleure adsorption des réseaux 2D sur la surface avant les étapes de rinçage et de séchage et donc une meilleure stabilité des structures.

Nous pourrions aussi envisager l'ajout d'une étape de désassemblage et d'une étape de réassemblage afin d'améliorer la qualité des réseaux 2D formés. Deux possibilités s'offrent à nous :

- L'augmentation de la température d'incubation à T > 25 °C permettant le désassemblage des réseaux 2D puis une diminution à T = 25 °C afin de permettre leur réassemblage.

- La hausse de la concentration en NaCl afin d'augmenter les effets de diffusion et de désassemblage et sa baisse afin de réorganiser les réseaux 2D.

Ces deux méthodes nous permettraient d'obtenir des petits nucléi autour desquels la réorganisation pourra se faire et garantir la formation de réseaux 2D de taille plus importante.

### **IV.2.2.3 Autres méthodes de quantification de l'ordre des réseaux 2D sur le substrat de SiO<sub>2</sub>**

Dans le Chapitre III, nous avons utilisé une méthode basée sur le tracé des fonctions de densité spectrale radiale d'images AFM et CD-SEM et sa décomposition dans le but d'avoir des données quantitatives sur l'ordre présent sur la surface des substrats de SiO<sub>2</sub>. Ce tracé a été réalisé à l'aide d'un code Python mis en place en interne.

Il est possible d'obtenir le même type de tracé avec des mesures de diffusion centrale des rayons X à faible angle (SAXS pour Small Angle X-ray Scattering). Cette méthode de caractérisation est basée sur l'interaction entre la surface d'un échantillon et un faisceau de rayons X incident. Elle permet l'analyse structurale de matériaux à l'échelle nanométrique. Il existe deux méthodes différentes :

- Le SAXS qui est basée sur un mode en transmission. Ce mode est utilisé pour l'analyse de poudres.
- Le GI-SAXS (Grazing-Incidence Small Angle X-ray Scattering) basée sur un mode en réflexion en incidence rasante et utilisée pour l'analyse structurale de films minces.

Nous présentons un exemple d'analyse GI-SAXS d'échantillons que nous avons réalisés durant la thèse (section III.3). Les analyses sont présentées sur la Figure IV-1. Nous pouvons y observer les fonctions de densités spectrales radiales des échantillons qui sont semblables à celles que nous avons obtenues dans la section III.3. Ces courbes nous permettent d'observer deux pics à 50,4 nm et à 38,1 nm et qui sont respectivement caractéristiques de la période du réseaux 2D et d'une dimension présente au sein de la structure du monomère. Pour la suite des travaux, il serait intéressant d'approfondir cette étude afin de mesurer les valeurs de longueurs caractéristiques et de longueur de corrélation en fonction des conditions de préparations des échantillons. Cela permettra aussi de comparer cette méthode d'analyse à celle liée au traitement des images AFM et CD-SEM.

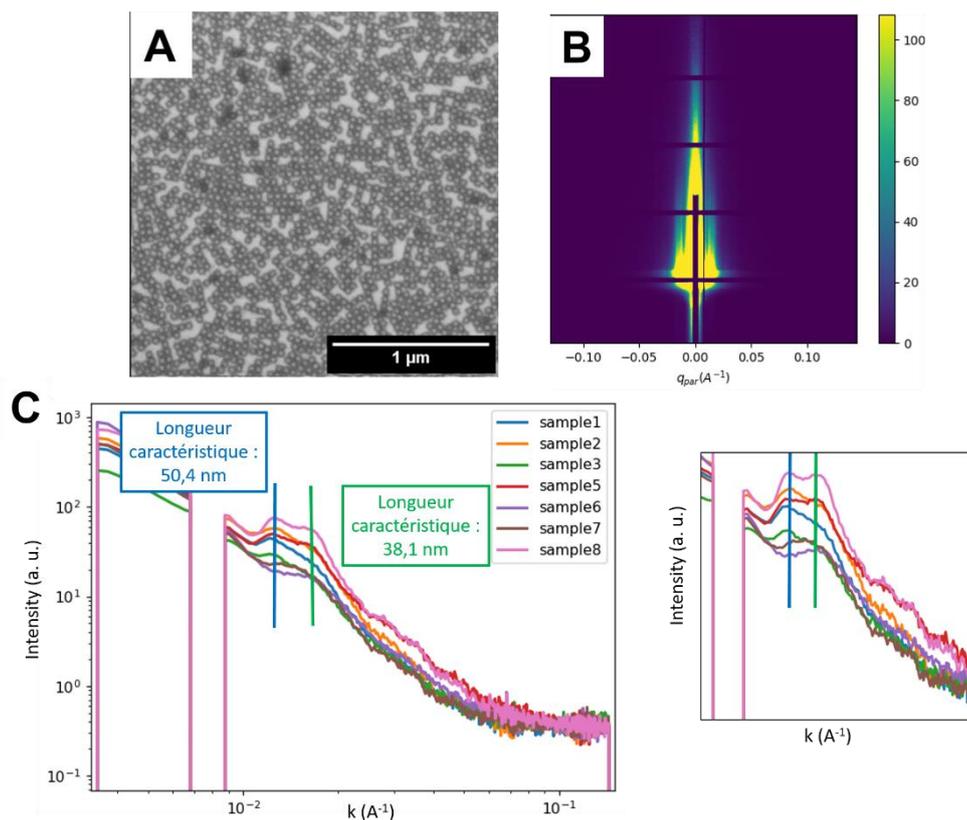


Figure IV-1 : A) Images CD-SEM de l'échantillon 8. B) Cliché GI-SAXS correspondant. C) Profils radiaux correspondant aux clichés GI-SAXS des différents échantillons.

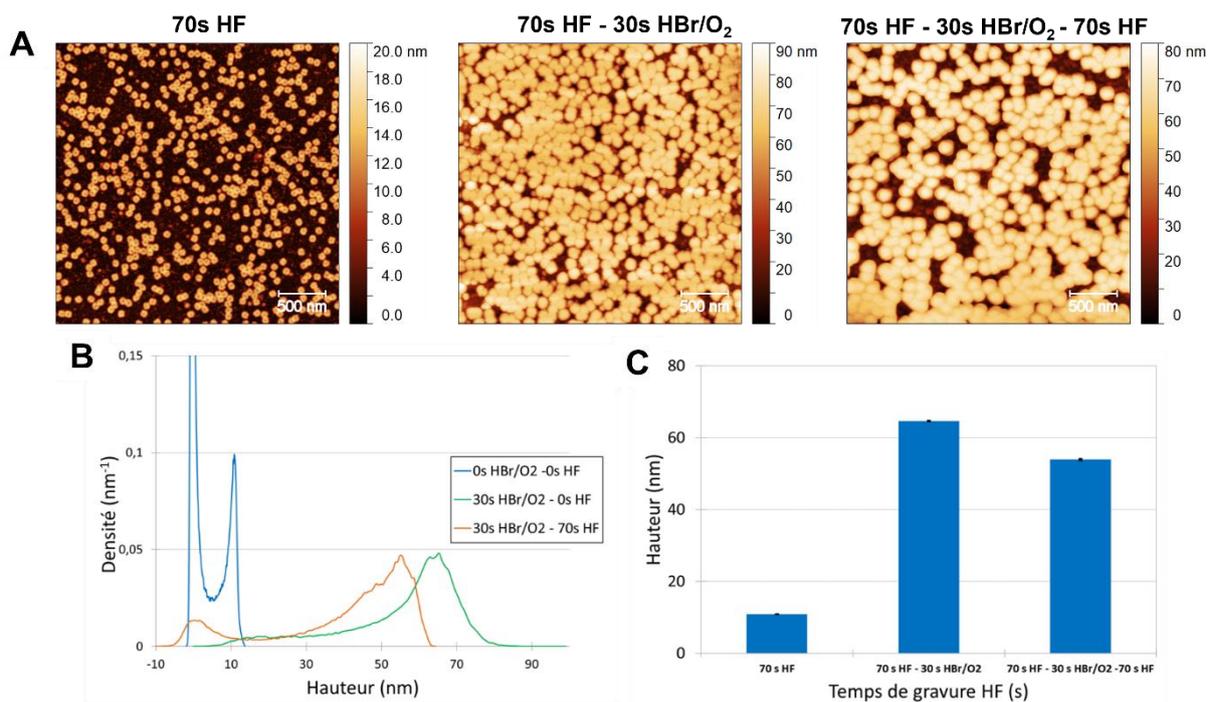
#### IV.2.2.4 Premiers résultats de gravure dans le SiO<sub>2</sub> et dans le Si

Une méthode de transfert de le Si a été développée au sein du CEA-Leti <sup>[69,70]</sup>. Cette méthode est constituée de deux étapes de gravure :

1. Une gravure HF vapeur pour le transfert du motif des origamis d'ADN dans le substrat en SiO<sub>2</sub>,
2. Une gravure HBr/O<sub>2</sub> du motif du masque dur en SiO<sub>2</sub> dans le substrat Si,
3. Une dernière gravure HF vapeur afin de retirer le masque dur en SiO<sub>2</sub>.

Des premiers essais de gravures ont été réalisés sur des monomères carrés déposés sur une surface de SiO<sub>2</sub> en présence de 40 mM de MgCl<sub>2</sub> pendant 1 h. Des images AFM et CD-SEM des échantillons sont présentées sur la Figure IV-2.

Il serait intéressant d'approfondir d'avantage l'étude sur le transfert du motif des monomères dans le SiO<sub>2</sub> et le Si et d'exploiter les résultats obtenus afin de réaliser le transfert des réseaux 2D dans ses substrats.



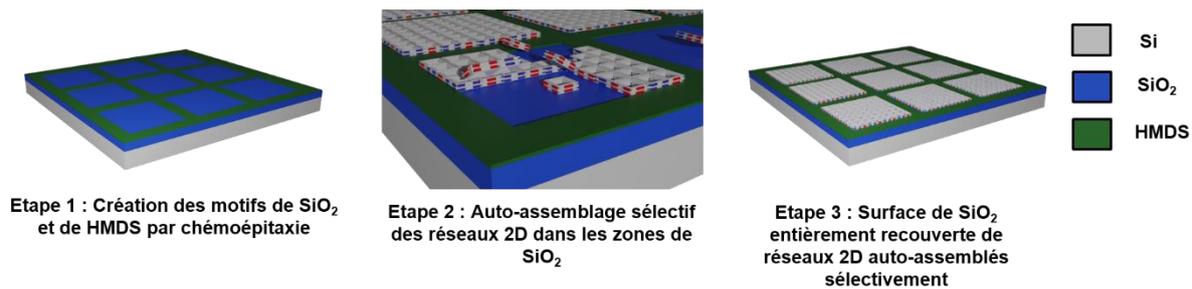
**Figure IV-2 :** A) Images AFM des correspondants aux différentes étapes de transfert des motifs monomères dans le Si. B) Histogrammes des hauteurs correspondantes. C) Evolution de la hauteur des motifs en fonction des étapes de transfert dans le Si.

#### IV.2.2.5 Perspectives sur l’auto-assemblage assisté par substrat localisé des réseaux 2D

Dans cette thèse, nous avons montré qu’il est possible de contrôler les interactions ADN-surface afin de permettre l’auto-assemblage assisté par substrat de réseaux 2D à grande échelle. Au cours de sa thèse, Marie Marmiesse a exploité une méthode de structuration chimique de surface afin de permettre le positionnement déterministe de structures unitaires sur une surface de SiO<sub>2</sub> thermique. Via l’utilisation de méthodes de lithographie (e-beam, nanoimpression, photolithographie), une alternance de chimie de surface avec des zones recouvertes de HMDS et des zones de SiO<sub>2</sub> a été réalisée, permettant le dépôt des origamis sur ces dernières.

Il nous paraît intéressant d’étudier la possibilité de réaliser l’auto-assemblage des origamis d’ADN de façon localisée en créant des zones de SiO<sub>2</sub> apparent avec des dimensions prédéfinies proportionnelles aux dimensions d’un monomère carré en origami (par exemple 470 nm x 470 nm). Un schéma de principe de l’auto-assemblage localisé est proposé sur la Figure IV-3. Cette méthode devrait permettre de contrôler la position et les dimensions des réseaux 2D formés.

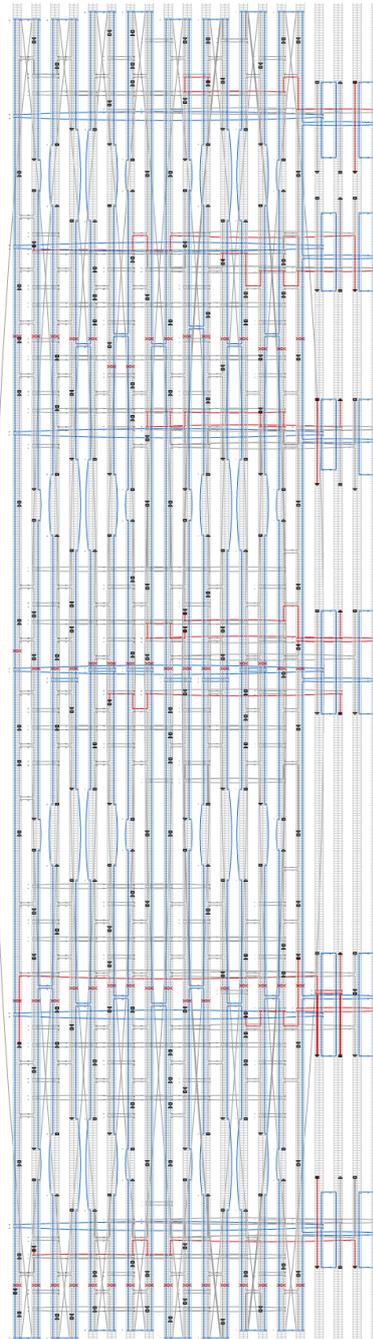
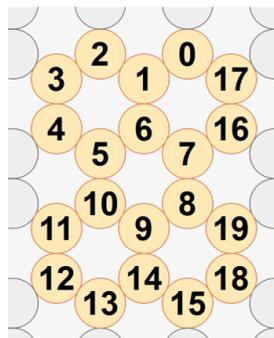
*Conclusion générale et perspectives*



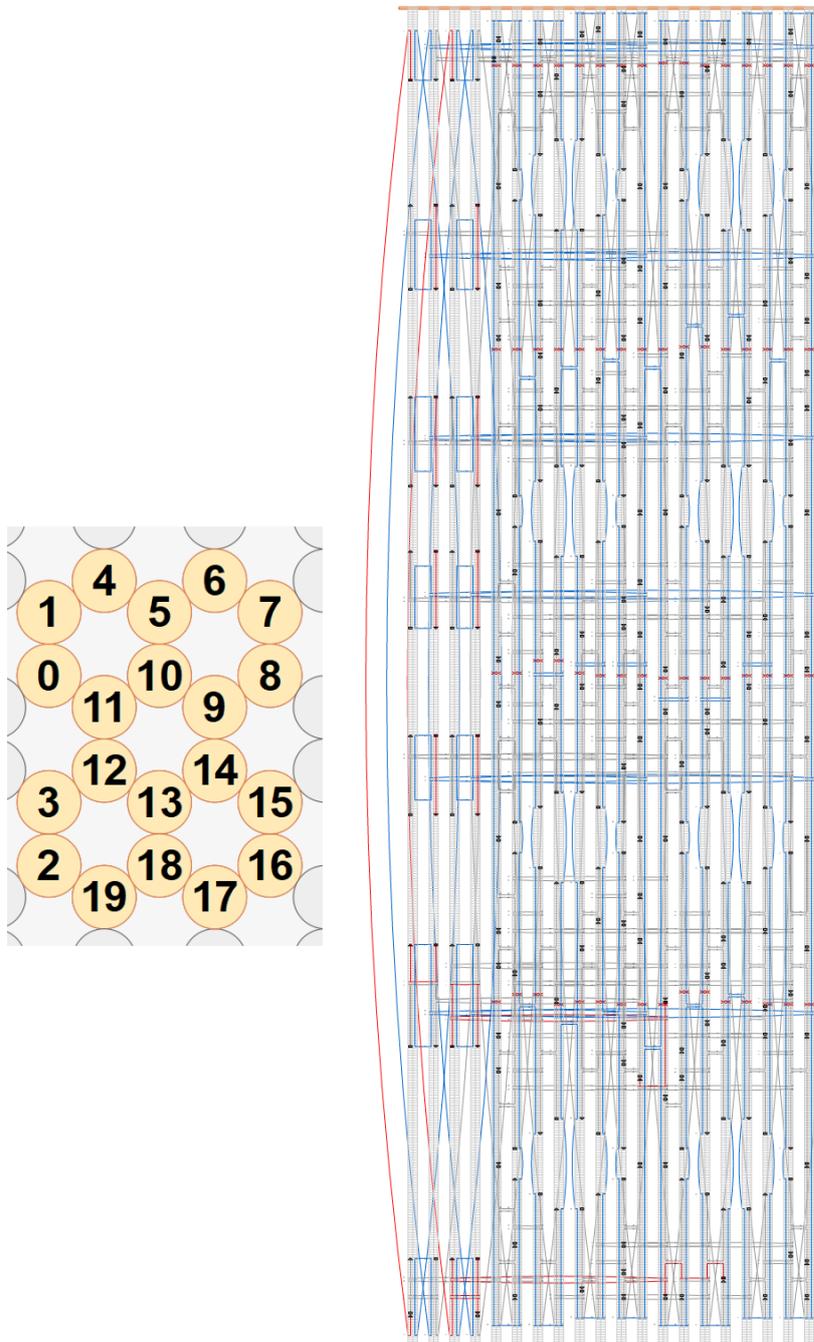
**Figure IV-3 : Schéma de principe de l'auto-assemblage sélectif des réseaux 2D en origamis d'ADN.**

# Annexes

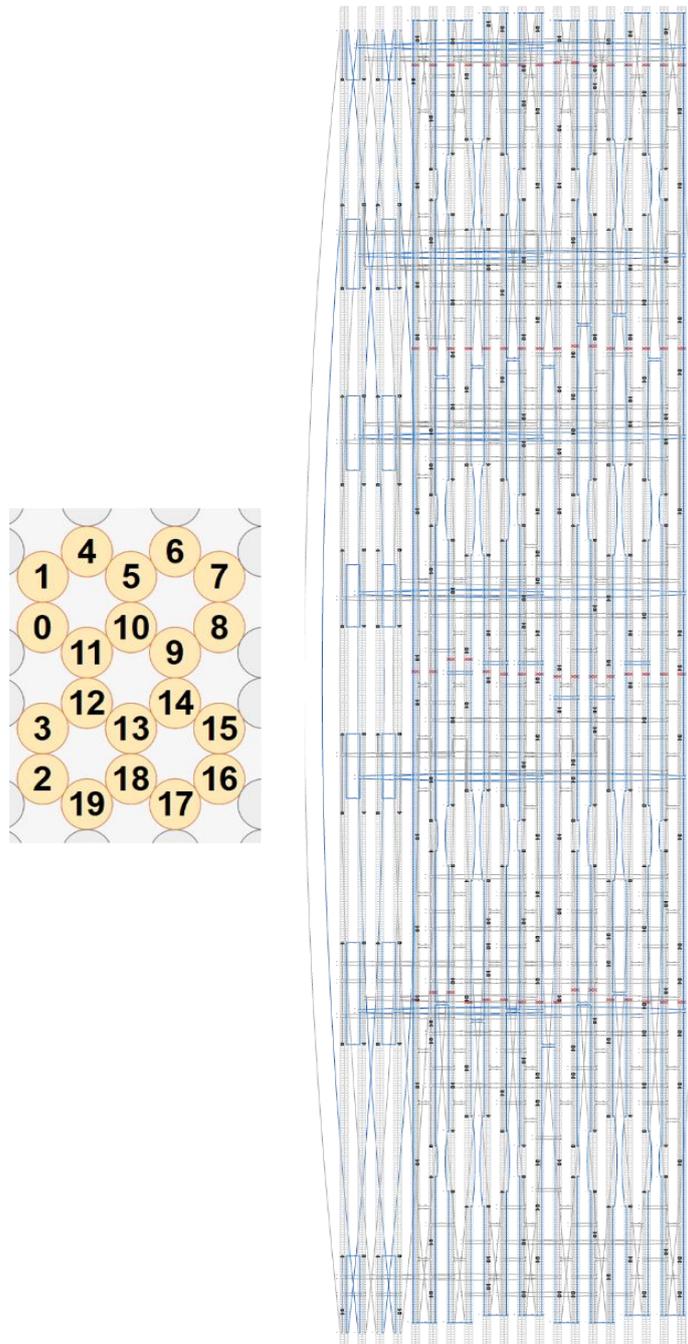
# Structures CaDNAno



**Figure 0-1 : Design CaDNAno de 2DA.**



**Figure 0-2 : Design CaDNAo de 2D<sub>B</sub>.**



**Figure 0-3 : Design CaDNAo de 2D<sub>BV2</sub>.**

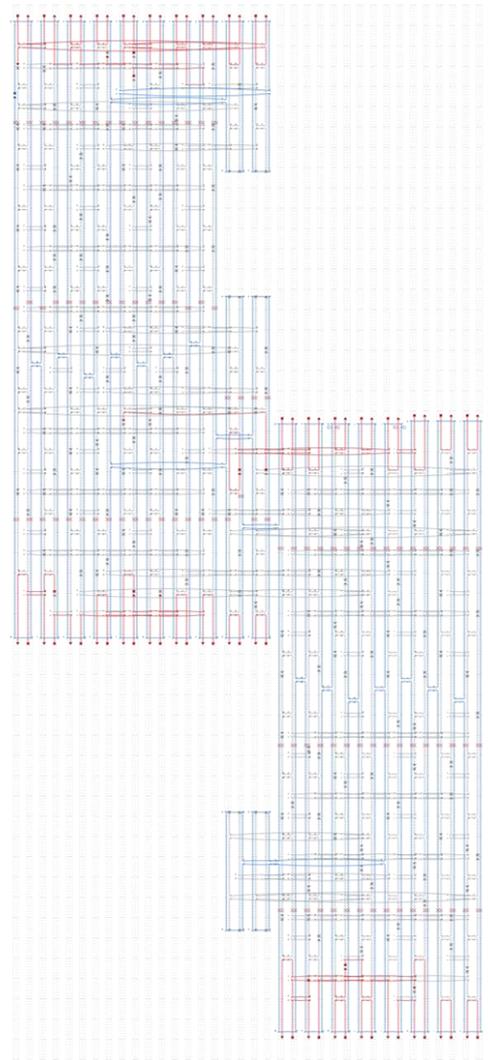
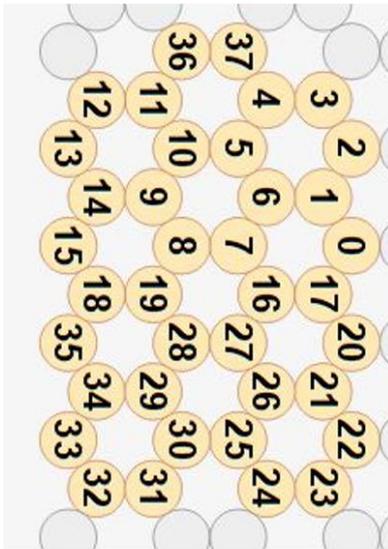
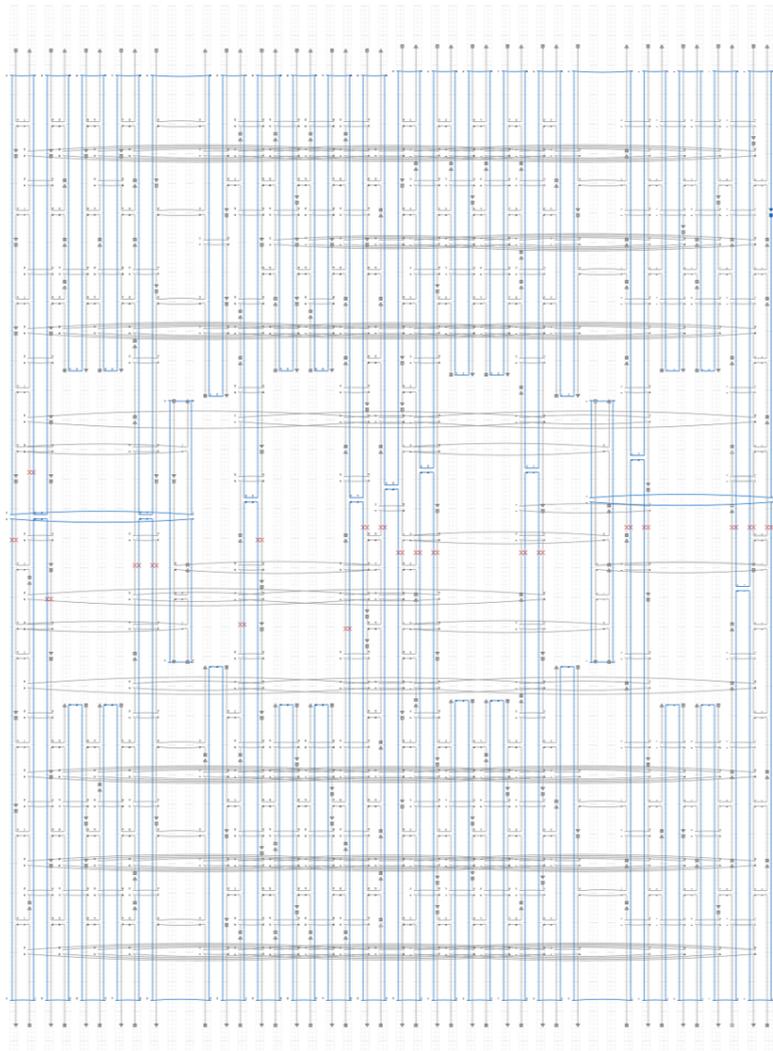
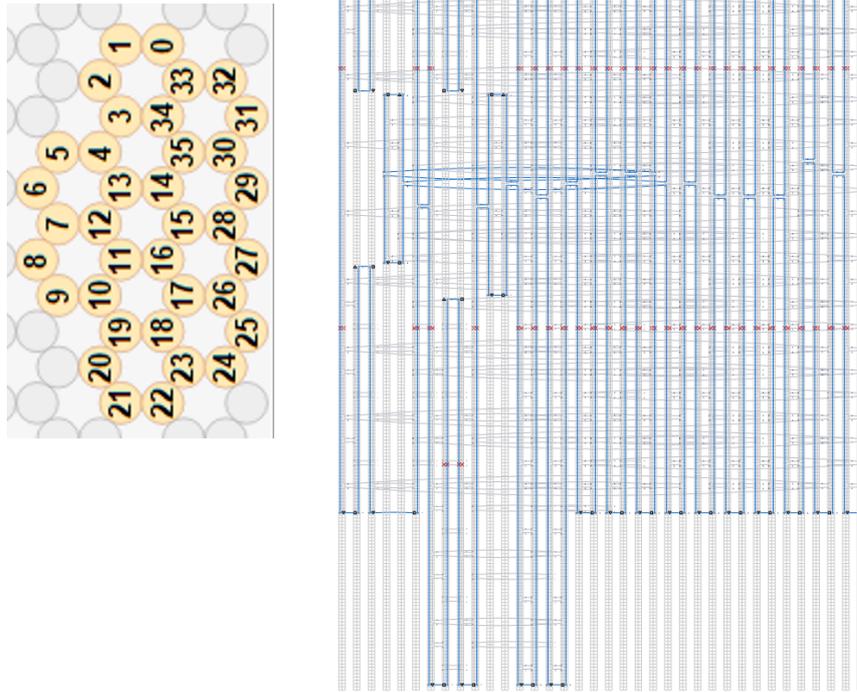


Figure 0-4 : Design CaDNAno du monomère en forme de Z.



**Figure 0-5 : Design CaDNAno du monomère carré s'auto-assemblant par complémentarité de forme en réseau 1D.**



**Figure 0-6 : Design CaDNAo du monomère s'auto-assemblant en capside en forme de « Vault ».**

# Bibliographie

- [1] Papadopoulou, A.; Laucks, J.; Tibbits, S. From Self-Assembly to Evolutionary Structures. *Archit. Design* **2017**, *87*, 28–37. DOI: 10.1002/ad.2192.
- [2] Busseron, E.; Ruff, Y.; Moulin, E.; Giuseppone, N. Supramolecular self-assemblies as functional nanomaterials. *Nanoscale* **2013**, *5*, 7098–7140. DOI: 10.1039/c3nr02176a.
- [3] Koubassova, N. A.; Tsaturyan, A. K. Molecular mechanism of actin-myosin motor in muscle. *Biochemistry. Biokhimiia* **2011**, *76*, 1484–1506. DOI: 10.1134/S0006297911130086.
- [4] Lecarpentier, Y.; Lambry, J. C.; Chemla, D.; Coirault, C. La myosine, moteur moléculaire musculaire. *Med Sci (Paris)* **1998**, *14*, 1077. DOI: 10.4267/10608/913.
- [5] Guo, K.; Shillcock, J.; Lipowsky, R. Self-assembly of actin monomers into long filaments: Brownian dynamics simulations. *The Journal of chemical physics* **2009**, *131*, 15102. DOI: 10.1063/1.3159003.
- [6] Perlmutter, J. D.; Hagan, M. F. Mechanisms of virus assembly. *Annual review of physical chemistry* **2015**, *66*, 217–239. DOI: 10.1146/annurev-physchem-040214-121637.
- [7] Buzón, P.; Maity, S.; Roos, W. H. Physical virology: From virus self-assembly to particle mechanics. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* **2020**, *12*. DOI: 10.1002/wnan.1613.
- [8] Rong, J.; Niu, Z.; Lee, L. A.; Wang, Q. Self-assembly of viral particles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2011**, *16*, 441–450. DOI: 10.1016/j.cocis.2011.09.001.
- [9] Schaedel, L.; Triclin, S.; Chrétien, D.; Abrieu, A.; Aumeier, C.; Gaillard, J.; Blanchoin, L.; Théry, M.; John, K. Lattice defects induce microtubule self-renewal. *Nature physics* **2019**, *15*, 830–838. DOI: 10.1038/s41567-019-0542-4.
- [10] <https://www.daviddarling.info/encyclopedia/M/microfilament.html>. Filament d'actine. <https://www.daviddarling.info/encyclopedia/M/microfilament.html> (accessed September 25, 2020).
- [11] <https://www.assignmentexpert.com/blog/are-there-any-useful-viruses-inside-us/>. Différentes structures de capsides de virus. <https://www.assignmentexpert.com/blog/are-there-any-useful-viruses-inside-us/> (accessed September 25, 2020).
- [12] Zottig, X.; Côté-Cyr, M.; Arpin, D.; Archambault, D.; Bourgault, S. Protein Supramolecular Structures: From Self-Assembly to Nanovaccine Design. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* **2020**, *10*. DOI: 10.3390/nano10051008.
- [13] Tibbits, S. The Self-Assembly Line. In *32nd Annual Conference of the Association for Computer Aided Design in Architecture*; ACADIA, Ed., 2012.
- [14] Franklin, R. E.; Gosling, R. G. The structure of sodium thymonucleate fibres. I. The influence of water content. *Acta Cryst* **1953**, *6*, 673–677. DOI: 10.1107/S0365110X53001939.
- [15] Watson, J.; Crick, F. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171*. DOI: 10.1038/171737a0.
- [16] Johannes M. Parikka; Karolina Sokotowska; Nemanja Markešević; J. Jussi Toppari. Constructing Large 2D Lattices Out of DNA-Tiles. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2021**, *26*, 1–28. DOI: 10.3390/molecules.
- [17] Roy, T.; Szuttor, K.; Smiatek, J.; Holm, C.; Hardt, S. Conformation and Dynamics of Long-Chain End-Tethered Polymers in Microchannels. *Polymers* **2019**, *11*. DOI: 10.3390/polym11030488.
- [18] Chen, H.; Meisburger, S. P.; Pabit, S. A.; Sutton, J. L.; Webb, W. W.; Pollack, L. Ionic strength-dependent persistence lengths of single-stranded RNA and DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, *109*, 799–804. DOI: 10.1073/pnas.1119057109.
- [19] Bhushan, B.; Luo, D.; Schrick, S. R.; Sigmund, W.; Zauscher, S. *Handbook of Nanomaterials Properties*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2014.

- [20] Anastassopoulou, J. Metal–DNA interactions. *Journal of Molecular Structure* **2003**, 651–653, 19–26. DOI: 10.1016/S0022-2860(02)00625-7.
- [21] Yan, X.; Huang, S.; Wang, Y.; Tang, Y.; Tian, Y. Bottom-Up Self-Assembly Based on DNA Nanotechnology. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* **2020**, 10. DOI: 10.3390/nano10102047.
- [22] Seeman, N. C. Nucleic Acid Junctions and Lattices. *Journal of Theoretical Biology* **1982**, 99, 237–247.
- [23] Winfree, E.; Liu, F.; Wenzler, L. A.; Seeman, N. C. Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals **1998**, 394. DOI: 10.1038/28998.
- [24] Lin, C.; Liu, Y.; Rinker, S.; Yan, H. DNA tile based self-assembly: building complex nanoarchitectures. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* **2006**, 7, 1641–1647. DOI: 10.1002/cphc.200600260.
- [25] He, Y.; Ye, T.; Su, M.; Zhang, C.; Ribbe, A. E.; Jiang, W.; Mao, C. Hierarchical self-assembly of DNA into symmetric supramolecular polyhedra. *Nature* **2008**, 452, 198–201. DOI: 10.1038/nature06597.
- [26] Ke, Y.; Ong, L. L.; Shih, W. M.; Yin, P. Three-dimensional structures self-assembled from DNA bricks. *Science (New York, N.Y.)* **2012**, 338, 1177–1183. DOI: 10.1126/science.1227268.
- [27] Ong, L. L.; Hanikel, N.; Yaghi, O. K.; Grun, C.; Strauss, M. T.; Bron, P.; Lai-Kee-Him, J.; Schueder, F.; Wang, B.; Wang, P.; *et al.* Programmable self-assembly of three-dimensional nanostructures from 10,000 unique components. *Nature* **2017**, 552, 72–77. DOI: 10.1038/nature24648.
- [28] Rothmund, P. W. K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns **2006**, 440, 297–302. DOI: 10.1038/nature04586.
- [29] Dey, S.; Fan, C.; Gothelf, K. V.; Li, J.; Lin, C.; Liu, L.; Liu, N.; Nijenhuis, M. A. D.; Saccà, B.; Simmel, F. C.; *et al.* DNA origami. *Nat Rev Methods Primers* **2021**, 1, 1–24. DOI: 10.1038/s43586-020-00009-8.
- [30] Castro, C. E. A primer to scaffolded DNA origami. *Nature methods* **2011**, 8, 221–229.
- [31] Douglas, S. M.; Dietz, H.; Liedl, T.; Högberg, B.; Graf, F.; Shih, W. M. Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature* **2009**, 459, 414–418. DOI: 10.1038/nature08016.
- [32] Douglas, S. M.; Marblestone, A. H.; Teerapittayanon, S.; Vazquez, A.; Church, G. M.; Shih, W. M. Rapid prototyping of 3D DNA-origami shapes with caDNAno. *Nucleic acids research* **2009**, 37, 5001–5006. DOI: 10.1093/nar/gkp436.
- [33] Kim, D.-N.; Kilchherr, F.; Dietz, H.; Bathe, M. Quantitative prediction of 3D solution shape and flexibility of nucleic acid nanostructures. *Nucleic acids research* **2012**, 40, 2862–2868. DOI: 10.1093/nar/gkr1173.
- [34] Bell, J. M.; Chen, M.; Baldwin, P. R.; Ludtke, S. J. High resolution single particle refinement in EMAN2.1. *Methods (San Diego, Calif.)* **2016**, 100, 25–34. DOI: 10.1016/j.ymeth.2016.02.018.
- [35] Tang, G.; Peng, L.; Baldwin, P. R.; Mann, D. S.; Jiang, W.; Rees, I.; Ludtke, S. J. EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *Journal of structural biology* **2007**, 157, 38–46. DOI: 10.1016/j.jsb.2006.05.009.
- [36] Dietz, H.; Douglas, S. M.; Shih, W. M. Folding DNA into Twisted and Curved Nanoscale Shapes. *Science (New York, N.Y.)* **2009**, 325, 725–729. DOI: 10.1126/science.1174251.
- [37] Wagenbauer, K. F.; Engelhardt, F. A. S.; Stahl, E.; Hecht, V. K.; Stömmer, P.; Seebacher, F.; Meregalli, L.; Ketterer, P.; Gerling, T.; Dietz, H. How we make DNA origami. *ChemBioChem* **2017**, 1873–1885.
- [38] Zhang, M.; Sabharwal, C. L.; Tao, W.; Tarn, T.-J.; Xi, N.; Li, G. Interactive DNA sequence and structure design for DNA nanoapplications. *IEEE transactions on nanobioscience* **2004**, 3, 286–292. DOI: 10.1109/tnb.2004.837918.
- [39] Tapio, K.; Bald, I. The potential of DNA origami to build multifunctional materials. *Multifunct. Mater.* **2020**, 3, 1–41. DOI: 10.1088/2399-7532/ab80d5.

- [40] Tian, Y.; Lhermitte, J. R.; Bai, L.; Vo, T.; Xin, H. L.; Li, H.; Li, R.; Fukuto, M.; Yager, K. G.; Kahn, J. S.; *et al.* Ordered three-dimensional nanomaterials using DNA-prescribed and valence-controlled material voxels. *Nature materials* **2020**. DOI: 10.1038/s41563-019-0550-x.
- [41] Wang, P.; Gaitanaros, S.; Lee, S.; Bathe, M.; Shih, W. M.; Ke, Y. Programming Self-Assembly of DNA Origami Honeycomb Two-Dimensional Lattices and Plasmonic Metamaterials. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138*, 7733–7740.
- [42] 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* **2015**, *347*, 1446–1452.
- [43] Wang, R.; Kuzuya, A.; Liu, W.; Seeman, N. C. Blunt-ended DNA stacking interactions in a 3-helix motif. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2010**, *46*, 4905–4907. DOI: 10.1039/c0cc01167c.
- [44] Masciotti, V.; Piantanida, L.; Naumenko, D.; Amenitsch, H.; Fanetti, M.; Valant, M.; Lei, D.; Ren, G.; Lazzarino, M. A DNA origami plasmonic sensor with environment-independent read-out. *Nano Res.* **2019**, *12*, 2900–2907. DOI: 10.1007/s12274-019-2535-0.
- [45] Yeşilyurt, A. T. M.; Huang, J.-S. Emission Manipulation by DNA Origami-Assisted Plasmonic Nanoantennas. *Adv. Optical Mater.* **2021**, *9*, 2100848. DOI: 10.1002/adom.202100848.
- [46] Wang, P.; Huh, J.-H.; Park, H.; Yang, D.; Zhang, Y.; Zhang, Y.; Lee, J.; Lee, S.; Ke, Y. DNA Origami Guided Self-Assembly of Plasmonic Polymers with Robust Long-Range Plasmonic Resonance. *Nano letters* **2020**, *20*, 8926–8932. DOI: 10.1021/acs.nanolett.0c04055.
- [47] Dass, M.; Gür, F. N.; Kořataj, K.; Urban, M. J.; Liedl, T. DNA Origami-Enabled Plasmonic Sensing. *The journal of physical chemistry. C, Nanomaterials and interfaces* **2021**, *125*, 5969–5981. DOI: 10.1021/acs.jpcc.0c11238.
- [48] Xin, L.; Zhou, C.; Duan, X.; Liu, N. A rotary plasmonic nanoclock. *Nature communications* **2019**, *10*, 5394. DOI: 10.1038/s41467-019-13444-3.
- [49] Kuzyk, A.; Jungmann, R.; Acuna, G. P.; Liu, N. DNA Origami Route for Nanophotonics. *ACS photonics* **2018**, *5*, 1151–1163. DOI: 10.1021/acsphotonics.7b01580.
- [50] Weiden, J.; Bastings, M. M. DNA origami nanostructures for controlled therapeutic drug delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2021**, *52*, 101411. DOI: 10.1016/j.cocis.2020.101411.
- [51] Keller, A.; Linko, V. Challenges and Perspectives of DNA Nanostructures in Biomedicine. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2020**, *59*, 15818–15833. DOI: 10.1002/anie.201916390.
- [52] Veneziano, R.; Moyer, T. J.; Stone, M. B.; Wamhoff, E.-C.; Read, B. J.; Mukherjee, S.; Shepherd, T. R.; Das, J.; Schief, W. R.; Irvine, D. J.; *et al.* Role of nanoscale antigen organization on B-cell activation probed using DNA origami. *Nature nanotechnology* **2020**, *15*, 716–723. DOI: 10.1038/s41565-020-0719-0.
- [53] Balakrishnan, D.; Wilkens, G. D.; Heddle, J. G. Delivering DNA origami to cells. *Nanomedicine (London, England)* **2019**, *14*, 911–925. DOI: 10.2217/nnm-2018-0440.
- [54] Chandrasekaran, A. R.; Anderson, N.; Kizer, M.; Halvorsen, K.; Wang, X. Beyond the Fold: Emerging Biological Applications of DNA Origami. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2016**, *17*, 1081–1089. DOI: 10.1002/cbic.201600038.
- [55] Kumar, V.; Palazzolo, S.; Bayda, S.; Corona, G.; Toffoli, G.; Rizzolio, F. DNA Nanotechnology for Cancer Therapy. *Theranostics* **2016**, *6*, 710–725. DOI: 10.7150/thno.14203.
- [56] Baig, M. S.; Babar, U.; Arshad, U.; Ullah, M. A. DNA Origami and Bionanotechnology: An Efficacious Tool for Modern Therapeutics and Drug Delivery. *International Journal of Development Research* **2018**, *8*, 24660–24669.

- [57] Zhang, Q.; Jiang, Q.; Li, N.; Dai, L.; Liu, Q.; Song, L.; Wang, J.; Li, Y.; Tian, J.; Ding, B.; *et al.* DNA origami as an in vivo drug delivery vehicle for cancer therapy. *ACS nano* **2014**, *8*, 6633–6643. DOI: 10.1021/nn502058j.
- [58] Engelen, W.; Sigl, C.; Kadletz, K.; Willner, E. M.; Dietz, H. Antigen-Triggered Logic-Gating of DNA Nanodevices. *Journal of the American Chemical Society* **2021**, *143*, 21630–21636. DOI: 10.1021/jacs.1c09967.
- [59] Schreiber, R.; Do, J.; Roller, E.-M.; Zhang, T.; Schüller, V. J.; Nickels, P. C.; Feldmann, J.; Liedl, T. Hierarchical assembly of metal nanoparticles, quantum dots and organic dyes using DNA origami scaffolds. *Nature nanotechnology* **2014**, *9*, 74–78.
- [60] Thacker, V. V.; Herrmann, L. O.; Sigle, D. O.; Zhang, T.; Liedl, T.; Baumberg, J. J.; Keyser, U. F. DNA origami based assembly of gold nanoparticle dimers for surface-enhanced Raman scattering. *Nature communications* **2014**, *5*.
- [61] Scalise, G. Milestones in Microelectronics. *Japan Spotlight* **2008**, 25–27.
- [62] IEEE Electron Devices Society. International Roadmap for Devices and Systems (IRDS). <https://irds.ieee.org/> (accessed September 15, 2022).
- [63] Chopra, J. Analysis of Lithography Based Approaches in Development of Semiconductors. *IJCSIT* **2014**, *6*, 61–72. DOI: 10.5121/ijcsit.2014.6604.
- [64] Landis, S. *Technologies de base en lithographie*; Hermes science publications: Paris, Lavoisier, 2010.
- [65] Bakshi, V., Ed. *EUV lithography*, Second ed.; SPIE Press: Bellingham, Wash., 2018.
- [66] Lee, B.; Hong, J.; Amos, N.; Dumer, I.; Litvinov, D.; Khizroev, S. Sub-10-nm-resolution electron-beam lithography toward very-high-density multilevel 3D nano-magnetic information devices. *J Nanopart Res* **2013**, *15*. DOI: 10.1007/s11051-013-1665-7.
- [67] Chou, S. Y.; Krauss, P. R.; Renstrom, P. J. Imprint of sub-25 nm vias and trenches in polymers. *Appl. Phys. Lett.* **1995**, *67*, 3114–3116. DOI: 10.1063/1.114851.
- [68] Jacquier, E.; Jouneau, P.-H.; Falconet, D.; Mariolle, D.; Thévenon, E.; Si Larbi, G.; Tiron, R.; Parcy, F.; Elchinger, P.-H.; Dumas, R. Self-Assembly of a Ginkgo Oligomerization Domain Creates a Sub-10-nm Honeycomb Architecture on Carbon and Silicon Surfaces with Customizable Pores: Implications for Nanoelectronics, Biosensing, and Biocatalysis. *ACS Appl. Nano Mater.* **2021**, *4*, 9518–9526. DOI: 10.1021/acsnm.1c01944.
- [69] Marmiesse, M. Lithographie par auto-assemblage d'origami d'ADN. Nano Electronique et Nano Technologies, Université Grenoble Alpes, Grenoble, 2021.
- [70] Thomas, G.; Diagne, C. T.; Baillin, X.; Chevolleau, T.; Charvolin, T.; Tiron, R. DNA Origami for Silicon Patterning. *ACS applied materials & interfaces* **2020**, *12*, 36799–36809. DOI: 10.1021/acsnm.1c01211.
- [71] Surwade, S. P.; Zhao, S.; Liu, H. Molecular lithography through DNA-mediated etching and masking of SiO<sub>2</sub>. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 11868–11871. DOI: 10.1021/ja2038886.
- [72] Diagne, C. T.; Brun, C.; Gasparutto, D.; Baillin, X.; Tiron, R. DNA Origami Mask for Sub-Ten-Nanometer Lithography. *ACS nano* **2016**, *10*, 6458–6463. DOI: 10.1021/acsnano.6b00413.
- [73] Jiao, D.; King, C.; Grossfield, A.; Darden, T. A.; Ren, P. Simulation of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> solvation using polarizable atomic multipole potential. *The journal of physical chemistry. B* **2006**, *110*, 18553–18559. DOI: 10.1021/jp062230r.
- [74] Chatterjee, A.; Dixit, M. K.; Tembe, B. L. Solvation structures and dynamics of the magnesium chloride (Mg(2+)-Cl(-)) ion pair in water-ethanol mixtures. *The journal of physical chemistry. A* **2013**, *117*, 8703–8709. DOI: 10.1021/jp4031706.
- [75] Piskunen, P.; Shen, B.; Keller, A.; Toppari, J. J.; Kostianen, M. A.; Linko, V. Biotemplated Lithography of Inorganic Nanostructures (BLIN) for Versatile Patterning of Functional Materials. *ACS Appl. Nano Mater.* **2021**, *4*, 529–538. DOI: 10.1021/acsnm.0c02849.

- [76] Shen, B.; Linko, V.; Tapio, K.; Pikker, S.; Lemma, T.; Gopinath, A.; Gothelf, K. V.; Kostianen, M. A.; Toppari, J. J. Plasmonic nanostructures through DNA-assisted lithography. *Science advances* **2018**, *4*, eaap8978. DOI: 10.1126/sciadv.aap8978.
- [77] Kreysa, G.; Ota, K.; Savinell, R. F. *Encyclopedia of Applied Electrochemistry*; Springer New York: New York, NY, 2014.
- [78] Trefalt, G.; Borkovec, M. Overview of DLVO Theory. [www.colloid.ch/dlvo](http://www.colloid.ch/dlvo) (accessed November 25, 2021).
- [79] Hamada, S.; Murata, S. Theoretical model of substrate-assisted self-assembly of DNA nanostructures. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 7406–7412. DOI: 10.1039/c2ra20764h.
- [80] Sushko, M. L.; Shluger, A. L.; Rivetti, C. Simple model for DNA adsorption onto a mica surface in 1:1 and 2:1 electrolyte solutions. *Langmuir* **2006**, *22*, 7678–7688. DOI: 10.1021/la060356.
- [81] Sushko, M. L.; Shluger, A. L. DLVO theory for like-charged polyelectrolyte and surface interactions. *Materials Science and Engineering* **2007**, *27*, 1090–1095. DOI: 10.1016/j.msec.2006.09.017.
- [82] Richemond, P. Non-retarded van der Waals Energies between a Finite Rod and a Planar Substrate. *Journal of the Chemical Society* **1974**, *2*, 229–239. DOI: 10.1039/F29747000229.
- [83] Guérin, L. Évolution des propriétés morphologiques de floccs de latex en réacteur de Taylor-Couette. Génie des Procédés et de l'Environnement, Université de Toulouse, Toulouse, 2017.
- [84] Tripathy, T.; De, B. R. Flocculation : A New Way to Treat the Waste Water. *Journal of Physical Sciences* **2006**, *10*, 93–127.
- [85] Marmiesse, M.; Tiron, R.; Thomas, G.; Levi, S.; Baillin, X. Nanoengineering DNA origami for lithography. In *Novel Patterning Technologies for Semiconductors, MEMS/NEMS and MOEMS 2020*; Panning, E. M., Sanchez, M. I., Eds.; SPIE, 2020 - 2020; p 35.
- [86] Kershner, R. J.; Bozano, L. D.; Micheel, C. M.; Hung, A. M.; Fornof, A. R.; Cha, J. N.; Rettner, C. T.; Bersani, M.; Frommer, J.; Rothmund, P. W. K.; *et al.* Placement and orientation of individual DNA shapes on lithographically patterned surfaces. *Nature nanotechnology* **2009**, *4*, 557–561. DOI: 10.1038/nnano.2009.220.
- [87] Zhang, G.; Surwade, S. P.; Zhou, F.; Liu, H. DNA nanostructure meets nanofabrication. *Chemical Society reviews* **2013**, *42*, 2488–2496. DOI: 10.1039/c2cs35302d.
- [88] Albrechts, B.; Hautzinger, D. S.; Krüger, M.; Elwenspoek, M. C.; Müller, K. M.; Korvink, J. G. Adsorption studies of DNA origami on silicon dioxide. In *21st Micromechanics and Micro Systems Europe workshop (MME 2010)*; University of Twente: Netherlands, 2010; pp 1–4.
- [89] Liu, B.; Salgado, S.; Maheshwari, V.; Liu, J. DNA adsorbed on graphene and graphene oxide: Fundamental interactions, desorption and applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2016**, *26*, 41–49. DOI: 10.1016/j.cocis.2016.09.001.
- [90] Hung, A. M.; Micheel, C. M.; Bozano, L. D.; Osterbur, L. W.; Wallraff, G. M.; Cha, J. N. Large-area spatially ordered arrays of gold nanoparticles directed by lithographically confined DNA origami. *Nature nanotechnology* **2010**, *5*, 121–126. DOI: 10.1038/nnano.2009.450.
- [91] Brassat, K.; Ramakrishnan, S.; Bürger, J.; Hanke, M.; Doostdar, M.; Lindner, J. K. N.; Grundmeier, G.; Keller, A. On the Adsorption of DNA Origami Nanostructures in Nanohole Arrays. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2018**, *34*, 14757–14765. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b00793.
- [92] Tanaka, S.; Taniguchi, M.; Kawai, T. Selective Adsorption of DNA onto SiO<sub>2</sub> Surface in SiO<sub>2</sub>/SiH Pattern. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2004**, *43*, 7346–7349. DOI: 10.1143/JJAP.43.7346.
- [93] Ding, B.; Wu, H.; Xu, W.; Zhao, Z.; Liu, Y.; Yu, H.; Yan, H. Interconnecting Gold Islands with DNA Origami Nanotubes. *Nano letters* **2010**, *10*, 5065–5069. DOI: 10.1021/nl1033073.
- [94] Pearson, A. C.; Pound, E.; Woolley, A. T.; Linford, M. R.; Harb, J. N.; Davis, R. C. Chemical alignment of DNA origami to block copolymer patterned arrays of 5 nm gold nanoparticles. *Nano letters* **2011**, *11*, 1981–1987. DOI: 10.1021/nl200306w.

- [95] Penzo, E.; Wang, R.; Palma, M.; Wind, S. J. Selective placement of DNA origami on substrates patterned by nanoimprint lithography. *Journal of Vacuum Science & Technology B, Nanotechnology and Microelectronics: Materials, Processing, Measurement, and Phenomena* **2011**, *29*, 1-5. DOI: 10.1116/1.3646900.
- [96] Scheible, M. B.; Pardatscher, G.; Kuzyk, A.; Simmel, F. C. Single molecule characterization of DNA binding and strand displacement reactions on lithographic DNA origami microarrays. *Nano letters* **2014**, *14*, 1627–1633. DOI: 10.1021/nl500092j.
- [97] Hansma, H. G.; Laney, D. E. DNA binding to mica correlates with cationic radius: assay by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* **1996**, *70*, 1933–1939. DOI: 10.1016/S0006-3495(96)79757-6.
- [98] Pastré, D.; Piétrement, O.; Fusil, S.; Landousy, F.; Jeusset, J.; David, M.-O.; Hamon, L.; Le Cam, E.; Zozime, A. Adsorption of DNA to Mica Mediated by Divalent Counterions: A Theoretical and Experimental Study. *Biophysical Journal* **2003**, *85*, 2507–2518. DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74673-6.
- [99] Woo, S.; Rothmund, P. W. K. Self-assembly of two-dimensional DNA origami lattices using cation-controlled surface diffusion. *Nature communications* **2014**, *5*, 1–11. DOI: 10.1038/ncomms5889.
- [100] Hamada, S.; Murata, S. Substrate-assisted assembly of interconnected single-duplex DNA nanostructures. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2009**, *48*, 6820–6823. DOI: 10.1002/anie.200902662.
- [101] Aghebat Rafat, A.; Pirzer, T.; Scheible, M. B.; Kostina, A.; Simmel, F. C. Surface-assisted large-scale ordering of DNA origami tiles. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2014**, *53*, 7665–7668. DOI: 10.1002/anie.201403965.
- [102] Liu, W.-J.; Zhang, P.; Sun, T.; Li, L.; Wei, Y.-H.; Wang, K.-Z.; Liu, L.; Li, B. Effect of concentration and adsorption time on the formation of a large-scale origami pattern. *NUCL SCI TECH* **2019**, *30*. DOI: 10.1007/s41365-019-0639-6.
- [103] Xin, Y.; Martinez Rivadeneira, S.; Grundmeier, G.; Castro, M.; Keller, A. Self-assembly of highly ordered DNA origami lattices at solid-liquid interfaces by controlling cation binding and exchange. *Nano Res.* **2020**, *13*, 3142–3150. DOI: 10.1007/s12274-020-2985-4.
- [104] Longfei Liu, Y. L.; Yulin Li; Yong Wang; Jianwei Zheng; Liu, L.; Li, Y.; Wang, Y.; Zheng, J.; Mao, C. Regulating DNA self-assembly by DNA–surface interactions. *ChemBioChem* **2017**, *18*, 2404–2407. DOI: 10.1002/cbic.201700545.
- [105] Kielar, C.; Ramakrishnan, S.; Fricke, S.; Grundmeier, G.; Keller, A. Dynamics of DNA Origami Lattice Formation at Solid-Liquid Interfaces. *ACS applied materials & interfaces* **2018**, *10*, 44844–44853. DOI: 10.1021/acsami.8b16047.
- [106] Shen, X.; Gu, B.; Che, S. A.; Zhang, F. S. Solvent effects on the conformation of DNA dodecamer segment: a simulation study. *The Journal of chemical physics* **2011**, *135*, 34509. DOI: 10.1063/1.3610549.
- [107] Mähler, J.; Persson, I. A study of the hydration of the alkali metal ions in aqueous solution. *Inorganic chemistry* **2012**, *51*, 425–438. DOI: 10.1021/ic2018693.
- [108] Cheng, Y.; Korolev, N.; Nordenskiöld, L. Similarities and differences in interaction of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> with condensed ordered DNA. A molecular dynamics computer simulation study. *Nucleic acids research* **2006**, *34*, 686–696. DOI: 10.1093/nar/gkj434.
- [109] Pasi, M.; Maddocks, J. H.; Lavery, R. Analyzing ion distributions around DNA: sequence-dependence of potassium ion distributions from microsecond molecular dynamics. *Nucleic acids research* **2015**, *43*, 2412–2423. DOI: 10.1093/nar/gkv080.
- [110] Kolev, S. K.; Petkov, P. S.; Rangelov, M. A.; Trifonov, D. V.; Milenov, T. I.; Vayssilov, G. N. Interaction of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> counter cations with RNA. *Metallomics : integrated biometal science* **2018**, *10*, 659–678. DOI: 10.1039/c8mt00043c.

- [111] Suzuki, Y.; Endo, M.; Yang, Y.; Sugiyama, H. Dynamic assembly/disassembly processes of photoresponsive DNA origami nanostructures directly visualized on a lipid membrane surface. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 1714–1717. DOI: 10.1021/ja4109819.
- [112] Kocabey, S.; Kempter, S.; List, J.; Xing, Y.; Bae, W.; Schiffels, D.; Shih, W. M.; Simmel, F. C.; Liedl, T. Membrane-assisted growth of DNA origami nanostructure arrays. *ACS nano* **2015**, *9*, 3530–3539. DOI: 10.1021/acsnano.5b00161.
- [113] Suzuki, Y.; Endo, M.; Sugiyama, H. Lipid-bilayer-assisted two-dimensional self-assembly of DNA origami nanostructures. *Nature communications* **2015**, *6*. DOI: 10.1038/ncomms9052.
- [114] Sato, Y.; Endo, M.; Morita, M.; Takinoue, M.; Sugiyama, H.; Murata, S.; Nomura, S. M.; Suzuki, Y. Environment-Dependent Self-Assembly of DNA Origami Lattices on Phase-Separated Lipid Membranes. *Adv. Mater. Interfaces* **2018**, *5*, 1800437. DOI: 10.1002/admi.201800437.
- [115] Khmelinskaia, A.; Franquelim, H. G.; Yaadav, R.; Petrov, E. P.; Schwille, P. Membrane-Mediated Self-Organization of Rod-Like DNA Origami on Supported Lipid Bilayers. *Adv. Mater. Interfaces* **2021**, 2101094.
- [116] Suzuki, Y.; Kawamata, I.; Watanabe, K.; Mano, E. Lipid bilayer-assisted dynamic self-assembly of hexagonal DNA origami blocks into monolayer crystalline structures with designed geometries. *iScience* **2022**, *25*, 104292. DOI: 10.1016/j.isci.2022.104292.
- [117] Sun, X.; Ko, S. H.; Zhang, C.; E. Ribbe, A.; Chengde, M. Surface-mediated DNA self-assembly. *JACS Communications* **2009**, *131*, 13248–13249. DOI: 10.1021/ja906475w.
- [118] Xin, Y.; Shen, B.; Kostianinen, M. A.; Grundmeier, G.; Castro, M.; Linko, V.; Keller, A. Scaling Up DNA Origami Lattice Assembly. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2021**, *27*, 8564–8571. DOI: 10.1002/chem.202100784.
- [119] Skiniotis, G.; Southworth, D. R. Single-particle cryo-electron microscopy of macromolecular complexes. *Microscopy (Oxford, England)* **2016**, *65*, 9–22. DOI: 10.1093/jmicro/dfv366.
- [120] Drulyte, I.; Johnson, R. M.; Hesketh, E. L.; Hurdiss, D. L.; Scarff, C. A.; Porav, S. A.; Ranson, N. A.; Muench, S. P.; Thompson, R. F. Approaches to altering particle distributions in cryo-electron microscopy sample preparation. *Acta crystallographica* **2018**, *74*, 560–571. DOI: 10.1107/S2059798318006496.
- [121] Maslov, D.; Nam, Y.; Kim, J. An Outlook for Quantum Computing. *PROCEEDINGS OF THE IEEE* **2019**, *107*, 5–10.
- [122] Debnath, S.; Linke, N. M.; Figgatt, C.; Landsman, K. A.; Wright, K.; Monroe, C. Demonstration of a small programmable quantum computer with atomic qubits **2016**, 63–66.
- [123] Griffiths, D. J.; Schroeter, D. F. *Introduction to Quantum Mechanics*, 3rd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, 2018.
- [124] Jarryd J. Pla; Kuan Y. Tan; Juan P. Dehollain; Wee H. Lim; John J. L. Morton; David N. Jamieson; Andrew S. Dzurak; Andrea Morello. A single-atom electron spin qubit in silicon. *Nature* **2012**, *489*, 541–545.
- [125] Maurand, R.; Jehl, X.; Kotekar-Patil, D.; Corna, A.; Bohuslavskyi, H.; Laviéville, R.; Hutin, L.; Barraud, S.; Vinet, M.; Sanquer, M.; *et al.* A CMOS silicon spin qubit. *Nature communications* **2016**, *7*. DOI: 10.1038/ncomms13575.
- [126] Hutin, L.; Fransceschi, S. de; Meunier, T.; Vinet, M. Dispositif quantique à qubits de spin, May 11, 2017.
- [127] Vinet, M.; Hutin, L.; Bertrand, B.; Barraud, S.; Hartmann, J.-M.; Kim, Y.-J.; Mazzocchi, V.; Amisse, A.; Bohuslavskyi, H.; Bourdet, L., Eds. *Towards scalable silicon quantum computing*, IEEE; IEEE, 2018.
- [128] Kim, Y.; Bertrand, B.; Hutin, L.; De Franceschi, S.; Meunier, T.; Vinet, M. Design and development of 3D arrays of coupled Quantum Dots in SOI CMOS technology **2018**, 1.
- [129] Majikes, J. M.; Liddle, J. A. DNA Origami Design: A How-To Tutorial. *J. RES. NATL. INST. STAN.* **2021**, 126. DOI: 10.6028/jres.126.001.

- [130] Stahl, E.; Martin, T. G.; Praetorius, F.; Dietz, H. Facile and scalable preparation of pure and dense DNA origami solutions. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2014**, *53*, 12735–12740. DOI: 10.1002/anie.201405991.
- [131] Liedl, T.; Högberg, B.; Tytell, J.; Ingber, D. E.; Shih, W. M. Self-assembly of three-dimensional prestressed tensegrity structures from DNA. *Nature nanotechnology* **2010**, *5*, 520–524.
- [132] Shuying Yang; Lingxiang Jiang. Biomimetic self-assembly of subcellular structures. *The Royal Society of Chemistry* **2020**.
- [133] Muñoz-Juan, A.; Carreño, A.; Mendoza, R.; Corchero, J. L. Latest Advances in the Development of Eukaryotic Vaults as Targeted Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics* **2019**, *11*. DOI: 10.3390/pharmaceutics11070300.
- [134] Kong, L. B.; Siva, A. C.; Rome, L. H.; Stewart, P. L. Structure of the vault, a ubiquitous cellular component. *Structure* **1999**, *7*, 371–379. DOI: 10.1016/S0969-2126(99)80050-1.
- [135] Ding, K.; Zhang, X.; Mrazek, J.; Kickhoefer, V. A.; Lai, M.; Ng, H. L.; Yang, O. O.; Rome, L. H.; Zhou, Z. H. Solution Structures of Engineered Vault Particles. *Structure (London, England : 1993)* **2018**, *26*, 619-626.e3. DOI: 10.1016/j.str.2018.02.014.
- [136] Brunero Cappella. *Mechanical properties of polymers*; Springer, 2016.
- [137] Corporation, B. Introduction to Bruker's ScanAsyst and PeakForce Tapping Atomic Force Microscopy Technology. [https://blog.brukerafmprobes.com/wp-content/uploads/2015/08/AN133-Introduction\\_to\\_Brukers\\_ScanAsyst\\_and\\_PeakForce\\_Tapping\\_Atomic\\_Force\\_Microscopy\\_Technology\\_AFM\\_AN133.pdf](https://blog.brukerafmprobes.com/wp-content/uploads/2015/08/AN133-Introduction_to_Brukers_ScanAsyst_and_PeakForce_Tapping_Atomic_Force_Microscopy_Technology_AFM_AN133.pdf) (accessed October 17, 2022).
- [138] Walczyk, W.; Schön, P. M.; Schönherr, H. The effect of PeakForce tapping mode AFM imaging on the apparent shape of surface nanobubbles. *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal* **2013**, *25*, 184005. DOI: 10.1088/0953-8984/25/18/184005.
- [139] Haynes, P. J.; Main, K. H.; Pyne, A. L. Atomic Force Microscopy of DNA and DNA-Protein Interactions. In *Chromosome Architecture: Methods and Protocols*; Leake, M. C., Ed.; Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, 2011.
- [140] Hbner, U.; Morgenroth, W.; Meyer, H. G.; Sulzbach, T.; Brendel, B.; Mirand, W. Downwards to metrology in nanoscale: determination of the AFM tip shape with well-known sharp-edged calibration structures. *Applied Physics A: Materials Science & Processing* **2003**, *76*, 913–917. DOI: 10.1007/s00339-002-1975-6.
- [141] Wikimedia Commons. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:EVT%2B.svg> (accessed November 6, 2022).
- [142] Experimental Methods in the Physical Sciences. *Radiometric Temperature Measurements: I. Fundamentals*; Elsevier, 2009; p ii.
- [143] Virtanen, P.; Gommers, R.; Oliphant, T. E.; Haberland, M.; Reddy, T.; Cournapeau, D.; Burovski, E.; Peterson, P.; Weckesser, W.; Bright, J.; *et al.* SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nature methods* **2020**, *17*, 261–272. DOI: 10.1038/s41592-019-0686-2.
- [144] van der Walt, S.; Schönberger, J. L.; Nunez-Iglesias, J.; Boulogne, F.; Warner, J. D.; Yager, N.; Gouillart, E.; Yu, T. scikit-image: image processing in Python. *PeerJ* **2014**, *2*, e453. DOI: 10.7717/peerj.453.
- [145] Cormen, T. H.; Leiserson, C. E.; Rivest, R. L.; Stein, C. *Introduction to algorithms*, Fourth edition; The MIT Press: Cambridge, Massachusetts, 2022.
- [146] Møller Sønderskov, S.; Hyltdgaard Klausen, L.; Amland Skaanvik, S.; Han, X.; Dong, M. In situ Surface Charge Density Visualization of Self-assembled DNA Nanostructures after Ion Exchange. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* **2020**, *21*, 1474–1482. DOI: 10.1002/cphc.201901168.
- [147] Mao, Y.; Daniel, L. N.; Whittaker, N.; Saffiotti, U. DNA Binding to Crystalline Silica Characterized by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Environmental Health Perspectives* **1994**, *102*, 165. DOI: 10.2307/3432234.

## Bibliographie

- [148] Zhai, H.; Wang, L.; Putnis, C. V. Molecular-Scale Investigations Reveal Noncovalent Bonding Underlying the Adsorption of Environmental DNA on Mica. *Environmental science & technology* **2019**, *53*, 11251–11259. DOI: 10.1021/acs.est.9b04064.
- [149] Zhang, T.; Nong, J.; Alzahrani, N.; Wang, Z.; Oh, S. W.; Meier, T.; Yang, D. G.; Ke, Y.; Zhong, Y.; Fu, J. Self-Assembly of DNA-Minocycline Complexes by Metal Ions with Controlled Drug Release. *ACS applied materials & interfaces* **2019**, *11*, 29512–29521. DOI: 10.1021/acsami.9b08126.
- [150] Yang, S.; Liu, W.; Zhang, Y.; Wang, R. Bottom-Up Fabrication of Large-Scale Gold Nanorod Arrays by Surface Diffusion-Mediated DNA Origami Assembly. *ACS applied materials & interfaces* **2021**, *13*, 50516–50523. DOI: 10.1021/acsami.1c13173.
- [151] Martin, T. G.; Bharat, T. A. M.; Joerger, A. C.; Bai, X.-C.; Praetorius, F.; Fersht, A. R.; Dietz, H.; Scheres, S. H. W. Design of a molecular support for cryo-EM structure determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2016**, *113*, E7456-E7463. DOI: 10.1073/pnas.1612720113.

## Résumé de la thèse

La méthode des origamis d'ADN, permettant la création de motifs complexes en 2D et en 3D avec une précision nanométrique, est un outil de choix pour des applications biologiques et dans l'industrie de la micro/nanoélectronique. L'objectif de la thèse est de démontrer la possibilité d'utiliser les origamis d'ADN afin de créer des structures hiérarchiques pour répondre à des problématiques technologiques. La première partie de ce travail s'est focalisée sur la réalisation des designs, la synthèse et la purification des origamis d'ADN ainsi que leur assemblage hiérarchique en solution. Nous avons créé un origami formant des microfilaments par appariement de bases. Ils ont ensuite été utilisés pour le développement d'un procédé de préparation d'échantillons de cryo-TEM. Ensuite, nous avons mis au point un système d'origamis d'ADN s'auto-assemblant en réseaux carrés par complémentarité de forme en solution en présence de  $\text{MgCl}_2$  pour la création de réseaux de qubits sur silicium pour le calcul quantique. La seconde partie de la thèse s'est intéressée au contrôle des interactions ADN-surface, via la variation des concentrations de  $\text{Mg}^{2+}$  et des ratios  $\text{Mg}^{2+}/\text{Na}^+$ , afin de médier directement l'assemblage des réseaux 2D sur les substrats de  $\text{SiO}_2$  thermique. Par l'utilisation de différentes méthodes de traitement d'images, telles que la décomposition des fonctions de densité spectrale de puissance radiale et la détection des centres des origamis, nous avons pu montrer qu'en présence de 74 mM de  $\text{MgCl}_2$ , l'augmentation de la concentration en NaCl entre 0 mM et 60 mM a permis d'éviter la formation de multicouches et l'élévation de l'ordre présent sur la surface. Nous avons aussi observé qu'à partir de 50 mM en NaCl, une très forte désorption des origamis de la surface était présente lors du rinçage provoquant la diminution de l'ordre.

## Abstract

The DNA origami method allows the creation of complex 2D and 3D patterns with nanometric precision, and as such is great tool for biological and microelectronic applications. The objective of this thesis is to show the feasibility of using DNA origamis to create hierarchical structures, in order to address problems in both domains. The first part of this work focused on the design, synthesis and purification of DNA origamis and their hierarchical assembly in solution. Firstly, we created an origami which forms microfilaments by base pairing for the preparation of biological cryo-TEM samples. Secondly, we developed a system of DNA origamis which can self-assembled into square 2D arrays by shape complementarity to realize qubit 2D arrays on silicon for quantum computing. The second part of this thesis focused on the control of DNA-surface interactions, by varying  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations and  $\text{Mg}^{2+}/\text{Na}^+$  ratios, to directly mediate the assembly of 2D arrays on thermal  $\text{SiO}_2$  substrates. The quality of the assembly was evaluated using two different image treatment methods, namely radial power spectral density function decomposition and origami center detection. We showed that in the presence of 74 mM  $\text{MgCl}_2$ , the increase of the NaCl concentration between 0 mM and 60 mM induced the formation of multilayers and an increased the order of assembly on the surface. We also observed that NaCl concentrations higher than 50 mM result in very strong desorption of origamis from the surface during the rinsing step and led to the decrease of the order.