



**HAL**  
open science

# Nanostructures hybrides plasmoniques assemblées sur des origamis d'ADN stimulables

Elise Gayet

► **To cite this version:**

Elise Gayet. Nanostructures hybrides plasmoniques assemblées sur des origamis d'ADN stimulables. Physique [physics]. Université Paris sciences et lettres, 2021. Français. NNT : 2021UPSLS054 . tel-03361374

**HAL Id: tel-03361374**

**<https://pastel.hal.science/tel-03361374>**

Submitted on 1 Oct 2021

**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 DE DOCTORAT**

**DE L'UNIVERSITÉ PSL**

Préparée à l'**ESPCI Paris**  
Institut Langevin

**Nanostructures hybrides plasmoniques assemblées sur  
des origamis d'ADN stimulables**

Soutenue par

**Elise Y. GAYET**

Le 30 mars 2021

École doctorale n°564

**Ecole Doctorale Physique  
en Ile-de-France (EDPIF)**

Spécialité

**Physique**

Composition du jury :

**Juan ELEZGARAY**

Directeur de recherche CNRS,  
Chimie & Biologie des Membranes et  
Nano-objets - CBMN, UMR 5248,  
Université de Bordeaux

*Rapporteur*

**Virginie PONSINET**

Directrice de recherche CNRS,  
Centre de Recherche Paul Pascal -  
CRPP, UMR 5031,  
Université de Bordeaux

*Rapporteuse*

**Claude NOGUES**

Chargée de Recherche CNRS,  
Laboratoire de Biologie et Pharmacolo-  
gie Appliquée - LBPA, UMR 8113,  
ENS Paris-Saclay

*Examinatrice*

**Yannick RONDELEZ**

Directeur de Recherche CNRS,  
GULLIVER, UMR 7083,  
ESPCI Paris

*Examineur*

**Sébastien BIDAULT**

Chargé de Recherche CNRS,  
Institut Langevin - UMR 7587,  
ESPCI Paris

*Directeur de thèse*



# Remerciements

Comme de tradition cette thèse commence par les remerciements aux personnes m'ayant accompagnées au cours de ces quatre années passées à l'Institut Langevin. J'espère que dans l'hypothèse où le lecteur y chercherait son nom et ne l'y trouvant pas il m'en excusera, cet oubli étant sans nul doute involontaire.

Tout d'abord je voudrais te remercier, Sébastien car sans toi cette thèse n'existerait tout simplement pas. Merci de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet. Merci d'avoir été là dans les bons et les moins bons moments. Je te l'ai déjà dit mais je n'aurais pu rêver meilleur directeur de thèse. Ce fut un réel plaisir de travailler et de partager ces quatre années avec toi.

Je souhaiterais remercier les membres de mon jury : Juan Elezgaray, Claude Nogues, Virginie Ponsinet, Yannick Rondelez, pour la lecture ainsi que la participation à la soutenance, qui fut un moment scientifiquement intéressant et agréable malgré les conditions particulières dans lesquelles cela s'est déroulée. J'aurais en effet apprécié pouvoir plus amplement échanger avec vous à la suite des délibérations. Je remercie en particulier Claude avec qui je travaille maintenant de m'avoir fait intégrer son équipe et participer à la construction de ce beau projet au sein de Kimialys.

J'aimerais également remercier tous les collaborateurs m'ayant accompagné au cours de ma thèse et sans qui elle n'aurait pu exister. Merci à toi Sylvie pour ces magnifiques particules d'or ! Je n'aurai pu avoir d'aussi belles distributions sans d'aussi belles synthèses. Je te remercie également d'avoir toujours été disponible pour des échanges scientifiques. Je remercie également toute l'équipe de Gaëtan au CBS de Montpellier : Nesrine, Allan et bien sûr Gaëtan, pour m'avoir fourni ces jolis origamis d'ADN et m'avoir accueilli pendant 3 mois. J'ai beaucoup appris sur l'ADN grâce à vous pendant ces quatre ans et en particulier au cours de ces 3 mois. Je remercie également les post-doctorants, doctorants et stagiaires : Nemanja, Francesca, Claudia, Gauthier et finalement Jeanne avec qui j'ai apprécié travailler. Je remercie également tous les membres de l'administration : Marjolaine, Christelle, Nathalie, Anne-sophie, Emmanuel et Catherine, ainsi qu'Arnaud et Yannick qui participent grandement à la bonne ambiance de l'Institut.

Mais la thèse c'est également l'occasion de rencontrer de nombreuses personnes, ainsi je remercie aussi tous les thésards, post-doctorants et stagiaires avec qui nous avons passé de joyeux moments et en particulier le bureau R33 : François, Chloé, Gauthier, William, Benjamin, Noet, Arthur et bien sûr Jeanne, encore toi. Merci également aux autres qui n'ont pas eu la chance d'être en R33 : Sam, Léo, Bart, Loubnan, Max, Chloë, Romain, Paul, Anwesh, Yamil, Camilo, Louis, Jules, Maximes et Mathieu. Merci à toi aussi Yannick pour nos discussions du soir et du week-end et de m'avoir servi de garde du corps le soir lorsque l'on rentrait ensemble en ces difficiles périodes de couvre-feu. Merci également à Ignacio pour nos discussions amicales et scientifiques. Nous avons également passé d'agréables moments scientifiques en compagnie de Gilles au cours de mes comités de suivi de thèse. Vous avez su, tous les deux, me soutenir et me remonter le moral même lorsque

j'avais l'impression que rien ne fonctionnait.

Je voudrais aussi remercier mes amis en dehors de Langevin. D'abord ceux de l'EPF : Flo, Julien et Claire ; de Jussieu : Ali, Basile, Violette, Léon et Mathis.

Un grand merci également à ma famille qui me supporte et me soutient depuis tant d'années.

Finalement merci à toi, Kévin ! Ca fait maintenant 2 ans et demi que tu partages ma vie (à distance) et que tu la rends meilleure.

# Préface

Les nanoparticules d'or sont de plus en plus exploitées dans des applications biomédicales : comme agents de contraste [1], comme sources photothermiques pour l'imagerie [2, 3, 4] et le traitement de cancer [5, 1], ou encore comme biocapteurs [6, 7]. En effet, elles présentent le double avantage de fournir une forte interaction lumière-matière grâce au phénomène de résonance plasmon, et d'avoir une excellente bio-compatibilité. De plus, lorsque deux particules se rapprochent, leurs résonances se couplent, entraînant une augmentation de la section efficace de diffusion et un changement de couleur visible sur un simple caméra couleur en microscopie de champ sombre [8]. Il est alors possible de détecter un changement de la distance interparticule à l'échelle nanométrique [9, 10, 11, 8, 12]. Si ce changement de distance peut être corrélé avec une information biochimique d'intérêt, il est alors possible de détecter cette dernière avec une grande facilité expérimentale à l'échelle de la molécule individuelle.

Cette idée a été exploitée depuis une quinzaine d'années pour concevoir des dimères de particules d'or (d'un diamètre typique de 30 nm à 50 nm) reliées par de courts brins d'ADN : il est alors possible de corrélérer le couplage plasmon mesuré avec la longueur de ce brin d'ADN [9, 10, 11, 8, 12]. Cette approche a ainsi permis de détecter optiquement l'hybridation d'un brin d'ADN [9] ou d'observer l'interaction entre une protéine unique et un dimère de particules reliées par une séquence aptamère d'ADN [13]. Toutefois, cette approche est limitée par plusieurs complexités expérimentales liées, en particulier, à la stabilisation des particules d'or par des ligands de surface qui introduisent un fort encombrement stérique entre les particules d'or [8] : il serait très intéressant d'arriver à délocaliser le processus de reconnaissance biochimique de cet interstice nanométrique. De plus, il apparaît essentiel de rendre ce mécanisme de modulation de la distance interparticule le plus versatile possible, afin de rendre les propriétés optiques de ces nanostructures hybrides sensibles à différents stimuli physicochimiques.

Au cours de ma thèse, je vais assembler de tels dimères de particules d'or autour de nanostructures complexes en ADN, nommées origamis d'ADN, et dont la morphologie peut être programmée pour répondre à différents stimuli externes. Au cours des 15 dernières, de nombreuses équipes ont développé de telles structures synthétiques en ADN dont la taille peut atteindre une centaine de nanomètres [14, 15, 16, 17, 18, 19]. De plus, la compréhension de plus en plus poussée des mécanismes d'interaction entre des brins d'ADN et d'autres (bio)molécules ou cations a permis de programmer des mécanismes de reconnaissance spécifique directement dans des séquences de nucléotides. Cette programmation va d'interactions entre brins d'ADN spécifiques comme l'ouverture de structures secondaires (i.e. *hairpins* [20]) ou des réactions de *strand displacement* [21]) ; à des mécanismes de repliement de brins d'ADN autour d'autres espèces chimiques : de la formation de quadruplex autour de cations [22] à des mécanismes sélectionnés par évolution dirigée pour les aptamères [23]. Les nanotechnologies ADN fournissent alors une boîte à outil particulièrement riche pour créer des nanostructures, avec un contrôle morphologique à l'échelle du nanomètre, qui sont programmées pour se déformer en présence de stimuli choisis [24, 25, 26].

Ainsi, ce travail de thèse vise à assembler un dimère de particules d'or de 40 nm de diamètre sur des origamis d'ADN dynamiques afin de créer des nanostructures hybrides

dont la réponse optique peut être activement modulée, de manière spécifique. Pour cela, j'ai développé, à la fois, des méthodes de synthèse de ces nano-objets hybrides complexes, mais également des outils spectroscopiques pour caractériser leurs propriétés optiques à l'échelle de l'objet individuel.

Ce manuscrit se compose de 6 chapitres. Dans le premier, je vous présenterai les aspects théoriques qui régissent les propriétés optiques des nanoparticules d'or ainsi que leur propriétés physico-chimiques. Cela me permettra de décrire l'état de l'art sur l'utilisation de nanostructures d'or sensibles à des informations biochimiques. Puis, après un bref rappel sur la structure d'ADN, je vous présenterai le domaine des nanotechnologies ADN et leur intérêt pour créer des nanostructures dynamiques. En particulier, j'introduirai les origamis d'ADN 2D, 3D et dynamiques puis je discuterai de l'état de l'art sur les nanostructures hybrides or - origamis d'ADN.

Dans le deuxième chapitre, nous verrons le design général de notre origami d'ADN en forme de Y ainsi que sa synthèse qui a été optimisée par nos collaborateurs de l'équipe de Gaëtan Bellot du CBS à Montpellier. Je vous présenterai ensuite le protocole que j'ai développé de fonctionnalisation des nanoparticules d'or et de leur assemblage sur ces origamis d'ADN. Cet assemblage a, en particulier, nécessité une optimisation de la stabilité colloïdale des particules d'or pour les rendre compatibles avec des origamis d'ADN.

Au cours du troisième chapitre, je vous présenterai deux protocoles d'analyse optique exploités au cours de cette thèse. Le premier est basé sur l'analyse spectroscopique de dimères uniques en champ sombre, le second sur une analyse colorimétrique grâce à un simple caméra couleur CCD. Je vous montrerai aussi, au cours de ce chapitre, l'intérêt d'utiliser des particules monodisperses en forme et en taille (fournies par notre collaboratrice Sylvie Marguet du CEA Saclay) plutôt que des particules commerciales afin de minimiser la dispersion des réponses optiques des dimères. Enfin, je vous présenterai une méthode numérique permettant d'établir une courbe théorique reliant la longueur d'onde de résonance longitudinale des dimères avec la distance interparticule.

Enfin, dans les deux derniers chapitres, nous nous intéresserons à la partie centrale de l'origami comportant le site actif de ces nanostructures dynamiques. Ainsi au cours du quatrième chapitre, nous étudierons des dimères de particules d'or assemblés autour d'un origami qui a été conçu pour changer de conformation par une réaction de *strand displacement*. Le chapitre 5 sera consacré à l'analyse du comportement de dimères assemblés sur des origamis sensibles à des variations de pH. Le dernier chapitre me permettra de conclure cette étude et d'en discuter les perspectives en présentant quelques données préliminaires obtenues au cours de cette thèse.

# Sommaire

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>1</b>
1.1	Les nanoparticules d'or . . . . .	2
1.1.1	Propriétés optiques des nanoparticules d'or . . . . .	2
1.1.2	Propriétés optiques de dimères de nanoparticules . . . . .	7
1.1.3	Physico-chimie des nanoparticules d'or . . . . .	11
1.1.4	Biocapteurs basés sur des nanoparticules d'or . . . . .	20
1.2	Nanotechnologies ADN . . . . .	24
1.2.1	L'ADN : rappels sur sa structure et ses propriétés . . . . .	24
1.2.2	Nanostructures or - ADN . . . . .	28
1.2.3	Origamis 2D / 3D . . . . .	29
1.2.4	Origamis dynamiques . . . . .	32
1.2.5	Nanostructures hybrides or - origamis d'ADN . . . . .	33
1.3	Problématiques de cette thèse . . . . .	35
<b>2</b>	<b>Synthèse des dimères hybrides AuNPs/Origamis d'ADN</b>	<b>39</b>
2.1	Design et synthèse des origamis d'ADN . . . . .	40
2.1.1	Le design . . . . .	40
2.1.2	Synthèse des origamis . . . . .	43
2.2	Synthèse de dimères AuNPs/origami . . . . .	46
2.2.1	Fonctionnalisation des nanoparticules d'or . . . . .	46
2.2.2	Assemblage des dimères de nanoparticules d'or . . . . .	55
2.2.3	Analyse des dimères assemblés par microscopie électronique . . . . .	59
<b>3</b>	<b>Spectroscopie de dimères uniques</b>	<b>65</b>
3.1	Spectroscopie de diffusion . . . . .	66
3.1.1	Montage optique . . . . .	66
3.1.2	Préparation des échantillons . . . . .	68
3.1.3	Sélection des dimères . . . . .	70
3.1.4	Acquisition de spectres de diffusion . . . . .	71
3.1.5	Traitement des spectres de diffusion . . . . .	71
3.1.6	Analyse des spectres de diffusion . . . . .	73
3.1.7	Outil de simulations numériques . . . . .	74
3.2	Amélioration de la dispersion spectrale . . . . .	75
3.2.1	Caractérisation des particules d'or . . . . .	76
3.2.2	Simulations numériques des propriétés optiques des dimères . . . . .	78
3.2.3	Particules commerciales Vs monodisperses . . . . .	84
3.3	Relation longueur d'onde - distance interparticule . . . . .	87

3.3.1	Particules commerciales . . . . .	88
3.3.2	Particules monodisperses . . . . .	89
3.4	Protocole d'analyse HSL . . . . .	93
3.4.1	Acquisition et traitement des données . . . . .	94
3.4.2	Choix des dimères . . . . .	95
3.4.3	Validation du nouveau protocole . . . . .	95
3.4.4	Comparaison des deux protocoles . . . . .	97
<b>4</b>	<b>Réaction de <i>strand displacement</i></b>	<b>99</b>
4.1	Design des origamis . . . . .	100
4.1.1	Origamis non modulables . . . . .	100
4.1.2	Origamis modulables par <i>strand displacement</i> . . . . .	102
4.2	Propriétés optiques de dimères hybrides . . . . .	107
4.2.1	Optimisation de la chimie de surface des particules . . . . .	107
4.2.2	Influence de la force ionique . . . . .	110
4.3	<i>Strand displacement</i> dans des dimères hybrides . . . . .	115
<b>5</b>	<b>Modulation du site actif des origamis</b>	<b>121</b>
5.1	Dimères hybrides sensibles à des variations de pH . . . . .	122
5.1.1	Conception du site actif des origamis . . . . .	122
5.1.2	Formation des i-motifs en fonction du pH et de la force ionique . . . . .	126
5.1.3	Analyse du changement de conformation des origamis en fonction du pH . . . . .	127
5.1.4	Dimères assemblés sur des origamis sensibles au pH . . . . .	130
5.2	Autres designs du site actif . . . . .	138
<b>6</b>	<b>Conclusions et perspectives</b>	<b>143</b>
6.1	Conclusions . . . . .	144
6.2	Analyse optique de dimères à temps court . . . . .	146
6.3	Dimères de nanocubes d'or assemblés sur origamis d'ADN . . . . .	148
<b>A</b>	<b>Visuel Cadnano de l'origami d'ADN</b>	<b>157</b>

# Chapitre 1

## Introduction

### Sommaire

---

<b>1.1 Les nanoparticules d'or</b> . . . . .	<b>2</b>
1.1.1 Propriétés optiques des nanoparticules d'or . . . . .	2
1.1.2 Propriétés optiques de dimères de nanoparticules . . . . .	7
1.1.3 Physico-chimie des nanoparticules d'or . . . . .	11
1.1.4 Biocapteurs basés sur des nanoparticules d'or . . . . .	20
<b>1.2 Nanotechnologies ADN</b> . . . . .	<b>24</b>
1.2.1 L'ADN : rappels sur sa structure et ses propriétés . . . . .	24
1.2.2 Nanostructures or - ADN . . . . .	28
1.2.3 Origamis 2D / 3D . . . . .	29
1.2.4 Origamis dynamiques . . . . .	32
1.2.5 Nanostructures hybrides or - origamis d'ADN . . . . .	33
<b>1.3 Problématiques de cette thèse</b> . . . . .	<b>35</b>

---

Mon travail de thèse porte sur le développement de nanostructures hybrides obtenues par l'association de nanoparticules d'or (AuNPs) et d'origamis d'ADN ; et dont les propriétés optiques sont sensibles à des stimuli physico-chimiques. Le but de ce chapitre introductif est donc, à la fois, d'introduire ces deux briques de bases par de brefs rappels théoriques et historiques ; mais également de motiver le sujet de ma thèse par un aperçu de l'état de l'art sur le développement de nanostructures hybrides or-ADN.

## 1.1 Les nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or trouvent de plus en plus d'applications biomédicales comme agents de contrastes optiques [1], sources photothermiques de chaleur localisée (pour la thérapie [5, 1] ou l'imagerie [2, 3, 4]) ou comme capteurs biochimiques [6, 7]. Cet engouement croissant est lié à la conjonction de deux propriétés essentielles de l'or à l'état de nanoparticules colloïdales : une très forte interaction lumière-matière due à des résonances plasmon localisées et une excellente bio-compatibilité liée à sa faible toxicité et sa résistance à l'oxydation. Dans un premier temps, je vais rappeler brièvement les propriétés optiques de nanoparticules d'or uniques et de dimères d'AuNPs, qui seront étudiés au cours de ce travail de thèse. Je rappellerai également les processus physico-chimiques qui gouvernent la stabilité des nanoparticules d'or en milieu aqueux et qui seront essentiels pour permettre la synthèse et l'étude de mes nanostructures hybrides. La dernière partie de ce sous-chapitre s'intéressera plus spécifiquement à l'utilisation de particules d'or uniques ou de dimères de nanoparticules d'or comme capteurs biochimiques. Ce paragraphe permettra, en particulier, de motiver l'utilisation des nanotechnologies ADN pour concevoir des nanostructures d'or sensibles à leur environnement.

### 1.1.1 Propriétés optiques des nanoparticules d'or

#### Approximations quasi-statique et dipolaire

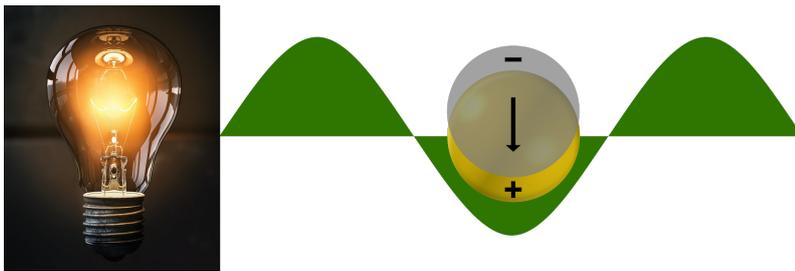


Figure 1.1: Représentation visuelle de l'excitation à la résonance plasmon d'une particule d'or répondant comme un dipôle électrique induit.

Intéressons-nous tout d'abord aux propriétés optiques des nanoparticules d'or et à leur capacité à présenter des résonances plasmon localisées. Les résonances plasmon aux fréquences optiques sont obtenues pour des matériaux présentant une partie réelle de leur constante diélectrique négative dans cette gamme de longueurs d'onde. De tels matériaux sont généralement décrits comme présentant un nuage d'électrons quasi-libres dont la constante diélectrique peut être exprimée par un simple modèle de Drude (électrons

ne subissant pas de force de rappel des noyaux mais simplement une force de frottement fluide). Dans le cas de l'or, les électrons de conduction peuvent être correctement décrits par un modèle de Drude mais la présence de transitions électroniques interbandes pour des longueurs d'onde inférieures à 500 nm (bande  $d$  vers bande de conduction  $sp$ ), nécessitent de corriger la constante diélectrique : on parle alors de modèle de Drude-Lorenz. Les parties réelle et imaginaire de la constante diélectrique expérimentale de l'or sont données sur la figure 1.2. On retrouve bien une partie réelle de la constante diélectrique sensiblement négative à des fréquences supérieures à 500 nm. Cette figure présente les parties réelles et imaginaires estimées dans deux publications à partir de mesures sur des films d'or. Les données en ligne pleine bleue, publiées par Johnson & Christy en 1972 [27], sont celles généralement exploitées pour étudier les propriétés optiques de particules d'or. La courbe en ligne pointillée orange représente des données obtenues en 2012 pour un film d'or de rugosité négligeable (0,25 nm) obtenu par *template stripping* [28] : on observe que si les parties réelles sont en accord pour les petites longueur d'onde (jusqu'à 600nm), dans les grandes les valeurs de 2012 sont légèrement inférieures à celles de 1972. En ce qui concerne la partie imaginaire des données, l'analyse est plus complexe. Les valeurs de Johnson & Christy sont tout d'abord inférieures jusqu'à 500nm, puis entre 500 et 900nm les deux séries de données sont assez proches et se croisent à plusieurs reprises. Finalement au delà de 900nm les deux courbes se séparent ; les mesures effectuées sur le film obtenu par *template stripping* se retrouvant alors en dessous. Nous verrons dans la partie 3.3 de cette thèse que ces différences entraînent une variation importante de la longueur d'onde de résonance obtenue pour des particules d'or.

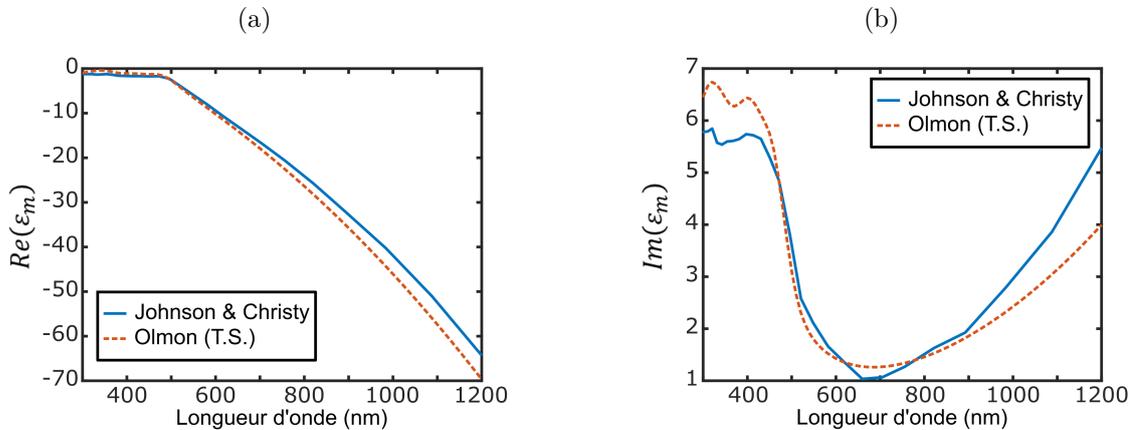


Figure 1.2: Parties réelle et imaginaire de la constante diélectrique de l'or mesurée expérimentalement sur des films continus [27, 28].

Pour une lumière incidente donnée, le nuage d'électrons de conduction de l'or va donc se polariser, comme représenté schématiquement sur la figure 1.1. Dans l'hypothèse où les particules d'or sont petites par rapport à la longueur d'onde (ce qui sera systématiquement le cas dans cette thèse avec des tailles typiques de 40 nm de diamètre), on peut négliger la périodicité spatiale du champ électrique de la lumière : il est probable que les électrons se déplaceront avec une phase homogène vis-à-vis du champ électrique et donc que les particules d'or pourront alors être approximées par un dipôle induit. Nous allons voir que

pour une fréquence spécifique de la lumière incidente, l'oscillation du nuage électronique peut être maximale : l'interaction est alors résonante. Cette résonance crée une amplification de l'absorption et de la diffusion de la particule, comme schématisé dans la figure 1.3.

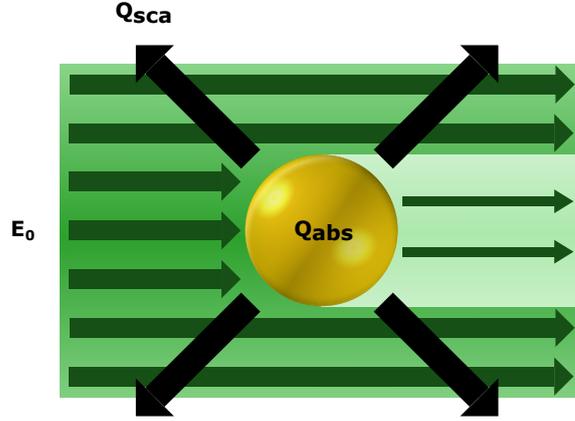


Figure 1.3: Extinction, absorption et diffusion de la lumière par une particule d'or.

Pour caractériser cette résonance de l'interaction lumière-matière, nous devons exprimer les grandeurs caractéristiques associées. La combinaison de l'absorption et de la diffusion définissent l'extinction dont la grandeur caractéristique est une section efficace  $C_{ext}$ , homogène à une surface : c'est à dire la surface effective d'une onde plane incidente qui est éteinte par la particule dans sa direction de propagation. Finalement, pour une particule d'or donnée, on exprime trois sections efficaces d'interaction  $C_{ext}$ ,  $C_{abs}$  pour l'absorption et  $C_{sca}$  pour la diffusion telles que :  $C_{ext} = C_{abs} + C_{sca}$ , dépendant toutes les trois de la fréquence de l'onde incidente.

Lorsque l'on suppose le diamètre des particules très inférieur à la longueur d'onde d'excitation, soit ne dépassant pas la dizaine de nanomètres, il est possible de se placer dans l'approximation quasi-statique : on suppose la longueur d'onde de la lumière infinie par rapport à la particule, correspondant à une fréquence effective nulle. Dans cette approximation, il est aisé d'effectuer un calcul électrostatique de la réponse d'une sphère d'or de rayon  $a$  vis-à-vis d'un champ électrique homogène et statique  $\vec{E}_0$  en connaissant la constante diélectrique de l'or  $\epsilon_m$  et la constante diélectrique de l'environnement  $\epsilon_1$ . Ce calcul montre que la sphère répond exactement comme un dipôle induit :

$$\vec{p}_{sphère} = \epsilon_0 \epsilon_1 \alpha_0 \vec{E}_0 \text{ avec } \alpha_0 = 4\pi a^3 \frac{\epsilon_m - \epsilon_1}{\epsilon_m + 2\epsilon_1} \quad (1.1)$$

$\alpha_0$  correspondant à la polarisabilité quasi-statique de la nanoparticule. Il apparaît alors une condition de résonance de cette polarisabilité lorsque la partie réelle du dénominateur s'annule :  $Re(\epsilon_m) = -2\epsilon_1$ . Dans le cas d'un milieu environnant tel que l'eau ou l'air, c'est à dire dont la constante diélectrique est positive et proche de 2, cela correspond pour l'or à une longueur d'onde de résonance proche de 520 nm - 530 nm. Cette résonance est appelée résonance de plasmon de surface localisé (LSPR, *Localized Surface Plasmon Resonance*).

Le principe du modèle quasi-statique est de négliger les oscillations temporelles du champ électrique pendant le calcul de la polarisabilité mais, ensuite, de considérer que le dipôle

induit est oscillant. Dans le cas général d'un dipôle oscillant de polarisabilité  $\alpha$  dans un champ  $E$  oscillant, le rayonnement qui est alors obtenu permet de définir les sections efficaces de diffusion et d'extinction telles que :

$$\begin{cases} C_{sca} = \frac{k^4}{6\pi} |\alpha|^2 \\ C_{ext} = k \operatorname{Im}(\alpha) \end{cases} \quad (1.2)$$

avec  $k = \sqrt{\varepsilon_1} \frac{2\pi}{\lambda}$  le vecteur d'onde associé à  $E$  se propageant dans un milieu d'indice  $\sqrt{\varepsilon_1}$ . Ces formules montrent les limites du modèle quasi-statique : si la partie imaginaire de  $\varepsilon_m$  est nulle alors  $C_{ext} = 0$  tandis que  $C_{sca} > 0$ . Or, nous avons bien rappelé que l'extinction représente l'énergie totale enlevée, prenant en compte la diffusion et l'absorption : d'après la loi de conservation de l'énergie, il n'est donc pas possible d'avoir  $C_{sca} > C_{ext}$ . Le modèle quasi-statique n'est donc exploitable que dans le cas où  $C_{sca} \ll C_{ext}$  et donc  $C_{abs} \approx C_{ext}$ . Cela est le cas pour des particules d'or de diamètre inférieur à 10 nm. La condition de résonance en extinction correspondant également à l'annulation de la partie réelle du dénominateur de la polarisabilité, ces formules permettent de comprendre la couleur rouge des suspensions colloïdales de petites particules d'or sphériques : la résonance en extinction à 530 nm correspond à une très forte absorption dans le vert et donc à une transmission de la couleur complémentaire, le rouge. On observe également que cette condition de résonance est a priori indépendante de la taille de la particule. Toutefois, l'approximation quasi-statique ne sera pas exploitable au cours de cette thèse puisque les particules utilisées feront 40 nm de diamètre environ.

Tant que la particule est d'une taille sensiblement inférieure à la longueur d'onde (jusqu'à des diamètres de 60-80 nm pour l'or), il est toujours possible de supposer que tous les électrons polarisés sont en phase les uns par rapport aux autres et donc d'approximer la particule à un dipôle électrique induit. Il faut toutefois corriger la polarisabilité quasi-statique par un terme de dépolarisation dynamique [29]. Ainsi, pour une sphère dont le diamètre est faible devant la longueur d'onde, la polarisabilité corrigée  $\alpha$  peut s'écrire :

$$\alpha(\omega) = \frac{\alpha_0(\omega)}{1 - i \frac{k^3}{6\pi} \alpha_0(\omega)} \quad (1.3)$$

La condition de résonance de la polarisabilité dépend alors de la taille de la particule. Ainsi la résonance se décale vers le rouge lorsque la taille de la particule augmente. De plus la dépolarisation dynamique amortit davantage la résonance plasmon et l'élargit spectralement. Après correction, la section efficace de diffusion peut s'écrire :

$$C_{sca} = |\alpha|^2 \frac{k^4}{6\pi} \quad (1.4)$$

Ainsi :

$$C_{ext} = k \operatorname{Im}(\alpha) = k |\alpha|^2 \left[ \frac{k^3}{6\pi} + \frac{\operatorname{Im}(\alpha_0)}{|\alpha_0|^2} \right] \geq |\alpha|^2 \frac{k^4}{6\pi} = C_{sca} \quad (1.5)$$

La loi de conservation de l'énergie est donc bien respectée.

En négligeant la dépolarisation dynamique, les sections efficaces de diffusion et d'absorption varient respectivement en  $a^6$  et  $a^3$ . De plus en effectuant le rapport des sections efficaces

de diffusion et d'extinction, on constate qu'il est proportionnel au volume  $V$  de la particule :

$$\frac{C_{sca}}{C_{ext}} \propto \frac{V}{\lambda^3} \propto \left(\frac{a}{\lambda}\right)^3 \quad (1.6)$$

Cela se traduit par une domination de l'absorption pour les petites particules et, à l'inverse, les particules plus grandes diffusent plus efficacement la lumière. Comme l'analyse des propriétés optiques effectuées pendant cette thèse sera effectuée par mesure de spectres de diffusion, cela explique que nous ne pouvons pas travailler avec des petites particules d'or. Au delà de 40 nm de diamètre, la section efficace de diffusion d'une sphère d'or vaut plus de 10% de la section efficace d'extinction : c'est pourquoi ce travail de thèse nécessite des particules d'or d'au moins 40 nm de diamètre.

### Limites du modèle dipolaire sphérique

Les formules présentées ci-dessus considéraient que la polarisabilité de la particule était un simple scalaire. Ceci n'est valable que pour une sphère unique. Pour une particule anisotrope, la polarisabilité est une matrice (3,3). Dans l'hypothèse où l'objet anisotrope est petit par rapport à la longueur d'onde et répondra donc toujours comme un dipôle électrique induit, cette polarisabilité sera une simple matrice diagonale. Dans ce cas, l'approximation dipolaire reste valable mais il faut recalculer la polarisabilité quasi-statique matricielle pour rendre compte de la géométrie de la particule.

Par conséquent, pour une particule anisotrope et suivant son orientation vis-à-vis du champ électrique, jusqu'à trois modes propres d'oscillation des électrons de conduction seront observés et ils auront des fréquences de résonance différentes. Ainsi, à volume équivalent une structure plus complexe aura une longueur d'onde de résonance différente d'une sphère [30]. Par exemple dans le cas d'une ellipsoïde de révolution, la résonance se décale vers le bleu pour une polarisation suivant le petit axe (mode dit transverse) et vers le rouge suivant le grand axe (mode dit longitudinal). Au cours de cette thèse nous verrons, en particulier, comment l'inhomogénéité en forme des particules entraîne un étalement des distributions de longueur d'onde pour des particules de volumes semblables.

Pour des particules de taille non négligeable par rapport à la longueur d'onde (supérieures à 60-80 nm de taille caractéristique), l'approximation dipolaire n'est plus valable. Dans le cas d'une particule sphérique, il est possible de résoudre exactement les équations de Maxwell en symétrie sphérique et d'utiliser la théorie de Mie [31] qui prend en compte le déphasage entre les déplacements des électrons à différentes positions de la particule : on voit alors apparaître des modes d'ordres plus élevés (quadrupolaires, octupolaires, etc...). La théorie de Mie permet également d'exprimer les sections efficaces d'extinction et de diffusion par une sphère. Il est ensuite facile d'en déduire également celle d'absorption. Cependant la théorie de Mie se limite à l'étude d'une sphère dans un milieu diélectrique environnant homogène : elle n'est donc pas suffisante pour décrire des systèmes à environnements diélectriques inhomogènes ou des particules de forme quelconque. Dans ces cas plus complexes, il est généralement nécessaire de résoudre numériquement les équations de Maxwell.

### 1.1.2 Propriétés optiques de dimères de nanoparticules

Les particules d'or utilisées dans le cadre de cette thèse (environ 40 nm de diamètre) peuvent donc être approximées par des dipôles induits. Comme ces dipôles rayonnent un champ électromagnétique, une première particule d'or va influencer sur le champ électrique à la position d'une seconde particule : des effets de couplage vont apparaître. Nous allons voir que ce couplage électromagnétique de plusieurs nanoparticules a une très forte dépendance vis-à-vis de la distance interparticule et que cette dépendance permet de traduire une distance nanométrique en une information spectrale aisément mesurable.

Grâce à l'approximation dipolaire, il est possible de considérer chaque particule comme un dipôle induit et de comprendre les principaux mécanismes liés au couplage plasmon sans avoir à les calculer quantitativement [32]. De plus, en considérant des particules sphériques, il est possible de négliger l'aspect matriciel de la polarisabilité et donc de ne s'intéresser qu'à des solutions scalaires : dans ce cas, les équations de Maxwell reviennent aux solutions de l'équation de Schrödinger. Ainsi le couplage des dipôles induits est analogue à l'interaction de deux orbitales atomiques de type  $p$  quand on forme une liaison moléculaire. Ce modèle d'hybridation peut être schématisé comme sur la figure 1.4a [33].

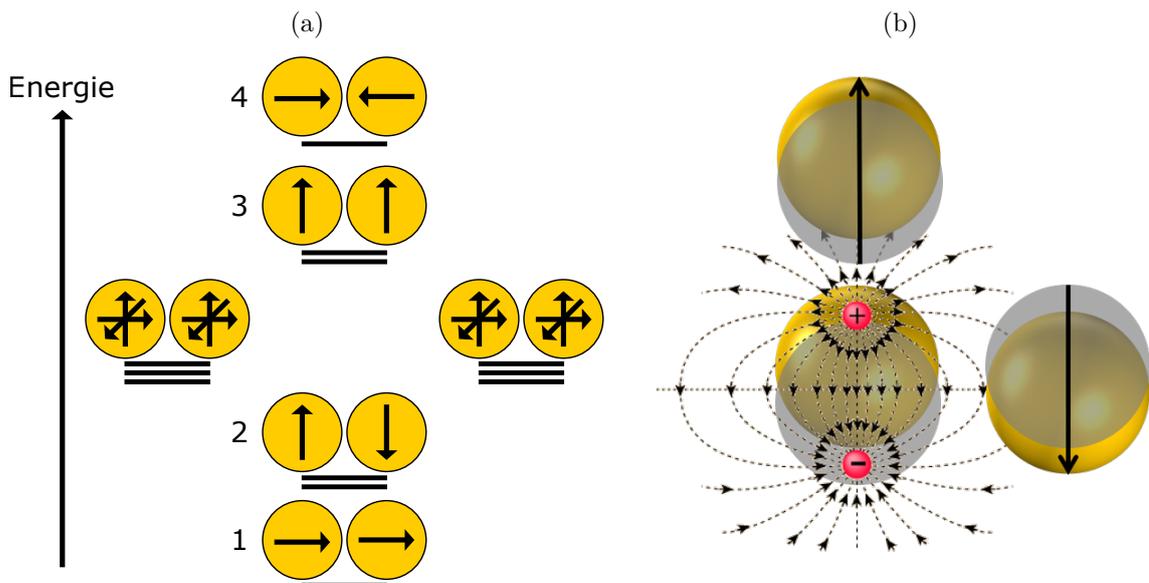


Figure 1.4: Représentations schématiques du couplage plasmon : modèle d'hybridation [33] (a) et représentation des lignes du champ émis par un dipôle induit dans une particule se couplant au nuage d'électron d'une seconde en géométrie longitudinale ou transverse.

Dans cette représentation, le couplage entre les dipôles induits dans chaque particule est obtenu suivant deux orientations. La première, selon l'axe du dimère, correspond à des modes longitudinaux (notés 1 et 4). La seconde, dans l'axe perpendiculaire à celui du dimère, fournit des modes transverses (notés 2 et 3). Les modes transverses sont dégénérés 2-à-2 compte-tenu de la libre révolution du système par rapport à l'axe du dimère. Pour chaque mode, les dipôles peuvent être couplés de manière parallèle (dipôles en phase) ou

anti-parallèle (dipôles en opposition de phase).

Il est possible d'expliquer qualitativement le décalage spectral correspondant à chaque géométrie de couplage en considérant l'orientation des lignes de champ électrique fournies par un des dipôles induits (figure de droite). Dans le cas longitudinal, les lignes de champ du premier dipôle vont favoriser le déplacement des électrons dans le même sens. Le couplage est donc coopératif pour le cas parallèle, et anti-coopératif dans le cas où les deux dipôles sont en opposition de phase. Il faut donc moins d'énergie pour exciter le cas parallèle (décalage spectral vers le rouge) et plus d'énergie pour le cas anti-parallèle (décalage vers le bleu). L'effet est inversé pour le cas transverse : en effet, les lignes de champs sont inversées sur l'axe perpendiculaire au dipôle et ce couplage favorise donc l'obtention de deux dipôles en opposition de phase.

De plus, l'amplitude du champ induit par le dipôle est plus élevé dans l'axe de dipôle que perpendiculairement : c'est pourquoi le décalage énergétique dans le cas longitudinal est plus élevé que dans le cas transverse, de manière similaire au décalage d'énergie supérieur pour un recouvrement d'orbitales  $p$  en configuration  $\sigma$  qu'en configuration  $\pi$ .

Ces 4 différents modes vont donc présenter différentes fréquences de résonance mais également de grandes variations des sections efficaces d'interaction avec la lumière. En effet, les deux modes anti-parallèles (notés 2 et 4) sont de manière effective des quadripôles : en approximation quasi-statique (champ parfaitement homogène), leur couplage avec la lumière serait totalement nul. Hors de cette approximation mais avec des dimères petits par rapport à la longueur d'onde (approximation dipolaire pour la réponse du système couplé), ces sections efficaces resteront faibles. Au contraire, les couplages parallèles (notés 1 et 3) correspondent à un dipôle effectif non-nul et se coupleront efficacement avec la lumière. On parle souvent de modes *sombres* pour les cas anti-parallèles et de modes *brillants* pour les cas parallèles [34, 33].

Il est également important de noter que le mode plasmon longitudinal *brillant* fournit des sections efficaces d'interaction avec la lumière plus importantes que le mode transverse *brillant*. En effet, l'aspect coopératif du couplage longitudinal n'entraîne pas seulement un décalage spectral vers le rouge mais il augmente également la polarisation induite dans chaque particule. Comme l'effet est anti-coopératif pour le mode transverse, on peut comprendre qualitativement que la section efficace d'extinction de deux particules couplées de manière transverse sera inférieure à deux particules non couplées, qui sera elle-même inférieure à deux particules couplées de manière longitudinale. C'est pourquoi, en pratique, le mode longitudinal va dominer les spectres d'extinction et de diffusion d'un dimère sous lumière blanche non-polarisée ; et c'est également la raison pour laquelle, au cours des analyses spectrales présentées dans cette thèse, ce sera ce mode qui sera étudié préférentiellement.

En pratique lorsque la distance interparticule est faible, et donc le couplage fort, il est possible de mesurer simultanément les deux modes grâce à l'important décalage vers le rouge de la longueur d'onde de résonance du mode longitudinal. Le décalage du maximum des spectres de résonance est quasi-exponentiel lorsque les particules se rapprochent [35, 11, 36, 37].

Les limitations pour l'utilisation de cette approximation dipolaire dans le cas d'un dimère sont encore plus strictes que dans le cas d'une particule seule. Ainsi, elle n'est valable que pour des couples de petites particules devant la longueur d'onde [34] et suffisamment éloignées l'une de l'autre [38]. En effet même pour des petites particules, si la distance

bord-à-bord est inférieure à leur rayon il est nécessaire de tenir compte des couplages entre les modes d'ordre supérieur [38]. Ceci est logique : le champ rayonné par chaque dipôle induit est inhomogène. Il faut donc que les particules soient éloignées avec un couplage inefficace pour pouvoir considérer le champ homogène au niveau de chaque particule et retrouver un modèle dipolaire réaliste.

Dans le cas de particules relativement grandes ( $> 60nm$ ) des modes supposés sombres dans l'approximation dipolaire peuvent même devenir brillants [39, 40]. Il n'est donc plus possible d'utiliser cette approximation. La théorie de Mie généralisée permet une analyse plus complète en prenant en compte tous les modes d'interaction tant que les particules sont sphériques [41] et que le milieu diélectrique environnant est homogène.

Il a été discuté dans la littérature que, pour des particules dont le diamètre ( $2a$ ) se situe entre 20 et 90 nm, le rapport entre le décalage spectral entre la résonance longitudinale du dimère  $\lambda_{\text{plasmon}}$  (pour une distance interparticule bord-à-bord  $d$ ) et une particule seule de résonance  $\lambda_0$  suit une loi d'échelle universelle indépendamment de la taille des particules [35, 42]. Cette équation est généralement appelée *plasmon-ruler* et se définit telle que :

$$\frac{\lambda_{\text{plasmon}} - \lambda_0}{\lambda_0} = 0,18 \exp \frac{-d/2a}{0,23} \quad (1.7)$$

Si cette équation donne un bon accord qualitatif pour des distances interparticules assez élevées [10], un ancien doctorant de l'Institut Langevin a vérifié qu'elle n'était pas adaptée pour des distances plus courtes [43]. De plus, à des distances interparticules de l'ordre du nanomètre ou moins, des effets non-locaux impliquent que les approximations de l'électrodynamique classique ne sont plus valables et les décalages spectraux théoriques sont alors surestimés [44, 45]. C'est pourquoi cette équation ne sera pas utilisée au cours de cette thèse. Toutefois, cette équation montre bien la très forte sensibilité du couplage plasmon à la distance interparticule : pour des particules de 40 nm de diamètre (utilisées dans cette thèse) et quand la distance interparticule varie de 20 nm à 10 nm :  $\Delta\lambda_{\text{plasmon}} \approx 0,04\lambda_0 \approx 20nm$ . Donc, on observe qu'une variation nanométrique de la distance donne un décalage spectral aisément mesurable sur un spectromètre, voire avec une simple caméra comme indiqué sur la figure 1.5 et comme nous en discuterons davantage au cours de ce manuscrit.

La figure 1.5 présente des données obtenues par un ancien doctorant de l'Institut Langevin en mesurant la résonance plasmon longitudinale de dimères de particules d'or de 40 nm liées par un double-brin d'ADN en fonction de la force ionique [8]. Comme expliqué dans le paragraphe suivant sur la physico-chimie des nanoparticules d'or, l'augmentation de la force ionique réduit la répulsion électrostatique entre particules et réduit la distance interparticule  $d$ . Nous pouvons voir un décalage spectral progressif vers le rouge de la résonance plasmon, aussi bien visible par spectroscopie de particules uniques que sur une simple caméra couleur.

Ces différents points expliquent l'intérêt que nous portons à l'utilisation du couplage plasmon entre particules de 40 nm pour mesurer des déformations nanométriques. Afin d'établir une relation quantitative entre la longueur d'onde de résonance longitudinale des dimères et la distance interparticule (bord-à-bord), permettant ainsi une analyse morphologique des nanostructures, nous avons utilisé une méthode numérique nommée *Boundary Element Method* et basée sur la méthode des éléments finis. Cet outil sera présenté

dans le chapitre 3 avec une discussion sur le choix des fonctions diélectriques afin d'établir une courbe de calibration la plus adéquate possible.

Pour optimiser la section efficace de diffusion et augmenter la force du couplage plasmon, on pourrait imaginer privilégier l'utilisation de particules d'or les plus grandes possibles. Toutefois, comme discuté dans le paragraphe suivant, la stabilité colloïdale des particules d'or diminue fortement avec leur taille. C'est pourquoi un bon compromis entre stabilité, section efficace de diffusion et couplage plasmon élevé est obtenu avec des particules d'or de 40-50 nm comme utilisées dans ce travail.

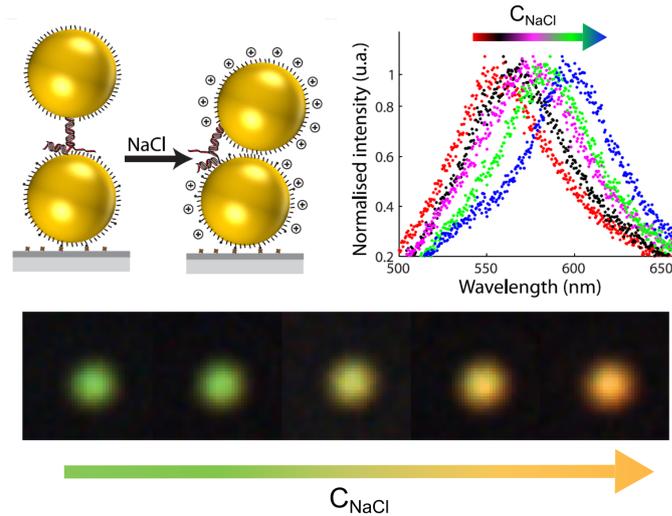


Figure 1.5: Évolution, en fonction de la force ionique, de la morphologie, et donc de la résonance plasmon longitudinale, d'un dimère de particules d'or de 40 nm assemblées sur un double-brin d'ADN : représentation schématique et exemple typique de l'évolution de la réponse optique en spectroscopie et en imagerie sur fond noir (adaptée de [8]).

Au cours de cette thèse nous ne nous intéresserons qu'à de simples dimères et à la dépendance de leur couplage en fonction de leur distance interparticule. Cependant il est également possible d'associer un plus grand nombre de particules d'or et d'exploiter le couplage de leurs résonances plasmon dans le but de moduler encore d'avantage les propriétés optiques. Il est ainsi possible de les organiser en hélices afin d'introduire de la chiralité [46, 47, 48, 49, 50] ou d'observer des effets magnétiques en les assemblant en cercle [51, 52] ou en *framboise* [53, 54].

### Couplage plasmon Vs FRET

La capacité du couplage plasmon à détecter des variations de distance par une mesure spectroscopique est conceptuellement proche du couplage entre fluorophores dans un processus de type FRET (*Förster Resonant Energy Transfer*) [20]: un couplage en champ proche entre dipôles, dont l'efficacité est sensible à la distance à l'échelle nanométrique, induit un phénomène spectral mesurable en champ lointain. Je discuterai plus en détails du FRET dans le chapitre 5 où ce processus sera exploité pour caractériser les variations de morphologie d'origamis d'ADN en fonction du pH.

Toutefois, il y a des différences conceptuelles et expérimentales importantes entre ces deux techniques spectroscopiques. Tout d'abord, Le FRET est un couplage entre un dipôle

incohérent émetteur (le donneur) et un dipôle induit absorbant (l'accepteur) quand le couplage plasmon est un phénomène cohérent de couplage entre un champ incident et deux dipôles induits qui se couplent de manière multipolaire. En pratique, le FRET est adapté pour mesurer des distances de l'ordre de quelques nanomètres [20] tandis que le couplage plasmon fonctionne de quelques nanomètres jusqu'à une distance de l'ordre du rayon de la particule [35], soit une vingtaine de nanomètres pour les objets étudiés dans cette thèse. De plus, la section efficace de diffusion d'une sphère d'or de 40 nm de diamètre est supérieure d'environ 4 ordres de grandeur à la section efficace d'absorption d'une molécule fluorescente : on peut ainsi observer un dimère unique de particules avec une simple lampe blanche et une caméra couleur comme indiqué sur la figure 1.5. Surtout, les particules d'or sont parfaitement photostables et ne souffrent pas du photoblanchiment des molécules fluorescentes, leur étude peut alors être menée pendant plusieurs dizaines d'heures [55].

### 1.1.3 Physico-chimie des nanoparticules d'or

Comme précisé précédemment, l'intérêt croissant porté aux nanoparticules d'or dans des applications biomédicales ne provient pas uniquement de leurs propriétés optiques : dans ce cas, l'argent serait privilégié car la partie imaginaire de sa constante diélectrique est significativement inférieure à l'or et il fournit donc des résonances plasmon avec de meilleurs facteurs de qualité (rapport entre la longueur d'onde de résonance et la largeur à mi-hauteur de la résonance). En pratique, les propriétés physicochimiques des particules d'or sont un point essentiel. En particulier, les faibles toxicité et réactivité de surface des particules d'or sont des atouts majeurs (tant que le diamètre dépasse la dizaine de nanomètres : en dessous, des effets catalytiques sont possibles [56]). De plus, les nanoparticules d'or peuvent être aisément fonctionnalisées par une large gamme de molécules organiques et de biomolécules comme représenté sur la figure 1.6, en exploitant, en particulier la liaison entre l'or et des fonctions thiols  $-SH$  [57].

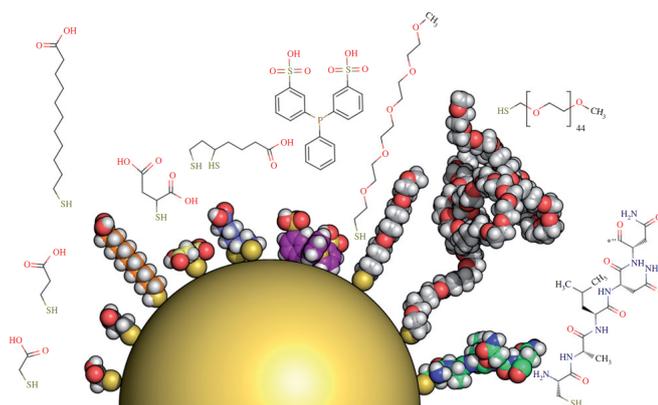


Figure 1.6: Représentation visuelle des différents ligands organiques pouvant être greffés en surface d'une particule d'or (adaptée de [57]).

Ces ligands de surface peuvent servir à minimiser l'interaction des particules avec des milieux biologiques en évitant, en particulier, l'accrochage non spécifique de biomolécules

environnantes sur la surface d'or [58]: cet aspect est essentiel pour l'utilisation des particules d'or dans des applications d'imagerie et de thérapie. A l'inverse, la fonctionnalisation de particules avec des biomolécules données permet une interaction spécifique avec des molécules cibles complémentaires (interaction anticorps-antigène [7] ou hybridation de brins d'ADN [6]), approche essentielle pour le développement de capteurs biochimiques ou de marqueurs optiques pour l'imagerie fonctionnelle.

De manière générale, l'intérêt de cette fonctionnalisation de surface est également de stabiliser la suspension colloïdale en augmentant les répulsions entre particules : soit par une augmentation de la répulsion électrostatique avec une augmentation du potentiel de surface des particules ; soit par l'introduction d'une répulsion stérique évitant l'agrégation irréversible des particules d'or. La compréhension de ces interactions entre particules est essentielle pour ce travail de thèse. En effet, nous verrons que l'assemblage de nanoparticules d'or sur des origamis d'ADN nécessite une excellente stabilité colloïdale car les origamis d'ADN ne sont stables qu'en présence d'ions divalents [14, 16] alors que les particules d'or agrègent en général en présence de ces ions [59].

Le but de ce paragraphe est donc d'introduire brièvement les différentes interactions qui régissent la stabilité des suspensions colloïdales de nanoparticules d'or, soit la théorie DLVO du nom de ses auteurs: Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek [60, 61]. J'introduirai également une extension de cette théorie pour prendre en compte la présence d'une couche importante de ligands organiques dans mes expériences tout en discutant des limites de ces modèles théoriques. J'en profiterai pour introduire l'influence de l'échafaudage d'ADN quand il s'agit d'exprimer les interactions présentes dans un dimère de particules d'or auto-assemblées et d'introduire le concept d'*energy landscape* (paysage énergétique, en français) d'une nanostructure hybride qui sera associé aux expériences effectuées au cours de mon travail de thèse.

### Attraction de Van der Waals

Les interactions de Van der Waals sont dues à des fluctuations temporelles, d'origine quantique, des fonctions d'onde électroniques induisant des fluctuations de dipôles induits dans la matière, qui peuvent se coupler avec leur environnement. Si l'origine de ces interactions est complexe, des formules phénoménologiques permettent d'exprimer simplement le potentiel attractif entre deux sphères de rayon  $a$  d'un matériau donné, placé dans un milieu donné, et distantes de  $d$  (bord à bord), grâce à la constante de Hamaker [62]:

$$V_a(d) = -\frac{A_{eff}}{6} \left( \frac{2a^2}{d^2 + 4ad} + \frac{2a^2}{(d + 2a)^2} + \ln \frac{d^2 + 4ad}{(d + 2a)^2} \right)$$

où  $A_{eff}$  est la constante de Hamaker effective pour ce matériau dans un environnement donné. Cette formule se simplifie nettement quand le rayon de la particule  $a$  est très grand devant la distance interparticule  $d$  et devient  $V_a = -\frac{A_{eff}a}{12d}$ , correspondant au cas de deux surfaces planes infinies. Si les particules sont très petites devant  $d$ , on retrouve la dépendance bien connue des interactions de Van der Waals entre molécules en  $-1/d^6$  mais celle-ci n'est pas applicable pour étudier la stabilité de sphères colloïdales.

Dans le cas simple où les sphères ne sont pas couvertes de ligands et où le milieu environnant est homogène (par exemple des sphères d'or non fonctionnalisées dans de l'eau ultrapure), la constante de Hamaker effective est obtenue simplement à partir des constantes de Hamaker théoriques du matériau et de l'environnement par  $A_{eff} = (\sqrt{A_{Au}} - \sqrt{A_{H_2O}})^2$

[63, 64]. Dans le cas de l'or dans l'eau ( $A_{Au} \cong 4,5 \cdot 10^{-19} J$  et  $A_{H_2O} \cong 0,43 \cdot 10^{-19} J$ ), la constante effective vaut environ  $2,2 \cdot 10^{-19} J$ , en excellent accord avec des mesures effectuées par microscopie à force atomique [65]. Cette constante de Hamaker est particulièrement élevée et est liée à la très forte polarisabilité de l'or par rapport à l'eau.

Dans le cas où les sphères sont couvertes d'un autre matériau, deux configurations sont possibles : soit la couche de surface est considérée comme rigide et le potentiel de Van der Waals fait intervenir trois termes en prenant en compte la constante de Hamaker du matériau en surface (modèle de sphères dures [63, 64]), soit la couche de surface peut se déformer ou s'interpénétrer et la formule précédente du potentiel de Van der Waals est conservée avec une constante de Hamaker effective modifiée (modèle de sphères molles). Dans le cas de surfaces d'or couvertes de ligands organiques dans un milieu aqueux,  $A_{eff} \cong 10^{-19} J$  d'après des mesures de microscopie à force magnétique [66]. L'interaction de Van der Waals est donc faiblement écrantée par la couche organique qui est plus polarisable que l'eau mais nettement moins que l'or. C'est cette valeur que nous utiliserons pour les nanoparticules d'or couvertes d'ADN utilisées dans ce manuscrit.

### Répulsion électrostatique

Des nanoparticules d'or synthétisées dans l'eau présentent une charge superficielle effective négative qui est généralement associée à la présence de ligands présents pendant la synthèse (généralement des ions citrates) et à la présence d'ions  $AuCl_2^-$  en surface [67]. Ce potentiel électrostatique  $\psi$  peut être modulé et même inversé en fonctionnalisant la surface avec d'autres ligands organiques chargés. Dans le cadre de cette thèse, nous utiliserons, par exemple, des ligands phosphines, des ligands amphiphiles thiolés et de courts brins d'ADN trithiolés présentant tous une charge négative à pH physiologique ; mais aussi une amine quaternaire amphiphile présentant une charge positive.

La répulsion électrostatique entre deux colloïdes chargés ne dépend pas uniquement de  $\psi$  mais aussi de la concentration ionique dans le milieu. En effet, les charges superficielles sont écrantées par une double-couche d'ions : une première couche d'ions de charge opposée à la particule qui est adsorbée en surface (couche de Stern) ; et une seconde plus diffuse mais qui se déplace avec la particule (couche de Gouy-Chapman). L'épaisseur de cette double-couche, appelée longueur de Debye-Hückel, est une fonction simple de la force ionique de la solution [68, 69] :

$$\kappa^{-1} = \left( \frac{\epsilon k_B T}{2 N_A e^2 I} \right)^{\frac{1}{2}}$$

avec  $T$  la température en Kelvin,  $N_A$  la constante d'Avogadro,  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $e$  la charge élémentaire et  $I$  la force ionique de la solution (en mM) qui s'exprime en fonction des concentrations des ions  $c_i$  et de leur charge  $z_i$  selon  $I = (1/2) \sum c_i z_i^2$ . On remarque que la longueur de Debye-Hückel est d'autant plus grande que la force ionique est faible. Dans le cadre de cette thèse, la force ionique sera essentiellement contrôlée par l'utilisation de cations  $Na^+$  et  $Mg^{2+}$  associés à des ions chlorures monovalents. Dans ce cas,  $I = c_{Na^+} + 3c_{Mg^{2+}}$ .

L'expression du potentiel électrostatique entre deux sphères de potentiel  $\psi$  peut être simplifiée dans des cas asymptotiques où le rayon de la sphère  $a$  est très petit par rapport à  $\kappa^{-1}$  (par exemple, cas de nanoparticules dans de l'eau ultrapure de faible force ionique) ou quand  $a$  est très grand devant  $\kappa^{-1}$  (par exemple, cas de colloïdes micrométriques en

présence d'une force ionique non-nulle) [61]. Dans le cadre de cette thèse, les forces ioniques utilisées seront toujours importantes : de plus d'une dizaine de mM jusqu'à 1 M. La longueur de Debye vaut alors moins de 3 nm et la seconde hypothèse est raisonnable pour des particules de 40 nm. Dans ce cas, le potentiel électrostatique est proche d'une décroissance exponentielle de longueur caractéristique la longueur de Debye-Hückel [68, 69] :

$$V_r(d) = 2\pi a \varepsilon_0 \varepsilon \psi^2 \ln(1 + e^{\kappa d})$$

où  $\varepsilon$  est la constante diélectrique de l'eau à fréquence nulle. Toutefois, il est généralement difficile d'estimer le potentiel électrostatique en surface de la particule *psi* par une estimation des charges superficielles [70]. Une façon indirecte de remonter à ce potentiel est de mesurer le potentiel zêta  $\zeta$  par des mesures de mobilité électrophorétiques en solution :  $\zeta$  correspond au potentiel électrostatique en surface de la double-couche [71, 70]. Dans le cas de nanoparticules d'or, le potentiel  $\zeta$  peut être significativement inférieur au potentiel de surface  $\psi$  et il dépend de la force ionique et de la nature des ions (taille et valence) [71].

### Répulsion stérique

Comme nous le verrons au cours de ce manuscrit, la présence de la couche de ligands ne peut pas être considérée par un modèle de sphères dures avec une constante de Hamaker et un potentiel électrostatique modifiés puisque des distances interparticules inférieures à deux fois l'épaisseur des ligands seront mesurées. Des phénomènes similaires ont également été observés par un ancien doctorant de l'Institut Langevin dans des dimères de nanoparticules d'or avec des chimies de surface et des géométries d'assemblage différentes [8, 72].

Cette possibilité d'interpénétration des couches de ligands nécessite l'utilisation d'un modèle de sphères molles. La répulsion stérique  $V_s(d)$  peut alors être exprimée selon deux termes : une répulsion due à la pression osmotique  $V_o(d)$  quand les deux couches de ligands se touchent et s'interpénètrent ; et un terme élastique  $V_e(d)$  du à la compression des ligands à des longueurs inférieures à leur longueur d'équilibre [73]. Soit  $L$  l'épaisseur de la couche de ligands, le terme osmotique est nul pour  $d \geq 2L$  tandis que le terme élastique est nul pour  $d \geq L$ . Un modèle pour exprimer ces potentiels a été établi par B. Vincent et collaborateurs [73], qui a donné un bon accord qualitatif pour différents types de ligands organiques [74, 75, 76]. Les répulsions stériques sont alors des fonctions définies par morceaux selon [73] :

$$\begin{aligned} V_o(d) &= 0 \quad \text{si } d \geq 2L \\ V_o(d) &= \frac{4\pi a k_B T}{\nu_l} \varphi^2 \left( \frac{1}{2} - \chi \right) \left( L - \frac{d}{2} \right)^2 \quad \text{si } L \leq d < 2L \\ V_o(d) &= \frac{4\pi a L^2 k_B T}{\nu_l} \varphi^2 \left( \frac{1}{2} - \chi \right) \left( \frac{d}{2L} - \frac{1}{4} - \ln \left( \frac{d}{L} \right) \right) \quad \text{si } d < L \\ V_e(d) &= 0 \quad \text{si } d \geq L \\ V_e(d) &= \frac{2\pi a L^2 k_B T N_{AP} \rho}{M_W} \varphi \left[ \frac{d}{L} \ln \left( \frac{d}{L} \left( \frac{3-d/L}{2} \right)^2 \right) - 6 \ln \left( \frac{3-d/L}{2} \right) + 3 \left( 1 - \frac{d}{L} \right) \right] \quad \text{si } d < L \end{aligned}$$

avec  $\nu_l$  le volume d'une molécule de ligand,  $\chi$  le paramètre d'interaction de Flory-Huggins,  $\varphi$  la fraction volumique de ligand proche de la particule d'or,  $\rho$  la densité du ligand et  $M_W$  sa masse molaire.  $\nu_l = M_W / (N_{AP})$  peut être aisément estimé pour un ligand

donné. Ces formules montrent bien l'importance de la fraction volumique  $\varphi$  occupée par le ligand : plus la couche de ligand est dense, plus la répulsion stérique est importante.  $\chi$  est un paramètre phénoménologique qui prend en compte les différentes interactions entre le polymère en surface de la particule et le solvant (polaire, protique, hydrophobie) [77]. Un très mauvais solvant correspond à  $\chi > 0,5$  et donc à une attraction entre particules à courtes distances [73]. Pour  $\chi = 0,5$ , les couches de ligands s'interpénètrent librement tandis que  $\chi$  tendra vers 0 quand le coût énergétique est maximum en cas d'interpénétration des ligands. Ce paramètre va, en particulier, expliquer la stabilité colloïdale très supérieure de particules couvertes de ligands amphiphiles par rapport à des ligands hydrophiles de longueur et potentiel électrostatique similaires [72]. Dans le cas amphiphile, la partie hydrophile éloignée de la surface d'une particule pourra difficilement pénétrer la couche hydrophobe en surface d'une autre particule [58, 72]. Dans les deux cas,  $\chi$  sera inférieur à 0,5 (car les deux ligands sont hydrophiles en surface) mais il sera plus faible pour un ligand amphiphile.

### Potentiel d'interaction entre deux nanoparticules colloïdales

La théorie DLVO analyse la stabilité d'une suspension colloïdale en additionnant simplement le terme attractif de Van der Waals et le terme répulsif électrostatique pour définir  $V_{tot}(d)$  [60, 61]. La théorie DLVO étendue pour des sphères molles rajoute simplement les termes d'interaction stérique [74, 75, 76]. Un paramètre important qui peut être établi à partir de ces potentiels est la concentration critique de coagulation  $ccc$  de la suspension colloïdale. Il s'agit de la force ionique pour laquelle le maximum du potentiel  $V_{tot}(d)$  devient négligeable par rapport à  $k_B T$  : le potentiel attractif de Van der Waals divergeant pour  $d \rightarrow 0$ , les fluctuations thermiques vont alors permettre l'agrégation irréversible des colloïdes.

Toutefois, dans le cas des nanoparticules, la validité de ces formules pour les différentes énergies potentielles et leur additivité a été récemment remise en cause [78]. En particulier, négliger la taille des ions et des molécules de solvant ou supposer la constante diélectrique de l'environnement  $\varepsilon$  homogène quand la distance interparticule descend à quelques nanomètres semble excessif. De plus, les termes d'interaction peuvent s'influencer mutuellement et ne seraient pas indépendants : à minima, une modification de l'épaisseur et de la densité de la couche de ligands chargés pour  $d < 2L$  devrait modifier le potentiel électrostatique [74]. Une solution serait de rendre certains paramètres, comme le potentiel de surface  $\psi$ , dépendant de la distance interparticule  $d$ , de la force ionique  $I$ , de l'épaisseur des ligands de surface  $L$  ou de la valence des contre-ions [78].

Ces problématiques rendent les formules précédentes difficilement exploitables de manière quantitative. Toutefois, ces potentiels permettent de bien comprendre qualitativement le comportement de suspensions colloïdales d'or avec différents ligands organiques et de discuter les choix opérés pendant cette thèse pour stabiliser suffisamment les particules afin de permettre leur assemblage sur des origamis d'ADN. La figure 1.7 présente l'énergie potentielle totale en fonction de la distance interparticule  $d$  pour des sphères d'or de 40 nm, couvertes par un court oligomère hydrophile d'éthylène glycol thiolé ( $\approx 2nm$ ), utilisé couramment à l'Institut Langevin [72, 8, 11] et pour quatre forces ioniques différentes.

On observe ainsi trois configurations possibles pour ces sphères colloïdales molles comme représenté schématiquement sur la figure 1.7b :

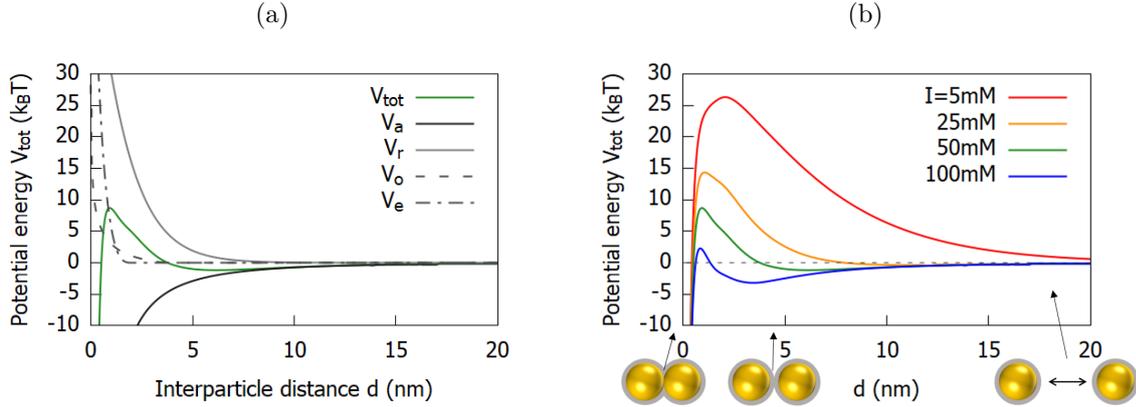


Figure 1.7: Energie potentielle d'interaction  $V_{tot}$  entre deux sphères d'or de 40 nm en suspension dans l'eau en fonction de la distance interparticule  $d$  : différents termes d'interaction pour  $I = 50mM$  (a) et évolution de  $V_{tot}$  quand la force ionique  $I$  augmente (b). Paramètres du calcul :  $T = 298K$ ,  $A_{eff} = 10^{-19}J$ ,  $\psi = -60mV$ ,  $L = 2nm$ ,  $\varphi = 0, 15$ ,  $\chi = 0, 4$ ,  $M_W = 356gmol^{-1}$ ,  $\nu_l = 0, 5nm^3$ .

- un minimum absolu d'énergie pour  $d \rightarrow 0$  correspondant à la domination de l'attraction de Van der Waals à très courte distance interparticule, due à la forte constante de Hamaker de l'or ;
- dans les cas des faibles forces ioniques, un minimum secondaire d'énergie potentielle nulle quand  $d \rightarrow \infty$  correspondant à une suspension colloïdale stable ;
- pour les fortes forces ioniques, un minimum secondaire d'énergie pour une distance interparticule  $d$  proche de  $2L$  et correspondant à une suspension colloïdale déstabilisée mais où les particules ne sont pas agrégées de façon irréversible. On parlera de particules au contact de leur couche de ligands.

Grâce aux phénomènes de couplages plasmon discutés précédemment, il est possible de visualiser simplement ces différents cas : une suspension stable présente une couleur rouge en transmission correspondant à la résonance plasmon de particules individuelles dans le vert ; l'agrégation irréversible correspond à la disparition de la couleur de la suspension et à un dépôt au fond du récipient ; quand la présence d'un minimum secondaire pour  $d$  faible entraîne un changement de couleur de la suspension de rouge vers bleu en transmission (décalage de la résonance plasmon de vert vers rouge) puisque la valeur d'équilibre de  $d$  est petite par rapport au rayon  $a$  des particules. Par conséquent, la force ionique pour laquelle la suspension change de couleur ne correspond pas à la concentration critique de coagulation  $ccc$  définie précédemment mais plutôt à la force ionique pour laquelle le minimum secondaire d'énergie apparaît pour  $d$  faible sans barrière énergétique par rapport à  $d \rightarrow \infty$ . Pour le ligand considéré, une suspension de nanoparticules d'or de 40 nm change de couleur pour une concentration typique de 50mM de NaCl [72, 8]. De plus, une suspension déstabilisée de couleur bleue deviendra incolore en quelques minutes ou quelques heures en fonction de la force ionique : cela indique une barrière énergétique faible entre ce minimum secondaire et le minimum absolu d'énergie à  $d \rightarrow 0$ .

Pour estimer qualitativement la hauteur de la barrière énergétique entre ces deux états

$\Delta V$ , il faut estimer l'ordre cinétique associé à l'agrégation des particules. Une étude récente effectuée avec des particules d'or de 15 nm a démontré qu'une loi cinétique d'ordre 1 pouvait être supposée [79] : la constante de temps d'agrégation  $\tau$  suit alors une loi d'Arrhenius selon  $1/\tau = f_0 e^{-\Delta V/k_B T}$ , où  $f_0$  est la fréquence de tentatives pour passer la barrière énergétique [80]. Pour les particules d'or de 15 nm, une fréquence  $f_0$  de l'ordre de 10 Hz a été observée. En prenant cet ordre de grandeur et en considérant une agrégation prenant de quelques minutes à quelques heures, cela indique une barrière énergétique de l'ordre de  $7 k_B T$  à  $10 k_B T$ .

La forme du potentiel énergétique en figure 1.7 n'est qu'indicative compte-tenu des incertitudes sur les formules théoriques des potentiels et sur plusieurs paramètres utilisés : potentiel  $\psi$ , paramètre  $\chi$  ou fraction volumique  $\varphi$ . Toutefois, elle permet de comprendre différents paramètres essentiels pour stabiliser les nanoparticules afin de les assembler sur des échafaudages ADN : influence de la longueur, de la charge, de l'hydrophobie (paramètre  $\chi$ ) mais aussi de la fraction volumique des ligands que nous aurons l'occasion de rediscuter dans le chapitre consacré à la synthèse des dimères d'or auto-assemblés.

### Potentiel d'interaction entre deux nanoparticules auto-assemblées

Avec les limites indiquées ci-dessus, la nature des interactions entre nanoparticules colloïdales en suspension est bien connue. La connaissance des interactions intervenant pour deux particules liées est par contre limitée. Les énergies potentielles d'interactions établies précédemment l'ont été en considérant deux nanoparticules isolées en suspension [60, 61] et ne devraient pas être modifiées pour des particules liées.

Des expériences effectuées précédemment à l'Institut Langevin et présentées dans la figure 1.5 ont montré comment la distance interparticule  $d$  change avec la force ionique par mesure du couplage plasmon. Ces données spectroscopiques peuvent être traduites en valeurs moyennes de  $d$  par une calibration numérique comme discuté précédemment et présenté plus en détail dans le chapitre 3. Il est alors possible de mesurer l'évolution de la distance interparticule en fonction de la force ionique pour un dimère de particules d'or de 40 nm liées par une courte double-hélice d'ADN et avec différents ligands organiques en surface [72, 8]. De plus, ces mesures ont montré que la force ionique pour laquelle les deux particules d'un dimère sont au contact de leur couche de ligands est notablement plus élevée que la force ionique pour laquelle la suspension change de couleur [72, 8]. Il doit donc exister un potentiel d'interaction supplémentaire, lié à la présence de la double-hélice d'ADN liant les deux particules, qui empêche les particules de se séparer, favorise une distance interparticule d'équilibre et augmente le potentiel répulsif à courte distance  $d$ .

B. M. Reinhard et collaborateurs ont étudié, toujours par couplage plasmon, les fluctuations mécaniques de dimères de nanoparticules d'or de 50 nm liés par une double-hélice d'ADN et pour une force ionique raisonnable (50 mM de NaCl) comme présenté sur la figure 1.8 [12]. Leurs expériences ont démontré que de tels dimères présentaient de manière effective une énergie potentielle d'oscillateur harmonique élastique :

$$V_{dim}(d) = \frac{1}{2} k_{eff} (d - d_{eq})^2$$

avec  $k_{eff}$  la constante de raideur effective et  $d_{eq}$  la distance interparticule moyenne, qui dépendent toutes deux de la longueur de la double hélice et de la présence de parties simple-brins dans l'échafaudage. Par exemple, pour des distances  $d_{eq}$  similaires de 15 nm,

$k_{eff}$  vaut environ  $14pN/nm$  pour un brin d'ADN totalement hybridé (PR2 sur la figure : 52 paires de bases) mais descend à environ  $5pN/nm$  pour un brin d'ADN combinant parties double-brin et parties simple-brin (PR3 sur la figure : en tout 100 bases de longueur dont 40 bases sous forme de paires de bases). De plus, on observe dans le cas PR3 que le puits de potentiel n'est pas parfaitement harmonique : des interactions répulsives, autres que ce potentiel élastique, gênent les contractions du dimère de plus de 2 nm.

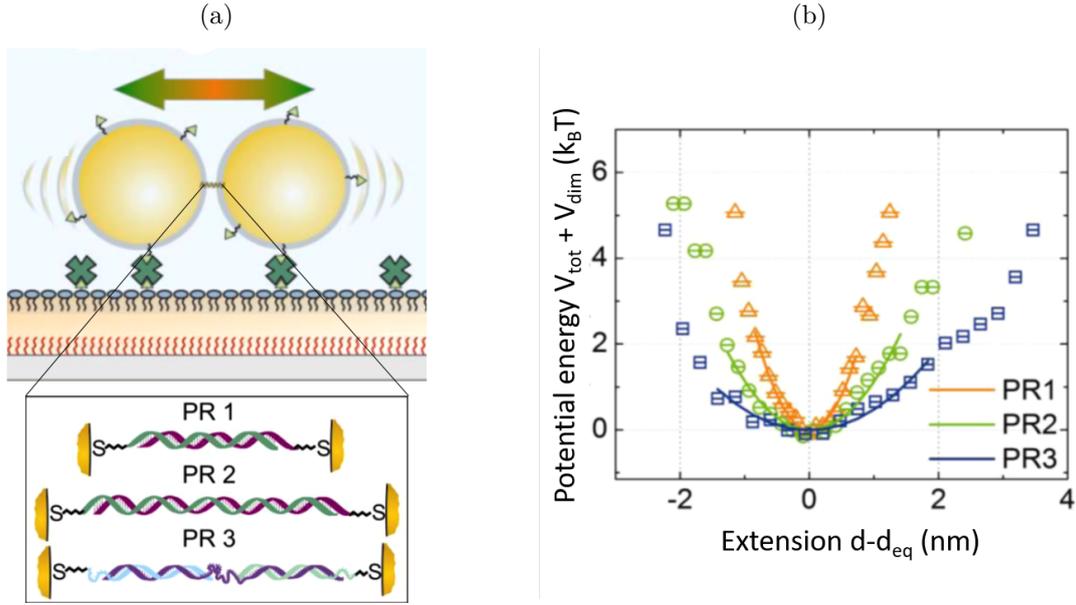


Figure 1.8: Mesure du puits de potentiel d'un dimère de nanoparticules d'or de 50 nm liées par un brin d'ADN par l'étude des fluctuations mécanique par spectroscopie de couplage plasmon, d'après [12] : schéma du système étudié (a) et puits de potentiel mesurés pour différents brins d'ADN de liaison (b).

Ces expériences montrent donc que passer du diagramme d'énergie potentielle de nanoparticules d'or colloïdales au diagramme énergétique d'un dimère auto-assemblé nécessite de considérer une interaction supplémentaire permettant d'obtenir, de manière effective, un potentiel harmonique autour d'une position d'équilibre. En analogie aux diagrammes énergétiques décrivant la morphologie d'une protéine repliée [80], on peut nommer ce diagramme d'énergie potentielle le paysage énergétique (*energy landscape*) du dimère auto-assemblé.

De manière phénoménologique, je vais donc considérer que je peux additionner un potentiel élastique aux forces d'interactions considérées précédemment pour les colloïdes en suspension. Ce potentiel élastique empêche les particules d'or de se séparer pour de grandes valeurs de  $d > d_{eq}$ , justifiant que le dimère est bien assemblé comme observé expérimentalement ; mais il ajoute également une répulsion pour  $d < d_{eq}$ , en accord avec les données expérimentales indiquant que les deux particules d'un dimère sont au contact de leur chimie de surface pour une force ionique supérieure aux particules colloïdales [72, 8].

La figure 1.9a présente l'évolution de la distance interparticule moyenne  $d_{eq}$  en fonction

de la force ionique, mesurée par L. Lermusiaux à l'Institut Langevin [8] et un diagramme d'énergie donnant une image qualitative de l'évolution du paysage énergétique d'un dimère auto-assemblé en fonction de la force ionique.

Il faut également considérer que le paysage énergétique du dimère pourrait être plus complexe avec l'existence de minima secondaires de l'énergie potentielle totale avec des barrières énergétiques entre états métastables. Par exemple, toujours dans le cas des dimères de particules d'or de 40 nm, liés par un brin d'ADN et avec un court oligomère hydrophile comme ligand de longueur  $L$ , des effets cinétiques ont été observés à forte force ionique [8] : si la distance interparticule observée au bout de quelques minutes est de l'ordre de  $2L$ , la distance mesurée après une dizaine d'heures est beaucoup plus courte et inférieure au nanomètre (à cette distance l'analyse des distances par couplage plasmon n'est plus quantitative [44, 45]).

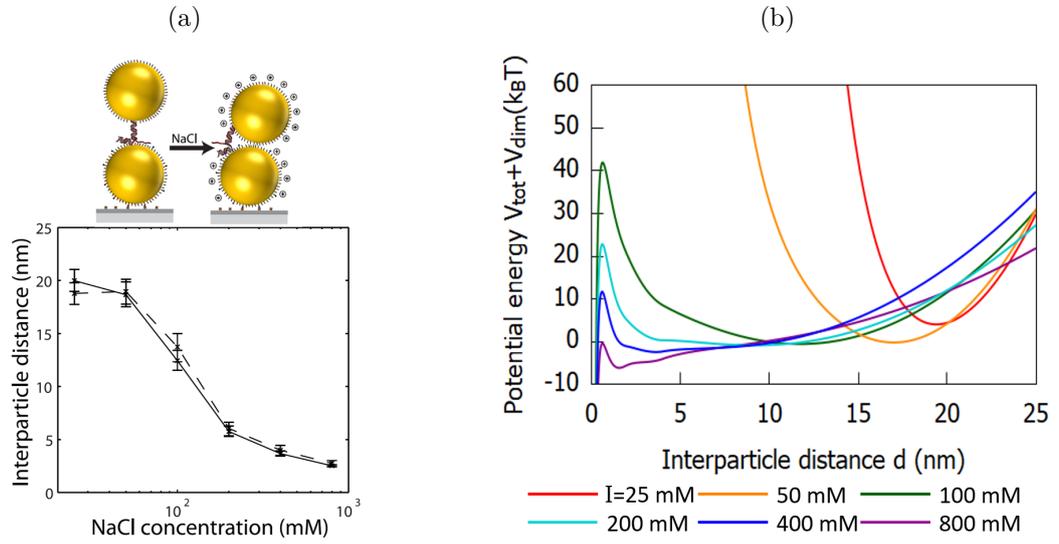


Figure 1.9: Evolution du paysage énergétique d'un dimère de nanoparticules d'or de 40 nm, stabilisées par un court ligand hydrophile et liées par ADN, en fonction de la force ionique  $I$  : (a) évolution de la distance interparticule en fonction de la force ionique mesurée dans [8] ; (b) énergies potentielles phénoménologiques  $V_{tot} + V_{dim}$  en fonction de la force ionique. La distance  $d_{eq}$  et la constante de raideur  $k_{eff}$  sont supposées diminuer quand  $I$  augmente pour prendre en compte la diminution de la longueur de persistance de l'ADN et la réorientation des particules comme représenté dans le schéma en (a).

On peut à nouveau estimer grossièrement la barrière énergétique correspondante à ce changement de conformation. Par analogie avec le cas du repliement d'une protéine [80], une cinétique d'ordre 1 peut toujours être supposée. Toutefois, dans le cas de deux particules liées, la fréquence  $f_0$  de tentative pour passer la barrière énergétique devrait être plus élevée compte tenu de l'absence de diffusion Brownienne des particules. Dans le cas d'une protéine, cette fréquence atteint  $10^6$  Hz [80]. Dans le cas de dimères autoassemblés, les mesures de fluctuations mécaniques indiquent que le dimère peut parcourir un paysage énergétique sur une hauteur de  $5 k_B T$  en quelques secondes (voir figure 1.8) [12]. Cela indiquerait plutôt une fréquence  $f_0$  de l'ordre de 100 à 1000 Hz. Avec un temps carac-

téristique de changement de conformation de plusieurs heures, cela indique une barrière énergétique de  $10 k_B T$  à  $15 k_B T$  pour l'interpénétration des ligands dans un dimère lié par ADN. A l'inverse, si un changement de conformation des dimères est observé expérimentalement en l'espace de quelques minutes, cela indique des barrières énergétiques plus proches de  $5 k_B T$  à  $10 k_B T$ . Si le changement de conformation est quasi-instantané, il est probable qu'il n'y ait pas de barrière énergétique supérieure à  $5 k_B T$ .

Il est important de rappeler que le but de cette introduction sur les propriétés physico-chimiques des particules d'or et de dimères de particules d'or auto-assemblés n'est pas de fournir des outils théoriques quantitatifs pour prédire la stabilité colloïdale des particules fonctionnalisées ou la morphologie des dimères auto-assemblés. Il s'agit surtout de définir les paramètres physico-chimiques que je vais moduler dans les expériences décrites dans ce manuscrit et qui seront discutés pour expliquer les données mesurées.

#### 1.1.4 Biocapteurs basés sur des nanoparticules d'or

Nous avons vu que les particules d'or présentent de grandes sections efficaces d'interaction avec la lumière et peuvent être stabilisées et fonctionnalisées chimiquement de manière efficace. Cela explique l'intérêt croissant des particules d'or comme sources locales de chaleur pour la photothermie en imagerie et en thérapie (grâce à leur section efficace d'absorption) [5, 1, 2, 3, 4], ou comme diffuseurs résonants en imagerie (grâce à leur section efficace de diffusion) [1]. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéressons principalement à la sensibilité de ces propriétés optiques à leur environnement et donc à la capacité des nanostructures plasmoniques à détecter optiquement, et de manière spécifique, des stimuli physico-chimiques extérieurs, en particulier la présence de biomolécules cibles (analytes).

#### Spectroscopie de résonance plasmon localisée

Nous avons vu précédemment que la polarisabilité quasi-statique d'une sphère d'or est une relation simple dépendant du contraste diélectrique entre la particule et son environnement avec une résonance pour  $Re(\epsilon_m) = -2\epsilon_1$ . Par conséquent, la longueur d'onde de résonance d'une particule dépend non seulement de ses caractéristiques propres (composition, taille, forme) mais aussi de l'indice diélectrique environnant [81, 82].

La plupart des molécules organiques possèdent un indice de réfraction supérieur à celui de la solution tampon. Par exemple l'indice utilisé pour simuler l'adsorption de protéines en surface de particule est  $n = 1,6$  [10, 83], pour un ADN simple brin  $n = 1,45$  et double brins  $n = 1,53$  [84], l'eau ayant pour rappel un indice de 1,33 environ. Ainsi, il est théoriquement possible de détecter un changement d'indice à la surface d'une particule métallique en observant le décalage spectral de sa longueur d'onde de résonance.

Ce processus est conceptuellement très proche du fonctionnement de la spectroscopie de résonance plasmon (SPR) commerciale sur film d'or métallique [85, 86] : dans ce cas, l'angle pour lequel une onde plane se couple avec un plasmon de surface à travers un prisme dépend également du contraste d'indice entre le film et une surface diélectrique. Dans le cas d'une particule seule, on parle de LSPR car on regarde une résonance plasmon localisée sur une nanoparticule. La SPR est beaucoup plus sensible que la LSPR pour mesurer une variation d'indice de réfraction (typiquement  $\delta n/n = 10^{-6}$  en SPR contre  $10^{-3}$  en LSPR). Toutefois, alors qu'un plasmon de surface est évanescent sur une centaine de nanomètres en surface du film d'or, le champ électromagnétique est exalté dans un

volume nanométrique en surface d'une particule d'or : la LSPR devrait donc permettre de détecter des quantités infinitésimales de matière organique tant que celle-ci se dépose là où le champ est exalté.

La figure 1.10 présente deux applications de la LSPR. En 2003, J. Feldmann et son équipe observent le décalage spectral avant (ligne pleine) et après (ligne pointillée) ajout d'une molécule cible à détecter (analyte) : il s'agit ici de streptavidine qui se lie de manière spécifique à la biotine placée en surface de la particule d'or (voir figure 1.10a). Il est alors possible d'observer des décalages spectraux de l'ordre de 2meV [7]. Une dizaine d'années plus tard, le groupe de C. Sönnichsen, en utilisant un nanobâtonnet d'or, a réussi à descendre la sensibilité à l'échelle d'une protéine unique [87]. Les décalage spectraux sont alors très faibles ( $< 1nm$ ). Il est important de noter que cette dernière mesure n'est pas spécifique : la surface d'or n'est pas fonctionnalisée afin de maximiser la variation d'indice optique quand les protéines se collent de manière non-spécifique à la surface. L'équipe de P. Zijlstra a également optimisé ce type de biocapteurs par LSPR en optimisant la méthodologie de mesure [88, 89] et la forme des nanoparticules [90].

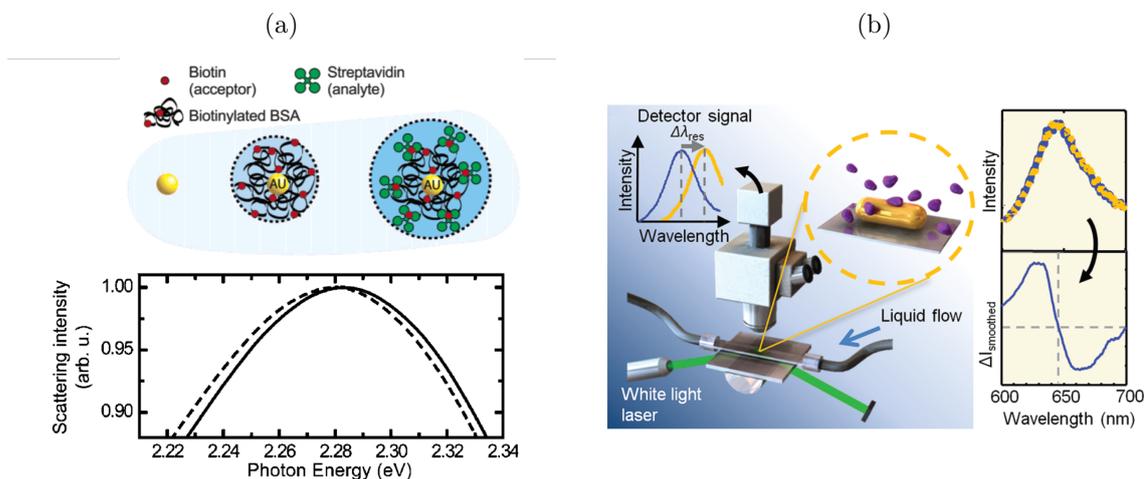


Figure 1.10: Exemples de détection de biomolécule par spectroscopie de résonance plasmon localisée (LSPR): détection de streptavidine sur nanoparticule sphérique (a, adaptée de [7]) et détection de protéine unique sur un nanobâtonnet d'or (b, adaptée de [87]).

En pratique, cette technique est potentiellement très sensible (car pouvant détecter de grosses protéines individuelles) mais présente plusieurs difficultés expérimentales intrinsèques, à la fois au niveau de la chimie de surface et de la mesure optique. En effet, il faut éviter de placer des molécules organiques en surface des particules d'or pour ne pas éloigner les molécules à détecter du volume de champ exalté ce qui rend la spécificité de la mesure difficile à assurer. La technique est très sensible à la présence de grosses protéines [88], ce qui nécessite, au contraire, une forte passivation de surface pour éviter de détecter des impuretés. Surtout, la détection optique est ardue car le décalage spectral inférieur à 1 nm nécessite une mesure très peu bruitée.

Dans le paragraphe 1.1.2, nous avons vu que le couplage plasmon permettait de traduire des déformations nanométriques en des décalages spectraux beaucoup plus élevés : de plusieurs dizaines de nanomètres. Si cette déformation morphologique est due à un unique

analyte cible, cela permettrait de développer des capteurs biochimiques de molécules individuelles avec une réponse optique aisément mesurable. C'est pourquoi, nous nous intéresserons dans cette thèse à la sensibilité des propriétés optiques de dimères de particules d'or vis-à-vis de stimuli extérieurs plutôt qu'au cas de particules seules.

### Capteurs colorimétriques

En 1996, C. Mirkin et son équipe développent les premiers capteurs colorimétriques se basant sur le couplage plasmon de particules d'or d'une dizaine de nanomètres [6, 91]. La figure 1.11a présente le principe de ces capteurs. Deux groupes différents de nanoparticules sont fonctionnalisés avec des simple brins d'ADN non-complémentaires entre eux. Les particules d'or sont stables à l'état colloïdal et n'interagissent pas : la distance entre particules est alors importante et la solution apparaît de couleur rouge (couleur complémentaire de l'absorption résonante de particules seules dans le vert). En ajoutant des brins d'ADN complémentaires aux deux séquences présentes sur les particules, leur hybridation entraîne le rapprochement des particules à une distance suffisante pour permettre le couplage plasmon et décaler la résonance vers le rouge. Cela a pour conséquence de modifier la couleur de la solution qui devient alors bleue en transmission. Cette technique présente l'avantage d'être très sensible à la structure de l'ADN cible et permet notamment de détecter des modifications d'une seule base de la séquence cible [91].

La principale limitation de cette technique réside dans la sensibilité du capteurs. Il est en effet nécessaire d'avoir une grande quantité de brins d'ADN cibles afin d'entraîner un changement optique macroscopique : une amplification par PCR est alors nécessaire. Des tests ELISA plasmoniques [92, 93] permettent d'obtenir un décalage spectral observable à l'œil nu pour de très faibles quantité d'analytes cibles. Cependant, les réactions étant catalytiques, elles sont fortement non-linéaires et peuvent donc présenter des effets de seuil, limitant leur utilisation quantitative. De plus à basse concentration en molécule cible, les cinétiques peuvent être très lentes.

Augmenter la sensibilité d'un capteur colorimétrique afin d'atteindre la molécule unique est obtenu en réduisant la taille du capteur à l'échelle d'un dimère individuel. La figure 1.11b présente la détection de l'hybridation d'un unique brin d'ADN avec un dimère de particules d'or. Tout d'abord, une particule couverte de streptavidine est immobilisée. Une seconde particule, couverte d'ADN simple brin et comportant une biotine à l'extrémité, permet la formation d'un dimère de particules d'or. Les deux images de microscopie en champ sombre permettent de visualiser les dimères (points intenses et rouges). L'hybridation avec le brin complémentaire a pour conséquence d'augmenter la distance interparticule, détectable par un décalage spectral vers le bleu du spectre de diffusion du dimère. Cependant, dans cette géométrie, les particules étant couverte d'ADN, une grande partie des brins cibles peuvent se fixer sans modifier la distance interparticule, limitant ainsi la sensibilité potentielle d'un tel capteur.

Plusieurs exemples ont alors réduit la quantité d'ADN à la surface des particules d'or afin de détecter une biomolécule unique. La figure 1.12 en montre un exemple qui, utilisant un aptamère d'ADN reconnaissant spécifiquement une protéine, a permis une détection spécifique d'une protéine unique dans un dimère de particules d'or de 30 nm par un dé-

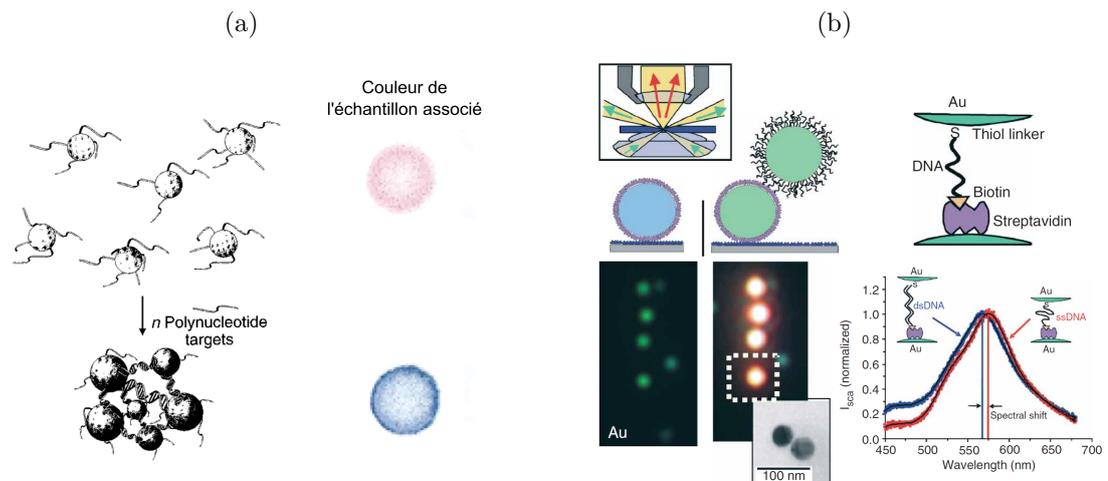


Figure 1.11: Principe du premier capteur colorimétriques basé sur le couplage plasmon de nanoparticules d'or (Adaptée de [6, 91])(a). Détection de la formation d'un double brin d'ADN par introduction d'un ADN cible par couplage plasmon d'un dimère de particules d'or (Adaptée de [9]) (b).

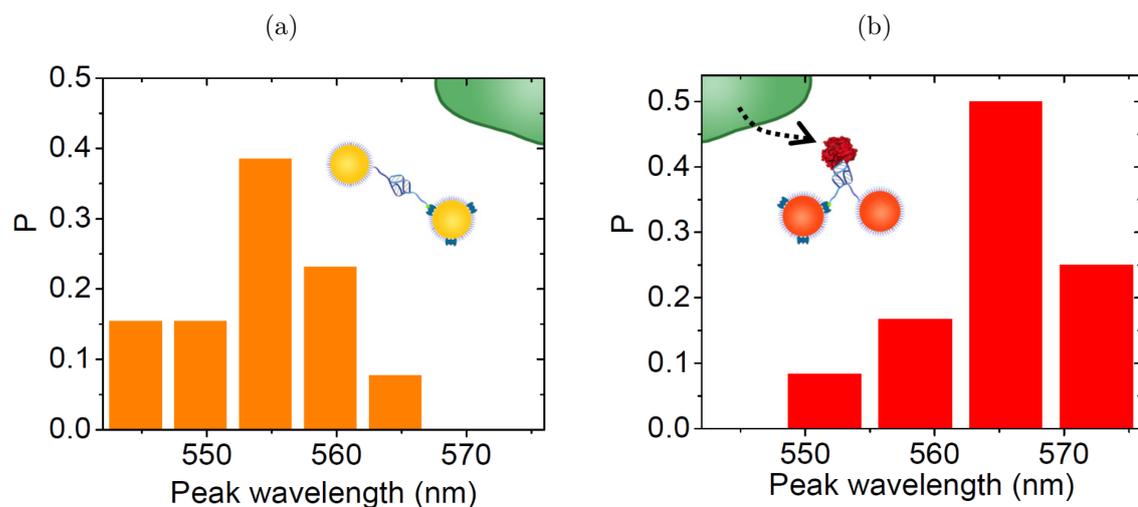


Figure 1.12: Exemple de détection colorimétrique de protéine unique sur un dimère de particules d'or de 30 nm liée par un aptamère d'ADN : distributions de longueur d'onde de résonance avant (a) et après interaction avec la molécule cible (b) (adaptée de [13]).

calage spectral de 10 nm [13]. Au cours d'une thèse précédente à l'Institut Langevin, L. Lermusiaux a réalisé des dimères de particules d'or de 40nm de diamètre liés par un double brin d'ADN [8]. L'optimisation de la synthèse des dimères a permis de n'attacher qu'un seul brin par nanoparticule. Ces mesures ont montré statistiquement qu'un décalage spectral pouvait être mesuré pour la détection d'un unique brin d'ADN mais avec d'importantes limitations expérimentales liées à l'encombrement stérique dans l'interstice entre les deux particules d'or [8]. La cinétique de réaction est lente et favorise de faux positifs liés au vieillissement des dimères de particules.

Comme discuté dans les paragraphes précédents, ces expériences ont, en tout cas, montré la sensibilité nanométrique du couplage plasmon à la distance interparticule pour des dimères uniques (figures 1.5 et 1.12). Il est donc possible de suivre une information biochimique grâce à l'observation du spectre de diffusion mais aussi par une analyse couleur obtenue sur un simple caméra couleur CCD. La sensibilité du couplage plasmon aux déformations nanométriques est telle qu'elle permet d'estimer les fluctuations mécaniques nanométriques de dimères uniques comme discuté pour la physico-chimie de dimères auto-assemblés (figure 1.8) [12]. Et ces mesures ne sont pas limitées par le photoblanchiment : le suivi des fluctuations morphologiques d'un dimère de particules d'or lié à une protéine unique a pu être effectué sur plus d'une dizaine d'heures [55].

Le but de ce projet de thèse est donc de conserver cette détection optique simple mais de délocaliser le site de reconnaissance de l'analyte hors de l'interstice nanométrique entre les particules afin d'éviter les problèmes d'encombrement stérique. L'idée est alors de complexifier la structure d'assemblage du dimère en exploitant la flexibilité des nanotechnologies ADN.

## 1.2 Nanotechnologies ADN

Les nanotechnologies ADN débutent au début des années 80. A cette époque, apparaît l'idée d'utiliser les propriétés particulières de l'ADN pour produire, par auto-assemblage, une structure cristalline 3D permettant d'organiser des protéines afin de solutionner les problèmes de cristallisation en diffraction des rayons X. Nadrian (Ned) Seeman imagine alors que l'appariement spécifique des liaisons entre les bases permettrait d'assembler de manière prédictive des structures d'ADN [94, 95] (voir figure 1.13). La décennie suivante, son équipe réalise, en suivant le même principe, une structure 3D où 6 brins qui s'auto-assemble afin de former un cube [96, 97] (voir figure 1.13). Ces structures restent de taille limitée et sont très complexes à concevoir et synthétiser. D'autres équipes commencent alors à s'intéresser à l'ADN, à investiguer sa structure particulière et ses propriétés.

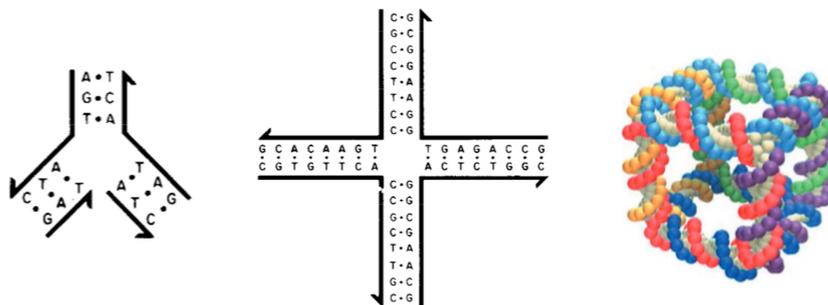


Figure 1.13: L'un des premiers exemples de nanostructure synthétique en ADN : un cube composé de 6 brins (adaptée de [94, 96]).

### 1.2.1 L'ADN : rappels sur sa structure et ses propriétés

Commençons d'abord par un bref rappel de la structure de l'ADN. L'ADN est un polymère composé d'une succession de nucléotides, composés chacun d'une base azotée, d'un dé-

soxyribose (pentose) et d'un groupe phosphate. Il existe 4 bases différentes : adénine (A), thymine (T), guanine (G) et cytosine (C). Deux simples brins peuvent s'hybrider entre eux en formant des liaisons appelées *Watson-Crick*. Dans cette configuration, l'adénine forme 2 liaisons hydrogènes avec la thymine et la guanine 3 avec la cytosine. La colonne vertébrale pentose-phosphate des brins d'ADN a un sens : une extrémité appelée 5' et une 3' compte-tenu de la position des groupements phosphate sur les carbones d'un pentose. Dans la conformation *Watson-Crick*, les deux brins d'ADN sont de sens opposés. C'est à dire que l'extrémité 5' d'un brin fait face à la 3' de l'autre. Un double brin se forme pour protéger les parties hydrophobes et optimiser l'hydrophilicité du squelette de pentose-phosphate. Pour faire cela, il adopte généralement la forme d'une hélice d'une largeur de 2 nm (voir figure 1.14a). Il faut alors 10,4 bases pour faire un tour d'hélice. Ainsi le pas entre chaque base peut être estimé à 0,34 nm.

Une double hélice d'ADN présente, de plus, une grande rigidité mécanique, caractérisée par sa longueur de persistance  $L_p^{ds}$ , grâce aux répulsions électrostatiques entre groupements phosphates de la colonne vertébrale pentose-phosphate. Cette longueur de persistance dépend donc de la force ionique locale et de la valence des ions présents : elle atteint typiquement  $\approx 100$  nm à faible force ionique et tend vers  $L_p^{ds} \approx 45$  nm en présence de fortes concentrations d'ions monovalents ou de concentrations modérées d'ions divalents [98].

Au contraire, un ADN simple brin est plus flexible [99] et se met en pelote afin de minimiser les interactions entre ses parties hydrophobes et la solution aqueuse dans laquelle il se trouve. Différentes valeurs ont été reportées dans la littérature pour la longueur de persistance d'un simple brin d'ADN et pour la distance typique entre nucléotides :  $L_p^{ss}$  est de l'ordre de 1 à 6 nm (et diminue également avec la force ionique) tandis que la distance entre bases est de l'ordre de 0,43 nm à 0,68 nm [100, 101, 102]. Dans le cas de courts oligomères de thymine, que nous utilisons dans ce manuscrit, une valeur intermédiaire de 0,55 nm a été estimée expérimentalement [101] et je l'utiliserai par la suite. Connaissant la longueur de persistance et la longueur d'un brin d'ADN simple ou double (*contour length*), il est alors possible d'estimer la distribution de distances entre ses extrémités en utilisant un modèle de polymère semi-flexible (*worm-like chain*) [103].

Un ADN simple-brin peut également former des liaisons *Watson-Crick* au sein de sa propre séquence et former des structures secondaires comme, par exemple, des conformations appelées *hairpin* (tige-boucle ou épingle à cheveux, en français). Ces structures secondaires de l'ADN sont à la base du développement de nombreux systèmes des nanotechnologies ADN.

Le développement de l'ADN synthétique, ainsi que la possibilité de fonctionnaliser chimiquement les extrémités de l'ADN avec de nombreuses molécules telles des fluorophores, facilitent l'étude conformationnelle de structures d'ADN. Ainsi, en 1996, S. Tyagi et F. R. Kramer proposent une structure, appelée *Molecular Beacon*, se composant d'un simple brin comportant à chaque extrémité un fluorophore et dans sa séquence un *hairpin* (voir figure 1.14b) [20]. Un des fluorophores est qualifié de *quencher* (extincteur, en français) : il permet à faible distance, par transfert d'énergie de type FRET, d'éteindre l'émission de l'autre fluorophore. Ainsi, lorsque l'*hairpin* est formé, on ne mesure pas de signal de fluorescence. Lors de l'ajout d'un second brin (brin cible) dont la séquence permet l'hybridation avec le premier et l'ouverture de l'*hairpin*, les deux molécules s'éloignent : la fluorescence n'est alors plus inhibée et peut être détectée. Cet objet est l'un des premiers exemples d'actuateur moléculaire conçu pour détecter une biomolécule spécifique.

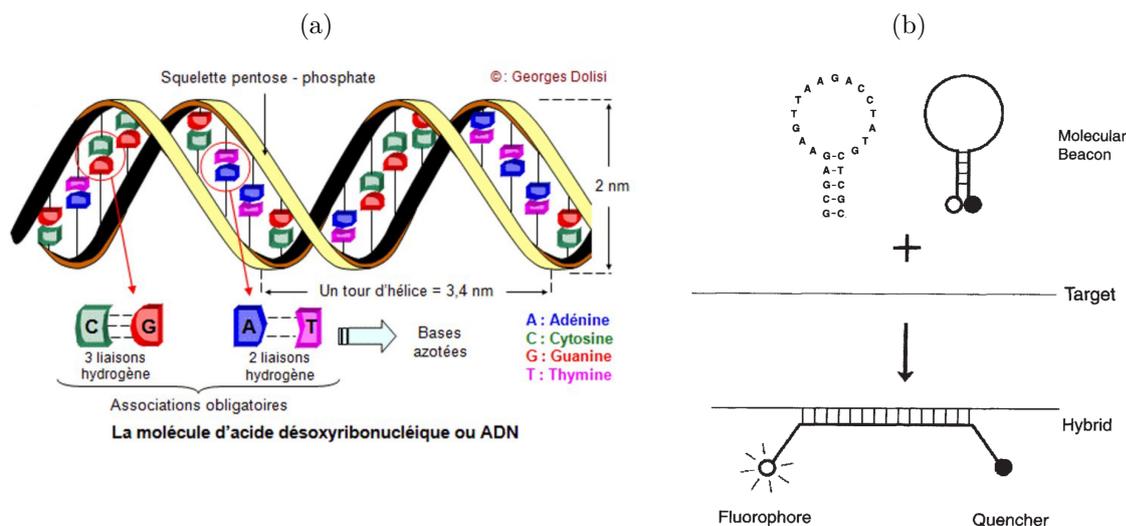


Figure 1.14: (a) Visualisation d'une double hélice d'ADN. (b) Premier exemple de brin d'ADN synthétique dynamique : un *Molecular Beacon* détectant un brin d'ADN cible par FRET [20].

Il est alors possible de concevoir des biocapteurs à ADN pour une séquence cible, dont la réponse peut être modulée par l'introduction d'un activateur ou d'un inhibiteur [104].

De ce simple principe, il est alors possible de concevoir des systèmes de réactions plus ou moins complexes, tel que la réaction de *strand displacement*. La figure 1.15a présente le principe de cette réaction. Deux brins partiellement hybridés l'un avec l'autre (brins orange et bleu) sont mis à incuber avec un troisième brin (brin vert). Ce troisième brin va alors s'hybrider avec la partie du sumples-brin contenant la séquence complémentaire (partie n°3 des brins orange et vert). La séquence restante du troisième brin entre alors en compétition avec l'hybridation partielle initiale. Le troisième brin présentant un nombre de bases d'hybridation plus important que le premier, l'équilibre thermodynamique évolue à son avantage et permet la libération d'un brin initial (brin bleu) partiellement hybridé. A partir de cette réaction simple, il est alors possible d'en concevoir des beaucoup plus complexes, comme présenté dans la figure 1.15b [21]. Cette réaction cyclique permet de passer d'une structure ouverte à fermée par simple ajout de brins spécifiques et ce de manière répétée. Le développement de ces réactions dynamiques, à partir d'ADN synthétique, a également permis la réalisation d'oscillateurs biomimétiques [105, 106] afin d'imiter et de contrôler des réactions biochimiques complexes observées chez les organismes vivants.

En 2002, il a également été mis en évidence que certaines séquences d'ADN sont capables, par un changement de conformation, de se lier spécifiquement à une molécule cible (analyte) [23]. Ces séquences sont appelés aptamères. La détermination de ces séquences se fait généralement par méthode SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*). Cette méthode *in vitro* se compose de phases successives de sélection, amplification et mutation de séquences aléatoires d'oligonucléotides de synthèse. Il a été, par exemple, possible de déterminer par cette méthode, la séquence d'un aptamère spéci-

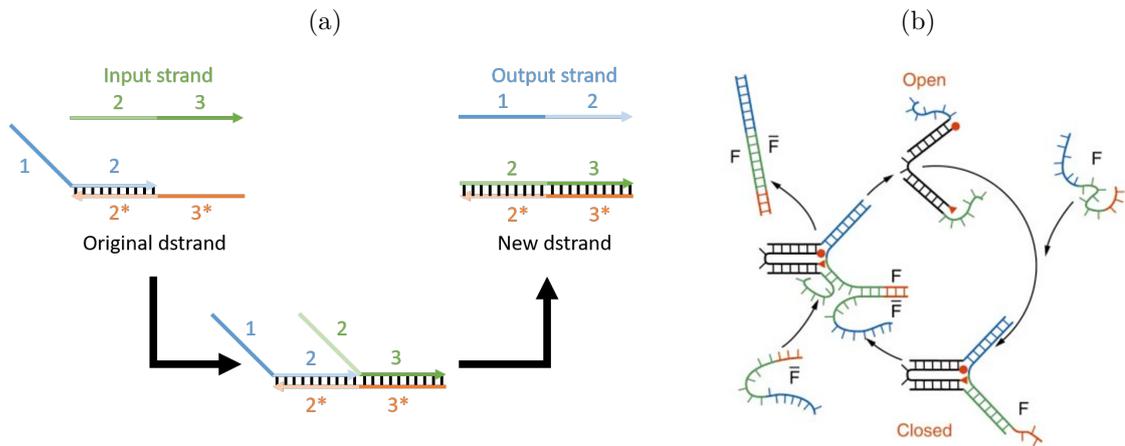


Figure 1.15: Principe de la réaction de strand displacement (a) et exemple d'utilisation pour une structure d'ADN dynamique (b, adaptée de [21]).

fique à la protéine MPT64, protéine sécrétée par la bactérie responsable de la tuberculose [107]. Une fois l'aptamère défini, il est possible de concevoir un biocapteur. La figure 1.16 présente un exemple d'utilisation d'un aptamère de cocaïne [108]. La détection de la molécule se fait par la suite par mesure de fluorescence. Il existe bien d'autres aptamères : par exemple, pour la détection d'ions métalliques lourds ( $Ag^+$  et  $Hg^{2+}$ ) [109]. Enfin d'autres structures secondaires d'ADN, sensibles à des cations spécifiques, ont été observées *in-vivo*. C'est le cas pour l'i-motif sensible à des variations de pH (qui est utilisé au cours de cette thèse et vous sera présenté dans le chapitre 5) ou des complexes de guanine (*G-quadruplex*) stabilisés par des ions potassium. Il est également possible de détecter des variations de pH grâce à la formation d'un triplex d'ADN à pH acide [110]. Nous avons vu que l'ADN peut former des liaisons *Watson-Crick* (–) mais il existe d'autres types d'association des bases d'ADN tels que les liaisons *Hoogsteen* (\*) qui, à bas pH, forment des complexes  $T - A * T$  et  $C - G * C^+$ .

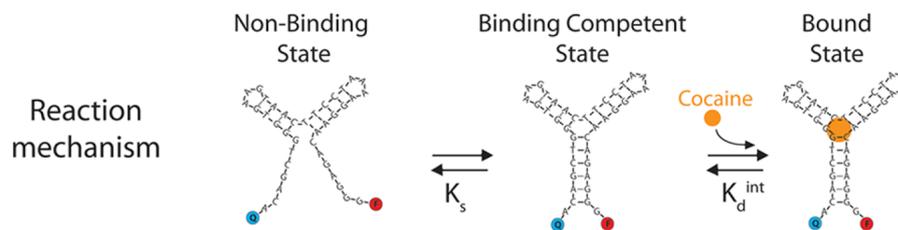


Figure 1.16: Exemple de biocapteur basé sur un aptamère d'ADN (adaptée de [108])

La plupart des biocapteurs à ADN que nous avons cités dans cette partie se basent sur une détection par fluorescence, réalisée généralement par des mesures d'ensemble. Il est en effet complexe d'arriver à mesurer à l'échelle de la structure unique de la fluorescence. Certaines techniques existent, telles que le *single molecule FRET* (*smFRET*) développé pour la première fois en 1996 [111] mais elle nécessite des détecteurs de haute sensibilité

et le signal n'est pas photostable (typiquement quelques secondes). Enfin j'ai déjà été évoqué précédemment les avantages de l'utilisation du couplage plasmon par rapport au FRET : intensité du signal optique et capacité à fournir une information morphologique sur une plus grande plage de distances.

### 1.2.2 Nanostructures or - ADN

Il est possible d'associer l'ADN avec différents types de particules nanométriques ou micrométriques, inorganiques [112] ou non [113] mais au cours de cette thèse je n'ai utilisé que des nanoparticules d'or : je me concentrerai donc dans cette introduction à ce type de particules.

Nous avons vu précédemment plusieurs structures associant nanoparticules d'or et ADN : figures 1.5, 1.8, 1.11a, 1.11b et 1.12 [6, 9, 13, 8, 12]. Ainsi, nous avons vu une structure basée sur la détection d'un ADN cible par hybridation avec des ADN de surfaces couvrant des particules d'or [6, 9, 114]. Nous avons aussi vu un système utilisant un aptamère afin de permettre la détection d'une protéine sécrétée par les glandes mammaire [13]. Une autre équipe a également combiné deux petites particules d'or (5nm de diamètre) avec un aptamère d'ATP [115]. Finalement je vous ai présenté les travaux effectués par un ancien étudiant de l'Institut Langevin synthétisant des dimères de nanoparticules d'or lié par un double brin d'ADN [72, 8]. Au cours de sa thèse, il a également conçu des dimères de particules de 8nm de diamètre permettant la modulation active de la distance interparticule grâce à une réaction de *strand-displacement* [116]. La figure 1.17 présente le principe de réaction de ce système. Les deux particules sont liées par un simple brin d'ADN comportant un *hairpin* réduisant l'espace interparticule. Par ajout du brin complémentaire, il est possible d'écarter les deux particules. Ce brin complémentaire étant plus long que le brin liant le dimère, il est ensuite possible de l'enlever avec un troisième brin et ainsi retourner à un dimère serré : il s'agit donc d'un exemple d'actuateur hybride nanométrique répondant à une séquence d'ADN cible. Le succès des différentes réactions est suivi grâce à des images en microscopie électronique et par électrophorèse : les particules ne sont pas assez grosses pour permettre une analyse optique.

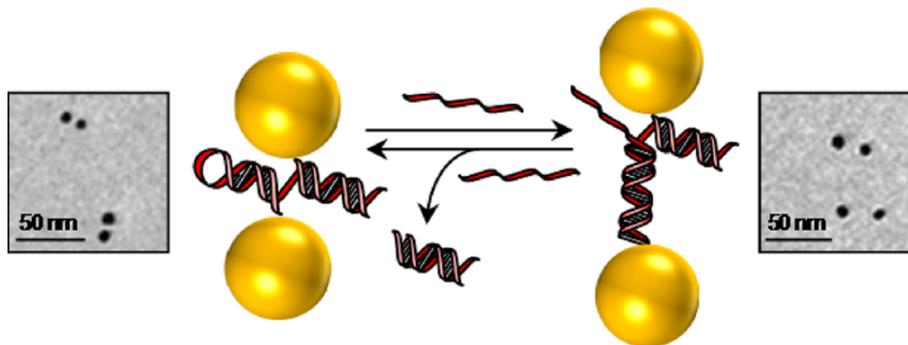


Figure 1.17: Dimère dynamique de nanoparticules d'or basé sur un hairpin d'ADN contrôlé par une réaction de strand displacement (adaptée de [116]).

Il a alors été tenté de réaliser le même type de réaction avec des particules de 40nm de diamètres, offrant une bien meilleure réponse optique comme déjà discuté. Malheureusement-

ment comme déjà évoqué, l'encombrement stérique dû à la présence de la chimie de surface a rendu difficile la détection de la réaction de *strand-displacement* [8]. Il est donc nécessaire de modifier en profondeur la structure de ses objets : par exemple, en externalisant le site de réaction suffisamment loin des particules. La complexification des structures ADN a été rendu possible grâce au développement de structures appelées d'ADN plus complexes, les origamis d'ADN.

### 1.2.3 Origamis 2D / 3D

Dès 1991, Ned Seeman propose une structure 3D d'ADN (voir figure 1.13) [96]. Dans les années qui suivent, d'autres équipes proposent des structures tétraédrique [117] ou octaédrique [118] dont la programmation des séquences est d'une grande complexité. La conception de nano-objets synthétiques en ADN prend une autre dimension quand, en 2006, Paul Rothemund, propose un principe de synthèse, à grande échelle et très flexible, de structures d'ADN nommées **origamis d'ADN** [14]. Ces structures 2D peuvent alors atteindre une taille d'une centaine de nanomètres. La figure 1.18 montre schématiquement le principe de synthèse. Un long ADN viral simple brin (M13mp18 ; 7249 nucléotides), appelé *Scaffold* et de séquence connue, permet l'ingénierie de centaines de brins courts complémentaires considérés comme des agrafes moléculaires et appelés *Staple strands*. Chaque *Staple strand* est complémentaire avec plusieurs zones du *Scaffold* afin de forcer ce dernier à se replier sur lui-même. On obtient ainsi une superposition de double hélices (*Helix Bundle*, HB) d'ADN qui forme la structure 2D. La rigidité de la structure des origamis vient du fait qu'il existe de nombreux croisements (*crossover*) entre les différentes lignes de double brins. Pour avoir une structure, 2D il est nécessaire que tous ces croisements s'effectuent dans le même plan. Il est alors possible de concevoir des formes complexes telles que des triangles, des étoiles et des *smiley faces* (voir figure 1.19).

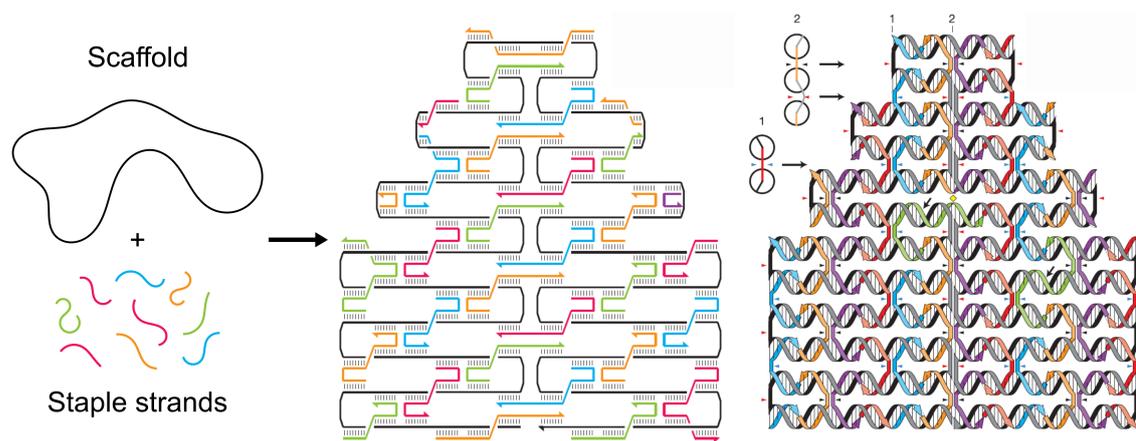


Figure 1.18: Principe de repliement d'un origami 2D d'ADN (adaptée de [14]).

L'auto-assemblage de milliers de bases nécessite des conditions de synthèse particulières. Après avoir mélangé le *Scaffold* et les *Staple strands* (mis en excès), ils sont incubés à 95°C. Cette haute température permet de rompre toutes les liaisons hydrogènes formées entre les nucléotides d'un même brin d'ADN. La température est ensuite très lentement

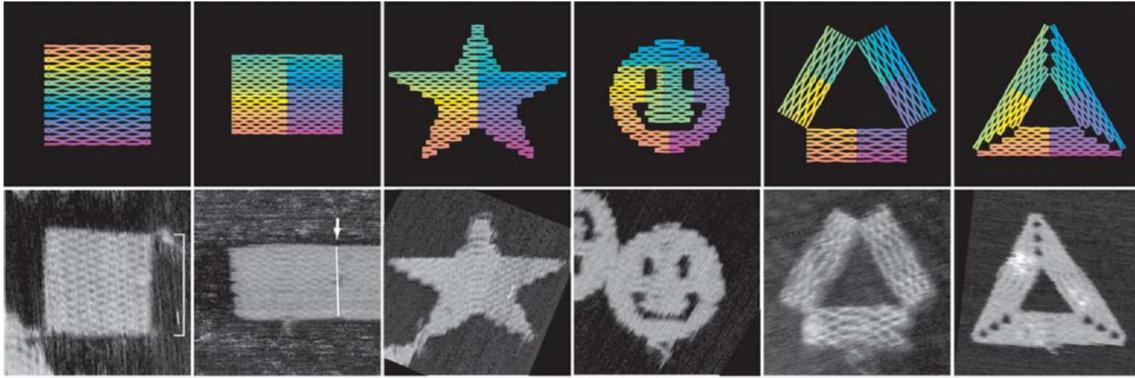


Figure 1.19: Exemples d'origamis 2D d'ADN imagés par microscopie à force atomique (adaptée de [14]).

diminuée jusqu'à la température ambiante afin de favoriser le complexe d'ADN le plus stable thermodynamiquement (donc présentant le maximum de nucléotides appariés) et ainsi éviter des états métastables (*kinetic traps*) correspondant à des origamis d'ADN partiellement hybridés. En analogie à des processus similaires dans la formation des structures 3D de protéines, on peut considérer cette étape comme le repliement de l'origami (*foldng*) qui doit être optimisé pour éviter des structures mal repliées (*misfolded*). Il est également essentiel d'optimiser la concentration de magnésium dans la solution. En effet, ces ions permettent, par l'écrantage des charges négatives de l'ADN, de diminuer la répulsion entre les différents brins d'ADN et ainsi permettre sa compaction en un origami parfaitement replié. La cinétique et la thermodynamique associées au repliement des origamis d'ADN ont été étudiées dans différentes études expérimentales et théoriques [119, 120, 121, 122].

La conception de structures 3D a été développée suivant deux méthodes : la première en modifiant l'angle de position des croisements ; la seconde en assemblant plusieurs origamis 2D par l'intermédiaire de brins complémentaires [17, 18, 19]. La première stratégie, développée par William Shih et son équipe, est basée sur la modulation de l'angle relatif aux croisements. Ainsi, en faisant varier l'angle de  $\pm 120^\circ$ , il est possible d'assembler les doubles hélices non plus sur le même plan mais en nid d'abeilles ; ce qui permet d'obtenir une structure 3D (voir figure 1.20)[16]. De plus, il est possible, par insertion ou soustraction de bases, de former une courbure au sein de la structure (voir figure 1.21)[15].

Nous avons vu qu'il est possible de concevoir des formes très complexes et variées, mesurant au maximum quelques centaines de nanomètres. Il est à présent intéressant de fonctionnaliser ces nanostructures organique afin de leur adjoindre des propriétés physico-chimiques supplémentaires. Pour cela, l'ADN présente de nombreux avantages. Comme discuté précédemment, le développement des biotechnologies, en particulier la production industrielle d'ADN synthétique, signifie qu'il est à présent aisé d'obtenir des brins d'ADN avec une grande variété de molécules à leurs extrémités mais également au milieu de la séquence. De plus, il est important de noter que la position de chaque nucléotide est connue précisément dans un origami d'ADN et que la distance typique entre deux bases d'une même double hélice (en considérant la forme classique d'une double hélice d'ADN) est d'un tiers de nanomètre. Ces structures permettent donc un contrôle morphologique de

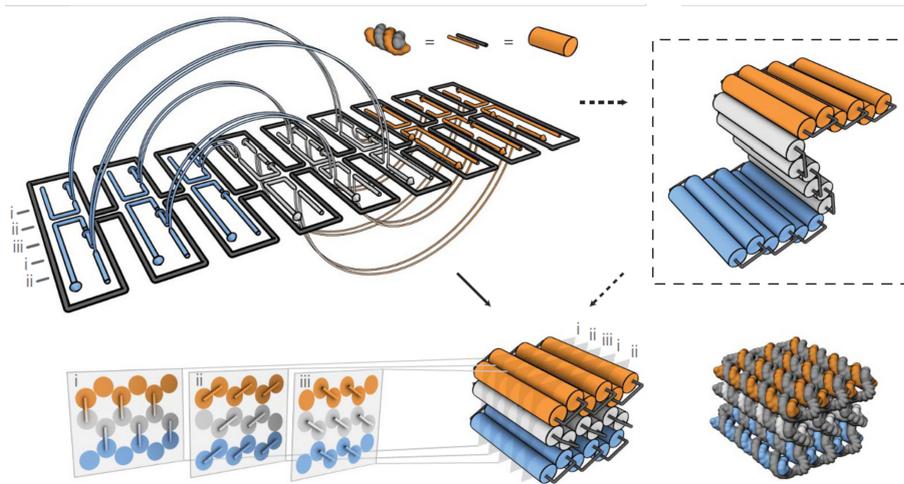


Figure 1.20: Principe de repliement d'un origami 3D d'ADN (adaptée de [16])

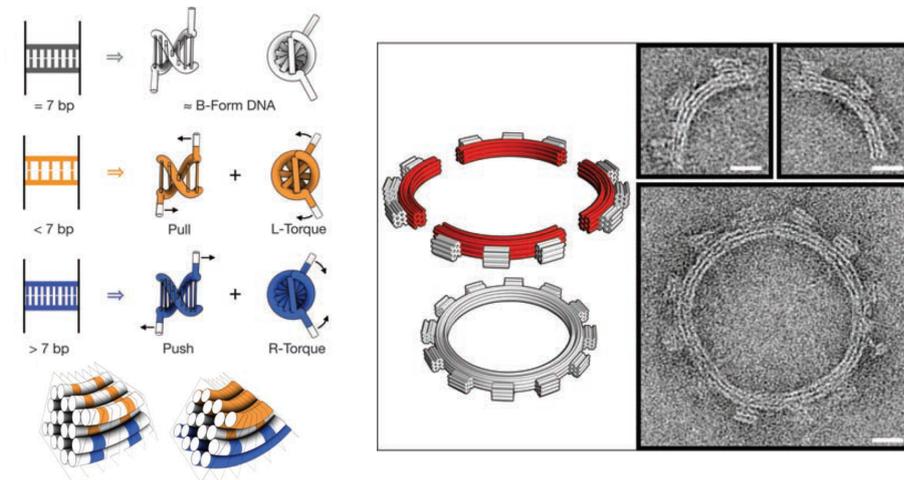


Figure 1.21: Exemple d'origamis 3D d'ADN courbés, imagés par microscopie électronique (adaptée de [15]).

la nanostructure organique formée avec une résolution théorique inférieure au nanomètre, offrant des champs d'applications très larges. Il a ainsi été montré par FRET qu'il était possible de positionner des molécules organiques fluorescentes dans un origami avec une résolution très inférieure au nanomètre [123].

Ce contrôle des distances est, par exemple, un outil utile dans le développement d'imageries super-résolues [124, 125, 126] : cette application est la première utilisation commerciale des origamis d'ADN par des compagnies telles que *Leica microsystems*. Cela a également servi de preuve de principe pour la technique du *DNA-PAINT*, développée par Ralph Jungmann (voir figure 1.22) [127]. Pour cela des ADN simple brins sont fonctionnalisés avec des molécules fluorescentes et un origami d'ADN est conçu pour présenter à sa surface les séquences complémentaires aux séquences contenant le fluorophore. Ces séquences sont conçues afin de permettre une interaction transitoire. Enfin, les fluorophores non-hybridés sont partiellement éteints, il est ainsi possible de reconstruire une image d'un

origami d'ADN avec une résolution de l'ordre de la dizaine de nanomètre. De nombreux fluorophores différents pouvant être liés à l'ADN, il est également possible de réaliser du multiplexage (voir figure 1.22).

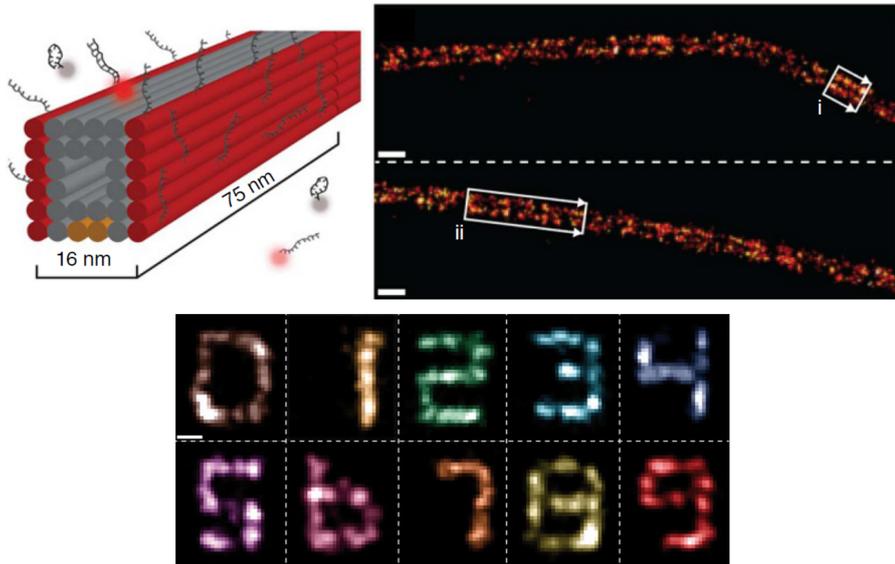


Figure 1.22: Imagerie super-résolue d'origamis d'ADN (adaptée de [127])

#### 1.2.4 Origamis dynamiques

Je vous ai donc expliqué comment l'ADN pouvait donc être, à la fois, façonné dans des formes très complexes, programmé pour effectuer des réactions biochimiques élaborées ou changer de conformation en présence d'un stimulus physico-chimique particulier (molécule cible, variation de pH, cation potassium...). Des équipes ont alors eu l'idée de combiner toutes ces propriétés afin de concevoir des nano-objets dynamiques grâce aux origamis d'ADN. En effet, l'ADN restant une structure flexible, il est possible d'inclure au sein des origamis des zones moins rigides fournissant une flexibilité mécanique à la structure.

La figure 1.23 présente un origami capable de changer de conformation en présence d'ions potassium, de petites protéines ou de micro-ARN. Cet actuateur nanométrique présente deux sites de réactions, à deux coins opposés. La présence ou l'absence de la molécule d'intérêt entraîne une modification de la conformation de l'origami révélé par un couple de fluorophores en FRET. Cette est issue des travaux de Gaëtan Bellot du Centre de Biologie Structurale de Montpellier en collaboration avec qui nous avons conçu mon projet de thèse.

Finalement, plusieurs équipes ont conçu des origamis en forme de boîte afin de libérer une molécule uniquement dans certaines conditions (voir figure 1.24). Dans le premier cas, la boîte s'ouvre par réaction de *strand displacement* (figure 1.24a) [128]. Dans le second, elle s'ouvre lorsque la molécule d'intérêt de l'aptamère (brin bleu, initialement hybridé avec un autre brin) est présente (figure 1.24b) [129].

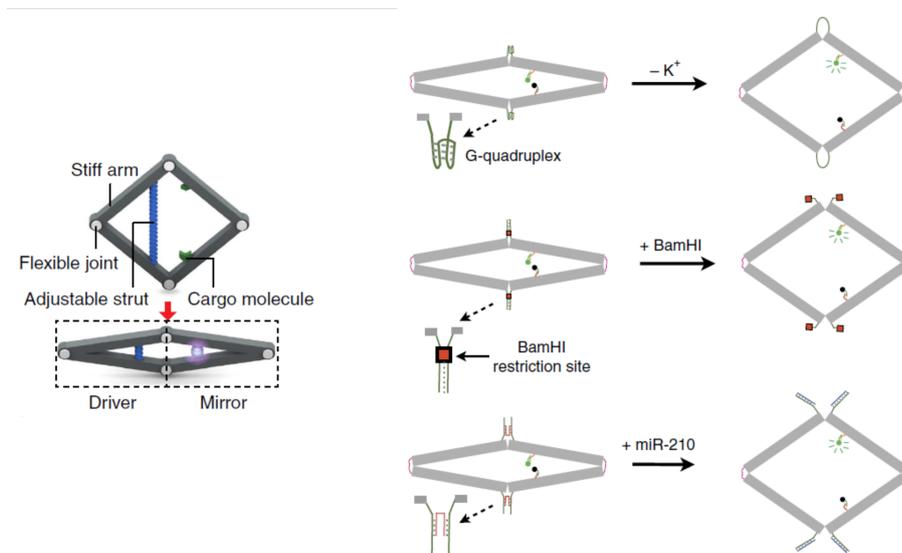


Figure 1.23: Exemple d'origami d'ADN dynamique répondant à différents stimuli chimiques (adaptée de [25]).

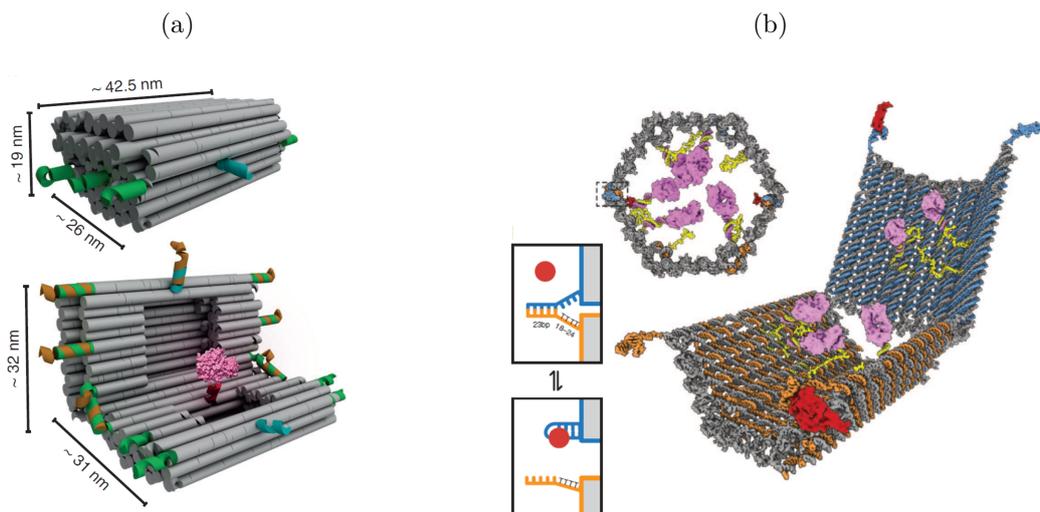


Figure 1.24: Exemples de boîtes 3D d'ADN dynamiques s'ouvrant en présence de stimuli chimiques spécifiques (adaptées de [128] et [129]).

### 1.2.5 Nanostructures hybrides or - origamis d'ADN

Nous avons vu précédemment qu'il était possible de concevoir des nanostructures hybrides particules d'or - ADN avec des échafaudages d'ADN assez simples : il est évidemment possible d'étendre cette approche à des origamis d'ADN [130, 131, 47, 48, 49, 50, 26]. Nous verrons cependant, au cours de cette thèse, que fonctionnaliser des origamis d'ADN avec des particules d'or de plus de 20 nm de diamètre demande une optimisation de leur chimie de surface. En effet, l'utilisation d'origamis avec des particules d'or pose quelques problèmes de stabilité colloïdale qui seront détaillés dans le chapitre 2.

Quelques exemples d'assemblages de particules d'or de plus de 40 nm ont été publiés [132, 133, 134, 135, 52]. Par exemple, la figure 1.25a présente une nanostructure hybride or-origami d'ADN développée pour exalter la fluorescence d'une molécule individuelle [132]. Un deuxième exemple de ce type d'assemblage est visible en microscopie électronique sur la figure 1.25b : un dimère de particules d'or est assemblé de part et d'autre d'un origami rectangulaire [133]. L'utilisation de grosses particules d'or (diamètre  $\geq 40\text{nm}$ ) assemblées en dimère permet de réaliser de la spectroscopie de résonance plasmon à l'échelle de la structure unique [134] (voir 1.25c). Au delà de l'assemblage de dimères sur des origamis d'ADN, un exemple d'assemblage de 4 particules d'or de 40 nm a permis, en particulier, de produire un dipôle magnétique induit aux fréquences optiques [52].

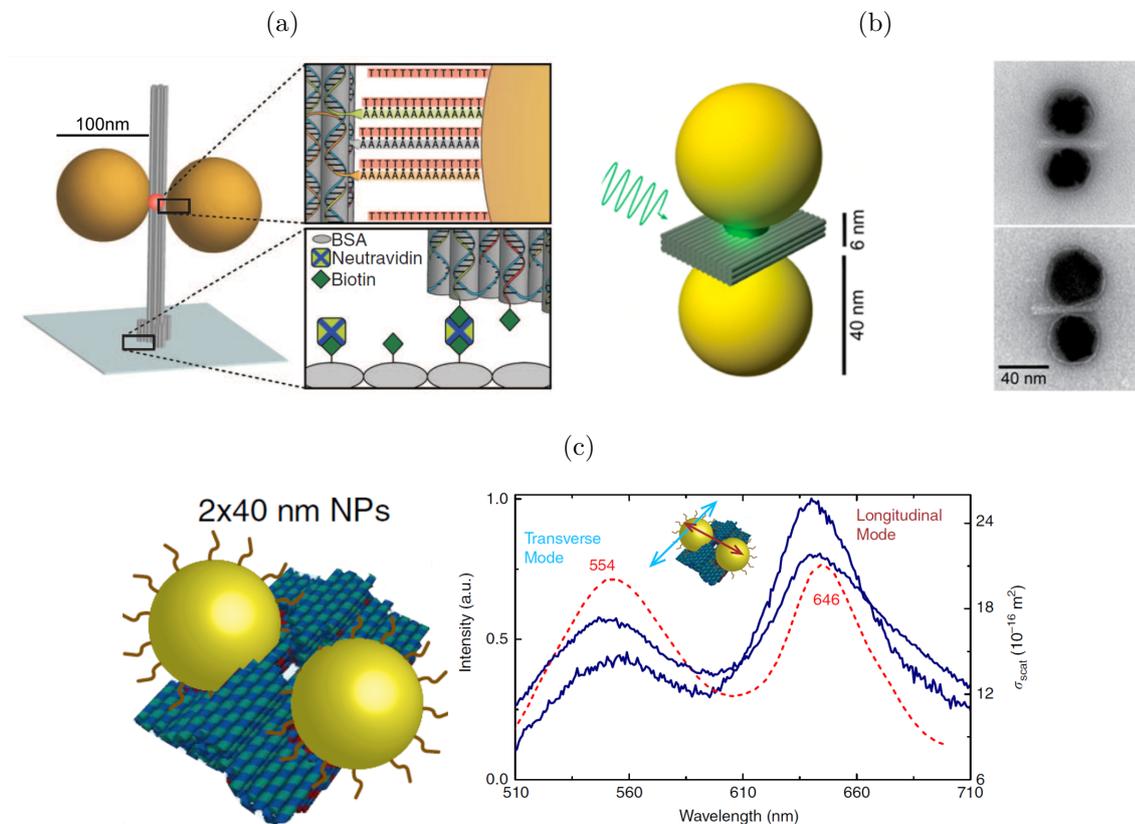


Figure 1.25: Exemples de nanostructures hybrides or-origamis d'ADN produites avec des particules d'or d'au moins 40 nm de diamètre (adaptées de [132], [133] et [134]).

Les systèmes hybrides or-origamis d'ADN peuvent également être programmés pour répondre de manière dynamique à des stimuli physico-chimiques. En particulier, le groupe de Laura Na liu propose une structure d'origami dynamique très versatile, pouvant être sensible à l'ajout de brins d'ADN spécifiques [24], à une exposition UV [136] ou à une variation de pH [137]. En pratique, l'assemblage d'un dimère de nanobâtonnets d'or sur l'origami permet une détection de ces changements de conformation grâce à une mesure d'ensemble par dichroïsme circulaire (voir figure 1.26) [26]. Ainsi, cette structure regroupe

une importante partie des fonctionnalités permises par l'ADN et présentées jusqu'à présent dans ce manuscrit. Cependant ces nanostructures hybrides ne permettent pas d'étude des propriétés optiques à l'échelle de la structure unique à cause de la petite taille des nanobâtonnets et d'un signal de dichroïsme circulaire faible.

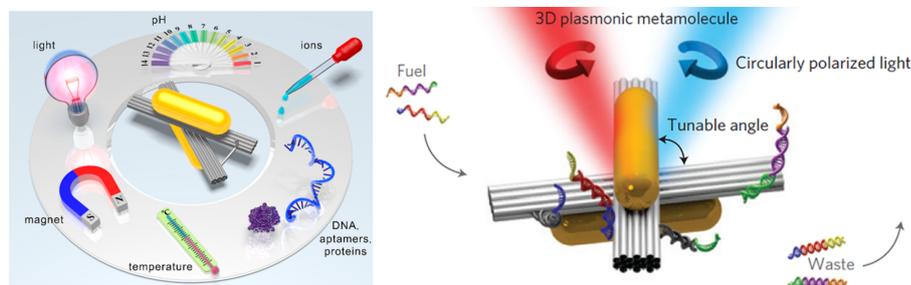


Figure 1.26: Exemple de nanostructures hybrides dynamiques or-origamis d'ADN permettant de détecter de nombreux stimuli physico-chimiques par des mesures d'ensemble de dichroïsme circulaire (adaptées de [26] et [24]).

### 1.3 Problématiques de cette thèse

Ainsi nous avons vu que les nanoparticules d'or et les nanostructures en ADN synthétiques ont des propriétés optiques et/ou physico-chimiques exceptionnelles qui ont permis, en particulier, le développement de (bio)capteurs en programmant leur sensibilité à des stimuli physico-chimiques spécifiques. Dans le cas des nanoparticules d'or, il est ainsi possible de détecter une protéine unique par LSPR ; au prix d'une mesure spectrale très complexe associée à des décalages de résonance plasmon inférieurs à 1 nm. Nous avons également vu qu'il est possible d'augmenter ces décalages spectraux en exploitant le couplage plasmon entre deux nanoparticules d'or. Cela permet une détection à l'œil nu (colorimétrie) dont la sensibilité peut également descendre à la molécule individuelle avec un montage optique relativement simple (tant que les particules ont un diamètre supérieur à 40 nm). En développant des nano-actuateurs basés sur des dimères de particules d'or, il devrait donc être possible de créer des nanostructures hybrides sensibles à des stimuli physicochimiques. Encore faut-il pouvoir traduire ce stimulus en un changement de la distance interparticule. Comme ces distances doivent être inférieures aux rayons des particules (pour permettre le couplage plasmon) et que les particules doivent être couvertes de ligand organiques (pour leur stabilité colloïdale), l'espace disponible entre les deux particules d'un dimère est particulièrement limité. Il y a fort encombrement stérique. L'idée de cette thèse est donc d'exploiter des origamis d'ADN dynamiques afin résoudre ces difficultés.

En effet, nous avons vu qu'il est possible de concevoir des nanostructures dynamiques dont la taille est similaire à une particule d'or de 40 nm. L'ADN synthétique offre, de plus, une grande flexibilité pour créer des structures sensibles à différents stimuli physicochimiques. Par sa nature même qui lui permet de reconnaître une séquence complémentaire par hybridation mais, également, grâce au développement des aptamères, dont la conformation change en interagissant avec des molécules ou cations spécifiques. En pratique, beaucoup de bio-capteurs ADN sont basés sur l'utilisation de fluorophores comme signal de détection. Malheureusement, les fluorophores présentent l'inconvénient de présenter

une section efficace d'absorption très faible ce qui complique la détection à faible concentration. De plus, ils photo-blanchissent en quelques seconde ce qui limite fortement un suivi temporel à l'échelle de l'objet unique. Heureusement, nous avons vu qu'il était possible d'assembler des dimères de grosses particules d'or sur des origamis d'ADN afin d'en étudier les résonances plasmon à l'échelle de l'objet unique. De plus, une équipe a déjà démontré une structure d'origami d'ADN dynamique, combinée avec des nanobâtonnets d'or, pour détecter optiquement un large éventail de stimuli différents (brins d'ADN, ions ou même lumière UV). Cependant, dans ce cas, la sensibilité reste limitée car des mesures à l'échelle de l'objet unique sont impossibles.

Nous avons donc choisi de concevoir une structure en origami d'ADN dynamique permettant l'auto-assemblage d'un dimère de particules d'or d'au moins 40 nm de diamètre. Le site actif doit être facilement accessible (donc ne pas être entre les particules d'or) et simplement adaptable pour détecter différents stimuli. Ce stimulus doit entraîner un changement de distance entre les particules d'or suffisant afin de pouvoir la détecter optiquement grâce au couplage plasmon. La figure 1.27 présente le principe de détection conçu pour cette thèse.

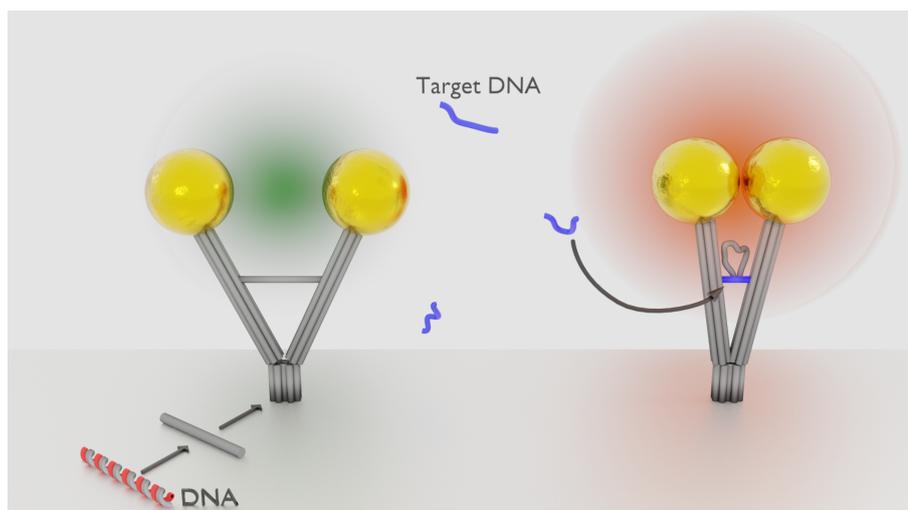


Figure 1.27: Représentation schématique des nanostructures hybrides dynamiques développées au cours de cette thèse. Un origami d'ADN est associé à deux nanoparticules d'or et peut changer de conformation en présence d'un stimulus (ici une séquence d'ADN spécifique) : ce changement de conformation est associé à un changement de distance interparticule qui se traduit par un décalage spectral vers le rouge de la résonance plasmon.

Au cours de ce manuscrit, je vous présenterai le design choisi pour notre origami et sa synthèse. Puis nous verrons le protocole de synthèse nécessaire à l'obtention de dimères hybrides or-origamis d'ADN. Nous nous intéresserons, par la suite, à la spectroscopie de dimères uniques : en discutant de l'amélioration de la dispersion spectrale par l'utilisation de particules monodisperses ; du choix des paramètres afin d'établir la meilleure relation entre la longueur d'onde de résonance et la distance interparticule ; et d'un nouveau protocole d'analyse optique basé uniquement sur une caméra couleur. Enfin deux types

de stimuli physico-chimiques seront étudiés avec ces dimères hybrides or-origami. Tout d'abord, une réaction de *strand-displacement* pour modifier l'angle entre les deux bras de l'origami comme représenté sur la figure 1.27. En particulier, nous avons soumis différentes nanostructures hybrides à des variations de forces ioniques afin d'observer leur différence de rigidité. Enfin, je vous présenterai les résultats obtenus en utilisant un origami dont la conformation est sensible au pH.



## Chapitre 2

# Synthèse des dimères hybrides AuNPs/Origamis d'ADN

### Sommaire

---

<b>2.1</b>	<b>Design et synthèse des origamis d'ADN</b>	<b>40</b>
2.1.1	Le design	40
2.1.2	Synthèse des origamis	43
<b>2.2</b>	<b>Synthèse de dimères AuNPs/origami</b>	<b>46</b>
2.2.1	Fonctionnalisation des nanoparticules d'or	46
2.2.2	Assemblage des dimères de nanoparticules d'or	55
2.2.3	Analyse des dimères assemblés par microscopie électronique	59

---

Au cours de ce chapitre, je vais vous détailler la méthode de synthèse des dimères de nanoparticules d'or que j'ai développée pendant ma thèse. Je vais, dans un premier temps, parler du design et de la synthèse des origamis que j'ai utilisé et qui ont été conçus par notre collaborateur à Montpellier, le Dr. Gaëtan Bellot et son équipe au Centre de Biochimie Structurale (CBS). J'ai décidé de ne décrire ici que les caractéristiques principales de ces origamis qui permettent d'en comprendre la synthèse et leur capacité à s'assembler avec des nanoparticules d'or. Le détail de leur structure leur permettant de devenir dynamiques et sensibles à des stimuli externes sera donné dans les chapitre 4 et 5 où ils seront utilisés. Dans un deuxième temps, je vais décrire mon travail de fonctionnalisation de particules d'or de 40 nm par une chimie mixte associant simple-brins d'ADN et ligands amphiphiles afin de leur permettre de s'assembler en dimères sur les origamis en présence d'ions magnésium. Je finirai par détailler l'assemblage et la purification de dimères, ainsi que leur caractérisation par microscopie électronique.

## 2.1 Design et synthèse des origamis d'ADN

### 2.1.1 Le design

Le design de notre origami d'ADN a été réalisé par l'équipe de Gaëtan Bellot au CBS. Il a une forme de Y (figure 2.1) : il est composé de deux bras, chacun constitué de 18 double brins d'ADN compactés (fagot de 18 double-hélices ou 18 *Helix Bundle*, HB) ; et d'un pied de deux fois 18 HB. En considérant la géométrie classique d'un double-brin d'ADN rappelée précédemment (doubles hélices d'environ 2 nm de diamètre avec une période de 3,4 nm pour 10,4 bases), chaque bras mesure théoriquement 49 nm de haut ( $L_{bras}$ ) et a un diamètre de 10 nm ( $2a_{ori}$ ). Le pied, quant à lui, a une hauteur de 20,4 nm et est relié aux bras par 6 simples brins d'une longueur de 1 nm permettant une liaison flexible entre les deux parties. Un visuel provenant du logiciel Cadnano permettant le design des origami d'ADN est disponible en annexe A.

L'intérêt d'utiliser des *Helix Bundles* de 18 double-hélices est la capacité à augmenter fortement la rigidité mécanique de ces chaînes organiques par rapport à un double-brin d'ADN classique. Ainsi, il a été estimé qu'un fagot de 6 hélices d'ADN a une longueur de persistance de près de 2  $\mu\text{m}$  et que cette longueur est encore augmentée pour un 18 HB [138].

Au sommet de chacun des bras se trouvent, respectivement, 6 et 5 simples brins d'ADN permettant l'auto-assemblage avec les particules d'or (présentant la séquence complémentaire en surface grâce à des fonctions thiols) avec une distance entre particule et origami notée  $l_{DNA}$ . Au pied de l'origami, 8 biotines permettent d'immobiliser les nanostructures sur un substrat fonctionnalisé avec des protéines adaptées. Dans mon cas, j'utiliserai des chambres microfluidiques présentant des Neutravidines en surface.

Les deux bras sont reliés en leur centre (à  $l_1 = 29$  nm de leur base) par deux simple-brins de 127 bases provenant de la longue séquence d'ADN viral qui est répliquée pour former l'origami et que j'ai appelé *scaffold* dans le chapitre précédent (M13mp18 ; 7249 nucléotides). Ces deux brins permettent la modulation de l'angle  $2\theta$  entre les bras du Y. Cette zone correspond donc au site actif de notre origami dynamique dont la longueur  $d_n$  sera modulée par des stimuli physico-chimiques spécifiques. En pratique, la forme en Y permet, par effet levier, d'amplifier l'écartement entre les extrémités des bras (et donc la distance  $d$  entre particules d'or) par rapport à la longueur du site actif.

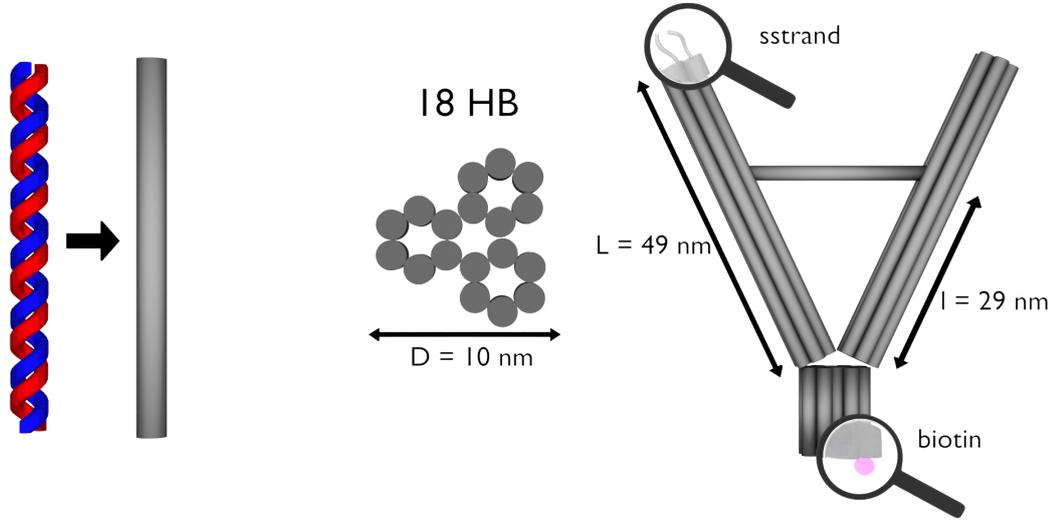


Figure 2.1: Représentation schématique de l'origami d'ADN en forme de Y, avec au centre une coupe transversale des bras représentant les 18 doubles brins

La figure 2.2a représente schématiquement un bras de l'origami associé à une nanoparticule d'or et indique les paramètres géométriques de notre nanostructure hybride. A partir de ce schéma, il est possible de donner les relations géométriques suivantes:

$$\begin{aligned}
 \frac{d}{2} &= \sin \theta (L_{bras} + l_{DNA} + r_1) - r_2 \\
 r_1 &= a - a_{ori} \tan \theta \\
 r_2 &= a - \frac{a_{ori}}{\cos \theta} \\
 \theta &= \arcsin \frac{d_n/2}{l_1}
 \end{aligned} \tag{2.1}$$

où  $r_1$  et  $r_2$  sont définis géométriquement sur la figure 2.2a. Ces relations permettent de relier directement  $d$  et  $d_n$  en connaissant le rayon  $a$  des nanoparticules et la longueur  $l_{DNA}$  de la liaison entre l'origami et la particule d'or. En supposant toujours une distance entre bases de 0,34 nm, il est possible d'exprimer  $d_n$  en nombre de paires de bases hybridées (bp) dans le scaffold et non en nm. Comme indiqué sur la figure 2.3, quand  $d_n < 127$ bp, les bases non-hybridées forment une boucle simple-brin qui n'influe pas sur l'angle  $\theta$  du Y.

$l_{DNA}$  va dépendre de la géométrie d'accrochage des particules d'or sur l'origami comme représenté sur la figure 2.4. Dans les deux cas, les brins d'ADN au sommet des bras de l'origami sont orientés avec une extrémité 3'. En figure 2.4a, le brin d'ADN en surface des particules se termine également en 3' avec un groupement thiol à son extrémité 5' : la double-hélice de liaison est alors parallèle au bras de l'origami. Dans le cas de la figure 2.4b, le groupement thiol est cette fois-ci à l'extrémité 3' du brin de surface et l'hybridation va donc se faire perpendiculairement à la liaison nanoparticule d'or-origami. Cette dernière configuration, surnommée *zipper* permet de minimiser la distance  $l_{DNA}$  à l'épaisseur d'une double hélice, soit environ 2 nm [139]. Il faut tout de même considérer que, dans ma thèse, il restera généralement une partie simple-brin d'ADN entre l'origami

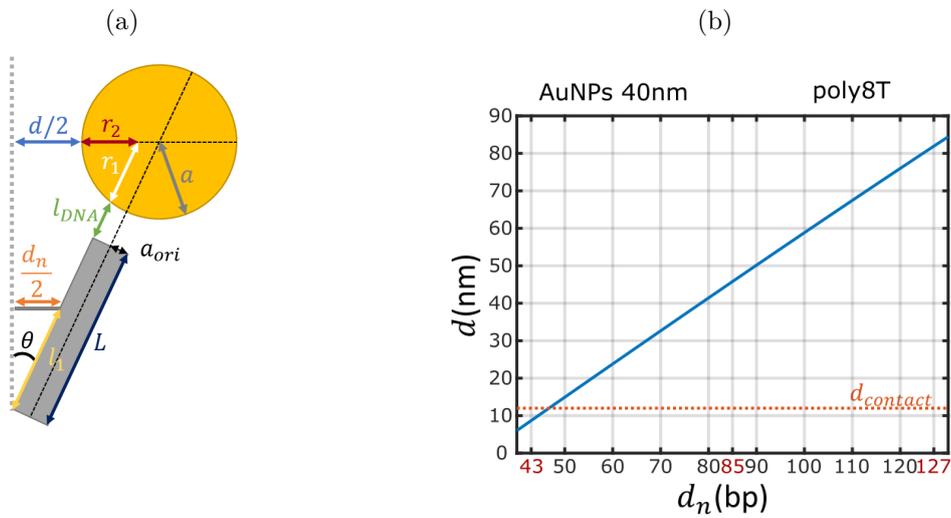


Figure 2.2: Calcul théorique de la distance interparticule bord-à-bord en fonction du nombre de paires de bases hybridées au centre de l'origami (a). Résultats obtenus pour un dimère de particules de 40nm de diamètre et recouvertes d'un ADN poly8T (b)  
 Paramètres utilisés :  $l_{DNA} = 8,4nm$  ;  $a = 20nm$  ;  $a_{ori} = 5nm$  ;  $l_1 = 29$  ;  $L = 49nm$

et le double brin de liaison avec la particule.

Pour une particule d'or de 40 nm et  $l_{DNA} = 8,4$  nm (correspondant à un ADN de 8 bases

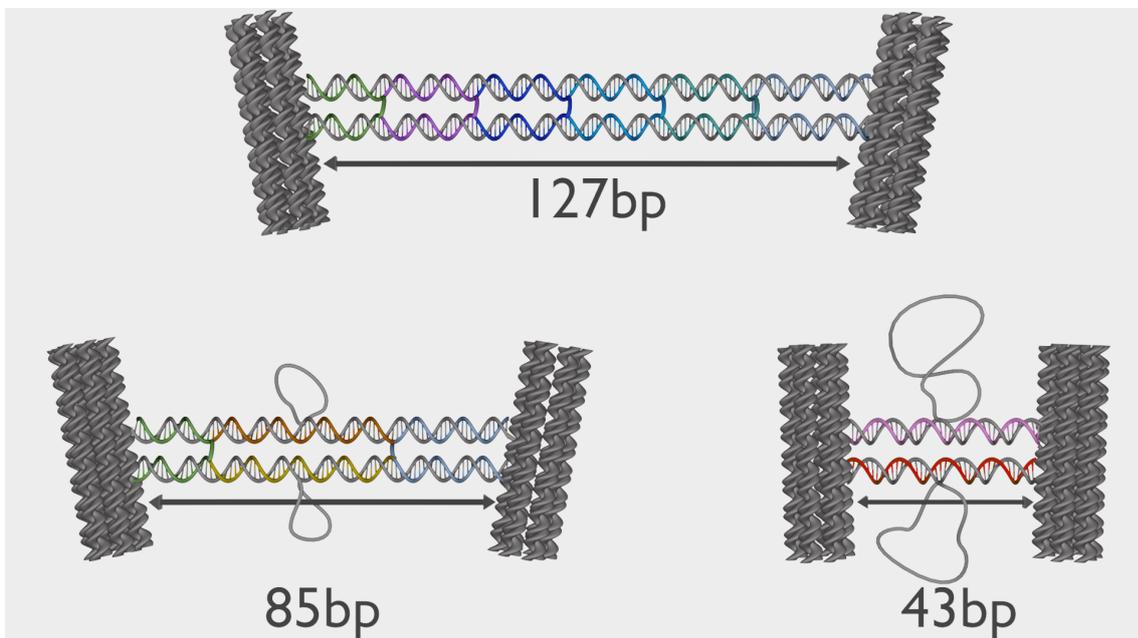


Figure 2.3: Représentation schématique de la partie centrale contrôlant la morphologie de l'origami : origami **ouvert**, **semi-ouvert** et **fermé**

assemblé suivant la structure visible à la figure 2.4b), on obtient le rapport géométrique

entre  $d$  (nm) et  $d_n$  (bp) fourni en figure 2.2b. La distance maximale entre particules d'or est obtenue quand le site actif est entièrement hybridé (127 bp). Dans ce cas, la distance interparticule bord à bord théorique est supérieure à 60 nm : bien supérieure aux rayons des particules, impliquant un couplage plasmon faible. On parlera d'origami **ouvert**. On parlera d'origami **fermé** quand la distance interparticule descend à quelques nanomètres. Dans mes expériences, j'utiliserai des origamis hybridés sur 43 bp, permettant théoriquement de descendre  $d$  à 9 nm. La figure 2.3 présente également le cas où l'origami est hybridé sur 85 bp (origami **semi-ouvert**) et qui sera également étudié dans le manuscrit. J'ai également indiqué une distance  $d_{contact}$  à 12 nm sur la figure 2.2b. Comme nous le verrons par la suite, cette distance correspond à deux fois la longueur  $L$  des ligands les plus couramment utilisés pendant mes expériences.

Comme on peut le voir sur la figure 2.3, l'origami **ouvert**, hybridé sur 127bp, contient de courts brins d'ADN synthétiques liant les deux brins du *scaffold* entre eux pour plus de rigidité. Il y a, en tout, 6 brins différents dans cette partie centrale. Au contraire, l'origami hybridé sur 43 bp, ne présente pas de pont entre les brins du *scaffold*. Seul 2 brins, hybridés sur les parties extrêmes et du même brin du *scaffold* permettent de structurer cet origami **fermé**. Dans le cas à 85 bp intermédiaire **semi-ouvert**, l'hybridation s'effectue grâce à 4 brins et combine, sur les côtés, la liaison entre les 2 brins du *scaffold* ; et, au milieu, 2 brins s'hybridant chacun sur un même brin du *scaffold* pour les forcer à former une boucle. Les séquences de la zone active de l'origami et des brins synthétiques complémentaires seront données lors dans le chapitre 4. Comme le design du reste de l'origami a été exclusivement optimisé par l'équipe de Gaëtan Bellot, je ne préciserai pas les séquences des *staples* n'intervenant pas dans le site actif.

Ce design en Y a été modifié pour rendre les origamis modulables par *strand displacement reaction*. Pour différencier les origamis **semi-ouverts** et **fermés** modulables de ceux décrits en figure 2.3, j'utiliserai une étoile \* dans le cas des systèmes modulables. Leur structures sont légèrement différentes et seront également présentées en détail dans le chapitre 4. Une forme intermédiaire entre des origamis **fermés** et **semi-ouverts** est un origami pour lequel les 2 brins du *scaffold* sont entièrement simple-brins sur 127 bases : je parlerai d'origami **dévrouillé\***. A ce stade, il est uniquement important de savoir qu'un origami **ouvert** correspond à une hybridation sur **127bp** de la partie centrale, **semi-ouvert** à une hybridation de **85bp** et enfin **fermé** à une hybridation de **43bp**. Pour les origamis modulables, un origami **semi-ouvert\*** est hybridé sur **71bp** et **fermé\*** sur **36bp** sur les deux brins.

D'autres designs d'origamis, conçus pour être sensibles au pH, seront décrits plus précisément dans le chapitre 5. Leur synthèse et leur assemblage en dimères de particules d'or suivent les mêmes protocoles que ceux décrits ici pour les origamis **ouverts**, **semi-ouverts** et **fermés**.

### 2.1.2 Synthèse des origamis

Une fois le design fini, le *scaffold* et les *staples* mis en excès (*scaffold* : *staples*  $\rightarrow$  1 : 10) sont placés dans une machine PCR pendant 3 jours avec 17 mM de  $MgCl_2$ , 5 mM de Tris-HCl pH=7.8 et 1mM d'EDTA, pour un volume typique de 200  $\mu$ L. La machine PCR n'est pas utilisée pour amplifier l'ADN mis en solution : elle sert à effectuer des cycles thermiques de refroidissement lent et de chauffage rapide afin d'éviter les formes mal repliées de l'origami qui agissent comme des pièges cinétiques pendant le repliement de



Figure 2.4: Représentation 3D des différents accrochages possibles des particules d'or aux sommets des bars de l'origami suivant que l'ADN de surface possède le groupement thiol à l'extrémité 5' ou 3'

celui-ci. Comme précisé dans le chapitre précédent, ce lent refroidissement et la présence d'ions magnésium sont essentiels pour favoriser thermodynamiquement le repliement des origamis. Le succès du repliement de l'origami étant très sensible à ce processus thermique, les échantillons sont divisés en solutions de  $100 \mu\text{L}$  dans la machine PCR afin d'assurer la synthèse même si un problème de chauffage sur une zone de la machine apparaît. L'optimisation de ces étapes (programmation des cycles thermiques et concentration en ions magnésium) a été effectuée par l'équipe de Gaëtan Bellot : je ne vais donc pas la décrire en détail.

Au cours d'un séjour d'un peu plus de 3 mois au CBS au cours de ma thèse, j'ai pu me former à la synthèse et à la purification des origamis une fois les conditions de repliement optimisées. En pratique, les échantillons sont purifiés par électrophorèse en gel d'agarose à 1% en masse contenant 11 mM de  $\text{MgCl}_2$ . De manière générale, l'électrophorèse est l'une des principales techniques utilisées en biologie moléculaire pour la séparation et la caractérisation de biomolécules chargées. La séparation se fait selon deux critères : la charge et le volume hydrodynamique. Un gel d'agarose est une matrice de polymère de sucre baignant dans un tampon conducteur, le *Tris Borate EDTA* (TBE x 0,5%) et de magnésium (dans le cas où l'échantillon contient des origamis).

La concentration en agarose varie selon la taille des structures à séparer. Une concentration élevée entraîne une réduction de la taille des pores de l'hydrogel et augmente alors la résolution chromatographique. Cependant, un gel trop concentré induit un ralentissement excessif de la mobilité des objets et entraîne un élargissement des bandes correspondant à chaque sous-produit de la réaction, diminuant le pouvoir de séparation. Les origamis sont révélés dans le gel par l'ajout d'un fluorophore s'intercalant dans l'ADN, le *SyberSafe* (Figure 2.5).

Après extraction du gel, la concentration en origami peut être estimée grâce à une mesure d'absorbance de l'échantillon à 260 nm. En effet, comme les acides nucléiques absorbent cette longueur d'onde, il est possible d'estimer la concentration en nucléotides grâce à la loi de Beer-Lambert :  $A = \epsilon \ell c$  où  $A$  est l'absorbance,  $\epsilon$  le coefficient d'atténuation molaire,  $\ell$  la longueur du trajet parcouru par la lumière dans le milieu et  $c$  la concentration de l'entité chimique, dans notre cas les acides nucléiques.

L'observation du gel est déjà un bon indicateur de la réussite ou non de la synthèse. Le gel ne doit se composer que d'une bande assez large et rapide correspondant aux *stapples*

en excès n'ayant pas réagi ; et une bande fine ralentie correspondant à nos origamis. Si cette dernière bande est trop large, cela indique un mauvais repliement de l'ADN. Comme le montre la figure 2.5, un origami **fermé\*** va plus vite dans le gel qu'un **déverrouillé\***, qui lui-même se déplace plus vite qu'un origami **semi-ouvert\***. Ainsi, la différence de morphologie des origamis entraîne une différence de volume hydrodynamique observable en électrophorèse. Afin de valider la synthèse, des images de microscopie électronique sont effectuées au Centre de Biochimie Structurale (CBS) de Montpellier.

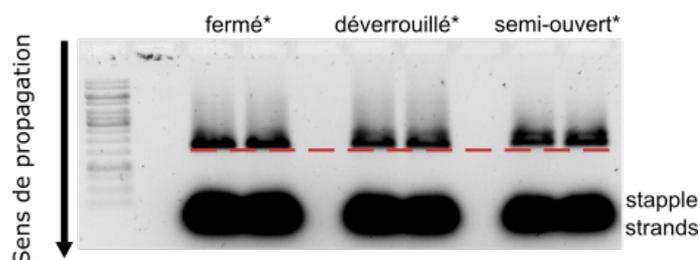


Figure 2.5: Représentation schématique de la partie centrale contrôlant la morphologie de l'origami : origami **semi-ouvert\***, **fermé\*** et **déverrouillé\*** (structures présentées dans le chapitre 4)

La microscopie électronique à transmission (*Transmission Electron Microscopy*, TEM) est une technique de microscopie utilisant un faisceau d'électrons, dans mon cas à 200 keV. Ce dernier va présenter une longueur d'onde de l'ordre de 0.025 nm. En pratique, la limite de résolution est généralement supérieure à la limite de diffraction à cause d'aberrations (0.08 nm). Il est également possible d'augmenter le contraste des parties biologiques grâce à l'utilisation d'un agent de contraste, tel que du tétrahydroxyde d'osmium ou de l'acétate d'uranyle : on parle alors de coloration négative. L'agent contrastant possède un numéro atomique élevé afin d'interagir fortement avec le faisceau d'électrons. Il est alors déposé de manière homogène sur le substrat de carbone de la grille de TEM et donne un fond sombre sur lequel un échantillon biologique, qui interagit peu avec les électrons, apparaît clair.

Cependant, en TEM, les électrons interagissent très fortement avec la matière : un vide extrêmement poussé est alors nécessaire dans l'ensemble de la colonne. Les échantillons biologiques en solution, mis directement dans cet environnement, sont immédiatement déshydratés et leur structure s'en trouve endommagée. C'est pourquoi, sur les images, les origamis n'auront pas toujours la forme désirée : ils peuvent en effet sécher sur la tranche, ne permettant pas l'observation du "Y", ou les bras peuvent changer d'espacement. Cependant sur une grande quantité d'objets, il est quand même possible de se faire une idée de la structure. D'autres techniques de microscopie électronique telle que la microscopie électronique cryogénique (cryo-EM) permettent de s'affranchir de ces problématiques. Dans ce cas, l'échantillon en solution est gelé instantanément pour former un film d'eau amorphe solide dans lequel les échantillons peuvent être imagés. En pratique, la cryo-EM nécessite une quantité de nanostructures importante qui n'était pas compatible en général avec nos échantillons. Je vous présenterai une image représentative de dimères assemblés sur origamis en cryo-EM mais nous avons généralement utilisé la coloration négative sur nos échantillons.

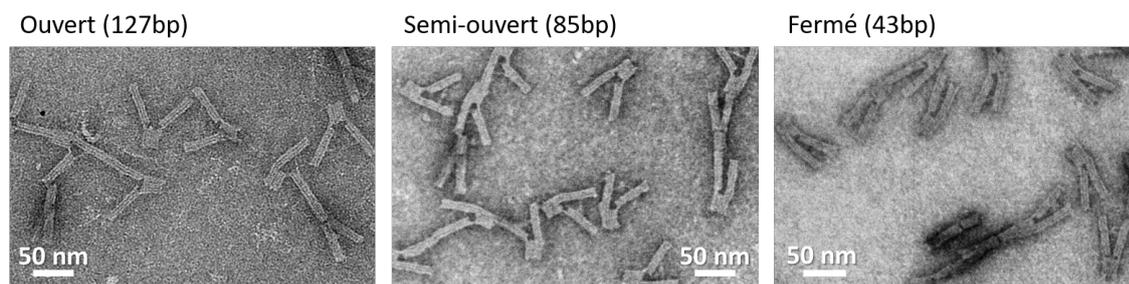


Figure 2.6: Images de microscopie électronique par transmission avec coloration négative d'origamis **ouverts**, **semi-ouverts** et **fermés**

La figure 2.6 présente les images de microscopie électronique d'origamis **ouverts**, **semi-ouverts** et **fermés** effectuées au CBS par l'équipe de Gaëtan Bellot. Les substrats sont traités par plasma avant dépôt et coloration puis séchage de l'échantillon. Malgré l'effet du séchage, nous pouvons constater la bonne formation des origamis **Y** ainsi que la différence d'ouverture angulaire entre leurs bras pour les différents designs.

## 2.2 Synthèse de dimères AuNPs/origami

L'origami d'ADN a été conçu afin de permettre l'auto-assemblage des dimères par l'accrochage spécifique de deux nanoparticules d'or. Pour cela, comme déjà indiqué, au sommet des deux bras de l'origami se trouvent des simple-brins libres d'ADN. En recouvrant la surface des particules avec la séquence complémentaire grâce à des fonctions thiols, il est alors possible de contrôler leur accrochage de manière spécifique sur les origamis. La difficulté de synthèse repose essentiellement sur le fait qu'une certaine concentration d'ions magnésium est nécessaire à la stabilité des origamis. Cependant, même en très petite quantité, cela a souvent pour conséquence l'agrégation irréversible des particules d'or.

L'expertise de notre équipe dans l'auto-assemblage de structure or-ADN [72, 8, 11] ainsi que les différents protocoles trouvés dans la littérature pour des assemblages or-origami d'ADN [132, 133, 134, 135, 52] nous ont permis d'avoir, dès le début, une idée des étapes de synthèse pour former notre structure hybride et des points de levier existants pour adapter le protocole. La figure 2.7 présente schématiquement les différentes étapes de synthèse des dimères assemblés. Comme on peut le voir, la synthèse se décompose en deux étapes. La première étape correspond à l'incubation de l'ADN de surface et des particules d'or ; la seconde à l'incubation des AuNPs recouvertes d'ADN mises en excès et des origamis d'ADN.

### 2.2.1 Fonctionnalisation des nanoparticules d'or

La fonctionnalisation des particules d'or avec des simple brins d'ADN comporte plusieurs étapes d'échanges de ligands suivies d'une purification électrophorétique. L'électrophorèse finale permet, à la fois, de purifier les particules en retirant les ligands non adsorbés mais, également, à s'assurer de la bonne passivation des particules en obtenant une fine bande dans le gel. Une bande large indiquerait des interactions non-spécifiques entre les particules et le gel tandis que la présence de nombreuses bandes indiquerait l'agrégation partielle des

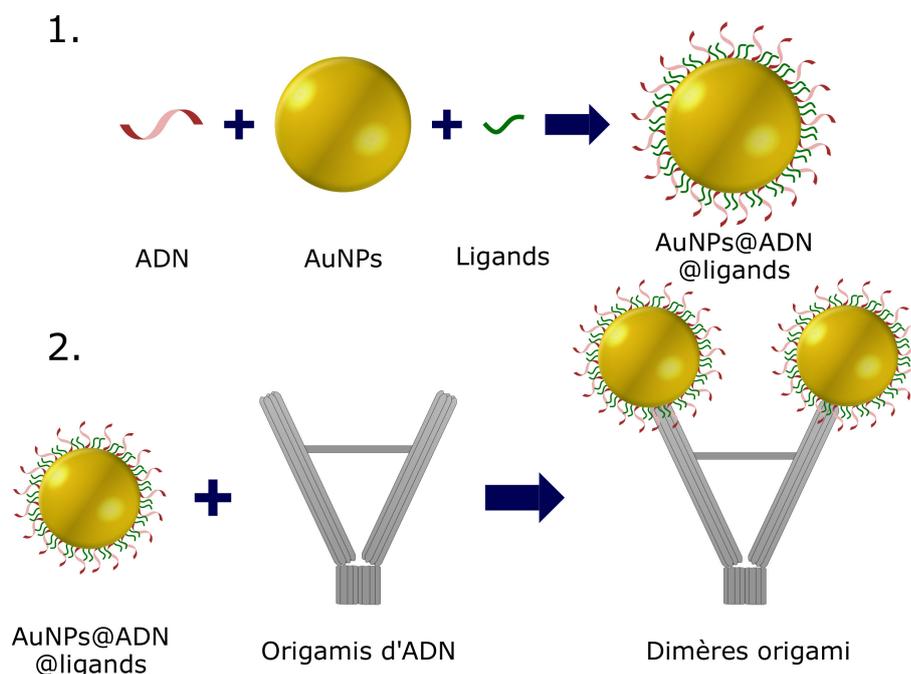


Figure 2.7: Représentation schématique du processus d'assemblage des dimères origami : première étape de fonctionnalisation des particules d'or et la seconde d'assemblage avec les origamis d'ADN

particules sous la forme de dimères ou de plus gros agrégats.

Les étapes d'échanges de ligands ne sont pas les mêmes en fonction de la chimie de surface initiale des particules. J'en ai utilisé deux types : des particules commerciales de 40 nm de diamètres et couvertes d'ions citrate chargés négativement (BBI Solutions) ; ou des particules monodisperses de 40 nm à 47 nm fournies par notre collaboratrice Sylvie Marguet du CEA Saclay et qui sont stabilisées par du bromure de cétrimonium (*CTAB*), un ammonium quaternaire chargé positivement. Ces particules monodisperses sont obtenues à partir de nanocubes monocristallins [140], après érosion chimique des pointes en présence d'ions  $AuCl_4^-$  [141]. La comparaison morphologique entre ces deux types de particules et son influence sur les propriétés optiques des dimères seront discutées dans le chapitre 3.

### Nanoparticules d'or commerciales

Les nanoparticules d'or commerciales sont obtenues faiblement concentrées (typiquement 150 pM pour 40 nm) et à peine stabilisées par les ions citrates. Ces concentrations sont insuffisantes pour former des bandes visibles dans des gels d'électrophorèse. De plus, elles agrègent rapidement en présence de sodium ou de magnésium ; ou en modifiant le pH. Or, comme les particules d'or et l'ADN sont chargés négativement, il faut nécessairement réduire cette répulsion électrostatique pour fonctionnaliser des particules d'or avec des simples brins d'ADN. Pour augmenter la stabilité colloïdale et concentrer les nanoparticules, nous échangeons les ions citrates par une phosphine chargée négativement, la bis(*p*-sulfonatophenyl)phenylphosphine (*BSPP*) en utilisant des protocoles exploités depuis de nombreuses années à l'institut Langevin [72, 8, 11]. La concentration finale est alors de 20 nM pour des particules de 40 nm. Les deux charges négatives du *BSPP* garantissent une

forte répulsion électrostatique entre les particules pour favoriser leur stabilité colloïdale mais ce sont des ligands qui sont aisément remplacés par des ligands thiolés comme des simples brins d'ADN [72, 8, 11].

Deux approches expérimentales peuvent être mises en œuvre pour ajouter des simples brins d'ADN sur la particule d'or : soit ajouter quelques brins d'ADN thiolés et passiver le reste de la surface par des ligands thiolés [72, 8, 11], soit couvrir la totalité de la surface par des simples brins d'ADN qui servent également alors de ligands de stabilisation pour les particules [132, 133, 134, 135, 52]. De plus, il est soit possible d'utiliser des brins d'ADN présentant une unique fonction thiol [132, 133, 134, 135, 52], soit d'exploiter une fonction trithiol afin d'augmenter la stabilité des brins d'ADN en surface des particules [142], approche généralement utilisée à l'institut Langevin [72, 8, 11].

En pratique, j'ai développé un protocole hybride en couvrant les particules d'or d'un maximum de simple-brins d'ADN trithiolés et en ajoutant un ligand amphiphile pour passiver au maximum la surface d'or. Le détail sur les différents ligands considérés et leur influence sur la stabilité colloïdale seront discutés dans la dernière partie de cette section. J'ai utilisé des simple-brins d'ADN avec une séquence quelconque de 30 bases ou de courts ADN polythymines de 5 à 19 bases (de *5T* et *19T*). Le brin de séquence quelconque *ss30* et *19T* sont trithiolés en 5', celui de *8T* est trithiolé en 3' (les 3 fournis par Fidelity Systems) tandis que les brins *5T*, *7T* et *9T* sont monothiolés en 3' (fournis par IDT DNA). Ces brins d'ADN sont associés, ou non, pendant la synthèse à un ligand amphiphile thiolé. Nous utilisons deux ligands différents (fournis par Prochimia) qui associent une fonction thiol, une chaîne alkyl de 12 carbones et un oligomère de 6 éthylènes glycols avec une fonction terminale, soit un acide carboxylique (XPEG, HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-EG<sub>6</sub>-OCH<sub>2</sub>-COOH), soit un méthyl éther (mXPEG, HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-EG<sub>6</sub>-OCH<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub>).

Pour couvrir les nanoparticules d'or d'un maximum de brins d'ADN, deux approches sont également possibles. Historiquement, les particules d'or sont mises en présence d'un grand excès d'ADN thiolé et la concentration en sodium est progressivement augmentée [6, 91, 142] : le sodium permet d'écranter la répulsion entre ADN et particule d'or pour permettre à des liaisons thiol-or de se former ; ce qui stabilise les particules afin qu'elles supportent une plus grande concentration de sodium, permettant ainsi à plus d'ADN de s'adsorber sur les particules et ainsi de suite jusqu'à une couverture d'ADN maximale. Plus récemment, un protocole a été développé afin d'accélérer et d'optimiser ce processus en réduisant le pH de la solution [143, 135]. Dans ce cas, les fonctions phosphate de l'ADN sont neutralisées ( $pK_a = 6,0 - 7,0$ ) et les simple-brins peuvent se greffer aisément en surface des particules d'or. En pratique, j'ai commencé par tester un protocole en présence de sodium puis je me suis rendu compte que la modulation de pH permettait d'obtenir des particules d'or plus stables comme discuté à la fin de ce sous-chapitre. C'est cette dernière approche que j'ai donc le plus utilisée. Toutefois, abaisser le pH neutralise également une partie des charges superficielles des particules d'or et les fait agréger partiellement. C'est pourquoi cette étape ne dure que quelques minutes avant de ramener la solution à pH physiologique.

Le protocole exact est légèrement différent en présence de sodium ou en modulant le pH. Dans les deux cas, pour un puits du gel d'électrophorèse, on utilise 2  $\mu$ L de nanoparticules concentrées avec un volume de 2  $\mu$ L d'ADN à 100  $\mu$ M pour obtenir un excès de 5000 de l'ADN par rapport aux particules d'or. Dans le cas du sodium, 1,5  $\mu$ L de NaCl à 200 mM et 4,5  $\mu$ L d'eau à 18 M $\Omega$  sont ajoutés afin d'atteindre un volume total de 10  $\mu$ L et une

concentration de NaCl de 30 mM. Les particules incubent alors pendant la nuit. Dans le cas de la modulation du pH, seul un volume de 6  $\mu\text{L}$  d'eau à 18 M $\Omega$  est ajouté afin d'atteindre un volume total de 10  $\mu\text{L}$ . Le pH de la solution est abaissé à 3 en ajoutant de l'acide citrique à pH 3 pour une concentration dans la solution de 20 mM pendant 5 min avant de revenir à 7,6 en ajoutant une solution tampon d'HEPES à pH 7.6 pour une concentration finale de 100 mM. La solution incube ensuite pendant la nuit afin de maximiser la couverture d'ADN.

Dans le cas du protocole en pH, les particules sont rincées au 0.5xTBE par centrifugation pour retirer l'HEPES. Le volume de la solution est alors ramené à sa valeur avant le traitement pH, soit 10  $\mu\text{L}$ . Pour tenter de passiver encore davantage la surface des particules d'or, je peux ajouter un excès de ligand amphiphile *XPEG* ou *mXPEG* (x300.000, volume de 1  $\mu\text{L}$ ) pendant 30 min. Dans tous les cas, les particules sont purifiées par électrophorèse dans un gel d'agarose de 0,75% en masse pendant 40 min à 90 V dans une solution tampon de 0,5xTBE comme éluant. Comme évoqué précédemment, cette étape permet d'éliminer les ligands non réagis mais aussi les agrégats qui auraient pu se former lors de l'incubation en présence de sodium ou à pH faible. Ainsi, les origamis d'ADN ne seront mis à incuber qu'avec les monomères de particules d'or et non avec des dimères ou trimères d'agrégation. Comme discuté plus loin, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le traitement pH et l'ajout de ligands. La figure 2.8 présente un gel de purification typique avec des particules de 40 nm pour deux type d'ADN de surface : *9T* monothiol et *19T* trithiol et avec un protocole utilisant un ajout de NaCl. Les particules sont visualisées dans le gel par l'extinction optique due à la résonance plasmon (visualisation d'une bande rouge). Les bandes correspondant aux particules couvertes d'ADN *9T* monothiol sont plus larges que celles couvertes d'ADN *19T* trithiol. L'élargissement des bandes traduit une couverture inhomogène de la surface des particules. Les ADN trithiolés semblent donc permettre une meilleure couverture de la surface. De plus ces dernières sont ralenties dans le gel ce qui correspond à un volume hydrodynamique plus important, en adéquation avec un brin d'ADN de surface plus long [144]. Pour ces deux échantillons, nous pouvons observer une seconde bande peu intense et plus lente : ils s'agit d'une agrégation partielle des particules d'or pendant l'incubation en présence de sodium.

Nous avons donc sélectionné un excès d'ADN/particules de 5000 afin d'avoir une couverture la plus dense possible d'ADN trithiolés en surface des particules. Les particules sont récupérées en découpant un réservoir de solution tampon 0.5xTBE, de taille centimétrique, dans le gel d'agarose. Après application d'un champ électrique de 200 V pendant 2 min environ, une suspension diluée d'AuNPs fonctionnalisées est obtenue. Celle-ci est concentrée par centrifugation pour obtenir une densité optique similaire, à l'œil nu, à la solution de nanoparticules concentrées. En pratique, environ la moitié des particules sont perdues au cours de cette étape de purification en fonction de la densité des bandes de dimères agrégés. De manière générale, j'effectuerai ce type de synthèse de particules fonctionnalisées avec une quantité initiale de 3,2 pmol de nanoparticules d'or, équivalente à 8 puits d'électrophorèse. Je recombinaurai ces particules pour produire typiquement 4 puits d'électrophorèse au moment de la synthèse d'origamis assemblés (dont 1 puits de référence).

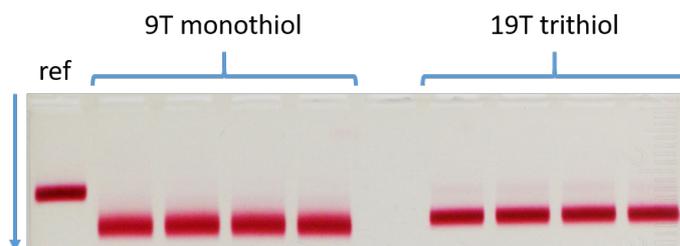


Figure 2.8: Gel de purification de particules commerciales *9T mXPEG* (à gauche) et *19T mXPEG* (à droite)

### Nanoparticules d'or monodisperses

A la différence des particules commerciales, les particules monodisperses présentent une très bonne stabilité colloïdale grâce au *CTAB* et elles peuvent être simplement concentrées à 20 nM par centrifugation. La difficulté est ici, au contraire, d'arriver à remplacer la bicouche de *CTAB* formée en surface des particules par des simples brins d'ADN. Différents protocoles ont été discutés dans la littérature sur cette étape d'échange de ligands [145, 146]. Dans mon cas, je suis simplement repartie de la méthode par modulation de pH employée avec les particules d'or commerciales, avec ajout de ligands amphiphiles, en remplaçant les nanoparticules stabilisées par le *BSPP* par les nanoparticules couvertes de *CTAB* ; le reste du protocole étant inchangé.

La figure 2.9 présente une photo du gel de la purification de particules monodisperses en présence d'une concentration décroissante d'ADN *19T* correspondant à des ratio ADN/particules de gauche à droite de : 5000/1, 500/1, 50/1 et 5/1. Le premier puits à gauche correspond à un échantillon de référence sans ADN. On observe que les particules couvertes uniquement de *CTAB*, donc chargées positivement, ne migrent pas dans le gel vers la cathode. Au contraire, dans les échantillons contenant de l'ADN, les particules diffusent bien vers la cathode. De plus, l'influence de la concentration de l'ADN est bien visible. L'échantillon contenant la plus faible concentration d'ADN a la plus grande mobilité électrophorétique. Cela indique un plus faible volume hydrodynamique et, donc, une moins bonne couverture d'ADN [144]. Les deux échantillons les plus concentrés migrent à des niveaux équivalents. Cependant, la bande de celui avec la plus importante concentration est plus fine, ce qui correspond à une couverture plus homogène des particules. C'est également cette concentration que nous utiliserons en pratique pour la fonctionnalisation des nanoparticules avant assemblage sur les origamis.

La figure 2.10 présente un gel représentatif de particules monodisperses couvertes d'ADN *8T* trithiol 3' avec comme ligand amphiphile le *XPEG*. Une grande partie des origamis qui vous seront présentés au cours de l'analyse optique présentent cette chimie de surface. On observe peu d'agrégation dans ce gel, les bandes de dimères et trimères d'agrégation sont en effet faibles. Comme dans le cas des particules commerciales, j'utiliserai généralement ce type de synthèse de particules fonctionnalisées avec une quantité équivalente à 8 puits d'électrophorèse contenant chacun environ 400 femtomoles de nanoparticules.

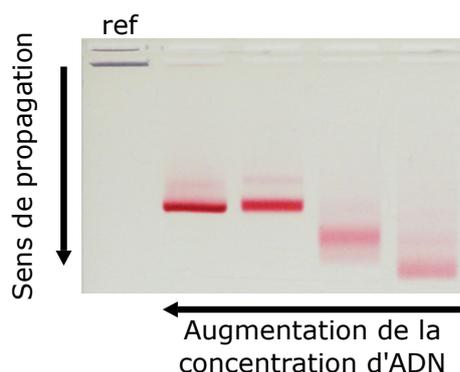


Figure 2.9: Gel de purification avec particules monodisperses : validation du protocole de fonctionnalisation par variation de la concentration d'ADN 19T.

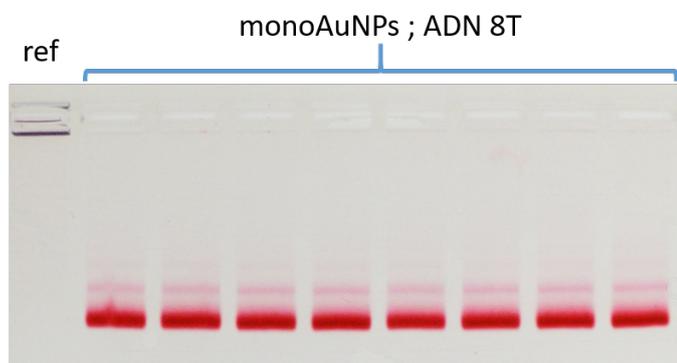


Figure 2.10: Gel de purification de particules monodisperses 8T XPEG

### Discussion sur l'optimisation de la stabilité colloïdale

Le but de la fonctionnalisation décrite ci-dessus est double : permettre l'hybridation spécifique des particules d'or sur les origamis présentant une séquence d'ADN d'accroche au bout de leur bras ; mais aussi de stabiliser les particules d'or suffisamment pour supporter des concentrations de magnésium, nécessaires à la stabilité des origamis, pendant l'étape d'assemblage. En pratique, l'équipe de Tim Liedl a proposé un test de stabilité colloïdale pour s'assurer d'un assemblage efficace : il faut que la solution de nanoparticules d'or ne change pas de couleur instantanément avec une concentration de magnésium de 50 mM [135]. Comme discuté dans le chapitre 1, cette force ionique ne correspond pas exactement à la concentration de coagulation critique *ccc* de la suspension mais davantage à une force ionique pour laquelle il existe une position d'équilibre de la suspension pour une distance interparticule  $d$  petite devant le rayon  $a$  de la particule. En général, la suspension se déstabilise alors en quelques minutes.

Nous nous sommes basés sur ce test de stabilité en utilisant des concentrations variables de  $NaCl$  et de  $MgCl_2$  pour considérer différents ligands de surface. Comme l'assemblage des origamis nécessite typiquement une concentration en magnésium d'au moins 4 mM, nous avons mis un seuil de stabilité à cinq fois cette concentration pour espérer effectuer l'assemblage, soit 20 mM. En pratique, ces tests de stabilité sont réalisés à l'œil nu. Pour cela, un petit volume de la solution récupérée après purification par électrophorèse est

dilué dans de l'eau 18 M $\Omega$ , suffisamment pour que la solution soit bien rouge mais non 'opaque', d'une densité optique d'environ 1 à 530 nm (pour une cuve d'1 cm). Un volume de sel (NaCl ou MgCl<sub>2</sub>) est alors ajouté. Ce volume ajouté ne doit pas dépasser le volume initial : le test étant réalisé à l'œil nu, une trop grande dilution des AuNPs ne permettrait pas une bonne évaluation de la stabilité. La couleur de l'échantillon est analysée après une incubation de 20 s.

Historiquement, à l'institut Langevin, nous utilisons un ligand amphiphile *XPEG*, défini précédemment, qui fait environ 3,5 nm de long et qui permet de stabiliser les particules d'or à des concentrations de sodium supérieures à 500 mM [72]. Sa formule semi-développée est donnée en figure 2.11a. La synthèse de particules d'or commerciales passivées par le *XPEG* correspond juste à la dernière étape décrite dans les protocoles précédents : particules avec BSPP incubées 30 min avec un excès de ligands avant purification par électrophorèse.

En présence de magnésium, le ligand *XPEG* ne permet pas de stabiliser les particules : à plus de 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, la solution change de couleur. Et pourtant, la force ionique pour cette concentration de magnésium (12 mM) est bien inférieure à celle d'une solution de NaCl de 500 mM ( $I = 500$  mM). Ceci confirme que les formules rappelées au chapitre 1 pour estimer la répulsion électrostatique  $V_r$  ne sont pas valables de manière quantitative pour des nanoparticules [78], surtout en présence d'ions divalents [147]. Pour expliquer ce résultat, il faut nécessairement que le potentiel électrostatique de surface dépende des ions en présence [78] et diminue fortement en présence d'ions divalents.

C'est ce que j'ai représenté qualitativement en figure 2.11a avec un diagramme de potentiel d'énergie pour différentes concentrations de sodium et de magnésium. Pour obtenir ce résultat, j'ai pris un potentiel électrostatique  $\psi$  de -120 mV en présence de sodium, réduit à -30 mV en présence de magnésium. Nous avons également testé un autre ligand amphiphile dont la seule différence est de présenter une fonction méthyl éther terminale et dénommé *mXPEG*. Ce ligand devrait théoriquement fournir un potentiel  $\psi$  inférieur. C'est ce que nous retrouvons avec un changement de couleur en présence de plus de 70 mM de NaCl. Étonnamment, ce ligand fournit une meilleure stabilité aux particules que le *XPEG* en présence de magnésium (10 mM). Cela indique probablement une répulsion stérique  $V_s + V_e$  plus élevée avec du *mXPEG* qu'avec *XPEG*, qui peut s'expliquer par la neutralité du ligand. Dans ce cas, il n'y a pas de répulsion électrostatique entre ligands, favorisant une couche plus dense, correspondant à une fraction volumique de ligands  $\varphi$  plus élevée. Dans tous les cas, ces seuls ligands amphiphiles ne permettent pas d'atteindre le seuil de 20 mM de MgCl<sub>2</sub>. Mais ils permettent d'indiquer qu'une augmentation de la répulsion électrostatique n'est pas suffisante pour stabiliser des particules d'or en présence d'ions divalents et qu'une augmentation de la répulsion stérique est nécessaire.

Nous avons donc testé différentes combinaisons de chimies de surface avec des brins d'ADN monothiolés ou trithiolés en 5' ou 3' de différentes séquences, associés ou non aux ligands *mXPEG* et *XPEG*, et pour des particules commerciales de 40 nm, ou des particules monodisperses de 40 nm et 47 nm. Les tests de stabilité sont résumés sur le tableau de la figure 2.12 : les concentrations de sodium et magnésium indiquées correspondent à la concentration la plus élevée mesurée pour laquelle la suspension est stable. Dans le cas de concentrations de 500 mM ou 1 M, la suspension n'a tout simplement jamais changé de couleur. De plus, les particules sont soit fonctionnalisées avec le protocole en présence de sodium, soit en modulant le pH.

Les premiers tests ont été effectués avec un brin d'ADN trithiolé en 5' *ss30* que nous avons

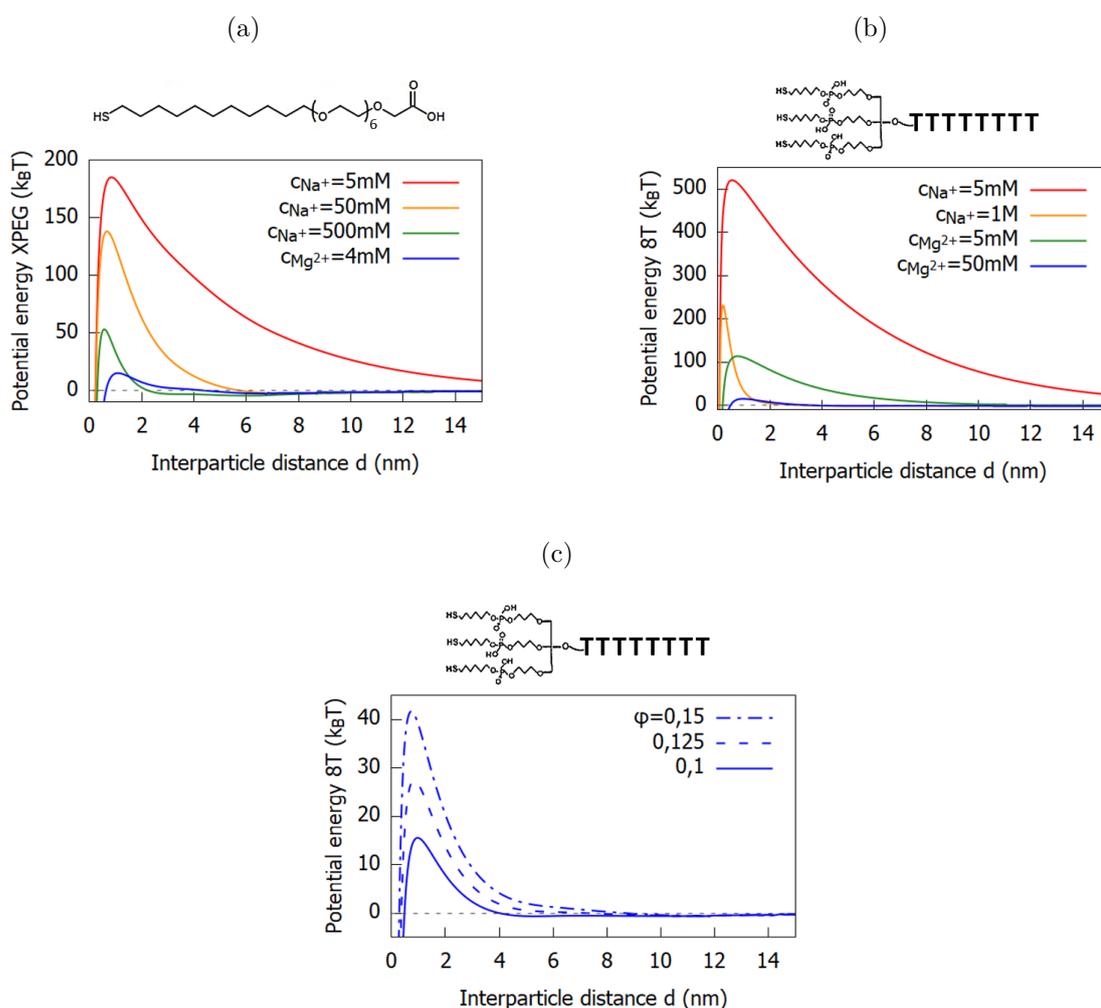


Figure 2.11: Diagrammes d'énergie qualitatifs représentant la stabilité colloïdale de nanoparticules d'or de 40 nm passivées par un ligand amphiphile (a) ou par un court simple-brin d'ADN composé de 8 thymines et d'une fonction trithiol (b-c). L'énergie potentielle d'interaction entre 2 sphères d'or de 40 nm de diamètre est calculée en fonction de la force ionique en utilisant les paramètres : (a)  $T = 298K$ ,  $A_{eff} = 10^{-19}J$ ,  $L = 3,5nm$ ,  $\varphi = 0,15$ ,  $\chi = 0$ ,  $M_W = 527gmol^{-1}$ ,  $\nu_l = 0,9nm^3$ ,  $\psi = -120mV$  en absence d'ions magnésium et  $\psi = -30mV$  avec  $c_{Mg^{2+}} = 5mM$  ; (b)  $T = 298K$ ,  $A_{eff} = 10^{-19}J$ ,  $L = 6nm$ ,  $\varphi = 0,1$ ,  $\chi = 0,2$ ,  $M_W = 3586gmol^{-1}$ ,  $\nu_l = 4,7nm^3$ ,  $\psi = -200mV$  en absence d'ions magnésium et  $\psi = -100mV$  avec  $c_{Mg^{2+}} = 5mM$  et  $\psi = -50mV$  avec  $c_{Mg^{2+}} = 50mM$ . Le calcul en (c) reprend les paramètres en (b) avec  $c_{Mg^{2+}} = 50mM$  et fait varier  $\varphi$  pour montrer l'influence de la fraction volumique de ligands sur la stabilité colloïdale à force ionique constante.

déjà au laboratoire, avec un protocole en présence de sodium. La formule semi-développée du groupement trithiol est fournie en figure 2.11b;2.11c. Cette méthode fournit une stabilité en magnésium suffisante (jusqu'à 30 mM) mais qui n'est pas très élevée compte tenu de la longueur du ligand qui atteint plus de 15 nm : 2 nm pour le groupement trithiol

(voir figure 2.11b ; 2.11c) et près de 15 nm pour le brin d'ADN (30 bases avec une distance typique de 0,55 nm). Cela indique une faible fraction volumique  $\varphi$  sur les particules. Cette problématique a déjà été évoquée dans la littérature : comme les bases de l'ADN ont des affinités différentes avec les surfaces d'or, la densité de simple-brins d'ADN thiolé en surface de particules d'or dépend de la séquence [148, 144]. Les bases ayant la plus forte affinité auront tendance à couvrir la surface, et donc à empêcher d'autres brins de se greffer ; tandis qu'une plus faible affinité favorisera des ligands en *cheveux* autour de la particule [144]. Comme la plus faible affinité est observée pour la thymine, des brins d'ADN polyT devraient favoriser une forte fraction surfacique de ligands : il a déjà été rapporté que de tels ligands favorisaient la stabilité de particules d'or en présence de magnésium [135].

J'ai donc testé différentes longueurs de brins d'ADN polyT avec des groupements terminaux monothiols (liés par une chaîne de 3 alkyls en 3' de l'ADN et généralement utilisés dans la littérature [132, 133, 134, 135, 52]) ou trithiols. Notre but, en testant différentes longueurs de brins polyT, est d'obtenir une bonne stabilité colloïdale avec un ligand suffisamment court. En effet, pour étudier le couplage plasmon, il faut que les particules puissent se rapprocher suffisamment. Un ligand dont la longueur  $L$  serait de l'ordre de la moitié du rayon des particules serait problématique : la distance au contact des chimies de surface correspondrait à  $a$ , à la limite du couplage plasmon.

Le tableau récapitulatif de la figure 2.12 indique que les meilleures stabilités colloïdales, avec des particules commerciales, ont été obtenues avec un brin 19T trithiolé en présence de *mXPEG* et en utilisant le protocole modulant le pH (stabilité à 500 mM de magnésium). Toutefois, la longueur de ce ligand peut être estimée à près de 12 nm. De très bons résultats sont également obtenus avec un brin 8T trithiolé (d'une longueur de l'ordre de 6 nm), en présence de *mXPEG* ou *XPEG* et avec un traitement pH. Un ligand 9T monothiolé (longueur d'environ 5 nm) a également fourni une stabilité suffisante en présence de ligands amphiphiles et avec le traitement pH. Par contre, les simple-brins d'ADN monothiols plus courts ne fournissent pas une stabilité en magnésium à notre seuil et n'ont pas permis de former des dimères assemblés sur origamis.

Il n'est pas étonnant que les meilleures stabilités soient obtenues avec le traitement au pH : la protonation du brin d'ADN pendant la fonctionnalisation neutralise la répulsion entre ligands, ce qui favorise une surface dense et donc une forte répulsion stérique ( $\varphi$  élevée).

Ce tableau indique aussi que les stabilités colloïdales obtenues avec des particules monodisperses sont meilleures que pour des particules commerciales avec la même association de chimie de surface (8T + ligands amphiphiles) et même qu'elles varient entre deux synthèses de particules fournies par notre collaboratrice du CEA Saclay. Il est probable que cette variation de stabilité, pour une même taille de particules et une même chimie de surface, vienne d'une variation de la densité de ligands en surface qui entraîne une augmentation de la répulsion stérique  $V_o + V_e$  (en augmentant  $\varphi$ ), et probablement une petite augmentation de la répulsion électrostatique  $V_r$  (en augmentant  $\psi$  même si cet effet semble moins important en présence de magnésium d'après les expériences avec le *XPEG* et le *mXPEG*).

Pour représenter qualitativement cet effet, je trace en figure 2.11b ; 2.11c des diagrammes d'énergie représentatifs pour l'ADN de 8T. Je néglige la présence des ligands amphiphiles qui augmentent probablement la fraction volumique  $\varphi$  effective par rapport à l'ADN seul. A nouveau, la différence de stabilité entre sodium et magnésium ne peut s'expliquer qu'en

diminuant le potentiel électrostatique en présence d'ions divalents. La figure 2.11c montre l'influence de la fraction volumique  $\varphi$  sur la stabilité colloïdale. Actuellement, nous ne comprenons pas comment la méthode de synthèse peut influencer la densité de ligands en surface des particules d'or mais il semblerait que ce paramètre soit essentiel pour permettre l'assemblage efficace de particules d'or fonctionnalisées par de l'ADN simple-brins sur des origamis d'ADN nécessitant du magnésium. En tout cas, cette étude nous a permis de développer des protocoles de fonctionnalisation de nanoparticules d'or de 40 nm, couvertes initialement de citrates ou de CTAB, par des ADN *ss30* ou polyT et qui sont stables à plus de 20 mM de  $MgCl_2$ .

Nature des particules	ADN	Thiol	Concentration d'ADN	Ligand	Traitement pH	Mg2+ (mM)	Na+ (mM)	
Commerciales	X	X	X	mXPEG	X	10	70	
				XPEG	X	4	500	
Commerciales	ss30	tri en 5'	6 fM	mXPEG	X	30		
				XPEG	X	20		
Commerciales	19T	tri en 5'	20 fM (10 fM)	mXPEG	V	500	1000	
Commerciales	5T	mono en 3'	20fM	mXPEG	V	15		
	7T				V	15		
	9T				V	50		
					X	V	5	
					X	X	5	
Commerciales	8T	tri en 3'	mXPEG	V	50	1000		
Monodisperses			XPEG	V	60			
Monodisperses 47nm			XPEG	V	150			

Figure 2.12: Table récapitulative de la stabilité

### 2.2.2 Assemblage des dimères de nanoparticules d'or

Comme expliqué précédemment, les origamis présentent des séquences simple brins au bout des bras du Y afin d'y fixer une particule d'or fonctionnalisée par hybridation. En fonction de la séquence d'ADN en surface des particules, les origamis présentent différentes séquences au bout de leurs bras : soit une séquence de 30 bases complémentaire de *ss30*, soit de courtes séquences polyA de 9 ou 19 bases. Toutefois, je n'ai jamais réussi à synthétiser des dimères de particules d'or avec uniquement 9 adénines comme séquence d'accrochage. Pour les particules d'or polyT, j'ai donc utilisé des origamis avec des séquences *19A*.

Après fonctionnalisation et purification, les nanoparticules d'or de 40 nm couvertes d'ADN thiolé (*8T*, *9T*, *19T* ou *ss30*) et de ligands sont incubées pendant une nuit avec une concentration donnée d'origamis également purifiés par électrophorèse des *stapples* en excès. Pour chaque puits de l'électrophorèse de purification des dimères assemblés, je mélange typiquement un volume de l'ordre de 3  $\mu L$  de la solution de particules d'or fonctionnalisées avec un volume (typiquement 4  $\mu L$ ) d'origamis d'ADN (contenant 11 mM de  $Mg^{2+}$ ), un volume de *NaCl* concentré et, si besoin, d'un volume de  $MgCl_2$  concentré pour atteindre 100 mM de  $Na^+$  et 4 mM de  $Mg^{2+}$  dans un volume final de 10  $\mu L$ . Le volume exact de la solution d'origamis dépend de la concentration obtenue après électrophorèse qui varie d'une synthèse à l'autre. En général, la concentration est de l'ordre de 1 fM (d'après des mesures d'absorbance à 260 nm) quand la suspension de nanoparticules d'or de 40 nm fonctionnalisées a une concentration de l'ordre de 5-10 nM après centrifugation.

En pratique, pour chaque solution d'origamis, j'effectue une optimisation phénoménologique du ratio AuNPs / origamis d'ADN. Il faut, à priori, un excès de particules d'or pour saturer les origamis d'AuNPs et donc favoriser la formation de dimères (1 particule par bras d'origami). Le but est d'éviter la présence de monomères (1 AuNP sur un seul bras de l'origami) ou la formation d'oligomères (des particules sont reliées à plusieurs origamis). Toutefois, une trop grande quantité de particules saturerait le gel d'agarose et réduirait son pouvoir de séparation ; tandis qu'une trop faible quantité d'origamis rendrait la bande de dimères difficilement visible à l'oeil nu.

J'utilise un gel d'agarose de 0,7% en masse avec un tampon 0,5xTBE + 4 mM de  $MgCl_2$  comme éluant. L'électrophorèse est effectuée avec une tension réduite de 50 V (à cause de la résistivité plus élevée de l'éluant contenant du magnésium) pendant 120 min. La figure 2.13 présente une photo d'un gel d'agarose typique où la concentration d'origamis **ouverts** a été doublée entre chaque puits pour une concentration constante de particules commerciales de 40 nm, fonctionnalisées avec des brins de séquence quelconque *ss30*. Le gel se décompose en différentes bandes correspondant chacune à des nanostructures particulières. La bande la plus rapide correspond aux particules d'or fonctionnalisées par l'ADN et le ligand, mais non-complexées à l'origami (déterminé grâce à la bande de référence sans origamis). Cette bande est souvent la plus dense et épaisse car, comme expliqué précédemment, les AuNPs sont mises en excès. La deuxième bande la plus rapide correspond à des dimères de particules d'or obtenus après une agrégation non-spécifique et non-désirée due à la longue incubation en présence de  $Na^+$  et de  $Mg^{2+}$  (également visible sur la référence). On observe que cette bande est peu intense et valide donc le choix des concentrations de cations pendant la synthèse.

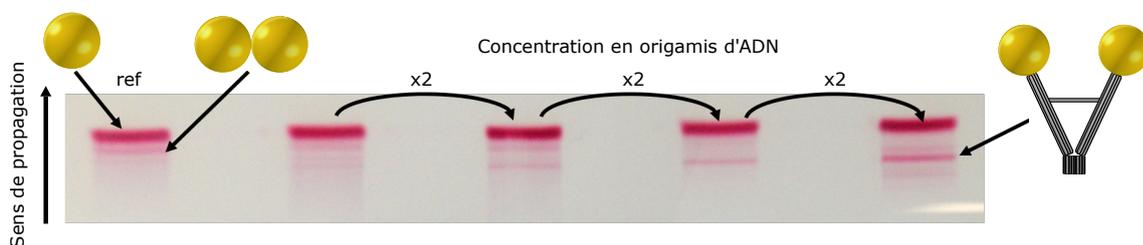


Figure 2.13: Gel de purification de dimères, assemblés sur des origamis **ouverts**, de particules commerciales couvertes d'ADN *ss30* : la concentration en origamis d'ADN est doublée entre chaque puits afin de valider le protocole de synthèse.

L'apparition d'une bande très ralentie, et de plus en plus visible lorsque l'on augmente la quantité d'origamis, correspond donc à des objets ayant une mobilité électrophorétique réduite par rapport à des dimères agrégés. Nous pouvons donc supposer que cette bande correspond aux dimères assemblés avec l'origami d'ADN, hypothèse qui sera validée en microscopie électronique par la suite. Les origamis avec 1 AuNP sont très légèrement visibles en figure 2.13 : ils correspondent certainement à la bande légère avant celle que l'on désire mais plus lente que les dimères agrégés. Cependant, cette bande étant très proche de nos dimères, il est difficile de l'exclure lors de l'extraction du gel qui se fait par la même méthode que dans le cas des particules fonctionnalisées. Il reste donc sûrement des origamis avec une seule particule dans notre échantillon final purifié. D'après cette constatation, les origamis seuls ont probablement une mobilité similaire à des particules

d'or seules dans le gel et ne devraient donc pas se retrouver dans notre échantillon final. Ils ne sont pas visibles directement dans le gel comme les particules, c'est pourquoi on ne peut les identifier. L'échantillon de dimères assemblés est ensuite concentrée par centrifugation à basse température, afin de ne pas dénaturer les origamis, avant leur caractérisation par TEM ou par des mesures optiques décrites dans le chapitre 3.

Au cours de la partie de ce chapitre détaillant l'étude de la stabilité colloïdale des particules en fonction de leur chimie de surface nous avons vu que l'utilisation du ligand *mXPEG* offre une meilleure protection que le *XPEG* vis-à-vis du magnésium. La figure 2.14 présente un gel de purification de dimères assemblés sur différents origamis avec des particules d'or commerciales couvertes d'ADN *8T* et de *mXPEG*, à gauche, et de *XPEG*, à droite. Pour les deux types de ligands, j'ai utilisé des origamis **semi-ouverts\*** et **semi-ouverts**, ce qui va nous permettre de comparer l'assemblage des dimères pour ces deux chimies de surface. La partie *XPEG* contient en plus un échantillon assemblé avec un origami **fermé\***.

Commençons par les dimères **semi-ouverts\*** : on constate que, pour les deux échantillons, la bande devant correspondre aux dimères origamis est très légère voir inexistante. Il semble donc que la synthèse avec cet origami n'ait pas fonctionné comme prévu pour les deux chimies de surface. Au contraire, pour les échantillons avec les origamis **semi-ouverts**, la bande correspondant aux dimères est bien visible. Il semble donc que cet origami ne présente pas de difficultés d'auto-assemblage avec les particules. En étudiant plus attentivement le gel, on peut observer que l'échantillon de *XPEG* présente une bande de dimères origami bien plus nette, fine et intense que l'échantillon *mXPEG*, traduisant un meilleur auto-assemblage des structures. Ainsi, contre toutes attentes, il semble préférable d'utiliser une chimie de surface alliant ADN et *XPEG* pour synthétiser des structures hybrides or / origamis d'ADN. C'est pourquoi j'ai préférentiellement utilisé cette chimie de surface par la suite. La nature exacte de cette différence de comportement n'est pas évidente à justifier : peut être un problème d'interaction non-spécifique entre les particules et le gel (mais qui aurait dû apparaître dès le première étape de fonctionnalisation) ; soit une répulsion entre le groupement aprotique terminal du *mXPEG* et les origamis.

On observe également sur la figure 2.14 de nombreuses bandes au dessus de la bande de dimères assemblés dans le cas des origamis **semi-ouverts** *XPEG* : cela indique la présence de structures où des origamis se lient plusieurs particules pour former des oligomères. Cette observation nous a permis de réduire la quantité d'origamis pour les synthèses suivantes. Finalement les dimères **fermés\*** *XPEG* semblent s'être convenablement assemblés. L'échantillon ne présente, cette fois-ci, pas de bandes correspondant à des structures de plusieurs origamis : ainsi, pour cet origami, la concentration peut être conservée pour de futures synthèses.

Comme décrit au début de ce chapitre, notre origami a été conçu et synthétisé sous plusieurs conformations : **ouvert** et **fermé** (figure 2.3). La figure 2.15 présente la photo du gel de purification de ces deux objets avec des particules d'or commerciales de 40 nm couvertes d'ADN *ss30*. La mobilité électrophorétique des dimères **ouverts** est inférieure aux systèmes **fermés** alors que la masse molaire de l'origami d'ADN et sa charge superficielle est à peine augmentée en allongeant la partie double-brin centrale. On peut alors supposer que la taille transverse supérieure des dimères **ouverts** réduit leur capacité à traverser la maille d'agarose et diminue leur mobilité pendant la purification, comme déjà

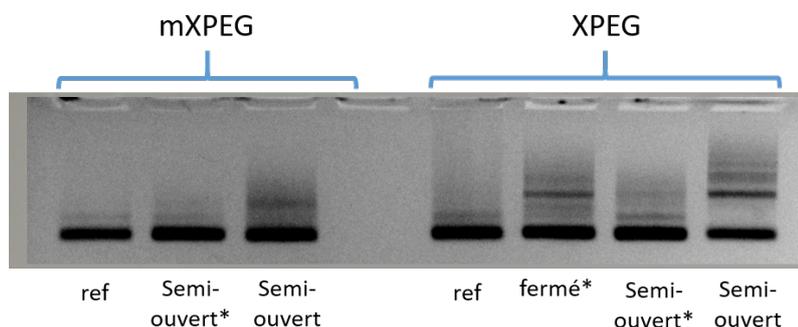


Figure 2.14: Gels de purification avec particules commerciales comparant l'auto-assemblage des dimères origami en fonction d'une chimie de surface ADN *8T* et *mXPEG*, à gauche, ou *XPEG*, à droite

observé lors des gels contenant juste les origamis d'ADN.

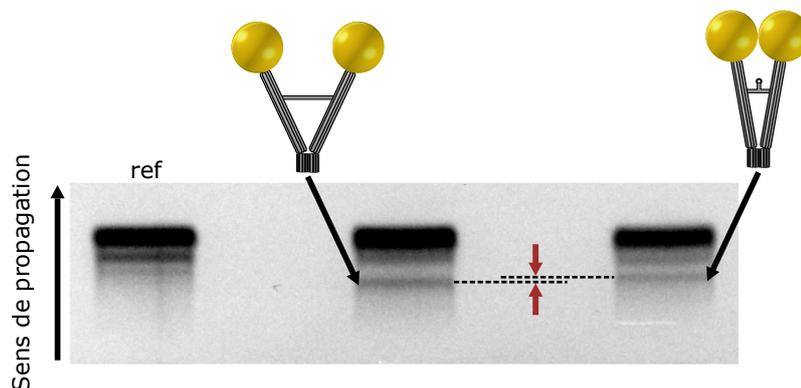


Figure 2.15: Gel de purification de dimères origami en conformation **ouvert** et **fermé** : la différence de morphologie entre les deux échantillons induit une différence de mobilité électrophorétique (image passée en noir et blanc pour amélioration du contraste) (particules commerciales ; ADN ss30)

Le figure 2.16 présente une synthèse similaire utilisant les nanoparticules d'or monodisperses de 40 nm couvertes d'ADN *8T* et de *XPEG* avec trois origamis différents. Dans ce cas, nous retrouvons également un décalage de mobilité entre des dimères assemblés autour d'un origami **fermé\***, d'un origami **dévrouillé\*** et d'un origami **ouvert**. Dans le cas des origamis **fermés\***, on observe une bande non-négligeable pour les monomères 1 particule - 1 origami. Cela peut s'expliquer par la distance faible entre les deux bras de l'origami (de l'ordre de 40 nm) permettant à une seule particule de se lier aux deux bras en même temps. De manière générale, le rendement de synthèse est systématiquement plus élevé dans le cas de dimères **ouverts** et **semi-ouverts** que dans le cas de dimères **fermés**.

De plus, je vous ai montré des gels de purification avec des ADN *8T*. Cependant l'utilisation d'un ADN plus long (*19T*) permet, en général, une meilleure stabilité colloïdale et des bandes plus fines dans les gels : le rendement d'assemblage est alors meilleur et on peut s'atteindre à une meilleure pureté de dimères.

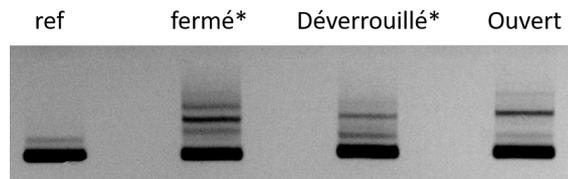


Figure 2.16: Gels de purification avec particules monodisperses : obtention des dimères origami en conformation **ouvert**, **déverrouillé\*** et **fermé\*** (image passée en noir et blanc pour améliorer le contraste) (AuNPs monodisperses ; ADN 8T ; ligand XPEG)

### 2.2.3 Analyse des dimères assemblés par microscopie électronique

Afin de valider notre processus de synthèse et la bonne formation de dimères liés par des origamis 3D d'ADN, nous avons réalisé des images en microscopie électronique en transmission (TEM) en conditions cryogéniques (cryo-EM) ou en utilisant un agent de contraste pour les électrons se liant à l'ADN (coloration négative). Ces expériences ont été menées par notre collaborateur Jean-michel Guigner de l'IMPMC à Sorbonne Université.

La cryo-EM consiste en congeler très rapidement dans de l'éthane liquide des échantillons aqueux sous forme hydratée. De cette manière ils sont figés dans une glace amorphe et non cristalline dans une morphologie identique à celle qu'ils présentent en solution. Ainsi la cryo-EM permet de réaliser des études structurales de complexes biologiques de manière beaucoup plus simple qu'avec la diffraction aux rayons X [149]. Contrairement à la coloration négative utilisée en TEM, aucun colorant ou fixateur chimique n'est requis. De plus, la cryo-EM présente l'avantage de ne pas dénaturer la conformation spatiale du dimère : l'environnement peut rester proche des conditions physiologiques (en termes de pH et de concentration en sel). Cependant cela a l'inconvénient de consommer beaucoup de nanostructures, l'échantillon nécessitant d'être très concentré : nous n'avons pu effectuer de telles mesures que sur un échantillon de dimères. A l'inverse, de nombreuses mesures de TEM en coloration négative ont été effectuées pour différents types d'origamis et pour différentes particules d'or commerciales ou monodisperses. Dans ce cas, la préparation de l'échantillon est similaire au cas des origamis seuls : traitement plasma du substrat puis fonctionnalisation chimique pour obtenir une surface chargée positivement avec un agent de contraste à base d'uranyles ; puis dépôt et séchage de l'échantillon après concentration par centrifugation à basse température.

Les figures 2.17, 2.18, 2.19 et 2.20 présentent des images en microscopie électronique à transmission avec coloration négative de dimères assemblés. Un exemple d'images de cryo-EM est donné dans la figure 2.17 en haut à droite. Les images de TEM sont traitées avec le logiciel GIMP afin d'augmenter le contraste au niveau des origamis d'ADN. Les particules peuvent parfois apparaître "floues" car elles sont sur-focalisées afin de rendre plus visible l'origami d'ADN. Des images ont été réalisées pour plusieurs types d'origamis, de chimies de surface et de natures de particules.

La figure 2.17 présente des images de dimères **ouverts** de particules commerciales couvertes d'ADN *ss30* (en haut) ou *9T* (en bas). Pour ces deux chimies de surfaces, on observe tout d'abord que la synthèse est un succès. De plus, l'origami semble avoir conservé un angle non négligeable entre ses bras, ce qui est en adéquation avec le design de cette nanostructure hybride.

La figure 2.18 représente elle des images de dimères avec des particules commerciales et les mêmes chimies de surface mais cette fois-ci avec des origamis **fermés**. Une fois de plus, la synthèse semble avoir bien fonctionné avec cet origami. De plus, on remarque que, cette fois-ci, pour les deux chimies de surface, les particules semblent être collées au sein des dimères. Avec ce design, les particules devraient conserver une dizaine de nanomètre de séparation au sein des dimères. Cependant, avec le phénomène de séchage de l'échantillon sur la grille, il n'est pas étonnant que, pour une si petite distance, les particules agrègent. On peut donc conclure que la différenciation entre les conformations **ouverte** et **fermée** semble donc possible en TEM pour ces deux chimies de surfaces *ss30* et *9T*.

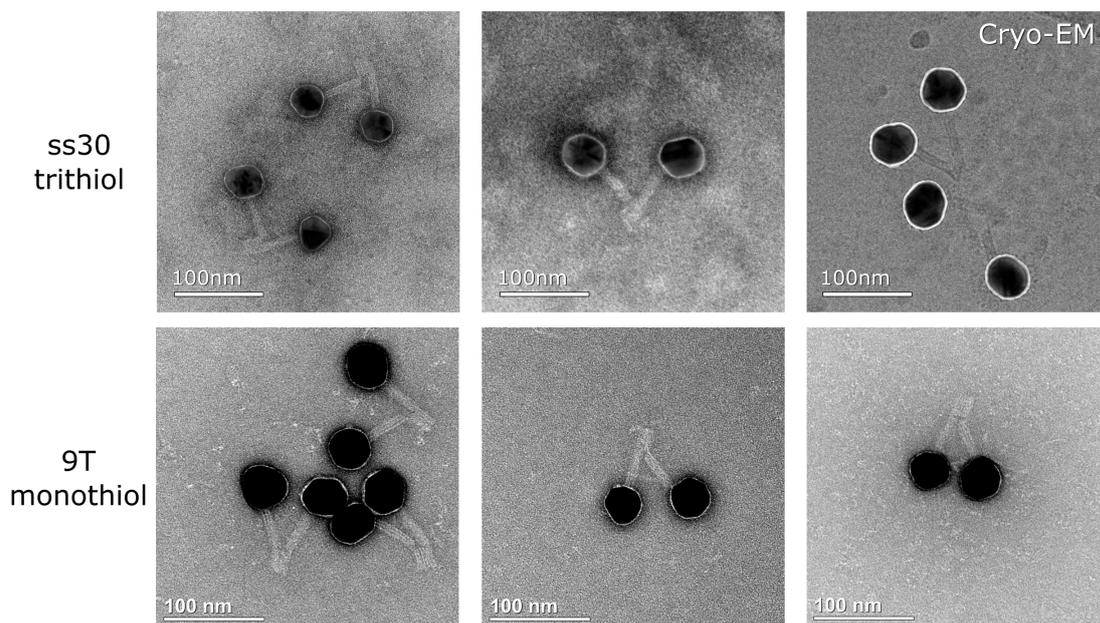


Figure 2.17: Images TEM avec coloration négative de dimères origami particules commerciales **ouvert**

La figure 2.19 montre des images de dimères **semi-ouverts** avec des particules commerciales couvertes d'ADN *ss30* et **semi-ouverts\*** avec des particules monodisperses couvertes de *19T*. La différence de morphologie entre les particules monodisperses et les particules commerciales est largement discuté dans le chapitre 3. Mais nous pouvons tout de même, dès à présent, noter que ces premières semblent beaucoup plus sphériques. Avec cette conformation d'origamis, les particules sont soit très légèrement espacées soit agrégées au sein des dimères. Il semble, dans ce cas, qu'il serait difficile de différencier en TEM cette conformation de la conformation **fermée** observée précédemment à la figure 2.18, et ce pour les deux types de particules.

Finalement la figure 2.20 montre des images de dimères avec un origami défini pour être sensible à des fluctuations de pH, présenté au cours du chapitre 5, et des particules monodisperses couvertes d'ADN *19T*. Au pH utilisé dans ce cas, l'origami doit être comparable à un origami **semi-ouvert**. Il est alors, comme précédemment difficile de différencier ces objets de dimères **fermés** par le seul intermédiaire d'images de TEM. Il a déjà été

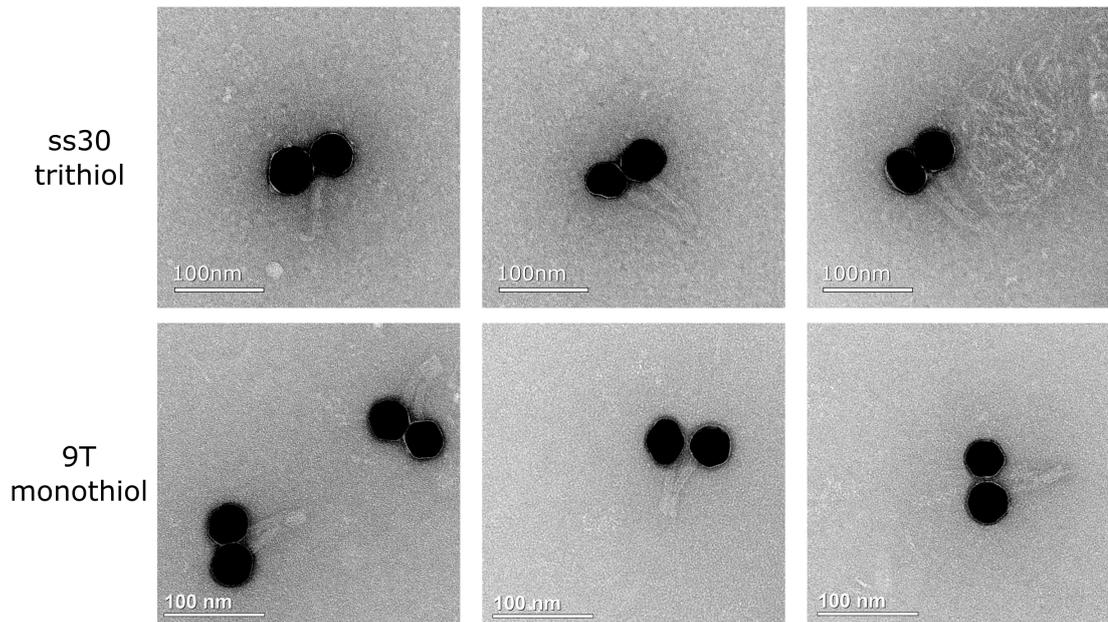


Figure 2.18: Images TEM avec coloration négative de dimères origami particules commerciales **fermé**

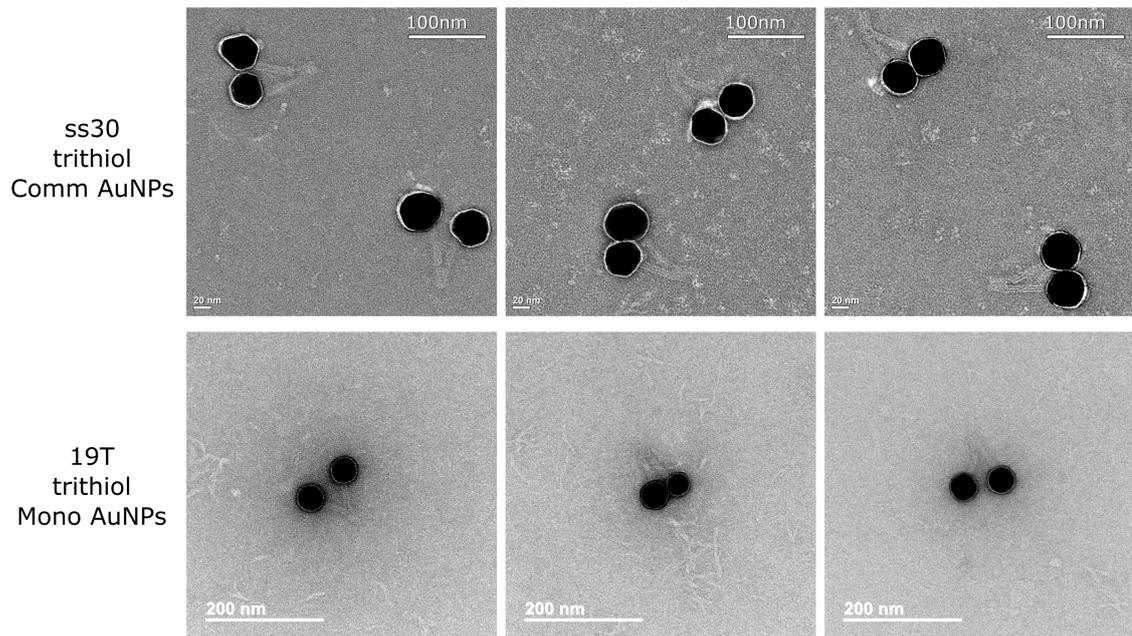


Figure 2.19: Images TEM avec coloration négative de dimères origami particules commerciales **semi-ouvert** et **semi-ouvert\*** pour les monodisperses

discuté dans la littérature que la microscopie électronique déchantillons secs contenant des dimères de particules d'or de 40 nm, doit donc être utilisée avec un œil critique à cause de problèmes d'agrégation à la préparation des échantillons [11].

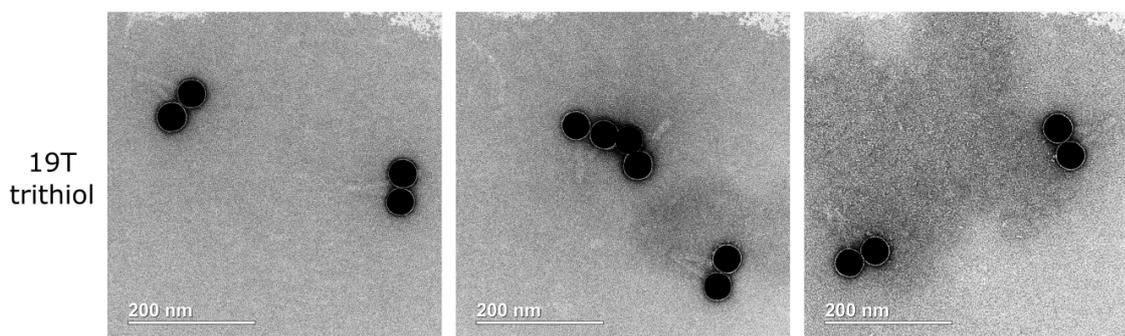


Figure 2.20: Images TEM avec coloration négative de dimères origami particules monodisperse, origami sensible au pH (origami : **i-motif polyT**, voir chapitre 5)

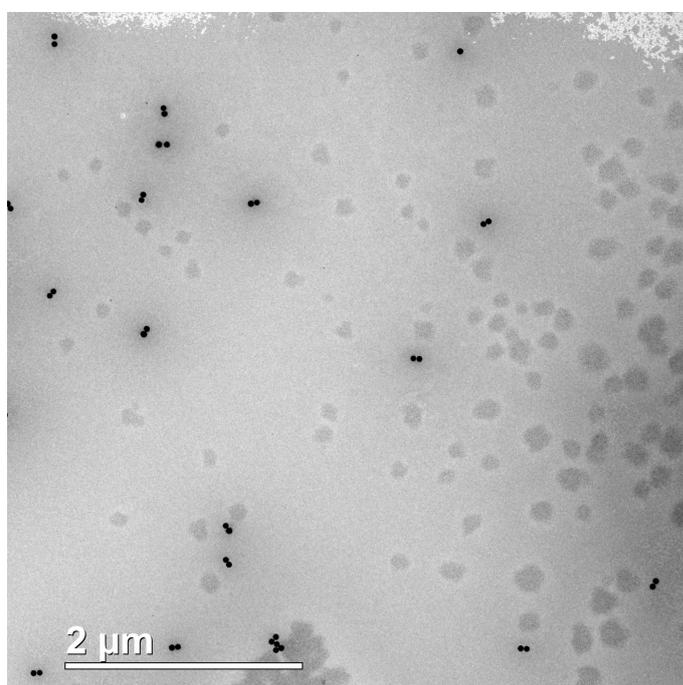


Figure 2.21: Images TEM avec coloration négative de dimères origami sensible au pH (origami : **i-motif polyT**, voir chapitre 5 ; AuNPs : monodisperse ; ADN : polyT 19b, trithiol en 5')

Nous avons également réalisé des images en champ large afin d'estimer la pureté en dimères de l'échantillon final, c'est-à-dire pour s'assurer de la réussite du protocole de synthèse et de purification. La figure 2.21 montre un exemple d'image en champ large avec les dimères sensibles au pH présentés précédemment avec des particules monodisperses et couvertes d'ADN 19T.

Pour estimer la pureté des échantillons grâce à ces images champ large, je n'ai pris en compte que les structures dimériques et monomériques visibles sur ces images en excluant les agrégats. Ainsi, il m'a été possible d'estimer le pourcentage de dimères observés pour les échantillons déjà présentés. La figure 2.22 présente ces résultats. Pour les dimères *ss30*, la pureté est de 25% pour les **ouverts** et de 30% pour les **fermés**. Elle passe

respectivement à 40% et 47% grâce à l'utilisation d'ADN polyT (9T). Elle est, par contre, de 38% pour les dimères **semi-ouverts\*** avec un ADN 19T trithiol. Nous avons vu, avec l'analyse des gels de purification, que la synthèse de dimères avec cet origami ne fournit pas une bande très fine (voir figure 2.14). Cette conclusion semble donc se confirmer avec les images TEM. Au contraire les origamis sensibles au pH avec le même ADN de surface présente, eux, une pureté de plus de 87%.

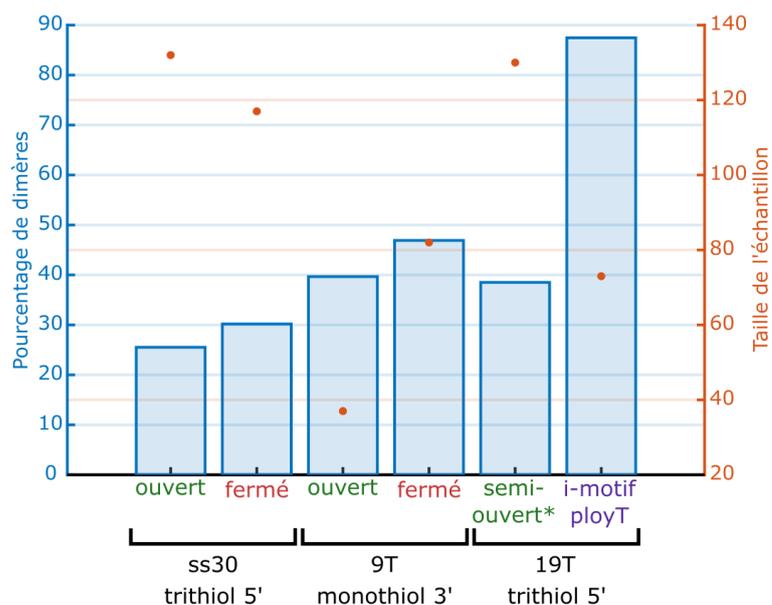


Figure 2.22: Pureté des échantillons dimères origami estimée par analyse d'images TEM en champ large, telle que 2.21

En conclusion, cette analyse en TEM a permis de valider mes protocoles de synthèse et d'assurer l'assemblage de dimères de particules d'or de 40nm sur différents origamis d'ADN en forme de Y.



# Chapitre 3

## Spectroscopie de dimères uniques

### Sommaire

---

<b>3.1 Spectroscopie de diffusion</b> . . . . .	<b>66</b>
3.1.1 Montage optique . . . . .	66
3.1.2 Préparation des échantillons . . . . .	68
3.1.3 Sélection des dimères . . . . .	70
3.1.4 Acquisition de spectres de diffusion . . . . .	71
3.1.5 Traitement des spectres de diffusion . . . . .	71
3.1.6 Analyse des spectres de diffusion . . . . .	73
3.1.7 Outil de simulations numériques . . . . .	74
<b>3.2 Amélioration de la dispersion spectrale</b> . . . . .	<b>75</b>
3.2.1 Caractérisation des particules d'or . . . . .	76
3.2.2 Simulations numériques des propriétés optiques des dimères . . . . .	78
3.2.3 Particules commerciales Vs monodisperses . . . . .	84
<b>3.3 Relation longueur d'onde - distance interparticule</b> . . . . .	<b>87</b>
3.3.1 Particules commerciales . . . . .	88
3.3.2 Particules monodisperses . . . . .	89
<b>3.4 Protocole d'analyse HSL</b> . . . . .	<b>93</b>
3.4.1 Acquisition et traitement des données . . . . .	94
3.4.2 Choix des dimères . . . . .	95
3.4.3 Validation du nouveau protocole . . . . .	95
3.4.4 Comparaison des deux protocoles . . . . .	97

---

Le but de ce chapitre est de présenter les techniques expérimentales et numériques que j'ai développées et exploitées pendant ma thèse pour analyser les propriétés optiques des dimères de particules d'or assemblés sur des origamis d'ADN. Dans un premier temps, je vais présenter le montage optique utilisé pour mesurer le spectre de diffusion d'une nanostructure unique en champ sombre et l'outil numérique *MNPBEM* que j'ai exploité pour associer ces données optiques avec des informations morphologiques sur mes échantillons. Je vais ensuite discuter l'influence de la polydispersité en forme des nanoparticules d'or sur ces propriétés optiques et comment le *MNPBEM* permet de simuler efficacement les propriétés optiques de dimères composés de particules commerciales ou monodisperses. Surtout, cette analyse me permettra de définir une relation théorique entre fréquence de résonance plasmon et distance interparticule qui sera essentielle pour l'analyse de mes données dans les chapitres 4 et 5. Je finirai ce chapitre par la description d'une autre approche expérimentale permettant de remonter aux distributions de propriétés optiques de dimères auto-assemblés n'utilisant qu'une simple caméra couleur.

### 3.1 Spectroscopie de diffusion de nanostructures uniques

Le protocole expérimental développé au cours de cette thèse vise à caractériser optiquement la réponse d'une nanostructure hybride unique à un stimulus spécifique. C'est à dire que nous souhaitons suivre l'évolution de la fréquence de résonance plasmon longitudinal d'un dimère unique dans le temps et en fonction de paramètres modulés activement, tels que la force ionique, le pH et l'ajout de brins d'ADN spécifiques. A ces fins, l'utilisation de chambres microfluidiques et la microscopie en champ sombre, permettant l'analyse des spectres de diffusion, ont été choisis. Une étude optique d'ensemble, bien que plus simple à mettre en œuvre, présente en effet de nombreux désavantages pour notre étude. Tout d'abord, les particules d'or ont des distributions de forme et de tailles telles qu'elles induisent un élargissement inhomogène important de la section efficace d'extinction en suspension.

Cet inconvénient se retrouvera bien sûr aussi dans une étude à l'échelle de la structure unique. Cependant, le fait de pouvoir suivre l'évolution de la réponse optique des dimères uniques permet non seulement de remonter à une réponse moyenne mais également d'analyser la dispersion spectrale des propriétés optiques. Surtout, la capacité de suivre l'évolution spectrale de chaque dimère au cours de l'expérience permet d'avoir accès à des informations spécifiques à chaque nanostructure. De plus, une solution de dimères n'étant jamais parfaitement pure, elle contient aussi des monomères d'une part et des structures plus larges (trimères et agrégats plus grands) d'autre part. La réponse optique de ces différents groupements est alors intégrée dans le spectre d'une mesure d'ensemble. Enfin, comme nous l'avons indiqué en introduction, la stabilité, vis-à-vis d'une augmentation de la force d'ionique, d'une suspension colloïdale de particules d'or est inférieure à la stabilité de dimères auto-assemblés. En isolant les nanostructures hybrides dans une chambre microfluidique, il est alors possible d'étudier une plus grande amplitude de variation de la force ionique [72, 8].

#### 3.1.1 Montage optique

La caractérisation optique s'effectue en microscopie en champ sombre afin d'étudier les spectres de diffusion des dimères. La microscopie en champ sombre permet d'observer la

lumière diffusée par un échantillon en empêchant la lumière directement transmise d'être détectée : un objet diffusant va alors apparaître comme lumineux sur un fond noir. Cela nécessite que la section efficace d'extinction des objets étudiés ne soit pas limitée à une section efficace d'absorption mais que la section efficace de diffusion soit importante. Comme évoqué dans le chapitre 1, cela nécessite des particules d'or d'au moins 40 nm de diamètre.

La figure 3.1 présente le schéma du montage utilisé. J'ai utilisé, au cours de ces expériences, un microscope classique inversé en champ sombre (IX71, Olympus). L'échantillon est éclairé par une lumière blanche incohérente non polarisée d'une lampe halogène qui traverse tout d'abord un filtre froid de longueur d'onde de coupure égale à 680 nm. Puis la lumière est focalisée à l'aide d'un condenseur en fond noir qui permet également de limiter l'éclairage de l'échantillon à un cône lumineux (en jaune sur la figure). Les angles des faisceaux provenant du cône du condenseur sont supérieurs aux angles d'acceptation de l'objectif. C'est à dire que les faisceaux incidents correspondent à des ouvertures numériques supérieures au maximum de l'objectif de collection. L'objectif ne récupère alors que la lumière diffusée (en vert sur la figure). Cette dernière est ensuite dirigée soit vers la caméra CCD couleur (QiCam, Roper), qui permet la visualisation de l'échantillon, soit vers le spectromètre à réseaux fibré (Acton SP 2300, Princeton Instruments), qui permet quant à lui l'acquisition des spectres de diffusion.

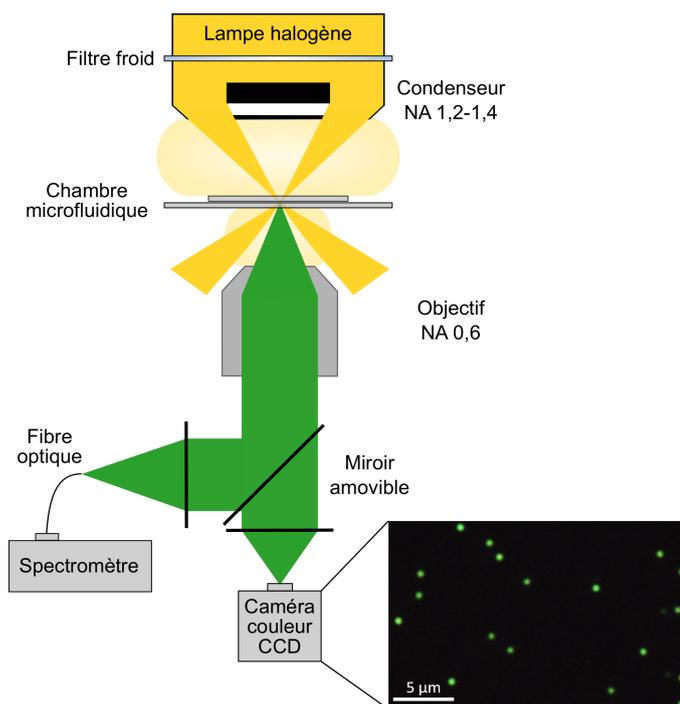


Figure 3.1: Représentation schématique du microscope en champ sombre utilisé, avec une image typique d'échantillons de dimères de particules monodisperses assemblées sur un origami et obtenue sur la caméra couleur CCD.

Pour l'éclairage en champ sombre, l'ouverture numérique du condenseur doit être supérieure à celle de l'objectif. Nous utilisons pour nos expériences un condensateur à immersion dans l'huile avec une ouverture numérique (Numerical aperture, NA) comprise entre 1,2 et 1,4 ; et un objectif à immersion dans l'huile également avec une NA de 0,6.

L'utilisation de condenseurs et objectifs à immersion permet d'avoir une plus grande densité de photons sur l'échantillon, moins de diffusion sur les lames de verres et un plus grand désaccord de NA entre l'excitation et la collection. Au final, cela permet d'optimiser le rapport signal/bruit pour observer des particules d'or de 40 nm.

L'objectif est de visualiser des dimères uniques. Compte tenu de leur taille bien inférieure à la longueur d'onde de la lumière visible, les dimères vont apparaître comme des points uniques de dimension contrôlée par la limite de diffraction, soit environ le diamètre d'une tâche d'Airy :

$$D \approx \frac{1,22\lambda}{NA} \approx 1\mu m \quad (3.1)$$

La figure 3.3 montre une image typique d'échantillon de dimères origamis obtenue avec la caméra couleur CCD (1392 x 1040 pixels de 4,65  $\mu m$  de côté). Chaque point vert correspond à un dimère unique dont la visualisation est bien définie par la limite de diffraction comme expliqué. C'est via cette image que les dimères seront sélectionnés à la main dans une étape détaillée prochainement.

Une fibre optique multimode de 50  $\mu m$  de diamètre fait office de trou de confocalité et permet ainsi de réduire, à l'échelle de la structure unique, la lumière dirigée vers le spectromètre. Ce dernier est composé de plusieurs réseaux, de pas différents, permettant l'obtention de différents intervalles spectraux libres. L'image à la sortie du réseau est envoyée sur une caméra CCD rectangulaire formée de 100 x 1024 pixels de 20  $\mu m$  de côté, refroidie à  $-70^\circ C$ . Un exemple de spectre de diffusion d'un dimère origami est présenté dans la figure 3.4a.

### 3.1.2 Préparation des échantillons

Les dimères doivent être conservés en solution pour garantir leur stabilité et éviter leur agrégation en séchant. Pour cela, les échantillons sont placés dans des chambres microfluidiques. L'utilisation de chambres microfluidiques permet d'étudier le changement de conformation des dimères restés libres d'évoluer d'une conformation à une autre pour l'étude de nanostructures dynamiques. In fine, le changement de conformation doit être contrôlé en changeant des concentrations de molécules ou d'ions dans l'environnement de la nanostructure : avec ce dispositif, il nous est possible d'injecter des solutions aqueuses dans la chambre.

Nous avons conçu la nanostructure hybride de telle sorte à ce que les dimères se greffent dans la chambre par l'intermédiaire de l'origami. Pour cela, le pied de notre origami comporte 6 biotines, comme déjà présenté. Par l'intermédiaire d'un assemblage biotine-neutravidine-biotine les dimères sont alors immobilisés dans la chambre microfluidique. Le pied étant une partie indépendante des bras, cela permet de ne pas influencer sur leur mouvement, déterminant la distance interparticule. De plus, cela permet d'affiner la pureté de l'échantillon au cas où elle n'est pas été parfaite lors de l'extraction du gel de purification ou que l'échantillon se soit quelque peu dégradé au cours de sa conservation. En effet, seul les origamis peuvent se fixer dans la chambre : elle ne contiendra à priori donc que

des dimères origamis ou des origamis avec une seule particule. La différence entre ces deux objets étant visible sur la caméra couleur, la dernière étape de tri se fera lors de la sélection des dimères dans une prochaine étape détaillée ci-après.

Les chambres microfluidiques que nous utilisons sont réalisées de manière artisanale. La figure 3.2 présente schématiquement les chambres microfluidiques utilisées ainsi qu'une représentation de la fonctionnalisation. Ainsi, elles se composent de deux lamelles de verre : une de 24x60 mm et une de 24x40 mm, et de 120  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, séparées par deux fines couches de parafilm d'une centaine de microns d'épaisseur. Une fenêtre est découpée au sein du parafilm et correspond à la chambre. Elle est alimentée par deux micropipettes, de 200  $\mu\text{m}$  de diamètre environ, placées entre les deux couches de parafilm. Le volume de solution dans la chambre varie alors entre 20 et 30  $\mu\text{L}$ .

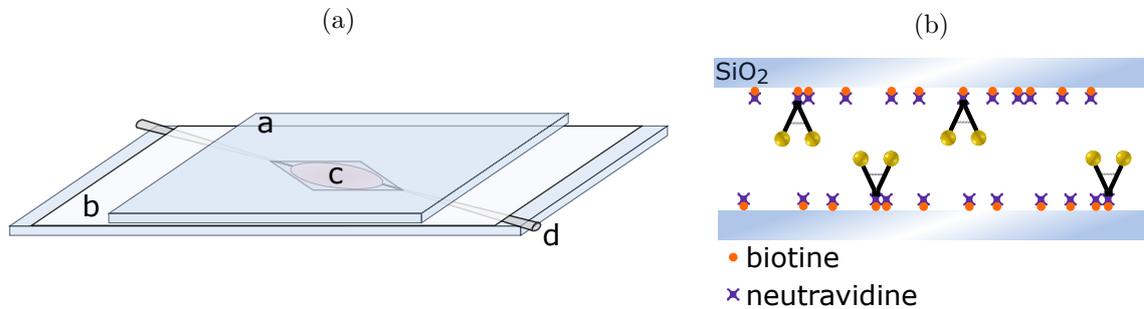


Figure 3.2: Représentation schématique des chambres microfluidiques utilisées (a) : a. lamelles de verre, b. parafilm, c. échantillon et d. micropipettes ; ainsi que leur fonctionnalisation, en coupe transverse (b).

La fonctionnalisation s'effectue en plusieurs étapes, chacune séparée par un rinçage de la chambre avec une solution tampon de pH 7,6. La solution de rinçage se compose de Tris-HCl à 10 mM et de NaCl à une certaine concentration  $x$ . Elle sera ainsi nommée T $x$  où  $x$  représente la concentration en NaCl exprimée en mM. Cette solution contient également du  $\text{MgCl}_2$  afin d'assurer le maintien de la compaction de l'ADN des origamis au sein de la chambre. La concentration de magnésium sera toujours précisée après celle de sodium si il y en a. Dans une première étape nous injectons de la *BSA-biotine* (albumine de sérum bovin fonctionnalisée avec de la biotine) pour en recouvrir la chambre. Après 10 min d'incubation, la chambre est rincée avec une solution tampon T50 avec 5mM de  $\text{MgCl}_2$ . Puis elle est remplie de *NeutrAvidine*, un mutant neutre de la *StreptAvidine*, qui se lie à la biotine par de nombreuses liaisons hydrogène. Après un nouveau rinçage au T50 avec 5mM de  $\text{MgCl}_2$ , la chambre est remplie de *Superblock*, qui empêche les interactions non-spécifiques entre les nanostructures et les parois de la chambre sans *NeutrAvidine*. Enfin, après un rinçage au T5 avec 5mM de  $\text{MgCl}_2$ , les dimères origamis sont mis à incuber pendant plusieurs dizaines de minutes jusqu'à une heure puis rincés, au moins deux fois, au T5 avec 5mM de  $\text{MgCl}_2$ . Le temps d'incubation des dimères dépend fortement de la concentration de dimères incubés : ainsi, moins la concentration est importante, plus le temps d'incubation optimal est grand.

### 3.1.3 Sélection des dimères

Une fois la chambre placée sur le microscope, l'échantillon est visualisé grâce à une image plein champ sur la caméra couleur CCD. Il apparaît alors de nombreuses tâches d'Airy colorées et lumineuses. La couleur observée est déjà un indice important quant à la nature de l'objet observé. En effet grâce à la Théorie de Mie généralisée [8, 11] ainsi que de nouveaux outils se basant sur la *Boundary Elements Method* (BEM, qui a été plus utilisée au cours de cette thèse que la théorie de Mie) [150], il est possible d'estimer la longueur d'onde de résonance d'un dimère en fonction de la distance interparticule. Ainsi, la longueur d'onde pour un dimère **écarté** de particules de 40nm de diamètre est d'environ 550nm lorsque les particules sont éloignées ( $d > 20$  nm), soit une couleur verte. Quand elles sont proches, ( $d \simeq 10$  nm) elle est d'environ 565nm, ce qui correspond plus à une couleur jaune. L'échantillon présenté dans la figure 3.3 correspond à des dimères avec une grande distance interparticule : c'est pourquoi la majorité des tâches d'Airy sont vertes.

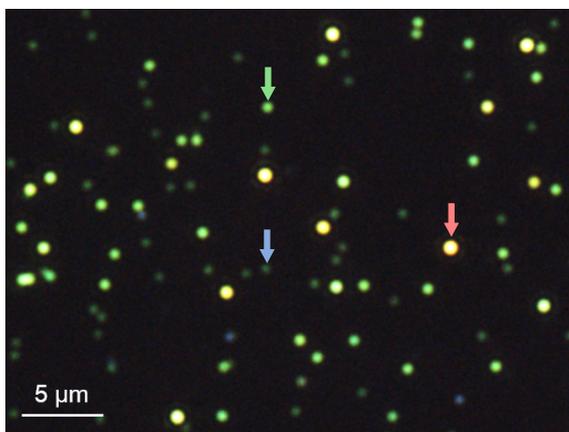


Figure 3.3: Exemple d'image obtenue sur la caméra CCD couleur permettant la sélection des tâches d'Airy correspondant à des dimères (flèche verte) ; les monomères (flèche bleue) et les agrégats (flèche rouge) sont ainsi éliminés de l'analyse

Cette information permet d'éliminer toutes les impuretés, qui apparaissent bleutées. Elle permet également théoriquement de différencier les monomères et les agrégats. Les monomères ayant une longueur d'onde de résonance égale à 535-540 nm, sont d'un vert différent des dimères **écartés**, et les agrégats, d'une longueur d'onde supérieure à celle des dimères apparaissent plus rouge. Surtout, cette différenciation par la couleur est complétée par une différence d'intensité. A exposition constante, les monomères ont une section efficace de diffusion plus de deux fois plus faible que les dimères, qui eux-même en ont une plus faible que les agrégats. Cela est visualisable sur la figure 3.3 : agrégat indiqué par flèche rouge ; dimère par la flèche verte et monomère par la flèche bleue.

Toutefois, dans le cas des particules d'or commerciales, leur inhomogénéité de forme et de taille limite l'efficacité de cette étape de sélection. Leurs réponses optiques présentent donc une hétérogénéité dans les couleurs et les intensités observées pour des dimères. Ainsi, certains gros monomères seront conservés, de même pour certains agrégats. Comme je le montrerai dans ce chapitre, l'utilisation de particules plus monodisperses facilite grandement cette étape de tri.

### 3.1.4 Acquisition de spectres de diffusion

Le plan focal de la caméra couleur est conjugué avec l'entrée de la fibre optique. L'échantillon étant fixé sur une platine piézoélectrique (PI) contrôlée par ordinateur, il est possible de le déplacer afin d'aligner une tâche d'Airy avec l'image de la fibre sur l'échantillon dont la position est connue et fixe. Lors de précédentes thèses à l'Institut Langevin, un protocole d'automatisation de l'acquisition des spectres a été développé par l'intermédiaire de Laurent Lermusiaux et Vincent Maillard [8], dont voici le déroulement :

- Visualisation en image plein champ avec la caméra couleur CCD (de 300 ms à 600 ms d'intégration) de l'échantillon. La position du volume focal de mesure, conjugué à l'entrée de la fibre optique, est connue.
- Sélection d'un nombre de dimères dont on souhaite mesurer le spectre : la platine piézoélectrique a un déplacement maximum de  $200 \times 200 \mu m$ . Chaque dimère choisi est alors virtuellement numéroté et sa position relative est enregistrée. Cela définit un parcours programmé pour la platine afin d'aligner, successivement, chaque dimère sur le volume focal de mesure. Aux vues des dérives mécaniques de l'échantillon dans le temps, on ne programme, généralement, une mesure consécutive que pour une dizaine de dimères.
- Le spectre de diffusion brut  $S_{brut}$  est obtenu avec un temps d'intégration de la caméra CCD de 2 secondes.
- Un spectre de même temps d'intégration, correspondant à une zone ne contenant ni particule ni impureté, est finalement acquis afin de pouvoir corriger  $S_{brut}$  du fond ainsi que de la dépendance spectrale de la lampe et du spectromètre, en post-traitement. Ce spectre est nommé  $S_{fond}$ .

### 3.1.5 Traitement des spectres de diffusion

A présent, pour obtenir le spectre de diffusion  $S$  du dimère, corrigé le plus possible de ces composantes parasites, il est nécessaire de soustraire le signal du fond noir  $S_{fond}$ , au signal mesuré  $S_{brut}$ , et le corriger de la réponse spectrale de la lampe d'excitation et du spectromètre. Ainsi l'estimation du spectre de diffusion normalisé est défini par la formule suivante :

$$S = \frac{S_{brut} - S_{fond}}{S'_{fond}} \quad (3.2)$$

où  $S'_{fond}$  est le spectre  $S_{fond}$  lissé (pour ne pas additionner du bruit expérimental dans ce traitement) auquel on a soustrait  $S_{fond_{min}}$  pour corriger un offset présent sur le signal du spectromètre. La figure 3.4a présente un spectre de diffusion normalisé typique des dimères origamis étudiés. Le mode longitudinal domine la résonance face à des modes transverses dégénérés comme déjà évoqué lors du chapitre 1. Le mode longitudinal présente une section efficace de diffusion maximale et se décale vers le rouge quand la distance interparticule  $d$  est réduite alors que les modes transverses sont très peu sensibles à  $d$ .

Lorsque les particules sont éloignées, donc avec un couplage plasmon faible, la longueur d'onde de résonance du mode longitudinal est proche de celle des modes transverses : il y a recouvrement des spectres et un seul pic est visible dans le spectre présenté. Cependant

lorsque les particules se rapprochent, la composante longitudinale se décale vers le rouge et laisse alors apparaître un léger épaulement correspondant à la composante transverse [8]. Il arrive que la composante transverse et la composante longitudinale soient d'intensités très proches, en fonction de l'orientation du dimère dans la chambre (qui influe sur la collection du rayonnement de chaque mode par l'objectif de microscope). Dans ce cas, il est parfois difficile de visualiser ces deux composantes et d'identifier la fréquence de résonance longitudinale qui nous intéresse. En pratique, chaque sommet de spectre est ajusté avec une lorentzienne en énergie (courbe noire sur la figure 3.4a). Le sommet de cette lorentzienne permet donc d'identifier la longueur d'onde de résonance longitudinale.

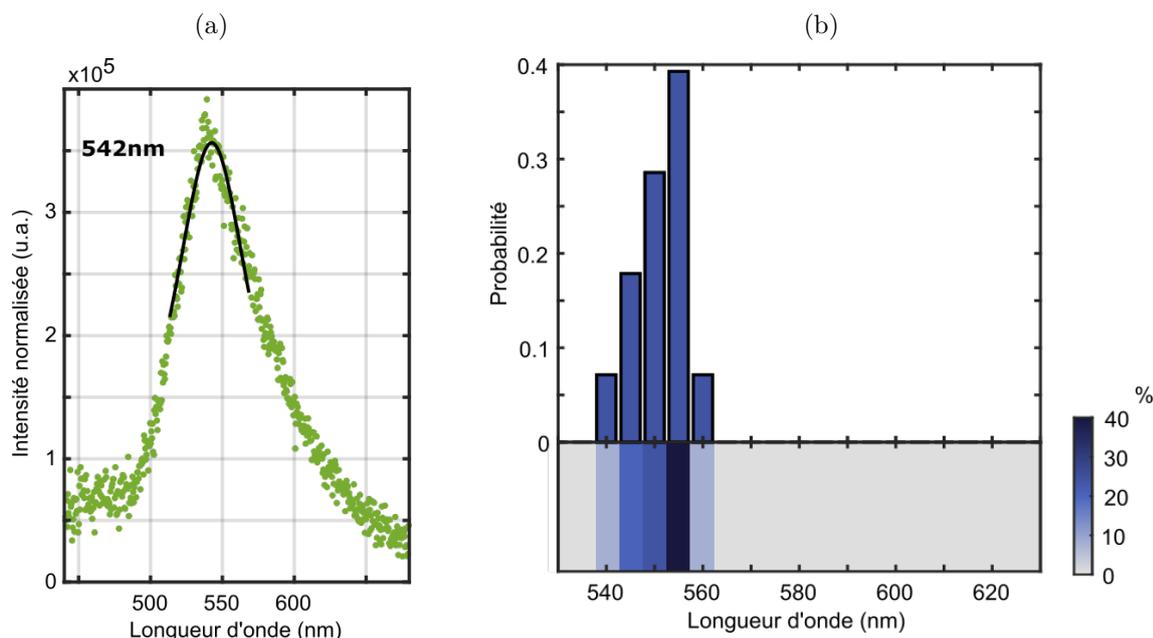


Figure 3.4: Exemple de spectre de diffusion d'un dimère de particules d'or monodisperses après post-traitement (en pointillés vert) et ajustement par une lorentzienne (courbe noire) : la valeur de longueur d'onde identifiée est alors de 542nm (a). Exemple de distribution de longueurs d'onde de résonance obtenue pour un échantillon de dimères et représentée sous forme d'histogramme (en haut) et de map2D (en bas) (b).

Comme cette information est obtenue pour chaque dimère, il est possible de donner la distribution des fréquences de résonances pour un échantillon donné, dans un environnement physicochimique fixé. Au cours de cette thèse, et afin d'étudier l'influence de l'environnement biochimique sur les nanostructures hybrides considérées, nous allons suivre l'évolution des distributions de fréquences de résonances de dimères uniques en fonction du temps et de stimuli spécifiques, tels que la force ionique, le pH ou l'ajout de brins d'ADN particuliers. Une fois la mesure des spectres de résonance effectuée avec le protocole précédent, un des paramètres expérimentaux est modifié. Le paramètre modifié dépend de la structure de la partie centrale de l'origami. En pratique, j'injecte une solution aqueuse spécifique dans la chambre en utilisant un volume sensiblement supérieur au volume de la chambre, soit 500  $\mu\text{L}$  environ. Je laisse alors la chambre incuber typiquement 1h avant d'analyser à nouveau les fréquences de résonance plasmon des dimères uniques.

Parfois, l'incubation dure tout une nuit : je préciserai ces étapes de longue incubation dans les expériences des chapitres suivants. Ainsi les résultats de ces mesures optiques seront présentés, d'une part sous forme de distribution de la longueur d'onde de résonance d'une population dans des conditions données, et d'autre part en présentant l'évolution de chaque spectre individuellement.

Au delà de la valeur de la longueur d'onde de résonance, chaque spectre contient une information sur l'amplitude de la résonance longitudinale. En effet, précédemment, il fut présenté qu'au sein d'un échantillon donné, l'intensité lumineuse des tâches d'Airy varie en fonction des différentes structures (monomères, dimères et agrégats). Entre des conformations différentes de dimères, l'intensité lumineuse devrait elle aussi être différente, maximale pour des dimères avec de courtes distances interparticules. Le suivi de la conformation des différentes nanostructures pourrait alors se faire également suivant ce critère. Cependant, l'amplitude dépend de l'alignement du montage. Malheureusement cet alignement peut légèrement varier d'une expérience à l'autre et même au cours d'une expérience sur plusieurs jours. En effet, lors de l'injection dans la chambre d'une nouvelle solution, afin de modifier l'environnement biochimique, il est difficile de ne pas légèrement déplacer l'échantillon ou la focalisation du microscope. Retrouver exactement un alignement identique est alors incertain. Au contraire, la calibration du spectromètre est régulièrement vérifiée grâce à une lampe à vapeur de mercure et est très reproductible. C'est pour cette raison que seules les valeurs de fréquences de résonances sont comparées au sein de cette thèse.

### 3.1.6 Analyse des spectres de diffusion

L'estimation de la longueur d'onde de résonance des dimères à partir des spectres normalisés  $S$ , est obtenue à l'aide de Matlab. Pour cela, une fenêtre d'au moins 50 nm est définie autour du maximum, puis une lorentzienne ajustée au spectre nous permet d'identifier la valeur de la longueur d'onde de résonance (Figure 3.4). Pour chaque expérience, plusieurs dizaines de dimères sont ainsi suivis et se voient donc attribuer leur longueur d'onde de résonance (une cinquantaine de dimères pour la plupart des mes expériences). Pour observer l'évolution de la conformation des dimères, nous comparons les distributions de longueur d'onde et la distribution de leurs variations au cours de l'expérience. Cependant, au cours de l'expérience, plusieurs phénomènes peuvent altérer certains dimères et donc diminuer le nombre de dimères comptabilisés. Les exemples les plus courants sont :

- un dimère se transforme en monomère ou disparaît : ce problème arrive généralement lors des rinçages permettant la modification de l'environnement biochimique. Une ou deux particules se détachent des bras de l'origami. Dans le cas où le dimère disparaît, il est difficile de savoir si cela est dû au détachement de l'origami lui même ou des deux particules. C'est un problème important, variable suivant les différentes structures de dimères origamis. En effet, cela peut impacter jusqu'à 25% des dimères sélectionnés.
- les solutions que nous injectons dans la chambre peuvent introduire des impuretés diffusantes qui peuvent venir se déposer à proximité ou sur un dimère et alors empêcher la mesure. En pratique, c'est un phénomène très rare.
- lors de l'utilisation de particules commerciales, une forte anisotropie peut induire

des résonances supplémentaires empêchant l'ajustement par une lorentzienne mais cela reste également assez rare (moins de 10% des dimères).

De plus, quand plusieurs distributions de fréquences de résonance sont mesurées sur un même échantillon statistique de dimères, je retire de cet échantillon de dimères ceux dont la fréquence de résonance ne varie jamais, pendant toutes les étapes, de plus de 1 nm. Cela me permet de ne pas considérer de gros monomères que j'aurais sélectionné par erreur ou de retirer des dimères qui seraient bloqués dans une conformation donnée en présentant, peut-être, une interaction non-spécifique avec la surface de la chambre microfluidique. Évidemment, je ne retire ces dimères que si leur nombre est statistiquement négligeable et donc que la fréquence de résonance médiane des dimères a varié au cours des différentes étapes de mesure. En pratique, le nombre de ces objets spectralement invariables doit rester inférieur à 10% des dimères restant dans mon échantillon statistique à la fin des différentes mesures optiques.

La figure 3.4b montre un exemple type des distribution de longueur d'onde obtenue avec des dimères origamis. Au cours de cette thèse, les distributions sont majoritairement représentées en "map 2D" (partie inférieure de la figure). Cette représentation facilite grandement la comparaison entre plusieurs distributions. De plus, notre méthode de mesure nous permet d'avoir accès à l'information de modification de la longueur d'onde de résonance à l'échelle du dimère unique. En effet, les spectres de dimères étant toujours acquis dans le même ordre, il est dès lors possible pour chaque dimère de définir son  $\Delta\lambda$  d'un événement à l'autre. Au cours de cette thèse, des distributions de  $\Delta\lambda$  sont également présentées sous forme de "map 2D". Elles permettent d'identifier si les décalages vers le bleu ou le rouge des longueurs d'onde de résonance sont identiques pour la totalité de l'échantillon ou une combinaison de plusieurs comportements.

### 3.1.7 Outil de simulations numériques

Pour comprendre la morphologie et le comportement de nos structures hybrides, il est important pour nous d'être capable d'estimer la distance interparticule. En effet, jusqu'à présent, nous avons vu que l'origami d'ADN pouvait être synthétisé pour être **ouvert**, **semi-ouvert** ou **fermé**. Comme nous avons pu le voir dans le chapitre 2 pour des origamis seuls, le gel de purification et leur images TEM permettent une assez bonne différenciation entre les conformations. Cependant, l'ajout des particules d'or couvertes d'ADN au sommet des bras des origamis induit l'apparition de nouvelles forces telles que la force de répulsion électrostatique entre les particules et la répulsion stérique due à l'ADN de surface.

Ainsi, l'estimation de distance entre les particules ne peut se limiter, comme pour les origamis seuls, à l'étude du design. Heureusement, la longueur d'onde de résonance d'un dimère est sensible à des variations de distance de l'ordre du nanomètre comme déjà présenté dans le chapitre 1. Ainsi, il nous est possible, par l'intermédiaire des spectres de résonance, d'estimer cette distance et donc la morphologie de notre structure pour des conditions données. Pour établir cette relation longueur d'onde - distance interparticule nous avons utilisé un outil Matlab nommé MNPBEM pour *Metallic NanoParticules Boundary Element Method*, développé à l'Université de Graz par Ulrich Hohnester et Andrea Trügler [151, 152, 153].

L'outil MNPBEM est un outil de simulation numérique des propriétés optiques de nanopar-

ticules métalliques, utilisant la méthode des éléments finis développée par F. J. Garcia de Abajo et A. Howie en 2002 [154]. L'objectif principal de l'outil est de résoudre l'équation de Maxwell pour des environnements diélectriques composés de corps avec des fonctions diélectriques homogènes et isotropes, séparés par des interfaces nettes et clairement délimitées. La figure 3.5 présente des exemples de systèmes à étudier avec le MNPBEM. Ainsi, les paramètres importants à définir sont le volume des corps diélectriques (e.g. une particule de 40nm de diamètre), le maillage de ces objets (plus ou moins fin ainsi que la forme des motifs élémentaires) et les différentes fonctions diélectriques (e.g.  $\varepsilon_b$  : eau,  $\varepsilon_m$  : or,  $\varepsilon_s$  : *semiconducteur*).

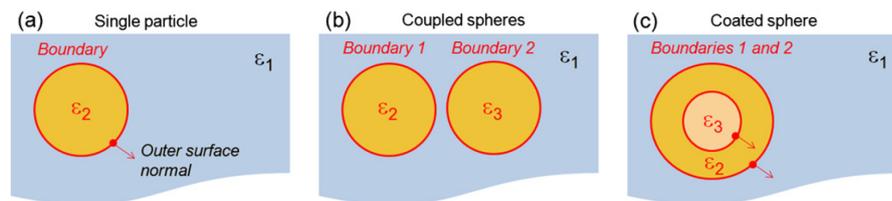


Figure 3.5: Exemples schématiques de systèmes possibles à étudier avec l'outil MNPBEM : une particule métallique dans un solvant (a), un dimère de particules couplées (b) et une particule composée d'un cœur de semi-conducteur et d'une coquille métallique dans un solvant (c) (Adaptée de [151]).

Au cours de cette thèse, vous verrez à plusieurs reprises des courbes de calibration de la longueur d'onde de résonance en fonction de la distance interparticule grâce à cet outil. Il sera également discuté, dans une prochaine partie, le choix des paramètres en fonction de la nature des particules d'or afin de correspondre au mieux aux données expérimentales.

### 3.2 Amélioration de la dispersion spectrale - comparaison entre particules commerciales et particules monodisperses

Comme déjà évoqué à plusieurs reprises, les particules d'or commerciales ont beau être relativement monodisperses en taille, elles sont polydisperses en forme : elles présentent à la fois des facettes et une anisotropie de forme. Malheureusement, cette non-circularité a un fort impact sur les réponses optiques des particules [155, 156, 157]. Cela a, en effet, pour conséquence un étalement de la distribution des longueurs d'onde de résonance des dimères [11], effet qui s'accroît pour un couplage plasmon élevé à faible distance [158]. Or, en considérant l'évolution du couplage plasmon quand la distance interparticule varie de quelques nanomètres, des variations de longueurs d'onde de résonance de l'ordre de 10-15 nm sont attendues. Cet étalement spectral est alors un inconvénient pour la différenciation des différentes structures : il y aurait recouvrement entre les distributions de fréquences de résonance. Heureusement, depuis plusieurs années, de nouvelles techniques de synthèse permettent d'obtenir des particules sphériques très homogènes en forme et en taille en érodant chimiquement les pointes de particules monocristallines en présence d'ions  $AuCl_4^-$  [159, 141]. Nous avons donc collaboré avec Sylvie Marguet du CEA de Saclay qui nous a fourni des nanoparticules d'or d'environ 40nm de diamètre qui présentent une faible

dispersion en taille et en forme comme discuté au chapitre 2.

### 3.2.1 Caractérisation des particules d'or

Dans le chapitre précédent, nous avons déjà vu que les particules monodisperses présentent une meilleure stabilité colloïdale que les particules commerciales. Nous avons également réalisé des images en microscopie électronique par transmission sur des dimères origamis avec les deux types de particules. La figure 3.6 montre ces deux échantillons. Sur ces images, l'hétérogénéité en forme des particules commerciales est bien visible. Certaines ont des formes triangulaires ou ressemblent à des nanobâtonnets. De manière générale, il est possible d'apercevoir des pointes ou des facettes sur chaque particule. Au contraire, les particules monodisperses semblent beaucoup plus lisses et plus sphériques comme attendu pour des particules ayant subi une érosion chimique de leur pointes et facettes [159, 141].

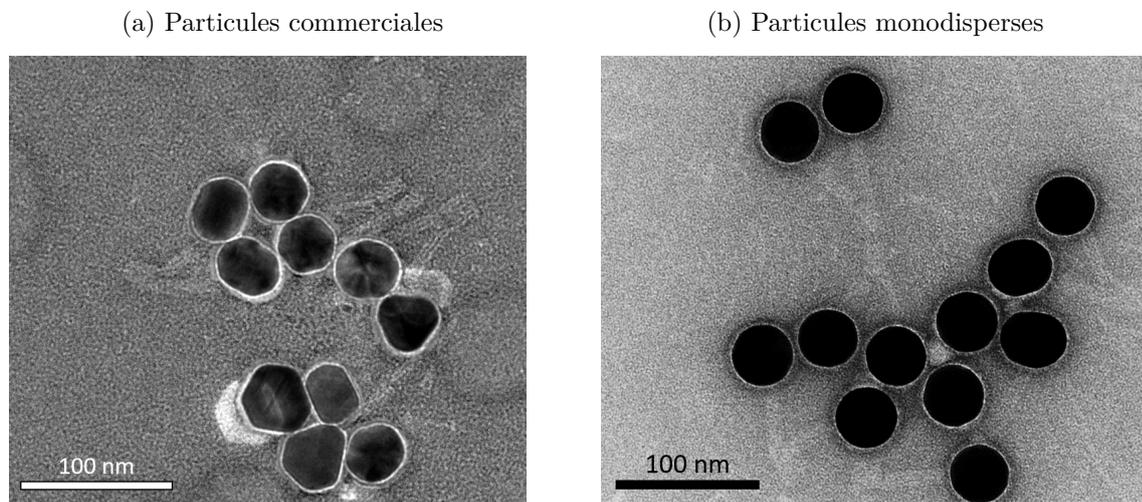


Figure 3.6: Images TEM avec coloration négative de dimères origami avec les différentes natures de particules.

Afin d'être plus quantitatif, j'ai réalisé une étude statistique de ces images TEM, comme indiqué sur la figure 3.8. Pour les particules commerciales, l'échantillon est de 299 particules et 63 pour les particules monodisperses. Les images TEM sont analysées en introduisant un seuil en contraste afin que le contraste des particules soit à 1 alors que le reste de l'image est à 0. Chaque particule est ajustée à une ellipse de grand axe  $Long$  et de petit axe  $trans$ . Pour comparer les caractéristiques morphologiques des particules, j'ai utilisé trois paramètres : l'aire  $\Sigma$  mais aussi l'excentricité et la circularité définis tels que :

$$Circularité = \frac{trans}{Long} \quad Excentricité = \sqrt{1 - \frac{trans^2}{Long^2}} \quad (3.3)$$

Les résultats sont présentés dans des boîtes à Moustache, représentation typique pour les analyses statistiques, telle qu'indiqué dans la figure explicative 3.7. La ligne rouge correspond à la valeur médiane, les bords de la boîte au premier (Q1) et au troisième

(Q3) quartile, respectivement. Cela signifie que 50% de l'échantillon est contenu dans cette boîte. Les extrémités des moustaches représentent, dans chaque cas, la valeur la plus éloignée de l'extrémité de la boîte et à une distance maximum de 1,5 fois l'espace interquartile. Enfin, les croix rouges mettent en évidence les valeurs à l'extérieur des moustaches.

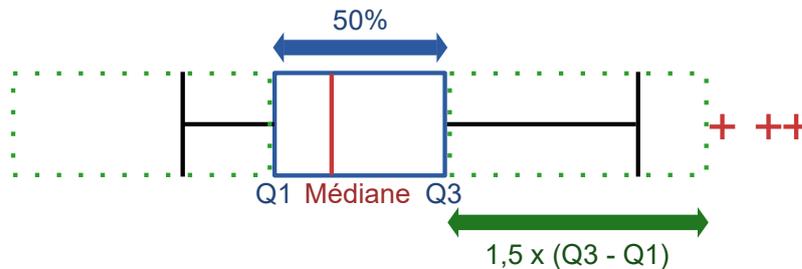


Figure 3.7: Explication schématique des boîtes à moustaches.

Pour des particules de 40nm de diamètre, l'aire estimée est de 1257nm<sup>2</sup>. La valeur médiane pour les particules commerciales est égale à 1223nm<sup>2</sup> et à 1406nm<sup>2</sup> pour les particules monodisperses. L'estimation de 40nm pour les particules commerciales est donc acceptable. Par contre, les monodisperses correspondent plus à des particules de 42nm de diamètre. L'espace interquartile, ainsi que celui entre les moustaches, sont divisés par plus de 2 entre les deux types de particules. Cela indique que les deux échantillons sont différents.

Pour confirmer cette différence, j'ai effectué un test statistique de Student, ou test t, à deux échantillons. Ce test permet de rejeter une hypothèse statistique quand on compare les moyennes de deux distributions  $\mu_1$  et  $\mu_2$  avec un écart théorique  $\delta_0$ , soit  $H_0 : \mu_1 - \mu_2 = \delta_0$ . La probabilité d'obtenir la valeur théorique  $\delta_0$  est donnée par la *pValue*. Cette valeur est alors comparée à un seuil préalablement défini, généralement 5%. Si elle est inférieure, l'hypothèse  $H_0$  est rejetée. Dans le cas contraire, lorsqu'elle est supérieure, il est impossible de conclure.

Dans notre cas, j'ai choisi comme hypothèse  $\delta_0 = 0$ . Cela correspond à deux échantillons identiques. Pour les aires des particules, nous obtenons une *pValue* =  $6,5 \cdot 10^{-15} \ll 5\%$ . L'hypothèse nulle est rejetée, les échantillons sont donc bien statistiquement différents.

Une circularité égale à 1 et une excentricité à 0 correspondent à une sphère parfaite. Pour les particules commerciales, la valeur médiane de la circularité est égale à 0,924 et à 0,977 pour les monodisperses. Ces dernières sont donc plus sphériques que les particules commerciales. L'espace interquartile ainsi que celui entre les moustaches sont respectivement divisés par 3,5 et 4,8 entre les deux types de particules. Le test de Student invalide l'hypothèse nulle avec une *pValue* =  $1,3 \cdot 10^{-8} \ll 5\%$  et confirme donc que les échantillons ne sont pas identiques.

Enfin pour l'excentricité, les valeurs médianes sont respectivement égales à 0,383 et 0,213 pour les commerciales et monodisperses. L'espace interquartile et celui entre les moustaches sont divisés par 1,9 et 2. Et ici aussi le test de Student invalide l'hypothèse nulle avec une *pValue* =  $4,7 \cdot 10^{-16} \ll 5\%$ .

Pour les deux types de nanoparticule, les valeurs obtenues en dehors des moustaches s'expliquent par le fait que, sur certaines images, des particules se trouvent sur les bords et sont alors coupées. De plus pour le cas de la circularité, malgré un bon contrôle de la forme des particules, il arrive que certaines aient une forme allongée, plus proche de nanobâtonnets. Ces valeurs restent cependant statistiquement négligeables et l'analyse statistique effectuée permet de s'en affranchir suffisamment pour comparer les deux échantillons.

Finalement, l'étude de ces trois paramètres nous permet de conclure que les particules monodisperses sont donc bien plus homogènes en forme et en taille. Elles sont également plus sphériques. Cependant, elles sont légèrement plus grosses. Cela a un impact sur la réponse optique : comme expliqué au chapitre 1, le phénomène de dépolarisation dynamique dans un modèle dipolaire de la résonance entraîne un décalage spectral de la résonance plasmon d'une sphère quand son rayon augmente. De plus, comme nous avons pu le voir dans le chapitre 1, la longueur d'onde de résonance longitudinale d'une particule anisotrope, qui domine sa réponse optique en lumière non-polarisée, est décalée vers le rouge par rapport à une sphère.

Pour mettre en évidence ces effets, j'ai mesuré le spectre de résonance plasmon de particules d'or isolées qui sont un sous-produit des chambres microfluidiques des dimères. La figure 3.9 présente la distribution de fréquences de résonance plasmon de particules commerciales et monodisperses. On observe que la valeur de résonance médiane est plus élevée pour les particules commerciales (544 nm) que pour les monodisperses (537 nm). Ceci est en accord avec mon analyse morphologique par TEM : même si les particules commerciales sont plus petites, elles présentent des résonances plasmon plus rouges compte tenu de leur anisotropie de forme. Par contre, la plus grande dispersion morphologique des particules commerciales ne donne pas une plus grande largeur de distribution pour les résonances plasmon.

La faiblesse de la section efficace de diffusion de particules seules se traduit expérimentalement par un faible rapport signal/bruit dégradant l'identification précise des longueurs d'onde de résonance. Il est donc difficile de déduire de l'analyse spectrale de monomères si l'utilisation de particules monodisperses améliore sensiblement la dispersion des fréquences de résonance. Au contraire, nous allons voir que ce n'est pas du tout le cas pour des dimères où la polydispersité des particules commerciales a un effet important sur les distributions de fréquences de résonance plasmon.

### 3.2.2 Simulations numériques des propriétés optiques des dimères

Récemment, l'équipe de Sebastian Schlücker a réalisé des simulations sur la variation de la longueur d'onde de résonance de dimères composés d'une particule sphérique et d'une particule commerciale facettée à très faibles distances interparticules [158]. La figure 3.10 présente les résultats de ces simulations. En faisant varier l'orientation de la particule facettée par rapport à la sphère (avec un alignement soit par la pointe, par l'arrête ou par la face), la longueur d'onde de résonance varie entre 710nm et 740nm alors qu'elle est égale à environ 730nm pour un dimère de sphères idéales. La présence de facettes devrait donc élargir la distribution des longueurs d'onde de résonance.

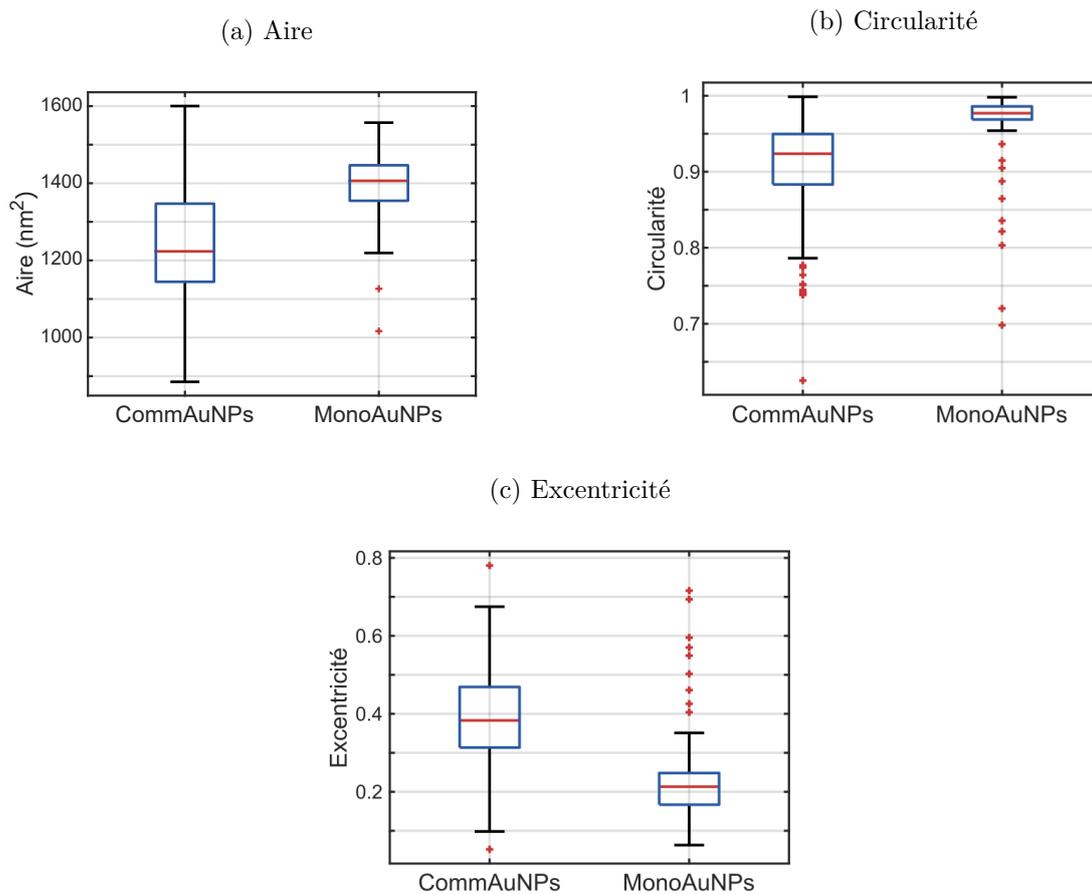


Figure 3.8: Comparaison des formes et tailles des particules commerciales et monodisperses d'après les images TEM.

Pour comprendre l'influence de particules d'or polydisperses sur la capacité à associer la longueur d'onde de résonance longitudinale et la distance interparticule, j'ai réalisé des simulations par *MNPBEM*. Pour cela, j'ai modélisé les particules d'or de 40nm commerciales et facettées à partir d'un motif élémentaire triangulaire (Figure 3.11), tandis que les particules monodisperses sont représentées à partir d'un motif circulaire comme les facettes cristallines ont été érodées chimiquement (Figure 3.13). Dans les deux cas, j'ai utilisé la constante diélectrique généralement utilisée pour simuler les propriétés optiques de particules d'or et mesurée sur des films d'or par Johnson & Christy en 1972 [27]. Pour l'environnement, j'ai utilisé un indice diélectrique de 1,4, entre la valeur de l'eau et celle des simple-brins d'ADN en surface des nanoparticules (environ 1,45) [84]. C'est cette valeur qui a été généralement utilisée dans des études précédentes à l'Institut Langevin, en bon accord avec des résultats expérimentaux obtenus sur des dimères assemblés par de courts brins d'ADN [150, 11, 8]

Pour les particules commerciales, le modèle géométrique se compose de 32 sommets et présente des facettes triangulaires. Les dimères sont soit alignés par les pointes (Figure 3.11a), soit par les arrêtes (Figure 3.11b), soit par les faces (Figure 3.11c). Dans ces simulations, je prends donc en compte le facettage des nanoparticules mais pas leur anisotropie

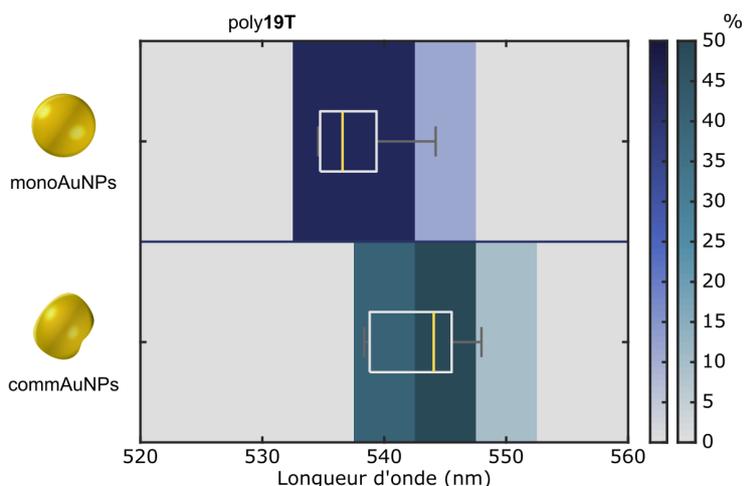


Figure 3.9: Distributions des longueurs d'onde de résonance de monomères de particules commerciales (en bas) et monodisperses (en haut) (pour 10 monomères).

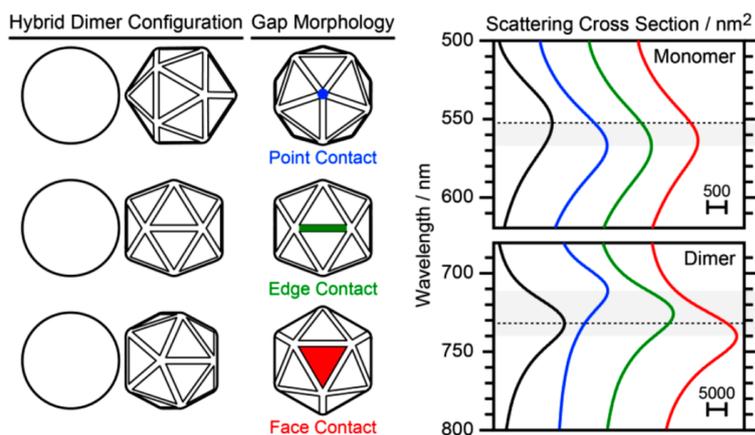


Figure 3.10: Simulations de spectres de diffusion de dimères de particules d'or, une sphère parfaite et une sphère facettée, suivant trois alignements différents : par la pointe, l'arrête ou la face.

Paramètres choisis :  $a = 25\text{nm}$  ;  $d = 1\text{nm}$  (Adaptée de [158]).

de forme.

La simulation est réalisée pour plusieurs distances interparticules. La figure 3.12 présente les spectres de diffusion obtenus pour les différents dimères à des distances de 5 nm et de 10 nm. A une distance de 5 nm, les spectres sont très décalés les uns par rapport aux autres. Pour un alignement par la face, les centres de masse des deux particules se rapprochent et entraînent un décalage vers le rouge. L'inverse se produit pour un alignement par la pointe. La différence de longueur d'onde de résonance entre ces deux extrêmes est de près de 50 nm. Lorsque la distance interparticule  $d$  augmente, cette différence décroît rapidement et atteint 4 nm pour 10 nm de distance interparticule. Entre l'alignement par les faces et par les arrêtes, elle est même très faible (environ 1 nm) à 10 nm alors qu'elle était significative (une vingtaine de nanomètres) à 5 nm.

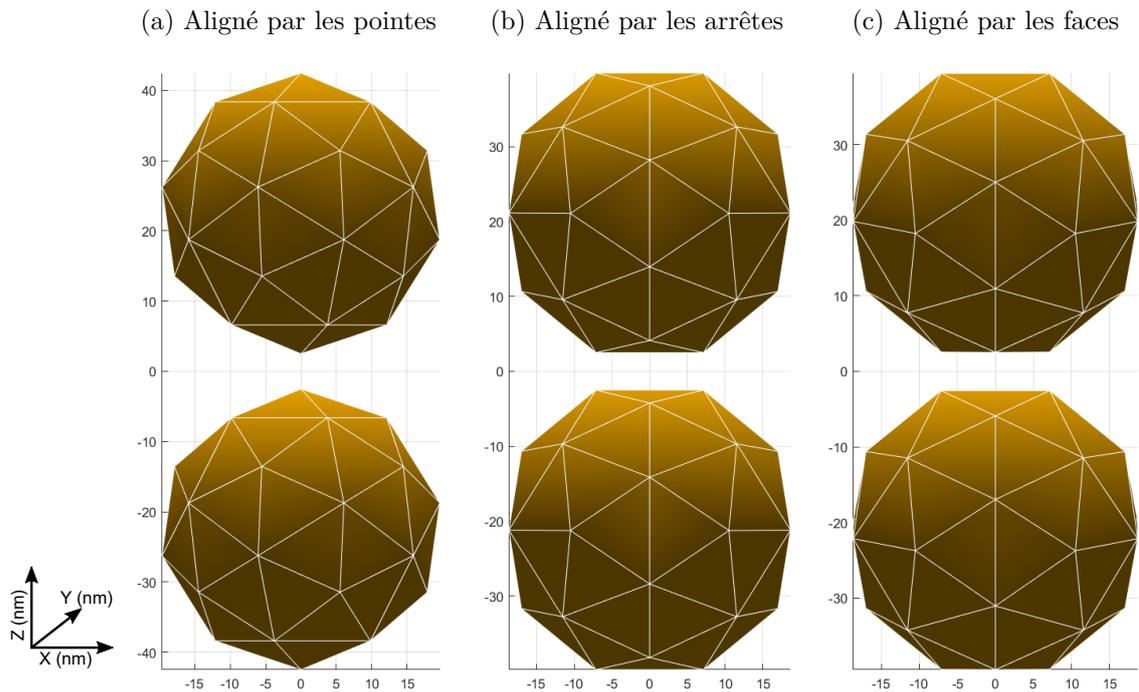


Figure 3.11: Représentation des modèles de dimères avec un motif triangulaire, utilisés pour les simulations numériques correspondant aux particules commerciales, pour 3 orientations d'alignement et avec une distance interparticule de 5nm.

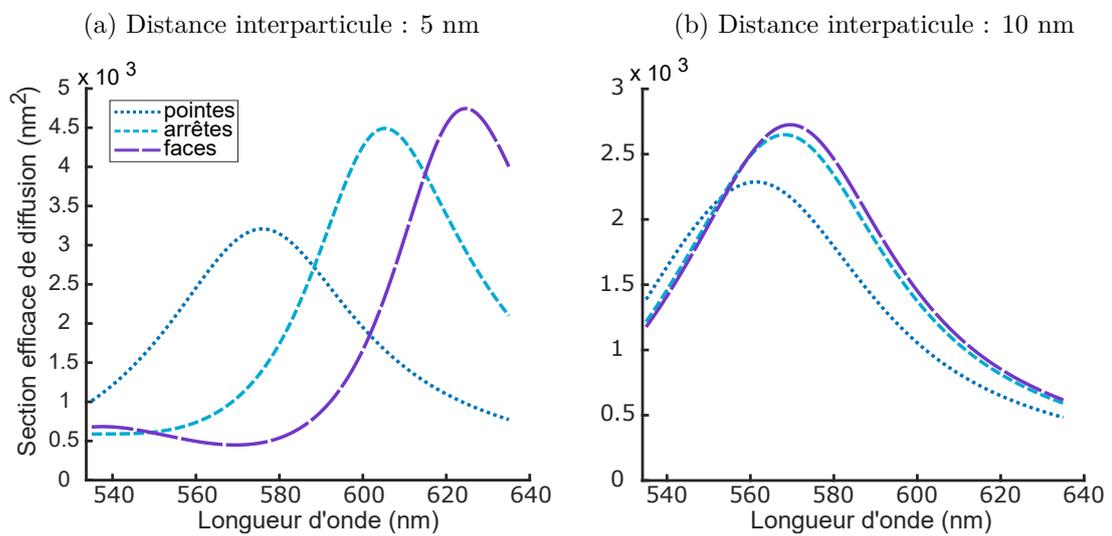


Figure 3.12: Spectres de diffusion simulés pour des dimères de particules d'or triangulaires alignées par les pointes, les arrêtes ou les faces.

En ce qui concerne les simulations avec le motif circulaire, le maillage est défini tel que  $0 \leq \phi \leq 2\pi$  avec un pas de  $\frac{2\pi}{39}$  et  $0 \leq \theta \leq \pi$  avec un pas de  $\frac{\pi}{29}$  pour des particules

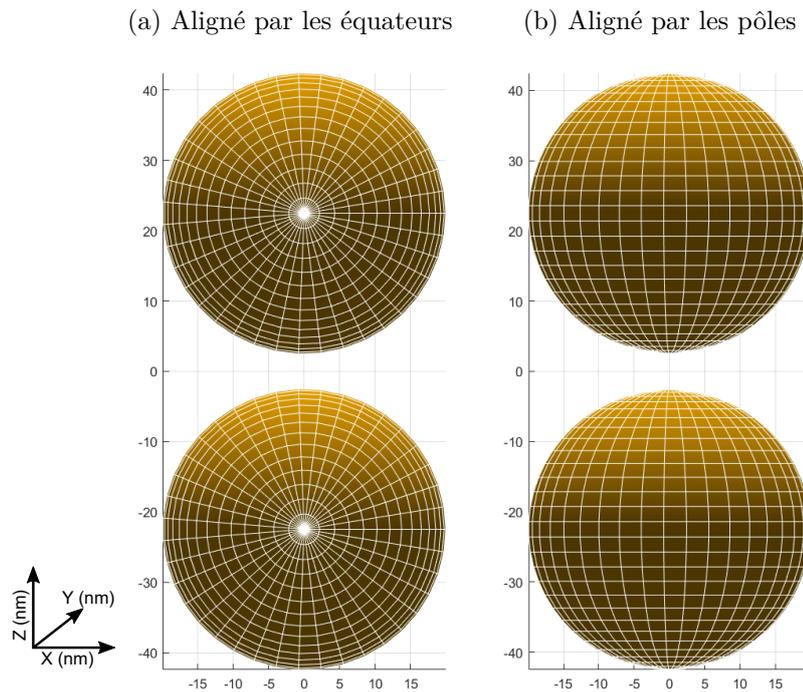


Figure 3.13: Représentation des modèles de dimères utilisés pour les simulations correspondant aux particules monodisperses (utilisant un motif circulaire), alignés par les équateurs ou les pôles, et avec une distance interparticule de 5nm.

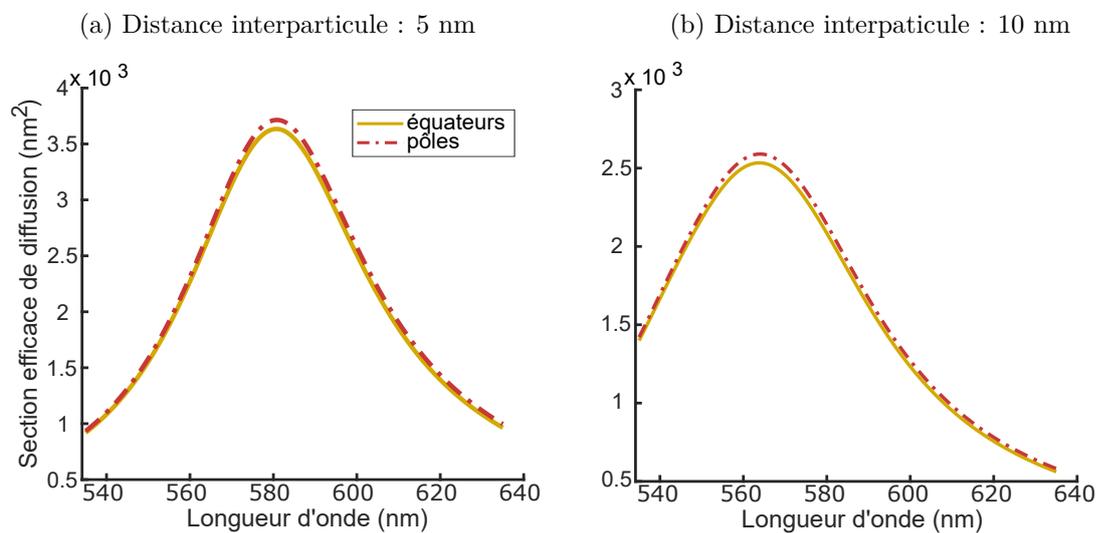


Figure 3.14: Spectres de diffusion simulés pour des dimères de particules d'or sphériques alignés par les équateurs ou les pôles

de 40nm. Les dimères sont soit alignés par les équateurs (figure 3.13a) soit par les pôles (figure 3.13b). Les figures 3.14a et 3.14b présentent les spectres de diffusion obtenus pour

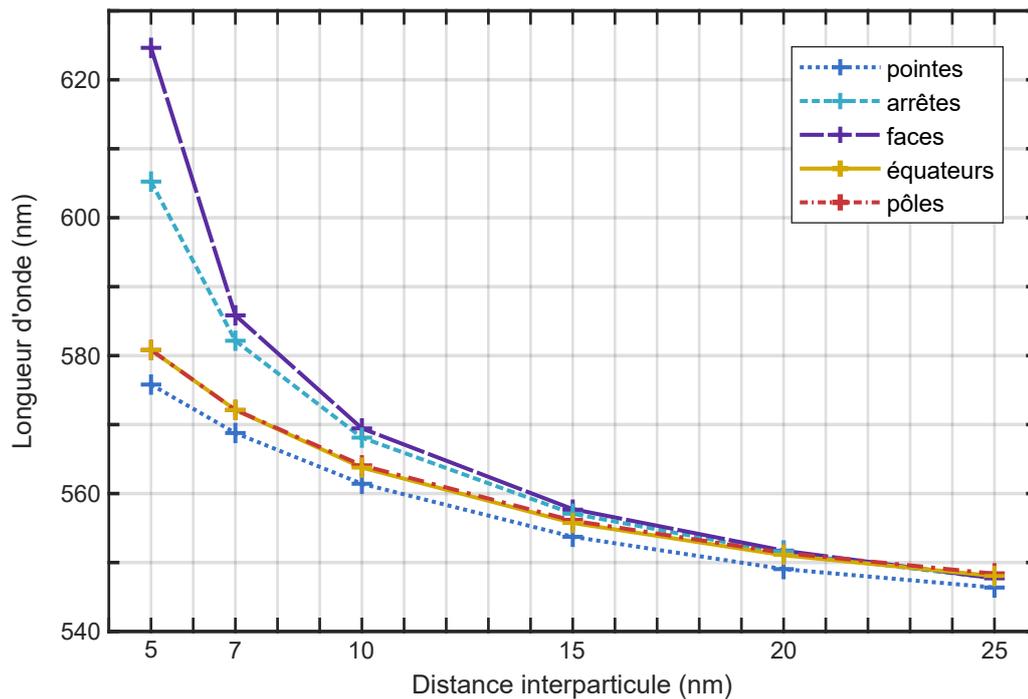


Figure 3.15: Variation théorique de la longueur d'onde de résonance de dimères de particules d'or suivant différents alignements (pointes, arrêtes, faces, équateurs ou pôles) en variant la distance interparticule.

des distance inter-particules de 5nm et 10nm. On peut alors constater, qu'entre les deux différents alignements, les différences sont négligeables en comparaison avec les simulations que nous avons vu pour les motifs triangulaires. Cela confirme que le *MNPBEM* est adapté pour simuler des dimères de sphères sans s'inquiéter de l'orientation des interfaces simulées.

Finalement, la figure 3.15 montre les différentes valeurs obtenues pour toutes ces conformations en fonction de la distance interparticule. On observe alors que, comme nous l'avons déjà visualisé avec les spectres, à très faible distance  $d$ , la dispersion de résonances est très importante et se réduit lorsque les particules s'éloignent l'une de l'autre. L'alignement par les pointes donnent les valeurs les plus bleues suivi par l'alignement par les arrêtes puis finalement par les faces. Cet ordre correspond à ce qui avait été observé dans la littérature [158]. Les valeurs pour les dimères non-facettés se trouvent entre les valeurs de l'alignement par les pointes et l'alignement par les arrêtes, ce qui n'était pas le cas pour l'équipe de S. Schlücker où la fréquence de résonance simulée pour un dimère de sphères se trouve entre l'alignement par l'arrête et la face. Cette différence peut venir de la différence de finesse du maillage qui peut avoir un impact sur les résultats. Ainsi, il est préférable de ne comparer entre elles que les simulations à motifs équivalents. Cela nous permet malgré tout de conclure que l'alignement aléatoire de dimères de particules présentant des facettes impacte fortement la longueur d'onde de résonance à faible distance et devrait donc se traduire par un élargissement des distributions. Au contraire, des dimères ne présentant pas de facettes sont beaucoup moins sensibles à l'alignement, ce qui ne devrait pas entraîner d'élargissement des distributions expérimentales.

Ces simulations montrent donc bien comment le facettage des particules commerciales va

entraîner un élargissement des fréquences de résonance pour des dimères par rapport à des particules dont les pointes ont été érodées chimiquement. Ces simulations ne prennent, par contre, pas en compte l'anisotropie de forme des particules qui est plus élevée et plus variable pour les particules commerciales. Cette anisotropie, et l'orientation relative des particules dans un dimère, vont donc amplifier l'élargissement de la distribution des fréquences de résonance pour les particules commerciales par rapport aux monodisperses. De plus, comme la résonance plasmon correspondant au grand axe d'une particule anisotrope domine son spectre de diffusion en lumière non-polarisée et que cette résonance est décalée vers le rouge par rapport à une sphère, on peut s'attendre à un décalage moyen vers le rouge de la résonance des dimères composés de particules commerciales par rapport au cas monodisperse.

### 3.2.3 Caractérisation optique de dimères origamis avec particules monodisperses et commerciales

La figure 3.16 présente les images visualisées sur la caméra couleur pour des échantillons de particules commerciales et monodisperses ayant la même chimie de surface (poly19T, trithiol) et attachées à des origamis d'ADN identiques, de type **ouvert**. Avec des particules commerciales, il apparaît une plus grande diversité de couleurs et d'intensités diffusées entre les dimères observés que dans le cas des particules monodisperses.

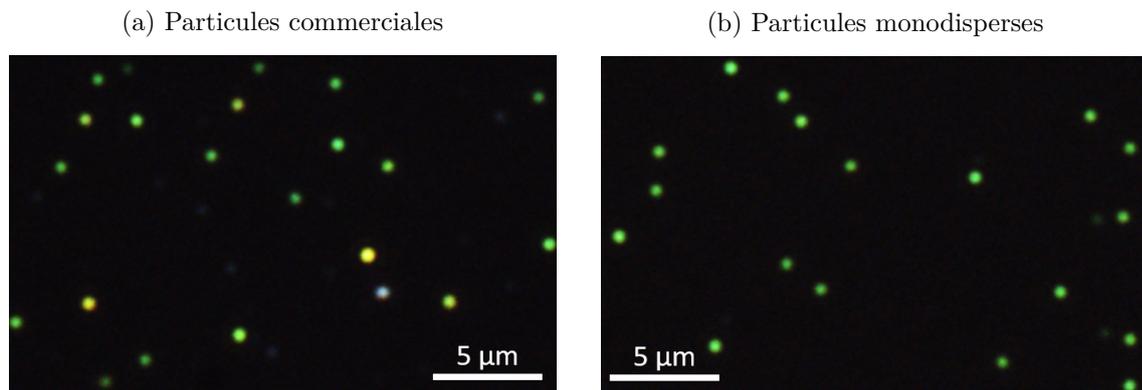


Figure 3.16: Visualisation d'échantillons en conformation "ouverte" sur la caméra couleur CCD pour les deux types de particules.

J'ai également réalisé une étude des spectres de diffusion afin d'avoir une vision plus quantitative de la différence de propriétés optiques de ces dimères. La figure 3.17 nous permet de comparer ces différents échantillons en présentant les distributions des longueurs d'onde de résonance ainsi que les boîtes à moustaches correspondantes. La partie supérieure contient les distributions de longueur d'onde de résonance de dimères origamis **ouvert** avec des particules commerciales (histogrammes turquoise, en bas) et monodisperses (histogrammes bleus, en haut). Dans ce cas, les brins d'ADN de surface font 19T et la force ionique est faible ( $I = 25$  mM) : la distance interparticule devrait donc être élevée. Pour les particules commerciales, la médiane est égale à 548 nm et à 542,5 nm pour les particules monodisperses. Le décalage spectral entre les deux est donc de 5,5 nm. Les espaces interquartiles respectifs sont de 5,9 nm et 2,6 nm. Et les moustaches s'étendent elles de

540,6 à 559,3 nm et de 537,7 à 546 nm. La distribution est asymétrique vers le rouge pour les particules commerciales mais ne l'est pas pour le cas monodisperse.

Ainsi pour la forme **ouverte** des dimères origamis, la taille de la boîte contenant 50% de l'échantillon est divisée par 2,3 en utilisant des particules monodisperses. Il en va de même pour les moustaches. Il y a deux raisons à la distribution bien plus large des fréquences de résonance plasmons des dimères composés de particules commerciales. D'après nos simulations précédentes, la réduction de l'espace interquartile pour les particules monodisperses est fortement liée à l'érosion chimique des facettes des particules. Il y a alors moins d'étalement de la distribution du aux différents alignements possibles des particules facettées du dimère. L'anisotropie plus faible des particules monodisperses explique également cette différence dans la largeur des distributions.

Dans la partie inférieure, sont représentées les distributions de longueur d'onde de résonance pour des dimères origamis **fermés\*** avec les deux types de particules, toutes deux couvertes de brins d'ADN *8T* et pour la même force ionique élevée ( $I = 455$  mM). Dans le cas de ces origamis **fermés\***, la distance interparticule théorique est inférieure à 10 nm, soit moins que deux fois l'épaisseur des ligands en surface ( $L \approx 6$  nm). On peut donc s'attendre ici à ce que les particules soient proches et probablement au contact de leur chimie de surface.

La distribution pour les dimères avec les particules commerciales est décalé vers le rouge par rapport à celle avec les particules monodisperses. Les valeurs médianes pour chaque population (barre verticale jaune) sont respectivement égales à 566,7 nm et 551,3 nm ; ce qui correspond à un décalage de plus de 15 nm. Pour les dimères de particules commerciales, l'espace interquartile est égal à 18,6 nm. La moustache s'étend de 542,8 à 603,2 nm. Elle traduit une légère asymétrie de la distribution vers le rouge. On observe également une valeur en dehors des moustaches, supérieure à 610 nm. Cela correspond probablement à un dimère avec une ou deux particules fortement anisotropes. En comparaison, avec les particules monodisperses, l'espace interquartile est égal à 7,8 nm et la moustache s'étend de 541 à 558,1 nm sans valeurs au-dehors. Par contre pour ces particules, l'asymétrie de la moustache est plus importante vers le bleu.

Nous voyons donc que l'espace interquartile de la distribution est divisé par 2,3 avec les particules monodisperses et la longueur des moustaches par 3,5, par rapport aux particules commerciales. On retrouve bien le résultat observé pour les origamis **ouverts** : l'utilisation de particules monodisperses permet de fortement réduire la dispersion spectrale des résonances des dimères. En particulier, en comparant les données pour les formes **ouvertes** et **fermées\*** des origamis, on voit bien qu'il y a un fort recouvrement des distributions de fréquences de résonance pour les particules commerciales ; fortement réduit dans le cas monodisperse.

Ces mesures indiquent également un important décalage entre les longueurs d'onde de résonance moyennes entre particules commerciales et monodisperses, pour les deux géométries d'origami. Dans le cas des particules seules, j'ai déjà indiqué un décalage spectral des fréquences de résonance d'environ 7 nm à cause de l'anisotropie de forme plus importante avec des particules commerciales. Ce décalage se retrouve dans les fréquences de résonance pour l'origami **ouvert** : c'est assez logique puisque, pour ces dimères, nous pouvons attendre une distance interparticule  $d$  grande et donc un faible couplage plasmon.

Dans le cas des dimères **fermés\***, le décalage atteint 15 nm. Deux explications peuvent

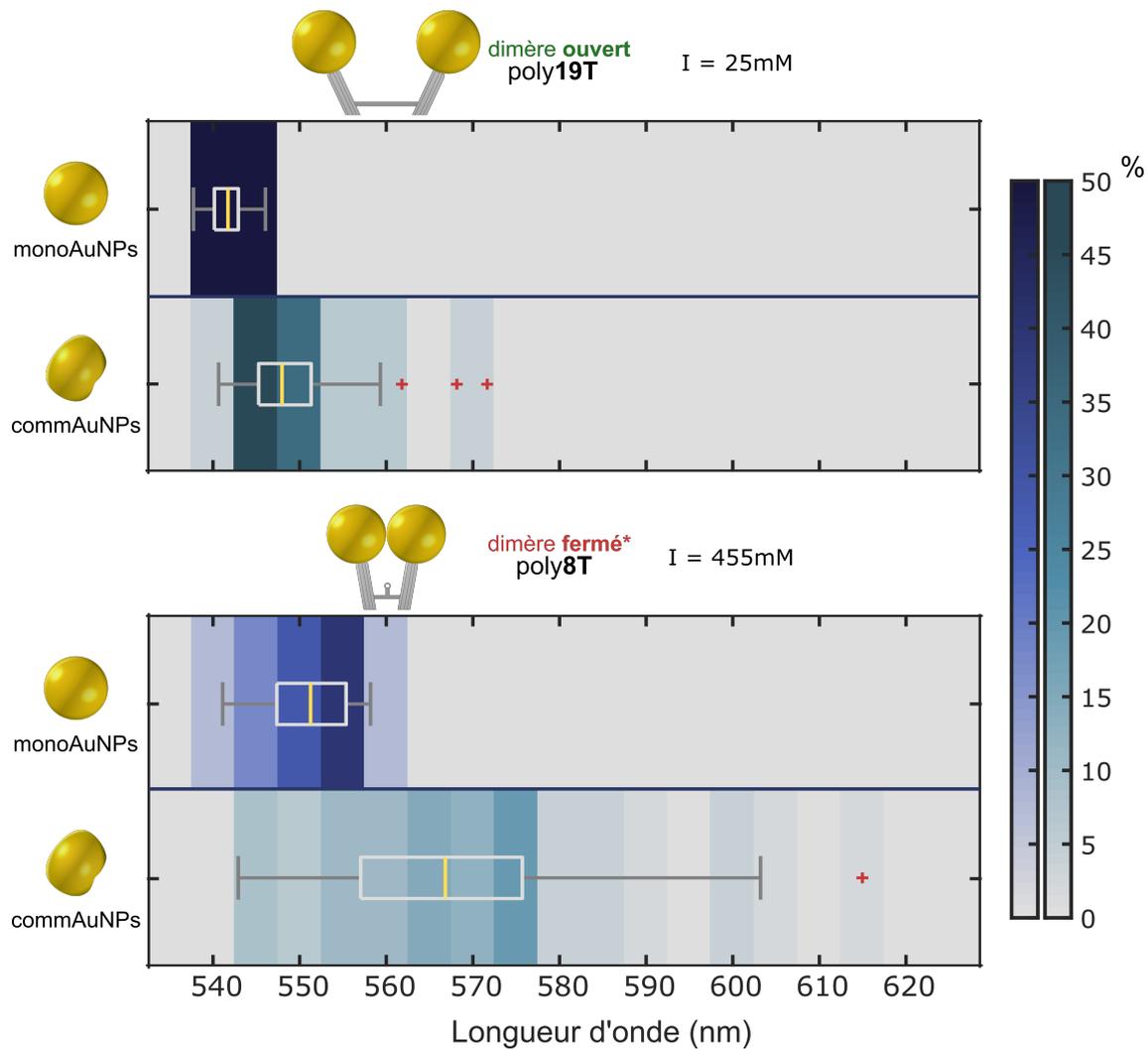


Figure 3.17: Comparaison des distributions de longueurs d'onde de résonance de dimères origamis de particules commerciales (distributions turquoise) et de particules monodisperses (distributions bleues) avec des origamis **ouverts** (en haut) et **fermé\*** (en bas). Distributions obtenues avec 48 (**fermé\***-commercial), 50 (**ouvert**-commercial), 28 (**fermé\***-monodisperse) et 38 dimères (**ouvert**-monodisperse).

justifier ce décalage plus élevé. Tout d'abord, nous avons déjà vu avec les simulations prenant en compte le facettage des particules que ces effets de forme avaient une influence plus grande sur les résonances plasmon de dimères à courte distance  $d$ . Il paraît donc cohérent que l'anisotropie de forme agisse davantage pour un origami **fermé\***. D'autre part, nous avons vu dans le chapitre 2 que les particules commerciales ont une plus faible stabilité colloïdale que les particules monodisperses, probablement associée à une fraction volumique de ligands  $\varphi$  en surface des particules plus faible. Il est donc possible que l'épaisseur de la couche de ligands soit un peu plus faible dans le cas des particules commerciales. Si, comme indiqué précédemment pour un origami **fermé\*** à forte force ionique, les particules du dimère sont au contact de leur chimie de surface, cela impliquerait une distance interparticule  $d$  moyenne plus faible pour les particules commerciales et donc un

décalage spectral vers le rouge de la moyenne de la distribution.

Les données comparatives présentées ici pour des particules commerciales et monodisperses, avec des dimères **fermés\*** à forte force ionique et des dimères *ouverts* à faible force ionique, nous confirme donc l'intérêt d'utiliser des particules qui ont été érodées chimiquement pour réduire la dispersion spectrale des résonances plasmon de dimères. L'intérêt de ces données expérimentales est également de nous fournir des cas extrêmes de distances interparticules  $d$  qui vont me permettre de valider les simulations par *MNPBEM* pour calibrer la relation attendue entre la fréquence de résonance plasmon longitudinale d'un dimère et  $d$ .

### 3.3 Relation longueur d'onde - distance interparticule

Je vous ai déjà présenté un exemple de relation longueur d'onde - distance interparticule en comparant des particules facettées ou non (figure 3.15). Dans cette partie nous allons discuter du choix des paramètres de cette simulation afin de calibrer cette relation vis-à-vis de mes données expérimentales.

Pour rappel, les paramètres importants à définir sont bien évidemment la taille des particules (rayon  $a$ ), leur forme, le type et la finesse du maillage, ainsi que l'indice de réfraction du milieu environnant et de la fonction diélectrique de l'or. Nous verrons au cours de cette partie comment, en modulant ces deux derniers paramètres, il nous a été possible d'établir des courbes de calibration en adéquation avec nos résultats expérimentaux.

Pour invalider ou non les paramètres choisis, il nous faut au moins deux cas limites (particules éloignées et particules proches). Pour cela nous utiliserons les distributions montrées dans la figure 3.17. D'après le design de nos origamis, pour les dimères **ouverts** à faible force ionique, on peut considérer que la distance interparticule va être élevée par rapport au rayon des particules : à cette distance le couplage plasmon est faible. Lorsque le couplage est faible, cette partie de la courbe est relativement plate (par exemple sur la figure 3.15) : ainsi, de grandes variations de la distance  $d$  entraînent des faibles variations de la longueur d'onde. C'est pourquoi, dans cette partie de la courbe, l'estimation de la distance  $d$  à partir des données spectrales ne sera pas très précis.

Au contraire, en ce qui concerne le cas où les particules sont proches, une petite variation de  $d$  entraîne une grande variation de longueur d'onde. C'est pourquoi, il sera intéressant de se placer dans un cas où les particules sont proches du contact entre leurs chimies de surface, soit  $d \approx 2L$  avec  $L$  l'épaisseur de la couche de ligands. J'appellerai cette distance la distance de contact  $d_{contact}$ . Comme indiqué dans le chapitre 2, pour des origamis **fermés**, la distance  $d$  dans le design devrait être inférieure à  $2L$ . De plus, j'ai utilisé pour les données de la figure 3.17 une grande force ionique (455 mM) qui favorise d'atteindre le contact des chimies de surface dans des dimères de particules d'or comme évoqué dans le chapitre 1 sur des données de Laurent Lermusiaux obtenues à l'Institut Langevin. Il est donc raisonnable de supposer que les données de la figure 3.17 sont obtenues au contact des chimies de surface. Des expériences complémentaires des chapitre 4 et 5 viendront confirmer cette hypothèse.

Pour un ADN simple-brin  $8T$ , j'ai déjà évoqué que  $L$  peut être estimé à 6 nm : 2 nm pour la fonction trithiol, puis 8 bases avec une distance d'environ 0,55 nm entre chaque base [160]. Comme un simple-brin d'ADN a une longueur de persistance inférieure à 2

nm à force ionique élevée [160], l'épaisseur de la chimie de surface en  $8T$  pourrait être significativement inférieure à 6,5 nm. Toutefois, avec une forte densité de ligands, il a été démontré que les simple-brins d'ADN polyT adoptent une conformation en cheveux autour de particules d'or [144]. C'est pourquoi 6 nm semble une estimation raisonnable. Comme la répulsion stérique est faible à  $d$  proche de  $2L$  (répulsion élastique nulle et répulsion osmotique à son minimum), il est possible d'observer une certaine compression des chimies de surface et donc une distance  $d$  légèrement inférieure à  $2L$ . La longueur des ligands amphiphiles, ajoutés aux brins  $8T$  en surface des particules, est de 3,5 nm : donc ceux-ci ne devraient pas intervenir avant une forte interpénétration des chimies de surface.

### 3.3.1 Particules commerciales

Lors de précédentes publications, notre équipe a déjà calibré la relation entre les longueur d'onde de résonance de dimères et leur distance interparticule pour des particules commerciales, en considérant toujours des particules sphériques par théorie de Mie [11, 8, 43, 161] ou avec le *MNPBEM* [150]. Par conséquent, j'ai, dans un premier temps, utilisé les mêmes paramètres pour les constantes diélectriques comme évoqué dans la partie 3.2.2 lors de la comparaison des particules commerciales et monodisperses. La figure 3.18 reprend les courbes de calibration pour les particules facettées isotropes avec les boîtes à moustaches des distributions de longueurs d'onde des particules commerciales de la figure 3.17. Les paramètres utilisés sont :

- le diamètre : 40nm
- la fonction diélectrique de l'or : Johnson et Christy (1972) [27]. C'est la fonction diélectrique de l'or la plus couramment utilisée.
- l'indice de réfraction du milieu : 1,4 [43, 8]. Indice utilisé précédemment par l'équipe qui correspond à une valeur définie car se trouvant approximativement entre l'indice de l'eau : 1,33 et l'indice de l'ADN simple brin : 1,45 [84]
- le maillage : triangulaire (32 motifs). Le choix de ce maillage et l'impact sur la longueur d'onde de résonance ont déjà été présentés précédemment.

D'après l'analyse des résultats, la distribution de longueur d'onde pour les dimères **ouverts** semble bien correspondre à une distance interparticule proche de 25nm. Ainsi, cela n'invalide pas les choix des paramètres pour ce cas limite. En ce qui concerne les dimères **fermés\***, la distribution de longueur d'onde correspond à une distance d'environ 10nm, les trois courbes étant comprises dans la boîte des 50%. La distance supposée est donc inférieure à la distance de contact définie précédemment. Cela signifie donc soit une légère compression des chimies de surface ou une fraction volumique de ligands en surface des particules plus faible qui permet aux simple-brins d'ADN de se replier. Cette dernière hypothèse est en accord avec la stabilité colloïdale plus faible obtenue avec des particules commerciales par rapport aux monodisperses. En tout cas, ces courbes de calibration sont globalement en bon accord avec les données expérimentales.

Il semble donc que le choix de ces paramètres pour les particules commerciales est judicieux. Il fonctionnait déjà pour les études précédentes [11, 8, 43, 161, 150] pour les valeurs moyennes en négligeant le facettage des particules (correspondant aux simulation

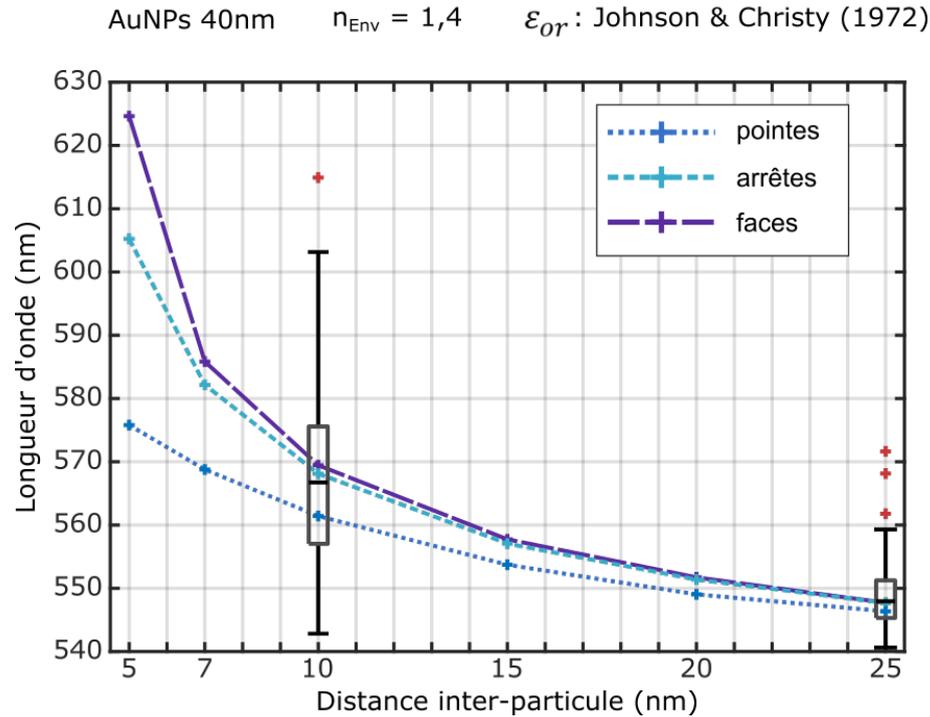


Figure 3.18: Comparaison des courbes de relation entre longueur d'onde et distance inter-particule obtenues pour des dimères de particules d'or à facette suivant différents alignement ainsi que les boîtes à moustaches des résultats expérimentaux pour des particules commerciales présentés dans la figure 3.17.

Paramètres choisis : diamètre 40nm ;  $\epsilon_{\text{or}} : \text{Johnson \& Christy [27]}$  ;  $n_{\text{Envir}} = 1,4$ .

avec un maillage circulaire dans la figure 3.15). Ce choix est confirmé en prenant en compte les facettes des particules commerciales : l'élargissement simulé est en bon accord avec les données expérimentales.

### 3.3.2 Particules monodisperses

Pour les particules monodisperses, nous pouvons d'ores et déjà supposer que les constantes diélectriques utilisées ci-dessus ne vont pas donner un accord quantitatif entre simulations et expériences. En effet, nous avons vu qu'avec ces particules, pourtant plus grosses que les commerciales, les résonances des dimères **ouvert** sont décalées vers le bleu. Nous avons donc décidé d'étudier l'influence de l'indice de réfraction du milieu et de la fonction diélectrique de l'or.

#### Indice de réfraction du milieu

Dans un premier temps, nous avons choisi de faire varier l'indice de réfraction du milieu. Le décalage spectral vers le bleu peut provenir d'une légèrement surestimation de cet indice en considérant l'eau et les ligands de surface. Nous avons également réalisé des simulations plus complexes, mais plus réalistes, considérant une coquille d'indice 1,45 et d'épaisseur 6 nm autour de la particule d'or (figure 3.19). Nous avons bien évidemment utilisé un diamètre de particules de 42nm (diamètre estimé grâce aux images TEM) et un maillage

circulaire tel que  $0 \leq \phi \leq 2\pi$  avec un pas de  $\frac{2\pi}{39}$  ; et  $0 \leq \theta \leq \pi$  avec un pas de  $\frac{\pi}{39}$  pour les particules d'or et la coquille d'ADN.

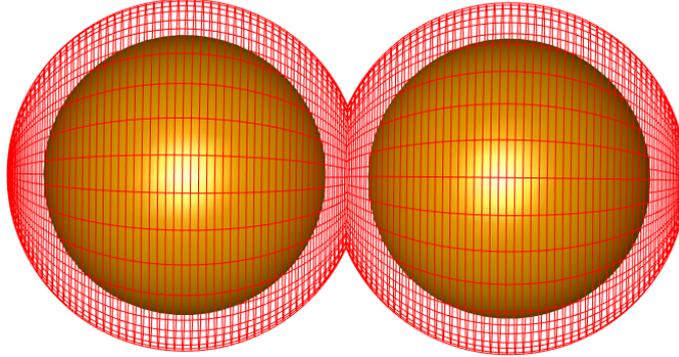


Figure 3.19: Représentation du modèle de dimère de particules d'or avec une coquille d'ADN de 6nm utilisé pour les simulations.

La figure 3.20 montre les résultats pour les simulations avec ces différents paramètres ( $n_{milieu} = 1,33$  et  $n_{shell} = 1,45 + n_{milieu} = 1,33$ ) ainsi que les boîtes à moustaches des distributions de longueur d'onde obtenues dans la figure 3.17 pour les particules monodisperses. On constate que, malgré la complexification du modèle par l'ajout de cette coquille, la relation obtenue reste surestimée par rapport aux données expérimentales. Au contraire, lorsque l'on retire la coquille d'ADN, réduisant le milieu environnant à de l'eau, la distance interparticule pour les dimères **ouverts** peut être estimée comme étant supérieure à 25nm et celle pour les dimères **fermés\*** à 13nm. Ces résultats sont donc en adéquation avec nos attentes morphologiques pour les dimères assemblés. Cependant, le fait de totalement négliger la couche dense d'ADN de surface ne nous semble pas réaliste. C'est pourquoi nous avons décidé d'également étudié l'influence de la constante diélectrique de l'or.

### Fonction diélectrique de l'or

La constante diélectrique utilisée dans mes simulations a été estimée expérimentalement dans un article de 1972. Depuis, d'autres équipes ont effectué des mesures complémentaires, plus ou moins en accord avec les données de 1972 [28]. En particulier, des mesures ont été effectuées en 2012 sur différents types de surfaces d'or par ellipsométrie pour étudier l'influence de la rugosité de surface sur les constantes diélectriques estimées, en les comparant à des nombreuses données publiées préalablement dont celles de 1972 [28]. Cette étude a montré que les mesures effectuées sur des films très rugueux avaient tendance à sous-estimer légèrement la partie imaginaire de la constante diélectrique de l'or  $Im(\epsilon_m)$  par rapport à des films parfaitement lisses obtenus par *template-stripping*.

Cette technique de fabrication consiste en un dépôt d'or sur un substrat de silicium ; suivi d'un dépôt d'époxy et de silice sur l'or afin de pouvoir décoller le substrat de silicium du dépôt d'or [162]. La surface d'or exposée, qui était en contact avec le silicium au moment du dépôt, présente une rugosité plus de 4 fois plus faible qu'un dépôt d'or traditionnel ou une couche d'or monocristalline (typiquement 0,25 nm contre plus de 1 nm) [28]. En pratique, la présence de vide au niveau des rugosités de surface serait à l'origine de cette sous-estimation de l'absorption dans une couche d'or rugueuse en ellipsométrie [28]. Par

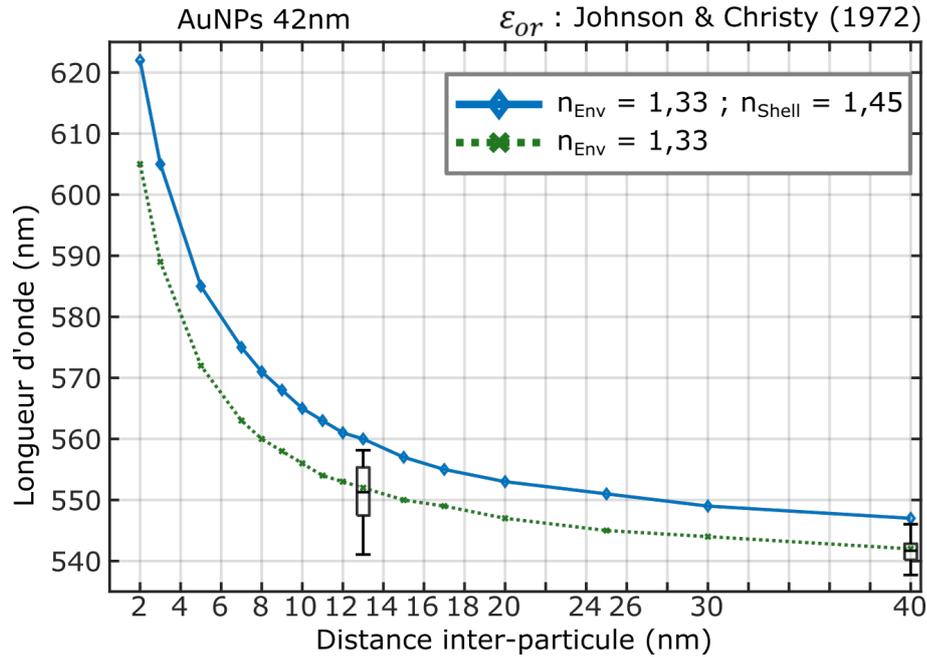


Figure 3.20: Comparaison des courbes de relation entre longueur d'onde et distance inter-particule obtenues pour des dimères de particules d'or avec ou sans coquille d'ADN ainsi que les boîtes à moustaches des résultats expérimentaux pour des particules monodisperses présentés dans la figure 3.17

Paramètres choisis : diamètre 42nm ;  $\epsilon_{or}$  : Johnson & Christy [27]

contre, les différences sont négligeables dans le visible pour la partie réelle de la constante diélectrique  $Re(\epsilon_m)$ . Ces différences avaient déjà été évoquées rapidement au début du chapitre 1 sur la figure 1.2.

La figure 3.21 présente les résultats obtenus avec la constante diélectrique mesurée sur un film lisse et pour un modèle de particule cœur (sphère d'or de 42 nm) - coquille (6 nm d'indice 1,45) ; associés aux boîtes à moustaches des distributions expérimentales des dimères **ouverts** et **fermés\*** pour des particules monodisperses. Pour une meilleure comparaison, la courbe obtenue précédemment avec la fonction diélectrique de Johnson et Christy de 1972, pour des particules cœur-coquille, a également été ajoutée. L'utilisation de la fonction diélectrique d'un film d'or lisse décale vers le bleu les longueurs d'onde de résonance en excellent accord avec mes expériences. Ainsi, pour les dimères **ouverts**, la distance interparticule est supérieure à 25 nm et, pour les **fermés\***, égale à 13 nm. Il faut également noter que cette simulation avec une coquille d'indice 1,45 et en prenant la dimension des particules d'or obtenues en TEM n'introduit quasiment aucune hypothèse géométrique, à part l'épaisseur de la couche de ligand. Pour cette dernière, une variation de 2 nm de l'épaisseur n'influe pas de façon notable sur les résonances simulées. Il y a donc un accord quantitatif entre nos données expérimentales, obtenues avec des particules très proches de sphères parfaites, et ces simulations.

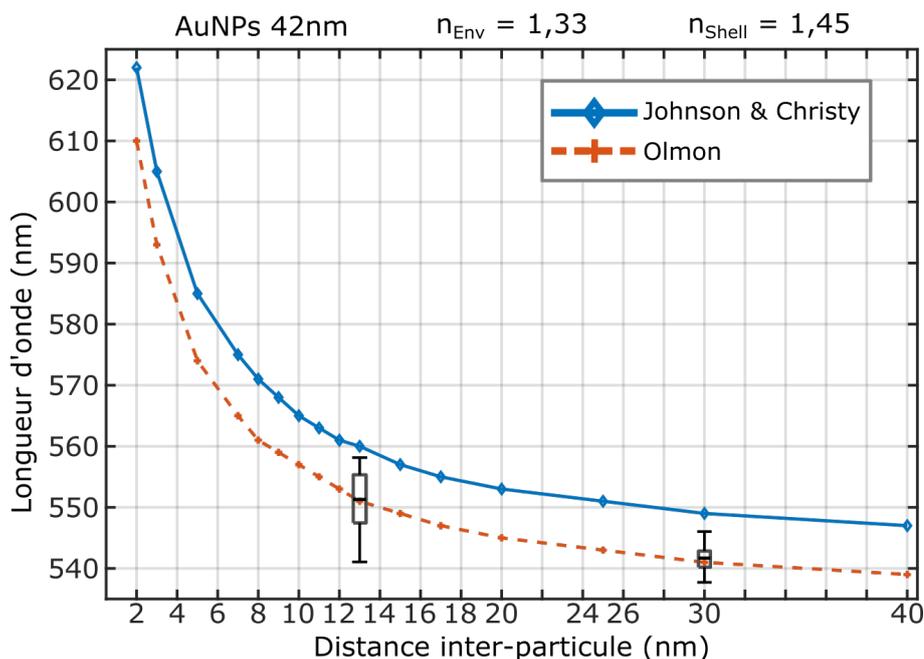


Figure 3.21: Comparaison des courbes de relation entre longueur d'onde et distance inter-particule obtenues pour différentes fonctions diélectriques : Johnson & Christy [27] et Olmon [28] ainsi que les boîtes à moustaches des résultats expérimentaux pour des particules monodisperses présentés dans la figure 3.17

Paramètres choisis : diamètre  $42\text{nm}$  ;  $n_{Env} = 1,33$  ;  $n_{Shell} = 1,45$

### Discussion sur les particules commerciales

Les simulations effectuées ici et dans la littérature avec la fonction diélectrique de l'or mesurée par Johnson et Christy semblent donc en excellent accord avec des mesures effectuées pour des dimères de particules commerciales polydisperses. Pourtant, elles donnent des résultats absurdes avec des particules d'or monodisperses : il faut alors négliger la présence de ligands organiques en surface et prendre la constante diélectrique de l'eau pour l'environnement. Or l'environnement diélectrique est le même pour les deux types de particules : ce n'est pas un paramètre raisonnable à exploiter pour adapter les simulations aux mesures expérimentales avec deux types de particules.

De par leur forme bien mieux contrôlée, les particules monodisperses devraient plutôt nous guider sur le choix des paramètres de simulation. Avec le modèle cœur-coquille précédent et la constante diélectrique obtenue sur un film d'or lisse, l'accord simulations-expériences est excellent. Des simulations avec ce modèle ne fonctionneraient évidemment pas avec les particules commerciales, même en considérant les facettes.

Comme je l'ai déjà évoqué en comparant les résonances des particules seules et les résonances des dimères, c'est l'anisotropie de forme des particules commerciales qui explique probablement ce désaccord en entraînant un décalage vers le rouge des résonances médianes. Il semblerait donc que l'utilisation d'une constante diélectrique sous-estimant la partie imaginaire  $Im(\epsilon_m)$  ait fortuitement compensé l'anisotropie de forme des particules commerciales. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait simuler des particules cœur-coquilles anisotropes avec la constante diélectrique de l'or publiée en 2012 et dans

différentes orientations relatives. Puis convoluer cet effet avec le facettage des particules, étudié précédemment, afin de reproduire le mieux possible les distributions expérimentales obtenues pour des particules commerciales. Cela dépasse un peu le cadre de cette étude : le but était d'obtenir des relations réalistes reliant la distance interparticule  $d$  avec des longueurs d'onde de résonance plasmon mesurées expérimentalement. C'est bien ce que nous avons obtenu ci-dessus, aussi bien dans le cas des particules monodisperses, que commerciales.

### 3.4 Protocole d'analyse Hue Saturation Lightness

Les outils expérimentaux décrits dans ce chapitre présentent plusieurs limites : nombre limité de nanostructures mesurées (typiquement une cinquantaine), dû à la lenteur de la méthode spectroscopique même automatisée ; sélection visuelle des dimères à étudier ; nécessité d'utiliser un spectromètre fibré et une platine piézoélectrique qui rendent ces mesures optiques difficilement exploitables d'un point de vue industriel. L'idée est donc d'essayer de remonter à ces informations spectroscopiques avec une simple image plein champ de microscopie à fond noir sur caméra couleur et ainsi d'exploiter des équipements beaucoup moins coûteux tout en évitant la lenteur et la subjectivité dues à la mesure des spectres de dimères individuels.

Dans la littérature, on trouve plusieurs exemples d'études utilisant le signal directement obtenu en champ sombre sur une caméra couleur afin d'analyser spectralement les résonances plasmon de nanostructures d'or [43, 8, 163, 164, 150]. Au cours de sa thèse à l'Institut Langevin, L. Lermusiaux avait établi une courbe de calibration des teintes moyennes de dimères individuels sur la caméra couleur CCD en fonction des valeurs moyennes de longueur d'onde de résonance [43, 8]. Ces expériences ont montré qu'il était possible d'analyser optiquement des structures uniques plasmoniques à l'aide d'une simple caméra couleur et sans spectromètre. Pour cela, il est nécessaire de comprendre la notion de couleur dans le signal d'une caméra CCD. Chaque pixel d'une caméra couleur est typiquement composé de 4 pixels qui, grâce à un jeu de filtres colorés, détectent la lumière bleue, verte ou rouge. On utilise généralement deux fois plus de pixels verts pour reproduire la sensibilité spectrale de l'œil humain. Le signal détecté peut alors être généralement décomposé selon ces trois couleurs en un signal RGB pour *Red Green Blue*. Toutefois, le signal sur chaque canal R, G ou B mélange une information spectrale et une information d'intensité.

Il existe donc d'autres protocoles pour différencier l'information d'intensité et l'information de couleur d'une caméra CCD. Ces protocoles utilisent des paramètres plus intuitifs et proches de la perception humaine des couleurs tels que les systèmes HSV (*Hue Saturation Value*) et HSL (*Hue Saturation Lightness*). Les paramètres H, S et L/V peuvent alors être calculés à partir des paramètres R, G et B pour chaque pixel d'une image. En pratique, il s'agit d'un simple changement de base pour la représentation 3D du signal d'une caméra couleur. Pour ces deux systèmes, H est la teinte du signal et est définie par un angle dans le cercle des couleurs :

- Rouge :  $0^\circ$  ou  $360^\circ$
- Jaune :  $60^\circ$
- Vert :  $120^\circ$

- Bleu : 240°

La saturation correspond à la finesse de la couleur, elle est aussi parfois appelée "pureté". Elle est donc associée à une finesse spectrale du signal mesuré. Plus cette valeur est faible, plus le signal reçu par un pixel recouvre tout le spectre visible, correspondant à un pixel gris. Dans un protocole HSV, V ou valeur est lié à l'intensité reçue par le pixel mais n'est pas indépendante de l'information spectrale. Lorsqu'elle vaut 0, le pixel est noir. Il est donc plus intéressant d'utiliser un protocole HSL car L ou luminosité correspond à l'intensité reçue indépendamment de l'information spectrale : L varie entre 0 (pixel noir) et 1 (pixel blanc) et donne donc un niveau de gris de l'image.

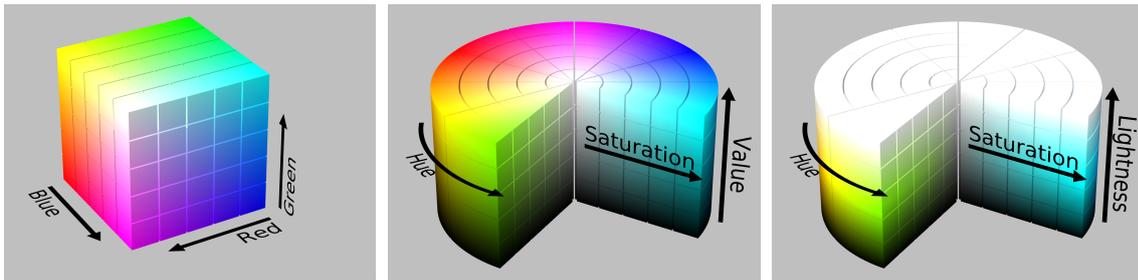


Figure 3.22: Représentation des différents systèmes de codage informatique de la couleur : *Red Green Blue*, *Hue Saturation Value* et *Hue Saturation Lightness* (figure adaptée de Wikipédia).

Précédemment, nous avons vu que, pour discriminer des dimères des autres structures, la teinte (vert, jaune, orange ou rouge) visualisée sur la caméra est un bon indicateur. Pour traduire cette perception en une valeur quantitative, nous avons choisi d'utiliser la teinte H. Nous avons également vu que l'intensité est un paramètre important lors de la sélection des dimères. En particulier, l'intensité des agrégats sature en général la caméra et ils apparaissent alors comme étant blancs au centre. Pour quantifier ce paramètre, nous avons choisi la valeur de la luminosité L. En effet, dans le protocole HSL, cette seule composante permet d'obtenir du blanc. Dans le protocole HSV pour en obtenir il faut une saturation S faible et une valeur V élevée : devoir suivre deux paramètres n'est pas pratique. Nous avons donc choisi de convertir les informations RGB de la caméra en HSL.

### 3.4.1 Acquisition et traitement des données

La première étape de ce nouveau protocole est la prise d'images de l'échantillon avec la caméra CCD couleur (exposition 300ms). Une sous-exposition ne permet pas un rapport signal / bruit suffisant pour le traitement automatique des données et une sur-exposition sature les tâches d'Airy correspondant au dimères et dégrade alors les informations sur la teinte. Une fois l'acquisition des images effectuées, tout le post-traitement est effectué avec Matlab.

Dans un premier temps, le centre de chaque tâche d'Airy est identifiée dans chacune des images. Lorsque les conditions expérimentales sont modulées dans le temps pour un même échantillon, les tâches sont associées sur chacune des images. Cela permet, par exemple, d'identifier les dimères qui se sont détachés lors d'une étape et donc de les retirer de l'étude statistique. Enfin, les informations de couleur de chaque dimère sont converties

de RGB en HSL grâce à une bibliothèque Matlab. Pour associer une valeur HSL à chaque dimère, nous moyennons les signaux sur 200 pixels autour du centre de la tâche d'Airy correspondante : compte-tenu du grandissement élevé (x72) et de la limite de diffraction de notre montage ( $1\mu\text{m}$ ), une tâche d'Airy est fortement sur-échantillonnée avec un diamètre de 15 pixels environ.

### 3.4.2 Choix des dimères

L'utilisation du protocole HSL a deux buts : simplification expérimentale et automatisation du choix de dimères, comme déjà évoqué précédemment. Nous avons ainsi défini empiriquement des valeurs seuils afin de discriminer les dimères des autres structures (monomères ou agrégats). Pour éliminer les monomères ainsi que certaines poussières, apparaissant comme des points bleutés, nous utilisons un seuil en teinte H : si la teinte est supérieure à  $130^\circ$ , la lumière diffusée est trop bleue pour provenir d'un dimère. Pour éliminer les agrégats, nous utilisons un seuil en luminosité L : si le point a une luminosité supérieure à 0.65, le signal est trop important pour un dimère. Cette utilisation de valeurs seuils permet d'éviter tout *cherry picking* involontaire lors du choix subjectif des dimères quand je mesure des spectres de diffusion d'objets uniques.

### 3.4.3 Validation du nouveau protocole

Afin de valider ce nouveau protocole, nous avons utilisé les mêmes échantillons que pour la partie précédente : dimères de particules commerciales et de particules monodisperses avec des origamis **fermés\*** et **ouverts**. Nous avons donc utilisé les images d'ensembles prises lors du choix des dimères des expériences avec le spectromètre. La figure 3.23 présente les résultats obtenus avec ces images grâce à ce nouveau protocole. Nous allons analyser les résultats pour répondre à la question : *l'utilisation de particules monodisperses améliore-t-elle la réponse optique ?*. Si nous arrivons aux mêmes conclusions, nous considérerons alors comme valide ce nouveau protocole.

Les résultats sont présentés de la même manière que précédemment : les dimères de particules commerciales en conformation **ouverte** et **fermée\*** dans la partie inférieure (histogrammes marron) et les dimères de particules monodisperses également dans ces deux conformations dans la partie supérieure (histogrammes verts). Une bande supplémentaire présente, en haut de la figure, associe la teinte estimée en degrés avec celle observée sur les images. Cela permet de visualiser la variation de couleur des dimères correspondant aux distributions. Afin de faciliter la comparaison entre les résultats de longueur d'onde de résonance et de teinte, l'axe des abscisses est inversé dans ce dernier cas : un décalage vers le rouge correspond à une diminution de la valeur de H en degrés.

Nous allons commencer l'analyse des résultats en comparant les deux échantillons de la forme **ouverte**. La valeur médiane est de  $104,1^\circ$  pour les particules commerciales et de  $103,5^\circ$  pour les monodisperses. Les espaces interquartiles sont respectivement égaux à  $12^\circ$  et  $7^\circ$ . Il y a donc un rapport d'environ 1,7 entre ces deux types d'échantillons. Il en va évidemment de même pour l'étendue des moustaches, qui, pour les commerciales s'étend de  $126,1^\circ$  à  $78,9^\circ$  ce qui correspond à un camaïeu de vert (le jaune équivalant à  $60^\circ$ ), et de  $114,7^\circ$  à  $94,2^\circ$  pour les monodisperses. Pour la conformation **fermée\***, La valeur médiane de H pour les particules commerciales est de  $85,5^\circ$  et de  $89,1^\circ$  pour les monodisperses. Le décalage entre **ouvert** et **fermé\*** est alors de  $18,6^\circ$  pour les premières et de  $14,4^\circ$

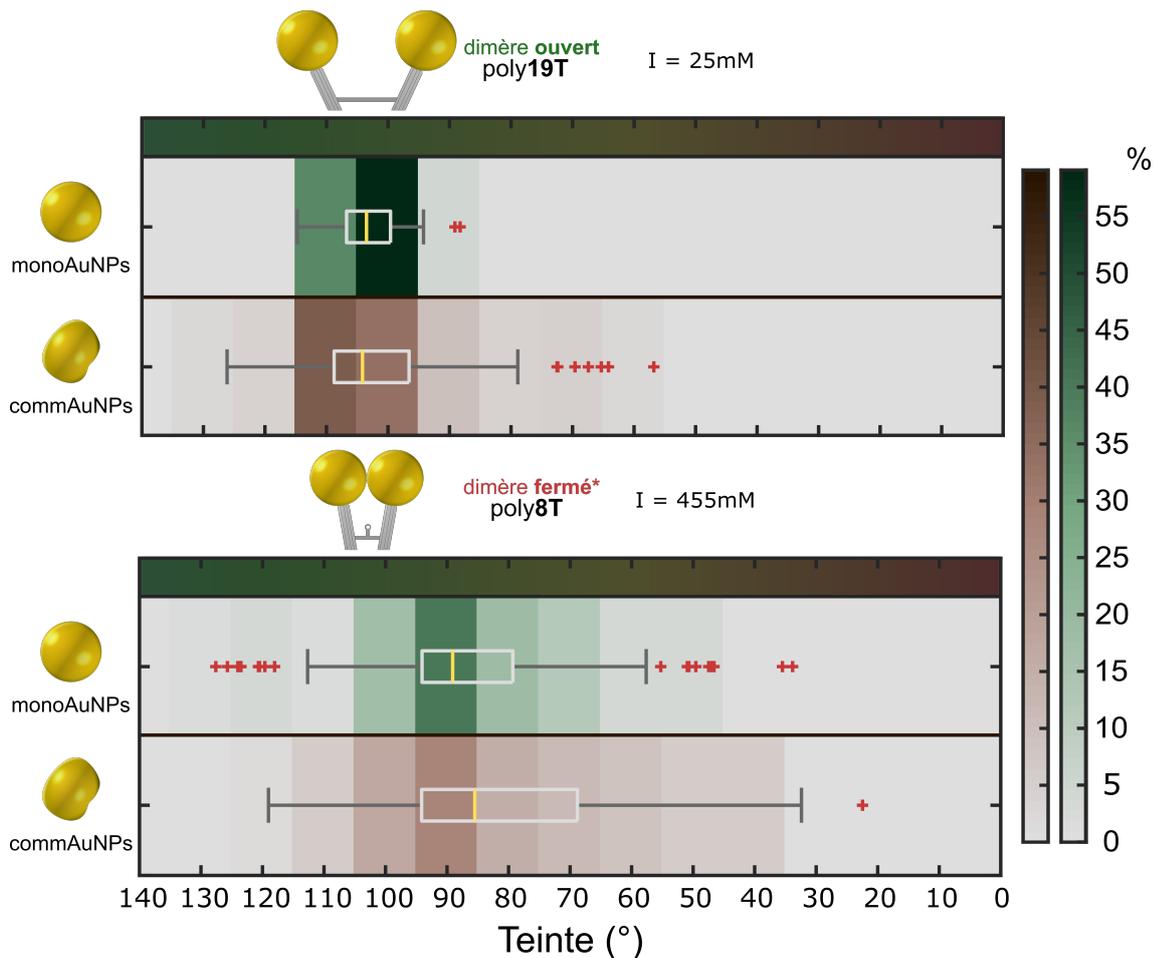


Figure 3.23: Analyse HSL de dimères origamis de nanoparticules commerciales (distributions marron) et de particules monodisperses (distributions vertes) en conformation **ouvert** (en haut) et **fermé\*** (en bas)

pour les secondes donc légèrement inférieur comme nous avons pu le voir précédemment avec l'analyse des spectres de diffusion. Les espaces interquartiles sont respectivement égaux à  $25,1^\circ$  et  $14,6^\circ$ . Ils ont donc été chacun multipliés par 2 environ par rapport à la forme **ouverte**. Finalement, les moustaches s'étendent de  $119^\circ$  à  $32,4^\circ$ , passant du vert au orange, pour les commerciales et de de  $112,7^\circ$  à  $57,6^\circ$ , du vert au jaune, pour les monodisperses. On observe alors une augmentation de l'étendue des moustaches pour les deux types d'origami.

Enfin, le calcul des *p Value*, sur l'hypothèse que les échantillons **ouvert** et **fermé\*** de chacune deux formes sont identiques, donne des valeurs respectivement égales à  $1, 1.10^{-20}$  et  $6, 3.10^{-17}$ , donc largement inférieures au seuil des 5%. Nous pouvons donc conclure qu'il est possible de différencier, pour chaque type de particules, d'une différence de conformation des dimères tel qu'observé avec les spectres de diffusion.

En pratique, l'utilisation de particules monodisperses divisent par 1,7 l'espace interquartile pour les deux conformations. Les moustaches sont, quant à elles, divisées par 2,3 pour la forme **ouverte** et par 1,6 pour la forme **fermée\***. Ainsi les distributions des particules

monodisperses sont bien moins larges et leur utilisation améliore donc la reproductibilité des réponses optiques.

Finalement, l'analyse des résultats par l'intermédiaire de ce nouveau protocole confirme l'hypothèse selon laquelle l'utilisation de particules monodisperses en forme et en taille améliore la réponse optique de nos nano-objets. Les conclusions étant donc identiques à celles obtenues dans la partie précédente avec l'ancien protocole, cela nous permet alors de valider l'approche basée sur l'analyse HSL. Cela nous permet également de conclure que la sélection des dimères que j'effectue avec la caméra couleur avant l'analyse spectrale de nanostructures uniques est valable car elle donne des résultats comparables à une analyse sans sélection subjective.

#### 3.4.4 Comparaison des deux protocoles

Comme déjà évoqué précédemment, ce nouveau protocole limite l'intervention humaine sur le choix des dimères. Cette intervention comporte en effet des biais cognitifs pouvant mener à un *cherry picking* non voulu. Ainsi, la limitation de cette intervention permet un choix plus objectif des tâches d'Airy considérées comme étant des dimères. Par conséquent, nous devrions observer un plus grand nombre d'événements extrêmes ainsi qu'un élargissement des distributions. En effet, nous avons vu lors de l'analyse des résultats que la diminution des grandeurs comparatives (espace interquartile et taille des moustaches) est légèrement inférieure avec le nouveau protocole pour les objet **ouverts** et plus importante pour les **fermés\***. Le tableau ci-après rappelle les valeurs de diminution de ces grandeurs pour les deux conformations obtenues avec les différents protocoles.

Etat	Grandeur observée	Protocole spectromètre	Protocole HSL
ouvert	esp. interquartile	2,3	1,7
	moustaches	2,3	2,3
fermé*	esp. interquartile	2,3	1,7
	moustaches	3,5	1,6

Nous observons également une augmentation du nombre de valeurs situées à l'extérieure des moustaches, représentées par des croix rouges, correspondant à des événements plus extrêmes. Cependant ce nombre est à relativiser par rapport à la taille des populations correspondant aux différents échantillons.

En effet, l'un des avantages de ce protocole est l'augmentation de la taille de l'échantillon. Alors qu'avec l'approche spectroscopique, nous utilisons au maximum une population de 50 dimères, la mesure HSL nous permet de traiter une plus grande quantité d'éléments. Le tableau ci-après présente, par exemple, la taille des échantillons utilisés pour l'analyse présentée ainsi que le pourcentage de valeurs en dehors des moustaches.

Particules	Etat	Taille de l'échantillon	Valeurs extrêmes
commerciales	ouvert	99	6%
	fermé*	144	0,7%
monodisperses	ouvert	88	2%
	fermé*	210	8%

Ainsi, pour chacun des échantillons, la taille de l'échantillon statistique est supérieure à 50. Quant aux valeurs extrêmes, leur nombre varie d'un échantillon à l'autre mais reste

relativement faible.

Cet agrandissement est en grande partie dû à la réduction du temps d'acquisition. En effet, pour acquérir 50 spectres, le temps nécessaire est d'environ 30 min avec le besoin d'une présence humaine pour surveiller et rectifier la dérive de l'échantillon qui est un paramètre critique pour l'obtention des spectres (recouvrement spatial entre l'image de la fibre du spectromètre sur l'échantillon et la position du dimère mesuré). Au contraire, ce nouveau protocole ne nécessite que quelques secondes, le temps de prendre des images et de les enregistrer, chaque image comportant souvent plus de 50 dimères. Il est, de plus, beaucoup moins sensible à la dérive de l'échantillon et peut donc permettre une meilleure automatisation. Il est également possible d'étudier l'évolution de la teinte H de chaque tâche d'Airy, pour un même échantillon donné, en modulant les paramètres physico-chimiques des dimères.

Ce protocole d'analyse des propriétés optiques de dimères plasmoniques a donc un potentiel intéressant pour des applications industrielles : équipements près de 100 fois moins chers (caméra couleur par rapport à un spectromètre associé à une caméra CCD refroidie et à une platine piézoélectrique), rapidité, et simplicité des alignements. Toutefois, en obtenant une information spectrale relative, il ne permet pas de remonter à la distance interparticule  $d$  dans l'analyse de mes échantillons. À l'inverse, la spectroscopie de nanostructures uniques, associée à des simulations numériques en *MNPBEM*, m'a permis de définir une relation entre fréquence de résonance et distance interparticule. L'approche HSL est donc surtout intéressante pour exploiter des nanostructures hybrides stimulables déjà bien caractérisées. Comme, pour cette thèse, il nous faut encore étudier et comprendre l'évolution de la morphologie de dimères de nanoparticules d'or assemblées sur des origamis d'ADN, je vais me concentrer dans les chapitres 4 et 5 à des mesures de spectroscopie de nanostructures uniques.

## Chapitre 4

# Ouverture et fermeture d'origamis d'ADN par *strand displacement*

### Sommaire

---

<b>4.1 Design des origamis</b> . . . . .	<b>100</b>
4.1.1 Origamis non modulables . . . . .	100
4.1.2 Origamis modulables par <i>strand displacement</i> . . . . .	102
<b>4.2 Propriétés optiques de dimères hybrides</b> . . . . .	<b>107</b>
4.2.1 Optimisation de la chimie de surface des particules . . . . .	107
4.2.2 Influence de la force ionique . . . . .	110
<b>4.3 <i>Strand displacement</i> dans des dimères hybrides</b> . . . . .	<b>115</b>

---

Dans ce chapitre, je vais vous présenter les résultats que j'ai obtenus en étudiant des dimères de nanoparticules d'or assemblés sur des origamis d'ADN en Y, dont la morphologie est modifiée en modulant la longueur d'une section double-brin du site actif de l'origami. Dans un premier temps, je vais détailler les différents designs que nous avons considérés : les origamis **ouverts**, **semi-ouverts** et **fermés**, décrits sommairement dans le chapitre 2 et dont le site actif n'est plus modulable une fois l'origami synthétisé ; et les origamis **semi-ouverts\*** et **fermés\*** dont la longueur du site actif peut être modulée par une réaction de *strand displacement*.

Je montrerai ensuite comment des mesures de spectroscopie de dimères uniques avec ces origamis nous a permis de choisir la chimie de surface des nanoparticules et le type de nanoparticules permettant au mieux de corrélérer les fréquences de résonance plasmon mesurées et la morphologie des origamis. Nous avons également pu étudier comment ces nanostructures hybrides voient leur morphologie modifiée en modulant la force ionique du milieu. Je terminerai le chapitre en décrivant les résultats obtenus sur des dimères hybrides assemblés sur les origamis modulables et où j'ai modifié la conformation de l'origami ex-situ (avant assemblage) ou in-situ (dans la chambre microfluidique).

## 4.1 Design des origamis

### 4.1.1 Origamis non modulables

Au cours du chapitre 2, je vous ai déjà présenté 3 designs d'origamis non-modulables en indiquant uniquement le nombre de bases hybridées qui définissent la section double-brin du site actif.

#### Origami *fermé*

L'origami **fermé** est hybridé par 2 brins de 43 bases chacun. La figure 4.1 présente une représentation schématique détaillée de cette structure. Les séquences données dans cette figure correspondent aux 2 simple-brins du *scaffold* qui relie les deux bras du Y. Les deux flèches d'une même couleur correspondent à un unique brin d'ADN synthétique de 43 bases comme indiqué par les pointillés. Toutefois, il n'y a pas d'hybridation au *scaffold* au niveau de ces pointillés : à ce niveau, le *scaffold* va former une boucle simple-brin. Les séquences des 2 brins synthétiques sont :

- Brin 1 : GTATTAAACCAAGTACCAGGCTTATCCGGTATTCTAAGAACGC (43 bases)
- Brin 2 : TAAATGCAATGCCTGAGTAATGTGTAATGCCGGAGAGGGTAGC (43 bases)

La boucle formée par le *scaffold* ne se situe pas au centre du site actif mais à 18 ou 25 bases en partant des bras : ce choix est effectué pour faire coïncider l'orientation des hélices de part et d'autre de la boucle comme indiqué sur une représentation 3D du site actif correspondant en figure 4.1. En considérant 43 paires de bases entre les bras, nous pouvons estimer leur écartement à environ 15 nm. Compte-tenu de l'effet de levier dû au Y et de la géométrie d'accroche des nanoparticules d'or, cela devrait impliquer une distance interparticule de 9 nm pour deux sphères de 40 nm comme expliqué au chapitre 2 dans la figure 2.2b.

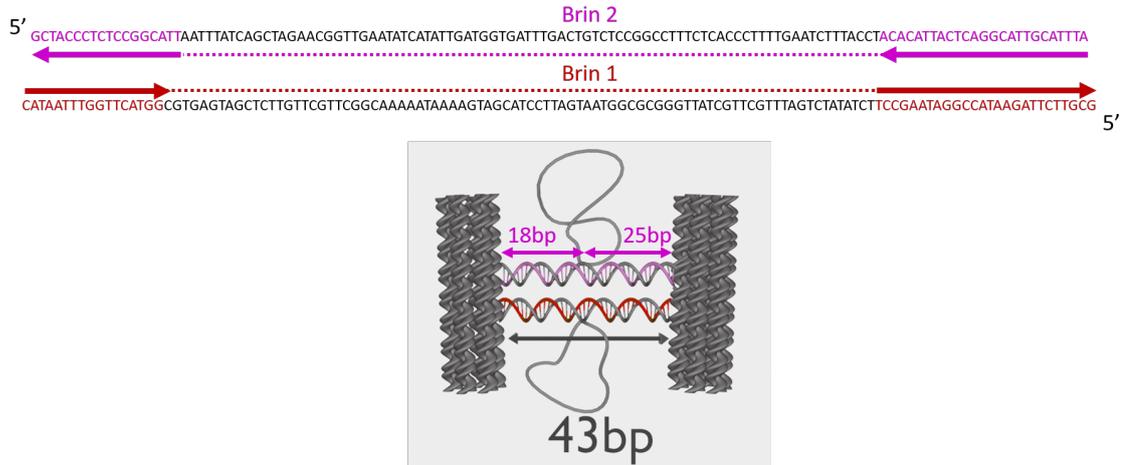


Figure 4.1: Schéma explicatif de la structure de la partie centrale de l'origami **fermé** (43bp). Séquences : les 2 brins du *scaffold*, flèches : les brins complémentaires au *scaffold* (séquences données dans le texte), pointillés : 0 base entre les deux extrémités des flèches (en haut). Représentation 3D de la structure de l'origami (en bas).

### Origami *semi-ouvert*

L'origami **semi-ouvert** est, lui, hybridé par 4 brins. La figure 4.2 présente une représentation schématique détaillée de cette structure. Deux brins, un à chaque extrémité, relient les deux brins du *scaffold*. Cela apporte plus de rigidité à la structure grâce à la disparition d'un degré de liberté de mouvement des brins. Des boucles sont formées de la même manière que précédemment en hybridant des brins différents sur chaque brin du *scaffold*. Les séquences de ces brins sont :

- Brin 1 : GGTAAGATTCAAAAGGGTGAACCGTTCTAGCTGATAAATTA (42 bases)
- Brin 2 : GCACTCATCGAGAACAAGCAAAGCAAATCAGATATAGA (42 bases)
- Brin 3 : GTATTAAACCAAGTACCATGCCGGAGAGGGTAGC (34 bases)
- Brin 4 : TAAATGCAATGCCTGAGTAATGTGTAAGGCTTATCCGGTATTCTAAGAACGC (52 bases)

La boucle ne se situe pas au centre de la structure mais à 38 ou 47 bases en partant des bras. L'écartement entre les bras devrait alors correspondre à environ 29 nm ; impliquant une distance bord à bord de l'ordre du diamètre des particules d'or.

### Origami *ouvert*

Enfin, l'origami **ouvert** est hybridé par 6 brins. La figure 4.3 présente une représentation schématique détaillée de cette structure. Toutes les bases des brins du *scaffold* sont hybridées par des brins complémentaires liant les deux différents brins : il n'y a aucune boucle. Les séquences de ces brins sont :

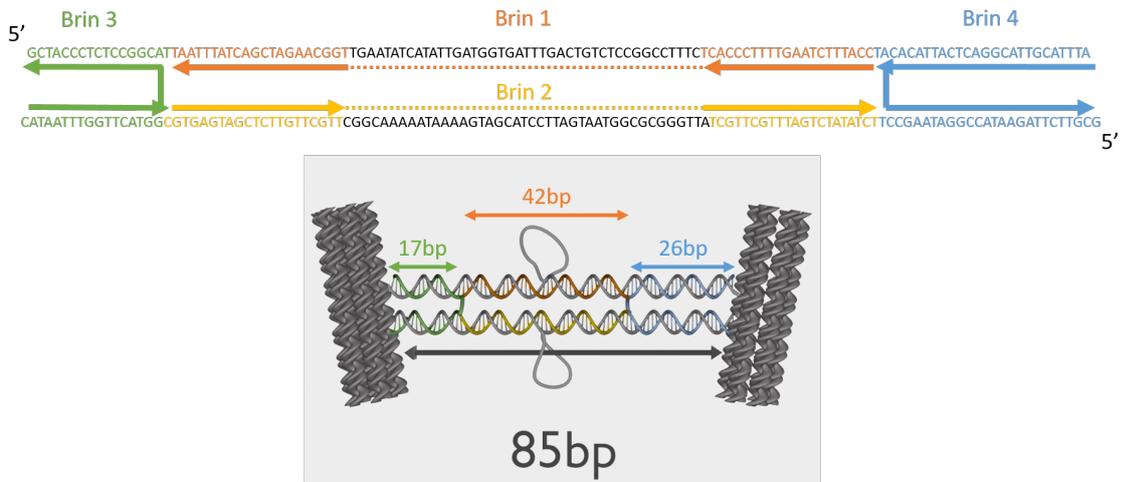


Figure 4.2: Schéma explicatif de la structure de la partie centrale de l'origami **semi-ouvert** (85bp). Séquences : les 2 brins du *scaffold*, flèches : les brins complémentaires au *scaffold* (séquences données dans le texte), pointillés : 0 base entre les deux extrémités des flèches (en haut). Représentation 3D de la structure de l'origami (en bas).

- Brin 1 : GCACTCATCGAGAACAAGCAAACCGTTCTAGCTGATAAATTA (42 bases)
- Brin 2 : GCCGTTTTTATTTTCATCGTATCACCATCAATATGATATTCA (42 bases)
- Brin 3 : AGCAAGCAAATCAGATATAGAGGTAAAGATTCAAAGGGTGA (42 bases)
- Brin 4 : GGAATCATTACCGCGCCCAATGAAAGGCCGAGACAGTCAAA (42 bases)
- Brin 5 : GTATTAAACCAAGTACCATGCCGGAGAGGGTAGC (34 bases)
- Brin 6 : TAAATGCAATGCCTGAGTAATGTGTAAGGCTTATCCGGTATTCTAAGAACGC (52 bases)

Les brins hybridés sur les extrémités du site actif (5 et 6) sont identiques à ceux de l'origami **semi-ouvert** (3 et 4). L'écartement entre les bras correspond à environ 43 nm et donc la distance interparticule devrait alors être significativement plus grande que le diamètre des particules.

#### 4.1.2 Origamis modulables par *strand displacement*

##### Design

La réaction de *strand-displacement* que nous avons conçue commence à partir d'un origami **fermé\*** (voir figure 4.4). La partie centrale est hybridée sur 36bp par deux brins (brins rose et rouge). Chaque brin du *scaffold* est indépendant comme sur la forme **fermé**. La boucle se trouve au milieu, à 18 bases d'un bras. De chaque côté des brins qui maintiennent l'origami fermé, 7 bases supplémentaires ont été ajoutées, uniquement des adénines

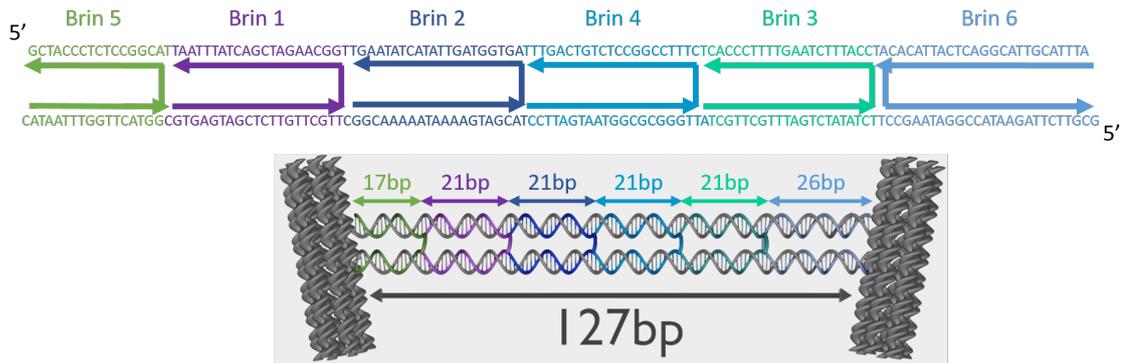


Figure 4.3: Schéma explicatif de la structure de la partie centrale de l'origami **ouvert** (127bp). Séquences : les 2 brins du *Scaffold*, flèches : les brins complémentaires au *Scaffold* (séquences données dans le texte) (en haut). Représentation 3D de la structure de l'origami (en bas).

(A). Les brins ont alors une longueur de 50 bases mais ne sont hybridés que sur 36. L'ajout de brins de **déverrouillage** (brins jaune et orange), entièrement complémentaires aux 50 bases, permet de libérer le *scaffold*. Finalement l'ajout de trois brins, dits d'**ouverture** (brins turquoise, noir et bleu), s'hybrident au *scaffold* sur le site actif et créent une section double-brin de 71bp entre les bras, complétée de sections simple-brins.

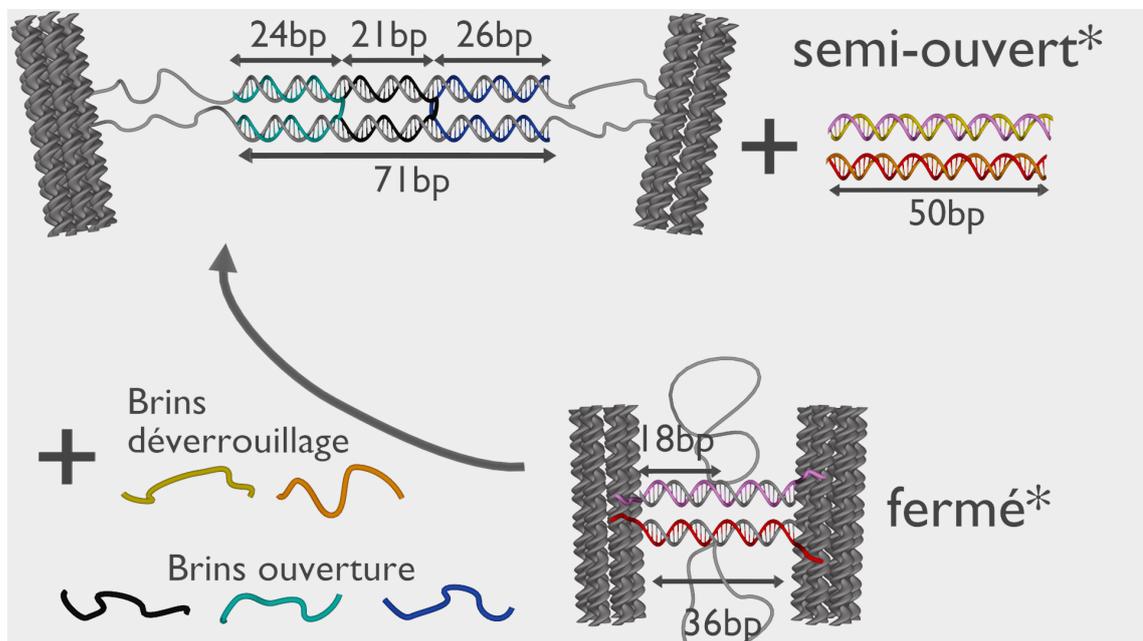


Figure 4.4: Représentation schématique 3D de la réaction de *strand-displacement* du passage d'un origami **fermé\*** à **semi-ouvert\***

Comme on peut le voir sur la figure 4.5, qui présente les séquences du *scaffold* hybridé dans les deux conformations, les brins d'ouverture et de fermeture s'hybrident sur des parties différentes. Ainsi, lors d'une incubation avec les 5 brins d'ADN de déverrouillage

et d'ouverture, ces derniers peuvent interagir avec l'origami avant la fin du déverrouillage de l'origami et ainsi le faciliter d'un point de vue thermodynamique. La réaction est dite coopérative.

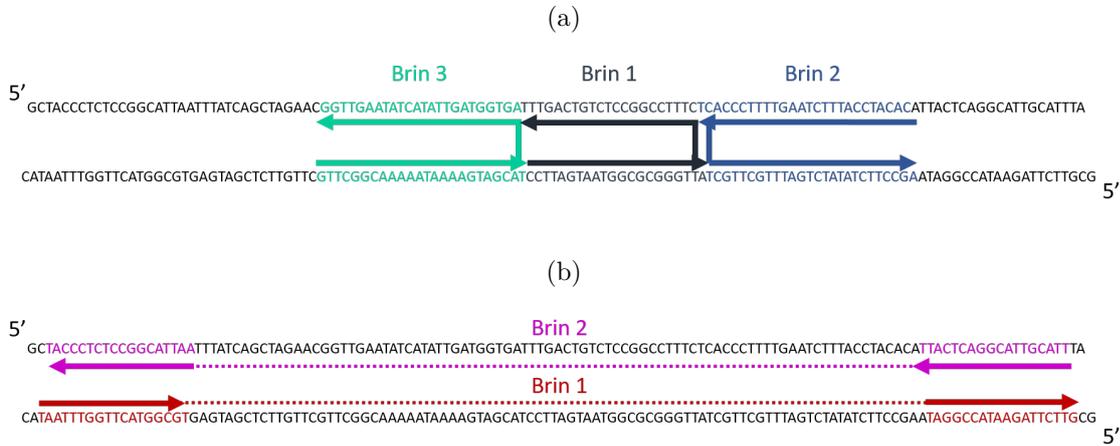


Figure 4.5: Schéma explicatif de la structure de la partie centrale de l'origami **semi-ouvert\*** (71bp)(a) et **fermé\*** (36bp)(b).

Séquences : les 2 brins du *Scaffold*, flèches : les brins complémentaires au *Scaffold* (séquences données dans le texte), pointillés : 0 base entre les deux extrémités des flèches.

Finalement, voici les différentes séquences des brins décrits :

- Brins de fermeture (rose et rouge) :
  - Brin 1 : AAAAAAA ATTAAACCAAGTACCGCAATCCGGTATTCTAAGAAC AAAAAAA (50 bases)
  - Brin 2 : AAAAAAA AATGCAATGCCTGAGTAATTAATGCCGGAGAGGGTA AAAAAAA (50 bases)
- Brins de déverrouillage (jaune et orange) :
  - Brin 1' : TTTTTTT GTTCTTAGAATACCGGATTGCGGTACTTGGTTTAAT TTTTTTT (50 bases)
  - Brin 2' : TTTTTTT TACCCTCTCCGGCATTAACTACTCAGGCATTGCATT TTTTTTT (50 bases)
- Brins d'ouverture (turquoise, noir et bleu) :
  - Brin 1 : GGAATCATTACCGCGCCAATGAAAGGCCGGAGACAGTCAAA (42 bases)
  - Brin 2 : GTGTAGGTAAGATTCAAAAGGGTGAAGCAAAGCAAATCAGATATA-GAAGGCT (52 bases)

- Brin 3 : CAAGCCGTTTTTATTTTCATCGTATCACCATCAATATGATATTCAACC  
(48 bases)

Il est également possible d'effectuer cette réaction de *strand displacement* dans les origamis en deux étapes en passant, dans un premier temps, d'une conformation **fermée\*** à une conformation que j'appellerai **déverrouillée\***, où le scaffold est parfaitement simple-brin entre les deux bras du Y. Ce passage se fait en ajoutant les 2 brins de déverrouillage à l'origami **fermé\*** (voir figure 4.6).

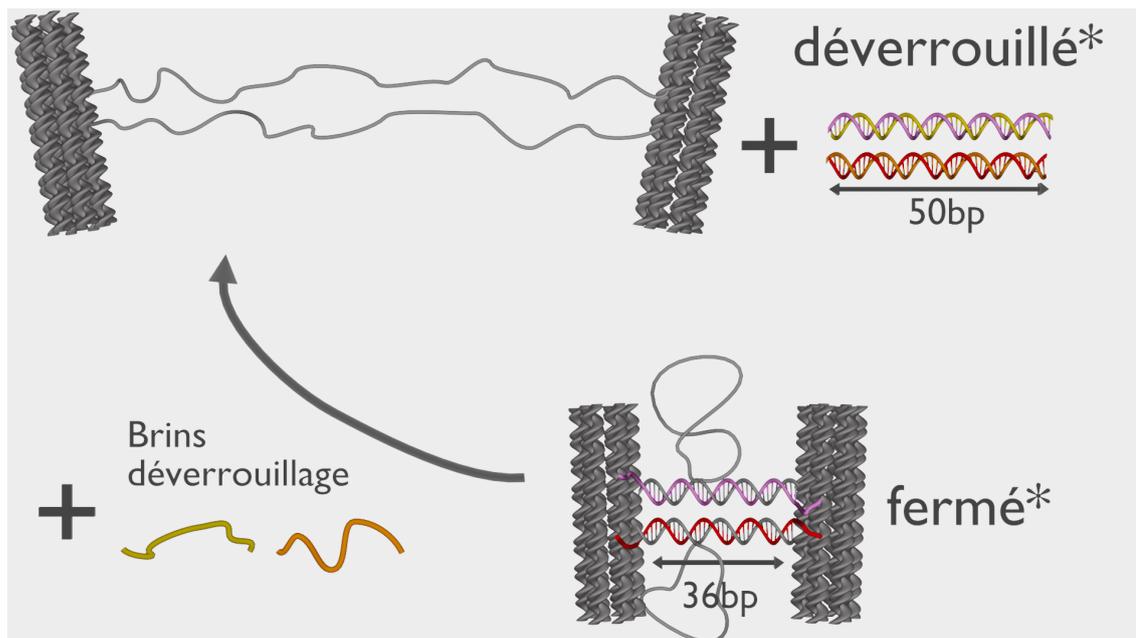


Figure 4.6: Représentation schématique 3D de la réaction de *strand-displacement* du passage d'un origami **fermé\*** à **déverrouillé\***

L'origami **déverrouillé\*** peut alors être refermé en ajoutant les brins de fermeture ou passer à la forme **semi-ouverte\*** avec les brins d'ouverture comme représenté sur la figure 4.7.

### Modulation des origamis seuls

Le mécanisme d'ouverture de ce nouveau design d'origami a, dans un premier temps, été testé à Montpellier par l'équipe de Gaëtan Bellot. Des images TEM ont été prises pour valider la conception. Les échantillons ont donc été synthétisés sous forme **fermée\***. La figure 4.8a montre une image TEM de ces origamis. Ces images indiquent bien un angle faible pour les Y des origamis, confirmant la conformation du site actif. Ils ont ensuite été mis à incuber avec les brins de déverrouillage et d'ouverture. De nouvelles images TEM ont alors été prises (figure 4.8b). Sur cette image, nous pouvons visualiser un certain nombre d'origamis où les deux bras sont écartés. La même expérience a été effectuée en deux étapes en formant, dans un premier temps, l'origami **déverrouillé\*** sans différence notable en TEM. Grâce à ces images, nous avons pu valider le fonctionnement du mécanisme de changement de conformation des origamis par *strand displacement*.

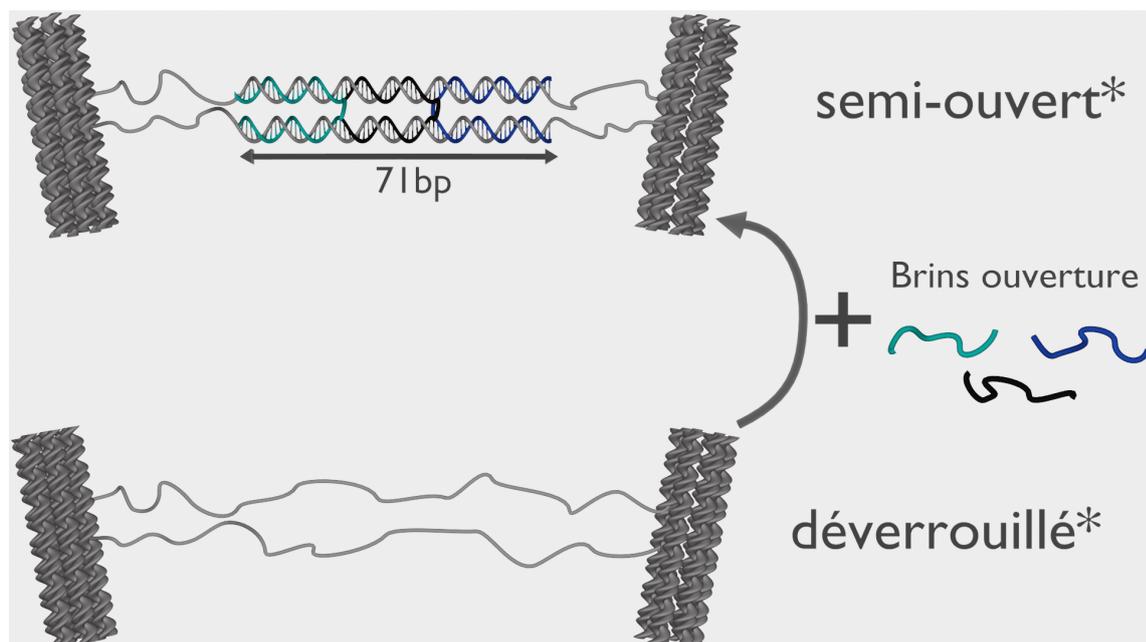


Figure 4.7: Représentation schématique 3D de la réaction de *strand-displacement* du passage d'un origami **déverrouillé\*** à **semi-ouvert\***

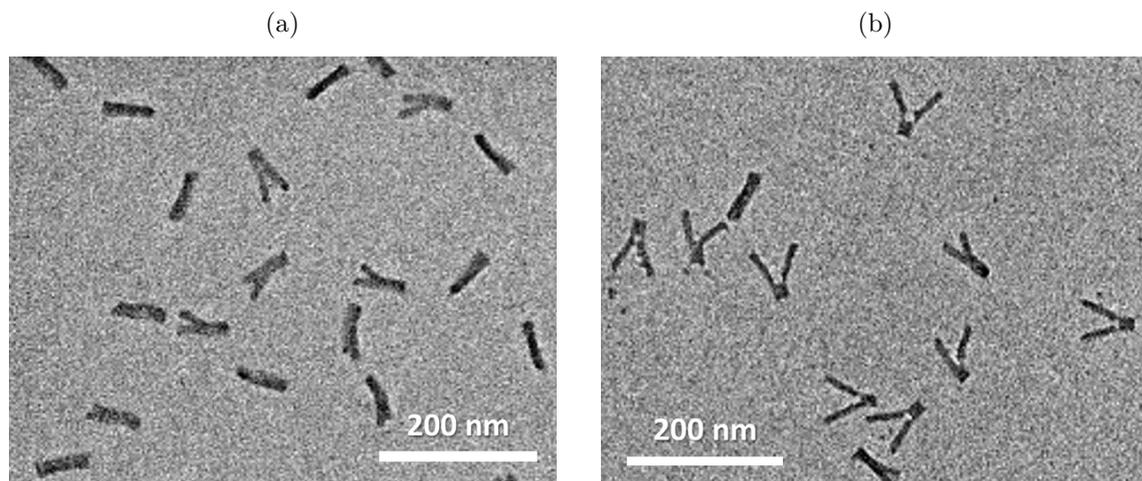


Figure 4.8: Images de microscopie électronique à transmission d'origamis **semi-ouvert\*** (a), puis les mêmes origamis ayant été mis à incuber avec les brins déverrouillage et ouverture (b).

## 4.2 Propriétés optiques de dimères hybrides

### 4.2.1 Optimisation de la chimie de surface des particules

Comme je vous l'ai indiqué dans le chapitre 2, j'ai pu synthétiser des dimères assemblés sur des origamis d'ADN avec différentes chimies de surface pour des particules d'or commerciales de 40 nm : brin d'ADN aléatoire de 30 bases *ss30* et différents brins polyT monothiolés en 3' (5T à 9T), trithiolé en 3' (8T) ou trithiolé en 5' (19T). Tous ces brins d'ADN sont associés à un ligand amphiphile, nommé *XPEG* précédemment. Le brin *ss30* a bien permis de synthétiser des dimères mais sa longueur théorique de plus de 17 nm le rend difficilement exploitable en couplage plasmon. Les brins monothiolés de 5 et 7 thymines n'ont pas permis d'obtenir une stabilité colloïdale suffisante pour assembler des dimères. J'ai donc étudié les propriétés optiques de dimères assemblés avec un brin 9T monothiolé en 3' (longueur théorique  $L \approx 5$  nm), un brin 8T trithiolé en 3' ( $L \approx 6$  nm) et un brin 19T trithiolé en 5' ( $L \approx 10$  nm en considérant la longueur de persistance de l'ADN simple-brin).

Le but dans la comparaison de ces chimies de surface est double : s'assurer que les dimères assemblés sont suffisamment stables pour que les deux particules d'or ne s'agrègent pas l'une sur l'autre ; s'assurer qu'il est possible de différencier optiquement les différentes conformations de l'origami d'ADN. La figure 4.9 compare les distributions de dimères **fermés** et **ouverts** recouverts soit d'un ADN 9T, soit 19T avec des particules commerciales. Tous les échantillons sont mis à faible force ionique,  $I=25$  mM, correspondant à une solution tampon avec 10 mM de Tris-HCl, 5 mM de  $\text{Na}^+$  et 5 mM de  $\text{Mg}^{2+}$ . On observe, pour les deux chimies de surface, que les dimères assemblés sur des origamis **fermés** présentent bien des fréquences de résonance décalées vers le rouge par rapport aux dimères **ouverts**.

Les distributions de longueurs d'onde observées dans le cas du ligand 9T sont très larges, en particulier dans le cas **fermé**. La longueur d'onde de résonance médiane des dimères **ouverts** 9T est de 552 nm. Cette valeur correspond à une distance interparticule  $d$  supérieure à 20 nm d'après la relation théorique entre longueur d'onde de résonance et  $d$  établie dans le chapitre 3 pour des particules commerciales. Cette distance est donc plus faible que celle attendue par le design des origamis mais le couplage plasmon n'est pas très précis dans cette gamme de distance. En ce qui concerne l'échantillon avec l'origami **fermé**, on observe une double distribution : une première centrée autour de 570 nm et une seconde bien plus rouge centrée sur 620 nm. Cette dernière population correspond à des distances interparticules  $d$  attendues à moins de 5 nm : cette valeur est donc en bon accord avec le design de l'origami **fermé** mais correspond donc à une très forte interpénétration des couches de ligands. Ces dimères sont agrégés. La distribution centrée à autour de 570 nm correspond à des distances interparticules de l'ordre de 8-10 nm, soit au contact des chimies de surface. Il semble donc que l'ADN 9T ne fournisse pas une très forte répulsion stérique entre particules d'or et que celles-ci vont avoir tendance à agréger. Cela sera probablement un problème pour créer des dimères dynamiques. Surtout, la distribution mesurée pour les dimères **fermés** est si large qu'il sera difficile d'observer des changements de conformations avec ces dimères.

L'échantillon contenant des particules d'or recouvertes de 19T présente des résonances plasmon décalées vers le bleu par rapport au cas 9T et des distributions moins larges. Dans le cas des dimères **ouverts**, la valeur médiane est de 549 nm, correspondant à une distance  $d$  de plus de 25 nm. Pour les dimères **fermés**, la médiane vaut 555 nm, cor-

respondant à une distance typique  $d$  de l'ordre de 17 nm. On observe donc un décalage spectral médian de 6 nm entre dimères **ouverts** et **fermés**, correspondant théoriquement à une variation de près de 10 nm de la distance interparticule. Il y a donc bien possibilité de détecter optiquement une différence de conformation des origamis mais la variation de distance  $d$  est bien plus faible que le design théorique. Dans le cas des dimères **ouverts**, il est important de rappeler que le couplage plasmon n'est pas très sensible à des distances  $d$  plus grandes que le rayon  $a$  des particules et que  $d$  pourrait donc être significativement plus grand sans moduler fortement la longueur d'onde médiane. Dans le cas des dimères **fermés**, une distance  $d$  de l'ordre de 17 nm correspond probablement à un contact des chimies de surface avec un ADN de surface de 19 thymines trithiolé. Cette mesure nous confirme donc que l'utilisation d'un ligand long, en surface des particules, va limiter la capacité de notre technique à corrélérer mesures optiques et morphologie de l'origami. La distance  $d$  la plus courte accessible avec un ADN 19T est trop proche du rayon  $a$  de la particule et donc de la limite de sensibilité du couplage plasmon.

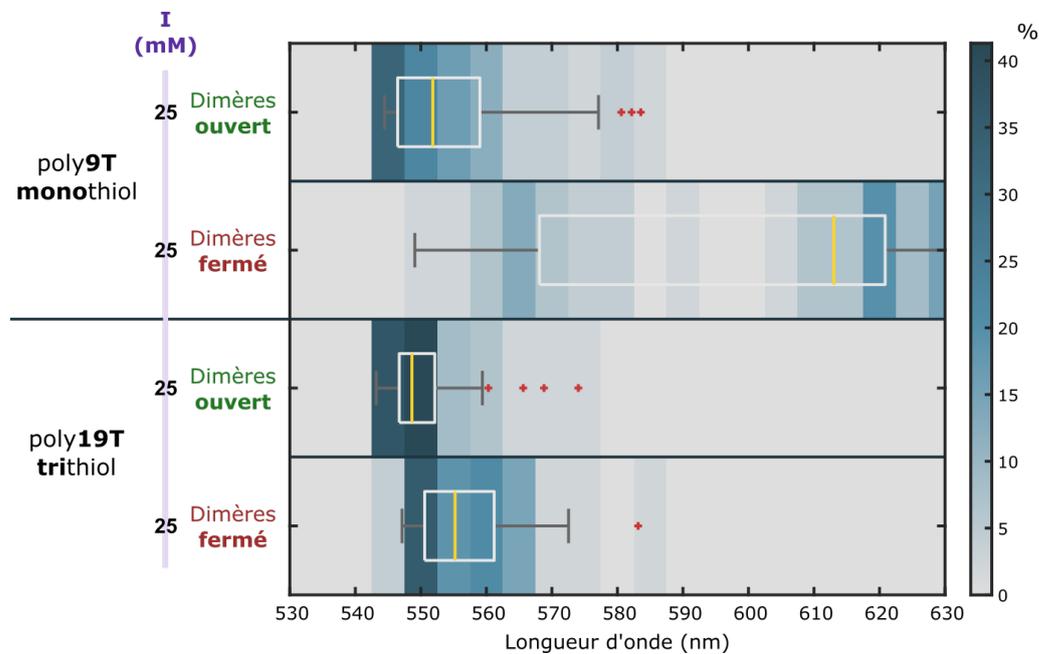


Figure 4.9: Comparaison des distributions de longueur d'onde de résonance pour des dimères de particules commerciales couvertes de poly9T monothiol (en haut) ou de poly19T trithiol (en bas) pour deux types d'origamis différents : **ouvert** et **fermé** (Taille des échantillons : 49 dimères) (Tailles des échantillons : 49 dimères pour **ouvert 9T**) ; 46 dimères pour **fermé 9T** ; 50 dimères pour **ouvert 19T** ; 48 dimères pour **fermé 19T**

Si l'ADN 9T permet d'atteindre des distances  $d$  intéressantes de l'ordre de 10 nm, l'apparition de dimères agrégés à faible force ionique (25 mM) est problématique. Je vais donc comparer les résultats obtenus en 9T à faible force ionique (25 mM) avec des mesures effectuées avec un 8T trithiolé à forte force ionique ( $I = 455$  mM, soit une solution tampon de 10 mM de Tris-HCl, pH=7,6, avec 150 mM de  $\text{Na}^+$  et 100 mM de  $\text{Mg}^{2+}$ ). La figure 4.10 présente les distributions mesurées. Les origamis étudiés sont des **semi-ouverts** et non des **ouverts** comme précédemment. Dans le cas des dimères 9T, cela entraîne un décalage

spectral médian de 3 nm vers le rouge, indiquant une distance interparticule de 17 nm. Il semble donc possible de différencier optiquement des origamis **semi-ouverts** et **ouverts** mais le décalage spectral est faible par rapport à la largeur typique de ces distributions. En comparant les dimères 9T et 8T, on observe des distributions assez similaires dans le cas d'un origami **semi-ouvert** avec des distances interparticules typiques estimées d'une vingtaine de nanomètres. Par contre, les distributions de longueurs d'onde de résonance dans le cas **fermé** sont sensiblement différentes : quand les dimères 9T sont en majorité agrégés, les dimères 8T présentent une majorité de fréquences de résonance autour de 565-570 nm (médiane à 567 nm), soit des valeurs typiques pour  $d$  de 10-12 nm. Il semble donc que, même à très grande force ionique, les dimères assemblés à partir de particules couvertes de 8T ne vont pas se rapprocher au delà du contact de leur chimie de surface. Ces mesures montrent qu'il est donc possible de corrélérer réponses optiques de dimères et morphologie des origamis. De plus, cette comparaison, entre les brins d'ADN 9T monothiolés, 19T trithiolés et 8T trithiolés, indique donc qu'une bonne stabilité des dimères est obtenue pour 19T et 8T ; mais que la distance interparticule la plus courte accessible en 19T va probablement être trop grande pour une mesure optique par couplage plasmon. Le cas du 8T trithiolé semble donc le meilleur compromis entre ces différentes chimies de surface. Ces mesures indiquent, de plus, que le décalage spectral observé entre des systèmes **semi-ouverts** et **fermés** peut atteindre une quinzaine de nanomètres mais que les distributions de longueurs d'onde mesurées sont larges. Il serait donc intéressant d'arriver à maximiser le contraste spectral entre les morphologies d'ADN (peut être en optimisant la force ionique) et en passant de particules commerciales à des particules monodisperses.

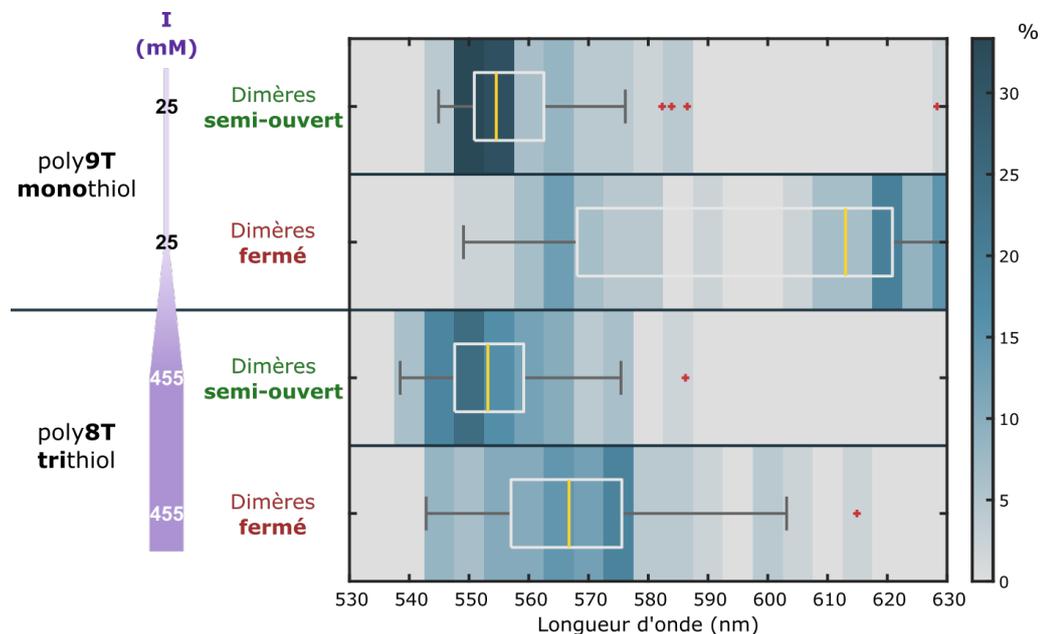


Figure 4.10: Comparaison des distributions de longueur d'onde de résonance pour des dimères de particules commerciales couvertes de poly9T monothiol (en haut) ou de poly8T trithiol (en bas) pour deux types d'origamis différents : **semi-ouvert** et **fermé** (Tailles des échantillons : 48 dimères pour **semi-ouvert** 9T) ; 46 dimères pour **fermé** 9T ; 49 dimères pour **semi-ouvert** 8T ; 48 dimères pour **fermé** 8T

## 4.2.2 Influence de la force ionique

Après avoir déterminé les avantages et inconvénients de chaque chimie de surface, j'ai analysé l'influence de la force ionique sur la morphologie des dimères auto-assemblés avec des particules commerciales ou monodisperses. En effet, l'ajout d'ions positifs tels que le sodium et le magnésium, diminue la répulsion électrostatique entre les particules par écrantage des charges. Ainsi, la variation de force ionique devrait impacter la conformation des objets. Cependant, la rigidité mécanique des double-brins d'ADN de la partie centrale de l'origami devrait également imposer une contrainte quant à la distance interparticule. Nous allons donc voir à quel point la morphologie de la zone active de l'origami module la distance interparticule en fonction de la force ionique.

### Particules commerciales

Dans cette partie, nous allons étudier des dimères de particules commerciales couvertes d'ADN 8T avec des origamis **semi-ouverts** (voir figure 4.2) et **fermés\*** (voir figure 4.4). Nous allons regarder leur comportement lors de l'augmentation de la force ionique et vérifier si, en cas de déformation de la nanostructure hybride en modulant la force ionique, ce changement est réversible.

La figure 4.11a présente les distributions de longueurs d'onde de résonance pour des dimères **semi-ouverts**. Toutes les distributions sont mesurées avec le même sous-échantillon de dimères (voir protocole décrit dans le chapitre 3). La chronologie des acquisitions est représentée de bas en haut. La première acquisition est effectuée à une force ionique déjà élevée  $I = 305$  mM (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM  $\text{Na}^+$  et 50 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ). La longueur d'onde de résonance médiane est alors de 552 nm, soit une distance interparticule de l'ordre de 20 nm : les dimères sont écartés. Les deux augmentations successives de  $I$  à 375 mM (150 mM  $\text{Na}^+$ , 75 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ) et 455 mM (150 mM  $\text{Na}^+$ , 100 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ) ne modifient que très peu la conformation des dimères en n'augmentant que de 2nm cette valeur médiane. Entre chaque mesure de la distribution des fréquences de résonance, l'échantillon incube avec la nouvelle force ionique pendant 1h.

J'ai, par la suite, laissé incuber l'échantillon pendant une nuit (environ 15h) à la plus haute valeur de force ionique, soit 455 mM. La longueur d'onde de résonance médiane, à la suite de cette incubation prolongée, a fortement augmenté de 9 nm. Cela correspond à une douzaine de nanomètres de distance interparticule. Les particules se sont donc fortement rapprochées au cours de la nuit jusqu'à probablement atteindre le contact de leurs chimies de surface. De plus, la largeur de la distribution de longueurs d'onde de résonance a fortement augmenté pendant la nuit. Afin d'essayer de retrouver une conformation écartée, j'ai injecté dans la chambre une solution tampon à faible force ionique (25mM), en espérant que l'augmentation de la répulsion électrostatique entre les particules qui en découlerait ré-éloignerait les particules. Malheureusement, la valeur médiane a à peine diminué, de 2nm, et la largeur de la distribution a augmenté, une partie de la distribution étant même supérieure à 600 nm. Il semble donc qu'une partie de ces dimères aient agrégés et que l'autre partie soit dans une position irréversible au contact de leur chimie de surface.

Les dimères **semi-ouverts** présentent donc une conformation écartée, avec une distance interparticule de l'ordre de 20 nm, à la suite d'une augmentation de force ionique. Cependant cette augmentation ne doit pas dépasser un certain laps de temps sans quoi la distance interparticule se réduit de manière irréversible. D'après la discussion du chapitre 1 sur la

physicochimie-chimie des dimères auto-assemblés, il doit donc y avoir une barrière énergétique de plus de  $15 k_B T$  entre ces deux conformations.

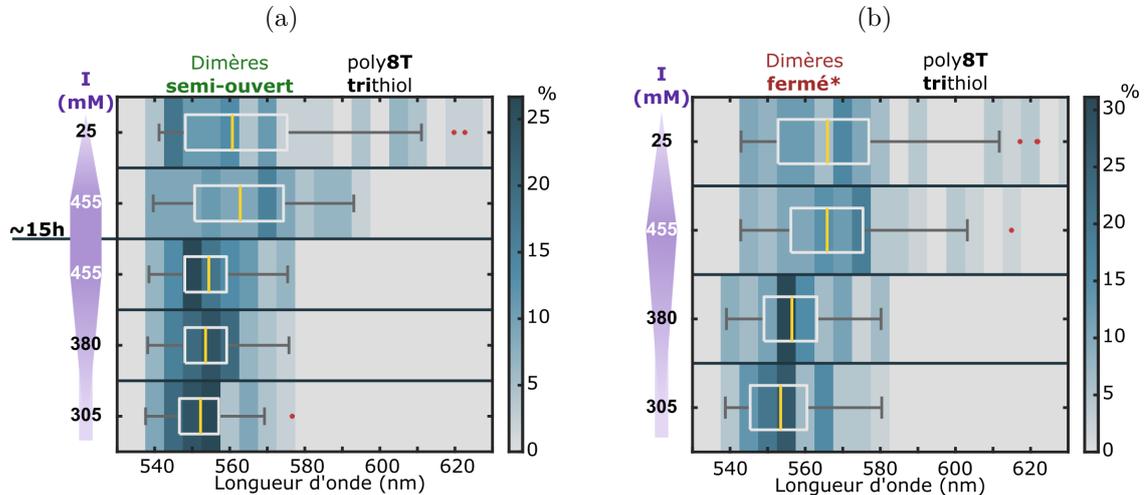


Figure 4.11: Evolution des distributions de longueur d'onde de résonance pour des dimères de particules commerciales couvertes de poly8T trithiol pour deux types d'origamis différents : **semi-ouvert** (a) et **fermé\*** (b) en fonction de la force ionique (sens chronologique : de bas en haut) (Taille des échantillons : 45 dimères pour **semi-ouvert** ; 41 dimères pour **fermé\*** )

En ce qui concerne les dimères **fermés\*** (voir figure 4.11b), les mêmes variations de force ionique ont été imposées à l'échantillon. Pour  $I = 305$  mM, la valeur médiane de longueur d'onde de résonance est égale à 554 nm. Les dimères sont donc également dans une géométrie écartée, avec  $d$  supérieure à 15 nm, malgré l'origami de type **fermé\***. Une répulsion, probablement électrostatique, entre les particules semble loquer le rapprochement des particules. Cela est étonnant en soi : à une force ionique aussi élevée, l'épaisseur de la double couche ionique autour des particules d'or est inférieure au nanomètre. Or, c'est la distance caractéristique de décroissance exponentielle de la répulsion électrostatique comme discuté au chapitre 1. Pour  $d$  de l'ordre de 15 nm, la répulsion électrostatique devrait être négligeable.

L'augmentation de  $I$  à 380 mM n'augmente que de 2 nm cette valeur médiane. Au contraire lorsque l'on passe à une force ionique de 455 mM, le décalage vers le rouge de la longueur d'onde est alors de 8 nm pour atteindre 564 nm et donc une dizaine de nanomètre de distance interparticule. On observe d'ailleurs certains dimères agrégés avec des résonances au delà de 600 nm. Surtout, la distribution de longueur d'onde s'est fortement élargie. Par la suite, j'ai directement diminué la force ionique à 25 mM pour voir s'il était possible de retrouver la conformation écartée initiale. Malheureusement, la distribution n'a pas réellement changé.

Ces expériences indiquent plusieurs difficultés expérimentales pour ce projet :

- A faible force ionique, un dimère assemblé sur un origami **fermé\*** peut présenter une conformation écartée avec une distance interparticule supérieure à 15 nm.

- Une différence de fréquence de résonance optique peut bien être observée entre un dimère **fermé\*** et un dimère **semi-ouvert** mais uniquement à une force ionique où les dimères ne sont pas stables à long terme.
- A forte force ionique, les distributions de longueurs d'onde sont très larges et un changement de conformation n'est pas réversible.

Afin de pouvoir mieux comparer les différences de comportement entre les deux types de dimères présentés, la figure 4.12a présente, sur un même graphique, les variations des distributions de longueurs d'onde médianes pour les 3 premières valeurs de force ioniques de ces objets. On constate que, sur les deux premières valeurs de  $I$  (305 mM et 380 mM), les dimères **fermés\*** sont très légèrement plus rouge que les **semi-ouverts**. Seulement, cette différence n'est pas réellement significative par rapport à la largeur des distributions et il est nécessaire d'atteindre  $I = 455$  mM pour voir une différence notable entre les deux échantillons.

A droite de cette figure, la figure 4.12b représente les distributions de variation de longueur d'onde de chaque dimère entre les différentes variations de force ionique pour les deux types d'origami. Cette représentation permet de visualiser si les variations de longueurs d'onde observées sur la totalité de la population sont les mêmes pour chaque dimère. Cette mesure est permise par le fait que toutes les distributions sont mesurées sur le même sous-échantillon de dimères, à chaque étape.

La partie supérieure montre les distributions de variations résultantes à l'augmentation de  $I$  de 305 mM à 380 mM. On constate alors bien que les variations pour les deux types d'origamis sont semblables et faibles, de l'ordre de 2nm. En ce qui concerne le passage de 380 mM à 455 mM, la variation pour les dimères **semi-ouverts** est quasi nulle alors que, pour les dimères **fermés\***, elle est de l'ordre de 10nm. Dans ce dernier cas, on observe également un fort élargissement de la distribution de ces variations : les dimères n'ont donc pas des comportements équivalents au sein d'un même échantillon.

Pour résoudre cette difficulté à différencier différentes conformations de l'origami, il faudrait donc augmenter la stabilité des particules pour pouvoir moduler la force ionique de façon réversible ; tout en diminuant la largeur des distributions de fréquences de résonance quand les particules sont au contact de leur chimie de surface. Comme discuté aux chapitres 2 et 3, une solution serait d'utiliser des particules monodisperses plutôt que des particules commerciales.

### Particules monodisperses

En utilisant des particules monodisperses, il est important d'utiliser une autre courbe de calibration reliant la distance interparticule  $d$  à la fréquence de résonance plasmon comme discuté au chapitre 3. Il ne faut donc pas comparer directement les longueurs d'onde médianes mesurées avec des particules commerciales et monodisperses. La figure 4.13 montre l'évolution des fréquences de résonance plasmon, en fonction de la force ionique, pour des dimères **semi-ouverts\*** avec des particules monodisperses recouvertes d'ADN 19T. A faible force ionique (25mM), la longueur d'onde de résonance médiane est de 544 nm, ce qui correspond à une distance interparticule de plus de 30 nm. En multipliant la force ionique par 30, cette valeur médiane ne se décale vers le rouge que d'à peine 1 nm. Les dimères semblent donc peu sensibles à la force ionique.

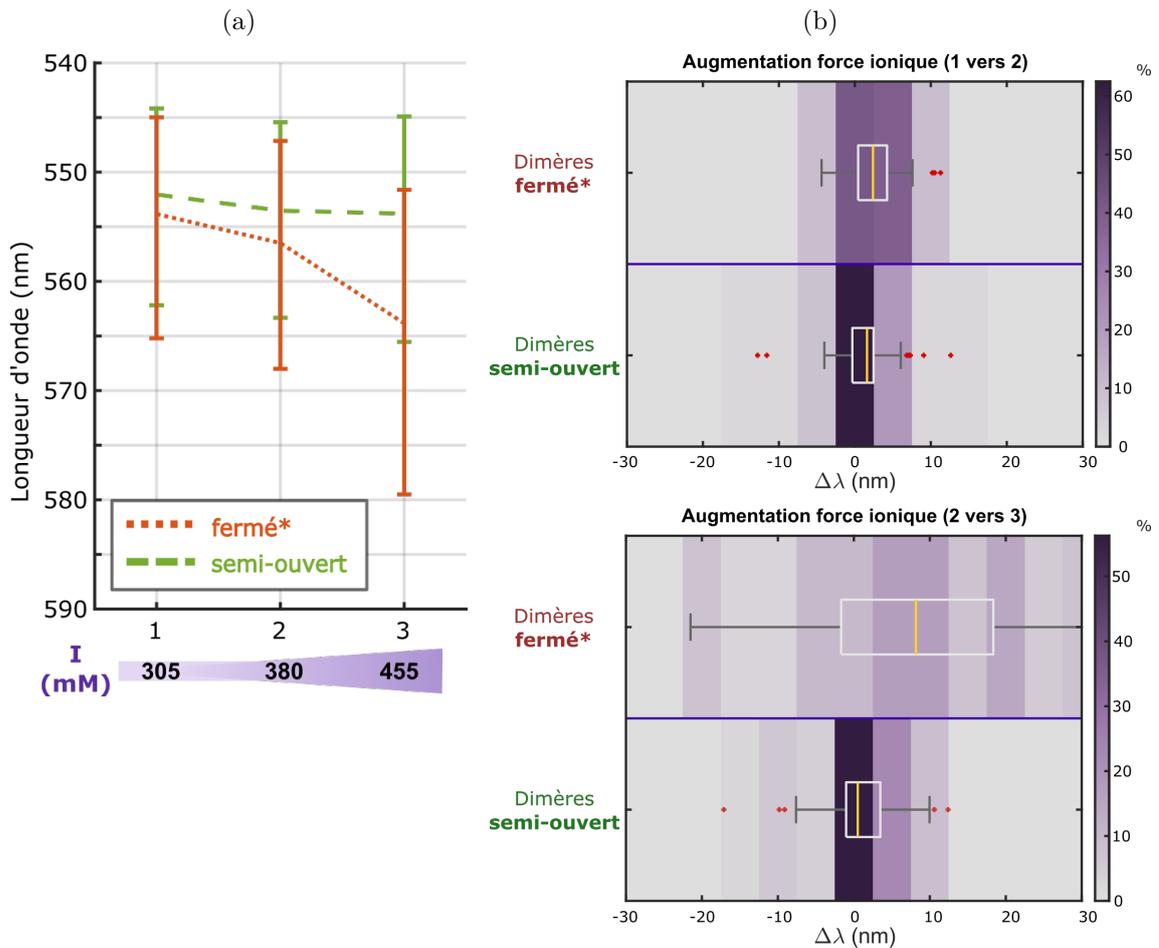


Figure 4.12: Courbe représentant l'évolution de la valeur médiane de longueur d'onde de résonance avec l'écart type des distributions montrées à la figure 4.11 (dimères **semi-ouverts** et **fermés\*** de particules commerciales couvertes de d'ADN 8T) (a). Distributions des variations de longueur d'onde à l'échelle des dimères uniques ( $\Delta\lambda$ ) entre le passage d'une force ionique de 305mM à 380mM (en haut) et de 380mM à 455mm (en bas)

La figure 4.14 présente les distributions, à différentes forces ioniques, des fréquences de résonance de dimères **fermés\*** avec des particules monodisperses couvertes d'ADN 8T. A faible force ionique ( $I=25\text{mM}$ ), la valeur médiane de longueur d'onde de résonance est égale à 544 nm. La distance interparticule est donc élevée, à près de 30 nm. Ainsi, on observe le même phénomène qu'avec les particules commerciales : des dimères **fermés\*** à faible force ionique présentent de grandes distances interparticules.

Quand la force ionique est augmentée à 455 mM, la valeur médiane se décale de 7 nm vers le rouge. Puis une nouvelle augmentation jusqu'à 1655mM (150 mM  $\text{Na}^+$ , 500 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ) entraîne un nouveau décalage de 4 nm. A cette dernière valeur, bien supérieure à la valeur maximale testée avec les AuNPs commerciales, nous n'observons pas d'élargissement trop important de la distribution ni de longueur d'onde supérieure à 600 nm. Ainsi la limite de stabilité de ces dimères auto-assemblés ne semble pas être atteinte.

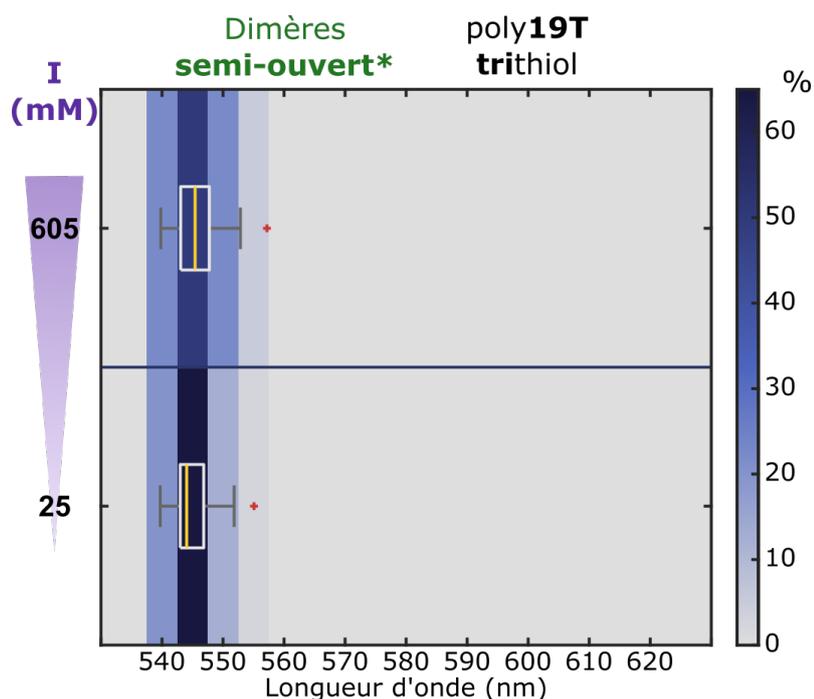


Figure 4.13: Evolution des distributions de longueur d'onde de résonance pour des dimères de particules monodisperses couvertes de poly19T trithiol pour des origamis **semi-ouvert\*** en fonction de la force ionique (sens chronologique : de bas en haut) (Taille échantillon : 50 dimères)

Pour en être convaincue, j'ai laissé l'échantillon à incuber à cette haute valeur de  $I$  pendant un week-end entier (environ 50h). Les mesures après cette très longue incubation ne présentent qu'une augmentation de 1 nm de la longueur d'onde médiane. Nous sommes donc très loin des 8 nm d'augmentation observés avec les particules commerciales. De plus, nous n'observons toujours pas de dimères présents au delà de 600 nm. J'ai donc, par la suite, diminué la force ionique pour retourner à une valeur de 25 mM. Et cette fois-ci, nous observons un décalage vers le bleu de la longueur d'onde de résonance dont la valeur médiane atteint 548 nm. Malgré ce léger hystérésis, nous observons que la modification de morphologie des dimères, en modulant la force ionique, est bien réversible.

Pour conclure, nous avons donc vu que pour la morphologie de l'origami ne semble pas contrôler forcément la conformation du dimère. En effet un dimère **fermé\*** peut présenter une distance interparticule élevée si la force ionique est faible. Ce résultat a été vérifié avec les particules commerciales et monodisperses. Cependant, nous avons aussi vu que l'augmentation de la force ionique n'agit pas de la même manière sur des dimères assemblés autour d'origamis **semi-ouverts\*** et **fermés\***. Ces derniers montre un décalage vers le rouge bien supérieur. De plus, les particules monodisperses ont une stabilité bien supérieure aux particules commerciales ce qui permet un rapprochement réversible des particules. Ainsi, il semble préférable d'utiliser des particules monodisperses pour étudier une modulation active de l'origami et de travailler à force ionique assez élevée, voire, de préférence, d'étudier la sensibilité de la conformation des dimères à des variations de  $I$ .

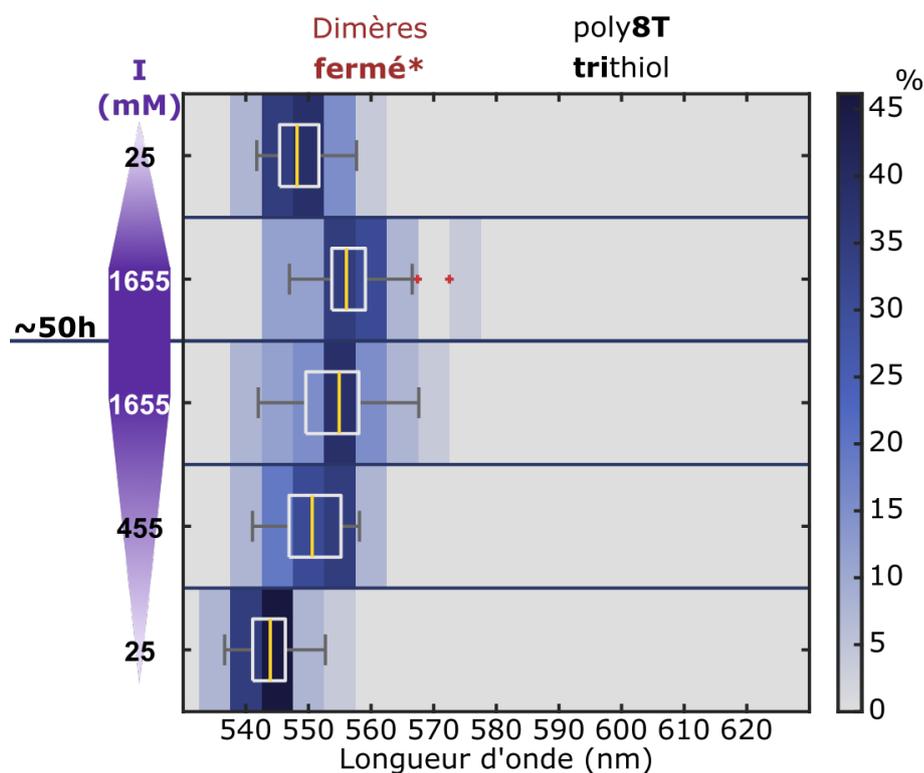


Figure 4.14: Evolution des distributions de longueur d'onde de résonance pour des dimères de particules monodisperses couvertes de poly8T trithiol pour des origamis **fermé\*** en fonction de la force ionique (sens chronologique : de bas en haut) (Taille de l'échantillon : 26 dimères)

### 4.3 Réaction de *strand displacement* dans des dimères hybrides

Pour tester si les origamis obtenus par la réaction de *strand displacement* donnent bien des réponses optiques variées, j'ai commencé par synthétiser des origamis **déverrouillés\*** et **semi-ouverts\*** à partir d'origamis **fermés\***. Pour cela, les origamis **fermé\*** ont été incubés avec les brins de déverrouillage pendant une journée avec 150 mM de NaCl et 6 mM de MgCl<sub>2</sub>. Ce mélange réactionnel a alors été utilisé pour synthétiser des dimères hybrides en suivant le protocole du chapitre 2.

Les fréquences de résonance de dimères **déverrouillés\***, avec des particules monodisperses et des brins 8T, sont ensuite mesurées en augmentant la force ionique (voir figure 4.15). A très faible force ionique ( $I=16$  mM, soit 5 mM Na<sup>+</sup> et 2 mM Mg<sup>2+</sup>), la longueur d'onde de résonance médiane est égale à 540 nm. Cela correspond à une distance interparticule de plus de 30 nm. Les dimères subissent alors une faible augmentation de la force ionique qui passe à 25 mM. On observe que la valeur médiane se décale de 10 nm vers le rouge, ce qui est une augmentation importante en comparaison à celles présentées jusqu'à présent. Puis la force ionique est élevée à 605 mM, entraînant un décalage d'encore 8 nm. J'augmente ensuite  $I$  jusqu'à 1655 mM, la longueur d'onde médiane augmentant une dernière fois de 4 nm et finissant donc à 562 nm. Cette dernière valeur correspond à une distance interparticule d'environ 7 nm. Nous sommes donc au-delà de la distance de contact que

nous avons estimée à 12 nm environ. Finalement l'échantillon est laissé pour la nuit à cette force ionique. Le lendemain, la distribution s'est très fortement décalée, de presque 30nm vers le rouge, indiquant que les dimères ont agrégé au cours de la nuit.

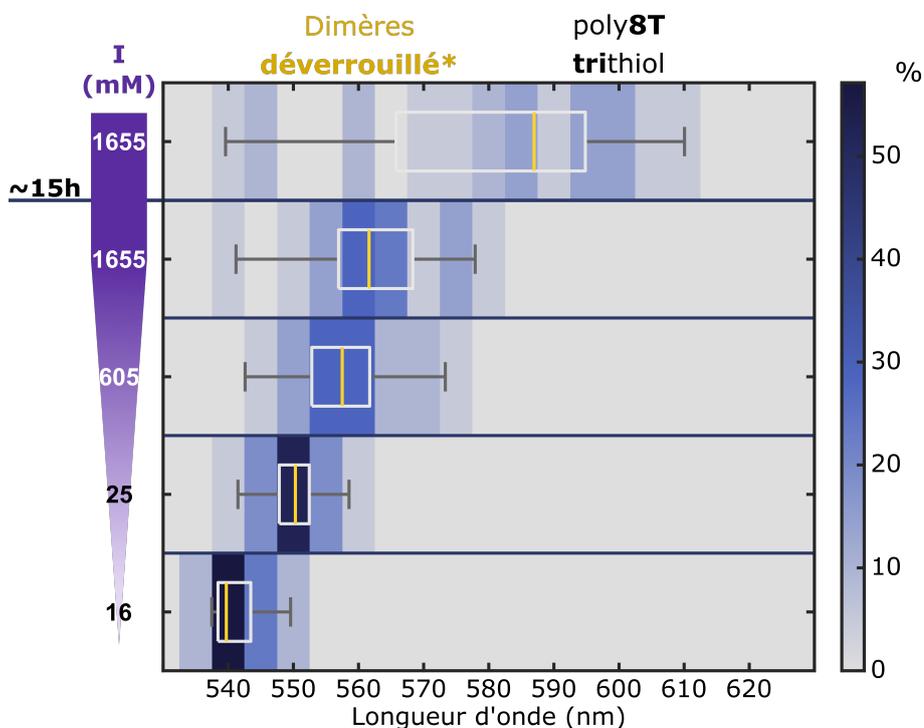


Figure 4.15: Evolution des distributions de longueur d'onde de résonance pour des dimères de particules monodisperses couvertes de poly8T trithiol pour des origamis **déverrouillés\*** en fonction de la force ionique (sens chronologique : de bas en haut) (Taille de l'échantillon : 21 dimères)

Pour une meilleure comparaison des comportements des différents types de dimères assemblés sur des origamis d'ADN modulables, la figure 4.16 reprend toutes les variations de longueur d'onde de résonance étudiées jusqu'à présent pour les particules monodisperses. Même si les dimères **déverrouillés\*** sont les seuls à avoir été étudiés à très faible force ionique, nous pouvons tout de même constater qu'ils sont plus bleus que les **semi-ouverts\*** à 25mM. Au contraire, lorsque la force ionique augmente, ils sont toujours plus rouges que les **fermés\*** et ce jusqu'à la valeur maximale de 1655 mM. Il semblerait donc que l'hybridation double brin de la partie centrale de l'origami entraîne une contrainte quand au rapprochement des particules observé à très forte force ionique. Finalement, après une longue incubation à forte force ionique, le comportement des dimères **déverrouillés\*** devient très différents des dimères **fermés\*** : les premiers agrègent alors que les seconds peuvent reprendre leur conformation de manière réversible. Cette différence notable de comportement semble par conséquent indiquer que les origamis ont bien été activement déverrouillés avant la synthèse des dimères.

Ces premières expériences indiquent donc qu'il est difficile de différencier le comportement des dimères **fermés\*** et **déverrouillés\*** à moins d'augmenter très fortement la force

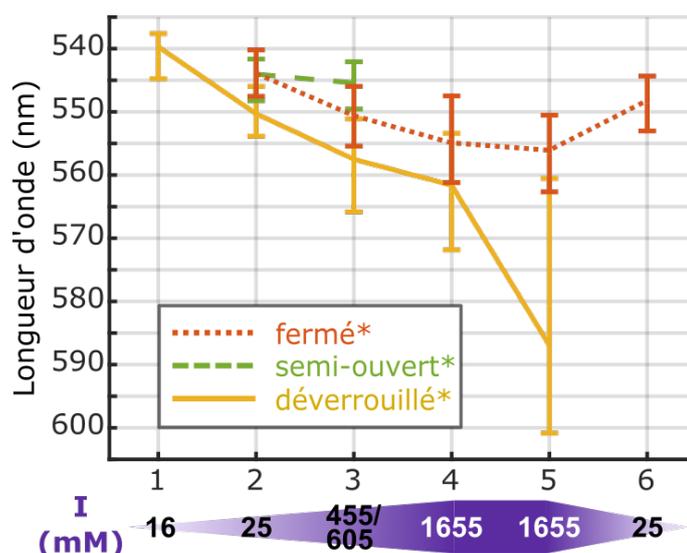


Figure 4.16: Courbe représentant l'évolution de la valeur médiane de longueur d'onde de résonance avec l'écart type des distributions montrées aux figures 4.14, 4.13 et 4.15 (dimères **semi-ouvert\***, **déverrouillé\*** et **fermé\*** de particules monodisperses couvertes de poly8T trithiol)

ionique. Par contre, la différence entre dimères **déverrouillés\*** ou **fermés\*** et **semi-ouverts** devrait être plus importante. Nous avons donc décidé d'essayer de modifier la morphologie des dimères in-situ, et non au préalable, en passant d'une morphologie **déverrouillée\*** à **semi-ouverte\*** (voir figure 4.7).

Tout d'abord les dimères **déverrouillés\*** sont étudiés à faible force ionique (25mM) (voir figure 4.17). La longueur d'onde de résonance médiane est de 551 nm ce qui correspond aux valeurs déjà obtenues. Les dimères sont ensuite soumis à une forte augmentation de force ionique (1655mM). Cette augmentation vise dans un premier temps à vérifier la bonne mobilité des dimères. En effet, grâce aux expériences précédentes, nous savons que les dimères **déverrouillés\*** sont très mobiles vis-a-vis d'une variation de la force ionique. La longueur d'onde de résonance médiane passe donc à 559 nm. Cette valeur est légèrement inférieure à celle obtenue avec une augmentation progressive comme réalisé précédemment (voir figure 4.15) mais reste importante et indique que les particules sont proches du contact de leurs chimies de surface.

La force ionique est ensuite abaissée à 25mM pour valider la réversibilité du changement de conformation. La valeur médiane est alors de 552nm, ce qui correspond bien à la valeur initiale avec un très léger hystérésis. L'échantillon est alors mis à incuber toute la nuit avec 500nM des brins d'ouverture à faible force ionique (25mM) et pH 4. J'ai abaissé le pH pour neutraliser les brins d'ADN et les charges superficielles de la BSA-biotine du substrat afin de permettre aux brins d'ADN d'atteindre les nanostructures hybrides. Le lendemain, la chambre est rincée avec une solution de force ionique 25 mM à pH 7,6. Après une nuit à pH 4, on observe un léger décalage vers le rouge de 2nm. Finalement la force ionique est augmentée à 1655 mM, comme précédemment, et cette fois-ci nous n'observons aucun décalage vers le rouge de la distribution.

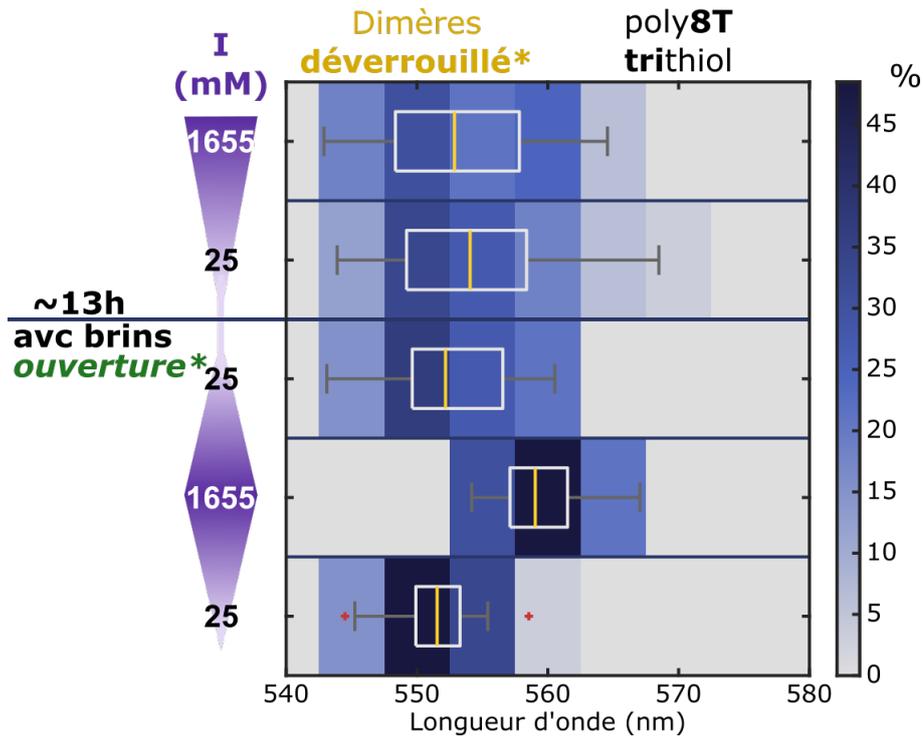


Figure 4.17: Evolution des distributions de longueur d'onde de résonance pour des dimères de particules monodisperses couvertes de poly8T trithiol pour des origamis **déverrouillé\*** en fonction de la force ionique, avant et après incubation avec 500nM de brins **ouverture\*** à pH4 pendant 13h (sens chronologique : de bas en haut) (Taille de l'échantillon : 33 dimères)

La figure 4.18 nous permet de visualiser le changement de comportement des dimères en représentant les variations de longueur d'onde de chaque dimère. Ainsi, les dimères sont bien mobiles lorsque l'origami est **déverrouillé\***, se décalant vers le rouge de presque 10nm lors de l'augmentation de force ionique, et vers le bleu quand elle diminue. Les distributions sont très fines : les dimères ont donc tous le même comportement. Finalement après l'ouverture, ces mêmes dimères ne changent que très peu de longueur d'onde de résonance, la variation étant très proche de zéros et n'excédant pas 2,5 nm pour plus de 80% d'entre eux. Ces premières données indiquent donc un changement important du comportement des dimères après ajout des brins d'ouverture. Il faudra effectuer des expériences complémentaires pour vérifier si ce comportement est bien spécifique vis-à-vis des brins d'ADN ajoutés.

Au cours de ce chapitre, nous avons donc défini le type de nanoparticules et la chimie de surface qui permettent d'allier stabilité et importantes variations réversibles des distances interparticules : utilisation de particules monodisperses et de brins d'ADN 8T en surface. Toutefois, ces expériences ont montré que l'analyse morphologique de dimères assemblés sur des origamis en Y était bien plus complexe qu'espéré au moment du design de ces nanostructures hybrides : il semblerait, en effet, que les interactions entre particules influent fortement sur la distance interparticule et dominant souvent la conformation de la nanostructure hybride. En particulier, j'ai observé un résultat très étonnant : à faible

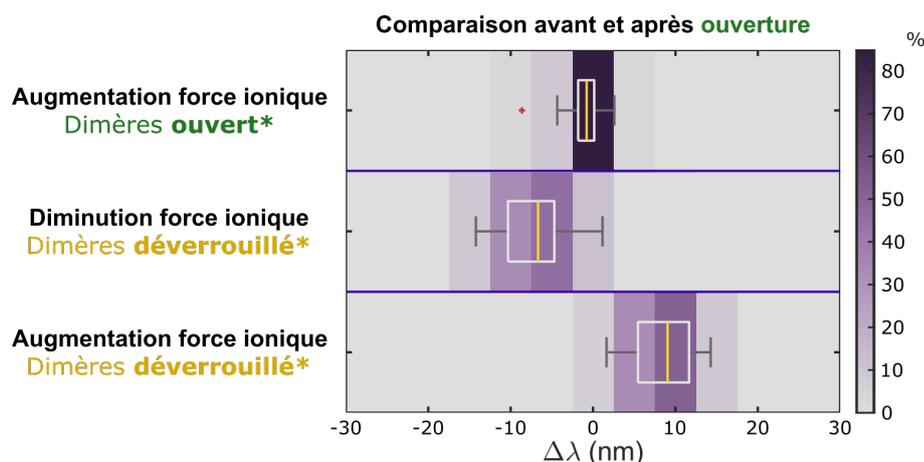


Figure 4.18: Distributions des variations de longueur d'onde à l'échelle des dimères uniques ( $\Delta\lambda$ ) après augmentation puis réduction de la force ionique avant ouverture puis augmentation de la force ionique après ouverture (sens chronologique de bas en haut)

force ionique, des origamis **fermés**(\*) fournissent des distances interparticules au moins 4 fois plus élevées que ce qui était attendu dans le design initial.

Il faut évidemment considérer que l'accrochage des particules sur les origamis se fait de manière assez flexible : nous avons dû conserver une partie simple-brin polyA entre la particule et les origamis. Quand nous avons essayé de raccourcir les brins d'accrochage sur les origamis à 9Å pour s'adapter aux 8T en surface des particules, les dimères ne se sont pas assemblés. Toutefois, il y a plusieurs brins d'accrochage sur l'origami : il paraît donc étonnant que les particules puissent s'écarter de manière importante de part et d'autre des bras du Y. De plus, alors que l'influence de la force ionique semble indiquer que la répulsion à l'origine de cette déformation est électrostatique, il est étonnant qu'elle agisse à une distance de l'ordre de 20 nm. En effet, à des forces ioniques supérieures à 25 mM, la longueur de Debye-Hückel (ou épaisseur de la double couche ionique) descend sous 2 nm. Il faudrait donc mieux comprendre ce que j'ai appelé au chapitre 1 le paysage énergétique de ces dimères auto-assemblés, pour analyser correctement les expériences décrites ici. La méthodologie optique présentée ici, de suivi de dimères uniques en modulant la force ionique du milieu, est, en tout cas, une méthode expérimentale intéressante pour cela.

Nos données nous ont tout de même permis de différencier les formes **ouvertes** / **semi-ouvertes** et **fermées** des origamis quand la force ionique favorise un contact des chimies de surface pour un origami **fermé** mais n'est pas assez élevée pour le faire avec une forme **ouverte** ou **semi-ouverte**. J'ai également observé qu'un dimère pour lequel le site actif de l'origami est entièrement simple-brin semble plus mou que les autres formes en fournissant les plus grandes variations de distances interparticules en modulant la force ionique. Je vous ai également montré un design d'origamis dont la morphologie peut être activement modulée par une réaction de *strand displacement*. En combinant ces origamis actifs et l'analyse optique en fonction de la force ionique, je vous ai décrit une première expérience de modulation in-situ de dimères hybrides en vous montrant comment le passage d'une forme **déverrouillée**\* à **semi-ouverte**\* semble changer la rigidité de la nanostructure hybride. Toutefois, cette expérience nécessite des mesures complémentaires pour être totalement validée.

En parallèle de ces travaux sur les origamis modulables par *strand displacement*, j'ai également développé des origamis en Y dont la morphologie peut être contrôlée par d'autres stimuli physico-chimiques et que je décris dans le chapitre suivant. En pratique, alors que les designs décrits ici ont été entièrement finalisés par nos collaborateurs du CBS à Montpellier, j'ai pu moi-même travailler sur le design et la synthèse de ces nouveaux origamis au cours d'un séjour d'un peu plus de trois mois au CBS fin 2019.

## Chapitre 5

# Modulation du site actif des origamis par des stimuli autres que l'ADN

### Sommaire

---

<b>5.1</b>	<b>Dimères hybrides sensibles à des variations de pH</b>	<b>122</b>
5.1.1	Conception du site actif des origamis	122
5.1.2	Formation des i-motifs en fonction du pH et de la force ionique	126
5.1.3	Analyse du changement de conformation des origamis en fonction du pH	127
5.1.4	Dimères assemblés sur des origamis sensibles au pH	130
<b>5.2</b>	<b>Autres designs du site actif</b>	<b>138</b>

---

Dans le chapitre précédent, je vous ai montré un exemple d'origamis dont la morphologie peut être modulée par une réaction de *strand-displacement*. Comme je vous l'ai expliqué dans le chapitre 1, des nano-objets en ADN peuvent être activement modulés par d'autres stimuli que des brins d'ADN spécifiques. Nous étions donc intéressés de valider la versatilité de notre géométrie d'origamis en Y pour d'autres types d'interactions physico-chimiques. Au cours d'un séjour d'un peu plus de trois mois au CBS à Montpellier, j'ai donc pu directement travailler dans l'équipe de Gaëtan Bellot pour concevoir et synthétiser d'autres origamis dynamiques.

Outre démontrer la flexibilité des origamis d'ADN, le but de ce chapitre est aussi de simplifier la modulation du site actif de l'origami. En effet, dans la réaction de *strand-displacement* précédente, le passage d'une géométrie **fermée\*** à **semi-ouverte\*** nécessitait l'ajout de 5 brins d'ADN. La cinétique de cette réaction est donc probablement assez lente à faible concentration. De plus, les brins d'ADN, chargés négativement, doivent diffuser jusqu'au site actif alors que la nanostructure hybride et la surface de la chambre microfluidique sont également chargées négativement. C'est pourquoi j'ai précédemment abaissé le pH pendant cette réaction pour neutraliser la répulsion électrostatique.

Il apparaît donc intéressant de n'avoir qu'une entité chimique nécessaire au changement de conformation de l'origami et qu'elle soit neutre ou chargée positivement. Nous avons donc décidé de concevoir des origamis réagissant à des cations ou de petites molécules organiques spécifiques. Pour cela nous nous avons considéré les différentes structures secondaires de l'ADN qui soient spécifiques à des stimuli externes : aptamères, i-motifs ou G-quadruplex introduits au chapitre 1. Dans ce chapitre, je vais essentiellement discuter des expériences que j'ai effectuées sur des origamis d'ADN sensibles à des variations de pH par l'incorporation d'i-motifs dans le site actif. Je discuterai aussi brièvement de données préliminaires obtenues en incorporant des séquences aptamères pour la cocaïne, les ions mercure  $Hg^2$  et les ions argent  $Ag^+$ .

## 5.1 Dimères hybrides sensibles à des variations de pH

### 5.1.1 Conception du site actif des origamis

Pour rendre les origamis d'ADN en Y sensibles au pH, j'ai incorporé des i-motifs dans leur site actif ; c'est-à-dire des complexes composés de 4 brins (quadruplex) riches en cytosines (figure 5.1a) qui se lient par la formation de 3 liaisons hydrogène entre une cytosine protonée et une cytosine neutre (figure 5.1b). D'abord découverts in-vitro [22], les i-motifs ont été récemment observés au cœur du noyau de cellules humaines [165].

Comme la formation de cette structure secondaire de l'ADN dépend de la protonation des cytosines, elle est évidemment sensible au pH. De plus, comme un i-motif se forme entre 4 séquences de plusieurs cytosines, sa formation est coopérative. En effet, si toutes les cytosines étaient isolées, la proportion d'entre elles qui sont protonées suivrait la dépendance en pH d'une base faible : soit une dépendance assez faible avec des petites fluctuations de pH. Au contraire, le fait que la formation du quadruplex de l'i-motif fournisse un fort gain enthalpique, quand la moitié des cytosines sont protonées, signifie que la transition ne se fera pas exactement au pKa de la cytosine et, surtout, que la transition sera soudaine et très sensible à des petites fluctuations de pH.

Dès lors, de équipes de recherche ont travaillé sur cette structure en modifiant le nombre de cytosines consécutives, la structure des trois boucles internes à la structure (nécessaires

au repliement du quadruplex, figure 5.1a) et étudié la modification du pH de transition et de sa finesse [22]. Nous nous sommes donc inspirés de ces recherches afin d'adapter notre origami en Y afin d'être sensible au pH.

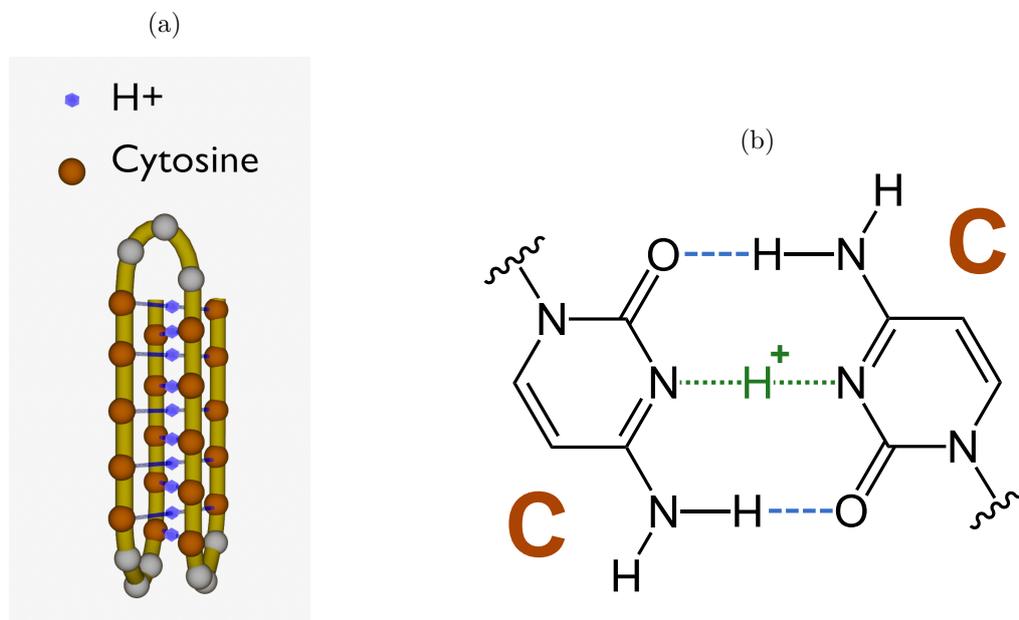


Figure 5.1: Schéma explicatif de la formation du quadrimère d'ADN comportant une forte concentration de cytosine (a) qui à bas pH s'associe deux à deux grâce à 3 liaisons hydrogène (b)

Jusqu'à présent, nous avons utilisé la séquence du *scaffold* comme site actif. Cependant, dans le cas de l'i-motif, nous avons besoin d'intégrer une séquence très particulière à notre site de réaction. La séquence du *scaffold* n'étant pas modifiable, nous avons développé une autre approche. La figure 5.2 présente un schéma 3D du fonctionnement de la partie centrale de cet origami sensible au pH. Le *scaffold* est hybridé par 3 brins différents. Aux extrémités, 2 brins lient les deux brins du *scaffold* sur 21bp et 20bp (brins verts). Sur un des deux brins du *scaffold*, un troisième brin joint les deux extrémités (gauche et droite) sur 21bp de chaque côté (brin jaune). Ainsi cela forme une structure longue de 83bp entre les deux bras quand le brin jaune n'est pas replié.

Ce brin jaune, partiellement hybridé au *scaffold*, comprend également une partie simple-brin sur laquelle se trouve la séquence de l'i-motif. Lors de la diminution de pH, la formation du quadruplex force le repliement de cette partie centrale et entraîne donc une réduction de la distance entre les deux bras de l'origami (figure 5.2). Ce design du site actif a été conçu pour transiter d'une conformation proche des origamis **fermés** décrits précédemment (43bp entre les bras du Y) à une conformation **semi-ouverte** (85bp entre les bras). Nous souhaitons donc que la partie du brin jaune qui n'est pas hybridée sur le **scaffold** et qui contient l'i-motif soit suffisamment longue pour ne pas replier l'origami à pH élevé, soit au moins 42 bases. Il est important de préciser qu'il y a une différence notable entre les deux conformations des origamis i-motifs et les origamis **fermés** ou **semi-ouverts** du chapitre 4 : pour les origamis i-motifs, un seul brin du *scaffold* est entièrement hybridé alors que, dans le chapitre précédent, les deux brins du *scaffold* l'étaient.

Les origamis ainsi conçus pourraient donc être mécaniquement moins rigides que ceux discutés dans le chapitre précédent.

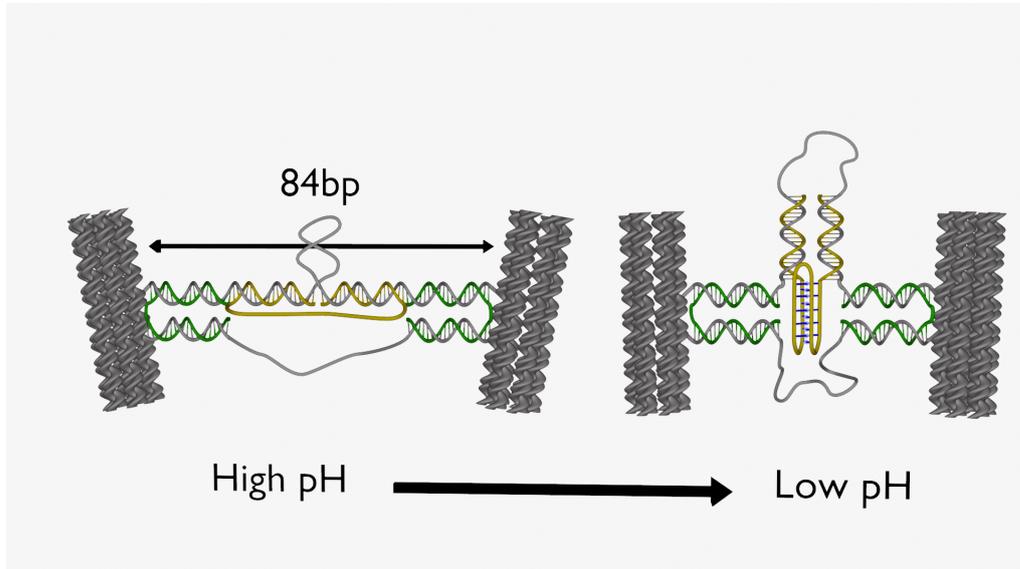


Figure 5.2: Schéma explicatif du fonctionnement du site de réaction de notre origami sensible au pH

Pour le design du site actif, nous avons repris deux séquences d'i-motifs développés dans une étude d'I. V. Nesterova et E. E. Nesterov de 2015 [22]. Cet article présente une étude du pH de transition de nombreuses séquences d'i-motifs. Nous avons, dans un premier temps, sélectionné un i-motif composé de 4 séquences de 5 cytosines entrecoupées par de simples séquences polyT en guise de boucles. Dans ce cas, le pH de transition a été estimé à 6,62. Pour augmenter la stabilité et la rigidité de l'origami replié à pH faible, nous avons également considéré un i-motif associé à un court *hairpin* de 4 bases pouvant se former à la place d'une des boucles simple-brins entre deux séquences de 5 cytosines. Il y a alors un effet coopératif entre le repliement de l'i-motif et celui du *hairpin*. Cette stabilisation enthalpique signifie que le pH de transition est décalé pour des concentrations plus faibles de protons : il augmente de 6,62 pour l'i-motif polyT à 7,22 pour l'i-motif coopératif (avec *hairpin*).

Pour étudier le changement de conformation des origamis en fonction du pH, il est important d'avoir des nanostructures de référence ne comportant pas d'i-motifs. Nous avons considéré deux références : un origami ne comportant que les brins verts reliant les deux brins du *scaffold* (figure 5.3b) et un origami remplaçant le brin comportant l'i-motif par un brin n'en comportant pas un mais qui inclue tout de même un *hairpin* de 4 bases (figure 5.3a). Cette référence est en fait un origami que je décrirai davantage à la fin de ce chapitre et qui est basé sur un aptamère des ions  $Hg^{2+}$ .

En pratique, les séquences des deux brins verts (voir figure 5.4) qui relient les deux brins du *scaffold* sont :

- brin 1 : AATTAATGCCGGAGAGGGTAGTATTAACCAAGTACCGCACT (42 bases)

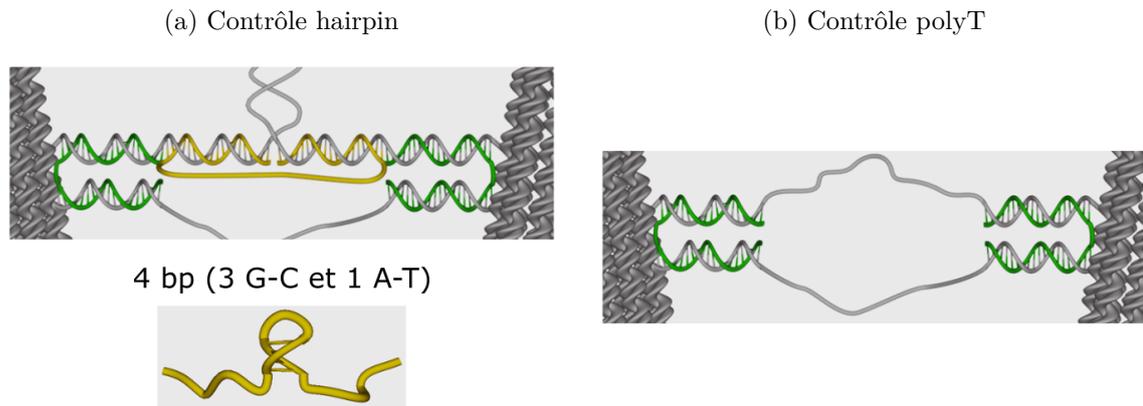


Figure 5.3: Spectres d'absorption des différentes séquences du site actif : i-motif polyT, i-motif coopératif, référence *hairpin* et brin polyT à différentes valeurs de pH et de force ionique (a), la variation de la valeur à 260nm suivant ces paramètres (b) et à 295nm (c).



Figure 5.4: Schéma explicatif de la structure de la partie centrale de l'origami. Séquences : les 2 brins du *scaffold*, flèches : les brins complémentaires au *scaffold* (séquences données dans le texte)

- brin 2 : TATCCGGTATTCTAAGAACGAAATGCAATGCCTGAGTAAT (40 bases)

La séquence jaune (voir figure 5.4) qui s'hybride à un brin *scaffold* et qui peut contenir un i-motif existe donc en trois versions :

- i-motif polyT : *ATTCAACCGTTCTAGCTGATA*  
**CCCCCTTTCCCCCTTTTTTTTTTTTTTTTCCCCCTTTCCCCC**  
*GTGTAGGTAAAGATTCAAAAAG* (81 bases, i-motif en rouge, boucle centrale polyT soulignée et séquences hybridées avec le *scaffold* en italique)
- i-motif coopératif : *ATTCAACCGTTCTAGCTGATA*  
**CCCCCTTTCCCCCTGAGCGCAGCTCTCCCCCTTTCCCCC**  
*GTGTAGGTAAAGATTCAAAAAG* (81 bases, i-motif en rouge, *hairpin* de la boucle centrale souligné et séquences hybridées avec le *scaffold* en italique)
- référence *hairpin* : *ATTCAACCGTTCTAGCTGATA*  
*TTCTTTCTTCTTTCTTTGAGCGCAGCTCTTGTGTTGTTGTTTGT*  
*GTGTAGGTAAAGATTCAAAAAG* (85 bases, *hairpin* souligné et séquences hybridées avec le *scaffold* en italique)

### 5.1.2 Formation des i-motifs en fonction du pH et de la force ionique

Pour valider la formation des i-motifs sélectionnés dans le design des origamis et pour définir une gamme de pH où étudier le changement de leur conformation, j'ai effectué des mesures d'absorbance UV sur les séquences sélectionnées. De plus, je vous ai montré dans le chapitre 4 que, pour analyser des dimères assemblés sur origamis d'ADN, il était intéressant de moduler la force ionique. Comme celle-ci, en particulier la présence d'ions  $Mg^{2+}$ , influe sur le repliement de l'ADN en structures secondaires, j'ai voulu analyser la formation des i-motifs dans les séquences sélectionnées en présence de fortes concentrations de sodium ou de magnésium.

Les parties des brins d'ADN qui s'hybrident au *scaffold* n'étant pas utiles pour cette étude, j'ai effectué ces mesures d'absorbance sur 4 brins simplifiés : les deux i-motifs considérés et deux références, une comportant un *hairpin* de 4bp, l'autre un simple polyT sans cytosines:

- i-motif polyT : **CCCCCTTTCCCCCTTTTTTTTTTTTTTCCCCCTTTCCCC** (39 bases, i-motif en rouge et boucle centrale polyT soulignée)
- i-motif coopératif : **CCCCCTTTCCCCCTGAGCGCAGCTCTCCCCCTTTCCCC** (39 bases, *hairpin* de la boucle centrale souligné)
- référence *hairpin* : TTCTTTCTTCTTTCTTGAGCGCAGCTCTTGTTTGTTGTTTGTT (45 bases, *hairpin* souligné)
- référence polyT : TTT (39 bases)

Les spectres d'absorbance UV permettent d'observer la protonation des bases de l'ADN, qui a pour effet de décaler vers le rouge le spectre d'absorption [22]. Le pKa de la cytosine est égal à 4,45, celui de l'adénine à 4,15 et celui de la guanine à 3,3. La thymine ne se protone pas à pH positif. Ainsi, la visualisation de la protonation de la cytosine à un pH significativement supérieur à 4,45 est le signe de la formation de liaisons hydrogènes entre une cytosine neutre et une cytosine protonée et donc, potentiellement, de la formation d'un i-motif [22].

La figure 5.5a représente les différents spectres d'absorption pour les différents brins à différentes forces ioniques et différents pH obtenus en mesure d'ensemble. On observe que, à pH faible, un décalage vers le rouge des spectres pour les des deux i-motifs et, dans une moindre mesure, pour la référence **hairpin**. Le décalage du spectre du contrôle *hairpin* s'explique par le fait que la séquence contient une faible concentration de cytosines : il est par conséquent possible qu'à pH acide, il y ait formation d'hétéro-dimères entre plusieurs bases C de deux brins différents.

Pour une comparaison plus quantitative de la formation des i-motifs, les figures 5.5b et 5.5c représente les variations d'absorption à 260 nm et à 295 nm. Une protonation des cytosines correspond à l'obtention simultanée d'une diminution de l'absorbance à 260 nm, et d'une augmentation de l'absorbance à 295nm. Dans le cas de la séquence polyT, le spectre n'évolue pas, en modulant le pH ou la force ionique  $I$  comme on peut s'y attendre pour une séquence comportant une base que ne se protone pas à pH positif. En ce qui concerne les i-motifs, nous observons une variation forte des absorbances à pH 6 et 4, par rapport aux spectres à pH 7,6 : cela confirme qu'il y a protonation de bases et, donc, que les pH de transition de ces deux i-motifs se situent bien dans une gamme de pH entre 6 et 7,6, comme démontré dans la littérature [22]. Il s'agit donc de la gamme de pH que nous

pourrons exploiter pour étudier les changements de conformation d'origamis contenant ses séquences.

Nous voyons également que le spectre se décale encore plus vers le rouge quand le pH descend à 4 pour l'i-motif coopératif : en effet, dans ce cas, les bases G et A peuvent se protoner. Cet effet est nettement plus élevé dans le brin de référence *hairpin* qui contient moins de C et plus de G.

En analysant les données en fonction de la force ionique  $I$  à pH fixé, nous voyons qu'une force ionique élevée ne favorise pas la formation d'un i-motif à pH=7,6. Au contraire, ces données indiquent une baisse de la protonation des cytosines à pH=6 à force ionique élevée. Il a été discuté dans la littérature que l'écrantage de charges négatives sur les brins d'ADN par une forte concentration de cations pouvait défavoriser la formation d'un i-motif [166]. Toutefois, cet effet semble marginal : quelque soit la force ionique, en travaillant à pH=7,6 l'i-motif ne devrait pas se former et, à pH=6, le quadruplex de cytosines devrait bien se replier. Nous pourrions donc considérer cette gamme de pH pour nos expériences et ce, quelque soit la force ionique appliquée.

### 5.1.3 Analyse du changement de conformation des origamis en fonction du pH

Dans un premier temps, comme pour la réaction de *strand-displacement*, nous avons validé la synthèse des origamis et la conception de ce nouveau site actif par l'intermédiaire d'images TEM (voir figure 5.6). Les origamis ont été synthétisés et purifiés en suivant les protocoles établis au chapitre 2. Au pH élevé utilisé pendant la synthèse, les deux types d'origamis présentent un angle important entre les bras du Y. Après une nuit d'incubation à pH 5,6, donc en dessous des deux pH de transition, l'angle des deux bras est plus faible. Toutefois, cet effet est moins visible dans le cas de l'i-motif polyT que dans celui de l'i-motif coopératif. Aux vues des images, il semble donc que l'i-motif coopératif permet une fermeture plus complète des origamis.

Pour obtenir une vision plus quantitative de ce changement de conformation avant de concevoir des dimères hybrides, j'ai effectué des mesures complémentaires par FRET (transfert d'énergie de type Förster introduit au chapitre 1) sur ces origamis en y ajoutant deux fluorophores. En effet, le TEM a pour inconvénient de sécher les échantillons et donc de changer leur morphologie. Je voulais donc m'assurer que le quadruplex de cytosine se replie bien à un pH proche de 6. Pendant des mesures de spectroscopie FRET, l'échantillon est conservé en solution et nous pourrions avoir une vision plus précise du changement de conformation. Cette spectroscopie est, en effet, régulièrement utilisée en biologie pour des mesures de distances à l'échelle nanométrique [20, 103, 101]. Cette spectroscopie repose sur la théorie de Theodor Förster. Le FRET est défini comme un transfert d'énergie non radiatif résultant d'une interaction dipôle – dipôle entre deux molécules. Ce phénomène physique nécessite une compatibilité énergétique entre ces deux molécules. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser deux fluorophores dont le spectre d'émission de l'un appelé le *donneur*, chevauche celui d'excitation du second appelé *accepteur* (voir figure 5.7). La probabilité de transfert  $E$  dépend de la distance entre les fluorophores, suivant la relation :

$$E = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6} \quad (5.1)$$

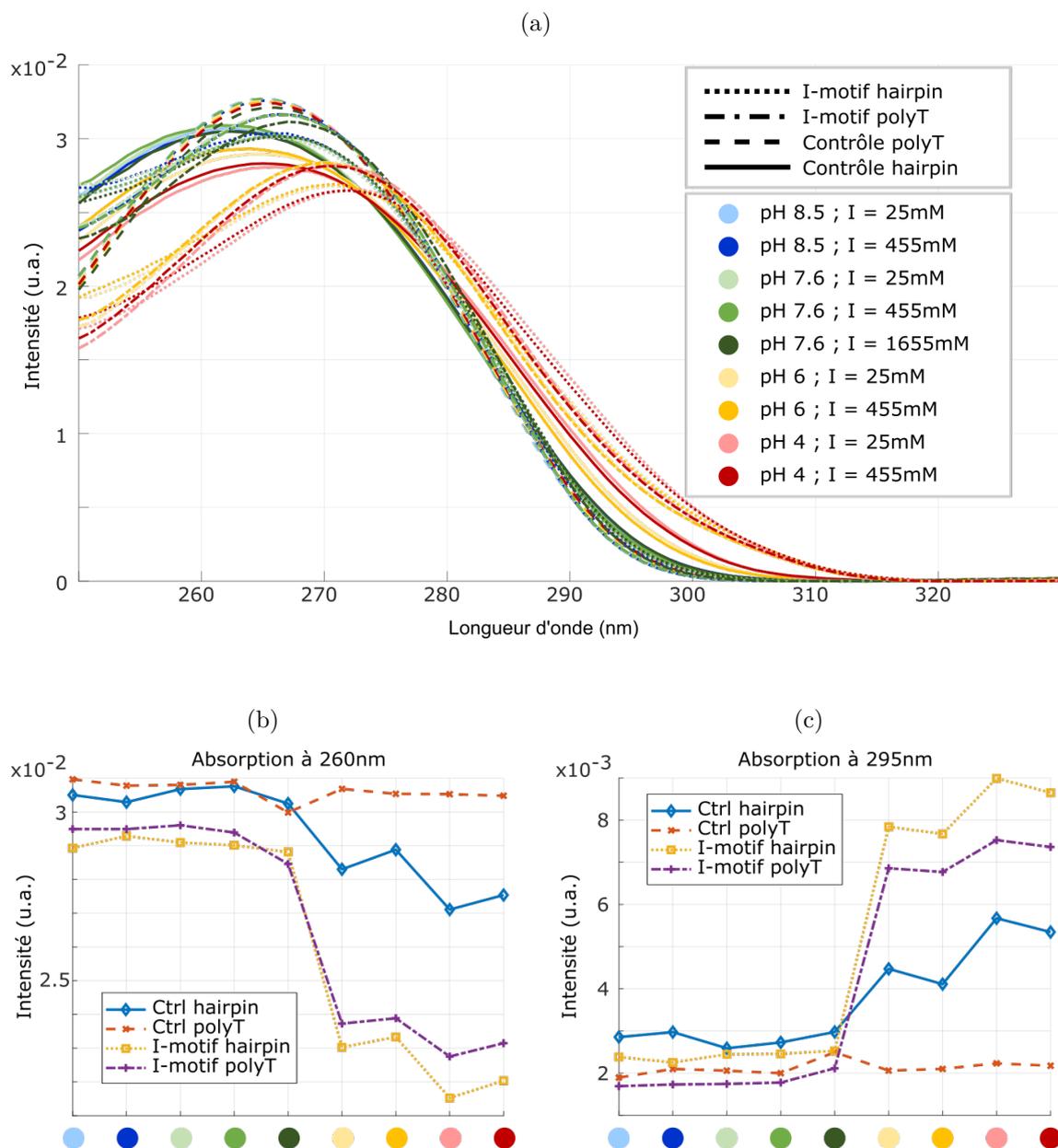


Figure 5.5: Spectres d'absorption des différentes séquences du site actif : i-motif polyT, i-motif coopératif, référence *hairpin* et brin polyT à différentes valeurs de pH et de force ionique (a), la variation de la valeur à 260nm suivant ces paramètres (b) et à 295nm (c).

où  $R$  est la distance effective qui sépare les deux molécules et  $R_0$  le rayon de Förster.

Dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser des cyanines comme fluorophores : Cy3 (*donneur*) et Cy5 (*accepteur*), dont le rayon de Förster est de l'ordre de 6 nm. Nous les avons inclus aux extrémités des brins verts liant les deux brins du *scaffold* entre eux (voir figure 5.8a). Ainsi, à fort pH, la distance entre ces deux émetteurs devrait être équivalente à la longueur d'une double-hélice de 42bp, soit plus de 12 nm : le transfert devrait être très

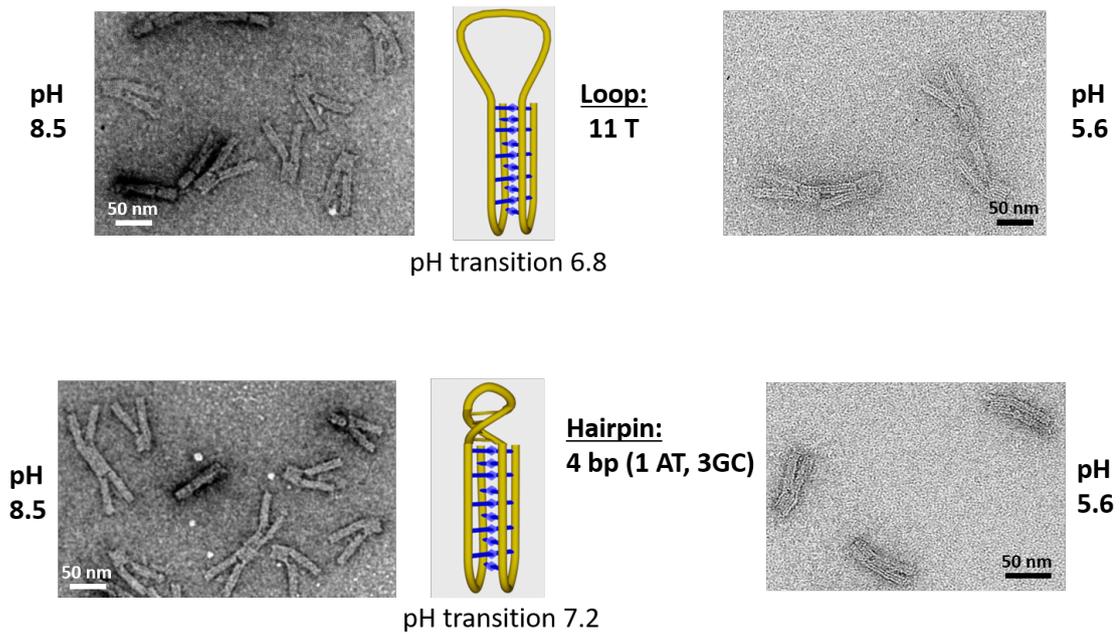


Figure 5.6: Vérification du fonctionnement de l'origami sensible au pH par l'intermédiaire d'images de microscopie électronique par transmission des origamis seuls i-motif coopératif (en bas) et polyT (en haut) à pH 8,5 et 5,6.

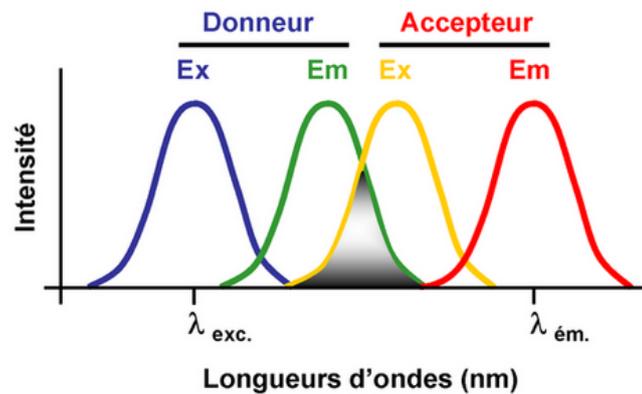


Figure 5.7: Schéma explicatif du transfert d'énergie FRET par l'intermédiaire des spectres d'excitation et d'émission du donneur et de l'accepteur (Source Wikipédia).

faible avec une probabilité de 1,5%. Au contraire, à pH faible, quand l'i-motif est replié, la distance devrait être de l'ordre de l'épaisseur de 3 hélices d'ADN, soit 6 nm environ, soit une efficacité de transfert de 50%. Expérimentalement, on estime la probabilité de transfert grâce à la relation :

$$E = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \quad (5.2)$$

où  $I_{DA}$  et  $I_D$  sont, respectivement, l'intensité de fluorescence du *donneur* en présence et en l'absence de l'*accepteur*. Cependant, cette mesure est très sensible à la concentration des objets. Malheureusement, du fait de notre méthode de purification d'origamis, notre

connaissance de la concentration de la solution n'est pas assez fiable. Ainsi, nous avons préféré mesurer l'efficacité relative de transfert, qui équivaut à un ratio de l'intensité du *donneur* et de l'*accepteur* tel que :

$$E_{\text{rel}} = \frac{I_A}{I_D + I_A} \quad (5.3)$$

avec  $I_D$  la composante du spectre correspondant au *donneur* et  $I_A$  correspondant à l'*accepteur*. La figure 5.8 présente les résultats FRET de mesures d'ensemble obtenus avec les origamis i-motif coopératifs contenant les cyanines couplées. Chaque sous-figure correspond au spectre d'émission, après excitation à 522 nm (soit dans l'absorption de Cy3 mais loin de l'absorption de Cy5), d'un échantillon d'origami en solution à un pH fixé. Ce spectre est décomposé grâce à des spectres d'émission d'échantillons uniquement composés d'un des fluorophores.

Nous observons donc, qu'à pH 8,5, l'efficacité relative de transfert est égale à 0,06. Elle est donc très faible, ce qui correspond bien à un écartement élevé des bras de l'origami. En utilisant un autre échantillon incubé à pH=5,6, l'efficacité de transfert atteint 0,16, ce qui confirme une conformation différente de l'origami par repliement des i-motifs. Finalement, j'ai utilisé un autre échantillon incubé à pH=5,6 mais j'ai augmenté le pH à 7,8 avant mesure de FRET afin de tester la réversibilité du changement de conformation. L'efficacité estimée est de 0,05, proche de la valeur mesurée pour le premier échantillon. Ces trois mesures ont été effectuées sur des solutions différentes pour éviter toute problématique de photoblanchiment des fluorophores.

Les mesures de FRET confirment donc les mesures d'absorbance et de TEM et indiquent donc le bon fonctionnement du site actif de l'origami en fonction du pH. Il serait intéressant de comparer ces mesures sur origamis à des échantillons bien calibrés contenant le couple Cy3/Cy5 (par exemple deux double-brins d'ADN contenant les deux fluorophores à deux distances bien définies) afin de corréliser les mesures de FRET à un changement de distance entre fluorophores dans les origamis en fonction du pH. Je n'ai pas eu le temps de finaliser ces expériences pendant mon court séjour à Montpellier mais nous les effectueront à court terme.

#### 5.1.4 Dimères assemblés sur des origamis sensibles au pH

Une fois rentrée de Montpellier, j'ai pu réaliser des dimères or-origamis sensibles au pH en utilisant les protocoles décrits dans le chapitre 2. Pour ces expériences, j'ai utilisé d'autres particules monodisperses fournies par Sylvie Marguet et dont le diamètre est de 47nm de diamètre d'après des mesures par TEM. Elles sont couvertes d'ADN 8T avec une fonction trithiol en 3'. Compte-tenu de ce diamètre plus élevé, j'ai effectué une nouvelle courbe de calibration par *MNPBEM* de la relation entre longueur d'onde de résonance et distance interparticule, donnée en figure 5.9, en utilisant la même géométrie simulée (coeur-coquille avec l'indice d'un simple-brin d'ADN et la constante diélectrique de l'or mesurée en 2012, voir chapitre 3). Globalement, il y a un léger décalage des fréquences de résonance vers le rouge compte-tenu de la taille des particules.

Moduler le pH pour ces dimères auto-assemblés ne va pas influencer uniquement sur le site actif au centre de l'origami. En effet, abaisser le pH et neutraliser les charges de la chaîne phosphate-pentose de l'ADN va jouer sur deux autres effets : modifier la longueur de persistance de l'ADN et donc sur la rigidité des origamis ; mais, surtout,

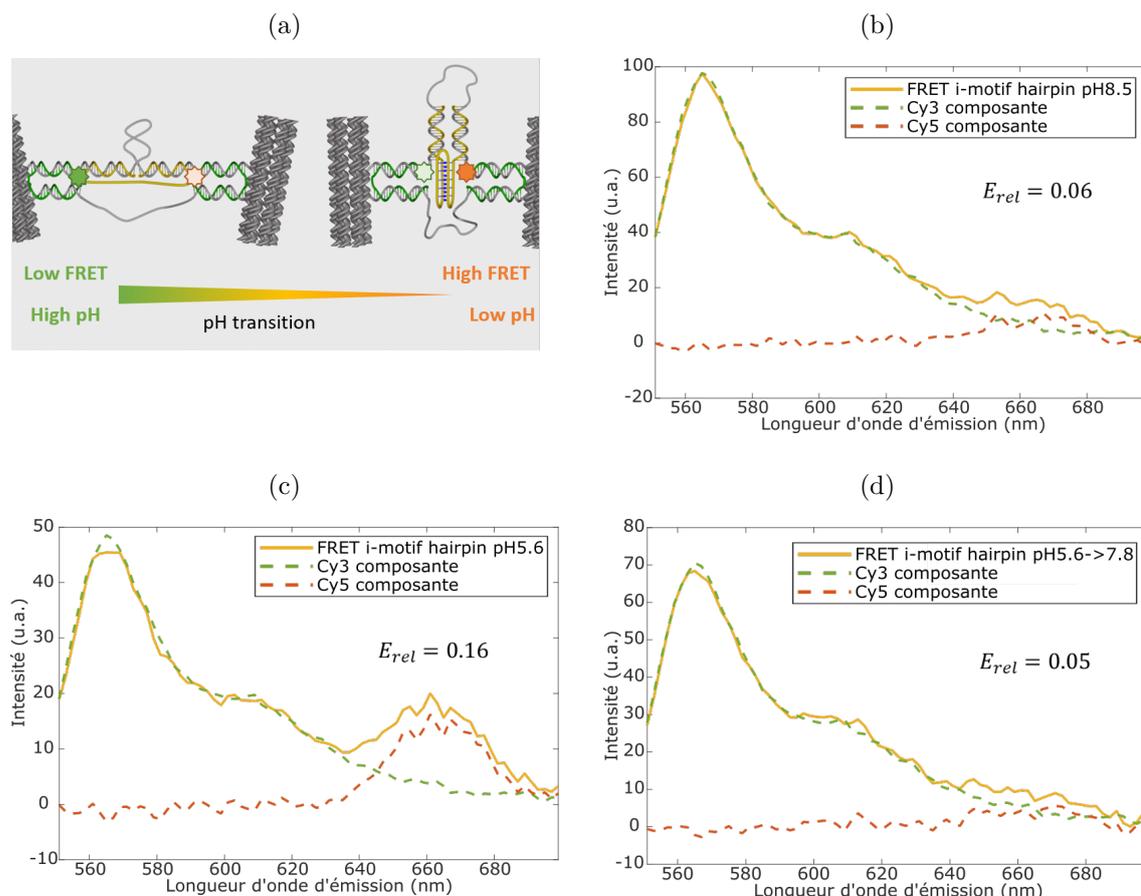


Figure 5.8: Mesures de FRET : schéma explicatif de la position et du fonctionnement du couple FRET (a). Spectre d'émission de l'échantillon origami i-motif hairpin à pH 8.5 (b), à pH 5.6 (c) et enfin vérification de la réversibilité avec un échantillon passé à pH 5.6 puis remonté à 7.8 (d).

*Excitation à 522nm*

neutraliser la répulsion électrostatique entre les particules d'or. Pour mettre cet effet en évidence, je présente sur la figure 5.10, les distributions de fréquence de résonance de dimères assemblés sur l'origami i-motif polyT et sur l'origami de référence flexible (où le *scaffold* est simple brin sur 86 bases) à faible force ionique ( $I = 25$  mM) et à pH=4 ou pH=8. On observe que, pour les deux types d'origamis, il y a une très forte modulation de la fréquence de résonance plasmon médiane : de 551 nm pour pH=8 à 558 nm pour pH=4, pour les dimères **i-motif polyT** et de 546 nm pour pH=8 à 554 nm pour pH=4, pour les dimères **contrôle semi-flex**. Ces longueurs d'onde de résonance correspondent donc à des distances interparticules  $d$  médianes respectivement de 17 nm et 25 nm à pH basique et respectivement 13 et 15 nm à pH acide. On observe donc bien, que ce soit pour l'i-motif ou la référence, une forte réduction de la distance interparticule en milieu acide correspondant à la neutralisation des charges négatives des brins d'ADN en surface des particules et, peut être, à la réduction de la rigidité mécanique des origamis. Dans les deux cas, les distances interparticules finales semblent proche du contact des chimies de

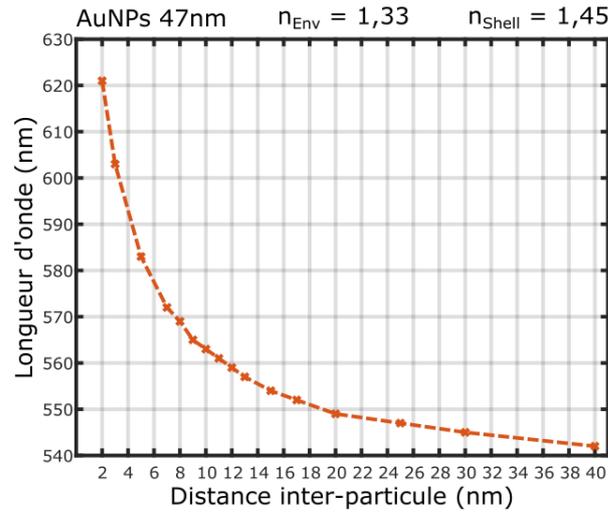


Figure 5.9: Courbe de calibration longueur d'onde - distance interparticule (*Paramètres : AuNPs 47nm, coquille : 6nm,  $\epsilon_{or}$  : Olmon [28]*)

surface.

Plus spécifiquement, à pH=8, les dimères de référence semblent plus ouverts que les i-motifs polyT. Ceci peut se comprendre compte-tenu de la structure des origamis : l'origami de référence peut théoriquement présenter jusqu'à 127 bases entre les deux bras du Y alors que l'origami i-motif polyT est limité à 83 paires de base sur un des brins du *scaffold* qui relie les deux bras du Y. Il faut tout de même faire attention à une comparaison directe entre deux échantillons différents compte-tenu de l'échantillon statistique considéré. Par contre, il est possible de comparer l'évolution des fréquences de résonance en modulant le pH comme ce sont toujours les mêmes dimères qui sont étudiés entre les étapes.

A pH=4, les deux échantillons subissent donc un fort rapprochement des particules. Malgré tout, la distribution avec l'i-motif reste plus rouge que pour les dimères contrôles. Il se pourrait donc que la formation de l'i-motif entraîne un rapprochement plus important des particules. Il semble surtout, comme dans l'étude de la réaction de *strand displacement*, que les interactions entre particules aient tendance à dominer la conformation des dimères auto-assemblés. Cela reste étonnant à des distances grandes par rapport à la longueur de Debye-Hückel à cette force ionique (de l'ordre de 2 nm).

Dans le cas des dimères i-motifs polyT, je présente également des mesures complémentaires démontrant la réversibilité de influence du pH : à pH basique, les particules s'éloignent à nouveau et se rapproche à pH=4. Ces données montrent, à nouveau, la bonne stabilité de particules monodisperses couvertes d'ADN 8T. On observe, tout de même, un léger décalage progressif vers le rouge : les incubations à différents pH ne durent qu'une heure et le changement de conformation important des dimères introduit peut-être des barrières énergétiques qui nécessiteraient des temps d'incubation plus long.

Pour étudier un changement de conformation uniquement dû aux i-motifs, il faut donc effectuer une modulation bien plus faible du pH pour ne protoner que les cytosines susceptibles de former des liaisons hydrogènes avec des cytosines neutres afin de replier l'i-motif. D'après mes mesures d'absorbance, un pH variant de 7,6 à 6 semble un bon choix.

La figure 5.11 présente les distributions de longueur d'onde de résonance à différentes

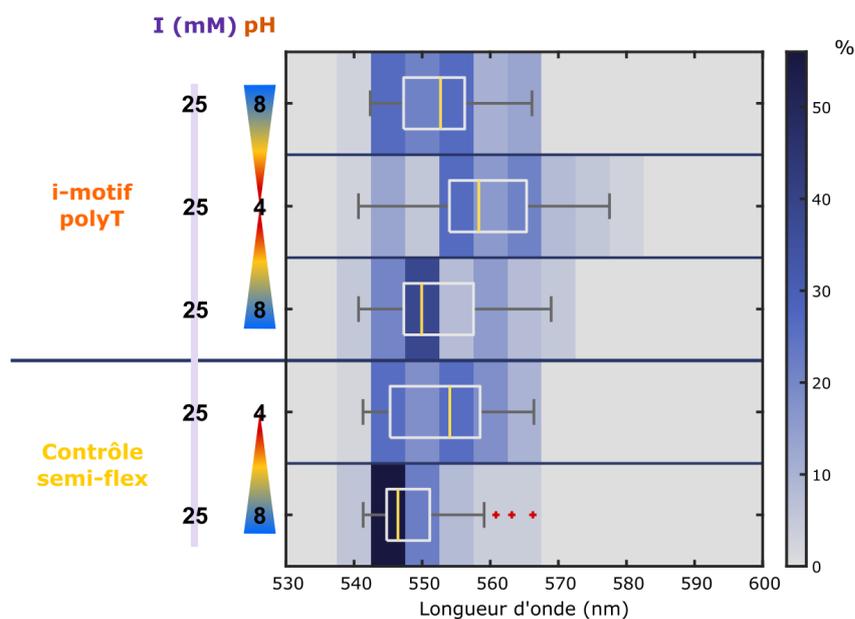


Figure 5.10: Evolution des distributions de longueur d'onde de résonance pour des dimères de particules monodisperses couvertes de poly8T trithiol pour des origamis **i-motif polyT** et **contrôle semi-flex** en fonction du pH (sens chronologique : de bas en haut) (Taille d'échantillon : 38 pour dimères **i-motif polyT** et 50 pour dimères **contrôle semi-flex**)

forces ioniques et différents pH pour des dimères **i-motif polyT**. Comme précédemment la chronologie se lit de bas en haut. A pH basique (7,6) et faible force ionique, la longueur d'onde de résonance médiane est égale à 551 nm, ce qui correspond à une distance interparticule comprise entre 15 et 20 nm. Le pH est ensuite abaissé à 6. Pour rappel, le pH de transition est de 6,62 : nous sommes donc bien suffisamment en dessous pour espérer la formation de l'i-motif. La valeur médiane est alors légèrement décalée vers le rouge pour atteindre 553 nm, soit une légère diminution de la distance interparticule pouvant indiquer la formation de l'i-motif. Cependant, comme nous l'avons déjà vu précédemment à faible force ionique, même un dimère **fermé / fermé\*** présente une distance interparticule élevée. La force ionique a donc été augmentée jusqu'à 455 mM. La distribution se décalé alors vers le rouge de 4 nm. Cette variation est inférieure à la variation observée avec les dimères **fermés\*** et **déverrouillés\*** du chapitre précédent. La force ionique est haussée une dernière fois jusqu'à 1655 mM. Le décalage spectral est alors de 6 nm vers le rouge, ce qui correspond à une distance entre les particules de moins de 10 nm, distance équivalente à celle observée avec les dimères **fermés\*** à la même force ionique.

En ce qui concerne les dimères i-motif coopératifs (voir figure 5.12), la longueur d'onde de résonance médiane de départ est légèrement supérieure, 553 nm. Cette différence de 2 nm, pourrait s'expliquer par la présence du *hairpin* sur la boucle centrale de l'i-motif mais, compte-tenu de la largeur des distributions, il est difficile de conclure. Le pH est ensuite abaissé à 6 comme précédemment : la distribution se décale alors également de quelques nanomètres pour atteindre 556 nm. Cependant, avec cet échantillon, lors de l'augmentation de la force ionique à 455 mM, nous n'observons pas de décalage de la dis-

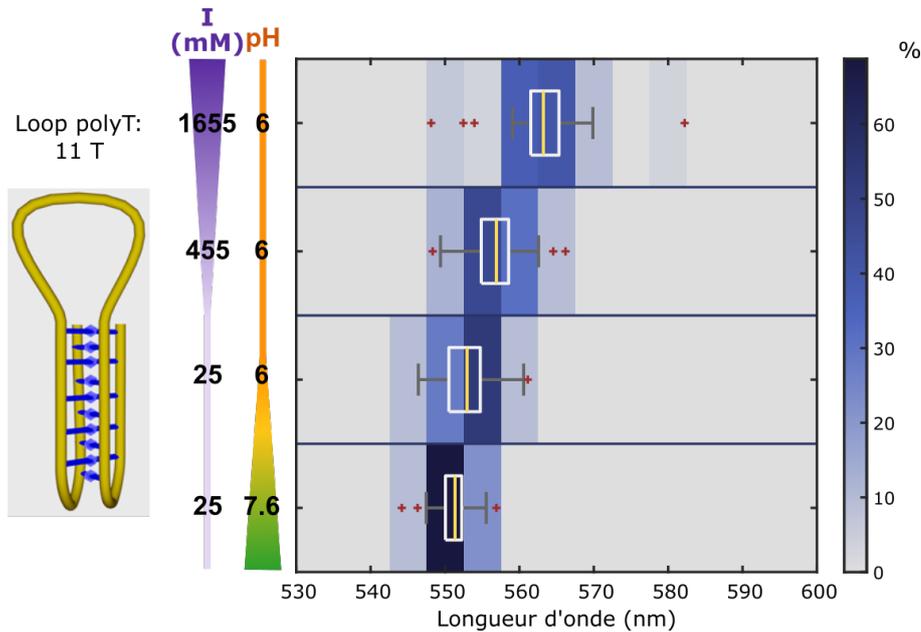


Figure 5.11: Evolution des distributions de longueur d'onde de résonance pour des dimères de particules monodisperses couvertes de poly8T trithiol pour des origamis **i-moyif polyT** en fonction de la force ionique et du pH (sens chronologique : de bas en haut) (Taille de l'échantillon : 32 dimères)

tribution. Finalement la dernière augmentation de force ionique entraîne un déplacement de la valeur médiane de la longueur d'onde de 9 nm (565nm), correspondant à une distance interparticule d'environ 9 nm donc comparable à la distance finale obtenue avec l'autre i-motif.

J'ai effectué la même analyse pour les origamis de référence : l'origami présentant un brin avec un *hairpin* mais pas d'i-motif (figure 5.13a) et l'origami flexible qui présente une grande section simple-brin du *scaffold* (figure 5.13b). A faible force ionique et pH basique, les dimères avec origamis de référence *hairpin* et flexibles ont, respectivement, pour longueur d'onde de résonance médiane 551 nm et 553 nm, similaires aux i-motifs à faible force ionique. Ces légers décalages sont de faibles par rapport aux largeurs de distributions pour des échantillons différents : par contre, pour un échantillon de dimères donnés, il est possible d'analyser des petites variations de longueur d'onde médiane. Ainsi, lors de la modification du pH, nous n'observons pas de décalage de la distribution de la référence flexible vers le rouge comme pour les i-motifs. Les dimères de référence avec l'*hairpin* présentent un léger décalage de leur longueur d'onde médiane, de 2 nm. Cependant, l'étendue des moustaches et de l'espace interquartile n'est pas modifié comme cela été le cas pour les dimères i-motifs. Surtout, lors de l'augmentation de la force ionique à 455 mM, les deux échantillons de référence ont le même comportement qui est significativement différent des i-motifs : leurs distributions de fréquences de résonance présentent un très fort décalage vers le rouge de 13 nm. La distance interparticule correspondante est alors inférieure à 9 nm. La dernière augmentation de force ionique décale encore légèrement les distributions vers le rouge respectivement de 4 et 2nm.

Les dimères de référence semblent donc présenter un comportement similaire l'un

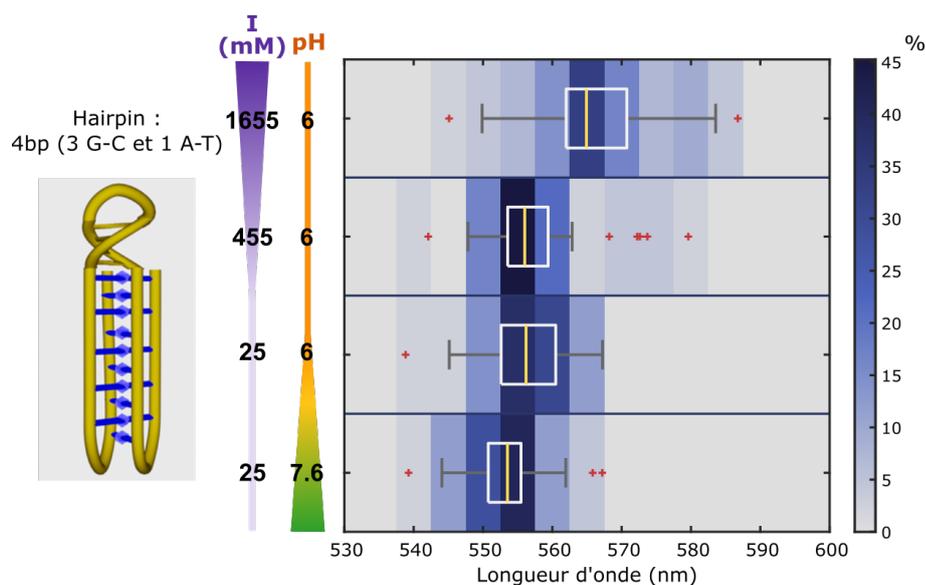


Figure 5.12: Evolution des distributions de longueur d'onde de résonance pour des dimères de particules monodisperses couvertes de poly8T trithiol pour des origamis **i-moyif hairpin** en fonction de la force ionique et du pH (sens chronologique : de bas en haut) (Taille de l'échantillon : 43 dimères)

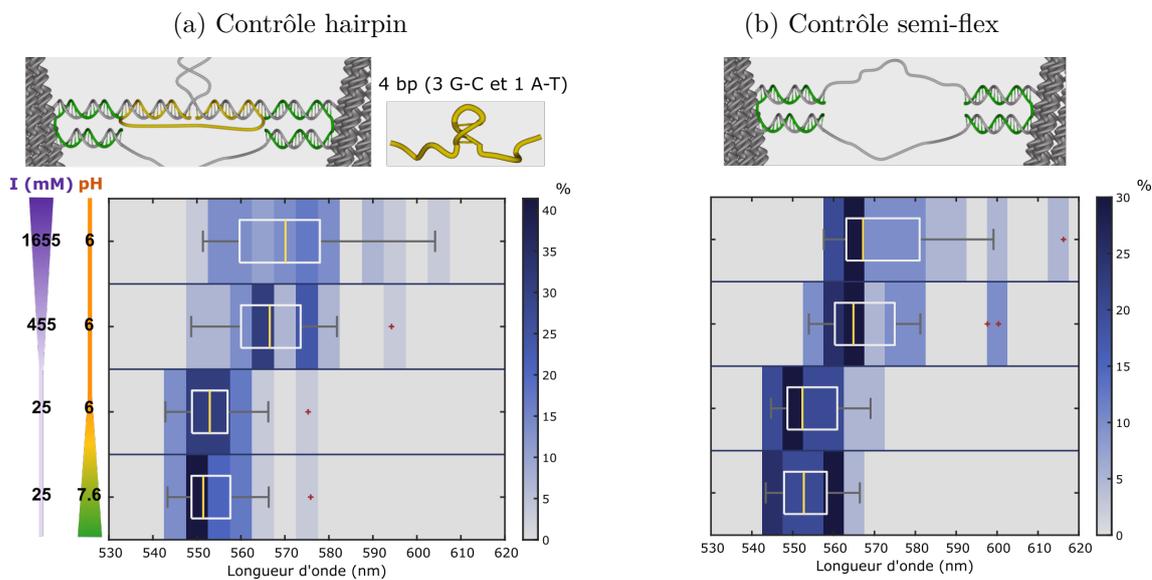


Figure 5.13: Evolution des distributions de longueur d'onde de résonance pour des dimères de particules monodisperses couvertes de poly8T trithiol pour des origamis **contrôle hairpin** (a) et **contrôle semi-flex** en fonction de la force ionique et du pH (sens chronologique : de bas en haut) ; Schémas explicatifs de la partie centrale des origamis contrôles (en haut) (Tailles des échantillons : 29 dimères pour **contrôle hairpin** ; 20 dimères pour **contrôle semi-flex**)

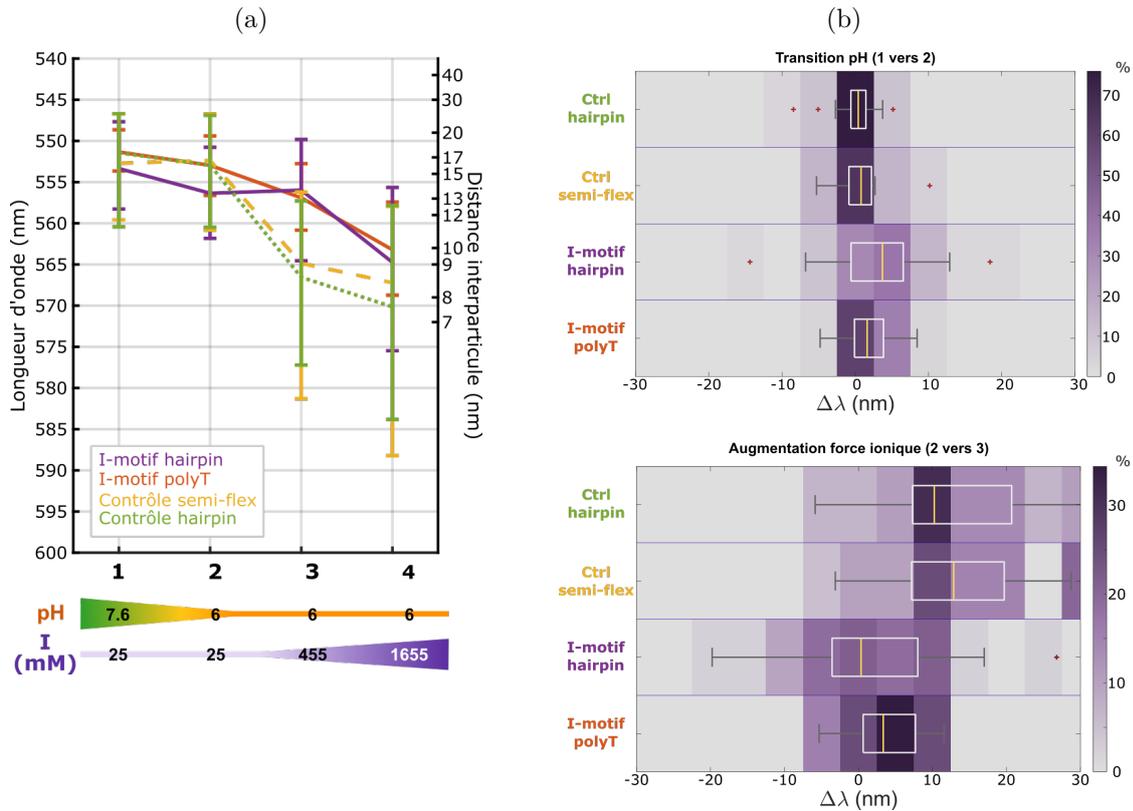


Figure 5.14: Courbe représentant l'évolution de la valeur médiane de longueur d'onde de résonance avec l'écart type des distributions montrées aux figures 5.11, 5.12 et 5.13 (dimères **i-motif polyT**, **i-motif hairpin** et **contrôle semi-flex** et **contrôle hairpin** de particules monodisperses couvertes de poly8T trithiol)(a). Distributions des variations de longueur d'onde à l'échelle des dimères uniques ( $\Delta\lambda$ ) entre le passage d'un pH 7.6 à 6 à 25mM (en haut) et une augmentation de force ionique de 25mM à 455mm (en bas)

à l'autre mais différent des dimères i-motifs. Afin de faciliter la comparaison de ces différentes structures, les valeurs médianes des longueurs d'onde de résonance obtenues précédemment ont toutes été représentées sur le même graphique (voir figure 5.14a) ainsi que les distributions des variations de longueur d'onde pour chaque dimère pour les différents design (voir figure 5.14b). Grâce à la courbe de calibration des longueurs d'onde vis-à-vis des distances  $d$ , la seconde ordonnée de cette figure fournit une échelle non-linéaire de  $d$ .

Ainsi, à faible force ionique et pH basique, les 4 structures présentent des distributions relativement proches comme déjà discuté. Lors du changement de pH, les dimères i-motifs se décalent légèrement vers le rouge. Les distributions en figure 5.14b (partie haute) permettent de clairement visualiser, qu'à la transition de pH, les dimères de référence ne varient quasiment pas de longueur d'onde de résonance alors qu'il y a un léger décalage pour les dimères i-motifs, en particulier le design coopératif. Il semble donc que la diminution du pH puisse entraîner la formation des i-motifs et que l'*hairpin* du design coopératif facilite ce repliement.

Lors de l'augmentation de la force ionique de 25 à 455 mM, les deux distributions des échantillons de référence subissent un important décalage spectral vers le rouge contrairement aux i-motifs. Les deux populations d'i-motifs finissent par se rejoindre : les i-motifs coopératifs n'évoluant pas contrairement au polyT. Cette différence de comportement est très visible lorsque l'on regarde les variations à l'échelle de dimères uniques (voir figure 5.14b, en bas). En effet il n'y a aucun chevauchement des espaces interquartiles des contrôles et des i-motifs.

Finalement, à très forte force ionique, les 4 distributions se rejoignent globalement. Les distances interparticules sont alors comprises entre 10 et 7 nm. Nous pouvons constater cependant un élargissement des distributions des dimères de référence, phénomène caractéristique lorsqu'il y a un début d'agrégation des dimères et que la limite de réversibilité de leur conformation a été atteinte, comme observé dans le chapitre précédent.

Cette expérience semble donc indiquer un comportement différent entre les échantillons comportant un i-motif et les deux références : non seulement, il y a un léger décalage spectral avec le changement de pH pouvant indiquer le repliement de l'i-motif mais, surtout, la formation de l'i-motif semble rigidifier la nanostructure hybride et limiter sa capacité à se déformer quand on augmente la force ionique. De plus, nous avons vu que l'ajout d'un **hairpin** sur la boucle centrale de l'i-motif semble aider à la formation de celui-ci par effet coopératif.

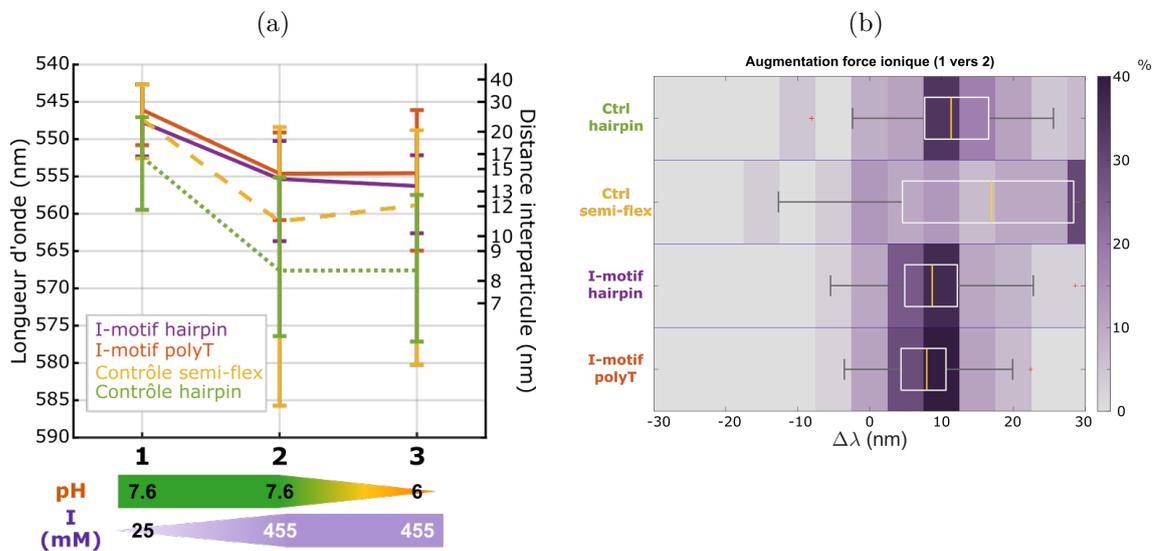


Figure 5.15: Courbe représentant l'évolution de la valeur médiane de longueur d'onde de résonance avec l'écart type (dimères **i-motif polyT**, **i-motif hairpin** et **contrôle semi-flex** et **contrôle hairpin** de particules monodisperses couvertes de poly8T trithiol)(a). Distributions des variations de longueur d'onde à l'échelle des dimères uniques ( $\Delta\lambda$ ) après une augmentation de force ionique de 25mM à 455mM à pH 7.6 (b)

En complément de cette étude, je trace sur la figure 5.15, les résultats obtenus pour les 4 origamis différents en augmentant la force ionique à pH basique. Lors de l'augmentation de la force ionique, les dimères de référence se décalent fortement vers le rouge. La dis-

tribution de la référence flexible présente même un fort élargissement. Au contraire, les dimères i-motifs se décalent légèrement, pour arriver à un niveau similaire aux valeurs obtenues précédemment à même force ionique mais à pH=6. Ce comportement différent est d'autant plus visible sur le figure 5.15b où les distributions pour les i-motifs sont quasiment identiques et très différentes des deux références.

Une fois à 455 mM de force ionique, changer le pH de 7,6 à 6 ne modifie pas beaucoup les distributions. Ce résultat est donc en désaccord avec l'analyse précédente : il semblerait que cette différence de comportement ne soit pas liée au pH et donc à la formation de l'i-motif. Je tiens à préciser que ces quatre échantillons de dimères ont été synthétisés avec les mêmes particules d'or en utilisant les mêmes conditions expérimentales, à quelques jours d'intervalle et que les mesures optiques ont été effectuées sur des échantillons fraîchement synthétisés. Il est donc difficile de justifier cette différence de comportement indépendamment de la structure des origamis considérés, surtout compte-tenu de l'utilisation de deux origamis différents contenant des i-motifs. Mais il est difficile de conclure de manière non-ambiguë, sans expériences complémentaires, que le repliement des i-motifs a été observé optiquement et qu'ils ont modifié la rigidité des nanostructures hybrides.

Pour conclure, au cours de cette partie, nous avons proposé deux designs d'origamis sensibles au pH. Nous avons vu qu'une modification de pH entraînait bien une modification de conformation sur des origamis seuls grâce à l'étude d'images de microscopie électronique et des mesures de FRET. De plus, nous avons vu que des dimères d'or assemblés sur des origamis voient leur morphologie fortement modulée à pH=4, probablement par la protonation des brins d'ADN en surface des particules. Je vous ai également montré que des dimères assemblés sur des origamis i-motifs semblaient présenter des comportements mécaniques différents de dimères hybrides ne présentant pas d'i-motifs.

## 5.2 Autres designs du site actif

Nous avons également testé d'autres géométries du site actif en exploitant, en particulier, des séquences aptamères. L'avantage du design du site actif décrit pour les i-motifs est qu'il suffit de modifier la séquence d'un seul brin d'ADN, le brin jaune sur la figure 5.2). Nous avons donc tout d'abord synthétisé un origami sensible à la cocaïne, dont voici la séquence du site actif [167] :

- *ATTCAACCGTTCTAGCTGATA*  
 GAGACAAGGAACAAGGAGAACTCCTTCAACGAAGTGGGTTTCCTTCAAC  
 GAAGTGGGTCTC *GTGTAGGTAAAGATTCAAAAAG* (103 bases, *hairpin* souligné  
 et séquences hybridées avec le *scaffold* en italique)

Cette séquence contient 2 sites de liaison pour la molécule de cocaïne. Pour confirmer le fonctionnement de l'origami nous avons, comme pour les i-motifs, réalisé des images TEM en présence et en l'absence de cocaïne. La figure 5.16a montre ces images. Nous pouvons remarquer qu'il n'y a pas de différence notable entre les deux images. Il est alors difficile de conclure du fonctionnement de cet origami. Nous avons donc également réalisé des mesures de FRET (voir figure 5.16b). Malheureusement même sans présence de cocaïne l'énergie relative mesurée est égale à 0,22, ce qui semble indiquer que l'origami présente toujours un angle faible entre ses bras. La figure 5.17 montre une représentation d'une molécule de cocaïne ainsi que ses sites d'interaction avec l'aptamère considéré. Malheureusement,

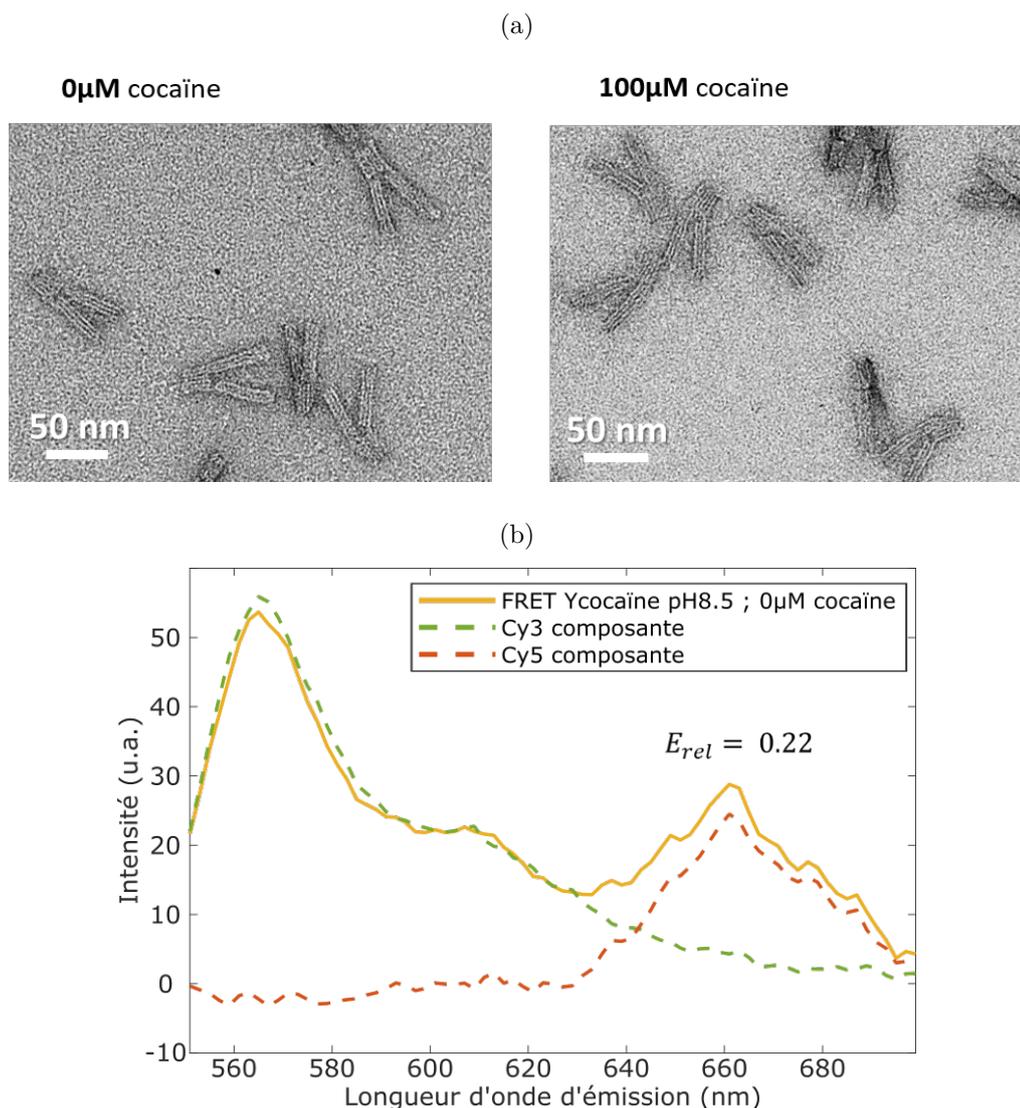


Figure 5.16: Images de microscopie électronique à transmission avec coloration négative des origamis sensibles à la cocaïne sans (à gauche) et avec 100 $\mu$ M de cocaïne (a) et le spectre d'émission d'un échantillon avec un couple FRET et sans cocaïne (b)

même en l'absence de molécules cibles, la structure secondaire de l'aptamère est très stable (voir figure 5.17). En effet à 20 mM de force ionique, l'énergie libre  $\Delta G$  est égale à  $-9,52kcal.mol^{-1}$  et a une température de fusion de presque 50°C. De plus, cette structure secondaire concerne l'entièreté de la séquence jusqu'aux extrémités. Ainsi il n'est pas étonnant que l'origami ait systématiquement un angle faible entre ses bras. Malgré tout, dans le cas d'un dimère de particules d'or la répulsion entre les particules pourrait permettre une déstabilisation de la structure secondaire et participer à son écartement. Malheureusement, je n'ai pas eu le temps de tenter la synthèse de tels objets.

Nous avons également réalisé des origamis sensibles aux ions mercure et argent. En ce



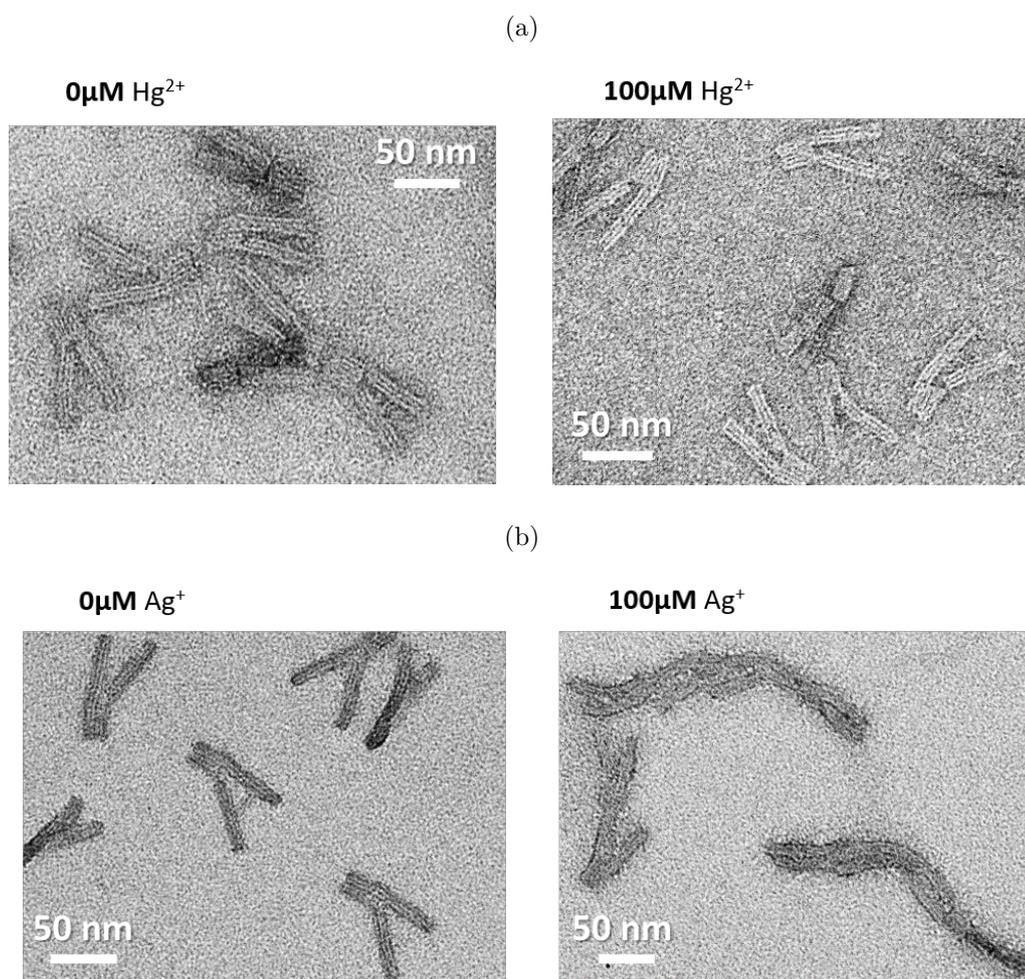


Figure 5.18: Images de microscopie électronique à transmission avec coloration négative des origamis sensibles aux ions mercure : sans (à gauche) et avec 100 $\mu$ M de Hg<sup>2+</sup> (à droite)(a) et d'origamis sensibles aux ions argent : sans (à gauche) et avec 100 $\mu$ M de AgNO<sub>3</sub> (à droite)(b)



## Chapitre 6

# Conclusions et perspectives

### Sommaire

---

<b>6.1</b>	<b>Conclusions</b> . . . . .	<b>144</b>
<b>6.2</b>	<b>Analyse optique de dimères à temps court</b> . . . . .	<b>146</b>
<b>6.3</b>	<b>Dimères de nanocubes d'or assemblés sur origamis d'ADN</b> . .	<b>148</b>

---

## 6.1 Conclusions

L'objectif de ce projet était la conception d'une nanostructure plasmonique hybride, composée d'un origami d'ADN et d'un dimère de particules d'or, et capable de modifier ses propriétés optiques en présence d'un stimulus physicochimique spécifique. Ainsi, au cours de ce manuscrit je vous ai présenté la méthode de synthèse de ces nano-objets que j'ai développée au cours de ma thèse : repliement et purification des origamis seuls ; fonctionnalisation et purification de deux types de particules d'or couvertes de différentes chimies de surface ; assemblage et purification des dimères assemblés. Ce travail de synthèse a demandé différentes optimisations, en particulier en jouant sur les ligands ADN et amphiphiles introduits en surface des particules d'or et dont j'ai analysé l'influence sur la stabilité colloïdale : cet aspect était essentiel comme l'analyse des propriétés optiques de dimères uniques nécessitait des particules d'or d'au moins 40 nm de diamètre alors que ces colloïdes d'or agrègent facilement en présence des ions  $Mg^{2+}$  nécessaires à la stabilité des origamis. Des images de microscopie électronique ont montré la réussite de la nanofabrication de ces objets pour différentes géométries d'origamis et pour les deux types de nanoparticules de 40 nm, qu'elles soient commerciales et facettées ou fournies par notre collaboratrice Sylvie Marguet et érodées chimiquement.

Je vous ai ensuite présenté des protocoles d'analyse optique spectrométrique et colorimétrique (HSL), adaptés à l'étude de dimères uniques de particules d'or de 40 nm. Nous avons également vu comment l'utilisation de particules monodisperses en taille et en forme permettait une réduction de la dispersion des réponses optiques et facilitait alors l'analyse morphologique de ces nanostructures hybrides. J'ai également présenté une méthode numérique qui m'a permise d'établir une courbe théorique reliant la longueur d'onde de résonance longitudinale des dimères avec la distance interparticules. J'ai, en particulier, discuté du choix des paramètres de cette simulation en fonction de la nature des particules considérées, monodisperses ou commerciales.

Par la suite, je vous ai présenté différents designs d'origamis dynamiques : non-modulables, modulables par interaction avec des brins d'ADN spécifiques (réaction de *strand displacement*), par des variations de pH ou par l'introduction de séquences aptamères sensibles à d'autres analytes (petite molécule organique - cocaïne - ou cations spécifiques -  $Ag^+$  et  $Hg^{2+}$ ). Des dimères de nanoparticules d'or ont été synthétisés pour ces différentes géométries d'origamis à l'exception des systèmes comportant des aptamères.

Je vous ai alors décrit des expériences optiques permettant de corrélérer directement la forme de l'origami avec les distributions de fréquences de résonance plasmon de dimères uniques. Cette étude m'a permis de caractériser quelles particules d'or et quelles chimies de surface permettaient d'avoir, à la fois, une bonne stabilité des dimères assemblés et une faible dispersion spectrale de leurs fréquences de résonance. J'ai pu également observer de fortes modulations réversibles de la morphologie de ces dimères hybrides en changeant la force ionique locale. Surtout, en exploitant ces nanostructures hybrides optimisées, j'ai montré qu'il était possible de différencier optiquement des dimères assemblés sur des origamis dont l'angle entre les bras du Y était modifié par différentes longueurs d'ADN double-brin ou des origamis mécaniquement moins rigides, avec uniquement des simple-brins entre les bras. Je vous ai également décrit une première expérience de modulation in-situ de la morphologie de l'origami qui permet de rigidifier ces nanostructures hybrides

pour les rendre moins sensibles à une variation de la force ionique. Il serait alors intéressant de valider la spécificité de la réaction observée en réalisant une série d'expériences avec des brins d'ADN cibles non-complémentaires au site actif de l'origami ou comportant des modifications ponctuelles de la séquence.

Toutefois, nous avons pu observer que, dans certaines conditions (en particulier, à faible force ionique), un origami qui a été conçu pour présenter de faibles distances interparticules présentait, au contraire, un faible couplage plasmon. Ainsi, il semblerait que la répulsion électrostatique entre les particules d'or peut dominer la morphologie des dimères en solution et forcer les particules à s'écarter. Cette observation reste étonnante au vu de la grande distance interparticule observée dans ces cas (15-20 nm) par rapport à la longueur caractéristique des interactions électrostatiques (longueur de Debye-Hückel, de moins de 2 nm dans ces conditions). L'optimisation de telles nanostructures hybrides dynamiques nécessite donc une meilleure compréhension des interactions qui gouvernent leur morphologie et donc leur paysage énergétique.

Enfin, je vous ai présenté un design très versatile d'origamis dynamiques ou la modification d'une unique séquence d'ADN permettait de changer l'analyte spécifique auquel l'origami est sensible. Pour cela, j'ai utilisé des quadruplex de cytosines sensibles au pH (i-motifs) ou des séquences aptamères. L'analyse de ces actuateurs nanométriques a été essentiellement portée sur le cas des i-motifs. Dans un premier temps, j'ai effectué des mesures d'absorbance et de fluorescence par FRET pour valider la formation des i-motifs à pH acide et le repliement des origamis. En étudiant optiquement des dimères assemblés sur origamis, j'ai démontré que ces objets, même en absence d'i-motifs, présentaient une modulation réversible de leur conformation en passant en pH très acide. Cela indique, à nouveau, la forte influence des interactions entre particules sur la morphologie de ces nanostructures hybrides. Avec une modulation plus faible du pH, je vous ai montré des mesures optiques indiquant la formation des i-motifs dans des dimères hybrides associée à une modification de leurs propriétés mécaniques vis-à-vis d'une modulation de la force ionique. Cependant nous n'avons pas pu relier cette modification avec le pH de transition des i-motifs.

Ces expériences montrent donc qu'il est particulièrement complexe de prévoir et d'analyser optiquement la morphologie de nanostructures hybrides comportant, d'une part, des particules inorganiques présentant de fortes interactions entre elles (qui gouvernent leur stabilité colloïdale quand elles sont isolées en solution) et, d'autre part, une nanostructure organique dynamique. Une des perspectives importantes de ce travail serait donc d'arriver à analyser plus précisément le paysage énergétique de ce type de nano-objets pour comprendre les interactions dominantes afin d'optimiser leur design. En ce sens, étudier cette morphologie à des échelles de temps courtes permettrait d'analyser et de moduler la flexibilité de ces nanostructures en fonction de la force ionique locale ou du pH. Dans cette direction, je présente ci-dessous des données préliminaires d'analyse des propriétés optiques de dimères de particules d'or à l'échelle de la seconde.

Dans l'hypothèse que la répulsion électrostatique entre les deux particules d'or est la raison principale du décalage entre le design des origamis et les fréquences de résonance plasmon observées, il serait intéressant d'optimiser encore la chimie de surface et la rigidité mécanique de la liaison entre les particules d'or et l'origami. Par exemple, raccourcir

la séquence polyA au bout des bras des origamis tout en allongeant légèrement l'ADN polyT en surface des particules d'or mais sans atteindre les 19 bases utilisées dans cette thèse. Allonger la séquence polyT permettrait d'augmenter la stabilité des dimères mais diminuerait le couplage plasmon : afin de limiter cet effet, et sans utiliser des particules plus grosses (qui diminueraient la stabilité), il serait possible de jouer sur la forme des particules. Je vous présente ci-dessous des données préliminaires que j'ai obtenues avec des dimères de nanocubes d'or assemblés sur mes origamis dynamique.

Si nous arrivons à optimiser le design de ces nanostructures hybrides, afin de corrélérer plus efficacement la morphologie des origamis et les mesures de couplage plasmon, la perspective principale de cette étude est évidemment d'utiliser le protocole colorimétrique de suivi des dimères afin de détecter, sur une simple caméra couleur, l'interaction spécifique de la nanostructure avec un unique analyte spécifique. Il serait alors possible d'étudier la cinétique, la spécificité et la sensibilité de cette détection optique.

De plus, il serait possible de programmer des mécanismes d'interaction de plus en plus complexes dans ces nanostructures hybrides, en jouant sur la flexibilité de l'ADN. Par exemple, au cours de mon séjour à Montpellier, j'ai également conçu des sites actifs plus complexes basés sur le fonctionnement de portes logiques "AND" permettant la détection de la présence simultanée de deux analytes spécifiques. Ils n'ont pas été présentés dans cette thèse car ils restent à un état très préliminaire. En effet nous n'avons pour l'instant validé que la synthèse des origamis seuls. Je n'ai pas pu réaliser une étude du fonctionnement du site actif par analyse d'images TEM, par FRET ou avec des dimères hybrides.

## 6.2 Analyse optique de dimères à temps court

Au cours de sa thèse, Laurent Lermusiaux avait remarqué que certains dimères semblaient se mettre à "clignoter" dans certaines conditions [43]. Il avait alors réalisé une analyse spectrale et colorimétrique de dimères de 40 nm reliés par simple brin d'ADN comportant un hairpin. Au début de ma thèse, quand les origamis d'ADN étaient en phase de finalisation dans l'équipe de Gaëtan Bellot, j'ai synthétisé des dimères reliés par un simple brin d'ADN comportant un hairpin avec des particules de 60 nm afin d'augmenter la section efficace de diffusion tout en exploitant le protocole développé par Laurent Lermusiaux dans sa thèse [43]. Cette augmentation de la taille des particules permet d'améliorer le rapport signal à bruit et ainsi de pouvoir diminuer le temps d'acquisition afin de détecter des fluctuations plus rapides.

La figure 6.1 montre une représentation schématique d'un dimère dans ces deux conformations opposées : fermé, grâce à la formation de l'hairpin et ouvert, dans le cas contraire. En bas de cette figure vous pouvez voir, en champ sombre, un dimère à plusieurs instants d'une vidéo d'une quinzaine de seconde. On observe alors que le dimère oscille entre le vert, le jaune et le rouge traduisant un changement rapide et stochastique de la distance entre les particules.

J'ai alors également réalisé des séries de spectres avec un temps d'acquisition de 200 ms (voir figure 6.2). A gauche de la figure 6.2, vous pouvez voir deux spectres du même dimère dans des conformations opposées lors d'un clignotement. Le spectre bleu a pour longueur d'onde de résonance identifiée 560 nm et 640 nm pour le rouge. On remarque

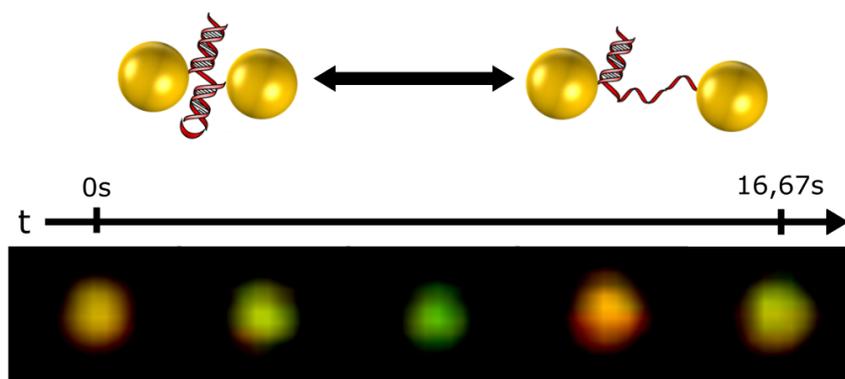


Figure 6.1: Représentation schématique des deux conformations adoptées par un dimère avec *ssHairpin* (en haut) et évolution temporelle de la tâche d'Airy d'un dimère unique enregistrée par une caméra CCD couleur et montrant le clignotement d'un dimère de particules de 60nm de diamètre (en bas)

aussi que le spectre bleu présente un léger épaulement sur la partie rouge de son spectre ce qui semble indiquer, qu'au cours de l'acquisition, plusieurs états ont été enregistrés. Il serait alors intéressant de diminuer encore le temps d'acquisition. La figure de droite de 6.2 montre l'évolution temporelle du spectre d'un dimère pendant environ 1 min (temps d'acquisition pour chaque spectre 200 ms). On remarque que le spectre passe à de nombreuses reprises entre les deux extrêmes et ne reste pas beaucoup plus que 3 itérations dans la même conformation. Le dimère semble donc métastable avec une dynamique relativement rapide.

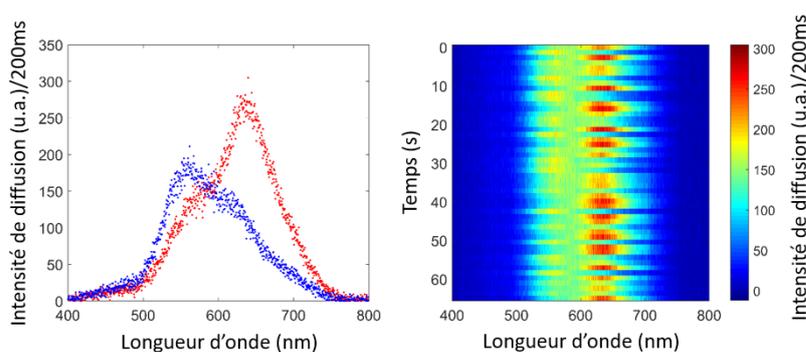


Figure 6.2: Exemple de deux spectres de diffusion d'un dimère de particules de 60 nm de diamètre "clignotant" (à gauche) et évolution temporelle du spectre de diffusion d'un dimère clignotant (à droite)

A partir des films acquis avec la caméra couleur, j'ai également pu réaliser une analyse colorimétrique d'un de ces dimères (voir figure 6.3). J'ai pour cela étudié le rapport  $\frac{R - G}{R + G}$  où  $R$  correspond à la moyenne pour la tâche d'Airy du dimère de la valeur  $R$  du signal RGB et  $G$  respectivement pour la valeur  $G$ . La figure 6.3 présente les variations de cette valeur

dans le temps à différentes forces ioniques pour un unique dimère. On constate ainsi, qu'à faible force ionique (5mM de NaCl), le vert domine (distance interparticule importante) tandis qu'au contraire, à haute force ionique (1M de NaCl), le rouge domine signifiant une réduction de la distance entre les particules. A 50 mM de NaCl, on observe une forte fluctuation rapide du rapport des signaux  $R$  et  $G$ . Ainsi, avec l'analyse colorimétrique de la vidéo, il semble possible de détecter le clignotement d'un dimère de 60 nm.

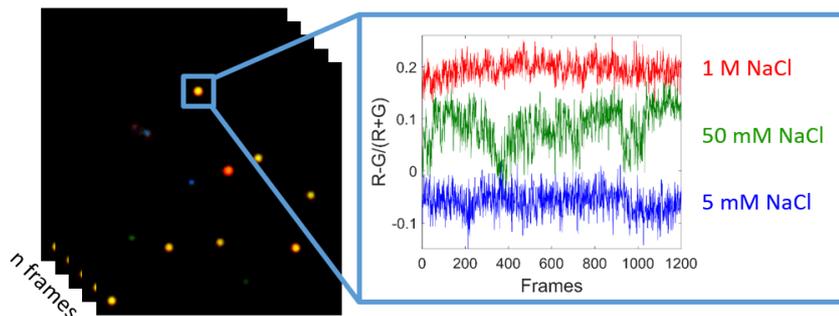


Figure 6.3: Visualisation des dimères de cubes Y sur la caméra couleur CCD

J'ai eu l'occasion d'observer ce type de clignotement sur certains dimères de nanoparticules d'or de 40 nm assemblés sur des origamis d'ADN. Surtout, il serait intéressant d'exploiter ces mesures pas uniquement pour des systèmes métastables mais aussi pour pouvoir analyser le paysage énergétique de dimères hybrides d'une manière similaire à l'approche développée par l'équipe de B. M. Reinhard [12] et introduite dans le chapitre 1. Je n'ai pas eu le temps d'essayer d'optimiser le temps d'acquisition sur la caméra couleur afin de vérifier si le rapport signal/bruit serait suffisant pour abaisser la résolution temporelle sous la dizaine de millisecondes.

### 6.3 Dimères de nanocubes d'or assemblés sur origamis d'ADN

Comme évoqué dans la conclusion ci-dessus, il serait intéressant d'optimiser le dimère hybrides afin de maximiser le couplage plasmon sans augmenter sensiblement la taille des particules et donc de jouer plutôt sur leur forme. Pour les besoins d'un autre projet porté par Jeanne Heintz, une doctorante de l'Institut Langevin, notre équipe utilise des nanocubes d'or fournis également par Sylvie Marguet du CEA Saclay. Pour vérifier que ces nanocubes peuvent être assemblés sur des origamis d'ADN, nous les avons testés sur ceux que j'ai développé à base d'i-motifs.

J'ai donc utilisé le protocole décrit au chapitre 2 pour assembler des nanocubes de 40 nm sur des origamis i-motifs polyT décrits dans le chapitre 5. La figure 6.4b montre des images de microscopie électronique à transmission de ces structures avec une coloration négative. On observe alors la bonne formation de ces dimères de nanocubes.

Par la suite j'ai immobilisé ces dimères de nanocubes dans une chambre microfluidique afin de réaliser les mêmes études optiques qu'avec les dimères à base de sphères. La figure

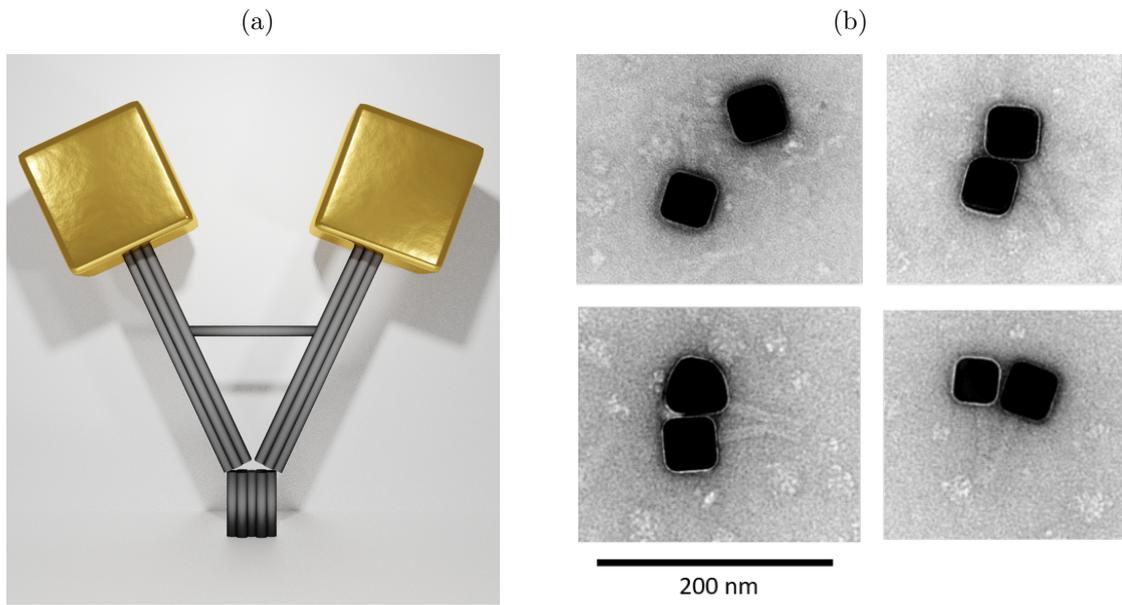


Figure 6.4: Représentation 3D d'un dimère origami de nanocubes d'or (a), images de microscopie électronique à transmission avec coloration négative ces dimères avec un origami i-motif polyT (b) (ADN *19T*), *XPEG*

6.5 est une image en champ sombre de cet échantillon visualisé sur la caméra couleur. On peut alors constater une plus grande variation de couleurs au sein de l'échantillon, même en comparaison avec des sphères commerciales de 40nm. En effet, au cours de cette thèse nous avons vu comment l'orientation relative des particules au sein de dimères pouvait modifier la longueur d'onde de résonance : il n'est donc pas surprenant qu'avec des cubes, l'échantillon présente une grande dispersion de couleurs.

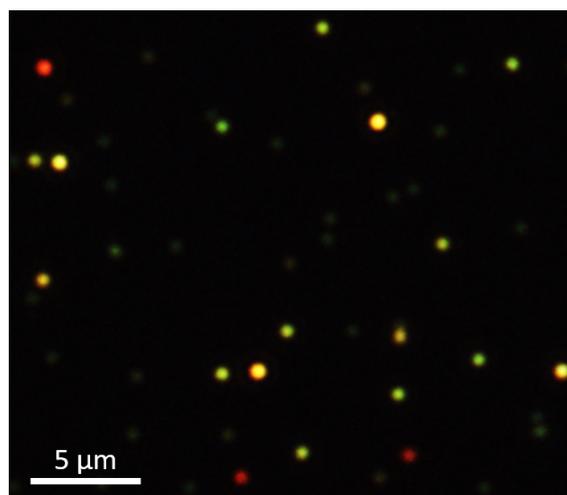


Figure 6.5: Visualisation des dimères de cubes Y sur la caméra couleur CCD (**i-motif polyT**, *8T*, *XPEG*)

La figure 6.6 montre les longueurs d'onde de résonance pour ces dimères de nanocubes à différentes forces ioniques et valeurs de pH. Tout d'abord, nous pouvons remarquer que la dispersion de couleurs observée sur la caméra se retrouve bien dans les distributions. Il existe alors deux groupes distincts de dimères : en-dessous et au-dessus de 600 nm. A faible force ionique ( $I=25\text{mM}$ ) et  $\text{pH}=7,6$ , la valeur médiane de longueur d'onde est de 567 nm, l'espace interquartile s'étend de 562 à 576,5 nm et les moustaches de 557 à 587 nm. Ainsi l'espace interquartile est multiplié par 7 et celui des moustaches par plus de 3 par rapport aux distributions avec les nanosphères érodées chimiquement. La seconde population est centrée sur 630 nm et correspond à 13% de l'échantillon. L'échantillon est ensuite passé à  $\text{pH}=6$ . La longueur d'onde médiane est alors décalée à 578 nm, l'espace interquartile entre 575 et 591 nm et les moustaches entre 566 et 609,5 nm. La seconde population se décale elle aussi pour se centrer autour de 640 nm. L'échantillon est ensuite remis à  $\text{pH}=7,6$  toujours à faible force ionique. La valeur de longueur d'onde médiane est alors de 573 nm, l'espace interquartile compris entre 570 et 582 nm et les moustaches entre 557 et 596,5 nm. On observe alors un hystérésis d'un peu plus de 5 nm. La seconde population subit également un décalage vers le bleu avec un léger hystérésis et se centre autour de 635 nm. Finalement la force ionique est augmentée jusqu'à 455 mM. On observe alors un très léger décalage vers le bleu de la distribution inférieure au nanomètre pour la valeur médiane. On observe donc un comportement très différent de ces dimères de nanocubes par rapport aux nanosphères : ils semblent bien plus sensibles à des modulations de pH qu'à des modulations de force ionique.

La figure 6.7 présente les distributions de variation de la longueur d'onde de résonance à l'échelle du dimère unique ( $\Delta\lambda$ ). Dans un premier temps, on peut constater, qu'à l'inverse des distributions de longueurs d'onde, celles du  $\Delta\lambda$  sont relativement fines et comparable à celles des sphères. Cela signifie que toutes les structures subissent les mêmes variations de longueurs d'onde de résonance même celles de la seconde population. La diminution du pH entraîne un décalage vers le rouge de 13 nm ; et sa ré-augmentation seulement un décalage de 6 nm vers le bleu. Cela traduit bien l'hystérésis observé. Cette variation de longueur d'onde en fonction du pH serait en parfait accord avec le fonctionnement de l'origami i-motif. Elle est même bien plus importante qu'avec les sphères où elle n'était que de quelques nanomètres. Au contraire l'augmentation de force ionique n'entraîne aucun décalage de la distribution. Ce comportement est donc très différent des dimères sphères qui se décalaient de presque 10 nm pour la même variation de  $I$ .

Nous avons alors décidé de synthétiser des dimères de nanocubes avec les deux origamis contrôlés du chapitre 5 : la référence simple-brin et la référence avec hairpin (voir chapitre 5). La figure 6.8a montre les variations de la valeur médiane de longueur d'onde des différents échantillons en fonction du pH et de la force ionique ainsi que l'écart-type des distributions. On observe alors que, malgré des valeurs de départ différentes (probablement dues à l'arrondissement progressif des nanocubes), le comportement des trois échantillons semble identique : une augmentation de la longueur d'onde lors de la diminution de pH, un léger hystérésis lors du retour à pH 7.6 ; et aucune variation lors de l'augmentation de la force ionique.

La figure 6.8b montre les  $\Delta\lambda$  pour les différents échantillons lors de la diminution de pH (à gauche) et l'augmentation de la force ionique (à droite). Lors de la diminution de

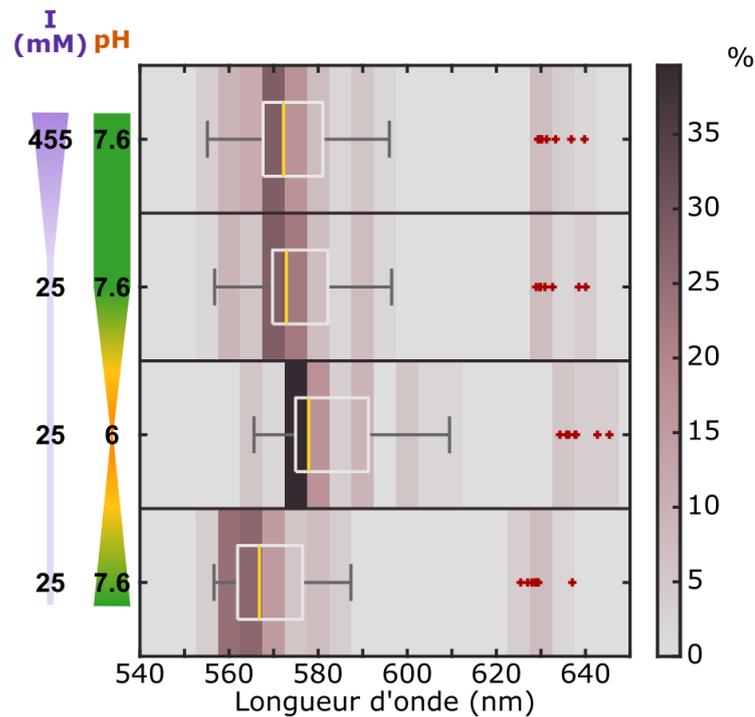


Figure 6.6: Distributions des longueur d'onde de résonance de dimères **i-motif polyT** avec nanocubes d'or en fonction de la force ionique et du pH, ADN : *poly8T*, ligand : *XPEG* (taille de l'échantillon 53 dimères) (sens chronologique de bas en haut)

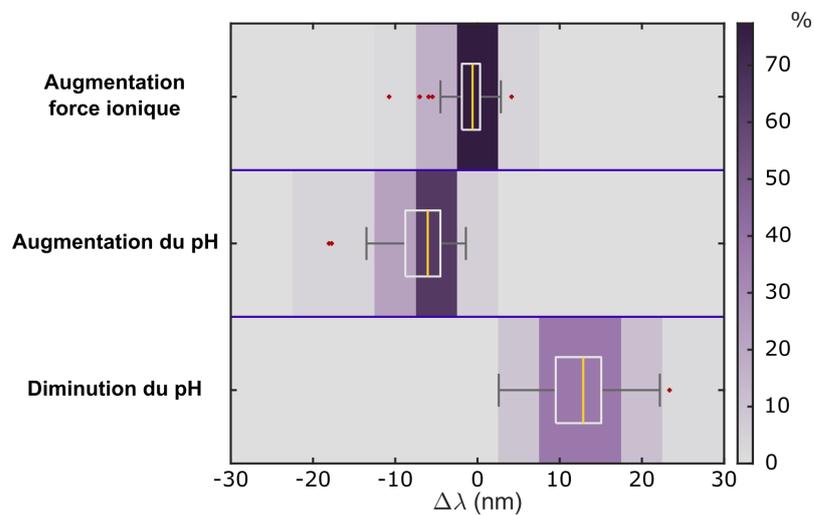


Figure 6.7: Variation de la longueur d'onde de résonance ( $\Delta\lambda$ ) à l'échelle du dimère unique pour des dimères **i-motif polyT** nanocubes d'or (même échantillon que 6.6) (sens chronologique de bas en haut)

pH, les dimères i-motifs semblent se décaler légèrement plus vers le rouge que les deux échantillons contrôles. Cependant cette différence reste faible et il est donc difficile de con-

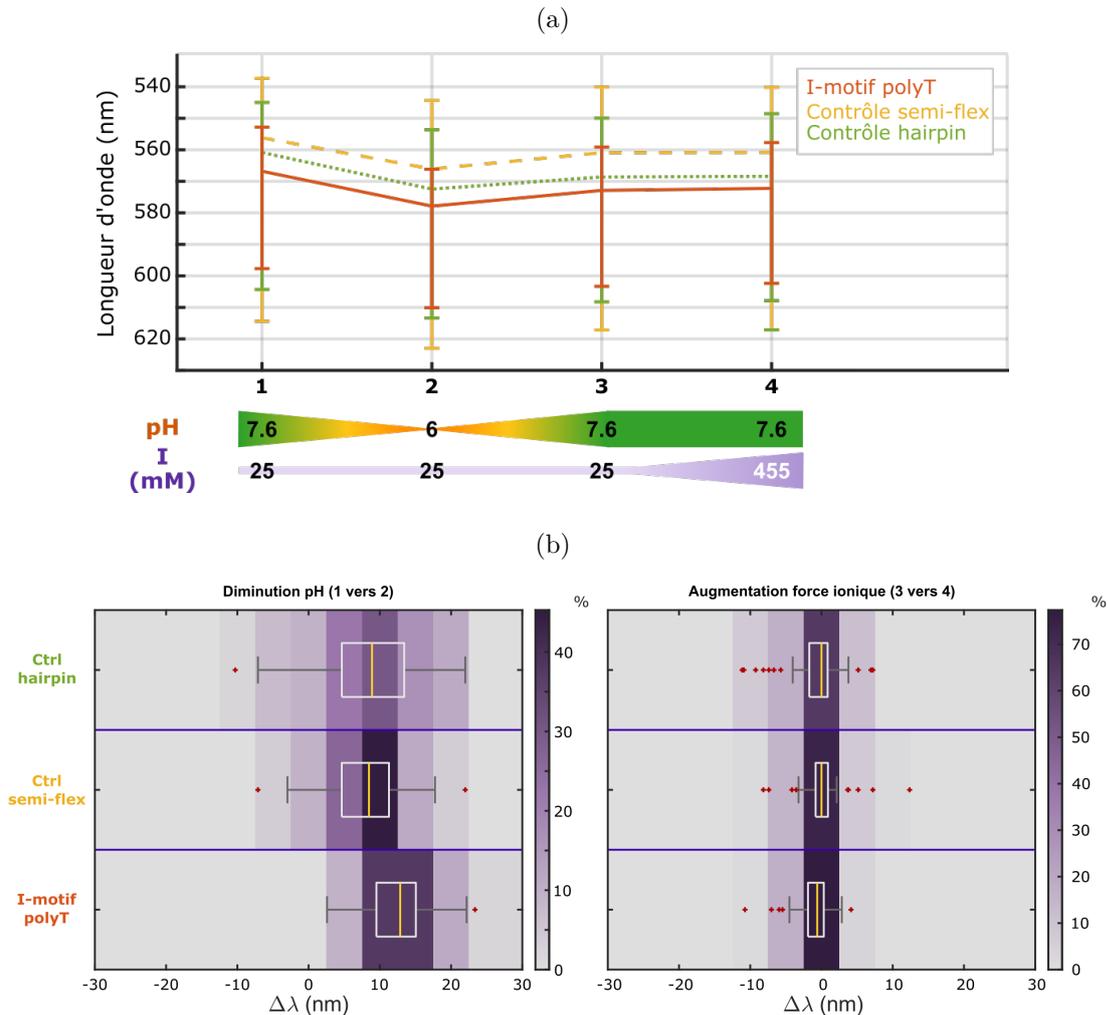


Figure 6.8: Courbe représentant l'évolution de la valeur médiane de longueur d'onde de résonance avec l'écart type des distributions montrées à la figure 6.6 correspondant aux dimères **i-motif polyT** avec nanocubes et pour les deux dimères contrôles : **contrôle semi-flex** et **contrôle hairpin** ( particules : nanocubes couverts de *poly8T* trithiol, *XPEG*)(a). Distributions des variations de longueur d'onde à l'échelle des dimères uniques ( $\Delta\lambda$ ) entre le passage d'un pH 7.6 à 6 à 25mM (à gauche) et une augmentation de force ionique de 25mM à 455mM à pH 7.6 (à droite)

clure, en l'état, sur l'impact de l'i-motif dans ce comportement. Lors de l'augmentation de la force ionique, les trois échantillons ne subissent aucun décalage. Comme déjà précisé ce comportement est totalement différent de celui observé les sphères.

Ainsi il semblerait que les dimères de nanocubes présentent des comportements très différents des dimères de sphères : une forte sensibilité au pH mais pas à la force ionique. Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude de ces nouveaux dimères pour tenter de comprendre leur fonctionnement et de comprendre l'origine de cette différence avec des sphères. Ils pourraient, par exemple, être intéressants pour les origamis du chapitre 4 où la forte sensibilité à la force ionique était problématique. Il faudrait, tout d'abord, être ca-

pable d'observer optiquement la différence de conformation de l'origami directement dans les distributions de fréquences de résonance de dimères de nanocubes. En tout cas, ces premiers résultats montrent bien que la forme des particules est un nouveau paramètre permettant d'influer sur la morphologie de dimères assemblés autour d'origamis d'ADN.



## **Annexes**



## Annexe A

# Visuel Cadnano de l'origami d'ADN

La figure [A.1](#) présente le visuel de l'origami d'ADN en forme de Y utilisé tout au long de cette thèse. Il fut conçu et synthétisé à Montpellier au CBS par Gaëtan Bellot et son équipe.

Sur ce visuel, il est possible de visualiser les deux bras, correspondant aux *Helix Bundle* numérotés du 0 jusqu'à 17 pour le premier, et de 18 à 35 pour le second. Les doubles brins numérotés 36 et 37 correspondent à la partie centrale de l'origami modulant la distance entre les deux bras. On peut remarquer également que dans chaque bras des *Helix Bundle* se décomposent en deux parties correspondant au pied et aux bras : du n°6 au n°17 et du n°18 au n°29. Les autres *Helix Bundle* sont quand à elles continues permettant ainsi la jonction entre le pied et les bras. Cette coupure permet alors la mobilité des bras et ainsi la possibilité de leur écartement.

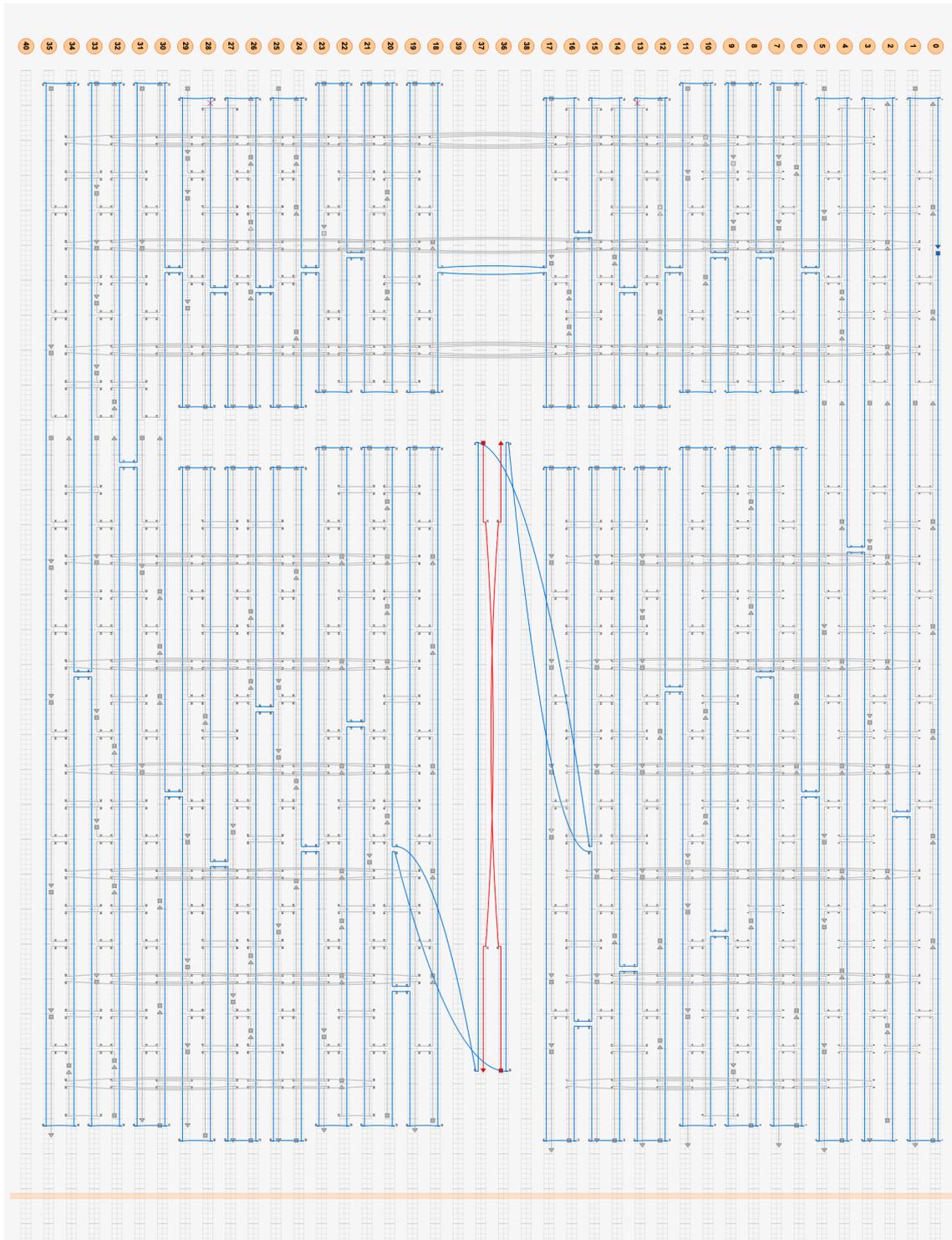


Figure A.1: Visuel Cadnano de l'origami d'ADN en forme de Y

# Bibliography

- [1] X. H. HUANG, I. H. EL-SAYED, W. QIAN & M. A. EL-SAYED; «Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods»; *J. Am. Chem. Soc.* **128**, p. 2115–2120 (2006).
- [2] D. BOYER, P. TAMARAT, A. MAALI, B. LOUNIS & M. ORRIT; «Photothermal imaging of nanometer-sized metal particles among scatterers»; *Science* **297**, p. 1160–1163 (2002). ISSN 0036-8075.
- [3] D. LASNE, G. A. BLAB, S. BERCIAUD, M. HEINE, L. GROG, D. CHOQUET, L. COGNET & B. LOUNIS; «Single nanoparticle photothermal tracking (SNaPT) of 5-nm gold beads in live cells»; *Biophysical Journal* **91**, p. 4598–4604 (2006).
- [4] Y. W. WANG, X. Y. XIE, X. D. WANG, G. KU, K. L. GILL, D. P. O’NEAL, G. STOICA & L. V. WANG; «Photoacoustic tomography of a nanoshell contrast agent in the in vivo rat brain»; *Nano Lett.* **4**, p. 1689–1692 (2004).
- [5] D. P. O’NEAL, L. R. HIRSCH, N. J. HALAS, J. D. PAYNE & J. L. WEST; «Photothermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles»; *Cancer Lett.* **209**, p. 171–176 (2004).
- [6] C. A. MIRKIN, R. L. LETSINGER, R. C. MUCIC & J. J. STORHOFF; «A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials»; *Nature* **382**, p. 607–609 (1996). ISSN 1476-4687. <https://www.nature.com/articles/382607a0>; number: 6592 Publisher: Nature Publishing Group.
- [7] G. RASCHKE, S. KOWARIK, T. FRANZL, C. SÖNNICHSEN, T. A. KLAR, J. FELDMANN, A. NICHTL & K. KÜRZINGER; «Biomolecular Recognition Based on Single Gold Nanoparticle Light Scattering»; *Nano Letters* **3**, p. 935–938 (2003). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/nl1034223+>; publisher: American Chemical Society.
- [8] L. LERMUSIAUX, V. MAILLARD & S. BIDAULT; «Widefield Spectral Monitoring of Nanometer Distance Changes in DNA-Templated Plasmon Rulers»; *ACS Nano* **9**, p. 978–990 (2015). ISSN 1936-0851. <https://doi.org/10.1021/nn506947g>; publisher: American Chemical Society.
- [9] C. SÖNNICHSEN, B. M. REINHARD, J. LIPHARDT & A. P. ALIVISATOS; «A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles»; *Nature Biotechnology* **23**, p. 741–745 (2005). ISSN 1546-1696. <https://www.nature.com/articles/nbt1100>; number: 6 Publisher: Nature Publishing Group.

- [10] B. M. REINHARD, M. SIU, H. AGARWAL, A. P. ALIVISATOS & J. LIPHARDT; «Calibration of Dynamic Molecular Rulers Based on Plasmon Coupling between Gold Nanoparticles»; *Nano Letters* **5**, p. 2246–2252 (2005). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/nl051592s>; publisher: American Chemical Society.
- [11] M. P. BUSSON, B. ROLLY, B. STOUT, N. BONOD, E. LARQUET, A. POLMAN & S. BIDAULT; «Optical and Topological Characterization of Gold Nanoparticle Dimers Linked by a Single DNA Double Strand»; *Nano Letters* **11**, p. 5060–5065 (2011). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/nl2032052>; publisher: American Chemical Society.
- [12] T. CHEN, Y. HONG & B. M. REINHARD; «Probing DNA Stiffness through Optical Fluctuation Analysis of Plasmon Rulers»; *Nano Letters* **15**, p. 5349–5357 (2015). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b01725>; publisher: American Chemical Society.
- [13] S. E. LEE, Q. CHEN, R. BHAT, S. PETKIEWICZ, J. M. SMITH, V. E. FERRY, A. L. CORREIA, A. P. ALIVISATOS & M. J. BISSELL; «Reversible Aptamer-Au Plasmon Rulers for Secreted Single Molecules»; *Nano Letters* **15**, p. 4564–4570 (2015). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b01161>; publisher: American Chemical Society.
- [14] P. W. K. ROTHEMUND; «Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns»; *Nature* **440**, p. 297–302 (2006). ISSN 1476-4687. <https://www.nature.com/articles/nature04586>; number: 7082 Publisher: Nature Publishing Group.
- [15] H. DIETZ, S. M. DOUGLAS & W. M. SHIH; «Folding DNA into Twisted and Curved Nanoscale Shapes»; *Science* **325**, p. 725–730 (2009). ISSN 0036-8075, 1095-9203. <https://science.sciencemag.org/content/325/5941/725>; publisher: American Association for the Advancement of Science Section: Report.
- [16] S. M. DOUGLAS, H. DIETZ, T. LIEDL, B. HÖGBERG, F. GRAF & W. M. SHIH; «Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes»; *Nature* **459**, p. 414–418 (2009). ISSN 1476-4687. <https://www.nature.com/articles/nature08016>; number: 7245 Publisher: Nature Publishing Group.
- [17] E. S. ANDERSEN, M. DONG, M. M. NIELSEN, K. JAHN, R. SUBRAMANI, W. MAMDOUH, M. M. GOLAS, B. SANDER, H. STARK, C. L. P. OLIVEIRA, J. S. PEDERSEN, V. BIRKEDAL, F. BESENBACHER, K. V. GOTHELF & J. KJEMS; «Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid»; *Nature* **459**, p. 73–76 (2009). ISSN 1476-4687. <https://www.nature.com/articles/nature07971>; number: 7243 Publisher: Nature Publishing Group.
- [18] A. KUZUYA & M. KOMIYAMA; «Design and construction of a box-shaped 3D-DNA origami»; *Chemical Communications* **0**, p. 4182–4184 (2009). <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2009/cc/b907800b>; publisher: Royal Society of Chemistry.
- [19] Y. KE, J. SHARMA, M. LIU, K. JAHN, Y. LIU & H. YAN; «Scaffolded DNA Origami of a DNA Tetrahedron Molecular Container»; *Nano Letters* **9**, p. 2445–

- 2447 (2009). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/nl901165f>; publisher: American Chemical Society.
- [20] S. TYAGI & F. R. KRAMER; «Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization»; *Nature Biotechnology* **14**, p. 303–308 (1996). ISSN 1546-1696. <https://www.nature.com/articles/nbt0396-303>; number: 3 Publisher: Nature Publishing Group.
- [21] B. YURKE, A. J. TURBERFIELD, A. P. MILLS, F. C. SIMMEL & J. L. NEUMANN; «A DNA-fuelled molecular machine made of DNA»; *Nature* **406**, p. 605–608 (2000). ISSN 1476-4687. <https://www.nature.com/articles/35020524>; number: 6796 Publisher: Nature Publishing Group.
- [22] I. V. NESTEROVA, J. R. BRISCOE & E. E. NESTEROV; «Rational Control of Folding Cooperativity in DNA Quadruplexes»; *Journal of the American Chemical Society* **137**, p. 11 234–11 237 (2015).
- [23] R. P. FAHLMAN & D. SEN; «DNA Conformational Switches as Sensitive Electronic Sensors of Analytes»; *Journal of the American Chemical Society* **124**, p. 4610–4616 (2002). ISSN 0002-7863. <https://doi.org/10.1021/ja012618u>; publisher: American Chemical Society.
- [24] A. KUZYK, R. SCHREIBER, H. ZHANG, A. O. GOVOROV, T. LIEDL & N. LIU; «Reconfigurable 3D plasmonic metamolecules»; *Nature Materials* **13**, p. 862–866 (2014). ISSN 1476-4660. <https://www.nature.com/articles/nmat4031>; number: 9 Publisher: Nature Publishing Group.
- [25] Y. KE, T. MEYER, W. M. SHIH & G. BELLOT; «Regulation at a distance of biomolecular interactions using a DNA origami nanoactuator»; *Nature Communications* **7**, p. 10 935 (2016). ISSN 2041-1723. <https://www.nature.com/articles/ncomms10935>; number: 1 Publisher: Nature Publishing Group.
- [26] C. ZHOU, X. DUAN & N. LIU; «DNA-Nanotechnology-Enabled Chiral Plasmonics: From Static to Dynamic»; *Acc. Chem. Res.* **50**, p. 2906–2914 (2017).
- [27] P. B. JOHNSON & R. W. CHRISTY; «Optical Constants of the Noble Metals»; *Physical Review B* **6**, p. 4370–4379 (1972). <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevB.6.4370>; publisher: American Physical Society.
- [28] R. L. OLMON, B. SLOVICK, T. W. JOHNSON, D. SHELTON, S.-H. OH, G. D. BOREMAN & M. B. RASCHKE; «Optical dielectric function of gold»; *Physical Review B* **86**, p. 235 147 (2012). <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevB.86.235147>; publisher: American Physical Society.
- [29] A. WOKAUN, J. P. GORDON & P. F. LIAO; «Radiation Damping in Surface-Enhanced Raman Scattering»; *Phys. Rev. Lett.* **48**, p. 957–960 (1982).
- [30] M. RYCENGA, C. M. COBLEY, J. ZENG, W. LI, C. H. MORAN, Q. ZHANG, D. QIN & Y. XIA; «Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications»; *Chemical Reviews* **111**, p. 3669–3712 (2011). ISSN 0009-2665. <https://doi.org/10.1021/cr100275d>; publisher: American Chemical Society.

- [31] C. F. BOHREN & D. R. HUFFMAN; *Absorption and Scattering of Light by Small Particles* (John Wiley & Sons) (2008); ISBN 978-3-527-61816-3; google-Books-ID: ib3EMXXIRXUC.
- [32] W. RECHBERGER, A. HOHENAU, A. LEITNER, J. R. KRENN, B. LAMPRECHT & F. R. AUSSENEK; «Optical properties of two interacting gold nanoparticles»; *Optics Communications* **220**, p. 137–141 (2003). ISSN 0030-4018. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0030401803013579>.
- [33] P. NORDLANDER, C. OUBRE, E. PRODAN, K. LI & M. I. STOCKMAN; «Plasmon Hybridization in Nanoparticle Dimers»; *Nano Letters* **4**, p. 899–903 (2004). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/nl049681c>; publisher: American Chemical Society.
- [34] L. WU & B. M. REINHARD; «Probing subdiffraction limit separations with plasmon coupling microscopy: concepts and applications»; *Chemical Society Reviews* **43**, p. 3884–3897 (2014). ISSN 1460-4744. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/cs/c3cs60340g>; publisher: The Royal Society of Chemistry.
- [35] P. K. JAIN, W. HUANG & M. A. EL-SAYED; «On the Universal Scaling Behavior of the Distance Decay of Plasmon Coupling in Metal Nanoparticle Pairs: A Plasmon Ruler Equation»; *Nano Letters* **7**, p. 2080–2088 (2007). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/nl071008a>; publisher: American Chemical Society.
- [36] K.-H. SU, Q.-H. WEI, X. ZHANG, J. J. MOCK, D. R. SMITH & S. SCHULTZ; «Interparticle Coupling Effects on Plasmon Resonances of Nanogold Particles»; *Nano Letters* **3**, p. 1087–1090 (2003). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/nl034197f>; publisher: American Chemical Society.
- [37] L. GUNNARSSON, T. RINDZEVICIUS, J. PRIKULIS, B. KASEMO, M. KÄLL, S. ZOU & G. C. SCHATZ; «Confined Plasmons in Nanofabricated Single Silver Particle Pairs: Experimental Observations of Strong Interparticle Interactions»; *The Journal of Physical Chemistry B* **109**, p. 1079–1087 (2005). ISSN 1520-6106. <https://doi.org/10.1021/jp049084e>; publisher: American Chemical Society.
- [38] P. K. JAIN & M. A. EL-SAYED; «Plasmonic coupling in noble metal nanostructures»; *Chemical Physics Letters* **487**, p. 153–164 (2010). ISSN 0009-2614. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009261410001193>.
- [39] B. ROLLY, B. STOUT & N. BONOD; «Metallic dimers: When bonding transverse modes shine light»; *Physical Review B* **84**, p. 125420 (2011). <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevB.84.125420>; publisher: American Physical Society.
- [40] S. Y. SUCK, S. COLLIN, N. BARDOU, Y. D. WILDE & G. TESSIER; «Imaging the three-dimensional scattering pattern of plasmonic nanodisk chains by digital heterodyne holography»; *Optics Letters* **36**, p. 849–851 (2011). ISSN 1539-4794. <https://www.osapublishing.org/ol/abstract.cfm?uri=ol-36-6-849>; publisher: Optical Society of America.

- [41] H.-X. XU; «A new method by extending Mie theory to calculate local field in outside/inside of aggregates of arbitrary spheres»; *Physics Letters A* **312**, p. 411–419 (2003). ISSN 0375-9601. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037596010300687X>.
- [42] P. K. JAIN & M. A. EL-SAYED; «Universal Scaling of Plasmon Coupling in Metal Nanostructures: Extension from Particle Pairs to Nanoshells»; *Nano Letters* **7**, p. 2854–2858 (2007). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/nl071496m>; publisher: American Chemical Society.
- [43] L. LERMUSIAUX; *Nanostructures plasmoniques dynamiques assemblées sur ADN*; These de doctorat; Paris 6, Institut Langevin Ondes et Images, ESPCI Paris-Tech, CNRS UMR 7587, Inserm U979, EDPIF (2015). <http://www.theses.fr/2015PA066007>.
- [44] J. A. SCHOLL, A. GARCÍA-ETXARRI, A. L. KOH & J. A. DIONNE; «Observation of Quantum Tunneling between Two Plasmonic Nanoparticles»; *Nano Letters* **13**, p. 564–569 (2013). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/nl304078v>; publisher: American Chemical Society.
- [45] H. CHA, J. H. YOON & S. YOON; «Probing Quantum Plasmon Coupling Using Gold Nanoparticle Dimers with Tunable Interparticle Distances Down to the Subnanometer Range»; *ACS Nano* **8**, p. 8554–8563 (2014). ISSN 1936-0851. <https://doi.org/10.1021/nn5032438>; publisher: American Chemical Society.
- [46] J. CHENG, G. LE SAUX, J. GAO, T. BUFFETEAU, Y. BATTIE, P. BAROIS, V. PONSINET, M.-H. DELVILLE, O. ERSEN, E. POUGET & R. ODA; «GoldHelix: Gold Nanoparticles Forming 3D Helical Superstructures with Controlled Morphology and Strong Chiroptical Property»; *ACS Nano* **11**, p. 3806–3818 (2017). ISSN 1936-0851. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b08723>; publisher: American Chemical Society.
- [47] X. LAN, X. LU, C. SHEN, Y. KE, W. NI & Q. WANG; «Au Nanorod Helical Superstructures with Designed Chirality»; *Journal of the American Chemical Society* **137**, p. 457–462 (2015). ISSN 0002-7863. <https://doi.org/10.1021/ja511333q>; publisher: American Chemical Society.
- [48] R. SCHREIBER, N. LUONG, Z. FAN, A. KUZYK, P. C. NICKELS, T. ZHANG, D. M. SMITH, B. YURKE, W. KUANG, A. O. GOVOROV & T. LIEDL; «Chiral plasmonic DNA nanostructures with switchable circular dichroism»; *Nature Communications* **4**, p. 2948 (2013). ISSN 2041-1723. <https://www.nature.com/articles/ncomms3948>; number: 1 Publisher: Nature Publishing Group.
- [49] A. KUZYK, R. SCHREIBER, Z. FAN, G. PARDATSCHER, E.-M. ROLLER, A. HÖGELE, F. C. SIMMEL, A. O. GOVOROV & T. LIEDL; «DNA-based self-assembly of chiral plasmonic nanostructures with tailored optical response»; *Nature* **483**, p. 311–314 (2012). ISSN 1476-4687. <https://www.nature.com/articles/nature10889>; number: 7389 Publisher: Nature Publishing Group.

- [50] M. J. URBAN, P. K. DUTTA, P. WANG, X. DUAN, X. SHEN, B. DING, Y. KE & N. LIU; «Plasmonic Toroidal Metamolecules Assembled by DNA Origami»; *Journal of the American Chemical Society* **138**, p. 5495–5498 (2016). ISSN 0002-7863. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b00958>; publisher: American Chemical Society.
- [51] S. N. SHEIKHOESLAMI, A. GARCÍA-ETXARRI & J. A. DIONNE; «Controlling the Interplay of Electric and Magnetic Modes via Fano-like Plasmon Resonances»; *Nano Letters* **11**, p. 3927–3934 (2011). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/nl202143j>; publisher: American Chemical Society.
- [52] E.-M. ROLLER, L. K. KHORASHAD, M. FEDORUK, R. SCHREIBER, A. O. GOVOROV & T. LIEDL; «DNA-Assembled Nanoparticle Rings Exhibit Electric and Magnetic Resonances at Visible Frequencies»; *Nano Letters* **15**, p. 1368–1373 (2015). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/nl5046473>; publisher: American Chemical Society.
- [53] V. PONSINET, P. BAROIS, S. M. GALI, P. RICHETTI, J. B. SALMON, A. VALLECCHI, M. ALBANI, A. LE BEULZE, S. GOMEZ-GRANA, E. DUGUET, S. MORNET & M. TREGUER-DELAPIERRE; «Resonant isotropic optical magnetism of plasmonic nanoclusters in visible light»; *Physical Review B* **92**, p. 220414 (2015). <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevB.92.220414>; publisher: American Physical Society.
- [54] V. MANY, R. DÉZERT, E. DUGUET, A. BARON, V. JANGID, V. PONSINET, S. RAVAINÉ, P. RICHETTI, P. BAROIS & M. TRÉGUER-DELAPIERRE; «High optical magnetism of dodecahedral plasmonic meta-atoms»; *Nanophotonics* **8**, p. 549–558 (2019). ISSN 2192-8614. <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/nanoph-2018-0175/html>; publisher: De Gruyter Section: Nanophotonics.
- [55] W. YE, M. GÖTZ, S. CELIKSOY, L. TÜTING, C. RATZKE, J. PRASAD, J. RICKEN, S. V. WEGNER, R. AHJADO-GUZMÁN, T. HUGEL & C. SÖNNICHSEN; «Conformational Dynamics of a Single Protein Monitored for 24 h at Video Rate»; *Nano Letters* **18**, p. 6633–6637 (2018). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b03342>; publisher: American Chemical Society.
- [56] R. GRISEL, K.-J. WESTSTRATE, A. GLUHOI & B. E. NIEUWENHUYS; «Catalysis by Gold Nanoparticles»; *Gold Bulletin* **35**, p. 39–45 (2002)ISSN 2190-7579.
- [57] R. A. SPERLING & W. J. PARAK; «Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles»; *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **368**, p. 1333–1383 (2010). <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsta.2009.0273>; publisher: Royal Society.
- [58] A. G. KANARAS, F. S. KAMOUNAH, K. SCHAUMBURG, C. J. KIELY & M. BRUST; «Thioalkylated tetraethylene glycol: a new ligand for water soluble monolayer protected gold clusters»; *Chemical Communications* **0**, p. 2294–2295 (2002). <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2002/cc/b207838b>; publisher: Royal Society of Chemistry.

- [59] S. BORSLEY, S. FLOOK & E. R. KAY; «Rapid and simple preparation of remarkably stable binary nanoparticle planet–satellite assemblies»; *Chemical Communications* **51**, p. 7812–7815 (2015). <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/cc/c5cc01543j>; publisher: Royal Society of Chemistry.
- [60] B. V. DERJAGUIN & L. D. LANDAU; «Theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols and of the Adhesion of Strongly Charged Particles in Solutions of Electrolytes»; *Acta Physicochimica U.R.S.S.* **14**, p. 633–662 (1941).
- [61] E. J. W. VERWEY; «Theory of the Stability of Lyophobic Colloids.»; *The Journal of Physical and Colloid Chemistry* **51**, p. 631–636 (1947). ISSN 0092-7023. <https://doi.org/10.1021/j150453a001>; publisher: American Chemical Society.
- [62] H. C. HAMAKER; «The London—van der Waals attraction between spherical particles»; *Physica* **4**, p. 1058–1072 (1937). ISSN 0031-8914. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031891437802037>.
- [63] M. J. VOLD; «The effect of adsorption on the van der waals interaction of spherical colloidal particles»; p. 1–12 (1961). <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/0095852261900575?token=F001E3553140A1A74E80DD2731265522C33954DA4EB21EF9ADF27773E0CEA8774C8D6AD2EE57435CF> iISSN: 0095-8522.
- [64] B. VINCENT; «The van der Waals attraction between colloid particles having adsorbed layers. II. Calculation of interaction curves»; *Journal of Colloid and Interface Science* **42**, p. 270–285 (1973). ISSN 0021-9797. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021979773902907>.
- [65] S. BIGGS & P. MULVANEY; «Measurement of the forces between gold surfaces in water by atomic force microscopy»; *The Journal of Chemical Physics* **100**, p. 8501–8505 (1994). ISSN 0021-9606. <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.466748>; publisher: American Institute of Physics.
- [66] P. D. ASHBY, L. CHEN & C. M. LIEBER; «Probing Intermolecular Forces and Potentials with Magnetic Feedback Chemical Force Microscopy»; *Journal of the American Chemical Society* **122**, p. 9467–9472 (2000). ISSN 0002-7863. <https://doi.org/10.1021/ja0020613>; publisher: American Chemical Society.
- [67] A. KUMAR, S. MANDAL, P. R. SELVAKANNAN, R. PASRICHA, A. B. MANDALE & M. SASTRY; «Investigation into the Interaction between Surface-Bound Alkylamines and Gold Nanoparticles»; *Langmuir* **19**, p. 6277–6282 (2003). ISSN 0743-7463. <https://doi.org/10.1021/la034209c>; publisher: American Chemical Society.
- [68] B. V. DERJAGUIN *Acta Physicochimica U.R.S.S.* **10**, p. 333 (1939).
- [69] R. HOGG, T. W. HEALY & D. W. FUERSTENAU; «Mutual coagulation of colloidal dispersions»; *Transactions of the Faraday Society* **62**, p. 1638–1651 (1966). <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1966/tf/tf9666201638>; publisher: Royal Society of Chemistry.

- [70] R. R. KUMAL, T. E. KARAM & L. H. HABER; «Determination of the Surface Charge Density of Colloidal Gold Nanoparticles Using Second Harmonic Generation»; *The Journal of Physical Chemistry C* **119**, p. 16 200–16 207 (2015). ISSN 1932-7447. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b00568>; publisher: American Chemical Society.
- [71] T. LAAKSONEN, P. AHONEN, C. JOHANS & K. KONTTURI; «Stability and Electrostatics of Mercaptoundecanoic Acid-Capped Gold Nanoparticles with Varying Counterion Size»; *ChemPhysChem* **7**, p. 2143–2149 (2006).
- [72] L. LERMUSIAUX & S. BIDAULT; «Increasing the Morphological Stability of DNA-Templated Nanostructures with Surface Hydrophobicity»; *small* **11**, p. 5696–5704 (2015).
- [73] B. VINCENT, J. EDWARDS, S. EMMETT & A. JONES; «Depletion flocculation in dispersions of sterically-stabilised particles (“soft spheres”)»; *Colloids and Surfaces* **18**, p. 261–281 (1986). ISSN 0166-6622. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166662286803171>.
- [74] G. FRITZ, V. SCHÄDLER, N. WILLENBACHER & N. J. WAGNER; «Electrosteric Stabilization of Colloidal Dispersions»; *Langmuir* **18**, p. 6381–6390 (2002). ISSN 0743-7463. <https://doi.org/10.1021/la015734j>; publisher: American Chemical Society.
- [75] L. A. WIJENAYAKA, M. R. IVANOV, C. M. CHEATUM & A. J. HAES; «Improved Parametrization for Extended Derjaguin, Landau, Verwey, and Overbeek Predictions of Functionalized Gold Nanosphere Stability»; *The Journal of Physical Chemistry C* **119**, p. 10 064–10 075 (2015). ISSN 1932-7447. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b00483>; publisher: American Chemical Society.
- [76] A. J. WORTHEN, V. TRAN, K. A. CORNELL, T. M. TRUSKETT & K. P. JOHNSTON; «Steric stabilization of nanoparticles with grafted low molecular weight ligands in highly concentrated brines including divalent ions»; *Soft Matter* **12**, p. 2025–2039 (2016). ISSN 1744-6848. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/sm/c5sm02787j>; publisher: The Royal Society of Chemistry.
- [77] P. J. FLORY; *Principles of polymer chemistry* (Cornell University Press) (1953).
- [78] C. A. S. BATISTA, R. G. LARSON & N. A. KOTOV; «Nonadditivity of nanoparticle interactions»; *Science* **350** (2015). ISSN 0036-8075, 1095-9203. <https://science.sciencemag.org/content/350/6257/1242477>; publisher: American Association for the Advancement of Science Section: Review.
- [79] A. DUTTA, A. PAUL & A. CHATTOPADHYAY; «The effect of temperature on the aggregation kinetics of partially bare gold nanoparticles»; *RSC Advances* **6**, p. 82 138–82 149 (2016). ISSN 2046-2069. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/ra/c6ra17561a>; publisher: The Royal Society of Chemistry.

- [80] S.-H. SHIN, S. CHUNG, B. SANII, L. R. COMOLLI, C. R. BERTOZZI & J. J. D. YOREO; «Direct observation of kinetic traps associated with structural transformations leading to multiple pathways of S-layer assembly»; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, p. 12 968–12 973 (2012). ISSN 0027-8424, 1091-6490. <https://www.pnas.org/content/109/32/12968>; publisher: National Academy of Sciences Section: Biological Sciences.
- [81] T. R. JENSEN, M. L. DUVAL, K. L. KELLY, A. A. LAZARIDES, G. C. SCHATZ & R. P. VAN DUYN; «Nanosphere Lithography: Effect of the External Dielectric Medium on the Surface Plasmon Resonance Spectrum of a Periodic Array of Silver Nanoparticles»; *The Journal of Physical Chemistry B* **103**, p. 9846–9853 (1999). ISSN 1520-6106. <https://doi.org/10.1021/jp9926802>; publisher: American Chemical Society.
- [82] T. R. JENSEN, M. D. MALINSKY, C. L. HAYNES & R. P. VAN DUYN; «Nanosphere Lithography: Tunable Localized Surface Plasmon Resonance Spectra of Silver Nanoparticles»; *The Journal of Physical Chemistry B* **104**, p. 10 549–10 556 (2000). ISSN 1520-6106. <https://doi.org/10.1021/jp002435e>; publisher: American Chemical Society.
- [83] A. S. JR & B. MJ; «Preparation and properties of serum and plasma proteins; the refractive properties of the proteins of human plasma and certain purified fractions.»; *Journal of the American Chemical Society* **69**, p. 1747–1753 (1947). ISSN 0002-7863, 1520-5126. <https://europepmc.org/article/med/20251412>.
- [84] S. ELHADJ, G. SINGH & R. F. SARAF; «Optical Properties of an Immobilized DNA Monolayer from 255 to 700 nm»; *Langmuir* **20**, p. 5539–5543 (2004). ISSN 0743-7463. <https://doi.org/10.1021/la049653+>; publisher: American Chemical Society.
- [85] K. M. MAYER & J. H. HAFNER; «Localized Surface Plasmon Resonance Sensors»; *Chemical Reviews* **111**, p. 3828–3857 (2011). ISSN 0009-2665. <https://doi.org/10.1021/cr100313v>; publisher: American Chemical Society.
- [86] C. NYLANDER, B. LIEDBERG & T. LIND; «Gas detection by means of surface plasmon resonance»; *Sensors and Actuators* **3**, p. 79–88 (1982). ISSN 0250-6874. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0250687482800085>.
- [87] I. AMENT, J. PRASAD, A. HENKEL, S. SCHMACHTEL & C. SÖNNICHSEN; «Single Unlabeled Protein Detection on Individual Plasmonic Nanoparticles»; *Nano Letters* **12**, p. 1092–1095 (2012). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/nl204496g>.
- [88] P. ZIJLSTRA, P. M. R. PAULO & M. ORRIT; «Optical detection of single non-absorbing molecules using the surface plasmon resonance of a gold nanorod»; *Nature Nanotechnology* **7**, p. 379–382 (2012). ISSN 1748-3395. <https://www.nature.com/articles/nnano.2012.51>; number: 6 Publisher: Nature Publishing Group.
- [89] M. A. BEUWER, M. W. J. PRINS & P. ZIJLSTRA; «Stochastic Protein Interactions Monitored by Hundreds of Single-Molecule Plasmonic Biosensors»; *Nano Letters* **15**, p. 3507–3511 (2015). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b00872>.

- [90] S. M. E. PETERS, M. A. VERHEIJEN, M. W. J. PRINS & P. ZIJLSTRA; «Strong reduction of spectral heterogeneity in gold bipyramids for single-particle and single-molecule plasmon sensing»; *Nanotechnology* **27**, p. 024001 (2015). ISSN 0957-4484. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/2/024001>; publisher: IOP Publishing.
- [91] R. ELGHANIAN, J. J. STORHOFF, R. C. MUCIC, R. L. LETSINGER & C. A. MIRKIN; «Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles»; *Science* **277**, p. 1078–1081 (1997). ISSN 0036-8075, 1095-9203. <https://science.sciencemag.org/content/277/5329/1078>; publisher: American Association for the Advancement of Science Section: Report.
- [92] R. DE LA RICA & M. M. STEVENS; «Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye»; *Nature Nanotechnology* **7**, p. 821–824 (2012). ISSN 1748-3395. <https://www.nature.com/articles/nnano.2012.186>; number: 12 Publisher: Nature Publishing Group.
- [93] L. RODRÍGUEZ-LORENZO, R. DE LA RICA, R. A. ÁLVAREZ PUEBLA, L. M. LIZMARZÁN & M. M. STEVENS; «Plasmonic nanosensors with inverse sensitivity by means of enzyme-guided crystal growth»; *Nature Materials* **11**, p. 604–607 (2012). ISSN 1476-4660. <https://www.nature.com/articles/nmat3337>; number: 7 Publisher: Nature Publishing Group.
- [94] N. C. SEEMAN; «Nucleic acid junctions and lattices»; *Journal of Theoretical Biology* **99**, p. 237–247 (1982). ISSN 0022-5193. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022519382900029>.
- [95] N. R. KALLENBACH, R.-I. MA & N. C. SEEMAN; «An immobile nucleic acid junction constructed from oligonucleotides»; *Nature* **305**, p. 829–831 (1983). ISSN 1476-4687. <https://www.nature.com/articles/305829a0>; number: 5937 Publisher: Nature Publishing Group.
- [96] J. CHEN & N. C. SEEMAN; «Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube»; *Nature* **350**, p. 631–633 (1991). ISSN 1476-4687. <https://www.nature.com/articles/350631a0>; number: 6319 Publisher: Nature Publishing Group.
- [97] T. J. FU & N. C. SEEMAN; «DNA double-crossover molecules»; *Biochemistry* **32**, p. 3211–3220 (1993).
- [98] S. GUILBAUD, L. SALOMÉ, N. DESTAINVILLE, M. MANGHI & C. TARDIN; «Dependence of DNA Persistence Length on Ionic Strength and Ion Type»; *Physical Review Letters* **122**, p. 028102 (2019).
- [99] A. B. STEEL, R. L. LEVICKY, T. M. HERNE & M. J. TARLOV; «Immobilization of Nucleic Acids at Solid Surfaces: Effect of Oligonucleotide Length on Layer Assembly»; *Biophysical Journal* **79**, p. 975–981 (2000). ISSN 0006-3495. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000634950076351X>.
- [100] B. TINLAND, A. PLUEN, J. STURM & G. WEILL; «Persistence Length of Single-Stranded DNA»; *Macromolecules* **30**, p. 5763–5765 (1997).

- [101] «Ionic strength-dependent persistence lengths of single-stranded RNA and DNA»; **109**, p. 799–804 (2012).
- [102] Q. CHI, G. WANG & J. JIANG; «The persistence length and length per base of single-stranded DNA obtained from fluorescence correlation spectroscopy measurements using mean field theory»; *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **392**, p. 1072–1079 (2013).
- [103] M. C. MURPHY, I. RASNIK, W. CHENG, T. M. LOHMAN & T. HA; «Probing Single-Stranded DNA Conformational Flexibility Using Fluorescence Spectroscopy»; *Biophysical Journal* **86**, p. 2530–2537 (2004).
- [104] F. RICCI, A. VALLÉE-BÉLISLE, A. PORCHETTA & K. W. PLAXCO; «Rational Design of Allosteric Inhibitors and Activators Using the Population-Shift Model: In Vitro Validation and Application to an Artificial Biosensor»; *Journal of the American Chemical Society* **134**, p. 15 177–15 180 (2012). ISSN 0002-7863. <https://doi.org/10.1021/ja304672h>; publisher: American Chemical Society.
- [105] K. MONTAGNE, R. PLASSON, Y. SAKAI, T. FUJII & Y. RONDELEZ; «Programming an in vitro DNA oscillator using a molecular networking strategy»; *Molecular Systems Biology* **7**, p. 466 (2011). ISSN 1744-4292. <https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/msb.2010.120>; publisher: John Wiley & Sons, Ltd.
- [106] T. FUJII & Y. RONDELEZ; «Predator–Prey Molecular Ecosystems»; *ACS Nano* **7**, p. 27–34 (2013). ISSN 1936-0851. <https://doi.org/10.1021/nn3043572>; publisher: American Chemical Society.
- [107] M. SYPABEKOVA, A. BEKMURZAYEVA, R. WANG, Y. LI, C. NOGUES & D. KANAYEVA; «Selection, characterization, and application of DNA aptamers for detection of *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein MPT64»; *Tuberculosis* **104**, p. 70–78 (2017). ISSN 1472-9792. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472979216304498>.
- [108] A. PORCHETTA, A. VALLÉE-BÉLISLE, K. W. PLAXCO & F. RICCI; «Using Distal-Site Mutations and Allosteric Inhibition To Tune, Extend, and Narrow the Useful Dynamic Range of Aptamer-Based Sensors»; *Journal of the American Chemical Society* **134**, p. 20 601–20 604 (2012). ISSN 0002-7863. <https://doi.org/10.1021/ja310585e>; publisher: American Chemical Society.
- [109] A. PORCHETTA, A. VALLÉE-BÉLISLE, K. W. PLAXCO & F. RICCI; «Allosterically Tunable, DNA-Based Switches Triggered by Heavy Metals»; *Journal of the American Chemical Society* **135**, p. 13 238–13 241 (2013). ISSN 0002-7863. <https://doi.org/10.1021/ja404653q>; publisher: American Chemical Society.
- [110] A. IDILI, A. VALLÉE-BÉLISLE & F. RICCI; «Programmable pH-Triggered DNA Nanoswitches»; *Journal of the American Chemical Society* **136**, p. 5836–5839 (2014). ISSN 0002-7863. <https://doi.org/10.1021/ja500619w>; publisher: American Chemical Society.

- [111] T. HA, T. ENDERLE, D. F. OGLETREE, D. S. CHEMLA, P. R. SELVIN & S. WEISS; «Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor»; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, p. 6264–6268 (1996). ISSN 0027-8424, 1091-6490. <https://www.pnas.org/content/93/13/6264>; publisher: National Academy of Sciences Section: Research Article.
- [112] D. B. ROBINSON, H. H. J. PERSSON, H. ZENG, G. LI, N. POURMAND, S. SUN & S. X. WANG; «DNA-Functionalized MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = Fe, Co, or Mn) Nanoparticles and Their Hybridization to DNA-Functionalized Surfaces»; *Langmuir* **21**, p. 3096–3103 (2005).
- [113] G. GINES, A. S. ZADORIN, J.-C. GALAS, T. FUJII, A. ESTEVEZ-TORRES & Y. RONDELEZ; «Microscopic agents programmed by DNA circuits»; *Nature Nanotechnology* **12**, p. 351–359 (2017). ISSN 1748-3395. <https://www.nature.com/articles/nnano.2016.299>; number: 4 Publisher: Nature Publishing Group.
- [114] M. M. MAYE, M. T. KUMARA, D. NYKYPANCHUK, W. B. SHERMAN & O. GANG; «Switching binary states of nanoparticle superlattices and dimer clusters by DNA strands»; *Nature Nanotechnology* **5**, p. 116–120 (2010). ISSN 1748-3395. <https://www.nature.com/articles/nnano.2009.378>; number: 2 Publisher: Nature Publishing Group.
- [115] P. F. XU, A. M. HUNG, H. NOH & J. N. CHA; «Switchable Nanodumbbell Probes for Analyte Detection»; *Small* **9**, p. 228–232 (2013). ISSN 1613-6829. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/sml1.201201721>; \_eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/sml1.201201721>.
- [116] L. LERMUSIAUX, A. SEREDA, B. PORTIER, E. LARQUET & S. BIDAULT; «Reversible Switching of the Interparticle Distance in DNA-Templated Gold Nanoparticle Dimers»; *ACS Nano* **6**, p. 10 992–10 998 (2012). ISSN 1936-0851. <https://doi.org/10.1021/nn304599d>; publisher: American Chemical Society.
- [117] R. P. GOODMAN, R. M. BERRY & A. J. TURBERFIELD; «The single-step synthesis of a DNA tetrahedron»; *Chemical Communications* **0**, p. 1372–1373 (2004). <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2004/cc/b402293a>; publisher: Royal Society of Chemistry.
- [118] W. M. SHIH, J. D. QUISPE & G. F. JOYCE; «A 1.7-kilobase single-stranded DNA that folds into a nanoscale octahedron»; *Nature* **427**, p. 618–621 (2004). ISSN 1476-4687. <https://www.nature.com/articles/nature02307>; number: 6975 Publisher: Nature Publishing Group.
- [119] J. SONG, J.-M. ARBONA, Z. ZHANG, L. LIU, E. XIE, J. ELEZGARAY, J.-P. AIME, K. V. GOTHELF, F. BESENBACHER & M. DONG; «Direct Visualization of Transient Thermal Response of a DNA Origami»; *Journal of the American Chemical Society* **134**, p. 9844–9847 (2012). ISSN 0002-7863. <https://doi.org/10.1021/ja3017939>; publisher: American Chemical Society.
- [120] J.-M. ARBONA, J.-P. AIMÉ & J. ELEZGARAY; «Cooperativity in the annealing of DNA origamis»; *The Journal of Chemical Physics* **138**, p. 015 105 (2013). ISSN

- 0021-9606. <https://aip.scitation.org/doi/full/10.1063/1.4773405>; publisher: American Institute of Physics.
- [121] J.-P. J. SOBCHAK, T. G. MARTIN, T. GERLING & H. DIETZ; «Rapid Folding of DNA into Nanoscale Shapes at Constant Temperature»; *Science* **338**, p. 1458–1461 (2012). ISSN 0036-8075, 1095-9203. <https://science.sciencemag.org/content/338/6113/1458>; publisher: American Association for the Advancement of Science Section: Report.
- [122] X. WEI, J. NANGREAVE & Y. LIU; «Uncovering the Self-Assembly of DNA Nanostructures by Thermodynamics and Kinetics»; *Accounts of Chemical Research* **47**, p. 1861–1870 (2014). ISSN 0001-4842. <https://doi.org/10.1021/ar5000665>; publisher: American Chemical Society.
- [123] J. J. FUNKE & H. DIETZ; «Placing molecules with Bohr radius resolution using DNA origami»; *Nature Nanotechnology* **11**, p. 47–52 (2016). ISSN 1748-3395. <https://www.nature.com/articles/nnano.2015.240>; number: 1 Publisher: Nature Publishing Group.
- [124] J. J. SCHMIED, M. RAAB, C. FORTHMANN, E. PIBIRI, B. WÜNSCH, T. DAMMEYER & P. TINNEFELD; «DNA origami-based standards for quantitative fluorescence microscopy»; *Nature Protocols* **9**, p. 1367–1391 (2014). ISSN 1750-2799. <https://www.nature.com/articles/nprot.2014.079>; number: 6 Publisher: Nature Publishing Group.
- [125] E. GRAUGNARD, W. L. HUGHES, R. JUNGSMANN, M. A. KOSTIAINEN & V. LINKO; «Nanometrology and super-resolution imaging with DNA»; *MRS Bulletin* **42**, p. 951–958 (2017). ISSN 1938-1425. <https://doi.org/10.1557/mrs.2017.274>.
- [126] T. MANGEAT, S. LABOUESSE, M. ALLAIN, E. MARTIN, R. POINCLoux, A. BOUISOU, S. CANTALOUPE, E. COURTAUX, E. VEGA, T. LI, A. GUÉNOLÉ, C. ROUVIÈRE, S. ALLARD, N. CAMPO, M. SUZANNE, X. WANG, G. MICHAUX, M. PINOT, R. L. BORGNE, S. TOURNIER, J. IDIER & A. SENTENAC; «Super-resolved live-cell imaging using Random Illumination Microscopy»; *bioRxiv* (2020). <https://www.biorxiv.org/content/early/2020/01/27/2020.01.27.905083>; publisher: Cold Spring Harbor Laboratory \_eprint: <https://www.biorxiv.org/content/early/2020/01/27/2020.01.27.905083.full.pdf>.
- [127] R. JUNGSMANN, M. S. AVENDAÑO, J. B. WOHRSTEIN, M. DAI, W. M. SHIH & P. YIN; «Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT»; *Nature Methods* **11**, p. 313–318 (2014). ISSN 1548-7105. <https://www.nature.com/articles/nmeth.2835>; number: 3 Publisher: Nature Publishing Group.
- [128] G. GROSSI, M. DALGAARD EBBESEN JEPSEN, J. KJEMS & E. S. ANDERSEN; «Control of enzyme reactions by a reconfigurable DNA nanovault»; *Nature Communications* **8** (2017). ISSN 2041-1723. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5648847/>.
- [129] S. M. DOUGLAS, I. BACHELET & G. M. CHURCH; «A Logic-Gated Nanorobot for Targeted Transport of Molecular Payloads»; *Science* **335**, p. 831–834 (2012).

- ISSN 0036-8075, 1095-9203. <https://science.sciencemag.org/content/335/6070/831>; publisher: American Association for the Advancement of Science Section: Report.
- [130] P. IVASKOVIC, A. YAMADA, J. ELEZGARAY, D. TALAGA, S. BONHOMMEAU, M. BLANCHARD-DESCE, R. A. L. VALLÉE & S. RAVAINÉ; «Spectral dependence of plasmon-enhanced fluorescence in a hollow nanotriangle assembled by DNA origami: towards plasmon assisted energy transfer»; *Nanoscale* **10**, p. 16 568–16 573 (2018). ISSN 2040-3372. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/nr/c8nr04426k>; publisher: The Royal Society of Chemistry.
- [131] Q. LIU, C. SONG, Z.-G. WANG, N. LI & B. DING; «Precise organization of metal nanoparticles on DNA origami template»; *Methods* **67**, p. 205–214 (2014). ISSN 1046-2023. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202313004027>.
- [132] G. P. ACUNA, F. M. MÖLLER, P. HOLZMEISTER, S. BEATER, B. LALKENS & P. TINNEFELD; «Fluorescence Enhancement at Docking Sites of DNA-Directed Self-Assembled Nanoantennas»; *Science* **338**, p. 506–510 (2012). ISSN 0036-8075, 1095-9203. <https://science.sciencemag.org/content/338/6106/506>; publisher: American Association for the Advancement of Science Section: Report.
- [133] P. KÜHLER, E.-M. ROLLER, R. SCHREIBER, T. LIEDL, T. LOHMÜLLER & J. FELDMANN; «Plasmonic DNA-Origami Nanoantennas for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy»; *Nano Letters* **14**, p. 2914–2919 (2014). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/nl5009635>; publisher: American Chemical Society.
- [134] V. V. THACKER, L. O. HERRMANN, D. O. SIGLE, T. ZHANG, T. LIEDL, J. J. BAUMBERG & U. F. KEYSER; «DNA origami based assembly of gold nanoparticle dimers for surface-enhanced Raman scattering»; *Nature Communications* **5**, p. 3448 (2014). ISSN 2041-1723. <https://www.nature.com/articles/ncomms4448>; number: 1 Publisher: Nature Publishing Group.
- [135] R. SCHREIBER, J. DO, E. M. ROLLER, T. ZHANG, V. J. SCHULLER, P. C. NICKELS, J. FELDMANN & T. LIEDL; «Hierarchical assembly of metal nanoparticles, quantum dots and organic dyes using DNA origami scaffolds»; *Nat. Nanotechnol.* **9**, p. 74–78 (2014).
- [136] A. KUZYK, Y. YANG, X. DUAN, S. STOLL, A. O. GOVOROV, H. SUGIYAMA, M. ENDO & N. LIU; «A light-driven three-dimensional plasmonic nanosystem that translates molecular motion into reversible chiroptical function»; *Nature Communications* **7**, p. 10 591 (2016). ISSN 2041-1723. <https://www.nature.com/articles/ncomms10591>; number: 1 Publisher: Nature Publishing Group.
- [137] A. KUZYK, M. J. URBAN, A. IDILI, F. RICCI & N. LIU; «Selective control of reconfigurable chiral plasmonic metamolecules»; *Science Advances* **3**, p. e1602 803 (2017). ISSN 2375-2548. <https://advances.sciencemag.org/content/3/4/e1602803>; publisher: American Association for the Advancement of Science Section: Research Article.

- [138] D. J. KAUFERT, T. KURTH, T. LIEDL & R. SEIDEL; «Direct Mechanical Measurements Reveal the Material Properties of Three-Dimensional DNA Origami»; *Nano Letters* **11**, p. 5558–5563 (2011). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/nl203503s>; publisher: American Chemical Society.
- [139] A. PUCHKOVA, C. VIETZ, E. PIBIRI, B. WÜNSCH, M. SANZ PAZ, G. P. ACUNA & P. TINNEFELD; «DNA Origami Nanoantennas with over 5000-fold Fluorescence Enhancement and Single-Molecule Detection at 25  $\mu\text{M}$ »; *Nano Letters* **15**, p. 8354–8359 (2015). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b04045>; publisher: American Chemical Society.
- [140] D. GE, S. MARGUET, A. ISSA, S. JRADI, T. H. NGUYEN, M. NAHRA, J. BÉAL, R. DETURCHE, H. CHEN, S. BLAIZE, J. PLAIN, C. FIORINI, L. DOUILLARD, O. SOPPERA, X. Q. DINH, C. DANG, X. YANG, T. XU, B. WEI, X. W. SUN, C. COUTEAU & R. BACHELOT; «Hybrid plasmonic nano-emitters with controlled single quantum emitter positioning on the local excitation field»; *Nature Communications* **11**, p. 3414 (2020). ISSN 2041-1723. <https://www.nature.com/articles/s41467-020-17248-8>; number: 1 Publisher: Nature Publishing Group.
- [141] Y.-J. LEE, N. B. SCHADE, L. SUN, J. A. FAN, D. R. BAE, M. M. MARISCAL, G. LEE, F. CAPASSO, S. SACANNA, V. N. MANOHARAN & G.-R. YI; «Ultraspherical, Highly Spherical Monocrystalline Gold Particles for Precision Plasmonics»; *ACS Nano* **7**, p. 11064–11070 (2013). ISSN 1936-0851. <https://doi.org/10.1021/nm404765w>; publisher: American Chemical Society.
- [142] Z. LI, R. JIN, C. A. MIRKIN & R. L. LETSINGER; «Multiple thiol-anchor capped DNA–gold nanoparticle conjugates»; *Nucleic Acids Research* **30**, p. 1558–1562 (2002). ISSN 0305-1048. <https://doi.org/10.1093/nar/30.7.1558>.
- [143] X. ZHANG, M. R. SERVOS & J. LIU; «Instantaneous and Quantitative Functionalization of Gold Nanoparticles with Thiolated DNA Using a pH-Assisted and Surfactant-Free Route»; *Journal of the American Chemical Society* **134**, p. 7266–7269 (2012). ISSN 0002-7863. <https://doi.org/10.1021/ja3014055>; publisher: American Chemical Society.
- [144] W. J. PARAK, T. PELLEGRINO, C. M. MICHEEL, D. GERION, S. C. WILLIAMS & A. P. ALIVISATOS; «Conformation of Oligonucleotides Attached to Gold Nanocrystals Probed by Gel Electrophoresis»; *Nano Letters* **3**, p. 33–36 (2003). ISSN 1530-6984. <https://doi.org/10.1021/nl1025888z>; publisher: American Chemical Society.
- [145] H. LASZEWSKI; *Transfert thermique photo-induit par des nanoparticules d'or appliqué à la thérapie génique*; Theses; Université Paris-Saclay (2019).
- [146] L. LERMUSIAUX, A. NISAR & A. M. FUNSTON; «Flexible synthesis of high-purity plasmonic assemblies»; *Nano Research* **14**, p. 635–645 (2021).
- [147] I. SOGAMI & N. ISE; «On the electrostatic interaction in macroionic solutions»; *The Journal of Chemical Physics* **81**, p. 6320–6332 (1984).

- [148] J. J. STORHOFF, R. ELGHANIAN, C. A. MIRKIN & R. L. LETSINGER; «Sequence-Dependent Stability of DNA-Modified Gold Nanoparticles»; *Langmuir* p. 6666–6670 (2002).
- [149] J. DUBOCHET, M. ADRIAN, J. J. CHANG, J. C. HOMO, J. LEPAULT, A. W. MCDOWALL & P. SCHULTZ; «Cryo-Electron Microscopy of Vitrified Specimens»; *Q. Rev. Biophys.* **21**, p. 129–228 (1988).
- [150] L. LERMUSIAUX & S. BIDAULT; «Temperature-Dependent Plasmonic Responses from Gold Nanoparticle Dimers Linked by Double-Stranded DNA»; *Langmuir* **34**, p. 14 946–14 953 (2018). ISSN 0743-7463. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00133>; publisher: American Chemical Society.
- [151] U. HOHENESTER & A. TRÜGLER; «MNPBEM – A Matlab toolbox for the simulation of plasmonic nanoparticles»; *Computer Physics Communications* **183**, p. 370–381 (2012). ISSN 0010-4655. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010465511003274>.
- [152] U. HOHENESTER; «Simulating electron energy loss spectroscopy with the MNPBEM toolbox»; *Computer Physics Communications* **185**, p. 1177–1187 (2014). ISSN 0010-4655. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010465513004220>.
- [153] J. WAXENEGGER, A. TRÜGLER & U. HOHENESTER; «Plasmonics simulations with the MNPBEM toolbox: Consideration of substrates and layer structures»; *Computer Physics Communications* **193**, p. 138–150 (2015). ISSN 0010-4655. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010465515001228>.
- [154] F. J. GARCÍA DE ABAJO & A. HOWIE; «Retarded field calculation of electron energy loss in inhomogeneous dielectrics»; *Physical Review B* **65**, p. 115 418 (2002). <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevB.65.115418>; publisher: American Physical Society.
- [155] Y. WANG, D. WAN, S. XIE, X. XIA, C. Z. HUANG & Y. XIA; «Synthesis of Silver Octahedra with Controlled Sizes and Optical Properties via Seed-Mediated Growth»; *ACS Nano* **7**, p. 4586–4594 (2013). ISSN 1936-0851. <https://doi.org/10.1021/nn401363e>; publisher: American Chemical Society.
- [156] C. NOGUEZ; «Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment»; *The Journal of Physical Chemistry C* **111**, p. 3806–3819 (2007). ISSN 1932-7447. <https://doi.org/10.1021/jp066539m>; publisher: American Chemical Society.
- [157] H.-X. LIN, J.-M. LI, B.-J. LIU, D.-Y. LIU, J. LIU, A. TERFORT, Z.-X. XIE, Z.-Q. TIAN & B. REN; «Uniform gold spherical particles for single-particle surface-enhanced Raman spectroscopy»; *Physical Chemistry Chemical Physics* **15**, p. 4130–4135 (2013). ISSN 1463-9084. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/cp/c3cp43857k>; publisher: The Royal Society of Chemistry.

- [158] J. H. YOON, F. SELBACH, L. SCHUMACHER, J. JOSE & S. SCHLÜCKER; «Surface Plasmon Coupling in Dimers of Gold Nanoparticles: Experiment and Theory for Ideal (Spherical) and Nonideal (Faceted) Building Blocks»; *ACS Photonics* **6**, p. 642–648 (2019). <https://doi.org/10.1021/acsphotonics.8b01424>.
- [159] C. ZIEGLER & A. EYCHMÜLLER; «Seeded Growth Synthesis of Uniform Gold Nanoparticles with Diameters of 15–300 nm»; *The Journal of Physical Chemistry C* **115**, p. 4502–4506 (2011). ISSN 1932-7447. <https://doi.org/10.1021/jp1106982>; publisher: American Chemical Society.
- [160] H. CHEN, S. P. MEISBURGER, S. A. PABIT, J. L. SUTTON, W. W. WEBB & L. POLLACK; «Ionic strength-dependent persistence lengths of single-stranded RNA and DNA»; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, p. 799–804 (2012). ISSN 0027-8424, 1091-6490. <https://www.pnas.org/content/109/3/799>; publisher: National Academy of Sciences Section: Biological Sciences.
- [161] S. BIDAULT, A. DEVILEZ, V. MAILLARD, L. LERMUSIAUX, J.-M. GUIGNER, N. BONOD & J. WENGER; «Picosecond Lifetimes with High Quantum Yields from Single-Photon-Emitting Colloidal Nanostructures at Room Temperature»; *ACS Nano* **10**, p. 4806–4815 (2016). ISSN 1936-0851. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b01729>; publisher: American Chemical Society.
- [162] M. HEGNER, P. WAGNER & G. SEMENZA; «Ultralarge atomically flat template-stripped Au surfaces for scanning probe microscopy»; *Surface Science* **291**, p. 39–46 (1993). ISSN 0039-6028. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0039602893914744>.
- [163] Y. YANO, M. NISOUGI, Y. YANO-OZAWA, T. OHGUNI, A. OGAWA, M. MAEDA, T. ASAHU & T. ZAKO; «Detection of Gold Nanoparticles Aggregation using Light Scattering for Molecular Sensing»; *Analytical Sciences* **advpub** (2019).
- [164] X. CHENG, D. DAI, Z. YUAN, L. PENG, Y. HE & E. S. YEUNG; «Color Difference Amplification between Gold Nanoparticles in Colorimetric Analysis with Actively Controlled Multiband Illumination»; *Analytical Chemistry* **86**, p. 7584–7592 (2014). ISSN 0003-2700. <https://doi.org/10.1021/ac501448w>; publisher: American Chemical Society.
- [165] M. ZERAATI, D. B. LANGLEY, P. SCHOFIELD, A. L. MOYE, R. ROUET, W. E. HUGHES, T. M. BRYAN, M. E. DINGER & D. CHRIST; «I-motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells»; *Nature Chemistry* **10**, p. 631–637 (2018). ISSN 1755-4349. <https://www.nature.com/articles/s41557-018-0046-3>; number: 6 Publisher: Nature Publishing Group.
- [166] W. REN, K. ZHENG, C. LIAO, J. YANG & J. ZHAO; «Charge evolution during the unfolding of a single DNA i-motif»; *Physical Chemistry Chemical Physics* **20**, p. 916–924 (2018).
- [167] H. YU, J. CANOURA, B. GUNTUPALLI, X. LOU & Y. XIAO; «A cooperative-binding split aptamer assay for rapid, specific and ultra-sensitive fluorescence detection of cocaine in saliva»; *Chemical Science* **8**, p. 131–141 (2017). <https://pubs.rsc>.

[org/en/content/articlelanding/2017/sc/c6sc01833e](https://doi.org/10.1039/c6sc01833e); publisher: Royal Society of Chemistry.



## RÉSUMÉ

---

Conjuguer des nanoparticules d'or et des nanostructures synthétiques faites d'ADN est particulièrement attrayant : d'un côté les particules d'or présentent une conjonction de propriétés optiques exceptionnelles - permises par leurs résonances plasmon - et de stabilité physico-chimique ; tandis que les nanotechnologies ADN fournissent une boîte à outil riche pour concevoir des actuateurs nanométriques dont la morphologie peut être modulée activement et de manière spécifique. Il est alors possible de programmer l'assemblage de nanostructures hybrides complexes dont les propriétés optiques, à l'échelle de l'objet individuel, sont sensibles à des stimuli physicochimiques présélectionnés.

Au cours de cette thèse, j'ai développé, à la fois, des méthodes de synthèse de dimères de nanoparticules d'or de 40 nm assemblés autour d'origamis d'ADN dynamiques ; mais aussi des outils de caractérisation de leurs propriétés optiques à l'échelle de la nanostructure individuelle. Ces origamis d'ADN en forme de Y sont conçus de telle sorte à ce que leur morphologie puisse être modifiée par différents stimuli externes : interaction avec des brins d'ADN spécifiques, modulation du pH ou reconnaissance d'un analyte chimique (molécule organique ou cation spécifique). Ce changement de conformation entraîne une modification de la distance entre les deux particules d'or, posée chacune sur un bras du Y : la modification du couplage plasmon peut alors être détectée, pour chaque dimère, par spectroscopie de diffusion ou sur une simple caméra couleur.

Ces développements expérimentaux m'ont permis d'étudier et d'optimiser ces nanostructures hybrides afin de corrélérer leur résonance plasmon avec la conformation de l'origami. J'ai ainsi étudié la dépendance de ces propriétés optiques en modulant la force ionique locale, le pH mais aussi en déformant l'origami d'ADN. Cette déformation est produite soit par une réaction de *strand displacement*, soit par le repliement d'un quadruplex d'ADN à pH acide (i-motif), démontrant la versatilité de ces nanoactuateurs en ADN. J'ai ainsi observé que la morphologie des dimères était sensible, à la fois, à la conformation de l'origami et à des interactions, probablement électrostatiques, entre les nanoparticules d'or. Ces travaux ouvrent de nombreuses perspectives pour la conception d'agents de contraste optique intelligents ou de nanocapteurs observables à l'œil nu et potentiellement sensibles à la molécule individuelle.

## MOTS CLÉS

---

Nanotechnologies ADN, Origamis d'ADN, Nanostructures hybrides, Plasmonique, Nanoparticules d'or, Spectroscopie de diffusion, Nanostructure unique.

## ABSTRACT

---

Combining gold nanoparticles and synthetic DNA nanostructures is particularly attractive: on the one hand, gold particles exhibit a combination of exceptional optical properties - allowed by their plasmon resonances - and physico-chemical stability; while DNA nanotechnology provides an extremely rich toolbox to design nanoscale actuators whose morphology can be actively and specifically modulated. It is then possible to program the assembly of complex hybrid nanostructures whose optical properties are sensitive, at the single structure level, to pre-selected physicochemical stimuli.

During this thesis, I developed synthesis methods to produce dimers of 40 nm gold nanoparticles assembled around dynamic DNA origamis; but also, experimental tools to characterize their optical properties at the single nanostructure level. These Y-shaped DNA origamis are designed in such a way that their morphology can be modified by various external stimuli: interaction with specific DNA strands, pH modulation or recognition of a chemical analyte (organic molecule or specific cation). This conformation change leads to a modification of the distance between the two gold particles, each placed on one arm of the Y: the modification of the plasmon coupling strength can then be detected, for each dimer, by scattering spectroscopy or on a simple color camera.

These experimental developments have allowed me to study and optimize these hybrid nanostructures in order to correlate their plasmon resonances with the conformation of the DNA origami. In particular, I studied the dependence of these optical properties when modulating the local ionic strength, the pH but also by shifting the shape of the origami. This deformation is produced either by a DNA strand displacement reaction or by folding a DNA quadruplex at low pH (i-motif), demonstrating the versatility of these DNA nanoactuators. In practice, I observed that the morphology of the dimers is sensitive both to the conformation of the origami and to interactions between the gold nanoparticles that are probably of an electrostatic nature. This work opens many perspectives for the design of intelligent optical contrast agents or to develop nanosensors, visible with the naked eye, and compatible with single molecule detection.

## KEYWORDS

---

DNA Nanotechnology, DNA Origamis, Auto-assembly, Plasmonic, Gold Nanoparticles, Scattering Spectroscopy, Single Nanostructures