



HAL
open science

Exploration des nanotechnologies ADN pour l'auto-assemblage de nanoparticules d'aluminium et d'oxyde de cuivre: application à la synthèse de matériaux énergétiques

Théo Calais

► **To cite this version:**

Théo Calais. Exploration des nanotechnologies ADN pour l'auto-assemblage de nanoparticules d'aluminium et d'oxyde de cuivre: application à la synthèse de matériaux énergétiques. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Institut National Polytechnique de Toulouse, 2017. Français. NNT: . tel-04214969v1

HAL Id: tel-04214969

<https://laas.hal.science/tel-04214969v1>

Submitted on 3 Mar 2017 (v1), last revised 22 Sep 2023 (v2)

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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Micro Nano Systèmes

Présentée et soutenue par :

M. THEO CALAIS

le lundi 16 janvier 2017

Titre :

Exploration des nanotechnologies ADN pour l'auto-assemblage de nanoparticules d'aluminium et d'oxyde de cuivre : application à la synthèse de matériaux énergétiques

Ecole doctorale :

Génie Electrique, Electronique, Télécommunications (GEET)

Unité de recherche :

Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (L.A.A.S.)

Directeur(s) de Thèse :

MME CAROLE ROSSI

M. AURELIEN BANCAUD

Rapporteurs :

M. DIDIER GASPARUTTO, CEA GRENOBLE

M. SEBASTIEN BIDAULT, ESPCI PARIS

Membre(s) du jury :

M. JEAN-PIERRE AIME, UNIVERSITE DE BORDEAUX, Président

M. ALAIN ESTEVE, LAAS TOULOUSE, Membre

M. AURELIEN BANCAUD, LAAS TOULOUSE, Membre

Mme CAROLE ROSSI, INP TOULOUSE, Membre

Mme ROSE-MARIE SAUVAGE, DGA, Membre

M. YVES CHABAL, UNIVERSITY OF TEXAS AT DALLAS, Membre

« Braddock, je vous préviens ! Attention où vous mettez les pieds... »

« Je mets les pieds où je veux Little John... »

Braddock : Portés Disparus 3, Aaron Norris, 1988

Remerciements

Les premières pages de ce mémoire de thèse sont dédiées à l'ensemble des personnes ayant contribué de près ou de loin à ces travaux de recherche, résultat de trois années passées au Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes du CNRS au sein de l'équipe NEO.

En premier lieu, je remercie Messieurs Jean Arlat et Liviu Nicu, directeurs successifs du LAAS-CNRS, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire. Je remercie également les chefs d'équipe successifs Jean-Yves Fourniols, Georges Landa et Alain Estève pour l'esprit de cohésion et de convivialité qui règne dans cette équipe multidisciplinaire. Enfin, merci à la Direction Générale de l'Armement pour avoir financé la thèse.

Je suis très sensible à l'honneur que m'a fait l'ensemble des membres du Jury en acceptant de participer à la lecture de mes travaux et à la soutenance. Tout d'abord, je remercie Jean-Pierre Aimé d'avoir endossé le rôle de Président de Jury et d'avoir instauré un esprit de convivialité lors de cette soutenance. Je remercie particulièrement les deux rapporteurs Sébastien Bidault et Didier Gasparutto pour avoir accepté de relire et juger ce long manuscrit malgré les périodes de fêtes. Enfin, je remercie Rose-Marie Sauvage pour avoir suivi ces travaux avec intérêt. Merci à tous pour vos retours, remarques et questions pertinentes qui ont animés de façon très intéressante les discussions suites à l'exposé.

Je suis également très reconnaissant envers l'ensemble des chercheurs auprès desquels j'ai eu la chance d'évoluer et de progresser au cours de la thèse, à commencer par ma directrice de thèse, Carole Rossi. Je tiens à te remercier pour ton suivi quotidien, tes conseils, et la confiance et l'autonomie que tu m'as accordées au cours de ces trois années. J'admire l'habileté avec laquelle tu t'adaptes aux personnalités bien différentes de tes doctorants, pour en tirer le meilleur. Enfin, merci pour ton aide précieuse et tes retours ultra-rapides lors de la correction de ce long manuscrit, sans lesquels la qualité n'aurait pas été au rendez-vous. Je remercie également mon co-directeur de thèse, Aurélien Bancaud. Tu as su apporter les bons conseils, les bonnes idées et la confiance dont j'avais besoin aux moments clés de la thèse. Je remercie Alain Estève pour sa participation active à ces travaux. Merci pour ces séances d'arrachage de cheveux et de discussions tardives et animées autour des spectres IR et autres ! J'en profite pour vous remercier, Alain et Carole, de m'avoir montré la force de la complémentarité théorie-expérience au service d'une production scientifique de qualité, que je saurai prendre en exemple dans le futur. Je remercie également Mehdi Djafari pour sa passion communicative pour la recherche et Jean-Marie Ducéré, l'encyclopédie vivante, pour m'avoir initié aux bienfaits du calcul théorique. Enfin, je remercie Yves Chabal, pour m'avoir donné l'opportunité de séjourner dans son laboratoire à Dallas. Ce séjour aura autant participé à l'avancement des travaux qu'à mon expérience personnel, et je te serai toujours redevable pour cela.

Je tiens à remercier l'ensemble des collègues du LAAS, à commencer par les services I2C et TEAM. Je souhaite remercier d'abord Sandrine Souleille et Charline Blatché pour votre aide, vos formations et la magnifique salle C211 que vous entretenez et développez au quotidien. On s'y sent tellement bien qu'on n'hésite pas à arriver tôt ou à partir tard ! Je remercie ensuite Véronique Conédéra pour les discussions de voyages et d'aventure, et plus particulièrement Fabien Mesnilgrete pour ton soutien en salle blanche sur des technologies difficiles. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière ! Je souhaite aussi remercier David Bourrier pour les mesures AAS qui auront indéniablement sauvées cette thèse, et Sylviane Baster pour ta persévérance à faire fonctionner des machines qui ne marchent pas. Enfin, merci Benjamin Reigh pour ton aide précieuse sur la microscopie électronique. Je n'aurais finalement pas passé autant de temps en salle blanche que ne le laissait présager le sujet, mais j'y aurai passé de très bons moments grâce à vous !

Mes remerciements s'adressent maintenant à mes collègues de la géniale équipe Pyro (attention ça chauffe). Par ordre d'apparition, Docteur Ludovic Glavier, tu auras été mon alter-ego au cours des trois années de thèse. Notre rencontre aura été riche, autant en discussions sérieuses qu'en franches déconnades (et pourtant il y en a eu...), et je sais que notre amitié survivra au temps. J'aurai toujours grand plaisir de te recroiser plus tard et de voir ce que devient le grand chasseur spatonaute ! Vient ensuite le tour de Vincent, au goût certain pour l'autodérision, merci pour toutes ces franches rigolades ! Lorena, je te remercie d'abord pour avoir pris soin de nous au bureau, mais aussi et surtout pour tes précieux conseils. J'admire ta rigueur scientifique et ton abnégation, et je te prendrai toujours en exemple par la suite. Andréa, la vraie pile électrique, je te remercie d'avoir fait chauffer le bureau à coup de bouilloire ! Merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse (certes remise en question par Benjamin) et ta disponibilité. Promis, je t'envoie un carton de caramels. Andrès, merci pour le café et les discussions engagées sur la géopolitique. Enfin merci aux derniers venus dans l'équipe : Jean-Laurent, Mathilde Iachella (merci pour le chocolat !!), Guillaume, et Ségolène. Ségolène, je te souhaite bien du courage et de la persévérance pour ta thèse ! Tu en auras besoin... Heureusement il y a les buffets ! Et un spécial remerciement pour Jérémy : sans toi, je n'aurais sans doute pas eu les belles images TEM à deux semaines de l'envoi du manuscrit, mais je n'aurais surtout jamais eu l'occasion de me mettre dans la peau d'Averell Dalton ! Enfin, merci à mes deux stagiaires : Benoit Playe et Bishal Poudel. Je vous souhaite tout le meilleur pour vos carrières, qui seront sans aucun doute brillantes tant vous êtes talentueux, humainement et professionnellement.

Nous avons également la chance au laboratoire de fréquenter des doctorants et post-doctorants de nombreux horizons, qui ont participé à ma découverte des nombreuses facettes de la recherche et de la société. Nicolas, nos discussions passionnées me manqueront indéniablement et ta curiosité infatigable restera un exemple pour moi. Merci Ruth pour ta gentillesse et les histoires de ton pays, je te souhaite tout le bonheur du

monde pour la suite (et quelques heures de sommeil...) ! Merci Mathilde Guiltat pour les nombreux cookies de Noël, Alex le meilleur chercheur-artiste d'Essilor et plus grand fan de l'équipe Pyro, Marion pour ta bonne humeur (même si tu as failli me tuer...), Antoine pour les exploits sportifs. Benjamin, j'ai indéniablement apprécié te charier en tant que stagiaire, mais reste comme tu es car tu es un mec génial. Je pense aussi à Brioux, Rémi, Amani, Marius, Sabeha, Yassine... être exhaustif me serait impossible.

Je n'oublie pas les anciens. Guillaume Taton, j'espère avoir été à la hauteur de l'héritage que tu as laissé dans le bureau, merci pour cet humour gras et salace auquel je suis particulièrement sensible, et pour avoir transmis ta passion pour les films pourris. Je te dédie ma citation de début de thèse ! Merci Stéphane Pinon pour avoir contribué à mon éveil citoyen. Je n'aurai jamais pu développer un semblant d'esprit critique sans ta présence, je te dois énormément ! Marc et Vincent: vous resterez dans ma mémoire comme d'infatigables blagueurs de bas étage (mais je reste fan).

Merci à vous tous d'avoir transformé la thèse en une période de vie immensément riche en rencontres et en connaissances.

J'aimerais également remercier les personnes étrangères au laboratoire, à savoir mes amis d'école d'ingénieur qui auront grandement participé aux week-ends de décompression salvateurs et nécessaires au cours de ces trois ans. Notamment à l'équipe Puls'A7 : Franck, Alex, Gibot, Mehdi, Selim, Léo, Alexandra, Marie-Lou, Solène, Alizé, j'ai hâte de vivre de nouvelles aventures à vos côtés. Un mot également pour mes amis forçats de la route, auprès desquels j'ai appris ce que la souffrance voulait dire dans les cols Pyrénéens, et qui auront suivi attentivement l'avancement de la thèse : Michel, Marc, Ludo, Sandrine, Rémy et tous les autres...

Merci à ma famille, mes frères et mes parents qui ont participé grandement à ce que je suis maintenant, en consacrant beaucoup de temps et d'énergie pour nous et nos études. Vous nous avez toujours poussés à développer nos passions, et vous êtes un véritable exemple pour moi. J'ai une pensée également pour mes grands-parents qui se seront toujours intéressés avec amour aux aventures de leurs petits-fils. Finally, thanks to my family-in-law for the big support over these years and for following the defense all over the world!

Enfin, mes derniers mots sont pour celle qui aura donné un sens à ma vie. Lavee, ta présence au quotidien est le moteur de ma motivation. Marcher à tes côtés me rend plus fort chaque jour. Je suis fier et honoré de partager ma vie avec toi. Les mots ne suffiront pas pour décrire toute l'aide que tu m'as apportée au cours de ces trois dernières années, et bien plus encore...

Merci

Résumé

Les nanotechnologies ADN utilisées pour l'auto-assemblage de nanoparticules d'or ou de métaux nobles ont connu un important développement au cours des vingt dernières années, permettant l'organisation de particules agencées en nano-cristaux, grâce à la reconnaissance biologique inégalable de deux brins complémentaires courts d'ADN. L'objectif de ces travaux de thèse est d'adapter ces nanotechnologies à l'assemblage de nanoparticules d'Al et de CuO en vue d'élaborer des matériaux composites énergétiques à haute performance, grâce à l'augmentation des surfaces en contact entre réducteur (Al) et oxydant (CuO) par la maîtrise de l'organisation spatiale des nanoparticules. Ainsi, la fonctionnalisation séparée des nanoparticules d'Al et de CuO dispersées en solution colloïdale par des monobrins d'ADN complémentaires doit amener, après mélange des deux solutions colloïdales, à l'agrégation des particules par l'hybridation des brins d'ADN greffés en surface. La stratégie de fonctionnalisation choisie ici est générique : la protéine « Streptavidine » est d'abord greffée sur la nanoparticule, puis le brin d'ADN fonctionnalisé par un groupe biotine à une de ses extrémités, se fixe sur la Streptavidine. Au-delà de l'organisation de la matière à l'échelle nanométrique, l'enjeu double de ces travaux tient dans l'établissement d'un protocole de fonctionnalisation fiable et reproductible, propre aux procédés de micro-électronique, pour envisager un report de ces matériaux sur puce, mais également dans le contrôle des performances énergétiques grâce à l'ADN. Nous avons tout d'abord étudié l'interaction entre les bases de l'ADN et la surface des particules afin d'identifier les interactions non-spécifiques pouvant provoquer une agrégation non-maîtrisée. Dans un second temps, nous nous sommes appliqués à élaborer le protocole en caractérisant précisément chaque étape de fonctionnalisation. Nous avons ensuite étudié l'agrégation des particules fonctionnalisées en fonction de nombreux paramètres expérimentaux telles que la longueur de la chaîne ADN, la séquence de l'oligonucléotide, ou encore la composition saline de la solution. A cause de l'existence d'interactions non-spécifiques, nous avons optimisés ces paramètres de façon à assurer une agrégation dirigée uniquement par l'hybridation des brins d'ADN et améliorer ainsi de façon conséquente l'organisation spatiale des particules et les performances énergétiques des matériaux synthétisés. Enfin, nous avons démontré la possibilité de contrôler les performances énergétiques des nanobiocomposites en maîtrisant leur microstructure grâce à l'ADN.

Abstract

Over the two last decades, DNA technologies have intensively been studied for the organization of matter at the nanoscale. Thanks to the bio recognition of two complementary DNA single-strands and their hybridization into the famous helicoidally structure, self-assembling of gold nanoparticles into highly ordered micrometer scale crystals has been demonstrated. The aim of this thesis is to explore this new nanotechnology for the self-assembly of Al and CuO nanoparticles driven by DNA hybridization into highly energetic nanocomposites by optimizing contact surfaces between reducer (Al) and oxidizer (CuO). We chose Streptavidin-biotin strategy to functionalize nanoparticles with DNA single strands. More precisely, the functionalization process includes four steps: (i) stabilization of Al and CuO nanoparticles into separate colloidal suspensions; (ii) Streptavidin grafting on Al and CuO nanoparticles; (iii) DNA grafting on Al and CuO Streptavidin-modified nanoparticles thanks to the addition of biotin function at the end of the DNA single strands; (iv) mixing of the two colloidal DNA-functionalized suspensions in order to realize the self-assembly. First, we precisely determined, characterized and optimized each step of the functionalization process. Then, we studied more precisely two key points of the process: we analyzed the interaction of DNA bases with technologically relevant oxide surfaces by studying the grafting of Thymidine by theoretical and experimental approaches; and we studied the influence of the coding sequence used for the DNA strands on the quality of the self-assembly, also by theoretical and experimental analyses. Finally, we optimized environmental conditions to realize the self-assembly of DNA-functionalized nanoparticles into energetic nanobiocomposites. Morphologies and energetic properties were established as a function of synthesis conditions, and the control of energetic performances of nanobiocomposites as a function of aggregation process was demonstrated.

Table des Matières

Remerciements	v
Résumé	ix
Abstract	xi
Liste des abréviations et terminologie utilisées.....	1
Introduction Générale	3
Chapitre 1. Etat de l'Art et Problématique	11
1. Les nanothermites, une classe de matériaux énergétiques	14
1.1. Généralités	14
1.2. L'apport de la nanostructure	17
1.3. Etat de l'art des travaux sur les nanothermites	18
1.4. Synthèse, mise en œuvre et propriétés des nanothermites par <i>nanopoudre</i>	21
1.5. Paramètres clés influençant les propriétés énergétiques	21
1.6. Synthèse et objectif de recherche.....	31
2. L'ADN, brique technologique de structuration de la matière	33
2.1. Quelques notions historiques sur l'ADN	33
2.2. Structure chimique de l'ADN	34
2.3. Les nanotechnologies ADN	35
2.4. Les applications des nanotechnologies ADN	36
2.5. Auto-assemblage de nanoparticules.....	40
2.6. Cristallisation de systèmes hétérogènes.....	48
2.7. Analyse et présentation de la problématique	51
3. Stratégie d'assemblage et objectifs scientifiques et technologiques de la thèse	54
Chapitre 2. Interaction Physico-Chimique entre Nucléotide et Surface Oxydée.....	57
1. Introduction	60
2. Choix des systèmes modèles	62
3. Méthodes expérimentales et théorique.....	64
3.1. Spectroscopie FTIR et XPS	64

3.2.	Calculs théoriques	65
4.	Protocoles expérimentaux	67
4.1.	Matériel général	67
4.2.	Préparation de la surface d'Al ₂ O ₃ avec terminaison -OH.....	67
4.3.	Greffage et analyse de la dTMP.....	68
5.	Résultats du greffage de la dTMP sur surfaces d'Al ₂ O ₃	71
6.	Etude des paramètres influençant l'interaction entre ADN et Alumine.....	78
6.1.	Calcul de la concentration de dTMP par unité de surface	78
6.2.	Influence de la température et de la durée d'incubation	80
6.3.	Etude de la perte des phonons d'Al ₂ O ₃	86
6.4.	Influence du solvant.....	88
6.5.	Influence de l'épaisseur de la couche d'Al ₂ O ₃	90
7.	Conclusions et perspectives	94
Chapitre 3. Bio-fonctionnalisation des nanoparticules d'Al et de CuO.		97
1.	Matériaux et méthodes expérimentales	100
1.1.	Produits chimiques et biologiques	100
1.2.	Les nanopoudres	101
1.3.	Méthodes expérimentales.....	104
1.4.	Stabilisation de la solution colloïdale	106
2.	Bio-fonctionnalisation de solutions colloïdales stables de nanoparticules de CuO.	108
2.1.	Dispersion des nanoparticules de CuO en solution aqueuse.....	108
2.2.	Greffage de la Streptavidine	118
2.3.	Greffage de l'ADN	121
3.	Bio-fonctionnalisation de solutions colloïdales stables de nanoparticules d'Al.....	124
3.1.	Dispersion des nanoparticules d'Al en solution aqueuse	124
3.2.	Greffage de la Streptavidine	132
3.3.	Greffage de l'ADN	134
4.	Caractérisation des densités de greffage de la Streptavidine et de l'ADN sur les nanoparticules d'Al et de CuO et validation de la préservation de la fonctionnalité de l'ADN	137

4.1.	Etat de l'art.....	137
4.2.	Méthode de caractérisation de la densité de greffage de la Streptavidine .	139
4.3.	Caractérisation du greffage de l'ADN	140
4.4.	Caractérisation de la fonctionnalité de l'ADN.....	141
4.5.	Quantification du greffage de la Streptavidine	142
4.6.	Quantification du greffage de l'ADN	146
5.	Conclusion.....	152
Chapitre 4. Etude de l'Assemblage, de la Structure et des Propriétés Énergétiques de Nanobiocomposites Al-CuO		157
1.	Agrégation de nanoparticules : cinétique et structure	160
2.	Conception des brins d'ADN	166
2.1.	Choix d'une séquence d'oligonucléotide de la littérature.....	166
2.2.	Optimisation de la séquence de l'oligonucléotide	167
2.3.	Synthèse	173
3.	Synthèse de nanobiocomposites Al-CuO : Protocole d'assemblage.....	174
4.	Etude des cinétiques d'agrégation de nanoparticules d'Al et de CuO : Influence des conditions expérimentales et des brins d'ADN	176
4.1.	Influence de la concentration en NaCl.....	176
4.2.	Influence de la séquence de l'oligonucléotide	180
4.3.	Influence de la température.....	183
4.4.	Validation de l'hybridation des brins d'ADN complémentaires	186
4.5.	Influence de la taille du <i>spacer</i> et de la Streptavidine	187
5.	Caractérisation structurale des nanobiocomposites.....	190
5.1.	Nanobiocomposites Al-CuO	190
5.2.	Influence de la séquence de l'oligonucléotide sur la structure	191
5.3.	Influence de la séquence sur la composition chimique.....	192
6.	Caractérisation thermiques des nanobiocomposites Al-CuO.....	193
6.1.	Analyse des propriétés thermiques	193
6.2.	Influence de la stœchiométrie dans les performances énergétiques	193
6.3.	Apport de l'assemblage des nanoparticules dirigé par ADN.....	197

6.4. Influence de la structure et de la cinétique d'agrégation sur les propriétés énergétiques des nanocomposites	201
7. Conclusion.....	205
8. Perspectives : vers une optimisation du procédé d'assemblage et une intégration de nanobiocomposites Al-CuO	206
8.1. Traitement thermique des nanoparticules agrégées	206
8.2. Intégration des nanobiocomposites sur puce électronique.....	208
Conclusion Générale	213
Annexes.....	221
Annexe 1. Description des techniques expérimentales	223
Annexe 2. Assignment du spectre IR de la dTMP par DFT	228
Annexe 3. Configuration de la dTMP sur surface Al ₂ O ₃ dans les calculs DFT	229
Annexe 4. Energies correspondants aux 10 configurations de la dissociation de la dTMP sur Al ₂ O ₃	234
Annexe 5. Pollution de la surface d'Al ₂ O ₃ lors du dépôt d'ALD	235
Annexe 6. Caractérisation de la taille des nanoparticules et de leur potentiel Zeta	236
Annexe 7. Plan d'expériences de CuO et d'Al.....	240
Annexe 8. Diamètres hydrodynamiques et potentiels Zeta de solutions colloïdales d'Al-Strep et CuO-Strep	241
Annexe 9. Calcul du nombre de nanoparticules d'Al	242
Annexe 10. Liste des séquences optimisées par algorithme	243
Annexe 11. Régression non-linéaire par loi puissance des cinétiques d'agrégation.....	244
Annexe 12. Données numériques soulignant la stabilité thermique des agrégats.....	245
Annexe 13. Analyse quantitative de la composition des agrégats Al-CuO suivant le mode d'agrégation	246
Annexe 14. Courbes DSC d'agrégats Al-CuO en fonction de la taille du <i>spacer</i>	247
Annexe 15. Images SEM de nanobiocomposites assemblés en régime DLCA	248
Bibliographie.....	251

Liste des abréviations et terminologie utilisées

AAS	<i>Atomic Absorption Spectroscopy</i> , ou Spectrométrie d'Absorption Atomique.
ADN	Acide Désoxyribose Nucléique.
ALD	<i>Atomic Layer Deposition</i> , ou Dépôt par Couche Atomique.
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilane.
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i> , ou Réflectance Totale Atténuée.
CC	Cubique Centré.
CFC	Cubique Face Centré.
CVD	<i>Chemical Vapor Deposition</i> , ou Dépôt Chimique en phase Vapeur.
DFT	<i>Density Functional Theory</i> , ou Théorie de la Fonctionnelle de la Densité.
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> , ou Diffusion Dynamique de la Lumière.
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> , ou Calorimétrie Différentielle à Balayage.
dTMP	Thymidine 5'-MonoPhosphate.
EDX	<i>Energy Dispersive X-ray spectrometry</i> , pour Analyse Dispersive en Energie.
FTIR	<i>Fourier Transform InfraRed spectrometry</i> , ou Spectroscopie Infra-Rouge par Transformée de Fourier.
IR	Infra Rouge.
PB	<i>Phosphate Buffered</i> , ou Tampon Phosphate.
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , ou Tampon Phosphate Salin.
PTFE	PolyTetraFluoroEthylène.
PVD	<i>Physical Vapor Deposition</i> , ou Dépôt en Phase Vapeur.
SAXS	<i>Small-Angle X-Ray Scattering</i> , ou Diffusion des rayons X aux Petits Angles.
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , ou DodécylSulfate de Sodium.
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> , ou Microscopie Electronique à Balayage.

SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i> , ou Résonance Plasmon de Surface.
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i> , ou Microscopie Electronique à Transmission.
TGA	<i>Thermogravimetric Analysis</i> , ou Analyse Thermo-gravimétrique.
TMA	Tri-Méthyl d'Aluminium.
TMD	<i>Theoretical Maximum Density</i> , pour Densité Maximale Théorique.
VASP	<i>Vienna Ab initio Simulation Package</i> .
XPS	<i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i> , ou Spectroscopie Photoélectronique X.
<i>nanopoudre</i>	Terme pour qualifier une poudre, en générale commerciale, dont les consitutants ont des dimensions caractéristiques autour de 100 nm ou inférieur.
nanocristal	On appelle nanocristal une organisation de nanoparticules « cristallisée », formant un réseau périodique avec des paramètres de maille connus.
<i>spacer</i>	Ce terme désigne la séquence d'un oligonucléotide dont le but est d'éloigner physiquement la séquence destinée à s'hybrider avec l'oligonucléotide complémentaire et la surface de la nanoparticule.
<i>linker</i>	Le <i>linker</i> est l'oligonucléotide qui sert de liaison à deux autres nucléotides dans un système d'hybridation à trois oligonucléotides.
<i>Temps d'initiation</i>	Correspond à la différence de temps entre l'allumage du laser et la détection d'un signal optique provoqué par la réaction de la nanothermite.

Introduction Générale

Introduction Générale

Dans un contexte sociétal complexe, où la prise de conscience de la limitation des ressources énergétiques et alimentaires de la planète devient source de tensions géopolitiques, les problématiques économique, écologique et énergétique deviennent indissociables et primordiales dans le développement des technologies futures. Ainsi, une réflexion profonde multi-échelle doit nous amener à réorienter notre vision de l'énergie afin de répondre aux défis de demain, à l'heure où l'usage généralisé des ressources fossiles est autant un poison à retardement pour l'environnement que l'indispensable remède au développement économique. Les matériaux énergétiques sont alors au cœur de cette réflexion. Ces matériaux, capable de libérer en un temps très court une quantité d'énergie chimique stockée à l'échelle atomique, sont en effet au cœur d'applications aussi diverses que nombreuses, centrales vis-à-vis des enjeux de la société du XXI^{ème} siècle. Pour n'en citer que quelques-unes, on peut évoquer l'aéronautique, l'aérospatiale, la soudure, les feux d'artifices, l'armement... Or, demain, ces matériaux énergétiques devront répondre à toujours plus de contraintes économiques et environnementales, auxquelles s'additionnent les problématiques de taille, d'efficacité, de sûreté et de fiabilité, notamment pour toutes les applications aéronautiques et spatiales. Ils seront multifonctionnels avec des performances adaptables à l'application. Ceci ne sera possible qu'en s'appuyant sur les progrès réalisés en micro et nanotechnologie, chimie et biochimie afin de travailler la matière à l'échelle moléculaire, voire atomique.

La course à la miniaturisation lancée depuis maintenant quarante ans a amené la recherche à développer des outils toujours plus précis, notamment dans le domaine de l'électronique, grâce à l'automatisation des équipements et à l'arrivée de techniques nouvelles permettant de structurer la matière à l'échelle atomique. Le développement « Moorien » de la puissance de l'ordinateur couplé aux techniques de fabrication autant des moyens de mesure que de production de la matière, a permis à la science des nanotechnologies d'émerger au cours des dernières décennies. L'intérêt grandissant des chercheurs pour l'infiniment petit se justifie alors par le comportement de la matière, exalté par des rapports de forme d'une dimension nouvelle et différent en tout point à celui observé à l'échelle macroscopique. Ces propriétés nouvelles agrandissent l'horizon des possibles pour les technologies de demain. Le domaine des matériaux énergétiques en tire dès à présent un grand bénéfice avec l'apparition de nanomatériaux aux performances énergétiques accrues par rapport aux matériaux conventionnels, notamment pour les matériaux énergétiques de type composites, couplant oxydants et réducteurs. Il a été montré en effet que la performance énergétique de ces derniers est directement impactée par la dimension de ses composants (Armstrong *et al.*, 2003). On peut voir ainsi que le développement des nanotechnologies au service de l'arrangement de la matière à l'échelle de l'infiniment petit permet déjà de relever les défis énergétiques de demain. L'étape qui

suit est le contrôle des interfaces et des dimensions aux échelles nanométriques pour régler finement les performances en fonction de l'application. Les travaux de la communauté internationale convergent vers cet objectif ultime d'obtenir de nouvelles catégories de matériaux énergétiques nanostructurés multifonctionnels aux performances réglables en fonction de l'application (Ahn *et al.*, 2016; Rossi *et al.*, 2007). Les contributions adressent des travaux théoriques et expérimentaux encore nombreux pour la maîtrise des réactions exothermiques aux échelles nanométriques que nous ne détaillerons pas ici.

C'est dans ce contexte de miniaturisation et de complexification des dispositifs qui intègrent des fonctionnalités de plus en plus nombreuses (intelligence, actions mécaniques, mesure, ...) que le Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS) a orienté sa recherche depuis le milieu des années 1990. L'intégration de matériaux énergétiques dans des systèmes issus de la micro-électronique a alors permis l'émergence de nouveaux dispositifs « micro-pyrotechniques » permettant un apport énergétique localisé (Rossi and Estève, 2005). De nombreuses applications ont été impactées par le développement de cette nouvelle technologie, d'abord dans le domaine médical exploré dans le cadre de la thèse de Carole Rossi en 1997 (Rossi, 1997), puis pour des applications plus diverses telles que la micro-propulsion de satellites (Larangot, 2004) ou de drones (Chaalane, 2008), l'actionnement micro-fluidique (Rodriguez and Adolfo, 2008) ou encore l'initiation pyrotechnique sécurisée (Pennarun, 2006; Pezous, 2009; Taton, 2013).

Ces travaux d'intégration de matériaux énergétiques dans des dispositifs miniaturisés ont été accompagnés parallèlement par le développement de nouveaux nanomatériaux énergétiques de type thermites, sous forme de nanofils (Zhang *et al.*, 2007), de multicouches (Bahrami, 2013; Petrantoni, 2010) ou de mélanges de nanopoudres (Glavier *et al.*, 2015). Ces matériaux consistent en l'association d'un oxydant, ici l'Aluminium (Al) avec un réducteur de type oxyde métallique, entre lesquelles s'établit une réaction exothermique très forte de type oxydo-réduction sous l'effet d'un stimulus extérieur (chauffage ou choc électrique). Une des voies approfondies par l'équipe NEO (NanoIngénierie et intégration des Oxydes et de leurs interfaces) du LAAS est alors le dépôt de couches nanométriques de ces deux composants par pulvérisation cathodique, permettant une maîtrise et amélioration des performances énergétiques grâce à l'augmentation des surfaces de contacts. Cependant, le mélange de nanopoudres au lieu de couches denses est également une voie intéressante, car elle augmente considérablement les surfaces de contacts entre composants, améliorant en conséquence encore davantage ses performances. Au-delà de l'augmentation de surface entre les réactants, une grande variété en nature et dimension de particules métalliques et d'oxydes métalliques sont disponibles et peuvent être combinés pour créer des composites aux performances variées. Le mélange de poudres nanométriques est simple, faisable à grande

échelle et à bas coût. De nombreuses techniques de report (technologie additive) sont envisageables (sérigraphie, jet d'encre, dépôt électrophorétique, ...) pour reporter les nanocomposites sur et dans les dispositifs. Mais le mélange des nanoparticules doit faire face à de nombreux verrous technologiques, notamment sur des problèmes d'interfaces liées aux échelles nanométriques, du contrôle de l'homogénéité du mélange et aussi sur les méthodes de manipulation et d'assemblage de nanoparticules.

Parallèlement à la micro-électronique, le monde de la « biologie » a connu également de grands bouleversements au cours des dernières décennies, avec en point d'orgue la découverte de la structure de l'ADN en 1957 par Crick et Watson, et du stockage de l'information du vivant dans le génome. Ce qu'on appelle communément ADN, ou Acide Désoxyribose Nucléique, est en fait un type de polymère, dans le sens de combinaison de briques élémentaires répétées un certain nombre de fois, où les quatre briques élémentaires sont les bases nucléiques Adénine (A), Thymine (T), Guanine (G) et Cytosine (C). La répétition de ces bases forme alors un brin d'ADN. Or, l'une des propriétés majeures de ces bases est d'être complémentaire deux à deux (A-T, G-C). Ainsi, si deux brins sont complémentaires, c'est-à-dire si l'ensemble des bases d'un brin peut s'appareiller avec l'ensemble des bases de l'autre brin, alors les deux brins s'hybrident et forment la célèbre structure en double-hélice. Ces découvertes ont bouleversé notre vision de la santé, et plus généralement de la science et de la technologie, avec l'association à venir de plus en plus forte et intriquée entre biologie et technologie. A titre d'exemple, utiliser l'ADN comme stockage de l'information en remplacement des technologies à base de silicium n'est plus de l'ordre de la science-fiction (Zhirnov *et al.*, 2016).

Outre l'énorme impact de l'ADN sur l'organisation du vivant, les chaînes de bases composantes de l'ADN possèdent une énorme affinité et une spécificité inégalable dans le monde de la chimie moléculaire. Ces caractéristiques lui confèrent un pouvoir structurant à l'échelle nanométrique sans comparaison avec d'autres technologies. Après la découverte des différentes structures géométriques que pouvait prendre l'ADN par Nadrian Seeman en 1992 (Seeman, 1992), Alivisatos et Mirkin sont les premiers en 1996 à démontrer la possibilité de l'utiliser comme brique structurante en assemblant des nanoparticules d'or en réseau organisé (Alivisatos *et al.*, 1996; Mirkin *et al.*, 1996). Ces découvertes marquent le début d'une nouvelle ère des nanotechnologies, celle des *DNA nanotechnologies*. Depuis lors, de nombreux travaux ont montré la possibilité d'organisation cristallographique de nanoparticules en utilisant l'ADN comme vecteur d'assemblage (Macfarlane *et al.*, 2011; Mirkin, 2000; Park *et al.*, 2008). Cependant, ces technologies sont encore limitées aujourd'hui par les matériaux concernés et peinent en conséquence à trouver des applications concrètes.

Cette brève description du pouvoir structurant de l'ADN nous permet de comprendre l'apport que peut avoir cette technologie pour la manipulation et l'assemblage de

nanoparticules pour la synthèse de matériaux énergétiques de type nanothermite. C'est à la rencontre de ces deux domaines technologiques que s'est construit mon sujet de thèse, que l'on peut résumer par cette problématique : ***comment utiliser les technologies ADN pour structurer de façon intelligente et contrôlée des nanoparticules d'Al et de CuO en matériaux énergétiques innovants ?***

*
* *

Les enjeux de ma thèse sont triples :

- **Technologique** : explorer l'ADN comme outil technologique pour interfacer, manipuler, assembler et organiser des nano-objets de différents types dans des matrices hétérogènes.
- **Matériau** : la conception d'un nouveau matériau, alliant l'inorganique des nanoparticules et l'organique de l'ADN en un matériau innovant et intelligent, par le contrôle du greffage des objets biologiques et de la structure finale et demain, sans aucun doute, par l'ajout de nouvelles fonctions biochimiques.
- **Applicatif** : explorer de nouvelles applications par intégration de ces matériaux nanocomposites bio-hybrides dans des puces micro-électroniques.

Les premiers travaux menés au LAAS sur ce sujet ont montré la faisabilité de la structuration d'un matériau énergétique composite par l'auto-assemblage de nanoparticules par ADN (Séverac *et al.*, 2012). Dans la continuité de ces travaux, nous nous sommes concentrés dans cette thèse sur la maîtrise, la caractérisation, et l'optimisation des modifications de surface de deux matériaux, l'aluminium et l'oxyde de cuivre. Nous avons pris soin d'optimiser les protocoles donnant des solutions stabilisées de nanoparticules fonctionnalisées par ADN à haute densité de greffage. La méthode développée ici est également générique, donc applicable à d'autres oxydes métalliques. Dans un second temps, nous avons combiné modélisation et expérimentation afin de comprendre l'interaction de l'ADN avec les surfaces considérées en micro-électronique et d'identifier les difficultés qu'elles peuvent entraîner sur les protocoles de fonctionnalisation. Après optimisation des paramètres liés à la fonctionnalisation de colloïdes, détaillées dans un troisième temps, nous avons pu étudier l'agrégation des nanoparticules et déterminés les conditions expérimentales favorables à l'organisation des particules assurée par l'hybridation des brins d'ADN. Pour ce faire, nous avons plus particulièrement étudié l'impact de la séquence de l'ADN sur l'agrégation des particules, et avons été en mesure de valider le rôle de l'ADN dans l'assemblage. Enfin, les performances énergétiques de ces matériaux énergétiques ont pu être caractérisées.

Mon manuscrit présente l'ensemble de mes travaux de thèse en quatre parties.

Dans un premier chapitre, nous contextualiserons la problématique, en détaillant l'état de l'art des matériaux énergétiques de type nanothermite et des technologies ADN existantes. Nous identifierons les avancées, les verrous, et les challenges à venir de ces

technologies, pour répondre aux enjeux sociétaux dans lequel s'inscrit mon travail : l'énergie embarquée.

Nous présenterons dans un second chapitre l'approche expérimentale et théorique du greffage de structures biologiques sur surface oxydée, en prenant pour exemple l'immobilisation d'une base de l'ADN, la Thymidine, sur des surfaces d'intérêt technologique. Nous identifierons les interactions physico-chimiques entre la base ADN et la surface et étudierons l'impact des conditions expérimentales et de la nature de la surface sur la force de ces interactions.

Dans le troisième chapitre, nous décrirons un protocole précis, robuste, reproductible et entièrement caractérisé pour la fonctionnalisation de nanoparticules d'Al et de CuO avec des brins d'ADN, en vue de réaliser un assemblage dirigé par l'hybridation de ces brins. Chaque étape de greffage sera caractérisée et validée, et les densités de greffage maximisées par optimisation des conditions expérimentales.

Enfin, dans le dernier chapitre, nous explorerons l'assemblage dirigé par brin ADN des nanoparticules en solution aqueuse pour former des composites énergétiques performants. La compréhension des mécanismes de l'assemblage a été un point important de mon travail de thèse, en étudiant d'une part l'impact sur l'agrégation de la séquence des brins complémentaires, optimisée par un code développé spécifiquement à cet effet, et d'autre part en explorant les conditions expérimentales favorisant les interactions spécifiques et réversibles des brins d'ADN. Nous comparerons ensuite la morphologie des agrégats obtenus en fonction de la stratégie d'agrégation retenue, et étudierons leur impact sur les propriétés thermiques.

Une dernière section du manuscrit sera consacrée aux perspectives nombreuses de ces travaux, en deux parties. Nous nous interrogerons d'abord sur les stratégies à suivre pour améliorer la qualité des composites synthétisés par ADN. Puis nous discuterons la possibilité d'intégration de ces composites sur puce micro-électronique en explorant deux technologies de report.

Nous finirons ce manuscrit par une synthèse des résultats majeurs obtenus ont fait l'objet de publications scientifiques et les avancées qu'offrent les technologies pour les matériaux énergétiques. Nous synthétiserons également les nombreuses perspectives de ces matériaux.

Chapitre 1.

Etat de l'Art et Problématique

Depuis maintenant deux décennies, l'ADN, connu comme support génétique de l'expression du vivant, est apparu comme un outil technologique à part entière, au pouvoir structurant puissant grâce à la reconnaissance biomoléculaire de deux brins complémentaires, sans équivalent dans le monde vivant. Par ailleurs, les matériaux énergétiques de type « nanothermite » ont connu sur la même période un développement conséquent grâce à l'apport de la nanostructuration des constituants, oxydants et réducteurs, impliquant une amélioration marquée de leurs performances énergétiques. Cependant, la structuration à l'échelle nanométrique des éléments hétérogènes de la nanothermite fait face aujourd'hui à de nombreuses difficultés, d'ordre technologique d'une part pour la mise en forme et le contrôle des structures, mais aussi d'ordre théorique pour la compréhension et la prédiction des performances énergétiques en fonction de la structuration de la nanothermite. Ces difficultés sont encore limitantes pour l'utilisation de ces matériaux énergétiques dans les applications nombreuses qui couvrent l'initiation, la soudure localisée, ou encore la génération de pression.

L'objectif de ce premier chapitre est de motiver l'utilisation de l'ADN pour la synthèse d'une nouvelle génération de nanothermites aux propriétés améliorées, contrôlées et surtout adaptables grâce à une grande variété de stratégies de synthèse.

Après avoir donné une définition générale des matériaux énergétiques, nous présenterons les nanothermites élaborés à partir de nanoparticules. Nous décrirons dans un premier temps les différents matériaux utilisés, les méthodes de synthèse, d'assemblage et les applications des nanothermites aujourd'hui. Puis nous nous intéresserons à l'ADN comme outil technologique pour l'élaboration d'une nouvelle catégorie de nanothermites. Nous expliquerons pourquoi l'ADN est susceptible de bouleverser le monde technologique en énumérant les nombreuses applications ouvertes par les nanotechnologies ADN. Enfin, nous étudierons plus particulièrement les avancées de ces vingt dernières années sur la structuration de nanoparticules par auto-assemblage assisté par ADN. Ces études bibliographiques permettront de justifier les choix stratégiques adoptés dans ces travaux de thèse, que nous décrirons dans la dernière section du chapitre.

1. Les nanothermites, une classe de matériaux énergétiques

1.1. Généralités

En guise d'introduction, nous pouvons rappeler que les matériaux énergétiques sont des composés capables de libérer une grande énergie en quelques fractions de seconde sous l'effet d'un stimulus (par apport de chaleur ou choc électrique). La réaction énergétique est généralement une réaction exothermique d'oxydo-réduction entre espèces ou molécules oxydantes et réductrices. Les matériaux énergétiques solides sont à usage unique et sont généralement classés en deux catégories :

-Les matériaux mono-moléculaires. Constitués d'une phase unique homogène où la molécule élémentaire contient tous les éléments nécessaires à la réaction, ils sont généralement de nature organique. Du fait de la proximité des éléments réducteurs et oxydants, souvent au sein d'une même molécule, la réaction exothermique est extrêmement rapide, allant jusqu'à une dizaine de km.s^{-1} pour le CL-20, puissant explosif développé à Chinese Lake en Californie ($\text{C}_6\text{N}_{12}\text{H}_6\text{O}_{12}$) (source Eurenco). La TNT (pour TriNitroToluène de formule $\text{C}_6\text{H}_2(\text{NO}_2)_3\text{CH}_3$) est un exemple célèbre de matériau réactif mono-moléculaire dont la proximité des groupes oxydant (NO_3) et réducteurs (CH_2 et CH) le rend très sensible et instable. L'extrême sensibilité de ces matériaux mono-moléculaires rend l'optimisation de leur potentiel énergétique difficile.

-Les matériaux composites. Ils se présentent généralement sous la forme de poudres, constituées d'au moins deux composants : l'oxydant et le réducteur. Leur cinétique de décomposition (classiquement appelée « réactivité ») est dépendante de la proximité des différents constituants et de la diffusion des espèces entre oxydant et réducteur, rendant ces matériaux énergétiques de fait moins sensibles que les matériaux mono-moléculaires. Pour des poudres micrométriques, les cinétiques de décomposition varient de quelques mm.s^{-1} à plusieurs m.s^{-1} suivant les ingrédients utilisés et le compactage des poudres. La poudre noire est un exemple célèbre des matériaux composites.

Les thermites, ou composés alumino-thermites, entrent dans cette deuxième catégorie. Elles peuvent être qualifiées de « composites », car elles associent un métal réducteur, appelé également « combustible », avec un oxyde métallique oxydant, appelé « comburant ».

Les thermites ont été découvertes en 1893 et brevetés en 1895 par le chimiste allemand Hans Goldschmidt (Goldschmidt, 1895), en cherchant une méthode de synthèse de métaux purs sans carbone. C'est en synthétisant du chrome par réduction de sa forme oxydée par l'aluminium qu'il comprit l'intérêt de sa découverte pour la soudure. Le nom

thermite vient du dégagement de chaleur très élevé de ces matériaux, dont la température de flamme peut atteindre 3 600 °C (Fischer and Grubelich, 1998).

D'un point de vue chimique, la réaction dite « thermite » désigne plus précisément la réaction d'oxydo-réduction intervenant entre les deux éléments (Piercey and Klapötke, 2010). Usuellement, le métal le plus utilisé est l'Aluminium (Al) car son affinité avec l'oxygène est telle qu'il est très facilement oxydable et ce métal est disponible en grande quantité et à bas coût. La réaction d'oxydo-réduction s'opérant entre les deux composés peut s'écrire formellement de la façon suivante :



Avec M et MO le métal et sa forme oxydée, de même AO et A un oxyde métallique et sa forme réduite, et ΔH l'enthalpie de réaction.

Cette réaction fortement exothermique produit une certaine quantité de chaleur, caractérisée par l'enthalpie de réaction ΔH , exprimée en cal.g^{-1} , J.g^{-1} ou encore J.cm^{-3} . Cependant, un certain nombre de facteurs limitent les rendements de la réaction comme la dissipation de chaleur dans l'environnement ou des barrières de diffusion d'espèce comme la couche d'alumine présente dans les poudres utilisées.

Conventionnellement, la chaleur de réaction peut être caractérisée par Calorimétrie Différentielle à Balayage (notée DSC, pour *Differential Scanning Calorimetry*). Cette technique d'analyse thermique compare les échanges de chaleur avec son environnement d'un échantillon et d'une référence situés dans une enceinte fermée. Plus précisément, l'appareil mesure la variation d'énergie appliquée à la référence pour maintenir la température de l'enceinte constante, suivant si l'échantillon absorbe de la chaleur en subissant une transformation endothermique (comme la fusion), ou dégage de la chaleur s'il subit une réaction exothermique.

Lorsqu'on travaille avec les thermites, il est important de connaître les conditions environnementales de la réaction ainsi que la stœchiométrie du mélange métal / oxyde. Nous pouvons donc définir dans un premier temps le ratio de masse équivalente \emptyset de façon à caractériser la stœchiométrie du mélange de la façon suivante :

$$\emptyset = \frac{(M_{Al}/M_{Oxyde})_{Sample}}{(M_{Al}/M_{Oxyde})_{ST}} \quad (1.2)$$

Où M_{Al} et M_{Oxyde} représentent les masses molaires de l'aluminium et de l'oxyde métallique. La notation *Sample* indique le ratio entre les deux composés et la notation *ST* indique le ratio entre les deux composés dans les conditions stœchiométriques, *i.e.* contenant la quantité d'oxygène nécessaire à oxyder la totalité de l'Al sans apport extérieur. Cette définition nous permet donc d'écrire la relation suivante :

$$\left(M_{Al}/M_{Oxyde}\right)_{ST} = \frac{x M_{Al}}{y M_{Oxyde}} \quad (1.3)$$

En prenant en compte la fine couche d'alumine (Al_2O_3) naturellement présente en surface des nanoparticules d'Al, nous pouvons considérer la pureté P correspondant au taux d'Al actif de la nanoparticule pour pouvoir exprimer de façon précise le rapport massique X entre métal et oxyde :

$$X = \frac{\emptyset \times (M_{Al}/M_{Oxyde})_{ST}}{P + \emptyset \times (M_{Al}/M_{Oxyde})_{ST}} \quad (1.4)$$

Les rapports massiques stœchiométriques de différents couples de nanothermites, les enthalpies théoriques des réactions associées, les températures adiabatiques et les produits de réaction finaux calculés à l'équilibre thermodynamique sont listés dans le Tableau 1 ci-dessous (Fischer and Grubelich, 1998).

Tableau 1 : Rapport massique stœchiométriques, températures adiabatiques calculées en tenant compte des changement de phase et enthalpies de réaction de différents couples de nanothermites usuellement utilisés (Fischer and Grubelich, 1998).

Couple oxydant-réducteur	Rapport massique stœchiométrique	Température adiabatique (K)	Enthalpie de réaction massique ($kJ.g^{-1}$)	Enthalpie de réaction volumique ($kJ.cm^{-3}$)	Proportion de gaz ($g.g^{-1}$)
Al-MnO ₂	1 / 2,147	2 918	4,9	19,5	0,4470
Al-CuO	1 / 4,422	2 843	4,1	20,8	0,3431
Al-Fe ₂ O ₃	1 / 2,959	3 135	4,0	16,5	0,0784
Al-NiO	1 / 4,454	3 187	3,4	18,0	0,0063
Al-TiO ₂	1 / 2,221	1 752	1,5	5,5	0,0000
Al-WO ₃	1/4,296	3 253	2,9	14,7	0,1463

Le Tableau 1 montre qu'il existe une grande variété de couples oxydant/réducteur ayant des propriétés énergétiques très différentes. Ainsi, il est possible de choisir le couple suivant les contraintes de l'application choisie. Par exemple, si le poids ou le volume est une contrainte prépondérante, on choisira un couple énergétique performant d'un point de vue massique ou volumique, *i.e.* Al-MnO₂ dans un cas ou Al-CuO dans l'autre. Par ailleurs, l'ensemble de ces couples ont en commun une forte température de réaction, de 1 800 à 3 300 K, raison pour laquelle les thermites sont principalement utilisées depuis leur découverte au XIX^{ème} siècle pour divers usages civils tels que la

découpe de métaux, la soudure, mais aussi la synthèse de matériaux. Par exemple, les thermites à base d'oxyde de fer sont utilisées historiquement pour la soudure de rails de chemin de fer, grâce à l'application locale de chaleur permettant la fusion des matériaux et l'apport de fer lors de la réaction permettant la soudure. De façon similaire, les thermites à base d'oxyde de cuivre peuvent servir à souder des tubes épais de cuivre pour des connections électriques.

Cependant, la forte enthalpie de réaction couplée à une haute température de flamme ne fait pas tout. En effet, les thermites ont souffert jusqu'ici de leur faible réactivité, de l'ordre du $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$, ne permettant pas une pleine exploitation de leur potentiel énergétique. Cette faible réactivité est principalement due à l'utilisation de composés sous forme de poudre macroscopique limitant le transport de l'oxygène d'un matériau à l'autre. Or, la diminution de la dimension de ces matériaux a ouvert la voie à des nouveaux développements.

1.2. L'apport de la nanostructure

L'évolution des technologies au cours des deux dernières décennies ayant permis la production de poudres nanométriques¹, ou *nanopoudres*, d'Al (Jiang and Yatsui, 1998; Kwon *et al.*, 2001) ou d'oxydes métalliques a fortement impacté le domaine des matériaux aluminothermiques. En effet, la diminution de la taille des éléments constitutifs a engendré une augmentation des performances énergétiques grâce notamment à l'augmentation importante des surfaces en contact entre oxydant et réducteur.

Plus précisément, le premier apport de la nanostructuration est géométrique, ou tout du moins surfacique. En diminuant la taille de la particule, on augmente sa surface spécifique, c'est à dire le rapport entre sa surface et sa masse. A titre d'exemple, une particule d'aluminium de 30 μm de diamètre possède une surface spécifique d'environ $0,07 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ contre $74 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ pour une particule de même nature avec un diamètre de 30 nm. Ainsi, lorsqu'on réduit le diamètre d'une particule d'un facteur 1 000, on augmente la surface spécifique du même facteur, soit une augmentation de 100 000 %. Une telle augmentation a pour conséquence directe de favoriser grandement le contact entre le métal et l'espèce oxydante et améliore ainsi la réactivité de la nanothermite.

En plus d'augmenter les surfaces spécifiques, la nanostructuration exalte les propriétés de la matière lors de la réduction d'échelle. Ainsi, le rapport entre le nombre d'atomes en surface, moins stables et plus réactifs, et le nombre d'atomes dans la matrice augmente considérablement avec la diminution du diamètre de la nanoparticule. Cette exaltation peut se traduire entre autres par une diminution de la température de fusion du matériau par rapport à son état massif. Expérimentalement vérifié pour divers matériaux

¹ Une poudre peut être qualifiée de nanométrique lorsqu'elle est composée de particules de taille inférieure à 100 nm. Dans la suite du manuscrit, une poudre nanométrique sera dénommée par commodité *nanopoudre*.

comme l'or (Buffat and Borel, 1976), l'étain (Wronski, 1967), l'iridium (Dippel *et al.*, 2001) le plomb (Peters *et al.*, 1997) ou l'aluminium (Eckert *et al.*, 1993; Levitas *et al.*, 2009), ce phénomène est lié à l'augmentation de la contribution de l'énergie de surface dans l'équilibre énergétique du matériau. Eckert *et al.* ont par exemple montré expérimentalement, et dans certaines conditions, une diminution de la température de fusion de l'aluminium de quasiment 100 °C pour une nanoparticule de diamètre 13 nm, au lieu de 660 °C pour le matériau massif (Eckert *et al.*, 1993). D'un point de vue thermodynamique, la dépendance en taille de la température de fusion peut être exprimée par la relation de Gibbs-Thomson (Skripov *et al.*, 1981) :

$$T_m(r) = T_m^b - \left\{ \frac{2T_m^b \sigma_{SL}}{\Delta H \rho_S r} \right\} \quad (1.5)$$

Où T_m représente la température de fusion d'une particule de rayon r , T_m^b la température de fusion du matériau massif, ΔH la chaleur latente de fusion du matériau, ρ_S la masse volumique du matériau solide, σ_{SL} l'énergie d'interface solide-liquide.

Pour l'aluminium, la réaction (1.5) se simplifie de la façon suivante (Levitas *et al.*, 2009) :

$$T_m(r) = 933,67 - \frac{251,618}{r} \quad (1.6)$$

Cette relation thermodynamique peut par ailleurs être corrigée en tenant compte de plusieurs facteurs influençant la température de fusion comme l'épaisseur de la couche d'oxyde possiblement présente en surface, ou des effets de pression liées à la fusion du matériau. Ainsi, Pantoya *et al.* ont montré que la température de fusion des nanoparticules d'Al étaient plus importante que celle prédite par l'équation de Gibbs-Thomson à cause de génération de pression sur la couche externe d'oxyde lors de la fusion de l'Al au cœur de la particule (Levitas *et al.*, 2009).

1.3. Etat de l'art des travaux sur les nanothermites

C'est au milieu des années 1990 que les premiers travaux sur les nanothermites apparaissent aux Etats-Unis. En 1995, le laboratoire de Los Alamos montre expérimentalement et pour la première fois l'augmentation d'un facteur 1 000 de la réactivité d'un mélange de poudres nanométriques d'Al et de MoO₃, en comparaison avec des poudres micrométriques (Aumann *et al.*, 1995). De nombreux travaux ont suivi aux Etats-Unis principalement et en Europe dans une moindre mesure et ont confirmé l'intérêt de la réduction de la taille caractéristique des particules sous 100 nm, notamment pour l'Al.

De 1995 à nos jours, le nombre d'équipes travaillant sur les nanothermites a augmenté très rapidement. La communauté regroupe aujourd'hui une vingtaine d'équipes internationales, basées principalement aux Etats-Unis, en Europe et en Chine. Les diagrammes de la Figure 1 montrent l'évolution du nombre de publications et de citations sur les thermites, couvrant les contributions expérimentales et théoriques, et illustre donc l'intérêt majeur porté par la communauté scientifique pour ce domaine de recherche. Ainsi, le nombre de publications a été multiplié par sept en 20 ans, et l'explosion du nombre de citations à partir de 2009, multiplié par 5, témoigne de l'émergence au niveau international des nanothermites à la fin des années 2 000.

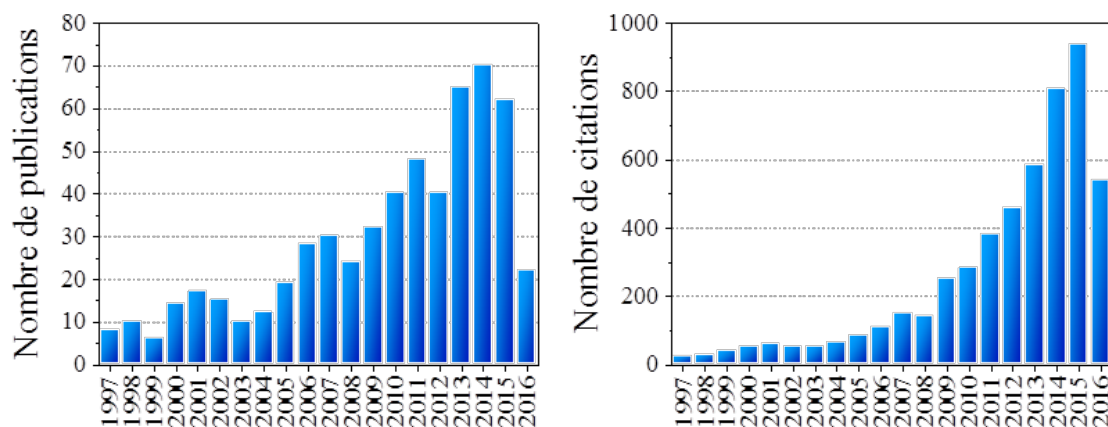


Figure 1 : Evolution du nombre de publications (diagramme de gauche) et du nombre de citations d'articles (diagramme de droite) dont le sujet traite des thermites au cours des 20 dernières années (Web of Science, consultation Septembre 2016).

Parmi les travaux recensés, l'aluminium est très majoritairement couplé avec CuO (Ahn *et al.*, 2013; Bahrami Motlagh *et al.*, 2012; Lanthony *et al.*, 2014; Malchi *et al.*, 2008; Shende *et al.*, 2008), Fe₂O₃ (Park *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013a; Zhou *et al.*, 2010) et MoO₃ (Bockmon *et al.*, 2005; Glavier *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2006; Weismiller *et al.*, 2011), car les réactions d'oxydo-réduction sont les plus exothermiques (voir Tableau 1). D'autres couples métal-oxydes métalliques ont également été étudiés, tels que Al-Bi₂O₃, WO₃ (Glavier *et al.*, 2015; Jacob *et al.*, 2015) ou encore des formes oxydées de l'Iode (Stacy and Pantoya, 2013).

Par exemple, Granier *et al.* (Granier and Pantoya, 2004) ont comparé expérimentalement la vitesse de combustion et la température d'initiation de thermites Al-MoO₃ préparées à partir de deux types de poudres : des particules nanométriques de diamètre inférieur à 200 nm et des particules micrométriques de diamètre 20 μm (Ø = 1,2). Les résultats ont montré que le *temps d'initiation*² de la thermite diminue avec la

² Dans ces travaux, l'initiation est réalisée par laser (50 W, CO₂) et le temps d'initiation correspond à la différence de temps entre l'allumage du laser et la détection d'un signal optique provoqué par la réaction de la nanothermite.

réduction de la taille des particules d'Al de l'échelle « micro » à l'échelle « nano », avec une réduction de 99,7 % des temps d'initiation entre des particules de 20 μm et des particules de 20 nm. Les auteurs relient clairement cette sensibilité accrue à l'initiation par la température de fusion plus basse des nanoparticules d'Al, expliquée dans la section précédente. De plus, une augmentation de la vitesse de combustion est observée lorsque le diamètre des particules diminue de 200 à 50 nm. Au contraire, la vitesse de combustion diminue lorsque le diamètre diminue en dessous de 50 nm, à cause de la contribution trop importante de l' Al_2O_3 contenu dans la couche de protection des particules d'Al. Ce phénomène sera discuté ultérieurement.

Plus récemment, en 2011, Weismiller *et al.* ont étudié l'impact de la réduction en taille des nanoparticules d'Al et d'oxydes MoO_3 et CuO sur les vitesses de combustion des thermites (Weismiller *et al.*, 2011). Les résultats obtenus indiquent alors que la diminution de la taille de l'oxydant est plus favorable que celle de l'Al pour augmenter la réactivité, pour les raisons évoquées précédemment.

Une autre étude menée par Ahn *et al.* confirme ces conclusions et note de plus l'effet morphologique et le compactage des nanoparticules oxydantes sur les vitesses de combustion des thermites (Ahn *et al.*, 2013). Ainsi, les nanocomposites réalisés à partir du mélange de nanoparticules d'Al avec des nano-filaments de CuO ont des vitesses de combustion plus élevées que ceux composés de nanoparticules de CuO sphériques, grâce à une augmentation des surfaces en contact entre réducteur et oxydant.

Ces nombreux travaux concernent principalement des nanothermites élaborées par mélange de *nanopoudres* sphériques. Cependant, d'autres voies de structuration ont été explorées. De façon non-exhaustive, on peut citer les voies de synthèse par procédé sol-gel (Tillotson *et al.*, 2001) où les deux matériaux sont synthétisés ensemble en solution, ou par *arrested milling* qui consiste à broyer ensemble les deux réactants (Schoenitz *et al.*, 2005; Umbrajkar *et al.*, 2006), ainsi que l'utilisation de formes variées de matériaux comme les nano-filaments (Ahn *et al.*, 2013; Shende *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2007) ou les nano-feuillets (Bahrami *et al.*, 2014; Marín *et al.*, 2015). De façon générale, les résultats de ces études confirment les mêmes tendances que celles observées dans le cas de *nanopoudres*, *i.e.* la diminution des dimensions entraîne une amélioration de la réactivité grâce à une meilleure intimité entre les espèces réactives.

Dans ce manuscrit nous limiterons l'analyse autour des *nanopoudres* qui seront à la base de nos travaux de recherche.

1.4. Synthèse, mise en œuvre et propriétés des nanothermites par *nanopoudre*

La méthode la plus répandue de préparation de nanothermites à partir de *nanopoudres* est le **mélange physique de nanoparticules sous ultrasons**, suivi d'une étape de compactage.

Cette méthode est la plus simple à mettre en œuvre. Elle consiste à mélanger deux *nanopoudres* métalliques dans un liquide volatile et inerte, comme l'hexane, et d'agiter l'ensemble à l'aide d'ultrasons afin d'assurer la désagrégation et l'homogénéité du mélange. Les avantages majeurs sont la rapidité et la simplicité de cette technique. Mais les inconvénients sont nombreux. Il est difficile de contrôler au moment de la sonication la dispersion des nanoparticules de chaque type, qui ont tendance à s'agréger entre elles au lieu d'assurer un mélange homogène. De plus, il a été observé que le traitement de trop grandes quantités induit une moins bonne homogénéité du mélange. Enfin, après évaporation du solvant, les composites réalisés sont compactés par l'application d'une pression sur le mélange obtenu pour former un agrégat solide manipulable. Le principe de la méthode de mélange est schématisé sur la Figure 2.

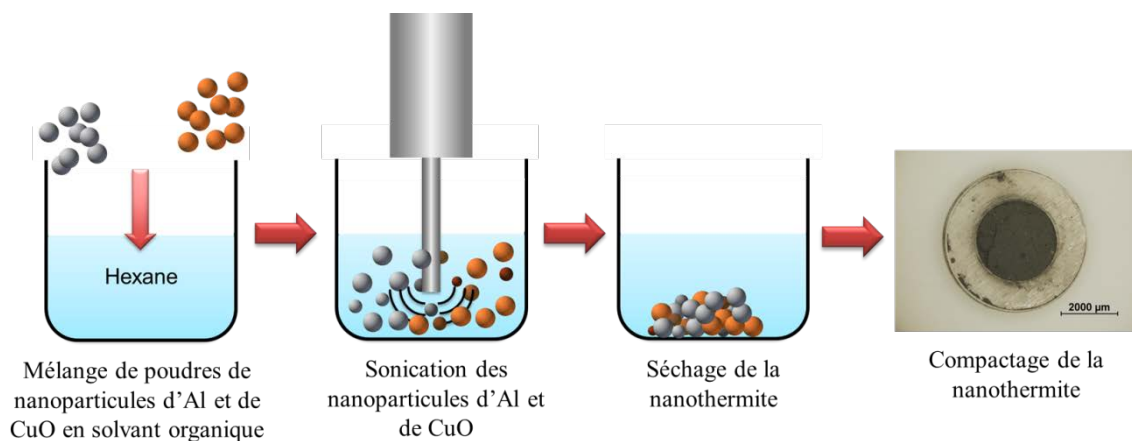


Figure 2 : Schéma de principe de la sonication de nanopoudres en solvant organique volatile avant séchage et compactage de la nanothermite.

Même si cette méthode est simple, très répandue et accessible, aucun industriel ne l'a encore adoptée faute de maîtrise des mélanges obtenus dont les caractéristiques varient d'un lot à l'autre, impactant la fiabilité des performances énergétiques des nanothermites obtenues.

1.5. Paramètres clés influençant les propriétés énergétiques

Outre la dimension des particules, d'autres paramètres influencent grandement les propriétés énergétiques des nanothermites préparées par mélange de *nanopoudres*. Nous limiterons ici la discussion aux principaux paramètres qui sont la nature et l'épaisseur de

la couche de protection des particules d'Al, la stœchiométrie, la nature de l'oxyde métallique associé à l'aluminium, l'organisation des nanoparticules entre elles et leur intimité.

1.5.1. Influence de la couche de passivation

L'Al possède de façon naturelle et systématique une couche d'oxyde en alumine (Al_2O_3), appelée couche de passivation, qui protège le matériau d'une oxydation profonde. Les nanoparticules d'Al n'échappent pas à la règle, et cette couche de passivation autour des particules permet une conservation et une manipulation des poudres à température ambiante et sous oxygène. Cette couche de passivation est visible par Microscopie Electronique à Transmission (notée TEM, pour *Transmission Electron Microscopy*), dont un exemple est présenté en Figure 3. Elle assure aussi la stabilité de la thermité après mélange des réactifs sur une large gamme de température, jusqu'à sa température d'initiation qui déclenche la réaction d'oxydo-réduction par transfert de l'oxygène de l'oxyde au métal.

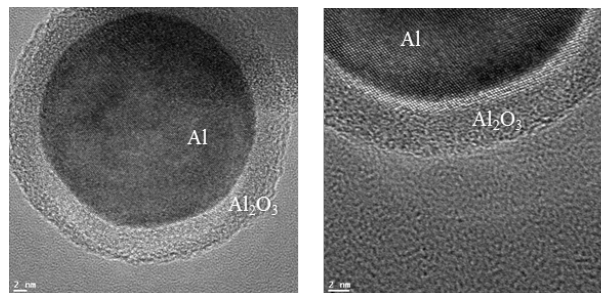


Figure 3 : Images TEM d'une nanoparticule d'Al ALEX®. On observe une structure cœur-coquille, avec le cœur en Al pur et une couche externe de passivation en Al_2O_3 .

Lorsque la taille des particules diminue, la proportion massique d' Al_2O_3 comparée à l'Al pur, appelé Al actif, devient non-négligeable (notamment lorsque les diamètres deviennent inférieurs à 50 nm) et impacte négativement les propriétés thermiques des nanothermites telles que la température de réaction ou la vitesse de combustion (Malchi *et al.*, 2008). Le Tableau 2, issu de la synthèse bibliographique de Piercey et Klapötke (Piercey and Klapötke, 2010), regroupe les données de différentes publications sur le pourcentage d'Al actif en fonction de la taille des nanoparticules, et montre la grande variabilité du pourcentage d'Al actif suivant le fournisseur, car la nature et l'épaisseur de la couche de passivation de la couche d'alumine dépendent fortement du procédé de fabrication des particules (André *et al.*, 2013; Kwon *et al.*, 2001; Sarathi *et al.*, 2007).

Tableau 2 : Evolution du pourcentage d'Al actif en fonction de la taille des nanoparticules (Piercey and Klapötke, 2010).

Taille moyenne de la nanoparticule (nm)	Al actif (%)
30	30
45	64
50	43
50	68
79	81
80	80
80	88

Pour s'affranchir de ces dispersions dans la nature et l'épaisseur de couche d'alumine, quelques travaux ont exploré des techniques de fonctionnalisation de la surface d'aluminium pendant le procédé de fabrication des nanoparticules. La synthèse d'un composé bimétallique Al-Ni en surface des nanoparticules a notamment été réalisé par l'équipe de Foley (Foley *et al.*, 2005). On trouve également la fonctionnalisation de nanoparticules d'Al par divers composés organiques fluorés (Jouet *et al.*, 2005) (Hammerstroem *et al.*, 2011). Cette fonctionnalisation peut avoir un effet positif important sur les performances énergétiques des thermites, comme l'ont montré les travaux de Kappagantula *et al.* (Kappagantula *et al.*, 2012). Les auteurs ont comparé les vitesses de combustion de mélanges Al-MoO₃ réalisés à partir de trois types de nanoparticules d'Al : fonctionnalisées avec acide perfluorotetradecanoïque (PFTD), acide perfluorobasique (PFS) et sans fonctionnalisation. Ils ont montré que les vitesses de combustion avec PFTD étaient 86% plus rapide que sans, tandis que les vitesses de combustion avec PFS étaient plus lentes de 50% que sans. Ces travaux démontrent la possibilité de maîtriser les propriétés des thermites via la fonctionnalisation de surface. Cependant les procédés de fonctionnalisation sont encore complexes, non maîtrisés et coûteux.

1.5.2. Influence de la nature de l'oxydant

Le choix de l'oxyde métallique associé avec l'Al peut influencer grandement les propriétés énergétiques de la nanothermite, en termes de chaleur de réaction (*cf.* Tableau 1), de pression dégagée et de vitesse de combustion. Une étude complète, réalisée par Glavier *et al.* (Glavier *et al.*, 2015)³, compare expérimentalement les caractéristiques de quatre nanothermites Al-CuO, Al-Bi₂O₃, Al-MoO₃ et Al-PTFE⁴, réalisées par sonication de *nanopoudres* commerciales dans de l'hexane. Après sonication dans l'hexane des poudres commerciales pendant 3 min, les nanothermites sont séchées et leur morphologie est caractérisée par imagerie électronique, dont les images sont regroupées en Figure 4

³ Glavier, L., Taton, G., Ducéré, J. M., Baijot, V., Pinon, S., Calais, T., ... & Rossi, C. (2015). Nanoenergetics as pressure generator for nontoxic impact primers: Comparison of Al/Bi₂O₃, Al/CuO, Al/MoO₃ nanothermites and Al/PTFE. *Combustion and Flame*, 162(5), 1813-1820.

⁴ PTFE : PolyTetraFluoroEthylène, est un oxydant organique, plus connu pour ces propriétés adhésives dans les ustensiles de cuisines et par son nom commerciale Teflon.

pour les quatre nanothermites. On peut noter sur les images obtenues par Microscopie Electronique à Balayage (notée SEM, pour *Scanning Electron Microscopy*) et présentées en Figure 4, que l'oxydant varie en forme et en volume : alors que CuO se présente de façon facettée et de taille très inégales (240 ± 50 nm), Bi₂O₃ est de forme ovoïde avec des dimensions allant de $600 \text{ nm} \times 400 \text{ nm}$ à $110 \text{ nm} \times 90 \text{ nm}$, MoO₃ a une distribution en taille très élevée ($2 \text{ }\mu\text{m} \times 6 \text{ }\mu\text{m}$ à $90 \text{ nm} \times 90 \text{ nm}$), et enfin les particules de PTFE sont larges et sphériques de diamètre $1 \text{ }\mu\text{m}$.

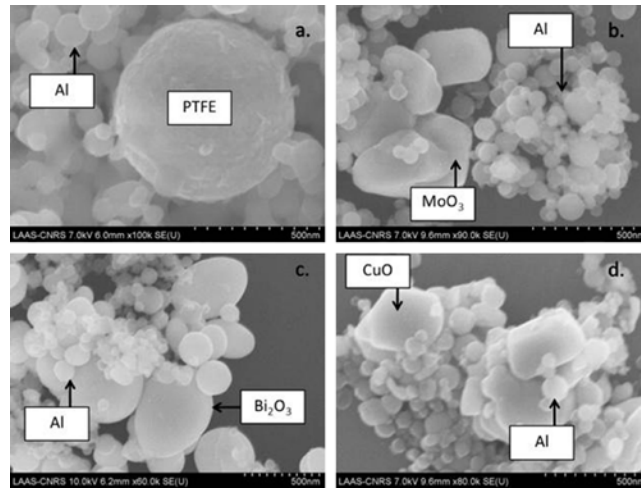


Figure 4 : Images SEM des nanothermites après mélange de poudre (a) Al-PTFE, (b) Al-MoO₃, (c) Al-Bi₂O₃, (d) Al-CuO (Glavier et al., 2015).

Les propriétés thermiques mesurées des quatre nanothermites sont résumées dans le Tableau 3 ci-dessous. La chaleur de réaction et la température d'initiation sont déterminées par DSC, le temps d'initiation et la pression maximale par bombe manométrique, et la vitesse de combustion par caméra rapide en initiant environ 150 mg de nanothermite non-confinée dans une rainure usinée dans du polycarbonate de dimensions $50 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$. Dans la bombe manométrique, la poudre est tassée dans la chambre à un certain taux de compaction, qualifié en pourcentage de Densité Maximale Théorique (notée TMD, pour *Theoretical Maximum Density*, moyenne des densités maximales des matériaux présents dans la poudre).

Tableau 3 : Résumé des propriétés énergétiques (chaleur de réaction, température d'initiation, vitesse de combustion et pression maximale) des quatre nanothermites étudiées (Glavier et al., 2015).

Thermite	Chaleur de réaction		T _{ini} (°C)	Vitesse de combustion (m.s ⁻¹)	Temps d'initiation (μs)	P _{max} (MPa) (30% TMD)
	expérimentale ΔH _{exp} (J.g ⁻¹)	théorique ΔH (J.g ⁻¹)				
Al-Bi ₂ O ₃	1 541	2 115	460	420 ± 10	5	21,6
Al-CuO	1 057	4 072	460	340 ± 20	15	16,7
Al-MoO ₃	1 883	4 698	460	100 ± 4	110	7,4
Al-PTFE	3 494	8 420	400	2 ± 1	550	21,4

Les résultats de Glavier *et al.* montrent que l'association entre l'Al et le PTFE possède la densité d'énergie la plus élevée ($3\,500\text{ J.g}^{-1}$, soit 40 % de la valeur théorique), avec une meilleure sensibilité en température (température d'initiation la plus faible à $400\text{ }^{\circ}\text{C}$) et un dégagement de pression très élevé grâce à la caractéristique organique du PTFE, et donc plus volatile que les métaux. Cependant, la nanothermite présente une réactivité très faible avec une vitesse de combustion très lente et un temps d'initiation élevé, à cause des dimensions micrométriques de l'oxydant.

La nanothermite Al-Bi₂O₃ possède également une forte densité énergétique, avec une chaleur de réaction mesurée (ΔH_{exp}) la plus proche de la valeur théorique (73 %), la réactivité la plus élevée (avec une vitesse de combustion maximale et un temps d'initiation minimale), et une pression dégagée maximale. Étonnamment, le système Al-CuO est le moins énergétique, avec une chaleur de réaction mesurée (ΔH_{exp}) la moins élevée malgré l'une des plus fortes valeurs théoriques. La réactivité est tout de même élevée, avec des vitesses de combustion et une pression maximale à peine plus faibles que celles obtenues avec Bi₂O₃. Cependant, les auteurs notent que pour un pourcentage de TMD supérieur (50 %), la pression maximale est supérieure à toutes les autres nanothermites, atteignant $41,7\text{ MPa}$. Enfin Al-MoO₃ possède une densité énergétique très élevée, avec $1\,900\text{ J.g}^{-1}$ de chaleur libérée par la réaction, mais possède la vitesse de combustion la plus faible des nanothermites à base d'oxyde métallique. La durée d'initiation est également la plus élevée, et le dégagement de pression la plus faible.

Les différences observées pour ces trois dernières nanothermites à base d'oxyde métallique peuvent s'expliquer par les caractéristiques physico-chimiques en termes de température de changement d'état et de degré d'oxydation des oxydes utilisés. En effet, le bismuth possède une température de fusion et d'ébullition particulièrement faible (533 K et $1\,837\text{ K}$ respectivement) comparativement au cuivre ($1\,358\text{ K}$ et $2\,843\text{ K}$ respectivement) et surtout au molybdène ($2\,896\text{ K}$ pour la température de fusion). Dans le cas d'Al-CuO, le CuO se convertit dans un premier temps en Cu₂O en libérant de l'oxygène réagissant avec l'Al. C'est dans un second temps, lorsque la température de réaction devient suffisamment élevée qu'on observe la vaporisation de l'Al et du Cu. C'est pourquoi à faible pourcentage de TMD, la réaction incomplète de décomposition de CuO en Cu₂O peut entraîner moins de pression. Dans le cas d'Al-Bi₂O₃ et d'Al-MoO₃, la pression est générée par la vaporisation de MoO₃ et la décomposition de Bi₂O₃ en bismuth et oxygène. Les températures élevées de changement de phase du molybdène expliquent donc la faible pression dégagée, car le molybdène est absent de la phase gaz, au contraire du bismuth qui se vaporise et se décompose très facilement, expliquant le haut taux de transformation énergétique (ΔH_{exp} à 73 % de la valeur théorique).

Ces travaux montrent que le choix de l'oxyde est primordial sur les différentes caractéristiques thermiques des nanothermites, et joue notamment sur le dégagement d'espèces en phase gaz et donc la pression générée, mais également sur la réactivité.

1.5.3. Influence de la stœchiométrie

Nous avons défini dans les généralités (section 1.1) la notion de stœchiométrie et de rapport massique. Ce paramètre peut aisément être ajusté de façon à maîtriser les propriétés thermiques. Ainsi, dans un environnement neutre, *i.e.* sans oxygène, la réaction entre l'oxyde et l'Al est théoriquement complète et l'enthalpie de réaction maximale pour un rapport massique stœchiométrique ($\emptyset = 1$) (*cf.* colonne 2 du Tableau 1).

Sous air, le comportement réactionnel est différent. En effet, les performances optimales sont obtenues pour des mélanges avec excès d'Al (\emptyset souvent compris entre 1,2 et 1,4), même si classiquement de nombreuses équipes se placent à la stœchiométrie ($\emptyset = 1$) dans leur étude. L'équipe de Dutro, en 2009, a étudié l'effet du rapport massique sur le comportement en combustion de nanothermites à partir de nanoparticules d'Al et de MoO_3 (Dutro *et al.*, 2009). Les auteurs ont identifié trois régimes de combustion suivant la proportion d'Al :

- Une vitesse de propagation de flamme très rapide entre 10 à 65 % d'Al.
- Une propagation plus variable qui s'accélère autour de 70 %.
- Une combustion très lente entre 75 et 85 %.

Des études similaires ont été menées par d'autres équipes sur le système Al- Fe_2O_3 (Park *et al.*, 2010). Ces quelques études expérimentales illustrent l'influence importante de la proportion relative d'Al et d'oxygène, notamment sur les réactions intermédiaires entre les espèces Al et oxyde métallique, mais les connaissances scientifiques sont encore insuffisantes pour prédire quantitativement les chemins réactionnels et les composés issus des réactions (AlO_x , MO_x , AlMO_x).

1.5.4. Influence de l'organisation des nanoparticules et de leur intimité

De nombreuses hétérogénéités peuvent exister dans les poudres et influencer les paramètres énergétiques finaux. Sun *et al.* se sont intéressés à l'impact de l'hétérogénéité des tailles de nanoparticules d'Al sur les propriétés thermiques et ont montré qu'une distribution en taille plus grande des nanoparticules peut impliquer une baisse de la température d'initiation de 40°C (Sun *et al.*, 2006a). D'autres travaux ont montré que la présence d'impuretés induites par la synthèse de nanothermites Al- WO_3 par synthèse sol-gel entraînait une diminution des vitesses de combustion lorsque la poudre était très compacte (Prentice *et al.*, 2006). Ces travaux illustrent l'impact de l'homogénéité sur les performances énergétiques, positif si ajout d'impuretés comme des dérivés carbonés qui contribuent à la réaction, ou négatif à cause par exemple de l'écrantage des réactifs, et insistent donc sur la nécessité de maîtriser l'organisation et le mélange des nanoparticules. Afin de résoudre les problèmes d'homogénéité induits par le mélange de nanoparticules par ultrasons, quelques solutions ont été explorées, visant à favoriser l'assemblage des particules Al et oxydes métalliques entre elles et défavoriser l'attraction

des particules Al-Al et oxyde-oxyde. On notera trois approches originales publiées ayant abouti à des résultats confirmant l'importance de l'organisation des particules dans le mélange :

1. Par modification de la charge de surface.
2. Par utilisation de feuilles de graphène.
3. Par brin d'ADN.

Modification de la charge de surface

Kim *et al.* ont utilisé la force électrostatique pour favoriser l'assemblage des nanoparticules métal-oxyde et défavoriser les interactions métal-métal et oxydes-oxydes en chargeant les nanoparticules en aérosol (Kim and Zachariah, 2004). Le schéma de principe est présenté en Figure 5.

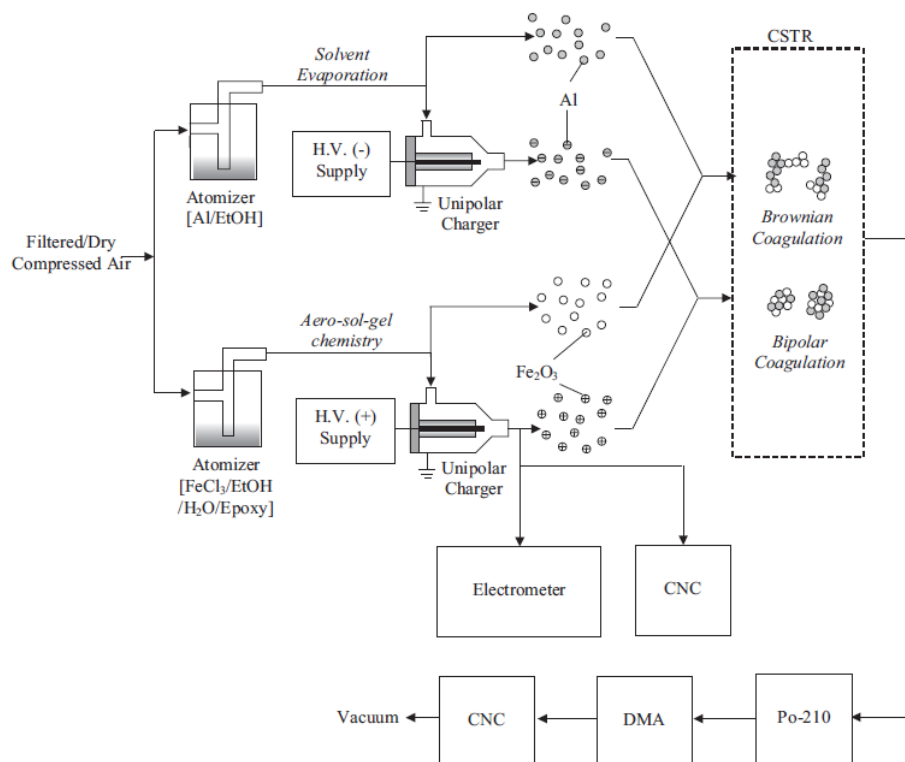


Figure 5 : Schéma représentant le dispositif de fonctionnalisation de nanoparticules d'Al et de Fe₂O₃ par charge électrostatique en aérosol (Kim and Zachariah, 2004).

Ils ont comparé la chaleur de réaction dégagée par un composite Al-Fe₂O₃ synthétisé à partir d'aérosols de nanoparticules d'Al et de Fe₂O₃ chargées (assemblage électrostatique) ou non (assemblage brownien aléatoire) et ont obtenu une amélioration de la chaleur de réaction mesurée par DSC (voir section 1.1) de 0,7 kJ.g⁻¹ à 1,8 kJ.g⁻¹. De plus, l'intensité lumineuse bien supérieure dégagée lors de l'initiation par éclair électrique du composite auto-assemblé (Figure 6) confirme le gain apporté par cette méthode de structuration.

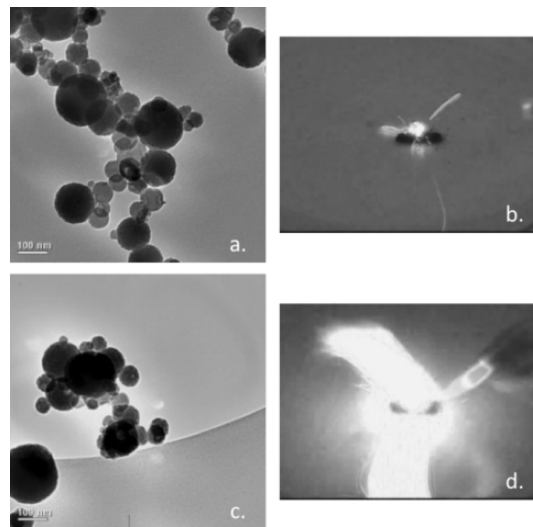


Figure 6 : Morphologie de nanocomposites Al-Fe₂O₃ et photographies de leur initiation thermique produits par assemblage brownien aléatoire (a et b) et auto-assemblage électrostatique (c et d) (Kim and Zachariah, 2004).

Suivant la même idée d'assemblage dirigé par forces électrostatiques, Malchi *et al.* ont fonctionnalisé la surface des nanoparticules Al et CuO avec des ligands de charge opposée, COOH(CH₂)₁₀NMe₃⁺ pour Al et SH(CH₂)₁₀COO⁻ pour CuO. (Malchi *et al.*, 2009). On peut noter par ailleurs que cette technique d'auto-assemblage fut également appliquée avec succès pour l'auto-organisation de systèmes nanoparticulaires binaires Ag-Au (Kalsin *et al.*, 2006), suggérant l'universalité de la méthode utilisée. Ils ont alors obtenu une vitesse de combustion de 285 m.s⁻¹ (avec 17 % d'erreur). De plus, l'initiation d'un nanocomposite issu de l'assemblage de nanoparticules fonctionnalisées avec des ligands neutres, non chargés, de longueur équivalente n'a pas été possible, démontrant l'efficacité de la méthode d'auto-assemblage et le rôle inhibiteur négatif du ligand organique qui induit une dilution du matériau énergétique du fait de sa présence.

D'autres travaux de Shende *et al.* illustrent la possibilité d'auto-assemblage de nanoparticules par fonctionnalisation de nano-bâtonnets ou nano-filaments de CuO avec le polymère Poly(4-vinylpyridine) (Shende *et al.*, 2008). Ce polymère possède plusieurs sites d'accroche ayant une grande affinité avec les surfaces d'oxydes métalliques comme l'Al₂O₃. La Figure 7 montre les images TEM des nanocomposites obtenus. Les auteurs précisent avoir obtenu de bien meilleures vitesses de combustions pour les structures auto-assemblées (2 400 m.s⁻¹ pour les nanocomposites Al-CuO en nano-bâtonnets auto-assemblés pour 1 650 m.s⁻¹ pour les mêmes nanocomposites non-auto-assemblés).

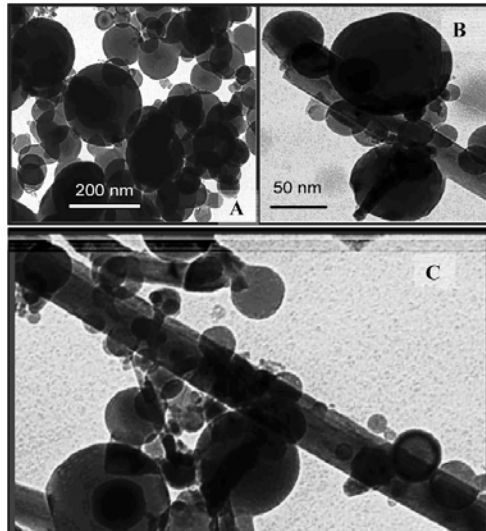


Figure 7 : Images TEM de nanoparticules d'Al (A), de nanoparticules d'Al auto-assemblées autour de nano-bâtonnets de CuO (B) et d'un nanocomposite montrant la continuité de la structure (C) (Shende et al., 2008).

Utilisation de feuille de graphène

Une approche novatrice en matière d'assemblage de nanoparticules, récemment présentée par Thiruvengadathan *et al.* (Thiruvengadathan *et al.*, 2014), propose l'utilisation de feuilles de graphène oxydé. Connues pour leurs propriétés optiques et de transfert thermique, les feuilles de graphène ont ici un rôle de matrice sur laquelle viennent se greffer les nanoparticules d'Al et de Bi₂O₃. En effet, les feuilles de graphène au potentiel Zeta⁵ négatif dans les conditions expérimentales décrites par les auteurs (-58,57 mV), et les nanoparticules d'Al et de Bi₂O₃ au potentiel Zeta fortement positif (+70,14 mV et +39,71 mV respectivement) s'attirent électrostatiquement les uns vers les autres. Les auteurs ont montré qu'un greffage fort et covalent s'opère entre les fonctions hydroxyles de la nanoparticule d'Al et les groupes hydroxyles ou carboxyliques du graphène, tandis que les forces s'établissant entre le Bi₂O₃ et le graphène étaient plus faibles (van der Waals et électrostatique longue portée). D'un point de vue énergétique, la structuration par feuille de graphène a permis un abaissement de la température d'initiation de 50 °C et une augmentation de la chaleur de réaction de quasiment 100 % comparé à un mélange physique classique de nanoparticules d'Al et de Bi₂O₃. Ces travaux semblent montrer que le graphène participe en tant que combustible grâce à l'apport de carbone que l'on connaît comme bon réducteur. Cette méthode novatrice et prometteuse est cependant limitée par le fait que le positionnement des nanoparticules n'est pas assuré suivant leur nature, mais seulement aléatoirement sur une structure de graphène.

⁵ Le potentiel Zeta décrit la différence de potentiel entre la surface d'une particule et le solvant dans laquelle elle est dispersée. Il permet d'évaluer la stabilité d'une solution colloïdale et les changements de chimie de surface. Cette notion sera détaillée plus tard.

Par brins d'ADN

Le LAAS a proposé en 2010 d'exploiter les propriétés de reconnaissance de l'ADN pour diriger l'assemblage de nanoparticules d'Al et CuO. Une étude préliminaire a permis de démontrer la faisabilité de ce nouveau concept d'assemblage de nanoparticules par ADN (Séverac *et al.*, 2012). Ce concept innovant consiste à fonctionnaliser séparément les nanoparticules d'Al et de CuO avec des brins d'ADN complémentaires, avant de les mélanger. Les brins d'ADN complémentaires se reconnaissent et s'hybrident en formant la célèbre structure en double-hélice. L'hybridation dirige l'assemblage, favorisant ainsi le placement des particules métalliques et d'oxydes métalliques. La Figure 8 montre un composite obtenu par auto-assemblage de nanoparticules d'Al et de CuO. Ce travail publié en 2012 a permis de noter, dans certaines conditions, une amélioration des performances sur l'assemblage dirigé par ADN par rapport à la même thermité obtenue par mélange de poudre de même taille, notamment par une augmentation de la chaleur de réaction de 200 J.g^{-1} à $1\,500 \text{ J.g}^{-1}$ prouvant l'intérêt de diriger l'assemblage des particules. Outre ces résultats prometteurs, ce travail a surtout mis en évidence la difficulté de contrôler les interactions spécifiques ADN-ADN et d'attribuer clairement les améliorations à la seule contribution de l'ADN dans l'organisation des particules.

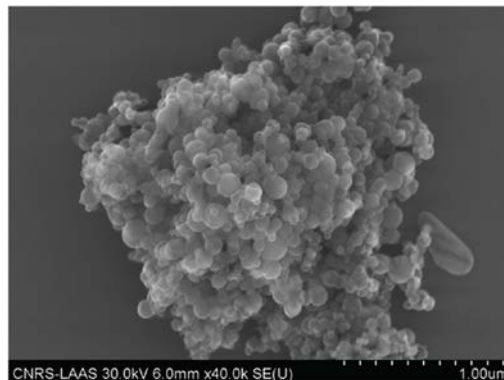


Figure 8 : Image MEB d'un nanocomposite obtenu à partir de l'auto-assemblage de nanoparticules d'Al et de CuO par ADN (Séverac *et al.*, 2012).

L'état de l'art des quelques travaux récents américains et du LAAS sur les diverses méthodes d'auto-assemblage ont clairement illustré l'intérêt d'améliorer l'organisation de la matière pour contrôler les réactions aux interfaces, mais ont aussi pointé les lacunes pour une exploitation de ces solutions dans la synthèse de matériaux pour des applications réelles. En effet, les quelques efforts sont restés au stade de l'étude préliminaire de laboratoire sans réelle analyse scientifique et sans valorisation de ces techniques pour synthétiser des nanothermites fonctionnelles et adaptées aux applications. Par exemple, la compatibilité des méthodes d'assemblages avec les technologies de report n'a jamais été abordée.

1.6. Synthèse et objectif de recherche

Après deux décennies de travaux nombreux aux USA et en Europe sur les nanothermites, nous retiendrons que, de façon générale, la réduction de la taille des constituants grâce aux nanotechnologies a permis une amélioration très nette des vitesses de combustion et un abaissement de la température et des temps d'initiation. Ce bénéfice n'existe plus lorsque le diamètre des nanoparticules d'Al devient inférieur à 50 nm à cause de la contribution de la couche d'alumine. Nous retiendrons les points suivants :

1. La dimension caractéristique des particules utilisées dans ces matériaux énergétiques se situe entre 80 et 120 nm. Comme l'ont démontré de nombreuses études, l'intérêt de la réduction des dimensions disparaît lorsque les diamètres de l'Al et de l'oxyde deviennent inférieurs à 50 nm à cause de la trop forte proportion d' Al_2O_3 passivant le métal et pénalisant la réaction en limitant le transfert de l'oxygène. Expérimentalement, la vitesse de propagation de flamme apparaît indépendante de la taille de la nanoparticule en dessous de 100 nm de diamètre (Bockmon *et al.*, 2005), tandis que le temps d'initiation est indépendant de la taille de la nanoparticule sous 120 nm (Granier and Pantoya, 2004). Ainsi, réduire les dimensions des particules n'apporte pas d'amélioration notable sur la réactivité.

2. Le choix de l'oxyde est très important et surtout fonction de l'effet désiré : génération de gaz, gamme de température, *etc...* Suivant la nature de l'oxyde, les températures de réaction et les espèces dégagées sont très variables (*cf.* Tableau 1). C'est un des atouts de cette catégorie de matériaux, leur ouvrant des perspectives nombreuses d'applications dans des domaines très variées comme la soudure (Bahrami Motlagh *et al.*, 2012), l'armement pyrotechnique sécurisé (Taton, 2013), la micro-propulsion à forte ou faible pression (Apperson *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2009). Cependant, aujourd'hui les chimies de décompositions des nanothermites sont peu connues et **des progrès sont très attendus pour la diffusion de ces matériaux dans les applications**. Les données théoriques en termes de chaleur de réaction et espèces générées, sont basées sur des calculs thermodynamiques à l'équilibre très éloignés des conditions expérimentales rencontrées, où les cinétiques de réactions hors équilibre sont très rapides. Il est donc impossible à ce jour de quantifier les effets précis de la composition de la nanothermite, de la taille et arrangement des nanoparticules sur les performances de la réaction mais les quelques études expérimentales préliminaires ont abouti à quelques conclusions qualitatives. Ainsi, par exemple, si l'objectif est de produire de la pression, les oxydes métalliques à faible température de fusion comme I_2O_3 et Bi_2O_3 sont préférés, grâce à la vaporisation d'espèces métalliques générées par la réaction. **Dans notre étude, nous choisirons l'oxyde de cuivre qui possède l'avantage d'avoir une des plus fortes enthalpies de réaction avec l'Al, disponible**

dans le commerce à l'état nanoparticulaire, et parce qu'il existe un nombre important de travaux sur ce couple nanothermique.

3. Tout comme le choix de l'oxyde, la façon dont sont organisées les nanoparticules entre elles impacte très fortement les propriétés énergétiques et réactionnelles du matériau. La réaction entre Al et oxyde ayant lieu aux interfaces, l'arrangement entre les particules d'Al et d'oxydes impacte directement les surfaces spécifiques en contact après mélange, et donc la réactivité. Ce point est clairement illustré dans les travaux expérimentaux récents qui explorent des ligands chimiques ou biologiques pour favoriser les interactions Al-oxydes au détriment des interactions Al-Al ou oxyde-oxyde. Aujourd'hui la maîtrise de l'organisation et de la structuration des nanoparticules reste **un enjeu technologique majeur, constituant le cœur de mon sujet de recherche, pour aboutir à des nanothermites optimisées et aux propriétés finement contrôlées et adaptables à l'application visée.** Nous avons présenté la proposition de l'équipe d'explorer l'ADN pour favoriser l'assemblage entre les nanoparticules. L'ADN, outre des propriétés de reconnaissance moléculaire bien connues offre aussi une flexibilité dans l'organisation de l'assemblage réglable par la longueur du brin d'ADN, le choix de sa séquence, et aussi par l'ajout possible de fonctions biologiques ou chimiques variées. Ce choix a également été motivé par l'essor des nanotechnologies ADN d'une manière générale, offrant une riche base d'outils moléculaires, ouvrant la perspective d'assemblages multiples et complexes contrôlés à l'échelle nanométrique. **Ma thèse se construira en continuité avec les premiers travaux menés au LAAS avec comme objectif ultime de développer une technologie d'auto-assemblage de nanoparticules d'Al et CuO caractérisée, contrôlée et reproductible, permettant la conception et la synthèse d'une nouvelle génération de thermites, appelées nanobiocomposites, aux performances énergétiques améliorées et surtout finement contrôlables.** Le défi de ce travail est essentiellement lié à la transposition de l'ADN hors de son contexte biologique pour en faire un outil technologique, interfaçant matière minérale et organique, tout en gardant la compatibilité, à terme, avec les procédés microélectroniques, demandeurs d'une reproductibilité rigoureuse.

Avant de détailler les objectifs scientifiques et technologiques précis de la thèse en dernière partie, une deuxième partie illustre les pouvoirs de l'ADN pour structurer la matière en assemblages tridimensionnels ordonnés à complexité variable.

2. L'ADN, brique technologique de structuration de la matière

Depuis 20 ans, l'Acide Désoxyribose Nucléique, ou plus communément appelé ADN, est apparu comme un outil technologique à part entière à l'échelle nanométrique, grâce à ses propriétés de reconnaissance moléculaire. Puces de détection à ADN, livraison ciblée de médicaments, structuration de nanoparticules, origamis, stockage d'information, l'ADN est devenu le centre de l'attention d'une grande communauté de scientifiques grâce à ses propriétés de reconnaissance moléculaire à l'échelle nanométrique et au développement de techniques de synthèse fiables et peu chères. Nous proposons donc dans cette partie de rappeler brièvement l'histoire et la structure de l'ADN, de définir les nanotechnologies ADN, d'en présenter quelques exemples, puis de développer les techniques sur l'auto-assemblage de nanoparticules grâce à l'ADN.

2.1. Quelques notions historiques sur l'ADN

C'est en 1869 que le biologiste Friedrich Miescher isole pour la première fois une substance riche en phosphore issue du noyau de cellules, dont il identifie rapidement son rôle prépondérant dans la structuration du vivant. Un siècle de recherche plus tard, la structure en double hélice de l'ADN est précisément décrite après la publication par James Watson et Francis Crick dans la revue *Nature* en 1953. A l'image du binaire pour l'informatique, l'ADN code l'ensemble des informations liées au monde vivant. La force de l'ADN tient dans le stockage double de l'information à travers l'association de deux brins complémentaires, autorisant une transmission semi-conservative de l'information génétique lors de la division cellulaire avec un taux d'erreur minimal. Ces brins sont une association de quatre bases élémentaires, organisées en gènes, eux-mêmes organisés en chromosomes. Afin de donner un ordre de grandeur, on compte chez l'être humain 3,4 milliards de paires de bases dans l'ensemble du génome, pour environ 26 000 gènes organisés en 23 paires de chromosomes. A titre de comparaison, l'un des plus petits génomes connus, le virus de la grippe, contient 13 000 bases, et le plus grand génome, possédé par l'amibe *Polychaos dubium*, un eucaryote microscopique, contient 675 milliards de bases.

Cette connaissance du rôle du génome dans la structuration du vivant a bouleversé l'approche de la médecine et de la biologie à l'aube du XXI^{ème} siècle. Les thérapies géniques, le clonage, l'agriculture, l'utilisation de l'ADN par la police scientifique ou plus récemment pour l'anthropologie et la recherche sur l'évolution des espèces au cours des millénaires sont autant d'exemples non-exhaustifs démontrant le rôle primordial de l'ADN dans la recherche aujourd'hui. Cet intérêt s'est couplé à un développement intense des techniques liées à l'extraction et la purification de l'ADN telles que la PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase), et donc à l'analyse du génome, et enfin à la synthèse d'ADN. De nos jours, il est possible de synthétiser avec précision une séquence d'ADN de 200

bases à moindre coût, avec la possibilité de modifier la séquence par ajout d'une grande variété de fonctions chimiques (groupes fonctionnels, chaînes carbonées, fonctions fluorescentes, protéines...), rendant cet outil disponible pour un grand nombre d'applications.

2.2. Structure chimique de l'ADN

L'ADN est un polymère constitué par la répétition aléatoire de briques élémentaires, les **nucléotides**. Un nucléotide est composé d'un groupe phosphate, relié à un groupe désoxyribose (ou sucre), lui-même relié à une **base nucléique**. On dénombre quatre bases nucléiques principales : l'Adénine, la Thymine, la Cytosine et la Guanine. L'association, ou la polymérisation, des nucléotides se fait par établissement d'une liaison covalente entre le groupe phosphate et le groupe sucre. On appelle le résultat de cette polymérisation un **polynucléotide**. On parle également d'oligonucléotides lorsque le nombre de bases considéré est peu important, *i.e.* compris entre 5 et 50 bases. La structure d'un segment d'ADN et des quatre bases nucléiques est donnée en Figure 9.

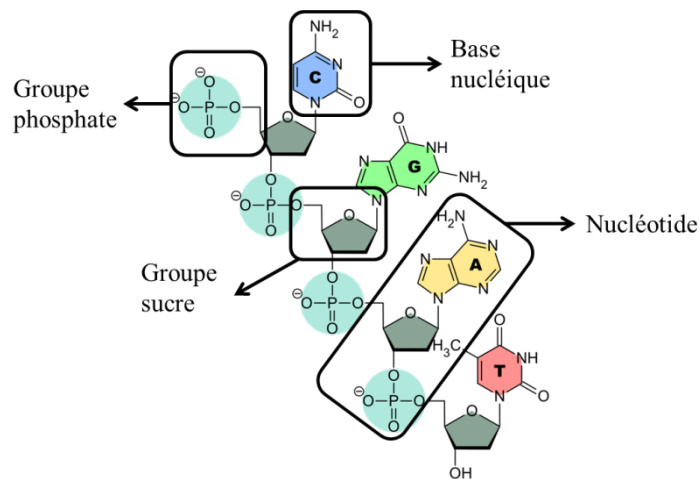


Figure 9 : Fragment d'ADN composé de quatre nucléotides, eux-mêmes constitués d'un groupe phosphate, d'un groupe désoxyribose, et d'une base nucléique. Les quatre différentes bases nucléiques sont présentées dans ce fragment : Adénine (A), Thymidine (T), Guanine (G), Cytosine (C).

La force de l'ADN réside dans la complémentarité de ses bases, plus précisément entre les bases A et T d'une part et les bases C et G d'autre part. Cette complémentarité est possible grâce à leur structure chimique permettant l'établissement de liaisons hydrogène. On dénombre ainsi 2 liaisons hydrogène entre les bases A et T et 3 liaisons entre les bases C et G, comme le montre le schéma en Figure 10.

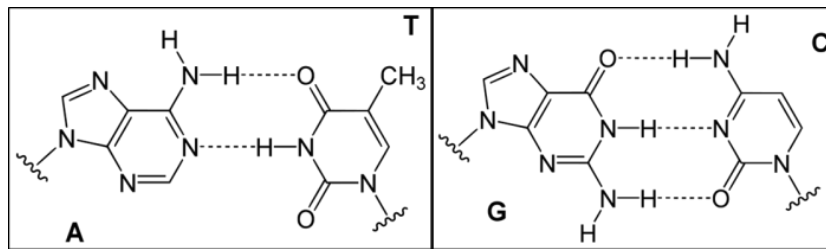


Figure 10 : Complémentarités par liaison hydrogène des bases A et T et des bases C et G.

Dans les conditions environnementales adéquates (pH, concentration saline, température), 2 polynucléotides complémentaires s'associent spontanément par l'appariement des bases complémentaires, formant la célèbre structure en double hélice. Cette structure est stable dans les conditions physiologiques malgré l'absence de liaisons covalentes grâce à la double action des liaisons hydrogènes et de l'empilement des cycles désoxyriboses. Cependant, les liaisons H restent une liaison faible, et un apport d'énergie telle qu'une élévation de la température peut amener la structure à rompre. On parle alors de température de fusion de l'ADN, notée T_m . De même, en milieu peu salin, ou en pH acide ou basique, les liaisons hydrogènes peuvent rompre et amener à une « dé-hybridation » de l'ADN, voire à une dégradation et une rupture des monobrinns.

2.3. Les nanotechnologies ADN

La puissance de l'ADN tient dans la spécificité chimique inégalable de la complémentarité des polynucléotides. Cette force a permis la complexification du vivant au cours des millénaires grâce à une transmission robuste de l'information d'une unité à l'autre. Or aujourd'hui, avec le développement des techniques de synthèse et l'avancée de la compréhension des mécanismes biologiques, l'ADN devient un outil technologique puissant ouvrant une nouvelle page de la technologie : **les nanotechnologies ADN**. Cependant, sa structure stable dans un environnement spécifique définit un certain nombre de limites aux nanotechnologies ADN, que nous allons développer dans la prochaine section.

Les nanotechnologies ADN regroupent de nombreux domaines scientifiques, de la chimie biomoléculaire à l'ingénierie de l'électronique. La terminologie désigne de façon générale la conception et la fabrication d'acides nucléiques artificiels à visée technologique. Au-delà de cette définition, les nanotechnologies ADN concernent aussi bien le développement de structures en deux ou trois dimensions, de nanorobots porteurs de médicament, ou encore la conception d'ordinateurs dont la logique est assurée par la réaction entre brins d'ADN. Plusieurs exemples d'applications sont détaillés dans la section suivante.

C'est au début des années 1980 que le concept de « nanotechnologie ADN » a vu le jour, avec les travaux de Nadrian Seeman sur l'étude de jonctions de brins d'ADN

permettant l'élaboration de mailles périodiques en deux ou trois dimensions (Seeman, 1982). Depuis ces travaux pionniers, ce domaine de recherche s'est intensément développé à partir des années 2000, comme le montre l'explosion du nombre de publications sur le sujet, multiplié par 70 entre 1998 et 2015, présenté en Figure 11.

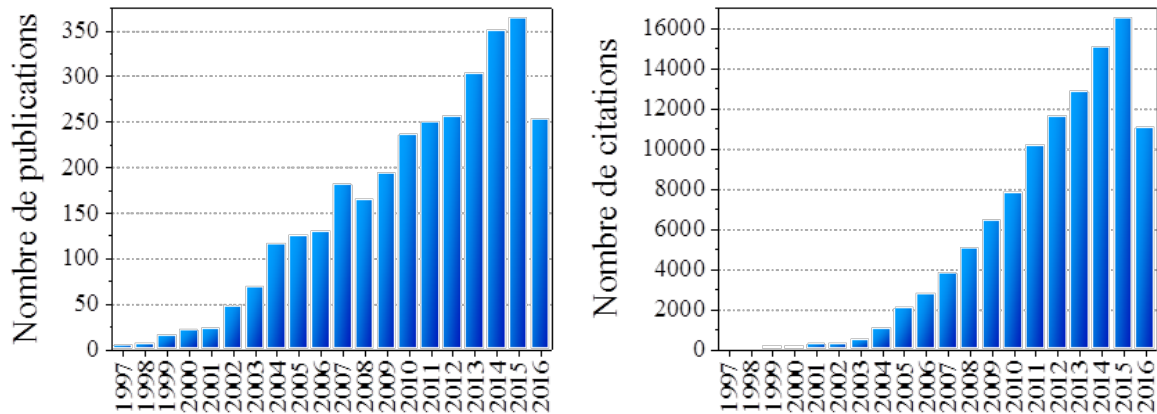


Figure 11 : Evolution du nombre de publications scientifiques (graphique de gauche) et du nombre de citations (graphique de droite) dont le sujet traite les nanotechnologies ADN (Web of Science, consultation Septembre 2016).

Les nanotechnologies ADN peuvent se diviser en deux catégories :

- **Les nanotechnologies structurantes à base d'ADN**, englobant la synthèse de mailles périodiques, de structures tridimensionnelles appelées origamis⁶, ou comme élément structurant de matériaux biologiques (protéines, fonctions chimiques, ...) ou physiques (nanoparticules métalliques, quantum dots, ...) hétérogènes en nature des oligonucléotides.
- **Les nanotechnologies à base d'ADN dynamiques**, englobant la conception de nanorobots capables de prendre et délivrer un objet (médicament, protéine), de brins d'ADN « marcheurs » capables de se déplacer le long d'un rail d'ADN, ou encore le déplacement en cascade de brins d'ADN à la base de portes logiques pour l'élaboration de calculateurs biologiques.

2.4. Les applications des nanotechnologies ADN

2.4.1. Les applications biomédicales

L'un des premiers domaines d'applications possibles des nanotechnologies ADN est l'univers biomédical. Que ce soit pour l'imagerie, la détection biomoléculaire, ou les nano-robots livreurs de médicaments, l'ADN peut jouer un rôle clé technologique. Dans

⁶ Un origami est une structure formée à partir de brins d'ADN. Suivant la séquence utilisée, il est possible de créer des figures géométriques complexes en 2D ou 3D comme des boîtes.

le domaine de l'imagerie, Joseph Wang a par exemple mis au point un nano-robot capable de détecter une cellule contenant une séquence d'ADN spécifique (Esteban-Fernández de Ávila *et al.*, 2015). L'idée est de transporter un monobrin d'ADN fonctionnalisé avec un fluorophore dans une cellule en utilisant un nanofil d'or recouvert d'une feuille de graphène comme transporteur. Sur le nanofil, le fluorophore est désactivé à cause du graphène qui joue le rôle d'extincteur du fluorophore. Une fois dans la cellule, le monobrin d'ADN peut s'hybrider sur la séquence cible et quitte le nanofil d'or. Le fluorophore redevient actif, permettant d'identifier la cellule en question par fluorescence. Le schéma de principe est présenté en Figure 12 ci-dessous. Leur méthode de détection rapide (2-3 min) leur permet d'identifier un micro-ARN, un brin nucléique de 22 nucléotides responsable de l'extinction de certains gènes dans les cellules eucaryotes, pouvant intervenir dans les tumeurs.

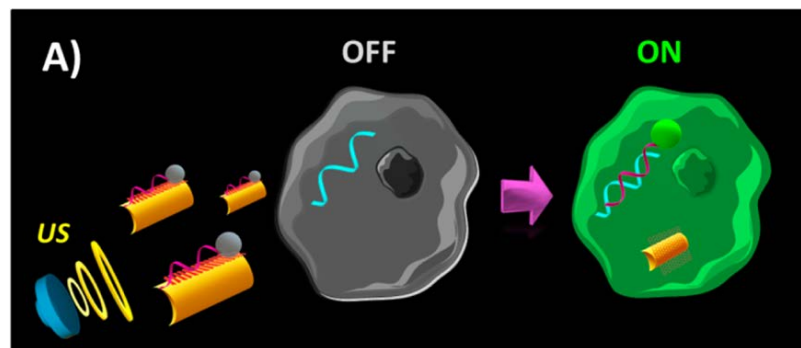


Figure 12 : Détection d'un micro-ARN présent en milieu cellulaire par utilisation d'un nanorobot composé d'un monobrin d'ADN fluorescent transporté par un nanofil d'or. L'emploi d'ultrasons (US) permet une pénétration rapide du monobrin dans la cellule (Esteban-Fernández de Ávila *et al.*, 2015).

Au-delà de l'imagerie, une grande communauté scientifique s'intéresse au design de structures complexes d'origamis pouvant encapsuler une substance destinée à être délivrée en milieu cellulaire. On peut citer à titre d'exemple la délivrance de médicaments anti-cancer comme la doxorubicine directement dans la cellule via une structure entièrement biocompatible car à base d'ADN (Jiang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). Récemment, une collaboration entre deux équipes indienne et française a également abouti au développement de deux nanorobots à base d'ADN capables de cartographier les changements de pH au sein d'une cellule (Modi *et al.*, 2013). Ces exemples montrent que ce domaine de recherche est très actif et diversifié avec des pistes de développement pour la médecine.

2.4.2. L'algorithmique

Une partie de la communauté s'intéresse à développer des nouveaux algorithmes s'appuyant sur le principe d'hybridation/dé-hybridation de l'ADN et du déplacement de monobrin d'ADN au sein d'un circuit constitué de brins d'ADN interconnectés pour réaliser des calculs. La Figure 13 présente quelques exemples d'organisation de

monobrins d'ADN. Faisant face à des verrous technologiques lourds évidents, les développements sont à l'heure actuelle encore théoriques, bien que la possibilité de réaliser des calculs « simples » tels que la soustraction et la division (Zhang *et al.*, 2009) ou plus complexes comme l'exponentiel ou le logarithme (Song *et al.*, 2016) ont été démontrés.

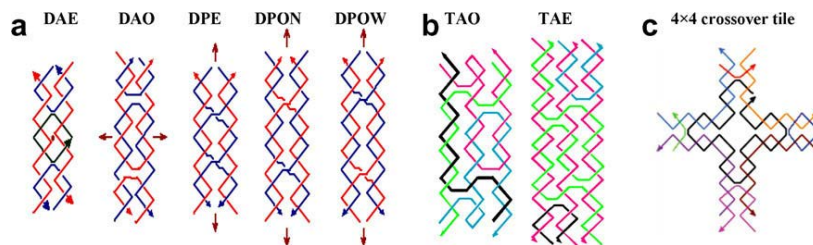


Figure 13 : Exemple d'arrangements de monobrins d'ADN en circuit logique permettant le calcul arithmétique (Zhang *et al.*, 2009).

Plus proche de l'expérience, on peut citer la création d'assemblages d'origamis d'ADN dans lesquels sont incorporées des fonctions logiques, telles que « OR », « AND » ou « NOR », toujours développés de façon théorique (Boemo *et al.*, 2015, 2016) mais aussi expérimentale (Amir *et al.*, 2014; Douglas *et al.*, 2012; Lund *et al.*, 2010) permettant une complexification et une autonomie de l'assemblage dans un milieu donné, comme à la bordure d'une cellule suivant l'information qu'elle contient (Douglas *et al.*, 2012), ou sur l'interaction entre plusieurs origamis transportant des principes actifs (Amir *et al.*, 2014). La recherche sur l'utilisation de l'ADN comme support de calcul ou comme implémentation d'un langage logique en est à son commencement et paraît très prometteur pour l'informatique comme pour la médecine.

2.4.3. La micro-électronique

L'approche « *bottom-up* » de l'auto-assemblage par ADN permet une structuration nanométrique de surface précise et programmable, propriétés particulièrement recherchées pour la réalisation de circuits imprimés ou de systèmes logiques (Le *et al.*, 2004; Seelig *et al.*, 2006). Le *nanopatterning* de surfaces par des origamis d'ADN a ainsi vu un important développement au cours des dernières années et a permis un abaissement d'échelles dans la réalisation de transistors que ne permettent pas les techniques classiques de photolithographie. Par exemple, Diane *et al.* ont développé une lithographie à base d'origami d'ADN pour structurer une surface de SiO₂ sur des échelles de l'ordre de 10 nm (Diagne *et al.*, 2016). L'idée, schématisée en Figure 14, est de reporter un origami d'ADN sur une surface de SiO₂, de graver la surface puis de retirer l'origami. L'origami joue ici le rôle d'une résine de photolithographie classique négative, mais possédant une résolution cent fois supérieure (si on considère une résine de résolution de l'ordre du micromètre).

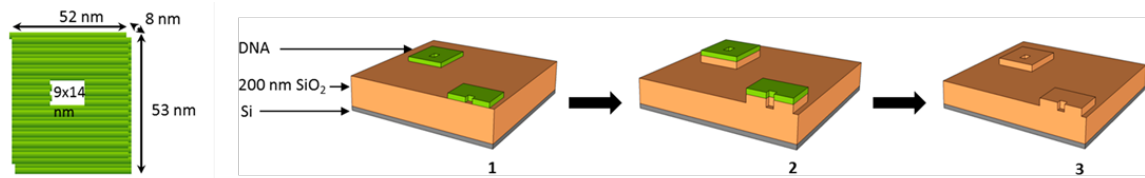


Figure 14 : Schéma de l'origami utilisé dans les travaux de (Diagne *et al.*, 2016) pour la structuration nanométrique d'une surface SiO_2 par procédé nanolithographique.

On parle aussi de transistors à un électron, transistors à base de nanotubes de carbone (Dwyer *et al.*, 2004; Maune *et al.*, 2010), ou encore de systèmes plasmoniques. On trouve également des applications pour l'immobilisation de nanoparticules sur surface permettant la réalisation de circuits optoélectroniques (Lalander *et al.*, 2010), ou la réalisation de nanofils conducteurs à base d'ADN hybridés avec des ions Argent (Toomey *et al.*, 2016). Les connections à l'échelle nanométrique sont également en développement, par report de filaments d'ADN sur surface qui sont par la suite métallisés par du cuivre, obtenant des filaments de 5 nm d'épaisseur (Brun *et al.*, 2016).

2.4.4. Le stockage digital de l'information

A l'heure d'un monde connecté et mondialisé, la quantité d'information échangée et stockée augmente de façon considérable. Se digitalisant massivement depuis le XXI^{ème} siècle (Hilbert and López, 2011), les données générées pourraient dépasser les capacités de stockage du silicium d'ici 2040, prédisent Zhirnov *et al.* (Zhirnov *et al.*, 2016), nécessitant la recherche de nouveaux matériaux pour stocker l'information. L'ADN apparaît alors comme une alternative pertinente grâce à sa haute capacité de stockage jusqu'à 10^6 fois plus importante que les techniques magnétiques ou optiques actuelles (Church *et al.*, 2012), sa stabilité dans le temps bien supérieure aux technologies Flash à base de silicium (Zhirnov *et al.*, 2016) et sa reproductibilité peu coûteuse grâce aux techniques d'amplification devenues « bon marché ». Ainsi, deux groupes indépendants d'Harvard University (Church *et al.*, 2012) et du Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire (Goldman *et al.*, 2013) ont démontré la possibilité de stocker des livres, images et sons dans l'ADN avec possibilité de relecture sans erreurs. Les densités de stockage sont alors largement améliorées, passant de $3,1 \times 10^9$ bits. mm^{-3} pour un classique disque dur à $5,5 \times 10^{15}$ bits. mm^{-3} par un stockage biologique (Church *et al.*, 2012).

Or, la faiblesse de la nanotechnologie ADN tient dans sa relative fragilité face aux agressions chimiques extérieures. Par exemple, on peut évaluer le nombre de dommages (principalement liés à l'hydrolyse en milieux aqueux) survenant dans l'ADN d'une seule cellule humaine à 10^4 - 10^5 par jour (Schärer, 2003). Cependant, il existe de nombreux outils biologiques d'autocorrection disponibles dans le monde vivant listés par Zhirnov *et al.* (Zhirnov *et al.*, 2016), ainsi que la possibilité de travailler dans un environnement

favorable permettant de gagner encore davantage de temps dans la conservation de l'information, comme en témoigne le séquençage d'un homme de Néandertal vieux de 50 000 ans préservé dans le permafrost à -4 °C (Prüfer *et al.*, 2014). Grass *et al.* ont mis à profit ces techniques pour réaliser le codage d'un texte de 83 kB en 4991 brins d'ADN (Grass *et al.*, 2015), et étudier la conservation de l'information suivant différents modes de stockage. La combinaison entre la mise en place d'un codon d'ADN auto-correcteur inspiré du code d'autocorrection de Reed-Salomon avec l'encapsulation de l'ADN dans une bille d'oxyde de silicium a alors permis aux auteurs d'estimer un temps de conservation sans erreurs de 2 millions d'années si stocké dans les conditions du permafrost.

Densité de stockage, temps de rétention, dimensions nanométriques sont autant d'avantages que possède l'ADN face aux technologies actuelles à base de silicium gourmandes en énergie et à l'impact écologique fort, productrices de chaleur, et dont la performance est désormais limitée par les limites dimensionnelles des techniques de lithographie. Cependant, le développement futur des nanotechnologies ADN dépendra du développement des techniques de production et de lecture des brins d'ADN, et surtout de leur coût (Zakeri and Lu, 2015). Il dépendra également du développement des autres applications citées précédemment telles que le calcul, la nano-lithographie, ou la détection moléculaire.

Bien qu'en marge des travaux présentés dans cette thèse, ce dernier paragraphe illustre parfaitement la puissance de cet outil technologique qui peut largement dépasser son cadre biologique originel, et la potentialité au moins aussi grande de son développement. L'ADN est un outil flexible, adaptable, et réparable, ce qui en fait un excellent candidat pour la structuration de la matière, dont entre autres l'organisation de nanoparticules, comme le démontre la section suivante.

2.5. Auto-assemblage de nanoparticules

2.5.1. Le concept

L'ADN comme outil d'organisation matricielle de particules est utilisé pour la première fois au milieu des années 1990 par deux équipes indépendantes, réalisant les premiers auto-assemblages de nanoparticules d'or (Alivisatos *et al.*, 1996; Mirkin *et al.*, 1996). Utilisant la chimie maîtrisée du soufre sur surface d'or (Brust *et al.*, 1994), ils ont l'idée de greffer des monobrins d'ADN fonctionnalisés en une extrémité par un groupe thiol (-SH) (Zuckermann *et al.*, 1987) sur des nanoparticules d'or de 13 nm de diamètre. Mirkin greffe ainsi deux brins non-complémentaires sur les nanoparticules (Mirkin *et al.*, 1996), puis mélange les solutions en ajoutant un brin d'ADN complémentaire aux deux extrémités, appelé *linker*. Les nanoparticules s'agrègent, mais de façon réversible, à cause de l'existence de la température de fusion de l'ADN (~ 50 °C). Grâce à l'existence de la

bande plasmon des nanoparticules d'or⁷, les cycles d'agrégation/désagrégation sont facilement détectés à l'œil nu ou par spectroscopie UV-visible comme présenté en Figure 15 ci-dessous. Alivisatos, de son côté, aligne les nanoparticules d'or de façon périodique dans une matrice de monobrins d'ADN complémentaires (Alivisatos *et al.*, 1996). Depuis, le domaine de recherche de l'assemblage de nano-objets par ADN est devenu très actif, représentant environ 10 % des articles publiés sur les nanotechnologies ADN sur les cinq dernières années (source Web of Science). Nous allons présenter brièvement dans le prochain paragraphe les applications liées à l'assemblage de nanoparticules par ADN.

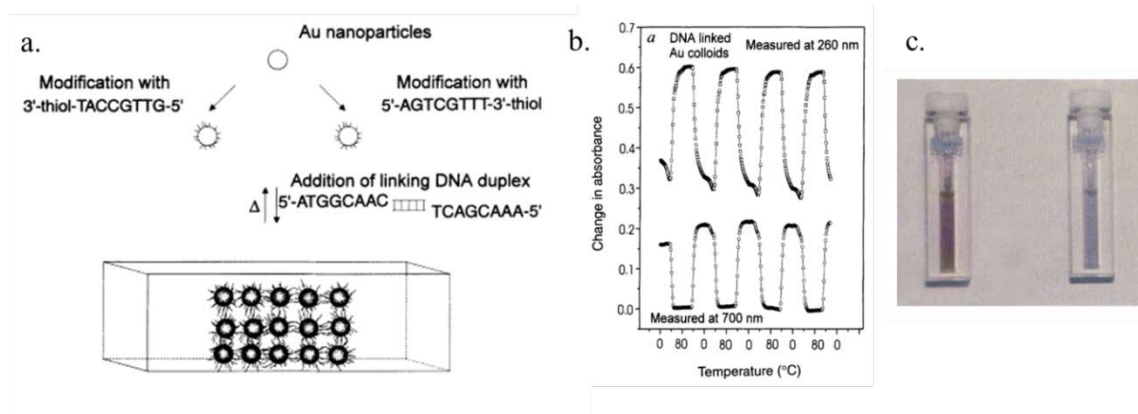


Figure 15 : (a) Schéma de principe de l'auto-assemblage par linker de nanoparticules d'or de 13 nm de diamètre (figure de gauche). (b) mesure de l'absorbance à 260 nm et 700 nm de la solution colloïdale de nanoparticules en fonction de la température (0 °C et 80 °C) et mise en évidence de la réversibilité de l'hybridation des brins d'ADN. (c) Photographie de la solution colloïdale chauffée à 80 °C de couleur rouge, et refroidie à 0 °C de couleur bleue (Mirkin *et al.*, 1996).

2.5.2. Les applications des nanotechnologies ADN pour l'auto-assemblage de nanoparticules

La détection biomoléculaire

L'une des premières applications mise en pratique est la détection biomoléculaire reposant sur le principe colorimétrique. Par exemple, les nanoparticules d'or initialement fonctionnalisées avec des brins complémentaires peuvent être amenées à se désagréger en présence d'une espèce cible, venant s'hybrider avec une partie des brins d'ADN (voir Figure 16) (Lee *et al.*, 2008; Liu and Lu, 2006). La désagrégation causée par la déhybridation des deux brins complémentaires est associée à un changement de couleur du bleu au rouge de la solution colloïdale. Ce principe a été utilisé par de nombreuses équipes pour détecter plusieurs espèces telles que la thrombine (Pavlov *et al.*, 2004), l'adénosine et la cocaïne (Liu and Lu, 2006), ou encore la cystéine (Lee *et al.*, 2008). Les

⁷ A cause de leur taille nanométrique, les métaux voient leur nuage électronique osciller en cohérence avec le champ électromagnétique de la lumière, induisant une bande d'absorption nommée bande plasmon. Or, cette bande est fortement dépendante de la taille des nanoparticules : l'or émet dans le rouge si le diamètre des nanoparticules est faible (< 50 nm), virant vers le violet puis bleu lorsque le diamètre augmente (~150 nm).

possibilités sont nombreuses mais limitées par les concentrations de détection relativement importantes de l'ordre du nM, contre une sensibilité plus élevée pour les méthodes par fluorescence (Rosi and Mirkin, 2005).

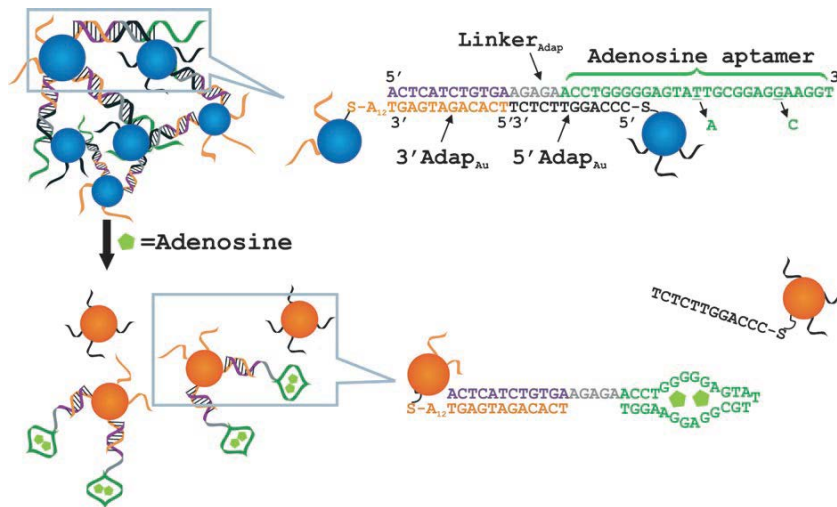


Figure 16 : Schéma de principe de la détection de l'Adénosine par méthode colorimétrique. Des particules d'or fonctionnalisées avec des brins d'ADN sont agrégées grâce à la présence d'un aptamère⁸ complémentaire avec l'Adénosine. Ainsi, en présence de la molécule cible, les aptamères s'hybrident sur la molécule entraînant une désagrégation des particules et un changement colorimétrique de la solution, passant du bleu au rouge (Liu and Lu, 2006).

L'optique et la plasmonique

Les cristaux composés de certaines nanoparticules inorganiques semi-conducteurs, appelés également « quantum dots », présentent l'avantage d'avoir des énergies de luminescence très intéressantes pour les applications biomédicales en remplacement des classiques fluorophores organiques utilisés pour l'imagerie, moins luminescents et plus sensibles au spectre de la lumière blanche (Bruchez *et al.*, 1998). Leur association avec un métal tel que l'or permet une augmentation encore supérieure de la photoluminescence dégagée par les quantum-dots. Ainsi, l'assemblage organisé de nanoparticules d'or et de quantum dots permet de contrôler la photoluminescence de la structure suivant plusieurs paramètres tels que la taille des constituants et la distance inter-particulaire. L'ADN se présente dans ce cas comme le candidat idéal pour l'organisation des nanoparticules et la maîtrise de la distance métal-quantum dots, permettant le suivi d'événements biologiques et le développement de spectroscopies plasmoniques améliorées.

La catalyse

Enfin, le contrôle de la taille des particules, la composition et la densité sont des qualités très intéressantes pour l'univers de la catalyse qui peuvent être apportées par la structuration par ADN. Cependant, l'utilisation de l'ADN impose un environnement

⁸ Un aptamère est un mono-brin d'ADN synthétique capable de fixer un ligand, dans le cas de la figure l'Adénosine, ou de catalyser une réaction.

aqueux particulier limitant pour la catalyse et passive la surface des nanoparticules, les rendant moins réactives. Afin de relever ces difficultés, Auyeung *et al.* ont élaboré un procédé à trois étapes : après avoir synthétisé une superstructure de nanoparticules d'or, ils figent la structure dans la silice et calcinent l'ensemble, donnant en résultat une structure poreuse organisée (Auyeung *et al.*, 2015). Ces premiers travaux ont pu démontrer l'intérêt de l'auto-assemblage pour la catalyse grâce à la maîtrise de l'homogénéité du matériau, propriété souvent difficile à obtenir dans ce domaine. Les auteurs prédisent en conclusion une véritable utilité pour les réactions catalytiques utilisant l'or comme l'oxydation de l'alcool, du monoxyde de carbone ou de la réduction par effet plasmon.

2.5.3. Les stratégies de fonctionnalisation des nanoparticules

Comme précisé lors de l'introduction de cette section, la technique de fonctionnalisation la plus répandue de surfaces d'or par des brins d'ADN utilise la fonction thiol. Cependant, d'autres alternatives ont été développées au cours des dernières décennies. L'utilisation des protéines et de leur forte reconnaissance moléculaire a largement été étudiée, notamment à travers le couple biotine-Streptavidine. Cette interaction est connue pour être une des plus fortes liaisons non covalentes de la nature. Pour illustrer l'intensité de cette affinité, on peut rappeler la valeur de la constante de dissociation du complexe de $4 \times 10^{-14} \text{ mol.L}^{-1}$ (Green, 1990) et une enthalpie de formation de 30 kT. Cette forte interaction est assurée par l'existence d'une poche protéinique parfaitement ajustée pour la biotine décrite dans ces travaux (Klumb *et al.*, 1998; Stayton *et al.*, 1999), ce qui rend la liaison peu sensible au pH, à la salinité (Green, 1963) et à la température (Fattaccioli, 2006; González *et al.*, 1999). La Streptavidine est une protéine constituée de quatre fragments tétramériques pouvant chacun accueillir quatre biotines (Green, 1990), dont la structure chimique est rappelée en Figure 17. La biotine s'immobilise alors sur la Streptavidine et forme des liaisons hydrogènes, électrostatiques et hydrophobes avec les groupes amines aromatiques de la Streptavidine.

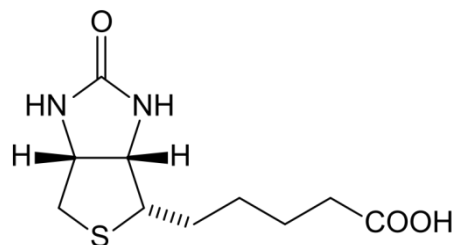


Figure 17: Structure chimique de la biotine.

Cette stratégie est intéressante par son aspect générique. Elle peut en effet être appliquée à tout type de surface, même l'or, à condition que la surface soit suffisamment réactive pour assurer le collage de la protéine. Par exemple Cobbe *et al.*, ont proposé une

agrégation de nanoparticules d'or préalablement fonctionnalisées avec un groupe biotine en utilisant la Streptavidine et des monobrins d'ADN (Cobbe *et al.*, 2003). Les deux stratégies utilisées dans ces travaux sont schématisées en Figure 18 a et b respectivement. L'auto-assemblage de nanoparticules de nature hétérogène et différentes de l'or par interaction protéine-ADN a également été employé par l'équipe d'Oleg Gang (Zhang *et al.*, 2013b)

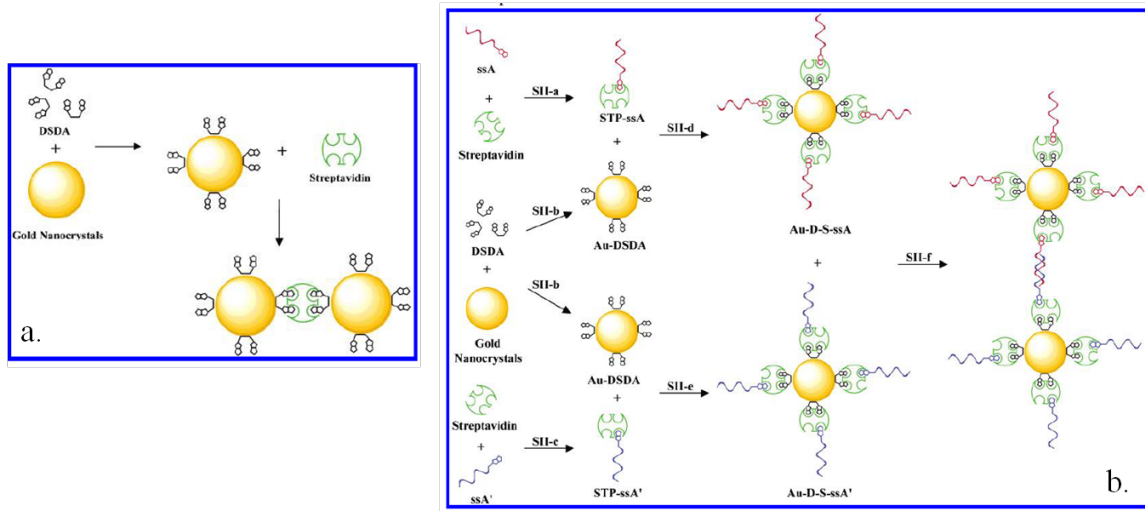


Figure 18 : Agrégation de nanoparticules assurée par la liaison biotine-Streptavidine (a) et par l'hybridation de deux brins d'ADN complémentaires préalablement immobilisés sur une Streptavidine à la surface d'une nanoparticule d'or (b) (Cobbe *et al.*, 2003).

Enfin, on peut évoquer l'utilisation d'autres fonctions chimiques, telles que l'acide carboxylique (-COOH) ou l'époxyde sur d'autres surfaces métalliques très réactives avec l'oxygène, comme l'aluminium. En effet, il est courant d'utiliser des agents organiques de ces natures pour passiver des nanoparticules d'Al synthétisées par voie chimique et éviter une couche d'oxydation trop épaisse (Chung *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 2010), démontrant la possibilité de fonctionnaliser ces surfaces par ces fonctions. Cependant, le greffage de brins d'ADN sur surface métallique ou particule par ces fonctions n'est à notre connaissance pas publiée dans la littérature, mais est plus largement utilisé pour la fonctionnalisation de nanotubes de carbone (Daniel *et al.*, 2007).

2.5.4. Structures cristallines à haut degré d'ordre obtenues

Après les travaux préliminaires de Mirkin et Alivisatos (Alivisatos *et al.*, 1996; Mirkin *et al.*, 1996), les équipes de recherche se sont concentrées à la résolution de problématiques majeures pour l'obtention de systèmes maîtrisés : comment contrôler la distance inter-particulaire ? Quels systèmes cristallins ou formes géométriques peuvent être obtenus ? Est-il réalisable de structurer des systèmes binaires ou ternaires ? Quels outils sont disponibles pour la caractérisation de tels systèmes ?

En jouant sur la nature du brin d'ADN faisant la liaison entre les nanoparticules, il a été montré qu'il est possible d'organiser les nanoparticules en systèmes cristallins Cubique Face Centré (CFC) ou Cubique Centré (CC), comme le résume le schéma de la Figure 19 (Nykypanchuk *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008).

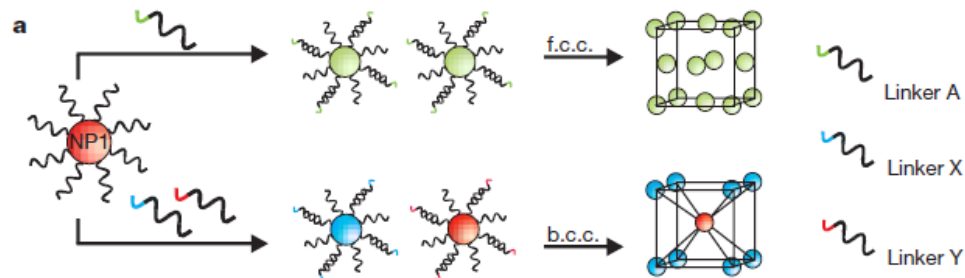


Figure 19 : Schéma récapitulatif de l'influence du linker sur la structure cristalline obtenue après auto-assemblage de nanoparticules d'or (Park *et al.*, 2008).

Plusieurs paramètres clés ont un effet prépondérant sur la nature des structures obtenues :

- **La concentration ionique** en solution, telle que la concentration en sel (NaCl, MgCl₂, ...). Park *et al.* ont montré que la concentration saline tend à diminuer la distance inter-particulaire en diminuant les charges répulsives des nanoparticules (Park *et al.*, 2004).

- **La nature du *spacer***⁹ de l'oligonucléotide influe également sur la distance inter-particulaire. En effet, un « affalement » de l'oligonucléotide sur la nanoparticule a été observé si un *spacer* composé de bases Adénines était utilisé, réduisant par 2,5 fois la distance inter-particulaire à cause d'une affinité de cette base plus grande pour l'or que les autres (Demers *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2004).

- **La longueur des brins d'ADN** a un impact sur la cristallinité de la structure : une liaison trop longue induit une structure moins cristalline car les nanoparticules sont moins contraintes, tandis qu'un lien trop court par rapport à la taille de la nanoparticule ne permet pas de cristallisation à cause de la polydispersité en taille des nanoparticules (Hill *et al.*, 2008; Macfarlane *et al.*, 2010; Nykypanchuk *et al.*, 2008). Les diagrammes de phase expérimentaux présentant la cristallinité de nanoparticules d'or en fonction de ces paramètres ont rapidement pu être établis (Xiong *et al.*, 2009). Grâce à la flexibilité de leur structure, les brins ADN sont aussi reprogrammables, permettant un changement de structure cristalline directement en solution en choisissant les bonnes séquences d'oligonucléotides (Maye *et al.*, 2010), ou en introduisant des intercalants de l'ADN

⁹ Ce terme désigne la séquence d'un oligonucléotide dont le but est d'éloigner physiquement la séquence destinée à s'hybrider avec l'oligonucléotide complémentaire et la surface de la nanoparticule.

modifiant la rigidité et la tenue en température de la liaison ADN (Seo *et al.*, 2016). Par exemple Gang *et al.* ont récemment déterminé les diagrammes de phase de nanoparticules d'or en fonction de la stœchiométrie et de la taille des nanoparticules, et de la longueur du *linker* ADN, de façon expérimentale et théorique à l'aide de modèles « gros grains » (Vo *et al.*, 2015). Comme le montre la Figure 20 ci-dessous, les nanoparticules peuvent se structurer suivant la cristallinité CsCl, AlB₂ ou Cr₃Si suivant la taille des nanoparticules (R_S) ou du *linker* (R_L).

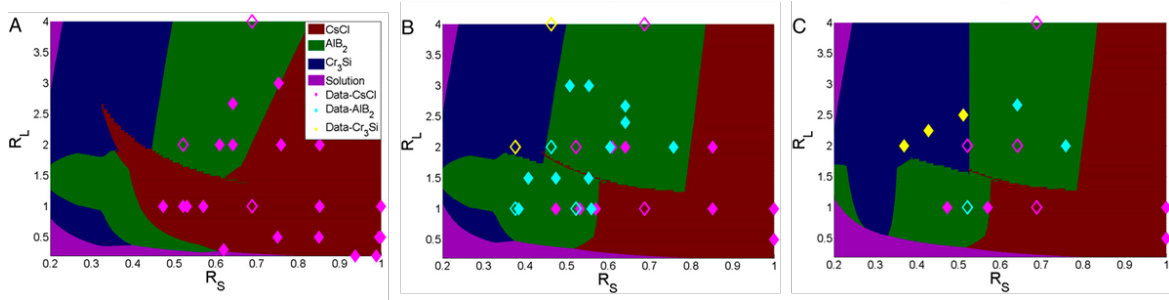


Figure 20 : Diagrammes de phases de nanoparticules d'or en fonction de la taille des nanoparticules (R_S) ou de la longueur du linker (R_L) pour trois stœchiométries différentes : (A) 1 :1, (B) 2 :1, (C) 3 :1. Les symboles représentent les points expérimentaux : les symboles pleins représentent les structures pures tandis que les vides représentent des structures polymorphes. On observe globalement une bonne concordance entre points expérimentaux et résultats théoriques (Vo *et al.*, 2015).

- La **température du solvant** a également un rôle primordial sur la cristallinité de la structure. En effectuant l'agrégation à une température proche de la température de fusion de l'ADN, la cristallisation cinétiquement plus lente peut amener à une cristallisation des nanoparticules à une plus grande échelle (Jin *et al.*, 2003; Macfarlane *et al.*, 2009; Nykypanchuk *et al.*, 2008). Un schéma de principe est illustré en Figure 21 (Nykypanchuk *et al.*, 2008).

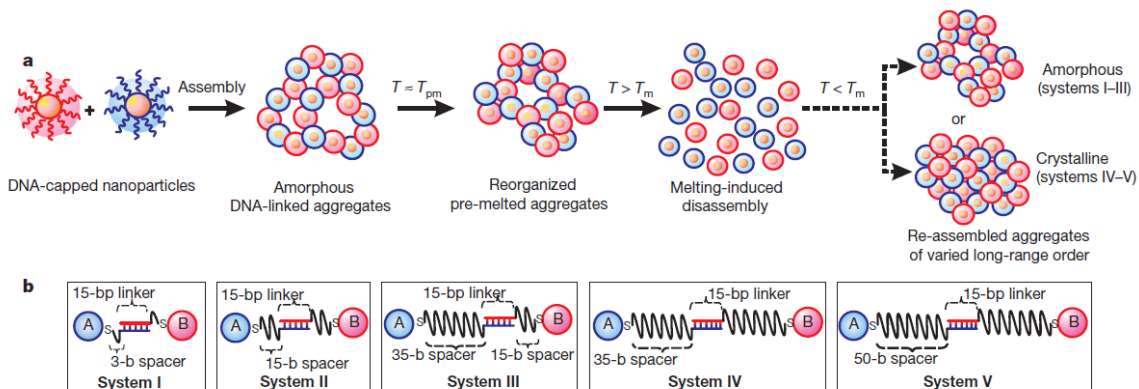


Figure 21 : Schéma présentant le comportement des agrégats de nanoparticules issus de l'auto-assemblage par ADN face à la température et de la longueur des brins d'ADN utilisés (Nykypanchuk *et al.*, 2008).

Ainsi, la qualité de la cristallisation est fortement dépendante des conditions en température. Une maîtrise du refroidissement de la solution colloïdale suffisamment lente, pouvant prendre de deux à trois jours, peut amener à la formation de « super-cristaux » micrométriques de forme dodécaèdre rhombique, comme l'a récemment montré l'équipe de Mirkin (Auyeung *et al.*, 2014). A l'inverse, un auto-assemblage effectué à température constante sous la température de fusion entraîne une polycristallisation des nanoparticules, alors moins organisées malgré le recuit (Auyeung *et al.*, 2012). De façon intéressante, la formation de ces dodécaèdres est indépendante de la taille des nanoparticules, montrant que cette structure est thermodynamiquement la plus stable pouvant être obtenue pour de tels systèmes.

Enfin, des modifications post-cristallisation ont également permis d'augmenter les intervalles de températures ou les solvants dans lesquelles ces structures sont utilisables, en ajoutant des complexes organiques ou en encapsulant l'ADN dans de la silice (Auyeung *et al.*, 2012; De Stefano and Vesterager Gothelf, 2016).

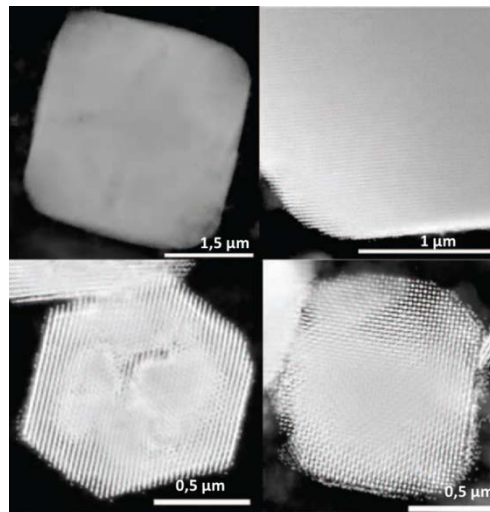


Figure 22 : Imagerie TEM de cristaux dodécaèdre rhombiques après refroidissement lent de nanoparticules d'or auto-assemblées par ADN en structure cubique centré (Auyeung *et al.*, 2014).

Notons également la possibilité de maîtriser le nombre de brins fonctionnalisés à la surface des nanoparticules d'or à un, deux ou plusieurs brins, en « triant » une solution colloïdale de nanoparticules par électrophorèse (Bidault and Polman, 2012). Cette technique permet l'hybridation de deux ou trois nanoparticules seules (dimères ou trimères) aux propriétés optiques dépendantes de la liaison inter-particulaire, régie par la nature du lien ADN pouvant être changée en dynamique et en solution (Lermusiaux *et al.*, 2012; Maye *et al.*, 2010), la force ionique (Lermusiaux *et al.*, 2015) et la nature chimique de la surface (Lermusiaux and Bidault, 2015). Ainsi, la nature chimique de la surface des nanoparticules d'or dépend des ligands utilisés pour la stabilisation des colloïdes. Lermusiaux *et al.* ont alors étudié les propriétés optiques de dimères immobilisés sur surface en fonction de la concentration ionique mais également de l'hydrophobicité des

surfaces en jouant sur la nature du ligand. Les résultats, présentés en Figure 23, ont montré que l'utilisation d'un ligand amphiphile, *i.e.* possédant à la fois un groupe hydrophobe et hydrophile, permet de gagner en stabilité en termes d'agrégation non désirée de nanoparticules ou en conformation entre les deux particules assemblées, comme le montrent les spectres d'absorbance présentés en Figure 23.

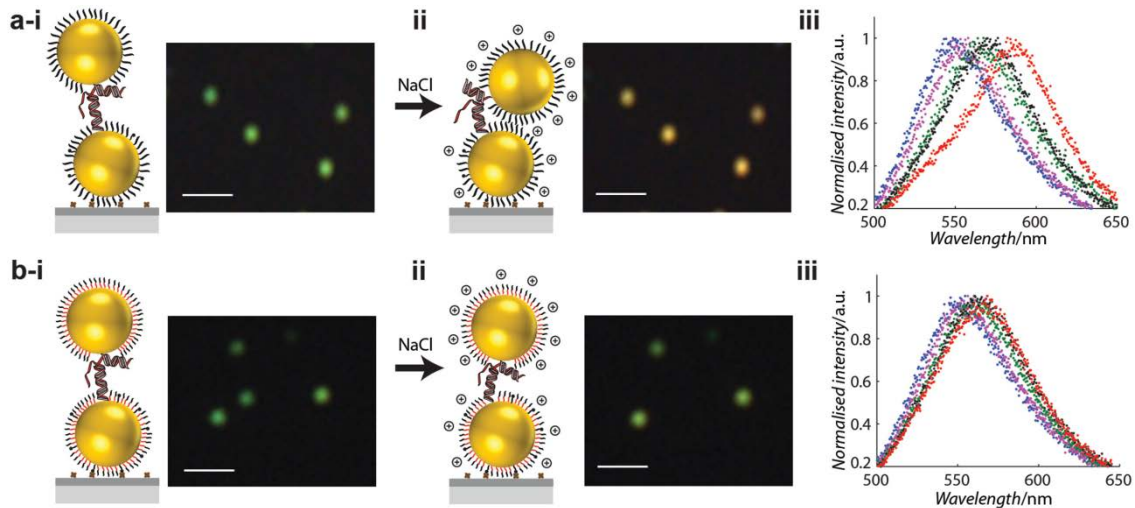


Figure 23 : Comparaison de la variation de la distance interparticulaire de nanoparticules d'or de 40 nm de diamètre organisées en dimères suivant l'utilisation de ligands hydrophiles (a) ou amphiphile (b) pour leur stabilisation après augmentation de la concentration saline (i : 5 mM en NaCl / ii : 800 mM en NaCl) par microscopie en champs sombre et absorbance spectrale (Lermusiaux and Bidault, 2015).

2.6. Cristallisation de systèmes hétérogènes

La plus grande majorité des travaux se sont intéressés à l'auto-assemblage de nanoparticules d'or ou d'argent, grâce à leur bonne stabilité colloïdale, une méthode de synthèse connue et maîtrisée permettant une large gamme en taille et la réactivité connue du soufre avec l'or. Cependant, pour élargir les applications potentielles des nanotechnologies ADN à d'autres domaines que l'opto-électronique, il est primordial d'élargir les matériaux utilisables. Ainsi, Gang *et al.* ont proposé une stratégie générale de fonctionnalisation de nanoparticules par ADN applicable en théorie pour une large gamme de matériaux (Zhang et al., 2013b), qu'ils ont appliqué à trois matériaux modèles : nanoparticules d'or avec palladium de trois formes différentes (cube, octaèdre et dodécaèdre), oxyde de fer Fe_2O_3 , et des *quantum-dots* (CdSe/CdTe/ZnS et CdSe/ZnS). Par ces travaux, ils ont explicité trois paramètres primordiaux lors de l'établissement de super-structures hétérogènes :

- (i) Le rôle de la forme de la nanoparticule sur l'ordre de la cristallinité obtenu.
- (ii) L'influence des interactions non-spécifiques liées à la présence d'ADN.
- (iii) L'émergence de désordre dans la composition dans les structures à plusieurs éléments.

Ces travaux pionniers font suite aux travaux du LAAS de Séverac *et al.* qui ont pour la première fois démontré la possibilité d'utiliser l'ADN comme vecteur d'assemblage dans le cadre de la synthèse de matériaux à haute-performance énergétique à partir de nanoparticules d'Al et de CuO (Séverac *et al.*, 2012).

Aussi, Fan *et al.* ont développé des assemblages de cinq nanoparticules de tailles différentes : une petite nanoparticule entourée de quatre plus grosses nanoparticules (voir Figure 24) (Fan *et al.*, 2011). De tels assemblages anisotropes ont l'avantage d'avoir des propriétés optiques mieux définies. Tan *et al.* ont ainsi développé une méthode généraliste et simple en une étape de fonctionnalisation et de cristallisation de systèmes anisotropes à partir de 2 tailles de nanoparticules (Tan *et al.*, 2013). Au-delà des densités de greffage qui évoluent fortement avec l'anisotropie, un effet prépondérant de la courbe de la nanoparticule, dépendant de sa taille, est identifié (Cederquist and Keating, 2009; Xing *et al.*, 2012).

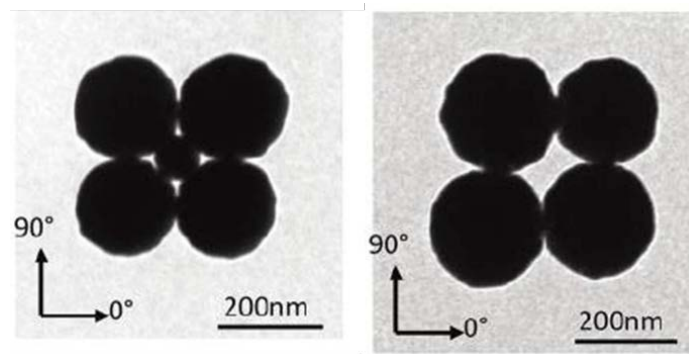


Figure 24 : Images TEM de structures anisotropes obtenues par auto-assemblage de deux types de nanoparticules d'or de taille différente. Fan *et al.* ont alors comparé les propriétés optiques des deux clusters avec ou sans nanoparticule de petite taille et ont montré une amélioration de celles-ci (Fan *et al.*, 2011).

Jones *et al.* a également étudié la cristallisation de nano-objets de forme non-sphérique telles que des octaèdres, prismes ou bâtonnets (Jones *et al.*, 2010). De façon générale, la structure obtenue est toujours celle qui permet le maximum d'hybridation de brins d'ADN (Macfarlane *et al.*, 2011), impliquant une superposition des nanoprismes (Millstone *et al.*, 2008), un arrangement 1D des nanobâtonnets ou une cristallisation classique CFC ou CC des octaèdres (Jones *et al.*, 2010). Cependant, seuls des petits agrégats sont obtenus et il reste difficile d'obtenir des cristallisations sur de longues échelles. Du côté théorique, Travesset et Knorowski ont étudié l'auto-assemblage de nanocubes (Knorowski and Travesset, 2014) et ont montré qu'une orientation face à face des cubes était obtenue lorsque les brins utilisés étaient courts, mais que plusieurs autres structures pouvaient être obtenues en utilisant des brins d'ADN plus longs et en appliquant des contraintes osmotiques.

Enfin, Macfarlane *et al.* ont démontré la possibilité d'obtenir des systèmes ternaires complexes en insérant une troisième taille de nanoparticules au sein d'une structure binaire préexistante (voir ci-dessous) (Macfarlane *et al.*, 2013). Ce procédé a permis d'établir une large gamme de structures cristallines et ce, de façon totalement réversible grâce à l'utilisation de l'ADN, ouvrant la voie à une méthode généralisable à d'autres matériaux.

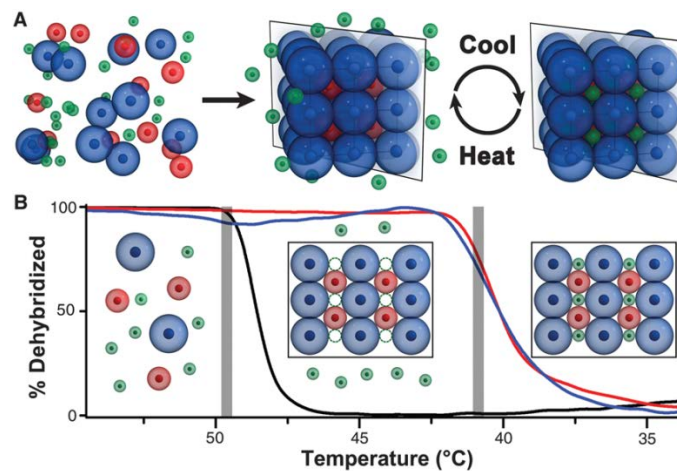


Figure 25 : Schéma de l'auto-assemblage de nanoparticules par ADN en structure cristalline ternaire. Une structure binaire est d'abord synthétisée avant l'insertion d'une troisième taille de nanoparticules dans un site prédéterminé (A). En (B) est présenté l'analyse thermique de la structure ternaire (Macfarlane *et al.*, 2013).

Les travaux précédemment décrits s'intéressent principalement à l'agrégation de nanoparticules, dont le diamètre peut varier de 10 à 150 voire 200 nm maximum. Or, d'autres équipes ont mis en évidence des comportements différents lorsque les nanoparticules sont d'ordre micrométrique, plus spécifiquement la stabilité des solutions colloïdales avec la température. En effet, les interactions entre particules changent avec leur taille, notamment les interactions faibles de type Van der Waals pouvant amener à une agrégation non-spécifique et irréversible (Valignat *et al.*, 2005). La cristallisation est donc bien plus difficile à obtenir et les agrégats sont le plus souvent amorphes, sous forme de gel avec une structure fractale (Biancaniello *et al.*, 2007; Geerts *et al.*, 2008; Rogers *et al.*, 2005; Schmatko *et al.*, 2007; Valignat *et al.*, 2005). Cependant, les travaux de Crocker *et al.* ont permis de montrer la possibilité de cristalliser ces microsphères en de courts cristaux hexagonaux, dans des conditions expérimentales radicalement précises en terme de de température, mais aussi et surtout en terme de préparation de surface (Biancaniello *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006, 2009). En effet, seule une méthode de fonctionnalisation particulière par gonflement-dégonflement de particules organiques micrométriques (comme du polystyrène) plongées en solvant organique en présence de Polyéthylène Glycol (PEG) a pu fonctionner (Biancaniello *et al.*, 2005). Au-delà de cet exemple, le phénomène de réversibilité avec la température est trop rarement observé et dépend fortement de la longueur de la liaison d'ADN (Geerts *et al.*, 2008) et de la

température qui doit être suffisante pour dé-hybrider les liaisons ADN sans entraîner une agrégation irréversible des nanoparticules. Bien qu'une *review* récente n'ait pas reporté d'avancée significative dans l'auto-assemblage de particules micrométriques (Michele and Eiser, 2013), une équipe des Etats-Unis a récemment démontré la possibilité de fonctionnaliser des particules micrométriques organiques (polystyrène ou Poly(méthyle méthacrylate) (PMMA)) ou inorganiques (oxyde de titane ou oxyde de silicium) avec des monobrans d'ADN par une méthode générique de cyclo-addition alcyne-azide (Wang *et al.*, 2015). Cette méthode permet d'obtenir des densités de greffage d'ADN supérieures aux méthodes utilisant le complexe biotine-Streptavidine, et a permis en conséquence la cristallisation des particules à température ambiante ou un réarrangement optimisé après recuit.

2.7. Analyse et présentation de la problématique

Par le biais de cette synthèse bibliographique, nous avons vu que les nanotechnologies ADN sont le sujet d'une intense recherche depuis le début du XXI^{ème} siècle grâce à ces nombreuses potentielles applications dans le vivant (imagerie, nano-robots...), et même plus largement (calculateurs, circuits électroniques, biocapteurs). L'assemblage de nanoparticules en réseau plus ou moins complexes et hétérogènes a particulièrement été développé depuis les années 2000, représentant environ 10 % des travaux touchants aux nanotechnologies sur les cinq dernières années (Web of Science). La flexibilité de l'ADN, autant chimique que mécanique, permet en théorie la synthèse d'une variété infinie et réversible de structures. Aussi, la cristallisation à très haut degré de nanoparticules d'or a été démontrée récemment, grâce à l'identification et la maîtrise des paramètres clés responsables de l'assemblage :

- La nature des monobrans d'ADN liant les nanoparticules : longueur, utilisation et nature du *spacer*, définition de la séquence.
- La taille et le forme des nanoparticules.
- Les conditions expérimentales : concentration ionique et température pendant l'auto-assemblage.

Après deux décennies de travaux de recherche, nous retiendrons de l'état de l'art que l'auto-assemblage de nanoparticules par ADN doit encore faire face à plusieurs défis, analysés par Gang et al (Zhang et al., 2013b), et rappelés ci-dessous :

- (i) **La stabilité des nanoparticules en solution** au moment de la fonctionnalisation biologique.
- (ii) **Le greffage de l'ADN sur la surface de façon spécifique**, *i.e.* en préservant la fonctionnalité du greffage.
- (iii) **Le contrôle de l'auto-assemblage par l'hybridation effective des deux brins complémentaires**, sans interactions non-spécifiques.

Nous verrons que ces trois défis guideront les travaux expérimentaux et scientifiques de mes trois années de thèse.

Aujourd'hui, deux méthodes de fonctionnalisation de l'ADN dominent les travaux pour assurer son greffage sur la surface de façon spécifique. La méthode la plus répandue utilise la fonction thiol, dont le greffage sur l'or est parfaitement maîtrisée depuis plusieurs décennies (Brust *et al.*, 1994). Une seconde stratégie efficace et plus générique consiste à utiliser la complémentarité biologique des protéines, le plus souvent du couple biotine-Streptavidine. Cette stratégie est préconisée lorsque les surfaces utilisées sont plus réactives que les métaux nobles, et présentent de fortes affinités avec les oligonucléotides de l'ADN (Zhang *et al.*, 2013b).

Après avoir défini le système à assembler et la stratégie de fonctionnalisation (Biotine/Streptavidine ou par fonction thiol), le choix de la stratégie d'hybridation des brins d'ADN entre les particules est une étape clé car elle conditionne les caractéristiques de l'assemblage final. En effet, le choix des **oligonucléotides** influe sur les cinétiques d'hybridation des brins d'ADN, donc également sur les cinétiques d'agrégation de nanoparticules et les superstructures cristallines obtenues. On peut distinguer 3 stratégies possibles :

1. **Le système à deux oligonucléotides** est le plus simple car met en jeu l'hybridation directe entre deux brins d'ADN complémentaires greffés sur chacune des nanoparticules (Alivisatos *et al.*, 1996; Cobbe *et al.*, 2003; Nykypanchuk *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013b).
2. **Le système à trois oligonucléotides** met en jeu un troisième oligonucléotide, appelé *linker*, servant de lien entre deux oligonucléotides non complémentaires greffés sur deux types de nanoparticules (Mirkin *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2009). Avec ce type de système, les cinétiques d'agrégation sont généralement plus lentes que celles observées avec le système à deux oligonucléotides dans des conditions environnementales équivalentes. L'avantage de cette stratégie consiste en la possibilité de jouer sur la rigidité de la liaison inter-particulaire, en utilisant un double-brin sur tout ou partie de la liaison. Cependant, pour un même nombre de bases considérées, peu de différences sont notables entre les deux stratégies sur la cristallisation des nanoparticules (Park *et al.*, 2004).
3. **Le système à quatre oligonucléotides**, plus complexe, consiste à greffer deux oligonucléotides non-complémentaires sur les nanoparticules, puis d'ajouter deux *linkers* à la solution (Auyeung *et al.*, 2014; Hill *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008). Ces *linkers* sont composées de deux parties principales : une séquence complémentaire avec l'oligonucléotide greffé sur la nanoparticule et une séquence courte, souvent 4 bases, complémentaire avec le deuxième *linker*. Généralement, un *spacer* double brin sépare les deux parties de façon à

augmenter la distance inter-particulaire et la rigidité de la structure. Après hybridation des *linkers* sur les nanoparticules respectives fonctionnalisées avec les brins complémentaire, l'agrégation des nanoparticules est assurée par la reconnaissance des courtes séquences des deux *linkers*. Le schéma de la Figure 26 permet d'illustrer cette méthode d'hybridation.

Bien que non explicité dans les travaux des auteurs, cette méthode présente l'avantage d'une hybridation rapide d'un point de vue thermodynamique, établissant un système d'hybridation / dé-hybridation suivant la conformation stérique des particules et des brins d'ADN greffés. Ainsi, dans les conditions en température et en pH idéales, *i.e.* proches de la température de fusion des brins, l'assemblage est assuré par la thermodynamique, amenant à un ordre plus élevé.

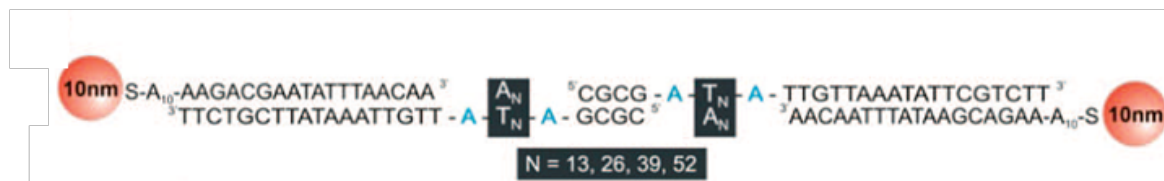


Figure 26 : Schéma de principe présentant l'auto-assemblage de nanoparticules avec hybridation de 4 oligonucléotides (Hill et al., 2008).

Enfin, il faut noter que malgré les promesses des nanotechnologies ADN, la communauté scientifique s'accorde sur le fait que certains verrous ralentissent aujourd'hui l'impact de ces technologies dans le domaine applicatif :

- (i) La cristallisation à grande échelle de nanoparticules hétérogènes en forme ou en taille est aujourd'hui encore très difficile.
- (ii) L'élargissement à des matériaux possédant une chimie de surface moins maîtrisable que celles de métaux nobles comme l'or n'est encore que principalement théorique.
- (iii) La taille des nanoparticules concernée est un facteur limitant, comme l'étude sur la cristallisation de nanoparticules de taille micrométrique l'a montré.

Les deux derniers points sont au cœur de la problématique de ma thèse puisque l'objectif *in fine* de mon travail, présenté en fin de la partie 1 du chapitre, est de parvenir à auto-assembler deux types de particules par hybridation de brin d'ADN, Al et CuO, de taille caractéristique d'environ 100 nm à partir de *nanopoudres* commerciales, ce qui implique une compréhension et un contrôle de toutes les étapes du procédé de fonctionnalisation jusqu'ici jamais réalisés.

3. Stratégie d'assemblage et objectifs scientifiques et technologiques de la thèse

La première étape de ces travaux de thèse est de choisir la stratégie de greffage des brins d'ADN à la surface des particules. Nous avons opté pour le développement d'une **méthode générique** permettant le greffage de brins d'ADN sur nanoparticules d'Al et de CuO via interaction entre la biotine et la Streptavidine, présentée précédemment. Cette stratégie avait déjà été explorée lors des travaux précédents menés par Fabrice Séverac sur la nanoparticule d'Al avec succès *a priori*¹⁰. Un greffage par fonction thiol (-SH) ajouté au brin d'ADN avait par contre été préféré pour le CuO (Séverac *et al.*, 2012). La fonction thiol ne permettant pas d'assurer un greffage fonctionnel de la molécule d'ADN sur la surface d'Al à cause d'une trop forte interaction des oligonucléotides de l'ADN, c'est donc la première stratégie qui sera suivie, dont le schéma de principe est synthétisé sur la Figure 27 ci-dessous.

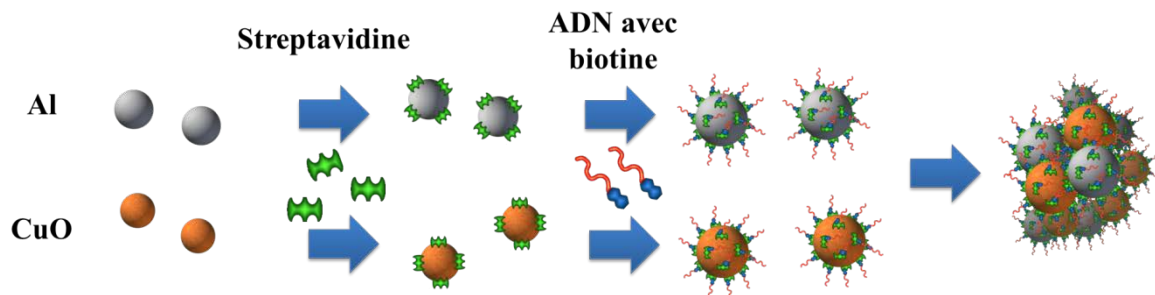


Figure 27: Stratégie adoptée pour l'auto-assemblage de nanoparticules d'Al et du CuO pour la réalisation de nanocomposites énergétiques.

Cette stratégie se décompose en quatre étapes :

1. Stabilisation des nanoparticules d'Al et de CuO en solutions aqueuse à partir des *nanopoudres* commerciales.
2. Greffage de la Streptavidine à la surface des nanoparticules.
3. Immobilisation du monobrin d'ADN, dont l'extrémité est fonctionnalisée par un groupe biotine, à la surface des nanoparticules grâce à la formation du complexe [biotine-Streptavidine].
4. Mélange des deux nanoparticules et auto-assemblage en nanobiocomposite énergétique.

Outre la mise au point et la caractérisation expérimentale précise de chacune des étapes de ce protocole d'assemblage, trois objectifs scientifiques seront adressés en relation avec les défis cités précédemment :

- **Fonctionnalisation de la surface par l'ADN.**

¹⁰ Le greffage de la protéine et de l'ADN n'avait pas été quantifié par des caractérisations poussées.

Nous étudierons expérimentalement et théoriquement les mécanismes d'interaction « ADN – surfaces oxydées » pour répondre à la question suivante : quelle interaction physico-chimique intervient entre un brin d'ADN et une surface d'oxyde ? Ce travail fera l'objet d'une étude spécifique que j'ai mené au laboratoire d'Y. Chabal de l'université du Texas à Dallas, qui possède des moyens de caractérisation précis de chimie de surface, par Infra-Rouge et rayons X.

- **Stabilisation des nanoparticules en solution.**

Nous établirons les paramètres expérimentaux optimaux en termes de concentration en nanoparticules, durée de dispersion et nature du solvant, pour obtenir une solution colloïdale stabilisée dans le temps avec un diamètre hydrodynamique moyen des particules minimisée. Cette première étape est essentielle car à l'origine du matériau de base utilisé pour l'auto-assemblage en solution et dans la suite des travaux, *i.e.* une dispersion de nanoparticules en solution qui seront par la suite fonctionnalisées.

- **Contrôles du greffage et de la spécificité de l'auto-assemblage.**

Nous quantifierons précisément les différentes espèces biologiques greffées sur les nanoparticules et l'impact des paramètres expérimentaux du procédé de fonctionnalisation et d'assemblage (pH, température, concentration saline...) sur l'efficacité des greffages. Nous développerons également un outil de conception des séquences de l'oligonucléotide pour favoriser les interactions spécifiques entre brins d'ADN complémentaires, et limiter les interactions non-spécifiques entre brins d'ADN non-complémentaires, de façon à assurer un auto-assemblage par l'hybridation des brins d'ADN complémentaires exclusivement.

Ces trois points étudiés, mon dernier objectif de thèse sera de démontrer que les nanotechnologies ADN permettent la synthèse d'un nouveau nanobiocomposite¹¹ de type thermite ayant des propriétés améliorées et surtout adaptables, grâce à une meilleure organisation des nanoparticules par l'ADN. Pour ce faire je m'appuierai sur la conception puis la caractérisation thermique de plusieurs assemblages conçus pour cette étude.

La suite de ce manuscrit détaillera les résultats de ce programme de travail, présentés en trois chapitres. Le second chapitre sera consacré à l'étude des interactions entre ADN et surface oxydée, répondant à la question de la fonctionnalisation directe de la surface par l'ADN. Le troisième chapitre présentera le protocole optimisé et caractérisé permettant la fonctionnalisation de nanoparticules commerciales. Le dernier chapitre sera consacré à l'auto-assemblage de nanoparticules en solution, du rôle de la séquence sur l'hybridation en passant par les conditions expérimentales puis en caractérisant les propriétés énergétiques des matériaux synthétisés.

¹¹ Nous parlerons dans ces travaux de nanobiocomposite pour désigner un matériau organisé à l'échelle nanométrique par des molécules biologiques comme l'ADN.

Chapitre 2.
Interaction Physico-Chimique entre
Nucléotide et Surface Oxydée
Cas de l'Alumine

Nous avons défini dans le chapitre précédent les quatre principales étapes du protocole de fonctionnalisation et d'auto-assemblage des nanoparticules d'Al et de CuO. Ces quatre étapes consistent à stabiliser les nanoparticules en solution, greffer la Streptavidine à la surface des particules, fonctionnaliser la surface par les monobrins d'ADN et enfin de réaliser l'auto-assemblage.

De façon à établir un protocole fiable et reproductible, nécessaire pour un transfert de la technologie dans le monde des micro-technologies, il est primordial d'anticiper les interactions non-spécifiques, dans le sens « non-désirées », amenant de l'imprécision dans les procédés de fonctionnalisation. Ainsi, nous proposons dans ce deuxième chapitre d'évaluer les interactions entre brins d'ADN et les surfaces métalliques oxydées telles que l' Al_2O_3 . Les résultats présentés dans ce chapitre représentent une partie du travail publié dans (Calais *et al.*, 2015)¹².

¹² Calais, T., Playe, B., Ducéré, J. M., Veyan, J. F., Rupich, S., Hemeryck, A., ... & Estève, A. (2015). Role of Alumina Coatings for Selective and Controlled Bonding of DNA on Technologically Relevant Oxide Surfaces. *The Journal of Physical Chemistry C*, 119(41), 23527-23543.

1. Introduction

En guise d'introduction, nous présentons rapidement les travaux publiés qui ont étudié de façon fondamentale les interactions physico-chimiques entre l'ADN et les surfaces oxydées. Ils sont peu nombreux car la majorité des travaux se sont focalisés sur les surfaces d'or (Haiss *et al.*, 1998; Kelly *et al.*, 2008; Kundu *et al.*, 2009; Liu, 2012; Petrovykh *et al.*, 2003, 2004). Par exemple Haiss *et al.* ont étudié la chimisorption de la base thymine sur une électrode d'Au (111) par spectroscopie Infra-Rouge et ont observé un greffage covalent par les groupes carbonyles avec un décalage de la signature infrarouge de la molécule par rapport à son état libre (Haiss *et al.*, 1998). D'autres ont suivi par InfraRouge en Transformée de Fourier, Raman, Electronique Auger ou encore microscopie à effet tunnel le greffage de brins d'ADN constitués de bases T, et ont calculé des densités de greffage en fonction des conditions expérimentales (concentration saline, durée d'incubation) (Petrovykh *et al.*, 2003). Ils ont montré qu'après une adsorption du brin d'ADN se couchant sur la surface d'or, la réaction de chimisorption covalente a lieu par la fonction thiol avec une ou deux bases sur la surface d'or. On trouve également d'autres travaux **combinant calculs théoriques et analyses spectroscopiques** sur l'adénine (Kelly *et al.*, 2008; Kundu *et al.*, 2009), la guanine (Camafeita *et al.*, 1996; Pergolese *et al.*, 2005) et la cytosine (Doneux and Fojt, 2009; 2002) sur la surface d'or. Ces travaux s'intéressent à l'orientation des molécules sur les surfaces au moment de l'adsorption, étudiée par calculs DFT (pour *Density Functionnal Theory*, *i.e.* la Théorie de la Fonctionnelle de la Densité) et analyses spectroscopiques diverses. Les énergies d'adsorption des molécules peuvent être déterminées théoriquement mais également expérimentalement, en étudiant la désorption de molécules adsorbées en chauffant la surface. Une comparaison des quatre nucléotides a démontré que la Thymine a l'énergie d'adsorption la plus faible (Demers *et al.*, 2002; Östblom *et al.*, 2005; 2002), justifiant son utilisation massive dans les assemblages de nanoparticules d'or dirigés par ADN (Hill *et al.*, 2008; Macfarlane *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2008; Xiong *et al.*, 2009).

D'autres travaux se sont intéressés aux interactions de bases ADN avec d'autres surfaces, telles que le métal noble argent avec la cytosine ou l'adénine (Giese and McNaughton, 2002; Watanabe *et al.*, 1985), ou encore la surface de cuivre avec l'adénine (Chen *et al.*, 2002; Furukawa *et al.*, 2007; Preuss *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2004), la cytosine, thymine et guanine (Bogdan and Morari, 2013; Yamada *et al.*, 2004). Plus récemment, les travaux se sont ouverts à d'autres surfaces oxydées comme le dioxyde d'hafnium (Fahrenkopf *et al.*, 2012), ou encore l'oxyde de fer (Geinguenaud *et al.*, 2014). Notamment, les travaux réalisés sur nanoparticules d'oxyde de fer se sont intéressés à l'étude de l'immobilisation de brins d'ADN d'une trentaine de bases, comportant les quatre bases, rendant difficile la lecture des spectres Infra-Rouge. Cependant, une dépendance de l'activité biologique des nanoparticules fonctionnalisées avec la densité de greffage a pu être montrée (Geinguenaud *et al.*, 2014). Concernant l'oxyde d'hafnium, les

auteurs ont révélé une double interaction de la molécule d'ADN avec la surface, par le groupe phosphate, et par la base (Fahrenkopf *et al.*, 2012).

L'absence de données théoriques et expérimentales fondamentales sur la chimie de greffage d'ADN sur des surfaces d'oxydes métalliques de type Al_2O_3 et CuO a donc motivé cette première étude de ma thèse mêlant théorie et expérimentation. La partie expérimentale de cette étude a été menée au *Laboratory for Surface and Nanostructure Modification* (Laboratoire de Nanostructuration et Modification de Surface) de Dallas (Texas, Etats-Unis), dirigé par Yves Chabal, où j'ai pu effectuer un séjour d'un mois en début de thèse. La partie théorique a été réalisée au LAAS avec l'aide de Jean-Marie Ducéré, ingénieur de l'équipe NEO. Afin d'élargir la portée de l'étude et de produire une publication référente dans le domaine, nous avons ajouté deux autres surfaces modèles largement utilisées en micro-électronique :

- La surface hydrophobe Si avec terminaison $-\text{H}$, notée Si-H.
- La surface hydrophile SiO_2 hydrolysée, *i.e.* avec des terminaisons $-\text{OH}$.

Cependant, afin de ne pas alourdir le manuscrit, la préparation de ces deux surfaces et les résultats obtenus ne sont pas détaillés dans ce chapitre, mais sont consultables sur la référence (Calais *et al.*, 2015).

Dans une première section, nous présenterons les surfaces et la molécule représentative de l'ADN, la Thymidine 5' monophosphate (notée dTMP), que nous utiliserons comme molécule modèle pour notre étude. Ensuite, nous détaillerons les techniques d'analyse spectroscopique et théoriques utilisées. Nous décrirons dans un second temps les protocoles de préparation de la surface d'alumine et du greffage de l'ADN. Nous analyserons les résultats du greffage de la dTMP sur la surface, avant de nous intéresser dans une dernière partie aux mécanismes réactionnels au contact de la surface d' Al_2O_3 . Une synthèse viendra ensuite conclure ce chapitre.

2. Choix des systèmes modèles

La première étape de l'étude consiste à choisir les systèmes modèles, aussi bien en termes de surfaces que de molécules organiques, qui nous permettront d'accéder à des informations fondamentales sur le greffage de l'ADN sur les surfaces qui nous intéressent ici : Al_2O_3 et CuO , mais également SiO_2 et Si-H .

Concernant les surfaces, il est nécessaire d'élaborer des oxydes métalliques plans et « propres », à la rugosité très faible et à la structure cristallographique contrôlée, afin de :

1. Quantifier par méthodes spectroscopiques la nature des liaisons chimiques entre l'ADN et la surface.
2. Avoir des systèmes expérimentaux les plus comparables possibles aux systèmes théoriques utilisés dans les calculs, indispensable à la compréhension des mécanismes réactionnels.

Pour ce faire, nous nous sommes appuyés sur les procédés technologiques de type Dépôt par Couche Atomique (noté ALD, pour *Atomic Layer Deposition*) suivi de différents traitements de surface spécifiques pour obtenir une surface propre d' Al_2O_3 . Malheureusement, nous n'avons pu obtenir une surface de CuO plane et suffisamment contrôlée pour l'étudier dans ce travail. En effet, la rugosité des échantillons obtenus variait suivant les conditions de 5 nm à 15 nm (Kwon *et al.*, 2013; Marín *et al.*, 2015), avec une structure du CuO colonnaire et polycristalline, impropre à une analyse Infra-Rouge par Transmission.

En ce qui concerne la molécule modèle, le choix du brin d'ADN doit prendre en compte les contraintes techniques suivantes. Nous souhaitons quantifier par les méthodes spectroscopiques les natures des liaisons chimiques entre groupes réactifs de l'ADN et surfaces étudiées. Pour avoir un signal exploitable, nous devons choisir un brin court, évitant une superposition de liaisons qui écraneraient le signal, mais contenant tous les groupes réactifs présents dans la structure de l'ADN. Nous avons donc choisi de réduire la structure complexe de l'ADN à l'étude de la Thymidine 5'-monophosphate, notée dTMP, qui contient en effet les trois parties essentielles de l'ADN : le **groupe phosphate**, le **groupe sucre**, et la **base ADN**, ici la Thymine. La limitation de l'étude à une base et à une taille de molécule courte a l'avantage de maximiser le rapport « signal sur bruit », c'est-à-dire en maximisant le signal des groupes en interaction par rapport aux groupes libres n'interagissant pas avec la surface. De plus, c'est un système modélisable en DFT, grâce à un nombre d'atomes limité (environ une trentaine d'atomes sans compter ceux de la surface), ce qui permettra en conséquence une comparaison optimale entre résultats de simulation et expérimentaux. La formule chimique de la dTMP modèle est schématisée en Figure 28, où les parties phosphate, sucre et base ADN Thymine sont explicitées, ainsi que les sites réactionnels pouvant réagir avec la surface.

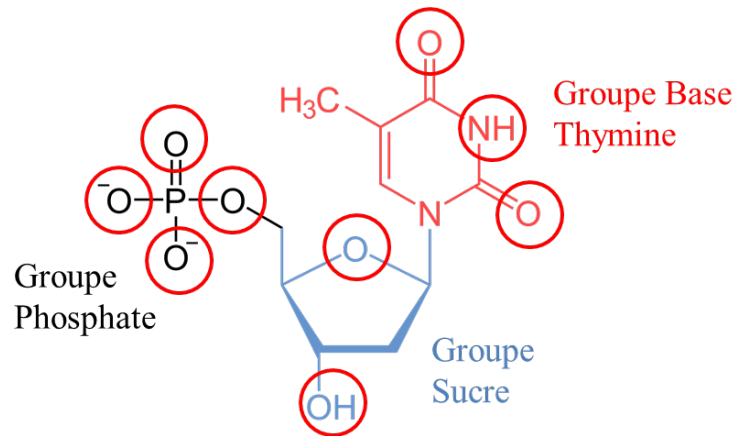


Figure 28 : Structure chimique de la 2-desoxy-thymidine-5'-monophosphate (dTMP). Les sites réactionnels sont explicités en rouge, et les trois groupes Phosphate (noir), Sucre (bleu) et Base (rouge) annotés sur le schéma.

La Thymidine 5'-monophosphate disodium salin hydraté est commercialisée par Sigma Aldrich, dont la formule chimique est rappelée en Figure 29. On peut d'ores et déjà remarquer que la version commerciale de la dTMP possède deux ions Na^+ associés aux oxygènes du groupe phosphate et qu'elle se présente sous forme de gel soluble dans l'eau. La protonation de la dTMP en remplacement de ces ions Na^+ dépend des conditions de pH.

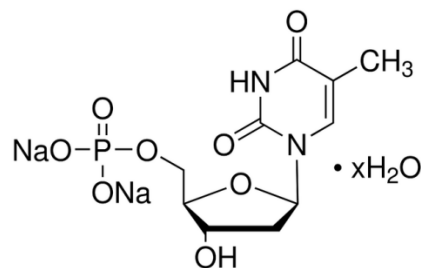


Figure 29 : Formule chimique de la Thymidine 5'-monophosphate disodium salin hydraté (Sigma Aldrich).

3. Méthodes expérimentales et théorique

3.1. Spectroscopie FTIR et XPS

Cette étude est basée sur deux types de techniques d'analyse par spectroscopie des surfaces :

1. **La spectroscopie Infra-Rouge par Transformée de Fourier** (notée FTIR, pour *Fourier Transform InfraRed spectroscopy*) est une méthode plutôt qualitative indiquant les transformations chimiques de la surface.
2. **La spectrométrie photo-électronique X** (notée XPS pour *X-ray Photoelectron Spectrometry*) permet de quantifier les éléments chimiques présents sur la surface.

La deuxième technique s'opère sous ultra-vide, et analyse la surface sur une zone équivalente à 1 cm² sur environ 5 nm de profondeur, tandis que la première technique est réalisée à pression atmosphérique, sous atmosphère contrôlée. La combinaison FTIR / XPS permet d'identifier dans le premier cas la modification de la chimie de surface après greffage de la dTMP puis de déterminer l'évolution de la quantité des éléments chimiques clés, tels que l'azote (N), le phosphore (P), et le carbone (C) présents après greffage sur la surface.

L'analyse du spectre d'absorbance Infra-Rouge (IR) des surfaces et films minces est effectuée en transmission, technique très bien adaptée à la mesure d'échantillons surfaciques plans, dont le substrat est transparent aux IR. Les spectres sont obtenus avec un angle de 70 ° entre l'échantillon et le faisceau lumineux avec une résolution de 4 cm⁻¹ en utilisant le spectromètre Thermo Nicolet 6700 FTIR équipé d'un détecteur DTGS. Les mesures sont réalisées dans une boîte à gant sous atmosphère neutre (N₂ avec une concentration en O₂ et H₂O contrôlée et inférieure à 0,1 ppm). Les spectres d'absorbance réalisés dans le moyen IR (4 000 - 399 cm⁻¹) sont calculés par différence de trois spectres de 500 scans des échantillons modifiés avec trois spectres de 500 scans des échantillons avant modification. Les neuf spectres obtenus sont finalement moyennés.

Le spectre de la dTMP commerciale et isolée est effectué par Réflectance Totale Atténuée (notée ATR pour *Attenuated Total Reflectance*). En effet, l'ATR est plus adaptée pour l'analyse IR d'échantillons liquides, poudreux, ou gélifiés comme la dTMP commercialisée. Les spectres ATR sont obtenus à l'aide d'une machine Thermo Nicolet iS50 FTIR. Les spectres d'absorbance sont obtenus dans la gamme 4 000 - 399 cm⁻¹ en moyennant 9 spectres, obtenus par différenciation de 3 spectres de 500 scans sur le gel de dTMP avec 3 spectres de 500 scans réalisés sans échantillon.

Les mesures XPS sont réalisées sous ultra-vide (10⁻⁹ mbar) avec le spectromètre Physical Electronics Quantum 2000 à micro-sonde à balayage ESCA, équipé d'une

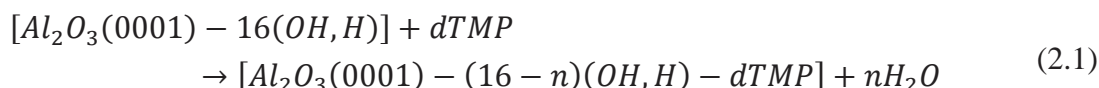
source monochromatique Al K α et d'un analyseur hémisphérique d'énergie électronique. L'échantillon est placé à 45 ° de l'analyseur et analysé avec une énergie de passage de 29,35 eV et une résolution de 0,125 eV par étape, sur 15 à 20 eV. Les scans sont obtenus pour les régions Si 2p (94 – 110 eV), Al 2p (67 – 82 eV), O 1s (526 – 542 eV), C 1s (279 – 296 eV), N 1s (392 – 410 eV), et P 2p (124 – 142 eV).

Une description détaillée des trois techniques utilisées est disponible en *Annexe 1*.

3.2. Calculs théoriques

Afin de déterminer les états chimisorbés de la dTMP sur les surfaces étudiées, nous effectuons des calculs à l'échelle atomique dans le formalisme de la DFT via le logiciel VASP (Vienna Ab initio Simulation Package). Une description complète des paramètres utilisés est disponible dans l'article publié dans le journal *Journal of Physical Chemistry* (Calais *et al.*, 2015). Notons que la modélisation a été effectuée uniquement sur la surface d'Al₂O₃, compte tenu des résultats expérimentaux obtenus sur les trois surfaces, développés dans la section 5. La surface d'Al₂O₃ est modélisée par une structure de type corundum avec une orientation (0001). La cellule unité est répétée dans les trois directions de l'espace (4 × 2 × 2) et un espace de 25 Å est laissé libre en surface, de manière à construire une tranche de matière infinie sur laquelle pourra être déposée la dTMP. Le volume de la cellule unité est de 19,057 × 16,503 × 34 Å³ avec une surface de 3,145 nm². Les atomes d'aluminium et d'oxygène du bas de la cellule sont gelés de façon à simuler les conditions d'une alumine massive. La surface d'alumine est hydrolysée par « réaction » de dissociation de 16 molécules d'eau afin de reproduire l'état hydraté de la surface expérimentale. La structure modèle obtenue correspond donc à une cellule périodique dans les trois directions d'Al₉₆O₁₇₆H₆₄, surmontée par un espace vide.

Les calculs DFT présentés ici sont effectués dans le vide à 0 K. Or, les réactions chimiques envisagées impliquent la présence de molécules d'eau. Ainsi, l'adsorption dissociative de la dTMP sur les surfaces d'Al₂O₃ hydratées est réalisée par substitution de n molécules d'eau pour une molécule de dTMP suivant l'équation (2.5), n dépendant de l'empreinte, et donc de l'orientation de la molécule sur la surface.



Si la référence pour les énergies de formation est prise sur les espèces isolées placées à l'infini les unes des autres, la dTMP et les molécules d'eau consommées pour les réactions sont considérées solvatées à l'infini. Conformément aux modes de calcul de solvation COSMO (Klamt and Schüürmann, 1993), des énergies de solvation de 1 eV pour chaque dTMP et 0,5 eV pour chaque molécule d'eau ont été appliquées.

En plus du logiciel de calcul VASP, le logiciel Turbomole 6.1 (Ahlich *et al.*, 1989) a été utilisé pour calculer le spectre vibrationnel de la molécule isolée mais en solution de la dTMP, sous forme anionique, et pour déterminer les modes de vibration de la molécule greffée par le groupe **phosphate** sur la surface d' Al_2O_3 , dont la structure chimique a été déterminée précédemment par DFT sur les dix configurations. Afin d'alléger les temps de calculs en utilisant Turbomole, la cellule réactionnelle est modélisée par la structure $\text{Al}_{16}\text{O}_{51}\text{H}_{11}\text{Na}_{37}\text{Mg}_3$, où les ions Na et Mg sont utilisés pour saturer les atomes d'oxygènes.

Au total, dix positions initiales de la dTMP sur la surface ont été étudiées de façon à explorer divers scénarii pour la formation d'une ou plusieurs liaisons covalentes entre la dTMP et la surface.

4. Protocoles expérimentaux

4.1. Matériel général

Une solution à base de chlorure de sodium (NaCl, Sigma Aldrich) est utilisée en tant que solution de contrôle propre à déterminer l'influence du solvant sur les surfaces considérées. D'autres solvants comme l'acétone (Fisher), l'hydroxyde d'ammonium (40 %, Sigma Aldrich), le dichlorométhane (Fisher), l'acide sulfurique (98 %, qualité C-MOS, JT Baker), le peroxyde d'hydrogène (30 %, qualité C-MOS, JT Baker), et le triméthylaluminium $\text{Al}_2(\text{CH}_3)_6$ (TMA) ont été utilisés pour la préparation des surfaces modèles. D'autre part, l'eau utilisée dans toutes les étapes de préparation de surface ou de fonctionnalisation est dé-ionisée par système Millipore avec une résistivité de 18,2 M Ω .cm et désoxygénée par flux d'azote.

Enfin, les surfaces modèles sont préparées sur substrats de silicium (100) dopé N de type CZ commercialisés par Atecom. Les wafers CZ, pour Czochralski (Zulehner, 1983), plus largement utilisés en micro-électronique, possèdent un degré de pureté moins bon que les wafers FZ. Les premiers sont donc utilisés pour les surfaces SiO_2 et Al_2O_3 car le niveau de pureté du wafer aura moins d'incidence sur l'étude des surfaces, tandis que les wafers FZ ont été utilisés pour les surfaces SiH. La résistance des wafers est de 20 à 60 Ω .cm pour une épaisseur de 500 à 550 nm recouvert d'un oxyde thermique de 5 à 10 nm d'épaisseur.

4.2. Préparation de la surface d' Al_2O_3 avec terminaison -OH

La surface d' Al_2O_3 est obtenue par Dépôt par Couche Atomique (noté ALD, pour *Atomic Layer Deposition*) sur des substrats CZ de silicium oxydé préalablement nettoyés par traitement « Piranha ». L'oxyde thermique est ensuite gravé par traitement HF pendant 20 sec, puis recrût chimiquement par immersion successive dans les solutions SC₁ et SC₂ pendant 15 min à 80 °C. La couche d' Al_2O_3 est ensuite déposée par ALD (Cambridge Nanotech Savannah) à partir des précurseurs TMA et H₂O. La technique par ALD permet un contrôle du dépôt couche atomique par couche atomique sur des surfaces à haut rapport de forme grâce à une version « pulsée » du procédé classique de Dépôt Chimique en phase Vapeur (CVD pour *Chemical Vapor Deposition*). Il se décompose en deux étapes. Dans un premier temps, le TMA se dissocie sur la surface du wafer de silicium pour former des complexes Al-CH₃. L'excès de TMA qui n'a pas réagi est ensuite évacué par pompage. Ensuite, H₂O est envoyé sur la surface en phase vapeur pour réagir avec les groupes méthyles des complexes Al-CH₃ pour donner CH₄ et la formation d' Al_2O_3 avec terminaison -OH. Rigoureusement, suivant ce procédé par étape, une couche atomique est déposée par cycle. Dans notre cas, la surface d' Al_2O_3 est obtenue après 20 cycles de TMA et de H₂O pour obtenir une épaisseur finale d'environ 2 nm.

L'épaisseur est vérifiée par ellipsomètre (Horiba Jobin UVISEL). Enfin, les surfaces d'alumine sont nettoyées par sonication pendant 10 min dans le dichlorométhane, l'acétone, et enfin le méthanol. Un spectre d'absorbance IR est réalisé avant et après dépôt de la couche d' Al_2O_3 de façon à déterminer les caractéristiques spectrales de la surface.

Un exemple de spectre d'absorbance obtenu après dépôt d' Al_2O_3 sur substrat de SiO_2 est présenté en Figure 30. On y observe l'apparition d'un large et intense pic à 955 cm^{-1} , propre au mode de vibration LO (Longitudinale Optique) des phonons d' Al_2O_3 , démontrant le dépôt effectif. Les autres pics autour de $1\ 650\text{ cm}^{-1}$ correspondent à une pollution aux hydrocarbures, liée à la chambre d'ALD, qui sera discutée plus tard dans le chapitre. Une nouvelle fois, la répétabilité des spectres obtenus sur une quinzaine d'échantillons témoigne de la fiabilité du procédé de dépôt par ALD.

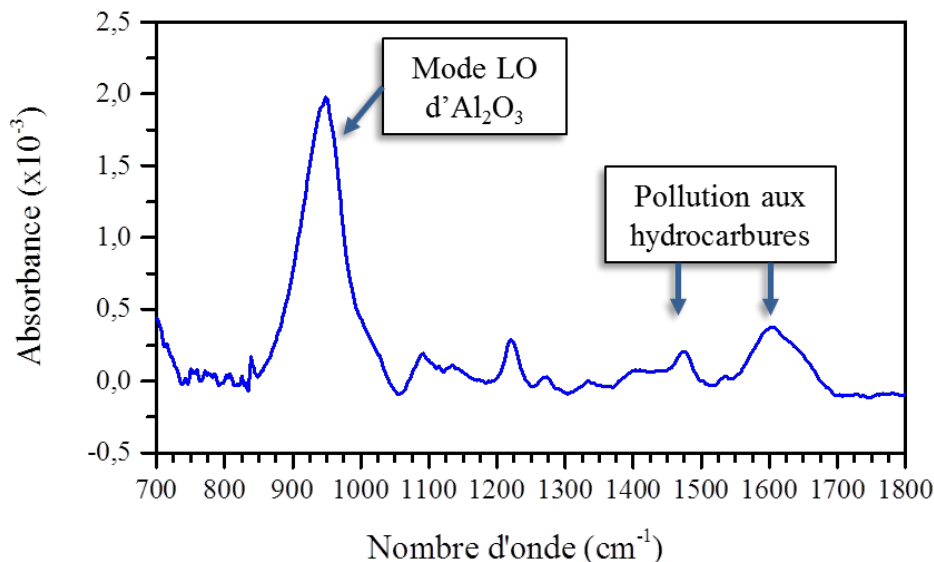


Figure 30 : Spectre d'absorbance IR de la surface Al_2O_3 après dépôt par ALD d'une couche de 2 nm d'épaisseur d' Al_2O_3 sur la surface SiO_2 de référence. Le pic d'absorbance observé à 955 cm^{-1} correspond aux phonons d' Al_2O_3 , tandis que les autres pics autour de $1\ 650\text{ cm}^{-1}$ correspondent à une pollution aux hydrocarbures.

4.3. Greffage et analyse de la dTMP

4.3.1. Analyse IR de la dTMP commerciale

Avant dissolution de la dTMP en solvant aqueux, une analyse de l'absorbance IR de la molécule sous forme de gel est réalisée par ATR. Le spectre d'absorbance de la molécule, obtenu par soustraction entre un spectre réalisé à vide et un spectre réalisé sur la dTMP, est présenté en Figure 31. On y voit clairement les bandes d'absorbance des différents groupes chimiques de la dTMP, dont la formule chimique est donnée en Figure 28. L'assignation des longueurs d'onde aux différents groupes chimiques a été validée par

des calculs théoriques DFT du spectre vibrationnel de la dTMP. Un assignement complet des pics d'absorbance est proposé en *Annexe 2*. Pour rappel, nous dissocions la dTMP en trois parties distinctes que l'on nommera dans les parties suivantes groupe **phosphate**, groupe **sucre**, et le groupe **thymine**, notés respectivement P, S et T sur les spectres.

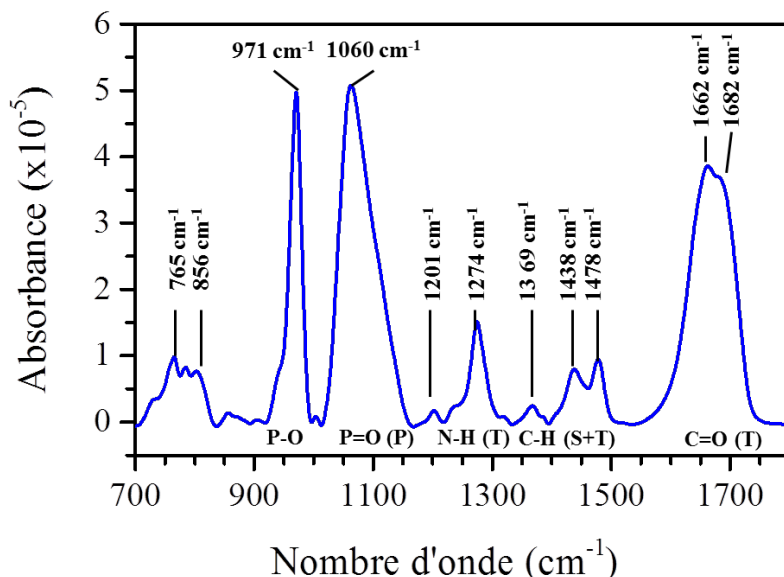


Figure 31 : Spectre d'absorbance IR de la dTMP obtenu par ATR.

L'analyse détaillée du spectre présenté en Figure 31 montre deux pics d'absorbance autour de 1700 cm⁻¹, associés à la vibration en élongation (*stretching*) couplée des liaisons C=O séparées par N-H dans le groupe **thymine**, calculées respectivement par DFT à 1662 et 1691 cm⁻¹. La zone intermédiaire, correspondant à la région 1100 – 1400 cm⁻¹, est quant à elle difficile à décrire à cause du recouvrement de plusieurs modes de vibration de la part des trois parties de la dTMP. A titre d'exemple, les calculs théoriques ont montré que la bande d'absorbance expérimentale à 1274 cm⁻¹ (dont la valeur calculée est 1257 cm⁻¹) correspond à six contributions du groupe **thymine** et **sucre**. Usuellement, cette bande a été associée au groupe **sucre** (Mathlouthi *et al.*, 1984) mais nos calculs ont montré une contribution du groupe thymine, notamment via la déformation de la liaison N-H qui se couple aux modes de vibration de la partie **sucre**. Ensuite, les deux pics intenses à basse fréquence (971 et 1060 cm⁻¹) sont caractéristiques du groupe phosphate. Les calculs par DFT prédisent des bandes d'absorbance à 1099 et 955 cm⁻¹. Enfin, les deux pics à très faible fréquence sont associés à des déformations globales des différentes parties de la molécule. Notons enfin que les spectres IR obtenus se différencient de ceux publiés dans le passé, notamment par Mathlouthi *et al.* (Mathlouthi *et al.*, 1984). Ceci peut provenir de l'utilisation de la thymidine sous forme solide qui induit un état de liaison intermoléculaire très différent des gels étudiés ici. Le Tableau 4 récapitule l'assignation des pics principaux obtenus expérimentalement et par le calcul. Pour rappel, un tableau plus complet est disponible en *Annexe 2*.

Tableau 4 : Assignation des bandes d'absorption de la dTMP mesurées par ATR et calculées par DFT sur la molécule isolée. La numérotation des atomes suit celle de la Figure 28. Les parties Thymine, Sucre et Phosphate sont notées T, S et P respectivement. Les modes de vibration sont notés st. (stretching), tw. (twisting), ro. (rocking), wa (wagging), b. (bending), sc. (scissoring), um. (umbrella), sy. (symmetric), as (asymmetric). Enfin, les intensités sont notées vs pour très intense, s intense, m moyenne, w faible, vw très faible.

Fréquences IR expérimentales	Intensité mesurée	Fréquences IR calculées	Intensités calculées	Assignation aux modes vibrationnels
1682	vs	1691	vs	T: C2=O2 st., NH b.
1662	vs	1662	vs	T: C4=O4 st., NH b.
1478, 1438	m	1446-1417	w	T: CH ₃ sc. S: CH b., CH ₂ sc.
1274.5	m	1257	ms	T: N1-C6 st., CH b., NH b. S: CH b., OH b., CH ₂ ro.
		1099,1120	vs	P: P-O as. st. S: CH tw.
1060 (1020-1160)	vs	1109	ms	T: N1-C2 st., C2-N3 st. TS: N1-C1' st. S: C1'-C2' st., CH ₂ tw. S: C1'-C2' st., C2'-C3' st., CH ₂
		1041	s	tw. S, P: C5'-O st.
		1022	s	S: C-C st.
971 (920-990)		955	s	T: CH ₃ ro. S: C4'-O st.
		928	s	P-O-Al sy. st.

4.3.2. Greffage de la dTMP

Après analyse IR, une solution mère de dTMP concentrée à 50 mM est préparée à partir de 5 mg de dTMP dissous dans 273 μ L d'eau ultra pure, puis stockée à -10 °C. Le greffage de la dTMP sur les surfaces est réalisé par immersion des échantillons dans une solution aqueuse concentrée à 50 μ M en dTMP. Sauf mention contraire, l'incubation dure 1 h, sous azote, à 30 °C, maintenue en immergeant le tube à essai dans un bain d'huile. Après réaction, l'échantillon est délicatement séché sous flux d'azote, analysé au FTIR sous atmosphère d'azote, puis analysé par XPS sous ultravide (10^{-9} mbar). L'ordre des analyses a été décidé afin d'éviter toute contamination liée au transport de l'échantillon et à l'environnement polluant de l'XPS (mise sous vide, puis sous atmosphère) lors de la mesure IR.

5. Résultats du greffage de la dTMP sur surfaces d'Al₂O₃

Le spectre d'absorbance de la surface d'Al₂O₃ après incubation dans une solution de dTMP concentrée à 50 μM pendant 1 h à 30 °C est obtenu après soustraction du spectre de la surface d'alumine avant incubation et est présenté en Figure 32.

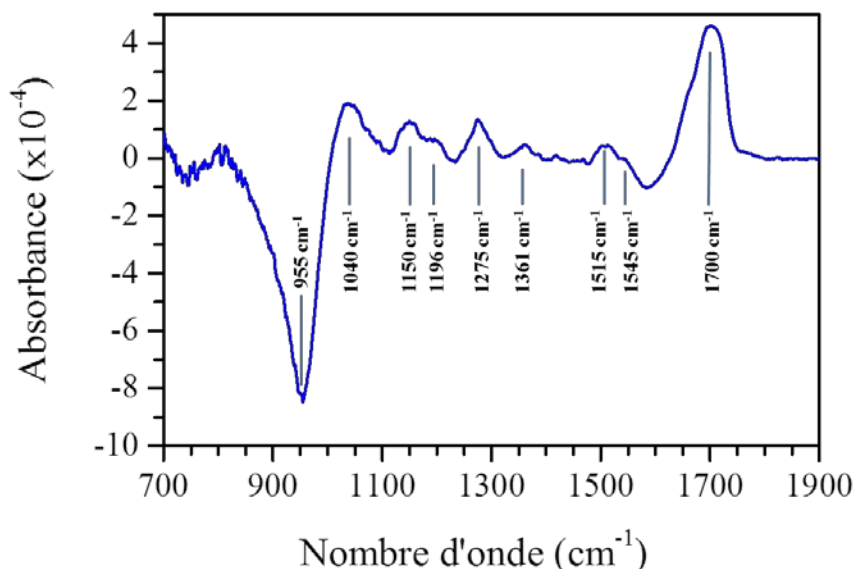


Figure 32 : Spectre d'absorbance IR de la surface d'Al₂O₃ après incubation dans une solution de dTMP concentrée à 50 μM pendant 1 h à 30 °C. La référence est prise sur la surface d'alumine nettoyée avant réaction.

On y voit plusieurs pics témoignant d'une modification majeure de la chimie de surface de l'Al₂O₃, avec trois zones distinctes :

La zone 1 500 – 1 750 cm⁻¹, dominée par un large et intense pic centré sur 1 700 cm⁻¹, caractéristique de la vibration de la liaison C=O du groupe **thymine**. Le double pic à 1 515 et 1 545 cm⁻¹ est également attribué à la liaison C=O de la partie **thymine**, mais cette fois-ci en interaction avec la surface, comme reporté dans la littérature sur surface d'or (Petrovykh *et al.*, 2003). Enfin, on observe une perte de l'absorbance à 1 585 cm⁻¹ attribuée au retrait d'impuretés carbonées, affectant de façon indésirable la qualité des pics précédents.

La zone 1 050 – 1 500 cm⁻¹ présente de nombreux pics de faible intensité que l'on peut associer à la dTMP. Le faible pic à 1 361 cm⁻¹ peut être associé aux vibrations couplés des groupes **sucre** et **thymine** correspondant à la vibration à 1 369 cm⁻¹ de la dTMP isolée (voir Figure 31). Le pic à 1 275 cm⁻¹ est associé au couplage des vibrations d'élongation de la liaison N-C et de déformation de la liaison NH du groupe **thymine**. Enfin, les pics entre 1 000 et 1 200 cm⁻¹ correspondent à des modes de vibration liés au phosphate.

La zone $800 - 1\ 050\ \text{cm}^{-1}$ est marquée par une très importante perte d'absorbance observée à $955\ \text{cm}^{-1}$, associée au mode de vibration LO des phonons d' Al_2O_3 . Cette bande d'absorbance apparaît positivement après le dépôt par ALD d' Al_2O_3 sur la surface SiO_2 (voir Figure 30). La perte d'absorbance est donc cohérente avec la perturbation des phonons des couches supérieures pouvant être causée par la chimisorption de la dTMP. Une observation similaire avait pu être réalisée lors du greffage de molécules sur surface SiO_2 (Dai *et al.*, 2010).

Avec l'aide des calculs DFT, nous proposons une assignation détaillée des fréquences calculées et observées expérimentalement en IR (voir Figure 32) dans le Tableau 5 ci-dessous. Plusieurs configurations d'accroche de la molécule sur la surface ont été calculées : par le groupe **phosphate**, le **sucre** et la **thymine**. Pour chaque configuration, l'énergie de liaison est calculée afin de déterminer les formes de greffage les plus probables. Une vue schématique des différentes configurations testées est présentée en *Annexe 3*, et toutes les énergies d'adsorption, les détails des liaisons formées, et l'évolution des structures dans leur globalité sont donnés en *Annexe 4*.

Tableau 5 : Assignation des fréquences IR de la dTMP ayant réagi avec la surface. La numérotation des atomes suit celle de la Figure 28. Les groupes Thymine, Sucre et Phosphate sont notées T, S et P respectivement. Les modes de vibration sont notés st. (stretching), tw. (twisting), ro. (rocking), wa (wagging), b. (bending), sc. (scissoring), um. (umbrella), sy. (symmetric), as (asymmetric). Enfin, les intensités sont notées vs pour très intense, s intense, m moyenne, w faible, vw très faible.

Fréquences IR expérimentales	Intensité mesurée	Fréquences IR calculées	Intensités calculées	Assignation aux modes vibrationnels
1700; 1600	vs	1715; 1706	vs	T: C=O st.
1545; 1515	m	1591; 1515	m	T: C-O-Al st.
1361	w	Gamme 1290-1375	w	T: NH b., CH b., CH ₃ um. S: OH b., CH b., CH ₂ ro.
1275	m	Gamme 1235-1257	m	T: N1-C6 st., CH b., NH b. S: CH b., OH b., CH ₂ ro.
1196	m	1141	s	P: P=O coupled with OH surface bending T: N1-C2 st., C2-N3 st.
1150	m	1184-1136 range	m	TS: N1-C1' st. S: C1'-C2' st., C3'-C4' st., CH ₂ tw.
1040	m	1027-1061		S, P: C5'-O-P st.
Pic négatif: Perte d'OH	vs	955	s	P-O-Al st.

Tout d'abord, on observe une bonne concordance entre résultats expérimentaux et théoriques des fréquences vibrationnelles des liaisons C=O du groupe **thymine**, où la fréquence à $1\ 700\ \text{cm}^{-1}$ correspond à la liaison C=O libre, donc sans interaction avec la

surface. Cette fréquence est décalée vers les plus basses longueurs d'ondes ($\sim 1\,500\text{ cm}^{-1}$) lorsque la liaison réagit avec la surface, pour former la liaison covalente C-O-Al.

Ensuite, les deux contributions à $1\,361\text{ cm}^{-1}$ et $1\,275\text{ cm}^{-1}$ sont associées aux liaisons couplées des groupes **thymine** et **sucre** (CH, OH en déformation, N-C en mode élongation). Ces contributions déjà existantes dans le spectre de la dTMP isolée montrent une absence d'interaction de ces atomes avec la surface.

Ensuite, la plus forte interaction du P-O calculée à $1\,141 - 1\,191\text{ cm}^{-1}$ est associée à l'élongation d'un P-O non-covalent à la surface, mais interagissant par liaisons faibles avec les terminaisons -OH de l'alumine. Le pic à $1\,040\text{ cm}^{-1}$ correspond lui à l'élongation de la liaison P-O-C. Enfin, la vibration de la liaison P-O-Al témoignant du greffage covalent de la dTMP sur la surface par le groupe phosphate est calculée à 955 cm^{-1} , dans la zone caractéristique des phonons de l'alumine. Les interactions complexes entre la surface, le solvant et la molécule rendent cependant difficile l'assignation précise des vibrations des liaisons liées au groupe **phosphate**. En effet, suivant les états de protonation ou déprotonation du groupe **phosphate**, des décalages des fréquences vibrationnelles peuvent être importants. Par exemple, on peut observer un décalage de $1\,141\text{ cm}^{-1}$ à $1\,191\text{ cm}^{-1}$ lorsque la liaison anionique P-O⁻ devient la double liaison P=O. De même, une liaison du phosphate sur 2 Oxygènes de la surface est possible, conservant la double liaison P=O dont la fréquence est alors décalée de $1\,196$ à $1\,182\text{ cm}^{-1}$. Enfin, la protonation du groupe phosphate possible par un échange Na^+ / H^+ avec la surface entraîne un décalage de la fréquence de la liaison P-O-Al de 955 cm^{-1} à $1\,044\text{ cm}^{-1}$, dans la zone de fréquence de P-O-C.

Les schémas de la Figure 33 résument les fréquences vibrationnelles calculées et observées expérimentalement du Tableau 5 en les associant aux différents groupes de la dTMP, suivant son état d'adsorption sur la surface.

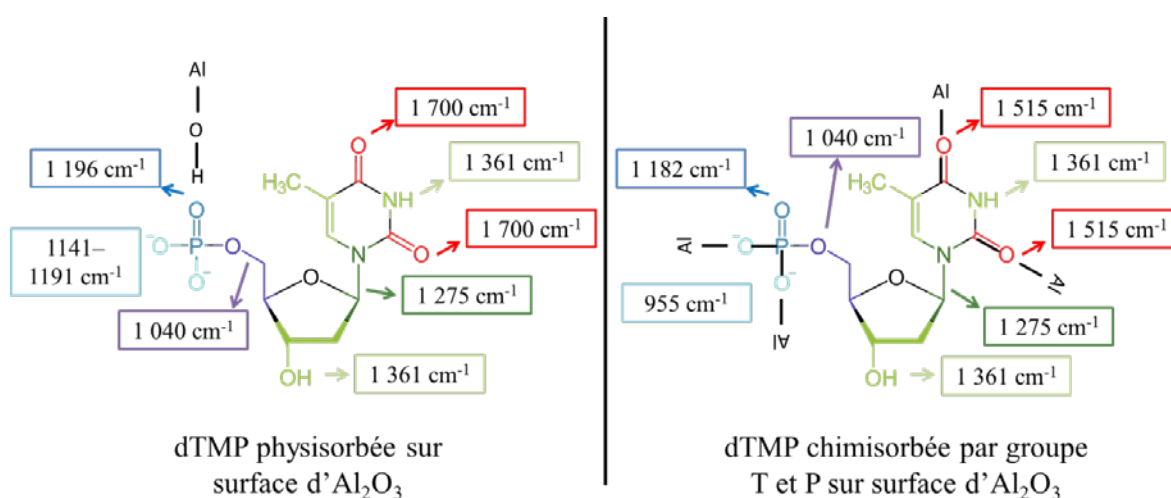


Figure 33 : Schéma des attributions schématique des fréquences vibrationnelles de la dTMP suivant son état d'adsorption sur la surface (physisorbé à gauche, chimisorbé à droite).

Au-delà de l'assignation des pics observés en IR, les calculs DFT permettent de déterminer les configurations finales les plus stables après formation de liaisons covalentes se formant entre la molécule et la surface d' Al_2O_3 . Globalement, dans toutes les configurations testées, on observe une transformation des liaisons $\text{C}=\text{O}$ et $\text{P}=\text{O}$ en $\text{C}-\text{O}-\text{Al}$ et $\text{P}-\text{O}-\text{Al}$ après réaction avec les terminaisons $-\text{OH}$ de l'alumine hydratée. La combinaison la plus stable (n° 8) schématisée en Figure 34, est obtenue par greffage sur la surface par les liaisons covalentes $\text{P}-\text{O}-\text{Al}$ et $\text{C}-\text{O}-\text{Al}$ des parties **phosphate** et **thymine** et l'établissement de nombreuses liaisons faibles hydrogènes et Van der Waals, justifiant la stabilité de la version « étalée » de la molécule. Globalement, la partie **sucre** n'interagit pas avec la surface, pour causes de problème stérique. Enfin, le greffage de la dTMP est prédit par les calculs DFT, aussi bien par la **thymine** que par le **phosphate**. Ce dernier peut en effet établir une ou deux liaisons avec des atomes d'Al sur la surface, complexifiant la lecture des graphes expérimentaux.

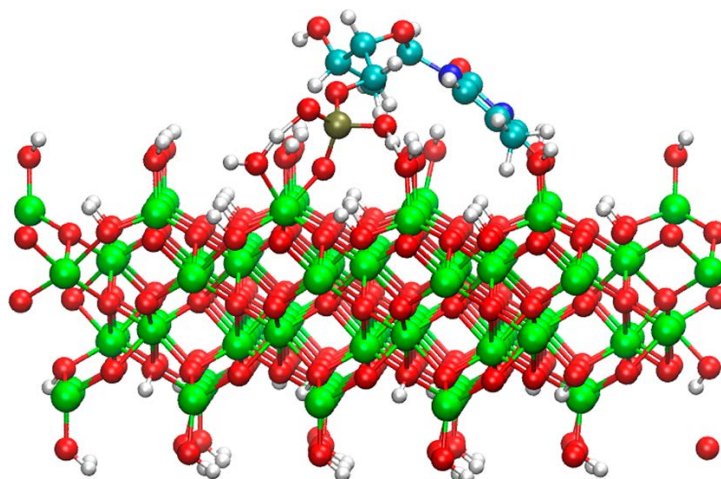


Figure 34 : Chimisorption de la dTMP sur surface d' Al_2O_3 hydratée (avec terminaison $-\text{OH}$) dans le cas le plus stable, i.e. avec formation de liaisons covalentes par le phosphate et la partie thymine.

Pour conclure, les calculs DFT ont permis d'analyser les spectres IR en assignant les pics d'absorbance observés au niveau des liaisons de la dTMP avec la surface. Deux « modes » de greffage semblent particulièrement plausibles : un premier par le groupe **phosphate**, un second par le groupe **thymine**. Si le greffage par le groupe **thymine** est facilement identifiable grâce aux pics à $1\,515\text{ cm}^{-1}$ et $1\,700\text{ cm}^{-1}$, celui par le groupe **phosphate** est plus difficile à cause des multiples états possibles des O liés au P, bien que la thermodynamique semble être préférable à un greffage par le groupe phosphate.

La modification importante de la signature spectrale de la surface d' Al_2O_3 après incubation avec la dTMP détectée par FTIR et les calculs théoriques démontrent incontestablement une chimisorption dissociative de la dTMP sur la surface d' Al_2O_3 . Ces observations sont confirmées par les analyses XPS de la surface, présentés en Figure 35, montrant l'évolution des quatre éléments principaux N, P, C et O de la dTMP sur la surface d' Al_2O_3 avant (courbe noire) et après (courbe rouge) incubation.

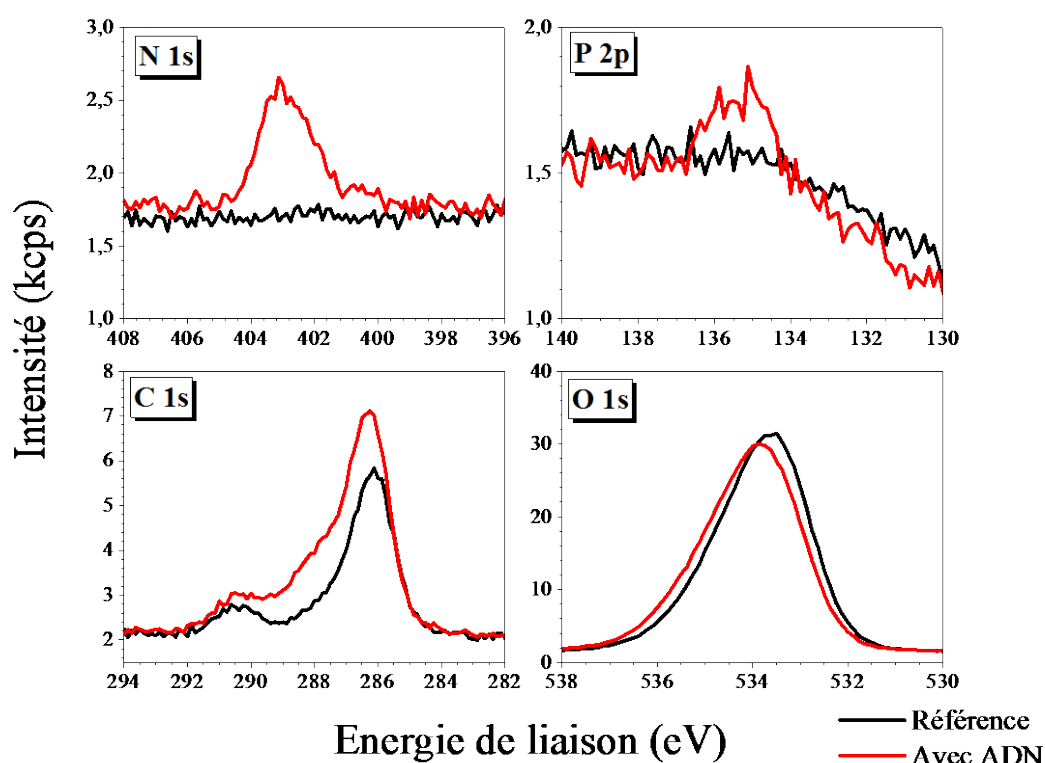


Figure 35 : Spectres XPS de trois éléments principaux de la dTMP (N, P, C) déposée sur surface Al_2O_3 ($50 \mu\text{M}$ pendant 1 h à 30°C). La courbe pointillée correspond au signal de référence (surface d'alumine) et la courbe continue correspond à la surface d'alumine exposée à la dTMP.

L'évolution du signal de l'**oxygène** n'est pas représentative à cause de sa présence dans la couche d' Al_2O_3 et dans le substrat de SiO_2 sur lequel a été déposée la couche d'alumine. De fait, l'apport d'oxygène par la dTMP est négligeable par rapport à la quantité initialement présente. On note par contre une claire apparition du signal de l'**azote** et du **phosphore**, démontrant la présence de la dTMP à la surface. L'énergie de liaison de N 1s située entre 402,8 et 403,3 eV est légèrement plus élevée que les énergies publiées pour la thymine adsorbée sur surface d'or (401,1 - 402,1 eV (Barber and Clark, 1970) ; 400,4 eV (Roelfs *et al.*, 1997) ; 400,5 - 401,0 eV (Petrovykh *et al.*, 2003)). Nous attribuons cette différence à la proximité de la base azotée de la thymine avec la surface d' Al_2O_3 par rapport au métal noble. Le signal du **phosphore** étant plus faible, il est plus intéressant de le comparer avec celui de l'**azote** plutôt que de l'analyser seul (voir paragraphe suivant). De plus, l'intensité initiale du **carbone** témoigne encore une nouvelle fois de la contamination aux hydrocarbures de la surface avant la réaction avec la dTMP. Des expériences complémentaires présentées en Annexe 5 ont identifié l'origine de la contamination au dépôt par ALD de la couche d'alumine. Malgré la contamination initiale, on note une nette augmentation du signal du **carbone** (environ 30 %), surtout entre 286 et 289 eV, confirmant la présence de dTMP sur la surface.

La technique d'analyse par XPS étant quantitative, il est possible d'établir la pureté du film de dTMP déposé sur la surface d' Al_2O_3 grâce aux rapports des éléments P, C et N de la molécule, contenant 1 P, 2 N et 10 C (voir Figure 28) (Kwon *et al.*, 2007). Autrement dit, le rapport des aires des pics des signaux P / N et C / N doivent théoriquement valoir 0,5 et 5 respectivement. Expérimentalement, à partir des spectres XPS de la Figure 35, le ratio P / N est de 0,48, donc très proche de la valeur théorique, et le ratio C / N est de 7,7. Ces résultats confirment donc d'une part que la dTMP a été adsorbée sur la surface et d'autre part que la surface est contaminée aux hydrocarbures, à cause du rapport C / N supérieur à la valeur théorique (Herne and Tarlov, 1997; Wang *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1999).

L'évolution de la position du pic de N 1s en fonction de la concentration de la solution en dTMP, présentée en Figure 36, a été étudiée entre 0,2 et 1 000 μM pour les mêmes conditions d'incubation (1h à 30 °C) afin d'étudier qualitativement le film de dTMP greffé en surface.

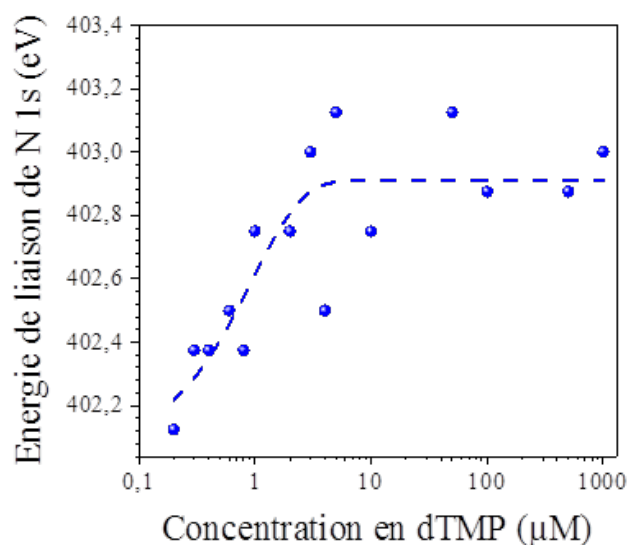


Figure 36 : Evolution de la position du pic N 1s avec la concentration en dTMP (en échelle logarithmique) pour des conditions identiques d'incubation (1 h à 30 °C).

On peut observer que la position du pic N 1s évolue fortement avec la concentration en dTMP, passant de 402,0 à 403,6 eV de 0,2 à 1 000 μM , confirmant les résultats publiés dans la littérature pour la surface d'or (Petrovykh *et al.*, 2003). Ceci est dû à la superposition de couches organiques sur des surfaces métalliques, impliquant des effets de charges et de relaxations extra-atomiques (Petrovykh *et al.*, 2003; Sexton and Hughes, 1984). On note également sur la Figure 36 que l'augmentation de l'énergie de liaison est plus forte sur l'intervalle 0,2 - 10 μM , puis se stabilise, laissant supposer une saturation

de la surface pour une concentration supérieure à 10 μM . Il est vraisemblable qu'au-delà de cette concentration, on observe un dépôt de dTMP en multicouches.

En conclusion, les analyses XPS confirment clairement la présence de dTMP sur la surface d' Al_2O_3 , observée lors des analyses IR. L'analyse quantitative réalisée sur les éléments N, P et C ont permis de montrer la bonne qualité du film biologique adsorbé, c'est-à-dire l'intégrité de la molécule est préservée après réaction, malgré une pollution de la surface aux hydrocarbures. L'influence de la concentration est également claire et suggère une formation de multicouches sur la surface au-delà d'une concentration limite de 10 μM . Compte tenu des conditions environnementales des analyses XPS, **nous pouvons donc déduire que la dTMP se chimisorbe sur la surface d' Al_2O_3 , par formation de liaisons covalentes** dont la signature spectrale a été détectée lors de l'analyse IR présentée en Figure 32.

Les premières analyses IR et XPS ont démontré la présence de dTMP chimisorbée sur la surface d'alumine et suggère la formation de multiples couches au-delà d'une concentration limite de 10 μM . Les calculs DFT ont permis d'assigner les pics observés sur les spectres. Deux modes de greffage sont mis en évidence : un par le groupe **phosphate** (bande d'absorbance de P-O-Al à 955 cm^{-1}) et un par le groupe **thymine** (bande d'absorbance de C-O-Al entre $1\ 515$ et $1\ 550\text{ cm}^{-1}$) (voir Figure 34). Ce dernier a pu être vérifié expérimentalement tandis que le premier est masqué par un phénomène de *gravure* des couches supérieures de l'alumine non-expliqué jusqu'à présent.

Nous proposons donc dans la dernière partie de ce chapitre d'étudier plus en détail les paramètres expérimentaux (en concentration, solvant, température et durée d'incubation), afin de valider d'une part le greffage de la dTMP par ses différentes parties, et d'autre part comprendre l'origine du phénomène de *gravure* observé. Enfin, à ce stade, ces résultats montrent que l'ADN possède structurellement une affinité particulière pour une surface nous intéressant particulièrement, et justifient en conséquence la stratégie biotine-Streptavidine décrite dans le premier chapitre.

6. Etude des paramètres influençant l'interaction entre ADN et Alumine

6.1. Calcul de la concentration de dTMP par unité de surface

Les spectres d'absorbance IR de surfaces d' Al_2O_3 après incubation dans une solution de dTMP de concentrations variables allant de $0,7 \mu\text{M}$ à $1\,000 \mu\text{M}$, pendant 1 h à 30°C , sont présentés en Figure 37. Chaque spectre est obtenu après soustraction du spectre de référence réalisé sur la surface d' Al_2O_3 correspondante avant incubation.

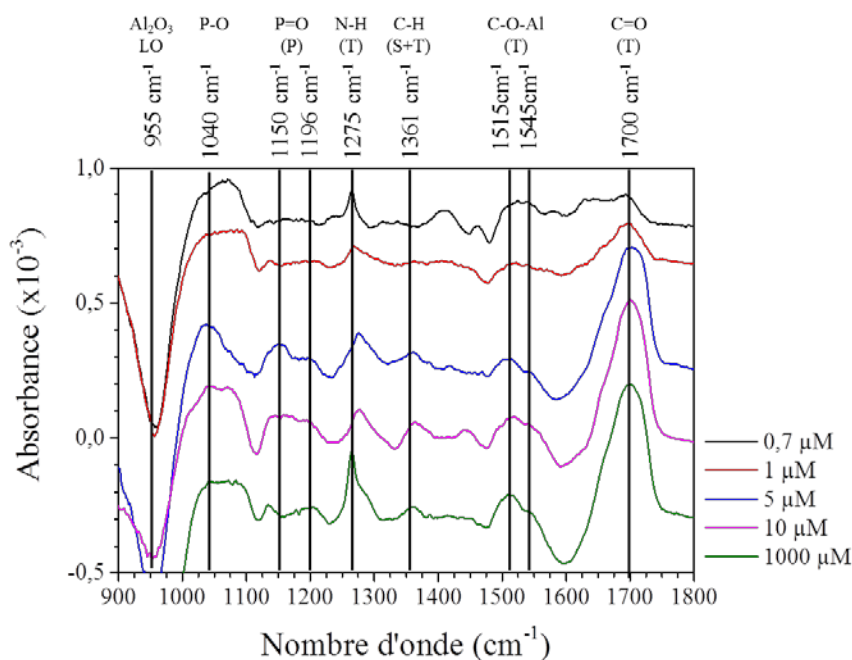


Figure 37 : Spectres d'absorbance de la surface d' Al_2O_3 après réaction pendant 1 h à 30°C dans une solution à différentes concentrations en dTMP ($0,7 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ et $1\,000 \mu\text{M}$). La référence est prise sur la surface d' Al_2O_3 avant réaction. Les liaisons identifiées par DFT des trois parties de la molécule sont annotées dans la partie supérieure du graphe (T pour Thymine, S pour Sucre, P pour phosphate).

On observe tout d'abord une saturation au-delà de $10 \mu\text{M}$ de l'intensité du double pic $1\,515 - 1\,545 \text{ cm}^{-1}$, propre à la liaison C-O-Al, dont l'aire atteint son maximum à $1\,000 \mu\text{M}$ (70, 39, 51 et 96 % de l'aire maximale pour les concentrations $0,7 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ et $1\,000 \mu\text{M}$ respectivement). Ces résultats corroborent ceux obtenus par XPS (voir Figure 35). De même, l'aire du pic à $1\,700 \text{ cm}^{-1}$, attribué à la liaison libre C=O, augmente de façon importante entre $0,7 \mu\text{M}$ et $5 \mu\text{M}$, avant de se stabiliser autour de sa valeur maximale au-delà de $5 \mu\text{M}$. En normalisant l'intensité des différents pics à $1\,700 \text{ cm}^{-1}$ par rapport à l'intensité maximale obtenue, on observe une augmentation du pourcentage jusque $5 \mu\text{M}$ (20 %, 26 % et 91 % pour $0,7 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ et $5 \mu\text{M}$ respectivement), puis une stagnation du pourcentage (100 et 96 % pour 10 et $1\,000 \mu\text{M}$ respectivement). Une visualisation graphique plus claire est proposée en Figure 38 (courbe noire).

Dans un second temps, nous considérons le rapport des aires des pics C-O-Al et C=O en fonction de la concentration en dTMP, afin de déterminer la proportion de dTMP chimisorbée par rapport à la dTMP physisorbée. Une représentation graphique de son évolution est proposée sur la courbe rouge de la Figure 38.

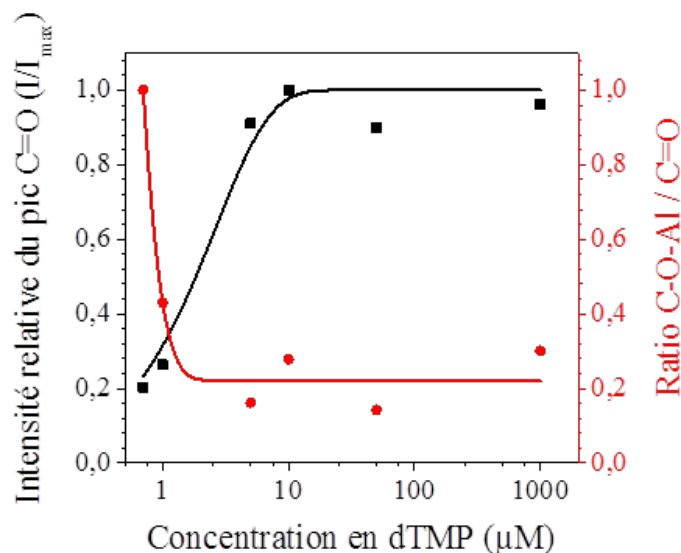


Figure 38 : Evolution de l'intensité relative du pic à 1700 cm^{-1} (courbe noire) et du ratio des aires sous la courbe des pics à 1515 cm^{-1} et 1700 cm^{-1} (ratio C-O-Al / C=O courbe rouge), en fonction de la concentration en échelle semi-log.

On observe que le ratio est très élevé pour de faibles concentrations (1,0 puis 0,43 pour 0,7 et 1 μM) puis décroît très rapidement pour atteindre une valeur stabilisée à $0,22 \pm 0,08$ au-delà de 5 μM . Ces résultats suggèrent que pour une faible concentration en dTMP, une chimisorption par les groupements carbonyles C=O est favorisée, mais qu'au-delà d'une concentration limite, autour de 5 μM , le nombre de molécules physisorbées augmente considérablement.

Par ailleurs, étant donné la surface de la molécule de dTMP d'environ 1 nm^2 , la concentration assurant un recouvrement homogène d'une monocouche de dTMP sur nos surfaces de $5,7\text{ cm}^2$ (taille standard de nos échantillons) est calculée à $1,3\text{ }\mu\text{M}$. Cette concentration conforte l'ordre de grandeur observé expérimentalement, entre 5 et 10 μM . Au-delà de 5 μM , la quantité de dTMP physisorbée à la surface augmente comme l'atteste l'augmentation du pic propre à la liaison C=O libre. Ainsi, nous estimons la concentration surfacique de dTMP assurant un recouvrement optimal de la surface d' Al_2O_3 à $1,3 \pm 0,4\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{cm}^2$.

6.2. Influence de la température et de la durée d'incubation

Nous considérons ici une concentration de dTMP fixée à 50 μM et avons fait varier la température de 30 °C à 90 °C et la durée d'incubation de 1 h à 12 h afin d'étudier leur impact sur le greffage de la molécule.

Les spectres d'absorbance IR des surfaces d' Al_2O_3 après incubation pendant 1 h dans une solution de dTMP en fonction de la température (30 °C, 60 °C et 90 °C) sont obtenus après soustraction du spectre de référence établi sur les surfaces respectives avant incubation, et sont présentés en Figure 39.

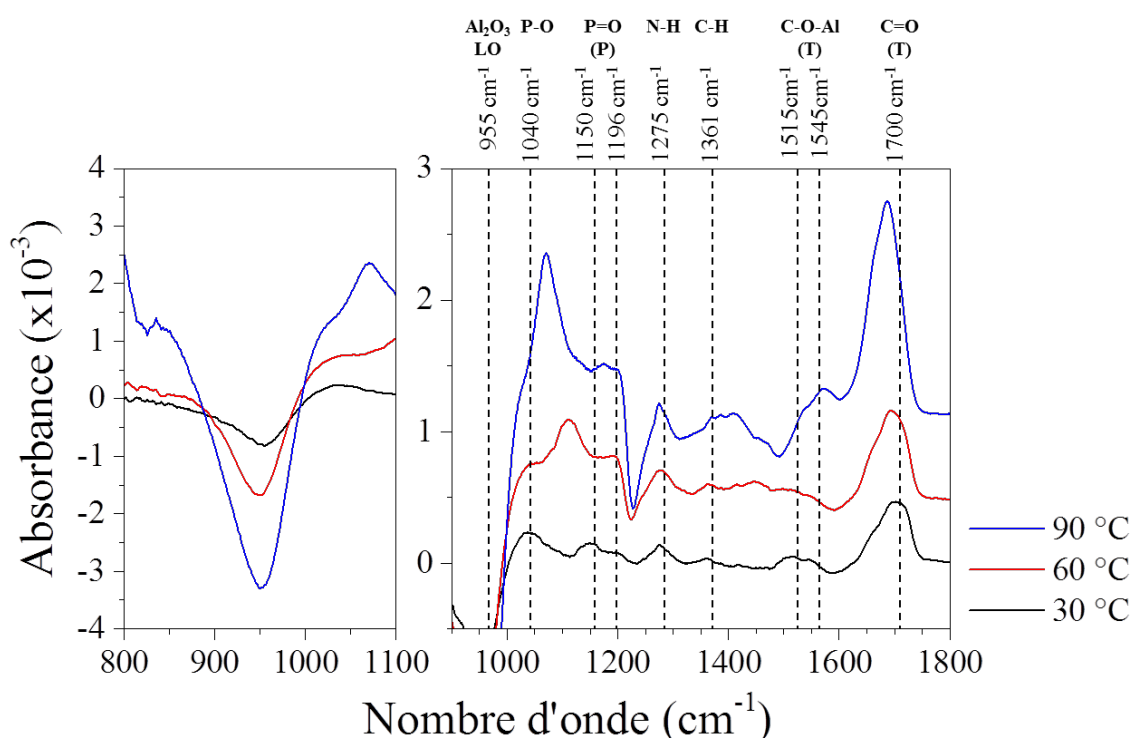


Figure 39 : Spectres d'absorbance IR de surfaces d' Al_2O_3 après incubation pendant 1 h dans une solution de dTMP concentré à 50 μM en fonction de la température d'incubation (30 °C, 60 °C et 90 °C). La référence est prise sur la surface d'alumine propre avant réaction. La perte de l'absorbance des phonons de l'alumine est représentée sur le graphe de gauche, et le reste du spectre sur le graphe de droite, afin d'améliorer la lisibilité des courbes.

La première observation notable est l'augmentation du pic à 1700 cm^{-1} , associé à la liaison C=O libre, avec l'augmentation de la température. L'aire sous le pic croît en effet de 33 % à 180 % en passant de 30 °C à 90 °C. Cette augmentation forte s'accompagne d'une augmentation de la perte d'absorbance observée à 955 cm^{-1} , dont l'aire augmente de 109 % et 548 % respectivement à 60 °C et 90 °C. Comme noté précédemment, cette perte d'absorbance est liée à la perturbation des phonons de la surface d'alumine. Les autres pics propres à la dTMP adsorbée sur la surface sont également identifiés dans la zone 1000 – 1400 cm^{-1} mais sont difficilement quantifiables. Pour finir, on note à 90 °C l'apparition d'un pic à 1100 cm^{-1} , qui peut correspondre à un décalage du pic propre aux

liaisons phosphates (voir section 5), ou bien aux phonons du SiO₂ (mode de vibration TO). La deuxième hypothèse impliquerait alors une gravure de la surface d'Al₂O₃, découvrant le support en SiO₂. De plus, l'élévation de la température d'incubation semble induire une augmentation du nombre de dTMP physisorbées à la surface, comme l'atteste l'augmentation de 180 % de l'aire sous le pic à 1 700 cm⁻¹ de 30 à 90 °C.

Lors de la montée en température (Figure 39), le rapport C-O-Al / C=O diminue de 0,19 à 0,11 puis 0,05 pour les températures 30 °C, 60 °C et 90 °C respectivement. Les évolutions des intensités relatives des pics à 1 700 cm⁻¹ et 1 515 cm⁻¹, ainsi que l'évolution du rapport C-O-Al et C=O sont présentés en Figure 40.

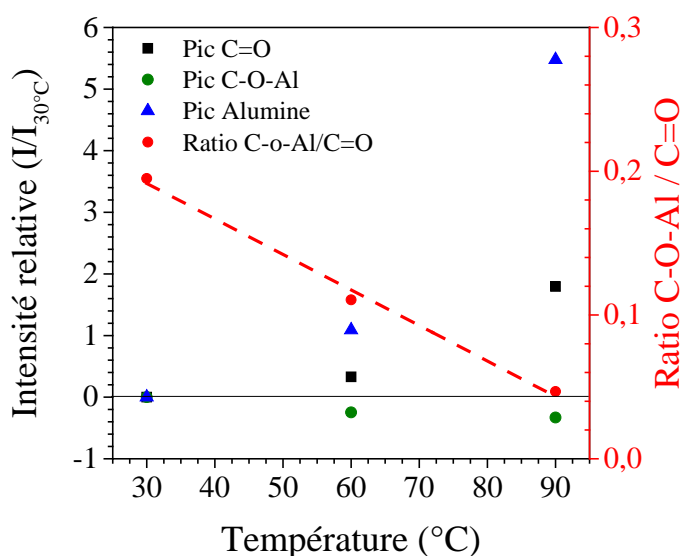


Figure 40 : Evolution de l'intensité relative des pics à 1 700 cm⁻¹ (courbe noire), à 1 515 cm⁻¹ (courbe verte) et à 955 cm⁻¹ (courbe bleue), normalisées par rapport à l'intensité obtenue pour une température d'incubation de 30 °C) et du ratio C-O-Al / C=O (courbe rouge), en fonction de la température.

La diminution du rapport est interprétée par l'augmentation du nombre de dTMP physisorbées en surface augmentant avec la température, alors que le nombre de dTMP greffés à la surface n'augmente pas. L'augmentation de l'aire sous le pic à 1 700 cm⁻¹ (de 180 % de 30 °C à 90 °C pour la liaison C=O libre) est supérieure à la diminution en valeur absolue de l'aire du pic à 1 515 cm⁻¹, de 75 % et 67 % en passant de 30 °C à 60 °C et 90 °C respectivement (voir Figure 40). Cela montre qu'il existe une combinaison des deux phénomènes, dominée par l'augmentation du nombre de dTMP physisorbées sur la surface.

Les résultats XPS des éléments propres à la dTMP confirment toujours le greffage effectif de dTMP à la surface d'Al₂O₃. Ainsi, les pics propres à l'**azote** et au **phosphore** apparaissent nettement, avec un rapport d'aires toujours proche de 0,5 (0,45 et 0,51 après incubation à 30 °C et 60 °C respectivement). De plus, les signaux de l'**azote**, du **phosphore** et du **carbone** augmentent avec la température, d'environ 20 % ± 3 % en

passant de 30 °C à 60 °C. Cette observation est cohérente avec l'augmentation du nombre de dTMP sur la surface observée par IR. De façon, intéressante, on observe également une augmentation importante du signal du **silicium** après incubation de la surface avec la dTMP. Cette augmentation est encore plus marquée lorsque la température passe de 30 °C à 60 °C, passant de 42 % à 62 % d'augmentation du signal après incubation avec la dTMP. Conjointement à cette observation, on note une diminution drastique du signal de l'aluminium avec l'augmentation de la température. A 30 °C, la diminution du signal de l'aluminium n'excède pas 5 % après incubation de la surface avec la dTMP. Par contre, à 60 °C, l'intensité du signal de l'aluminium diminue de 40 %. Ces observations renforcent l'hypothèse d'une gravure physique de l'aluminium, qui aurait comme conséquence une ouverture de la surface, ou du moins une diminution de l'épaisseur d' Al_2O_3 , rendant le silicium plus détectable à l'XPS. Le schéma de la Figure 41 ci-dessous illustre ces observations.

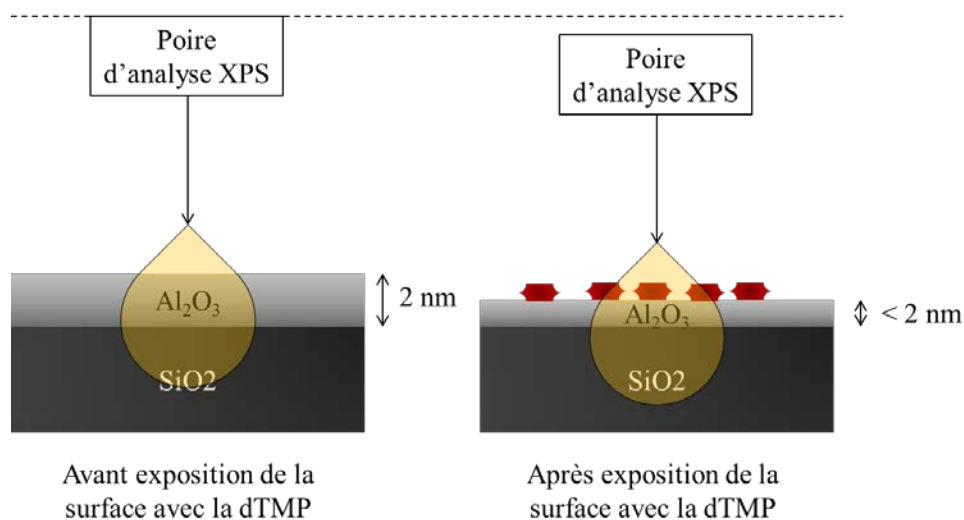


Figure 41 : Schéma illustrant la gravure physique de la couche supérieure de l'alumine, permettant d'expliquer l'évolution des signaux XPS des éléments Si et Al après exposition de la surface avec la dTMP : après exposition de la surface avec la dTMP, les éléments organiques apparaissent ou augmentent (N, C et P), la quantité d'Al diminue tandis que la quantité de Si augmente.

Les spectres d'absorbance IR des surfaces d' Al_2O_3 après incubation dans une solution de dTMP en fonction de la durée d'incubation (étudiée entre 1 h et 12 h) sont obtenus après soustraction du spectre de référence déterminé sur les surfaces correspondantes avant incubation, et sont présentés en Figure 42. Lors de ces expériences, la concentration en dTMP est de 50 μM et la température de 30 °C.

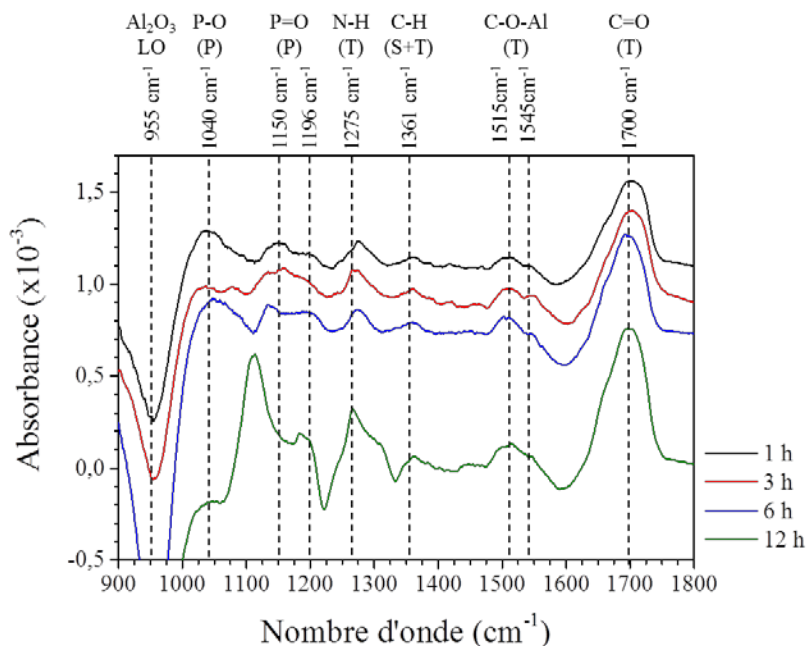


Figure 42 : Spectres d'absorbance des surfaces d'Al₂O₃ après incubation dans une solution de dTMP concentrée à 50 µM à 30 °C, en fonction de la durée d'incubation (1h, 3h, 6h et 12h). Pour chaque courbe, la référence est prise sur la surface d'Al₂O₃ propre, avant incubation.

L'augmentation de la durée d'incubation entraîne une augmentation de la perte en absorbance à 955 cm⁻¹, dont l'aire augmente de 22, 77 et 139 % après 3 h, 6 h et 12 h respectivement. Son évolution est graphiquement représentée en Figure 43. Concernant les autres pics propres à la dTMP sur la zone 1 000 – 1 400 cm⁻¹, on observe peu d'évolution entre 1 h et 6 h d'incubation. Par contre, après 12 h d'incubation, un pic apparaît à 1 100 cm⁻¹, associé aux phonons du SiO₂, témoin de la gravure d'Al₂O₃. Enfin, l'augmentation du pic à 1 700 cm⁻¹ déjà observée lors l'augmentation de la température d'incubation se retrouve ici, avec une augmentation de l'aire du pic de 16, 32 et 69 % après 3 h, 6 h et 12 h respectivement.

Par contre, le rapport C-O-Al / C=O évolue peu et se situe dans la gamme déterminée précédemment en fonction de la concentration en dTMP, autour de 0,22 (voir Figure 38). Cependant, on note une légère augmentation entre 1 h et 3 h d'incubation (de 0,14 à 0,24) puis se stabilise entre 6 h et 12 h d'incubation, à 0,19. En regardant plus en détail la contribution des deux pics, dont l'évolution est présentée en Figure 43, on note que :

- L'aire sous le pic à 1 550 cm⁻¹ (C-O-Al) augmente de 100 %, 78 % et 131 % lorsque la durée d'incubation passe de 1 h à 3 h, 6 h et 12 h respectivement (courbe verte Figure 43).
- L'aire sous le pic à 1 700 cm⁻¹ (C=O libre) augmente de 16 %, 32 % et 69 % lorsque la durée d'incubation passe de 1 h à 3 h, 6 h et 12 h respectivement (courbe noire Figure 43).

La contribution de la liaison libre C=O n'augmente que très légèrement en fonction du temps, comparativement à celle observée avec l'augmentation de la température (69 % après 12 h contre 180 % à 90 °C), suggérant que peu de dTMP se physisorbent en plus sur la surface, malgré une durée d'incubation plus grande. La chimisorption de la dTMP apparaît donc progressive, atteignant un maximum après 3 h d'incubation, proportionnellement au nombre de dTMP présent en surface. Cette progression est mise en évidence sur le graphique de la Figure 43, représentant les pourcentages d'augmentation des aires sous les pics C-O-Al et C=O.

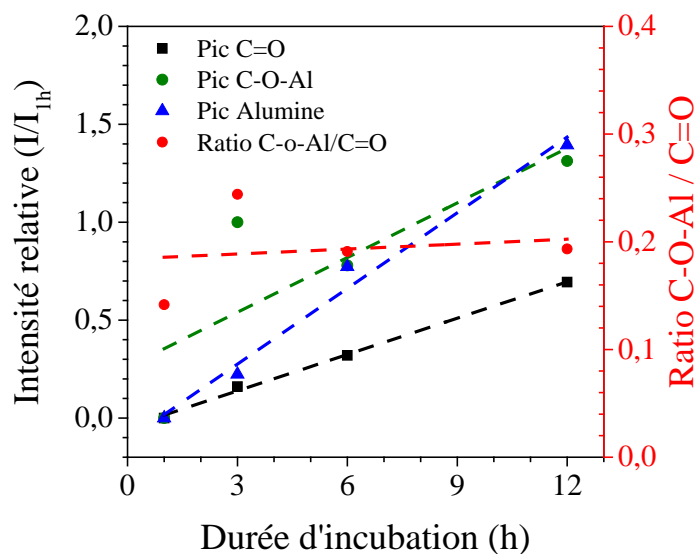


Figure 43 : Evolution de l'intensité relative des pics à 1700 cm^{-1} (courbe noire), à 1515 cm^{-1} (courbe verte) et à 955 cm^{-1} (courbe bleue), normalisées par rapport à l'intensité obtenue après 1 h d'incubation, et du ratio C-O-Al / C=O (courbe rouge), en fonction de la durée d'incubation.

Enfin, dans les deux expériences en température et en cinétique, on observe une augmentation des intensités des pics de la zone $1\ 000$ à $1\ 150\text{ cm}^{-1}$, mais la position des pics évolue. On observe ainsi un décalage de plus en plus important pour les pics $1\ 150$ et $1\ 196\text{ cm}^{-1}$ à $1\ 110$ et $1\ 070\text{ cm}^{-1}$ pour 60 et 90 °C , respectivement (voir Figure 39), phénomène que l'on observe à nouveau lorsque la durée d'incubation est très longue (12 h, voir Figure 42).

Comme dit précédemment, ce pic peut être assigné à la vibration des phosphates, dont la nature de protonation ou de nombre de liaisons avec la surface (bidentate, ou tridentate si deux ou trois oxygènes sont liés à la surface) pour de hautes températures (90 °C) et de longues durées d'incubation (supérieures à 6 h). Cependant, il peut également être attribué aux phonons du SiO_2 , ce qui signifierait que la couche d' Al_2O_3 serait gravée dans ces conditions salines. Cette hypothèse est cohérente avec l'augmentation très importante de la perte d'absorbance à 955 cm^{-1} associé aux phonons d' Al_2O_3 . Ce phénomène de gravure pourrait induire une augmentation de la rugosité de la surface, en cohérence avec

l'augmentation significative du taux de dTMP physisorbée observée pour de hautes températures (90 °C) et de longues durées d'incubation (supérieures à 6 h).

Enfin, les analyses XPS permettent de compléter ces observations. Tout d'abord, l'intensité du signal de l'**azote** et du **phosphore** augmente lorsque la durée d'incubation devient supérieure à 3 h. Pour 6 h et 12 h d'incubation, les intensités des signaux augmentent de 35 % et 53 % par rapport à celles obtenues pour 1 h et 3 h d'incubation. Le constat est similaire pour le signal du **carbone**, qui augmente jusqu'à 40 % en augmentant la durée d'incubation de 1 h à 12 h. D'autre part, l'évolution des signaux du **silicium** après exposition de la surface à la dTMP s'analyse en deux temps :

- Pour des durées d'incubation courtes (1 h et 3 h), le signal du **silicium** décroît après incubation de la surface avec la dTMP, de 27 % et 66 % respectivement pour 1 h et 3 h.
- Pour des durées d'incubation longues (6 h et 12 h), le signal du **silicium** augmente, de 48 % et 15 % après incubation de la surface avec la dTMP.

Enfin, le signal de l'**aluminium** diminue fortement après 3 h d'incubation (79 % de diminution contre 4 % de diminution après 1 h d'incubation). Le signal diminue de façon plus mesurée après 6 h et 12 h d'incubation de 30 % et de 50 % respectivement.

Ces observations peuvent s'expliquer par un phénomène d'écrantage du signal par la dTMP, notamment pour les durées d'incubations courtes (1 h et 3 h) où les signaux du **silicium** et de l'**aluminium** diminuent tous les deux. Par contre, pour de plus longues durées d'incubation, un phénomène de *gravure* de l'**aluminium** peut être mis en cause, à cause d'une augmentation du signal du **silicium** couplée à une diminution du signal de l'**aluminium** (voir schéma de la Figure 41).

Un résumé des influences de la température et de la durée d'incubation sur les différents pics est proposé dans le Tableau 6 ci-dessous.

Tableau 6 : Résumé des influences de la température et de la durée d'incubation sur la qualité du greffage de la dTMP.

	Signal XPS Si	Signal XPS Al	Signal FTIR C-O-Al	Phénomène observé
Température élevée (30 °C et 60 °C)	augmente	diminue	diminue	Gravure d'Al ₂ O ₃ Physisorption dTMP
Durée d'incubation entre 1 h et 3 h	diminue	diminue	augmente	Chimisorption dTMP Ecrantage chimique Al ₂ O ₃
Durée d'incubation supérieure à 6 h	augmente	diminue	stable	Gravure d'Al ₂ O ₃ Physisorption dTMP

6.3. Etude de la perte des phonons d' Al_2O_3

La perte d'absorbance observée à 955 cm^{-1} est clairement associée à la perturbation des phonons LO d' Al_2O_3 . Cependant, elle peut s'expliquer par deux phénomènes différents, et potentiellement simultanés :

- (i) La chimisorption de la dTMP sur la surface d'alumine ou l'adsorption d'ions Na^+ sur la surface d' Al_2O_3 qui modifient les modes de vibration des phonons par *gravure chimique*.
- (ii) La *gravure* physique du film d' Al_2O_3 déposé par ALD (c'est-à-dire avec perte d'atomes d'Al).

Afin de différencier la contribution de ces phénomènes, nous avons comparé les spectres IR et XPS des surfaces d'alumine trempées dans une solution saline ayant une charge ionique en NaCl identique à la solution de dTMP utilisée dans les expériences précédentes (c'est-à-dire concentrée à $100\text{ }\mu\text{M}$). Tout d'abord, le spectre d'absorbance IR sur l'intervalle $800 - 1\ 200\text{ cm}^{-1}$ de la surface après 1 h d'incubation à $30\text{ }^\circ\text{C}$ dans le bain salin est présenté sur la Figure 44 et comparé à celui obtenu dans les expériences précédentes.

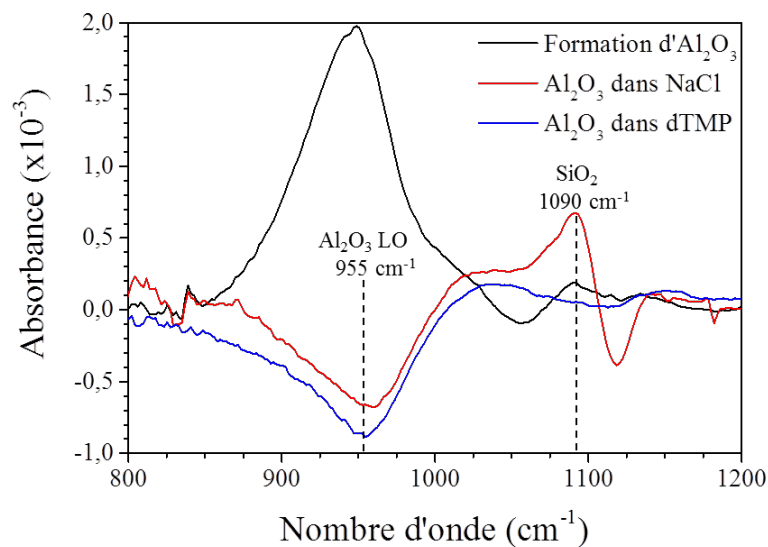


Figure 44 : Spectres d'absorbance IR de la perte de la vibration des phonons d' Al_2O_3 après incubation pendant 1 h à $30\text{ }^\circ\text{C}$ dans une solution saline (courbe rouge) et une solution concentrée à $50\text{ }\mu\text{M}$ en dTMP (courbe bleue). La référence est prise sur la surface d' Al_2O_3 nettoyée avant réaction. Ces spectres sont comparés au spectre d'absorbance IR de la surface après dépôt d' Al_2O_3 (courbe noire) pour lequel la référence est prise sur la surface de SiO_2 avant dépôt ALD.

La perte des phonons d' Al_2O_3 est comparée entre une surface incubée dans une solution de référence concentrée à $50\text{ }\mu\text{M}$ en dTMP (courbe bleue) et une surface incubée dans une solution équivalente en NaCl concentrée à $100\text{ }\mu\text{M}$, ne contenant pas de dTMP

(courbe rouge). La perte en absorbance des phonons de l'alumine à 955 cm^{-1} est quasiment équivalente dans les deux cas, avec 40 % pour la surface plongée dans une solution de NaCl et 45 % pour la surface plongée dans une solution de dTMP. De plus, lorsque la surface est immergée dans une solution saline, on observe l'apparition d'un pic à $1\,090\text{ cm}^{-1}$, associé aux phonons de SiO_2 .

Afin de confirmer l'hypothèse de la *gravure* de l' Al_2O_3 , nous avons analysé quantitativement par XPS les éléments Al et Si avant et après immersion de la surface d' Al_2O_3 dans une solution de NaCl. Les courbes sont données sur la Figure 45.

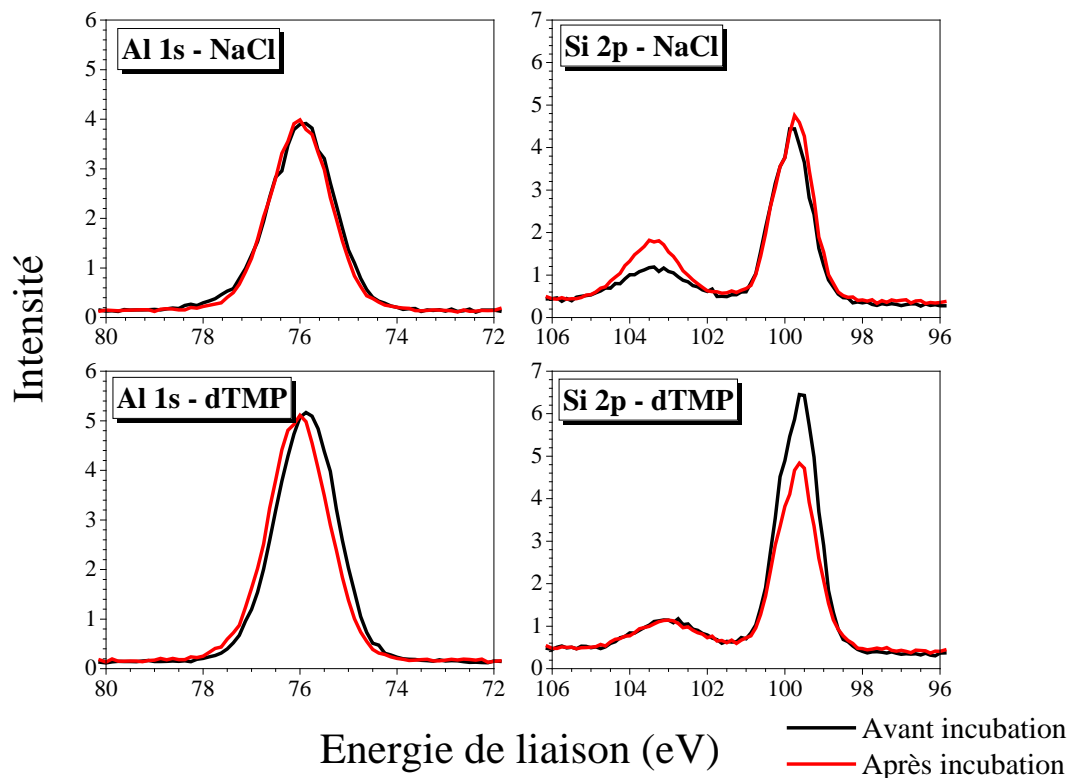


Figure 45 : Données XPS des éléments Al et Si des surfaces d' Al_2O_3 avant (courbe noire) et après (courbe rouge) incubation dans une solution de NaCl concentrée à $100\ \mu\text{M}$ pendant 1 h à $30\text{ }^\circ\text{C}$ (figures du haut). Données XPS des éléments Al et Si des surfaces d' Al_2O_3 avant (courbe noire) et après (courbe rouge) incubation dans une solution de dTMP concentrée à $50\ \mu\text{M}$ pendant 1 h à $30\text{ }^\circ\text{C}$ (figures du bas).

Après immersion de la surface pendant 1 h à $30\text{ }^\circ\text{C}$ dans une solution saline de NaCl, le signal de l'élément Al, dont l'énergie de liaison est centrée sur 76 eV, diminue peu (perte inférieure à 2 %). De même, on observe une faible augmentation inférieure à 2 % de l'aire sous le pic associé au Si non oxydé centré sur 100 eV. Au contraire, on observe une augmentation de 14 % de l'aire du pic secondaire à 103 eV, lié au SiO_2 , confirmant le pic lié aux phonons du SiO_2 observé sur le spectre IR. On peut conclure que la couche d' Al_2O_3 peut être gravée par le solvant ionique, impliquant une diminution de son épaisseur et donc la détection du substrat en SiO_2 (voir schéma de la Figure 41), et ce

malgré des conditions d'incubation choisies ne permettant pas une gravure marquée de l'alumine (faible durée d'1 h et de température de 30 °C).

Lorsque la surface est incubée dans une solution de dTMP, on observe une légère baisse du signal de l'**aluminium**, inférieure à 4 %, qui peut s'expliquer par un écrantage de la surface due à la présence de la dTMP et par la gravure physique de l'alumine, observée dans le premier cas. Enfin, le signal de Si décroît de façon marquée, avec une diminution de l'aire sous le pic principal à 99,6 eV de 24 %, et une baisse du pic secondaire à 103,1 eV de 6 %. Cette diminution s'explique également par un écrantage effectif de la surface par la molécule chimisorbée.

Les analyses couplées de ces deux méthodes nous permettent de confirmer l'impact du solvant polaire ionique sur le film d' Al_2O_3 , qui peut être gravé localement, libérant l'accès du Si aux oxygènes du solvant aqueux qui provoquent une oxydation. La présence de la dTMP limite le phénomène d'oxydation de Si, qui ne sont observées qu'à haute température (90 °C) ou pour des durées d'incubation longues (supérieure à 6 h). Ainsi, nous pensons que dans des conditions « normales » de greffage, *i.e.* pour des durées d'incubation raisonnables et des températures de 30 °C, la dTMP se chimisorbe par les groupes phosphates et thymine sur la surface d' Al_2O_3 , sans dégrader l'état de surface de l' Al_2O_3 .

6.4. Influence du solvant

L'effet de l'utilisation d'un solvant polaire organique, le méthanol, sur le greffage de la dTMP sur surface d' Al_2O_3 a été étudié dans les conditions expérimentales identiques que précédemment. Notons que la dissolution du gel de dTMP est plus difficile dans le méthanol que dans l'eau, mais les conditions en concentration en dTMP sont identiques dans les deux cas (50 μM). Les spectres d'absorbance IR des surfaces d' Al_2O_3 après incubation pendant 1 h dans une solution de méthanol concentrée en dTMP à 50 μM à 30 °C sont obtenus après soustraction du spectre de référence établi sur les surfaces respectives avant incubation, et sont présentés en Figure 46.

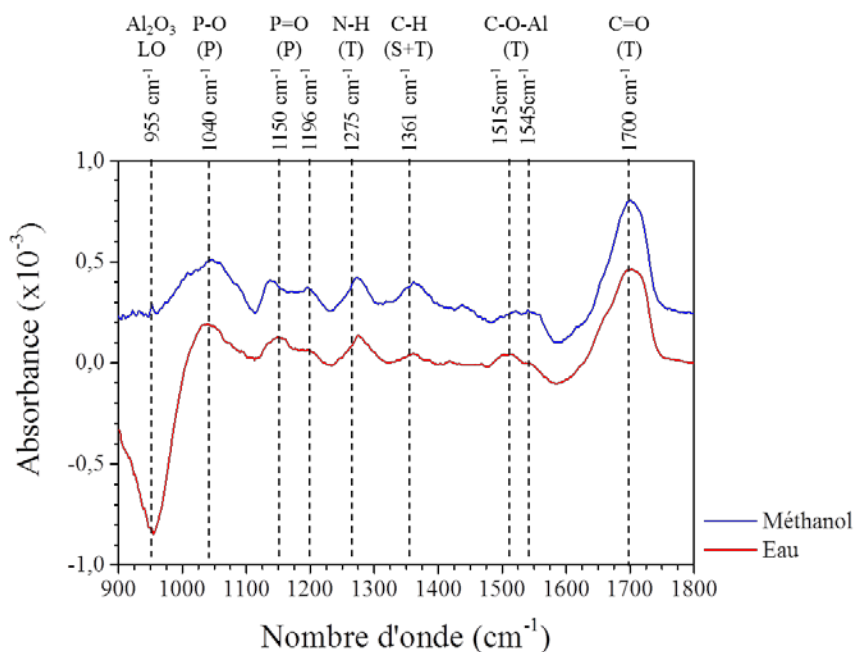


Figure 46 : Influence de la nature du solvant sur l'absorbance IR de la surface d' Al_2O_3 après dépôt de dTMP pendant 1 h à 30 °C. L'incubation de la surface a été réalisée dans le méthanol (courbe bleue) et dans l'eau (courbe rouge) avec une concentration identique en dTMP (50 μM), référencée à la surface d' Al_2O_3 avant réaction.

Tous les pics déjà identifiés de la dTMP se retrouvent avec les deux types de solvant, eau et méthanol, avec une définition des pics et des aires sous les pics très similaires. Cependant, on peut noter que la perte d'absorbance à 955 cm^{-1} n'est plus véritablement détectée lorsque la surface est immergée dans le méthanol. Profitons de cette observation pour rappeler que la chimisorption de la dTMP par la partie **phosphate** doit avoir une bande d'absorption d'intensité forte calculée à 955 cm^{-1} pour la liaison P-O-Al. L'absence de ce pic dans le cas du greffage de la dTMP dans le méthanol peut s'expliquer par deux facteurs :

- (i) Une compensation de l'absorbance négative due à la perte des phonons d' Al_2O_3 induite par le greffage de la dTMP en surface par l'absorbance positive du greffage de la dTMP par la partie **phosphate**.
- (ii) Un échange H^+ / Na^+ entre les terminaisons $-\text{OH}$ de la surface et la partie **phosphate** de la dTMP, qui induirait un décalage du pic de P-O-Al de 955 cm^{-1} à $1050 - 1070\text{ cm}^{-1}$.

La seconde hypothèse est renforcée par le fait que l'aire sous le pic à 1040 cm^{-1} augmente de 380 % dans le cas du méthanol par rapport à la solution à base d'eau. Cette observation renforce la conclusion du paragraphe précédent sur la *gravure* de l'alumine par un effet du solvant aqueux.

6.5. Influence de l'épaisseur de la couche d' Al_2O_3

Dans la partie précédente, nous avons démontré le greffage covalent de la dTMP, de façon théorique et expérimentale, sur des substrats de SiO_2 recouvert d'un film d' Al_2O_3 d'épaisseur 2 nm déposé par ALD. Alors que le greffage covalent par le groupe **thymine** de la dTMP a pu être analysé de façon expérimentale par la spectroscopie IR, nous n'avons pu visualiser expérimentalement, par IR ou XPS, le greffage de la dTMP par le groupe **phosphate** à cause de la bande d'absorbance de la liaison P-O-Al, car située dans la zone des phonons de l'alumine (environ 955 cm^{-1}). L'idée exposée dans ce paragraphe est donc de réduire son épaisseur pour limiter la contribution des phonons afin de détecter la contribution des liaisons P-O-Al. Nous avons alors exploré le greffage de la dTMP sur des films ultra-minces d' Al_2O_3 , d'une monocouche atomique (environ 0,2 nm) à 5 monocouches atomiques (environ 0,5 nm). Les spectres d'absorbance de ces surfaces après exposition à la dTMP pendant 1 h à $30\text{ }^\circ\text{C}$ dans une solution aqueuse concentrée à $50\text{ }\mu\text{M}$ sont présentés en Figure 47.

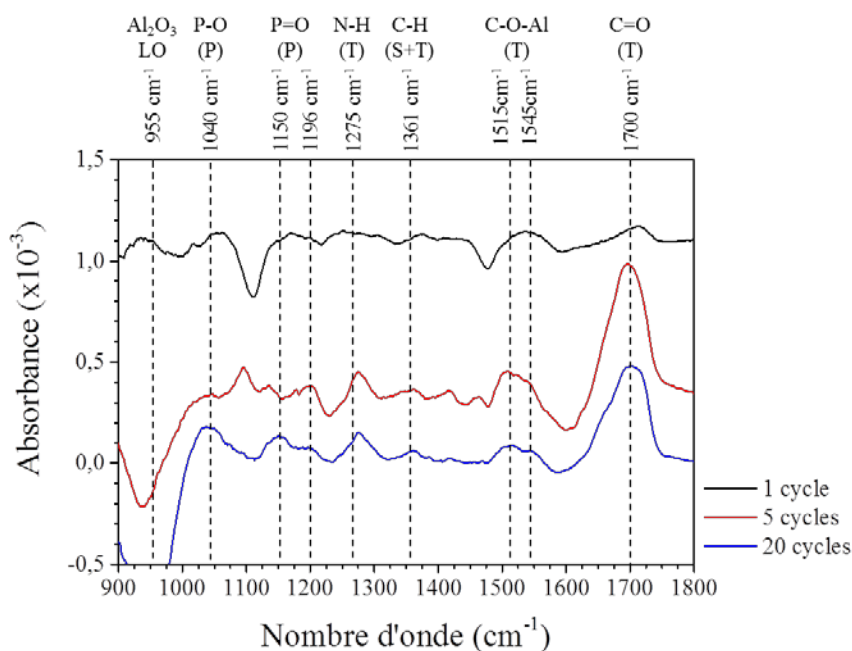


Figure 47 : Spectres d'absorbance de la surface d' Al_2O_3 après incubation dans une solution aqueuse de dTMP ($50\text{ }\mu\text{M}$) pendant 1 h à $30\text{ }^\circ\text{C}$ en fonction du nombre de cycles de dépôt par ALD (1, 5 et 20 cycles, c'est-à-dire 0,2 nm, 0,5 nm et 2 nm environ)). La référence est prise sur la surface d' Al_2O_3 correspondante avant réaction.

Les spectres montrent une modification de la surface quelle que soit l'épaisseur de la couche d'alumine. Les pics propres à la présence de la dTMP de 1040 cm^{-1} à 1700 cm^{-1} sont présents pour les trois épaisseurs. Cependant, certains pics présentent de plus fortes intensités pour l'épaisseur d' Al_2O_3 la plus faible, notamment le pic à 1700 cm^{-1} (C=O libre), la zone $1500 - 1550\text{ cm}^{-1}$ (C-O-Al) et 1275 cm^{-1} (N-H) pour la surface à 5 cycles.

On note également une réduction drastique de l'intensité de la perte des phonons d'Al₂O₃ et un décalage vers les faibles longueurs d'onde pour l'échantillon avec 5 couches atomiques. Enfin, on observe un gain d'absorbance à 955 cm⁻¹ pour la surface préparée avec 1 cycle. L'absence de pic négatif peut s'expliquer par un trop faible recouvrement d'Al₂O₃ sur la surface.

Plus précisément, on observe que les pics propres à la dTMP sont plus faibles pour l'échantillon avec 0,2 nm d'Al₂O₃ par rapport à celui avec 0,5 nm, notamment pour le pic à 1 700 cm⁻¹. Ceci suggère que le nombre de dTMP physisorbées à la surface est plus limité lorsque l'oxyde est très mince. Le rapport des intensités C=O / C-O-Al diminue aussi quand l'épaisseur augmente, passant de 1,82 à 0,32 puis 0,19 pour 0,2 nm, 0,5 nm et 2 nm d'Al₂O₃ respectivement. Ceci indique que même si le taux de greffage par adsorption ou physisorption de la dTMP est faible pour les couches ultra-minces, le greffage est préférentiellement de type covalent. De plus, l'absence de pic négatif dans la région des phonons d'Al₂O₃ dans la zone 900 - 990 cm⁻¹ du spectre de la surface avec 0,2 nm d'épaisseur permet d'identifier un pic positif correspondant à la liaison P-O-Al, calculée à 955 cm⁻¹ par DFT. Sa détection confirme enfin le greffage de la dTMP par la partie **phosphate** prédit par la DFT. Ainsi, le spectre de la surface avec 0,2 nm d'épaisseur d'Al₂O₃ présente simultanément les pics du greffage covalent de la dTMP par le groupe **phosphate** (P-O-Al à 955 cm⁻¹) et le groupe **thymine** (C-O-Al à 1 515 cm⁻¹), confirmant l'étalement possible de la molécule sur la surface, en adéquation avec les calculs théoriques.

Enfin, l'analyse XPS des éléments N et Al des surfaces avec des épaisseurs d'Al₂O₃ de 0,2 nm, 0,5 nm et 2 nm avant et après exposition avec la dTMP (1 h à 30 °C, concentration à 50 μM) est présentée en Figure 48.

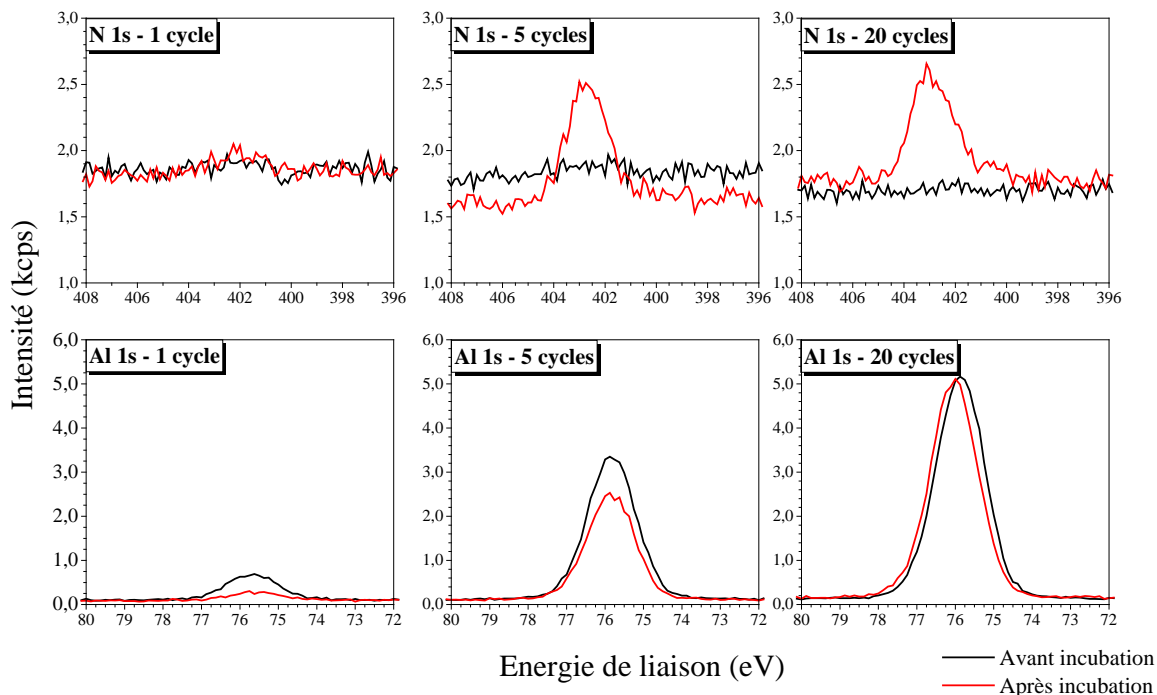


Figure 48 : Données XPS des éléments N et Al après réaction des surfaces d'Al₂O₃ avec la dTMP pour trois films d'épaisseur différents (0,2 nm et 0,5 nm) comparés aux résultats obtenus sur 2 nm d'épaisseur. Les courbes en noir correspondent au signal avant réaction et les courbes en rouge après réaction.

Tout d'abord, on observe l'apparition nette du pic de l'atome N à 402 eV après réaction avec la dTMP sur les surfaces à 5 cycles et 20 cycles, confirmant la présence de la molécule. Pour la surface avec 0,2 nm d'épaisseur, l'augmentation du signal à 402 eV est masqué par le bruit de la mesure, bien que la présence du mode de déformation de la liaison N-H à 1 275 cm⁻¹ sur le spectre IR de la Figure 47 confirme la présence de N, et donc de la dTMP. Ensuite, le signal de l'Al 2p avant réaction avec la dTMP (courbe noire, Figure 48) augmente en valeur absolue avec le nombre de cycles, de façon logique. Après réaction, on observe globalement une baisse du signal, due à la gravure d'Al₂O₃ discutée précédemment. Cette baisse diminue en intensité quand le nombre de couches déposées augmente : 70 % de diminution de l'aire de la courbe d'Al pour la surface à 1 cycle, 35 % pour la surface à 5 cycles, 5 % pour la surface à 20 cycles. On peut noter enfin que l'augmentation du signal du niveau N 1s est liée à l'augmentation du signal Al 2p de l'alumine restant sur la surface après réaction avec la dTMP.

La perte du signal d'Al s'explique doublement, par l'écrantage de la surface par la dTMP chimisorbée et par la gravure de la surface due au solvant. C'est à cause de ces deux phénomènes surfaciques qu'on observe une baisse de la diminution de ces intensités : plus la couche d'Al est épaisse, moins le nombre d'atomes est en contact avec le solvant, et donc moins le phénomène de gravure est observable.

Enfin, la diminution du nombre de dTMP chimisorbées lorsque le nombre de couches d'Al₂O₃ diminue, observée aussi bien par FTIR que par XPS (diminution de l'aire du pic de l'azote), s'explique aussi par une combinaison de phénomènes amenant à une diminution des sites disponibles. Entre autres, on peut citer le recouvrement d'Al plus faible et une rugosité moins élevée lorsque les épaisseurs sont faibles, les différentes configurations chimiques de l'Al lorsqu'une couche atomique est déposée (liaison avec Si-O, stœchiométrie variable, les configurations locales des terminaisons OH), l'état du substrat au moment du dépôt d'Al sur la première couche pouvant amener à des couches mixées... Ainsi, une étude plus poussée sur la morphologie des films d'Al₂O₃ déposés sur la surface pourrait permettre d'approfondir la compréhension des mécanismes de *gravure* observés sur ces surfaces.

En conclusion, nous avons vu qu'il existe une concentration seuil au-delà de laquelle un dépôt en multicouches de dTMP physisorbées est présent en surface, jusqu'à atteindre la saturation de cette dernière. Nous avons également vu que l'élévation de la température et de la durée d'incubation provoque une dégradation de la surface et une diminution du nombre de dTMP chimisorbées à la surface, la dégradation de la surface étant due à deux phénomènes en compétition :

- (i) Une *gravure* de la surface par la force ionique du solvant aqueux polaire.
- (ii) Un greffage de la dTMP sur la surface perturbant les phonons d'Al₂O₃.

L'influence relative de ces deux phénomènes évolue fortement avec les conditions expérimentales, le premier phénomène devenant prépondérant à haute température ou pour de longues durées d'incubation.

7. Conclusions et perspectives

Cette étude, couplant calculs théoriques par DFT et analyse spectroscopique a permis de conclure sur deux résultats importants pour le greffage d'ADN sur les surfaces et donc de proposer des stratégies de greffage adaptées et optimisées pour l'hybridation des nanoparticules d'Al et de CuO pour les technologies ADN appliquées à la fonctionnalisation de matériaux oxydés fonctionnels.

Le premier résultat important est la mise en évidence de la forte interaction de la thymine, une des bases de l'ADN, avec Al_2O_3 qui est la surface qui recouvre les nanoparticules d'Al utilisées dans la suite des travaux. Cette étude prédit un étalement possible et irréversible du brin d'ADN sur la surface de la nanoparticule. Cet étalement est aléatoire, hors équilibre et désorganisé. Il peut donc être vu comme un facteur pénalisant l'hybridation avec un brin complémentaire (voir le schéma de la Figure 49). Ainsi, elle justifie la stratégie définie dans le premier chapitre, basée sur la formation du complexe biotine-Streptavidine. N'ayant pas pu étudier les surfaces CuO, nous avons choisi de suivre la même stratégie de greffage que pour Al_2O_3 .

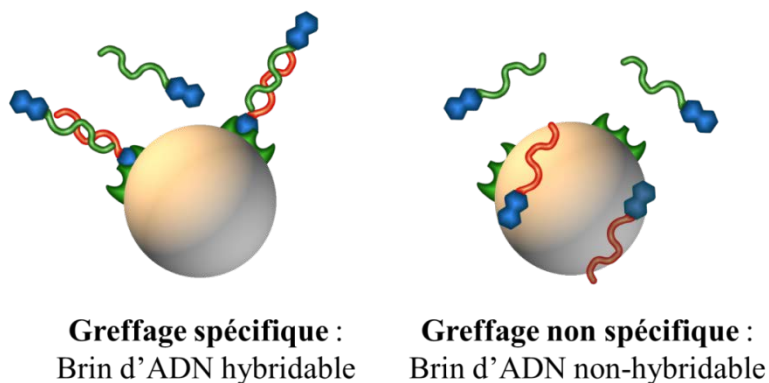


Figure 49 : Vue schématique d'un greffage spécifique d'un brin d'ADN, par exemple par formation du complexe biotine-Streptavidine, disponible pour s'hybrider avec un brin complémentaire, et un greffage non-spécifique, où le brin d'ADN est physisorbé, ou « allongé », sur la surface de la particule. Il ne peut donc s'hybrider avec un brin d'ADN complémentaire.

Pendant, ce résultat peut amener à reconsidérer l'utilisation du complexe biotine-Streptavidine : un greffage direct et optimisé en termes de nature de *spacer* ou de longueur de brins permettrait de s'affranchir de l'intermédiaire protéinique grâce à la forte affinité de l'ADN avec la surface. En effet, il serait intéressant de comparer les stratégies de greffage direct ou par utilisation du couple biotine-Streptavidine dans la perspective d'une analyse quantitative de fonctionnalisation de surfaces par brin d'ADN, en termes de couverture de greffage et de la conservation de la fonctionnalité du brin d'ADN.

Le deuxième résultat intéressant qui dépasse le strict cadre de cette thèse est la proposition d'une méthode de fonctionnalisation simple et novatrice pour le greffage covalent d'ADN sur surfaces oxydées, par couverture de la surface d'une couche atomique d' Al_2O_3 permettant de s'affranchir du greffage d'un intermédiaire chimique.

Enfin, plusieurs perspectives intéressantes se dégagent pour la suite de ces travaux. Tout d'abord, il serait intéressant d'approfondir la caractérisation du film d'alumine déposé par ALD, et ce en fonction de son épaisseur. Ensuite, malgré la similitude chimique des différentes bases, il conviendrait de mener une étude similaire sur les autres nucléotides afin de hiérarchiser les affinités avec la surface d'alumine. A l'image des études réalisées pour l'or, il faudrait évaluer de façon précise la base qui possède l'énergie d'adsorption la plus faible, de façon à favoriser un greffage du brin d'ADN par son extrémité (voir section 2.3.2 du Chapitre 1). Aussi, il serait intéressant de prolonger cette étude à d'autres surfaces, telles que le CuO par exemple, en travaillant sur l'élaboration d'une surface modèle, chose à laquelle nous ne sommes pas parvenus au cours de ce travail.

A la suite de ce travail préliminaire, permettant de justifier la stratégie choisie dans le Chapitre 1, nous proposons dans le chapitre suivant de développer les protocoles expérimentaux établissant un greffage optimisé de brins d'ADN à la surface de nanoparticules d'Al et de CuO.

Chapitre 3.
Bio-fonctionnalisation des
nanoparticules d'Al et de CuO

La démonstration de la forte affinité de l'ADN avec la surface d' Al_2O_3 donnée dans le chapitre précédent justifie la stratégie de greffage définie dans le Chapitre 1, et rappelée en Figure 50. La première étape du protocole d'assemblage consiste à disperser puis stabiliser les *nanopoudres* d'Al et de CuO en solution aqueuse. Ensuite sont greffés successivement sur les nanoparticules la Streptavidine puis l'ADN. Enfin le mélange des deux solutions colloïdales fonctionnalisées permet l'assemblage dirigé par ADN des nanoparticules Al et CuO en nanobiocomposite énergétique.

Dans ce chapitre, chaque étape du protocole sera détaillée. Nous précisons, successivement pour chaque type de particules, les conditions expérimentales permettant d'abord la stabilisation de solutions colloïdales à partir des nanopoudres, puis le greffage de la protéine Streptavidine et des brins d'ADN sur les nanoparticules. La détermination des paramètres d'influence sur ce procédé sera effectuée grâce à une caractérisation par DLS, mesure de potentiel Zeta, et analyse microscopique. Nous terminerons ce chapitre par la quantification par analyse en fluorescence des espèces biologiques greffées afin de maximiser les densités de greffage, avant de résumer les caractéristiques physico-chimiques des solutions colloïdales fonctionnalisées.

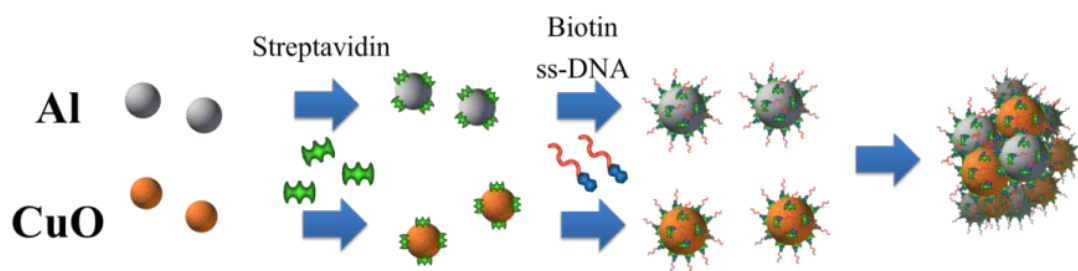


Figure 50 : Stratégie adoptée pour l'auto-assemblage de nanoparticules d'Al et du CuO pour la réalisation de nanobiocomposites énergétiques.

1. Matériaux et méthodes expérimentales

1.1. Produits chimiques et biologiques

Les poudres de NaCl, de sodium monobasique NaH_2PO_4 et dibasique $\text{Na}_2\text{HPO}_4^-$, le tampon phosphate salin 10X¹³ (noté PBS pour *Phosphate Buffered Saline*), le tensioactif Tween 20 ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Les différents PBS utilisés par la suite ont été réalisés par dilution de la solution mère PBS 10X fournie, tandis que les tampons phosphates (noté PB, pour *Phosphate Buffered*) ont été obtenus par mélange de sodium monobasique et dibasique dans les proportions permettant d'obtenir une solution mère PB de 0,2 M au pH de 7,0 (39 % vol monobasique et 61 % vol dibasique).

La Streptavidine, avec ou sans fluorophore Cy3, et les oligonucléotides, avec ou sans fluorescéine, sont fournis par Sigma-Aldrich et Eurogentec respectivement. Après réception, les oligonucléotides sont dilués dans de l'eau dé-ionisé ultra-pure (EDI) à une concentration mère de 0,5 mM. Les séquences des deux brins complémentaires, notés ss-A et ss-B (*cf.* Tableau 7), ont été optimisées de façon à limiter les interactions non-désirées entre brins identiques (Calais *et al.*, 2016) grâce à un outil algorithmique présenté dans le prochain chapitre. Un *spacer* constitué de bases T est ajouté à la séquence « codée » afin de l'espacer de la surface de la nanoparticule et limiter ainsi la gêne stérique lors de la reconnaissance des deux brins. La longueur du *spacer* est matérialisée dans le Tableau 7 par la lettre X. Ne pouvant optimiser théoriquement sa longueur, trois longueurs seront considérées dans cette étude : 0, 15 et 30, nommées **ADN court**, **intermédiaire** et **long** respectivement. Notons que pour l'étude de la quantification des brins d'ADN greffés à la surface des particules, présentée dans la section 4 du chapitre, un fluorophore, la fluorescéine, notée FAM, est greffé en extrémité 3' du brin d'ADN.

Tableau 7 : Séquence et longueur des oligonucléotides utilisés.

Nom	Séquence (5' à 3')
ss-A _x	Biotine-(T) _x -ACA-TCG-CCC-CGC-CT
ss-B _x	Biotine-(T) _x -AGG-CGG-GGC-GAT-GT

¹³ La notation 10 X signifie que les éléments constitutifs du PBS sont concentrés 10 fois. Le PBS 1X contient 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 et 2 mM KH_2PO_4 .

Nom	Longueur X du <i>spacer</i> (nombre de bases T)	Nombre total de bases	Longueur estimée du brin d'ADN
Court	0	15	~ 5,0 nm
Intermédiaire	15	30	~ 9,9 nm
Long	30	45	~ 14,9 nm

1.2. Les nanopoudres

1.2.1. Les nanoparticules de CuO

Les nanoparticules de CuO, fournies par Sigma-Aldrich, ont un diamètre nominal de 50 nm. Les observations réalisées au Microscope Electronique à Balayage (noté SEM, pour *Scanning Electronic Imaging*), ont montré des nanoparticules fortement facettées et agglomérées, de diamètre variant de 15 à 150 nm. Une photo SEM et un histogramme réalisé à partir d'analyse d'images SEM sont présentés en Figure 51. Nous y voyons que la distribution en taille est asymétrique : la médiane est située à 36 nm tandis que la moyenne et son écart-type sont de 44 ± 25 nm. L'image SEM confirme la forte agglomération de plus petits éléments.

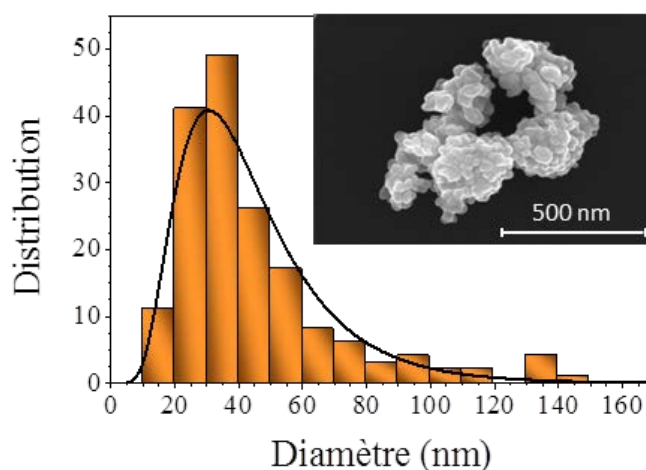


Figure 51 : Distribution statistique du diamètre des nanoparticules de CuO fournies par Sigma Aldrich, et image SEM de nanoparticules de CuO dispersées dans l'éthanol.

1.2.2. Les nanoparticules d'Al

Les nanoparticules d'Al de diamètre moyen de 70 nm fournies par US Research Nanomaterials (Texas, Etats-Unis) sont de forme sphérique avec un diamètre variant de 25 à 280 nm. L'histogramme obtenu à partir des analyses d'images SEM présenté en Figure 52, montre que la distribution en taille est asymétrique, comme dans le cas du

CuO : la médiane est située à 95 nm tandis que la moyenne et son écart-type sont de 105 ± 45 nm. La majorité des particules a en effet un diamètre compris entre 50 et 150 nm.

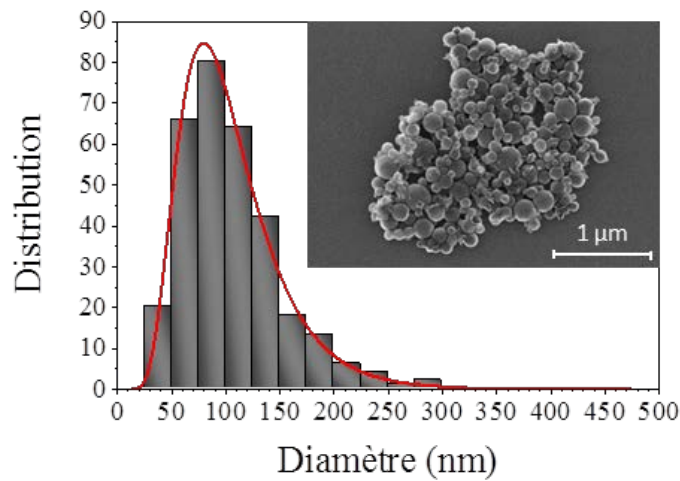


Figure 52 : Distribution statistique du diamètre des nanoparticules d'Al fournies par US Research Nanomaterials et image SEM de nanoparticules d'Al dispersées dans l'éthanol.

L'aluminium présente à l'état naturel une couche d'oxyde d'aluminium (Al_2O_3) qui passive la surface du matériau, comme présenté dans le Chapitre 1, et ne contribue pas à la réaction exothermique de la nanothermite. La structure « cœur-coquille » des nanoparticules d'Al est schématisée en Figure 53. Les nanoparticules sont constituées d'une sphère d'Aluminium pur, aussi appelé « Al actif », de masse volumique ρ_{Al} , de masse m_{Al} et de rayon r_{Al} , couvertes d'une coque d' Al_2O_3 , d'épaisseur $e_{\text{Al}_2\text{O}_3}$, de masse volumique $\rho_{\text{Al}_2\text{O}_3}$ et de masse $m_{\text{Al}_2\text{O}_3}$.

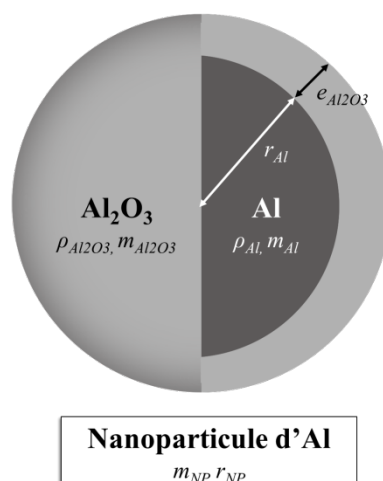


Figure 53 : Schéma d'une nanoparticule d'Al, de masse m_{NP} et de rayon r_{NP} , dite « cœur-coquille », i.e. constituée d'un noyau d'Al de masse volumique ρ_{Al} , rayon r_{Al} et masse m_{Al} , et d'une coque d' Al_2O_3 de masse volumique $\rho_{\text{Al}_2\text{O}_3}$, de masse $m_{\text{Al}_2\text{O}_3}$ et d'épaisseur $e_{\text{Al}_2\text{O}_3}$.

Ainsi, il est important de connaître le pourcentage d'Al pur (cœur des nanoparticules) pour calculer la masse d'oxyde nécessaire à oxyder l'Al. Les nanoparticules d'Al sont caractérisées par Analyse ThermoGravimétrique, (notée TGA pour *ThermoGravimetric Analysis*). La prise de masse et l'énergie libérée par l'oxydation de l'Al sont mesurées sous chauffage de l'échantillon de 5 °C par minute entre 30 °C et 1 000°C. Un palier de 30 min à 1000°C est respecté afin d'assurer l'oxydation complète des nanoparticules. Les différents stades d'oxydation de l'aluminium sont annotés sur le diagramme obtenu, présenté en Figure 54.

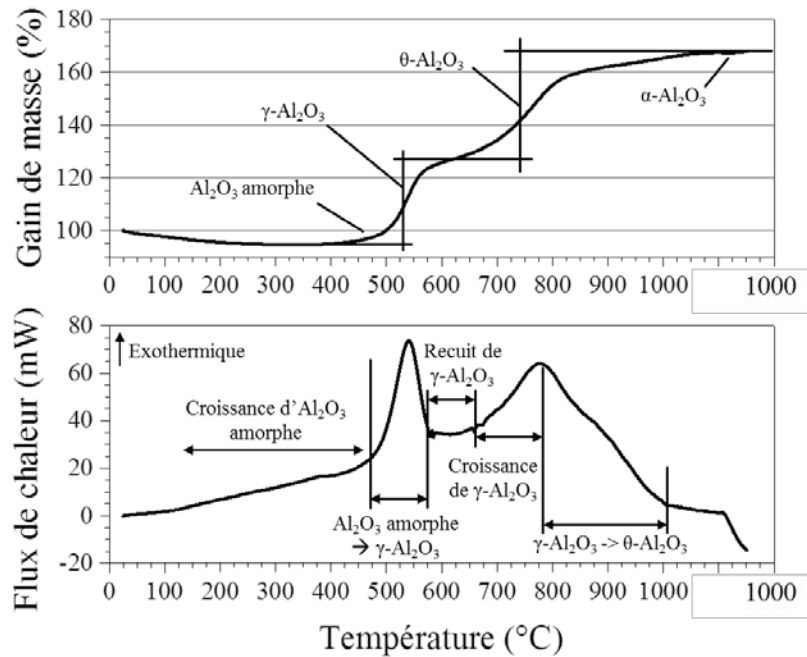


Figure 54 : Diagrammes TGA et DSC de nanoparticules d'aluminium sous flux d'air chauffé à 5°C/min, mettant en évidence les différentes phases de l'oxydation de l'Aluminium décrites par Trunov et al. (Trunov et al., 2005).

On y voit que l'oxydation de l'Al s'établit en deux temps. Une première prise de masse importante de $29 \pm 1 \%$ s'opère à 540 °C et correspond à la transformation de phase de l'alumine amorphe en cristaux γ . La poursuite de la montée en température permet de recuire cette phase qui se réorganise et se transforme en phase θ , plus dense et s'accompagnant donc d'une seconde prise de masse de $41 \pm 1 \%$. En fin d'expérience, le gain de masse s'élève donc à 70 %, pour une énergie libérée de $27 \pm 2 \text{ kJ.g}^{-1}$. Connaissant le diamètre moyen des nanoparticules et en considérant l'oxydation de l'aluminium terminée à la fin de l'expérience, il est possible de déterminer la masse d'Al actif et donc d'en déduire l'épaisseur de la couche d'oxyde, notée $e_{Al_2O_3}$.

On définit tout d'abord le rapport W_{Al} de la masse d'Al actif m_{Al} par rapport à la masse totale de la nanoparticule m_{NP} :

$$W_{Al} = \frac{m_{Al}}{m_{NP}} = \frac{\Delta m}{m_{initiale}} \times \frac{M_{Al}}{1,5 \times M_O} \quad (3.1)$$

Ce rapport est déterminé par l'analyse TGA donnant Δm . M_{Al} et M_O correspondent aux masses molaires de l'Aluminium et de l'Oxygène, respectivement.

Ainsi, l'épaisseur de la couche d'oxyde $e_{Al_2O_3}$ s'exprime par la relation suivante :

$$e_{Al_2O_3} = r_{NP} \left(1 - \sqrt[3]{\frac{W_{Al} \times \rho_{Al_2O_3}}{\rho_{Al} + W_{Al} \times \rho_{Al_2O_3} - W_{Al} \times \rho_{Al}}} \right) \quad (3.2)$$

Avec

$$r_{NP} = r_{Al} + e_{Al_2O_3} \quad (3.3)$$

A partir du diamètre des particules de 105 ± 45 nm et de la prise de masse de 70 %, l'épaisseur de la couche d'oxyde calculée est de $3,3 \pm 0,6$ nm. Une expérience complémentaire réalisée sur les mêmes échantillons en fin de deuxième année de thèse au laboratoire MADIREL (Marseille) par l'équipe de Vanessa Coulet ont montré des résultats similaires en ayant élevé la température à $1\,500$ °C, confirmant l'oxydation complète des nanoparticules à la fin de nos expériences.

1.3. Méthodes expérimentales

Les *nanopoudres* commerciales sont soniquées en solution aqueuse, par le système Vibra-Cell VCX 500 à 200 W. Un cycle de trois secondes, alternant deux secondes de sonication pour une seconde de pause, est répété entre 30 et 600 fois afin d'augmenter le temps total de sonication tout en limitant l'augmentation de la température de la solution, qui favoriserait l'oxydation des nanoparticules d'Al. La température est contrôlée et maintenue en deçà de 40 °C durant tout le procédé de sonication. Dans la suite, les temps de sonication indiqués ultérieurement entre 1 et 20 min correspondent au temps effectif de sonication, *i.e.* la durée de sonication sans les pauses d'une seconde et les arrêts de la sonication due à l'élévation de température.

L'appareil Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) est utilisé pour mesurer le diamètre hydrodynamique des nanoparticules dispersées en solution, par Diffusion Dynamique de la Lumière (notée DLS pour *Dynamic Light Scattering*). Un faisceau laser He-Ne de longueur d'onde $632,8$ nm traverse la solution colloïdale. Le signal diffusé par les particules en suspension est collecté par un détecteur placé à 173 ° de l'émetteur, et le logiciel calcule une valeur à partir de la diffusion du laser, correspondant au diamètre d'une particule sphérique possédant le même coefficient de diffusion en solution que la particule analysée, *i.e.* son **diamètre hydrodynamique**. Le même appareil est utilisé pour

la mesure du **potentiel Zeta**, basée sur l'effet Doppler. Ce potentiel Zeta correspond à la différence de potentiel entre la surface de la particule et le solvant. La solution colloïdale est soumise à une variation de potentiel, provoquant le mouvement des particules et influençant donc la diffusion du laser. A partir de cette diffusion, l'appareil calcule le potentiel des particules. Sauf mention contraire, toutes les mesures sont effectuées à 25 °C et à pH 7,3. Une description plus détaillée du principe de la technique utilisée est présentée en *Annexe 6*.

La Spectrométrie par Absorption Atomique, notée AAS pour *Atomic Absorption Spectroscopy*, est utilisée pour mesurer la concentration en élément Cu et Al de chacune des solutions colloïdales préparées. Les mesures sont réalisées à l'aide de l'AAAnalyst 200 fabriquée par PerkinElmer Instruments. L'échantillon à analyser est pulvérisé en aérosol puis atomisé par une flamme. Les éléments atomisés absorbent de l'énergie à une longueur d'onde spécifique fournie par une lampe à cathode creuse, propre à l'élément à analyser. Ces atomes passent dans un état d'excitation, puis libèrent une énergie lumineuse en repassant dans un état stable, dont l'intensité est mesurée par un détecteur et convertie en signal électronique. Cette technique nécessite la préparation de solutions « standardisées » permettant d'étalonner le signal obtenu et de quantifier l'élément analysé. Deux types de flammes sont utilisées dans notre étude : la première est issue de la combustion d'un mélange air / acétylène montant à 2 300 °C, destinée à la détection de Cu ; la deuxième est assurée par la combustion d'un mélange protoxyde d'azote / acétylène montant à 3 100 °C, destinée à la détection de l'Al, élément réfractaire. L'équipement avec la deuxième flamme n'étant pas disponible au LAAS, les mesures ont été réalisées au laboratoire Géosciences Environnement Toulouse.

Les mesures en fluorescence sont réalisées à l'aide de l'appareil Varioskan Flash. Les échantillons sont disposés dans une plaque de 96 puits pouvant contenir jusque 400 µL de solution. Les longueurs d'onde d'excitation sont fixées à 550 nm et 495 nm pour les fluorophores Cy3 (Streptavidine) et fluorescéine (oligonucléotides) respectivement. Les longueurs d'émission correspondantes sont fixées à 570 nm et 518 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée pour chaque mesure en fluorescence afin de quantifier le nombre d'éléments biologiques en solution (ADN ou protéine). Un exemple de courbe étalon est présenté en Figure 55.

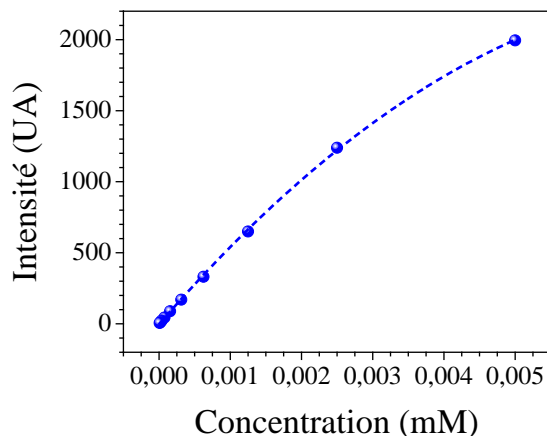


Figure 55 : Exemple de courbe d'étalonnage obtenue après mesure de l'intensité en fluorescence d'un étalon à la concentration en ADN connue. La courbe pointillée est obtenue par régression polynomiale du second ordre.

Enfin, les observations par microscopie électronique à balayage sont réalisées à l'aide de l'instrument Hitachi S4800 du LAAS, couplé à une sonde pour l'Analyse Dispersive en Energie (notée EDX pour *Energy Dispersive X-ray spectrometry*). Pour les observations, une goutte de 20 μ L de solution colloïdale est déposée sur une grille de nickel recouverte d'un film de carbone.

1.4. Stabilisation de la solution colloïdale

Le pH de la solution aqueuse dans laquelle sont dispersées les nanoparticules d'Al et de CuO est maintenu à 7,3 à l'aide d'un tampon phosphate (échange de proton entre les espèces $\text{H}_2\text{PO}_4 / \text{HPO}_4^- / \text{PO}_4^{2-}$). Dans ces conditions, l'oxydation des nanoparticules d'Al est très lente (Hagyard and Williams, 1961) et le milieu est adapté à l'utilisation de l'ADN. En effet, les travaux de Hagyard et Williams (Hagyard and Williams, 1961) décrivant le comportement de l'aluminium en solution acide, montrent un ralentissement de la cinétique d'oxydation à pH neutre. Nous avons en effet observé que dans une solution sans tampon phosphate, le pH se stabilise à 6 provoquant une oxydation des nanoparticules d'Al en quelques heures seulement : les particules deviennent blanches et précipitent.

Un surfactant, le Polyoxyéthylène (20) sorbitan monolaurate, ou Tween 20, est aussi ajouté à la solution aqueuse pour améliorer la stabilité et réduire l'agrégation des nanoparticules. Ce dernier, dont la formule chimique est représentée en Figure 56, présente l'avantage de ne pas interagir avec les biomolécules, notamment avec la biotine et la Streptavidine (Séverac *et al.*, 2012). Sa concentration micellaire critique (CMC) est de 0,01 % vol. Comme illustré sur la Figure 56, le Tween 20 stabilise les particules grâce à la formation de micelles autour de ces dernières, empêchant leur réagrégation.

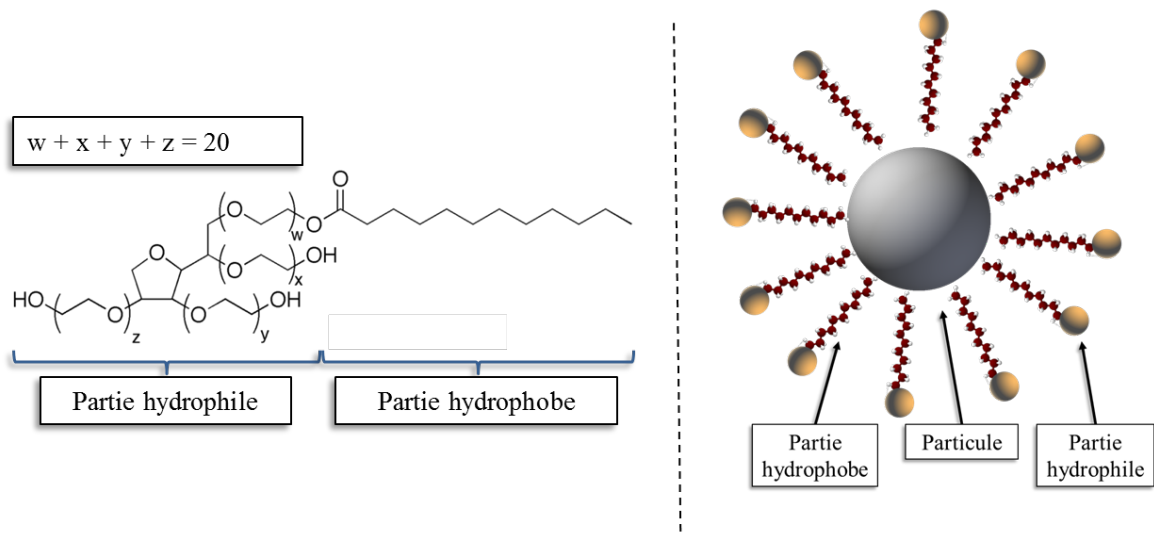


Figure 56 : Ecriture de Lewis et représentation schématique du Tween 20. Illustration de la formation de micelles autour des nanoparticules.

Nous avons vérifié que sans ajout de surfactant, les solutions colloïdales de nanoparticules d'Al et de CuO ne sont pas stables : les particules s'agrègent et sédimentent en moins d'une heure après sonication. L'observation est illustrée sur les photos de la Figure 57, donnant l'état des solutions colloïdales en présence, ou non, de Tween 20, une heure après la fin de la sonication.

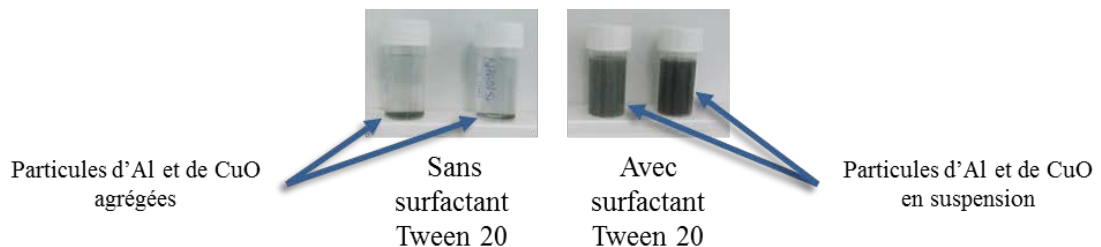


Figure 57 : Effet du Tween 20 sur la stabilité des solutions colloïdales de CuO et d'Al une heure après la sonication.

Ainsi stabilisées, les nanoparticules de CuO et d'Al sont versées dans 25 mL de solution aqueuse à base d'eau dé-ionisée ultra-pure, de Tween 20, et de PB, puis soniquées et laissées au repos afin que les plus gros amas sédimentent. Le surnageant est alors récupéré et caractérisé en termes de diamètre hydrodynamique, potentiel Zeta et concentration des nanoparticules de CuO.

2. Bio-fonctionnalisation de solutions colloïdales stables de nanoparticules de CuO

La mise en place d'un protocole reproductible de dispersion et de fonctionnalisation de *nanopoudres* commerciales de CuO est présentée dans cette section, en distinguant trois parties. D'abord, nous étudierons et optimiserons la stabilisation des nanoparticules de CuO en solution aqueuse. Puis, dans les deux parties suivantes, nous étudierons la fonctionnalisation des nanoparticules de CuO par la Streptavidine et les brins d'ADN.

2.1. Dispersion des nanoparticules de CuO en solution aqueuse

2.1.1. Optimisation de l'étape de sonication

La durée de sonication et la masse de nanoparticules initiale sont deux paramètres influençant l'obtention d'une solution colloïdale stable. Ils ont ainsi été optimisés en suivant un plan d'expérience de Doelhart. La durée de sonication a été étudiée entre 30 sec et 20 min, et la masse de nanoparticules entre 0 et 20 mg pour un volume de solution et une puissance de sonication constants (25 mL et 200 W respectivement). Conformément aux travaux réalisés par Fabrice Séverac (Séverac *et al.*, 2012), la concentration en Tween ajouté à la solution est de 0,1 %vol, et la concentration en tampon phosphate à 20 mM, deux valeurs fixées afin d'obtenir un plan d'expérience simplifié et nécessitant moins d'expériences. Des informations supplémentaires sur le nombre d'expériences menées et la variation des paramètres sont données en *Annexe 7*. Les résultats du plan d'expérience, dont le modèle est illustré graphiquement en Figure 58, montrent que **le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules en solution est minimal pour une sonication de 13 mg de CuO pendant 8 min.**

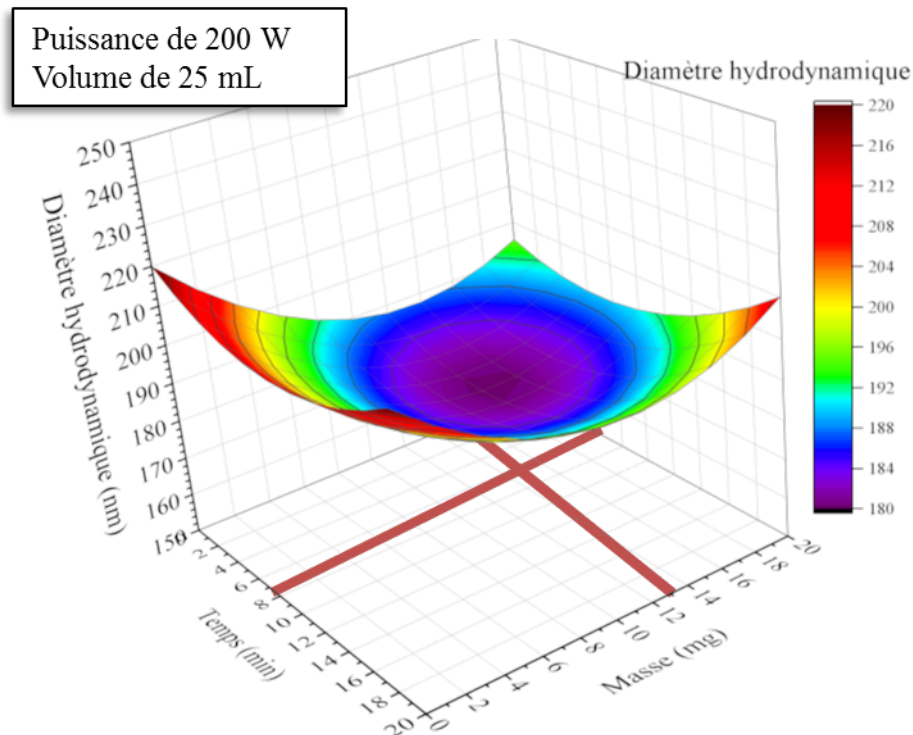


Figure 58 : Evolution du diamètre hydrodynamique moyen de la dispersion colloïdale en fonction de la durée de sonication et la masse de nanoparticules de CuO mise en solution, après 24 h de sédimentation.

On constate sur le graphique 3D de la Figure 58 que le diamètre hydrodynamique moyen varie entre 180 nm et 220 nm en fonction des conditions de sonication. Un diamètre minimum de 180 nm est atteint au bout de 8 minutes, pour une masse de 13 mg de nanoparticules initiales (en rouge sur le graphique). On constate que l'augmentation des durées de sonication a pour effet d'augmenter les diamètres moyens, conformément à ce qui avait été observé par Séverac *et al.* Ainsi, il est nécessaire d'équilibrer l'énergie apportée au système lors de la sonication de particules :

- (i) L'énergie apportée au système doit être suffisante pour fragmenter et diviser les agrégats.
- (ii) D'autre part, cette énergie ne doit pas dépasser l'énergie de répulsion entre deux nanoparticules.

Un compromis est donc à trouver en notant que l'énergie nécessaire à la fragmentation des agrégats varie avec la taille de l'agrégat, donc dans le temps. Plus celui-ci est petit, plus grande est l'énergie nécessaire à sa division. A partir d'une taille critique, l'agrégation est de nouveau favorisée. C'est à ce moment que la sonication doit être arrêtée. Ce phénomène est bien illustré par la forme « en puit » de la nappe 3D de la Figure 58. Le temps optimal de 8 min correspond à l'équilibre entre les deux phénomènes décrits ci-dessus.

Rappelons ici que cette optimisation a été réalisée pour des concentrations en Tween et en PB fixés à 0,1 % et 20 mM respectivement. Ces paramètres seront ajustés dans un second temps pour obtenir une solution colloïdale ayant une concentration en nanoparticules de CuO optimisée. Pour la prochaine étude, nous garderons les conditions optimisées de dispersion (13 mg, 8 min) en faisant l’hypothèse que la modification des concentrations de Tween et PB n’influent pas de façon significative sur ces paramètres.

2.1.2. Détermination de la concentration en Cu et en nanoparticules de CuO¹⁴

La concentration en nanoparticules de CuO est une information caractéristique clé des solutions préparées, nécessaire pour poursuivre le protocole de greffage puisqu’elle permet de calculer la *surface spécifique*¹⁵ de CuO en solution. Pour ce faire, les solutions colloïdales de CuO sont préparées en suivant le protocole défini et optimisé précédemment : une masse de $13,0 \pm 0,1$ mg de nanoparticules est versée dans 25 mL (± 2 %) de solution aqueuse avec tampon phosphate (PB) et Tween 20, puis soniquées pendant 8 min. Après un temps de repos à optimiser, le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules de CuO en solution est mesuré par DLS. Ensuite, 1 mL de solution est prélevé dans un eppendorf, dans lequel on ajoute 1 μ L de HCl concentré à 39 % pour dissoudre les nanoparticules de CuO, avant analyse par AAS donnant la concentration massique en Cu.

Le nombre de nanoparticules de CuO, noté N_{CuO} , contenu dans un volume de solution colloïdale noté V_{sol} , est calculé à partir de la concentration massique en Cu, notée $[Cu]_m$, suivant l’équation (3.4) ci-dessous :

$$N_{CuO} = \frac{[Cu]_m \times V_{sol} \times \left(1 + \frac{M_O}{M_{Cu}}\right)}{\frac{4}{3} \times \pi \times \left(\frac{\Phi_{CuO}}{2}\right)^3 \times \rho_{CuO}} \quad (3.4)$$

Avec M_O et M_{Cu} les masses molaires de l’oxygène et du cuivre respectivement, et ρ_{CuO} Φ_{CuO} correspondant à la masse volumique et au diamètre des nanoparticules de CuO (correspondant au diamètre hydrodynamique moyen) respectivement.

Cette formule a été obtenue en considérant d’une part la masse de CuO comme la somme des masses de ses éléments constitutifs :

¹⁴ Par commodité, nous parlerons de concentration en nanoparticules pour décrire le nombre de nanoparticules par mL de solution colloïdale dont l’unité sera notée NP.mL⁻¹.

¹⁵ La surface spécifique correspond à la surface totale disponible en solution. On la calcule ici en considérant une solution colloïdale constituée de N particules sphériques de diamètre égal au diamètre hydrodynamique obtenu par DLS.

$$\begin{aligned}
 m_{CuO} &= m_{Cu} + m_O \\
 m_{CuO} &= n_{Cu} \times M_{Cu} + n_O \times M_O \\
 m_{CuO} &= N_{CuO} \times \frac{4}{3} \times \pi \times \left(\frac{\Phi_{CuO}}{2} \right)^3 \times \rho_{CuO}
 \end{aligned} \tag{3.5}$$

Avec m_{CuO} , m_{Cu} et m_O les masses respectives d'oxyde de cuivre, de cuivre et d'oxygène, et n_{Cu} et n_O les quantités atomiques de cuivre et d'oxygène.

D'autre part, la concentration massique en Cu s'écrit :

$$[Cu]_m = \frac{m_{Cu}}{V_{sol}} = \frac{n_{Cu} \times M_{Cu}}{V_{sol}} \tag{3.6}$$

La combinaison des deux équations (3.5) et (3.6) permet de retrouver la formule donnant le nombre de nanoparticules de CuO en fonction de la concentration en cuivre et du volume de solution colloïdale.

2.1.3. Influence de la concentration en tampon phosphate et en surfactant sur la sédimentation des nanoparticules de CuO

Nous étudions ici l'influence de la concentration de PB et de Tween sur la concentration en nanoparticules de CuO dans la solution colloïdale finale. La composition des différents échantillons préparés et analysés est donnée ci-dessous :

- **CuO A** : 13 mg de CuO dans 25 mL de PB à 20mM et Tween à 0,1 %
- **CuO B** : 13 mg de CuO dans 25 mL de PB à 10mM et Tween à 0,05 %
- **CuO C** : 13 mg de CuO dans 25 mL de PB à 20mM et Tween à 0,05 %
- **CuO D** : 13 mg de CuO dans 25 mL de PB à 10mM et Tween à 0,01 %
- **CuO E** : 13 mg de CuO dans 25 mL de PB à 20mM et Tween à 0,01 %

Le diamètre hydrodynamique moyen et le potentiel Zeta juste après sonication (noté t_0), après 24 h de repos (noté t_{24}) et 96 h de repos (noté t_{96}) sont présentés dans la Figure 59.

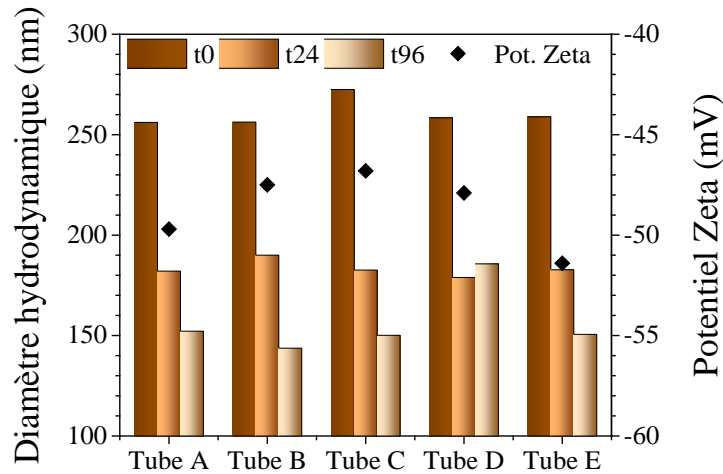


Figure 59 : Diamètre hydrodynamique moyen et potentiel Zeta de la solution colloïdale de CuO en fonction de la durée de sédimentation et de la composition de la solution.

Tout d'abord, quelles que soient les concentrations en PB et en Tween, les diamètres hydrodynamiques moyens sont relativement homogènes indépendamment de la durée de repos : 260 ± 7 nm à t0, 184 ± 5 nm à t24 et 157 ± 17 nm à t96. Les plus petits diamètres sont obtenus pour **CuO A** et **CuO B** à t0 (256 nm), pour **CuO D** à t24 (179 nm), et pour **CuO B** à t96 (144 nm). Les valeurs de potentiel Zeta varient quant à elles entre -46 et -52 mV, valeurs homogènes et élevées qui témoignent de la bonne stabilité de la solution colloïdale grâce à la répulsion électrostatique entre particules.

La concentration massique en Cu déterminée par AAS et la concentration en nanoparticules correspondante sont présentées sur la Figure 60. Notons que la concentration théorique en Cu attendue s'il n'y avait pas de phénomène de sédimentation, est de 414 mg.L^{-1} .

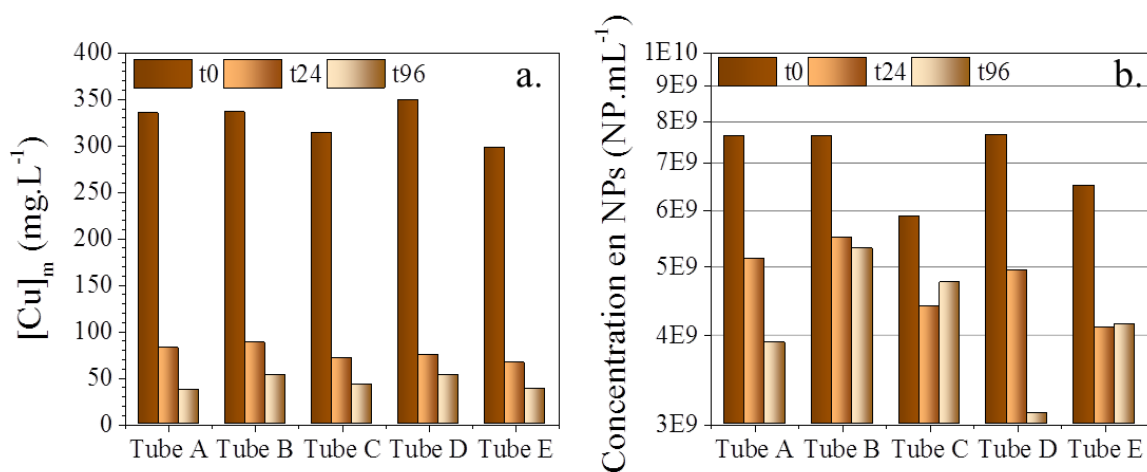


Figure 60 : Concentration massique en Cu (graphique (a)) et concentration en nanoparticules de CuO (graphique (b)) pour les différentes solutions colloïdales de nanoparticules de CuO en fonction du temps de repos.

On observe une diminution drastique de la concentration massique en Cu avec l'augmentation du temps de repos, ce qui est conforme à l'observation d'un dépôt important de nanoparticules non dispersées en fond de tube avant le prélèvement pour analyse :

- A t_0 , les concentrations obtenues sont homogènes, allant de 300 mg.L^{-1} pour **CuO E** à 350 mg.L^{-1} pour **CuO D**. L'écart de 15 à 27 % par rapport à la concentration théorique peut s'expliquer par un manque d'homogénéité de la solution juste après sonication et une erreur expérimentale due à l'assimilation du diamètre des nanoparticules à leur diamètre hydrodynamique.
- Après 24 h de repos, $[Cu]_m$ est divisée par quatre pour **CuO A** et **CuO B** (passant de 335 mg.L^{-1} à 82 et 88 mg.L^{-1} respectivement) et par cinq pour les trois autres solutions.
- A t_{96} , $[Cu]_m$ diminue de 85 % par rapport à la concentration mesurée à t_0 .

On note que la concentration en Cu la plus élevée est obtenue pour la composition **CuO B**, passant de 336 mg.L^{-1} sans repos à 88 mg.L^{-1} après 24h de repos (26 % de la concentration à t_0) puis 53 mg.L^{-1} après 96 h de repos (15,5 % de la concentration à t_0).

L'évolution de la concentration en nanoparticules de CuO montre de fortes disparités entre les différents échantillons préparés. Les conditions donnant une concentration de nanoparticules maximale sont celles de **CuO B**, avec $(7,6 \pm 0,2) \times 10^9 \text{ NP.mL}^{-1}$ à t_0 , $(5,5 \pm 0,1) \times 10^9 \text{ NP.mL}^{-1}$ à t_{24} et $(5,3 \pm 0,1) \times 10^9 \text{ NP.mL}^{-1}$ à t_{96} . La chute de la concentration en nanoparticules est donc de 28 % et de 30 % après 24 h et 96 h de repos, respectivement. En comparaison, les diminutions de la concentration sont beaucoup plus importantes pour **CuO A** et **CuO D**, avec 50 % et 60 % après 96 h de repos.

Cette expérience confirme la perte rapide de matière liée au phénomène de sédimentation après de longs repos. Après 24 h de repos, le surnageant ne contient plus qu'un quart de la quantité de Cu. Après 96 h, il n'en reste plus que 10 % (Figure 60). Cependant, la concentration en nanoparticules ne diminue que de 30 %, car la perte de Cu est principalement causée par la sédimentation d'un petit nombre de nanoparticules, les plus grosses. Cette expérience a aussi montré que les concentrations en PB et en Tween influent sur la sédimentation des nanoparticules. La sédimentation est limitée pour 10 mM de PB et 0,05 % de Tween (**CuO B**). Ceci s'explique par le fait qu'en diminuant la concentration en PB, on limite l'écrantage des charges autour des nanoparticules tout en conservant un pH neutre. Il est plus difficile de commenter l'effet de la teneur en Tween 20. La concentration micellaire critique (CMC) du Tween est de 0,01 % vol, ce qui signifie qu'en dessous de cette valeur, l'aspect « micelle » du Tween, nécessaire à la stabilisation des nanoparticules, n'intervient plus : le Tween peut être dissous en solution. On peut imaginer qu'au-delà d'une certaine concentration, l'efficacité du tensioactif

diminue à cause d'une agrégation des molécules. De plus, de façon générale, la valeur de la CMC diminue avec l'augmentation de la concentration en sel. Ceci a été vérifié puisque pour une même valeur de concentration en Tween 20, la chute de nanoparticules de **CuO C** est plus forte que celle de **CuO B**, et au contraire celle de **CuO E** est plus élevée que celle de **CuO D**.

2.1.4. Reproductibilité du protocole de dispersion

La reproductibilité de la dispersion des nanoparticules en solution aqueuse stabilisée a été évaluée en répétant 5 fois le protocole de dispersion précédemment décrit dans les conditions de la solution **CuO A** (PB 20 mM et Tween 0,1 %). Les concentrations massiques en Cu (en mg.L^{-1}) et concentrations en nanoparticules correspondantes sont présentés sur la Figure 61 après sonication et après 24 h de repos.

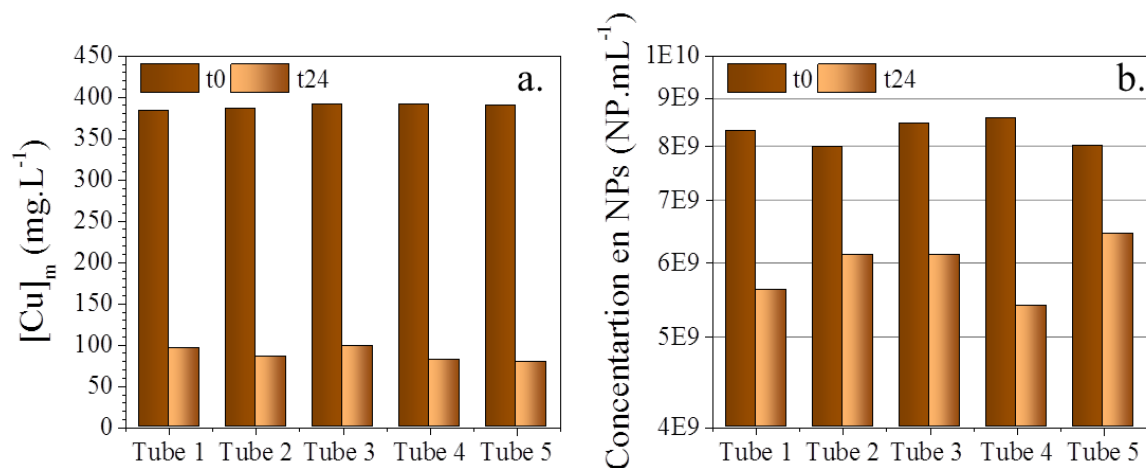


Figure 61 : Concentration massique en Cu (graphique (a)) et en nanoparticules de CuO (graphique (b)) en solution à t0 et à t24 pour une solution de type CuO A (PB à 20 mM et Tween à 0,1 %).

On observe une très bonne reproductibilité de la concentration massique en Cu à t0, avec une moyenne de $388 \pm 4 \text{ mg.L}^{-1}$. L'écart type représente une variation de 1 % autour de la valeur moyenne. Après 24 h de repos, la concentration moyenne en Cu diminue à $88 \pm 9 \text{ mg.L}^{-1}$, soit une variation de 10 %. Par ailleurs, la perte de matière après 24 h de sédimentation représente 80 % de la valeur initiale de Cu, conformément à ce qui a été observé précédemment.

La concentration en nanoparticules de CuO calculée est également homogène. A t0, la concentration en nanoparticules de CuO est de $(8,3 \pm 0,3) \times 10^9 \text{ NP.mL}^{-1}$, soit une variation de 3 %. A t24, il ne reste plus qu'environ $(5,9 \pm 0,4) \times 10^9 \text{ NP.mL}^{-1}$, soit une variation plus élevée de 6,5 %. Ainsi, les variations se situent proches d'une marge d'incertitude usuellement appliquée de 5 %, ce qui, compte tenu du nombre de paramètres intervenants lors de la dispersion colloïdale, est un très bon résultat.

Enfin, l'homogénéité de la dispersion colloïdale est caractérisée en prélevant au sein de la même solution colloïdale (20 mL de type **CuO A**) plusieurs échantillons à cinq endroits du tube après 24 h de repos : en surface du surnageant, dans le surnageant et au fond du surnageant (cf. schéma de la Figure 62). Les concentrations en nanoparticules de CuO caractérisées pour ces 5 prélèvements sont données en Figure 62.

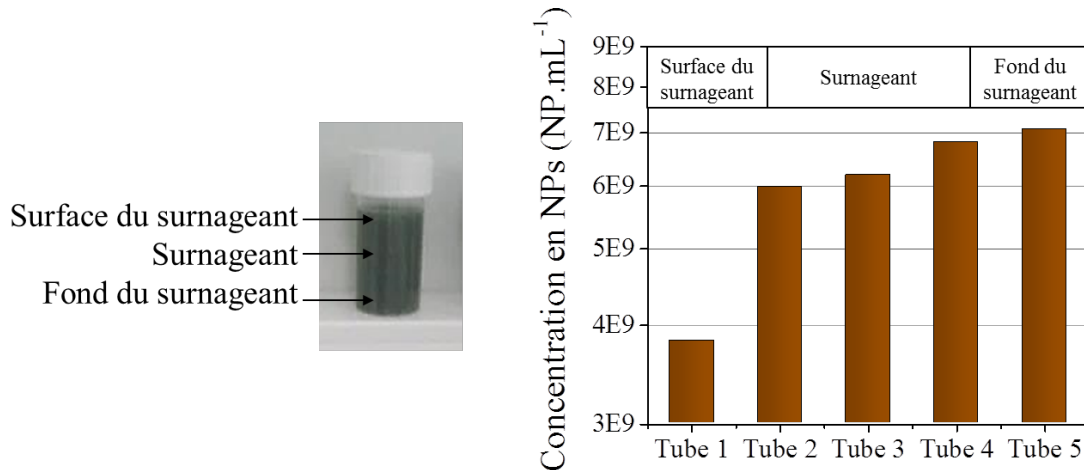


Figure 62 : Schéma illustrant les zones de prélèvement d'échantillons au sein de la solution colloïdale à base de CuO, et concentration en nanoparticules de CuO (NP.mL⁻¹) après 24 h de sédimentation en 5 endroits du tube.

On constate une augmentation de la concentration massique en cuivre de 75 à 140 mg.L⁻¹ de la surface au fond du surnageant : on dénombre $3,8 \times 10^9$ NP.mL⁻¹, $6,4 \times 10^9$ NP.mL⁻¹ et $7,0 \times 10^9$ NP.mL⁻¹ en surface, milieu et fond de la solution, respectivement. Comme attendu, il existe un fort gradient de concentration en nanoparticules au sein de la solution colloïdale lié à la sédimentation. Ceci entraîne donc des dispersions dans la reproductibilité, car on ne peut pas contrôler précisément la zone du prélèvement.

Dans une dernière expérience, nous avons séparé le surnageant (20 mL) du reste de la solution colloïdale, laissant le résidu de matière sédimenté au fond du tube. Cinq prélèvements ont été réalisés à nouveau au sein de ce surnageant et les résultats en termes de concentration de nanoparticules sont présentés sur la Figure 63 ci-dessous.

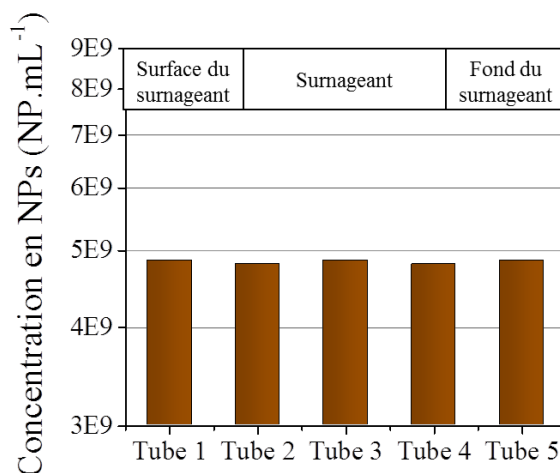


Figure 63 : Concentration en nanoparticules de CuO (NP.mL⁻¹) après 24 h de sédimentation en fonction de la zone de prélèvement.

Le nombre de nanoparticules par mL calculé est de $(4,8 \pm 0,1) \times 10^9$ NP.mL⁻¹ (erreur de 0,6 %). L'étape de séparation du surnageant (20 mL) sera dorénavant appliquée pour la réalisation de toutes nos dispersions colloïdales.

2.1.5. Bilan et caractérisation des solutions colloïdales optimisées

Nous avons mis en place les paramètres de dispersion de nanoparticules de CuO en solution aqueuse permettant d'obtenir une suspension colloïdale **stabilisée sur plusieurs heures, homogène, reproductible et bien contrôlée**. La solution colloïdale de CuO ainsi obtenue contient environ $7,6 \times 10^9$ NP.mL⁻¹ de CuO de diamètre moyen de 255 nm. Après 24 h de repos, la solution colloïdale est homogène avec $(5,2 \pm 0,2) \times 10^9$ NP.mL⁻¹ de CuO ayant un diamètre moyen d'environ 180 nm. La concentration en Tween et en sel a été optimisée à **0,05 %vol et 10 mM respectivement**, afin de limiter cette perte de matière : en 24 h de repos, un tiers des nanoparticules initialement présentes est éliminée, ce qui représente environ 75 % de la masse initiale. Les observations au SEM de la Figure 64 confirment que l'on obtient après sonication des agrégats de trois ou quatre nanoparticules, soit un diamètre réel entre 100 et 500 nm.

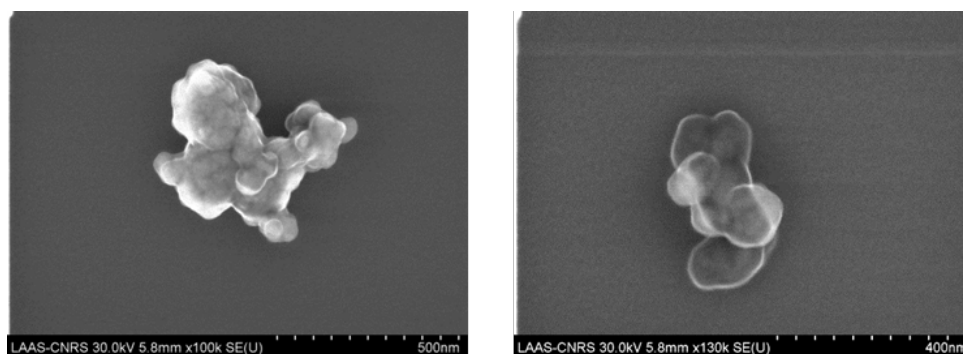



Figure 64 : Images SEM des dispersions colloïdales de CuO obtenues après sonication en solvant aqueux avec PB et Tween 20 à 10 mM et 0,05 %vol. respectivement.

Ainsi, les solutions colloïdales de CuO de type **CuO B** (PB à 10 mM et Tween à 0,05 %) sont caractérisées par DLS. Les résultats sur 25 solutions préparées sont reportés dans le Tableau 8.

Tableau 8: Diamètre hydrodynamique moyen et potentiel Zeta des nanoparticules de CuO dispersées en solution aqueuse avant fonctionnalisation (les incertitudes sont calculées selon la loi de Student sur 25 expériences indépendantes).

	Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	Potentiel Zeta (mV)
Solution colloïdale de CuO	187 ± 5	$-46,4 \pm 1,0$

Les forts potentiels Zeta mesurés à $-46,4 \pm 1,0$ mV confirment la bonne stabilité des solutions préparées grâce à une charge de surface supérieure à 40 mV en valeur absolue (Hunter, 2013; Masliyah and Bhattacharjee, 2006). Les mesures sont très homogènes, comme en témoigne l'écart type de 2,7 % sur un diamètre moyen de 187 nm, calculé suivant la loi de Student sur 25 expériences indépendantes. Cependant, il paraît important de préciser que l'incertitude déterminée ici correspond à l'incertitude sur le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules déterminé par DLS.

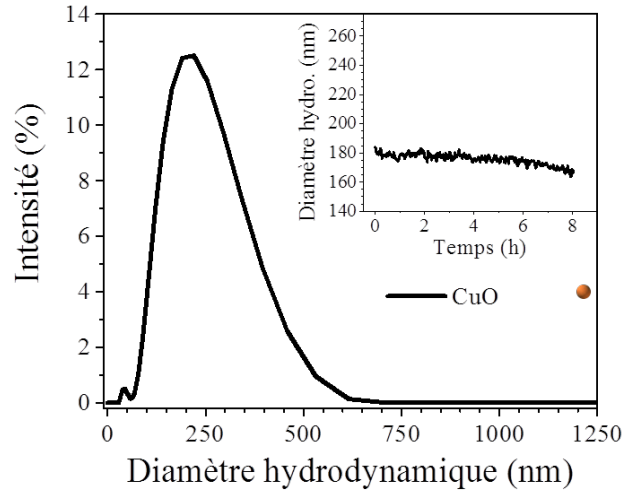


Figure 65 : Distribution en taille des nanoparticules de CuO après sonication et 24h de repos et stabilité dans le temps de la solution colloïdale (encadré supérieur droit).

La courbe principale de la Figure 65, donnant le pourcentage d'intensité de signal pour chacune des tailles de nanoparticules en solution, décrit une gaussienne asymétrique centrée sur 250 nm, semblable à celle obtenue après analyse de la distribution statistique en taille des nanoparticules présentée en première partie de chapitre (voir Figure 51). Cela indique donc que la majeure partie des particules ont une taille comprise entre 100 et 300 nm. Notons également qu'une particule de taille importante absorbe une intensité du signal plus importante, si bien que cette technique ne permet pas de décrire directement la population en taille des nanoparticules. Cependant, on peut observer que le diamètre hydrodynamique moyen est stable dans le temps. (*cf.* encadré supérieur droit de la Figure 65). On n'observe pas de réaggrégation et la diminution en taille est attribuée à une sédimentation des plus grosses particules (diamètre supérieur à 500 nm). Une simple homogénéisation de la solution pendant quelques secondes au Vortex suffit à retrouver le diamètre initial.

2.2. Greffage de la Streptavidine

Tout d'abord, la première étape consiste à calculer la quantité de Streptavidine nécessaire pour fonctionnaliser l'ensemble des nanoparticules présentes dans les solutions stabilisées précédemment préparées. Supposant que la solution colloïdale contient N_{CuO} nanoparticules sphériques de diamètre Φ_{CuO} (~ 190 nm) dans un volume V de solution colloïdale, la surface totale de CuO, S_{tot} , disponible pour le greffage de la Streptavidine est :

$$S_{tot} = N_{CuO} \times V \times 4\pi \times \left(\frac{\Phi_{CuO}}{2} \right)^2 \quad (3.7)$$

Avec :


- $N_{\text{CuO}} = (5,2 \pm 0,2) \times 10^9 \text{ NP.mL}^{-1}$
- $V = 20 \pm 0,1 \text{ mL}$
- $\Phi_{\text{CuO}} = 190 \pm 5 \text{ nm}$

On trouve pour 20 mL de solution colloïdale une surface à fonctionnaliser de $(1,12 \pm 0,08) \times 10^{-2} \text{ m}^2$.

La taille moyenne d'une molécule de Streptavidine étant de 5 nm^2 , le nombre de Streptavidine nécessaire pour couvrir toute la surface de CuO doit être supérieur à $1,10 \times 10^{14}$. La masse molaire de la Streptavidine étant d'environ 60 000 Dalton ($9,13 \times 10^{-17} \text{ mg.unité}^{-1}$), le **volume** nécessaire de solution mère de **Streptavidine** concentrée à $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ doit être supérieur à **10 μL** . Nous choisissons donc d'ajouter 50 μL de solution de Streptavidine aux 20 mL de solution colloïdale de CuO afin de se placer en excès.

Après un temps d'incubation d'au minimum de 4 h (Zhang et al., 2013b), les solutions sont rincées trois fois afin d'éliminer l'excès de Streptavidine non greffé. Entre chaque rinçage, la solution est centrifugée pendant 15 min à 16 000 G et les particules redispersées par 5 min dans un bain à ultrasons après changement du solvant. Le rinçage est réalisé dans une solution de tampon phosphate salin dilué PBS 0,1 X, contenant 0,05 %vol de Tween 20, bien que le greffage de la Streptavidine tend à stabiliser les colloïdes. Les solutions ainsi obtenues, notées **CuO-Strep**, sont caractérisées par DLS et les résultats reportés dans le Tableau 9.

Tableau 9: Diamètre hydrodynamique et potentiel Zeta des nanoparticules de CuO-Strep (les incertitudes sont calculées d'après la loi de Student sur 15 échantillons).

	Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	Potentiel Zeta (mV)
CuO-Strep (PBS 0,1X)	230 ± 14	$-44,1 \pm 1,8$

La taille de la protéine étant de $4 \times 4,2 \times 5 \text{ nm}^3$ (Weber et al., 1989)), une augmentation du diamètre hydrodynamique de 10 à 15 nm est attendue après greffage sur la nanoparticule. Or, on constate qu'elle est de 43 nm (de 187 nm à 230 nm). Notons de plus que le potentiel Zeta diminue légèrement après greffage (2 mV).

L'augmentation plus importante qu'attendue du diamètre hydrodynamique en solvant PBS 0,1 X peut s'expliquer par l'existence d'interactions non-désirées entre les particules induites par la Streptavidine. En effet, l'aspect « collant » de la protéine peut induire des attractions entre nanoparticules par la protéine, ou bien une superposition de plusieurs protéines sur la surface (Wilchek and Bayer, 1990). Ces interactions plus ou moins faibles

rendent donc difficile la redispersion des nanoparticules après sonication dans un bain à ultrasons de la solution colloïdale, après les centrifugations dues aux lavages de la solution colloïdale. Enfin, elles peuvent expliquer la dispersion sur le diamètre beaucoup plus important (écart type de 6 %) que celle obtenue avant greffage de la protéine. Notons en effet que l'écart entre le diamètre hydrodynamique le plus faible et celui le plus élevé est de 30 nm, soit 13 % de la valeur moyenne.

La diminution du potentiel Zeta est expliquée par l'utilisation du PBS 0,1 X, dont la charge ionique est plus importante que le PB. Cette diminution est cependant limitée à 2 mV grâce au greffage de la Streptavidine qui stabilise les particules. Nous avons validé que la solution de **CuO-Strep** redispersée dans un solvant PB équivalent à une solution de CuO avant greffage présente un potentiel Zeta supérieur en valeur absolue de -60 mV, confirmant la bonne stabilisation des nanoparticules après greffage de la protéine (voir *Annexe 8*).

Enfin, le graphe de la Figure 66 compare la distribution en taille des nanoparticules de CuO avant (courbe noire) et après greffage de la Streptavidine (courbe verte). La stabilité de la solution dans le temps a été vérifiée et est illustrée dans l'encadré supérieur droit. Une diminution de la taille est visible après 4 h, toujours liées à la sédimentation des plus gros éléments, mais aucune réaggrégation n'est observée.

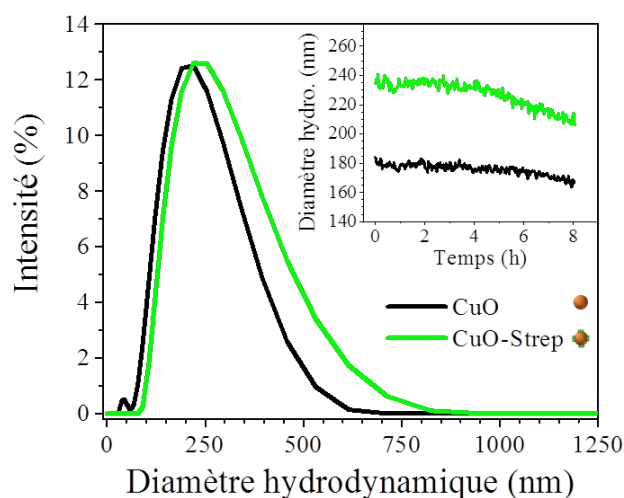


Figure 66 : Distribution en taille des nanoparticules de CuO avant (courbe noire) et après greffage de la Streptavidine (courbe verte) et stabilité dans le temps de la solution colloïdale (encadré supérieur droit).

La distribution en taille des nanoparticules de **CuO-Strep** est centrée sur 260 nm mais est plus étalée que celle avant greffage, ce qui signifie qu'il y a plus de nanoparticules entre 300 et 1 000 nm.

Les observations au SEM (Figure 67) de quelques nanoparticules de **CuO-Strep** ne montrent pas de différence majeure avec les clichés obtenus avant greffage de la

Streptavidine. Nous distinguons toujours des agglomérats de plusieurs nanoparticules de tailles similaires à ceux précédemment identifiés, *i.e.* de 150 à 350 nm.

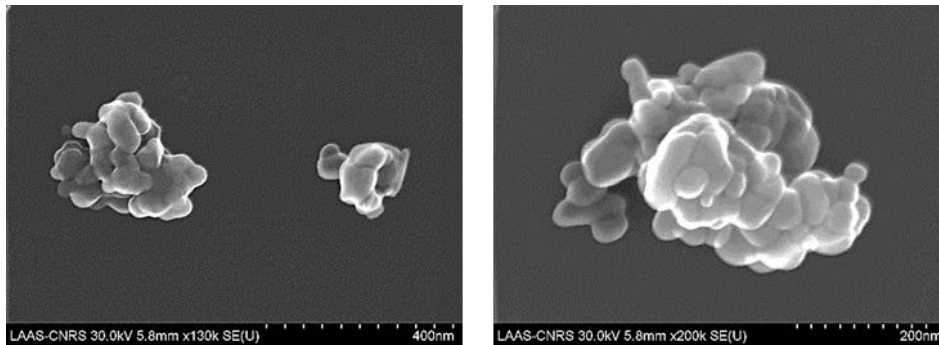


Figure 67 : Images SEM des dispersions colloïdales obtenues après sonication de poudres de CuO après fonctionnalisation par la Streptavidine.


Ce résultat suggère que l'augmentation du diamètre hydrodynamique est plutôt liée à la formation d'une couche de Streptavidine « épaisse » avec plusieurs épaisseurs de protéines. Les résultats obtenus après fonctionnalisation des nanoparticules avec l'ADN tendent à le confirmer, comme nous allons le présenter.

2.3. Greffage de l'ADN

Tout comme pour la Streptavidine, la première étape est l'estimation de la quantité d'ADN nécessaire pour fonctionnaliser l'ensemble des protéines disponibles sur la surface des nanoparticules de CuO. 50 μL de Streptavidine à la concentration massique de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ donne $2,5 \times 10^{13}$ protéines par mL. Afin de se placer en excès par rapport à la Streptavidine, nous ajouterons 5 fois plus d'ADN que de Streptavidine. La concentration de la solution mère en ADN étant de 0,5 mM, nous ajouterons un volume de 0,5 μL par mL de solution colloïdale de **CuO-Strep**, soit 10 μL de solution mère d'ADN pour les 20 mL de solution colloïdale préparée précédemment. Les brins d'ADN utilisés dans ces expériences sont ceux présentés dans le Tableau 7.

Après incubation d'au moins 7 h (Zhang et al., 2013b), la solution colloïdale est rincée trois fois par 15 min de centrifugation à 16 000 G afin d'éliminer l'excès d'ADN en solution. La solution colloïdale est redispersée après chaque centrifugation dans une solution aqueuse de PBS 0,1 X et de Tween 0,05 % dans un bain à ultrasons. Le diamètre hydrodynamique et le potentiel Zeta des nanoparticules fonctionnalisées obtenues, notées **CuO-ADN**, sont caractérisés par DLS et les résultats pour trois longueurs d'ADN (court, intermédiaire et long) sont reportés dans le Tableau 10.

Tableau 10: Diamètres hydrodynamiques moyens et potentiels Zeta des nanoparticules de CuO fonctionnalisées avec les brins d'ADN courts (15 bases), intermédiaires (30 bases) et longs (45 bases) (les écarts types sont calculés suivant la loi de Student, à partir de 2, 6 et 11 expériences indépendantes, respectivement pour l'ADN court, intermédiaire et long).

	Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	Potentiel Zeta (mV)
CuO-ADN court (ss-A ₀ , PBS 0,1 X)	209 ± 18	-43,0 ± 2,1
CuO-ADN intermédiaire (ss-A ₁₅ , PBS 0,1 X)	222 ± 9	-43,7 ± 1,0
CuO-ADN long (ss-A ₃₀ , PBS 0,1 X)	238 ± 10	-44,1 ± 2,3

Le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules de CuO est de 209 ± 18 nm avec les ADN courts (15 bases), de 222 ± 9 nm avec les ADN longs (30 bases) et de 238 ± 10 nm pour les ADN longs (45 bases). La dispersion particulièrement élevée de **CuO-ADN court** (8,6 %) est principalement due au nombre restreint d'échantillons caractérisés (2 ici seulement).

Le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules augmente respectivement de 22 nm, 35 nm et 51 nm après greffage avec les ADN courts, intermédiaires et longs. Ces résultats sont conformes aux augmentations attendues : en tenant compte de la protéine et de la longueur du brin d'ADN, nous avons calculé une augmentation théorique de 22 nm, de 35 nm et de 40 nm respectivement, par rapport au diamètre avant greffage de la Streptavidine (187 ± 5 nm). Ces résultats confirment donc que les augmentations trop importantes observées après greffage de la Streptavidine (de 30 nm) étaient liées à des interactions faibles dues à l'adsorption d'une couche épaisse de protéines à la surface des nanoparticules de CuO, induisant un diamètre hydrodynamique supérieur à celui obtenu pour CuO-ADN (230 nm).

On constate de façon intéressante que le potentiel Zeta augmente en valeur absolue avec l'augmentation de la taille de l'ADN, de 43 à 44 mV. Cette observation est cohérente avec la charge négative de l'ADN dans l'eau : plus on augmente le nombre de bases, plus la charge négative est importante. Elle témoigne également du gain de stabilité de la solution colloïdale avec la taille de l'ADN.

Ces différentes observations confirment donc le greffage effectif de l'ADN sur les particules.

La Figure 68 donne la distribution en taille des nanoparticules de CuO après greffage de l'ADN intermédiaire (courbe rouge), de la Streptavidine (courbe verte), et avant

fonctionnalisation (courbe noire). Dans l'encadré supérieur droit, l'évolution du diamètre hydrodynamique moyen pendant 8 h des nanoparticules de **CuO-ADN** est tracée sur la courbe rouge et montre une sédimentation après 3 h de stockage. Cette sédimentation témoigne d'un manque de stabilité en suspension des particules les plus lourdes : une simple ré-homogénéisation de la solution permet leur redispersion.

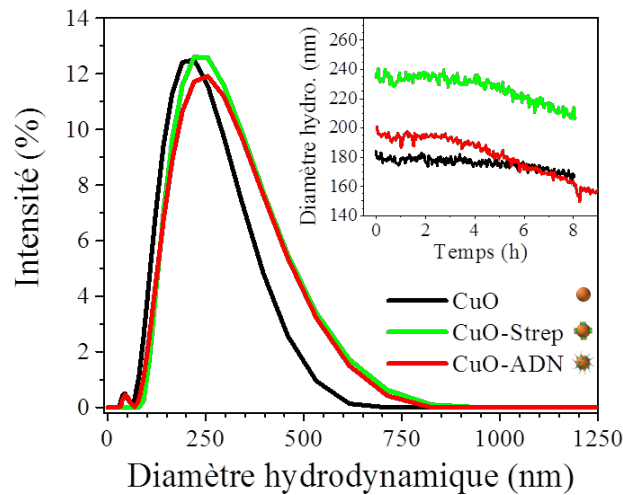


Figure 68 : Distribution en taille des nanoparticules de CuO avant (courbe noire), après greffage de la Streptavidine (courbe verte) et après greffage de l'ADN intermédiaire (courbe rouge) et stabilité des solutions colloïdales (encadré supérieur droit).

L'augmentation de la taille moyenne des nanoparticules est confirmée ici par le décalage du pic à 285 nm, alors centré sur 190 nm avant fonctionnalisation. Les observations SEM confirment que la taille des agrégats a augmenté (voir Figure 69). Nous y voyons aussi une plus forte polydispersité. La surface n'apparaît pas particulièrement modifiée par rapport aux nanoparticules fonctionnalisées par la Streptavidine.

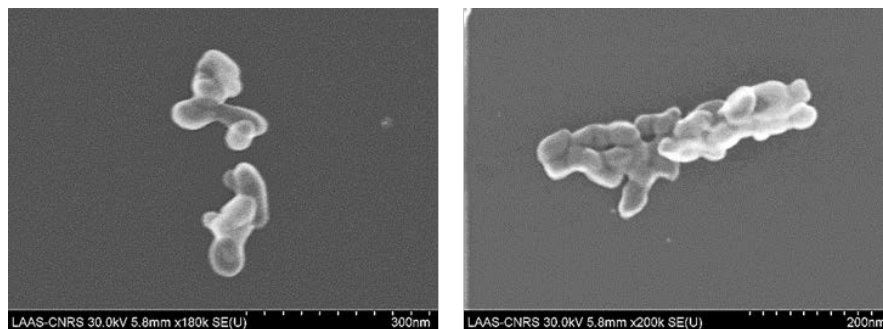


Figure 69 : Images SEM des dispersions colloïdales obtenues après sonication de nanopoudres de CuO et après fonctionnalisation par l'ADN.

3. Bio-fonctionnalisation de solutions colloïdales stables de nanoparticules d'Al

Cette section présente le protocole de dispersion et de fonctionnalisation des nanoparticules d'Al, en trois parties : la stabilisation et la caractérisation des nanoparticules d'Al en solution aqueuse, la fonctionnalisation des nanoparticules d'Al avec la Streptavidine, puis avec les brins d'ADN.

3.1. Dispersions des nanoparticules d'Al en solution aqueuse

3.1.1. Optimisation de l'étape de sonication

Après dispersion des nanoparticules d'Al dans 25 mL de solution aqueuse, comme décrit dans la section 2.1, la solution est soniquée puis laissée au repos pour éliminer par sédimentation les plus gros agrégats. La durée de sonication et la masse de poudre à disperser sont les deux paramètres clés à étudier pour optimiser la dispersion des nanoparticules d'Al.

Comme pour les nanoparticules de CuO, un plan de Doelhart a permis de trouver le couple optimal « durée de sonication - masse de nanoparticules ». La durée de sonication a été étudiée entre 30 sec et 20 min, et la masse de nanoparticules entre 0 et 40 mg pour un volume de solution et une puissance de sonication constants, de 25 mL et 200 W respectivement. Conformément aux travaux de F. Séverac (Séverac *et al.*, 2012), la concentration en Tween ajouté à la solution est de 0,1 %vol, et la concentration en tampon phosphate de 20 mM. Des informations supplémentaires sur le nombre d'expériences menées, la variation des paramètres et la répétabilité sont données en **Annexe 7**. L'évolution du diamètre moyen de la dispersion colloïdale d'Al en fonction de la durée de sonication et de la masse de nanoparticules initiale après 24 h de repos, déterminée par le plan de Doelhart, est représentée sur la Figure 70.

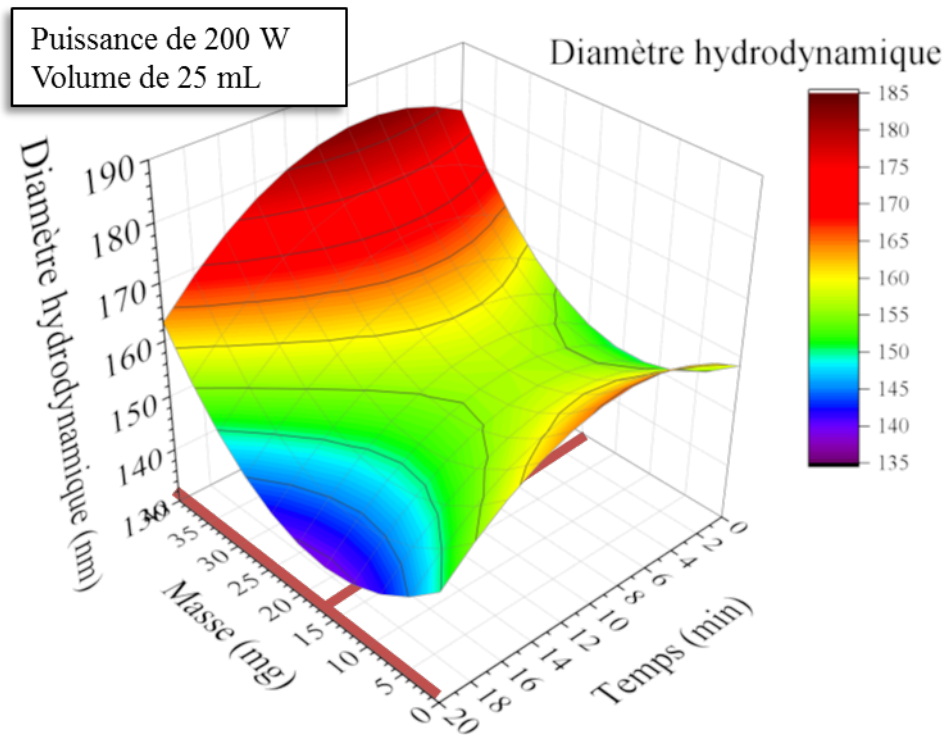


Figure 70 : Evolution du diamètre hydrodynamique moyen de la dispersion colloïdale à base de nanoparticules d'Al en fonction de la durée de sonication et de la masse de nanopoudre commerciale d'Al mise en solution, après 24 h de repos.

En fonction de la durée de sonication et de la masse de nanoparticules d'Al, le diamètre moyen varie entre 140 nm et 190 nm. On observe sur le graphique que les diamètres les plus faibles sont obtenus pour une durée de 20 min, et pour une masse d'environ 15 mg de nanoparticules d'Al (zone en rouge sur le graphique). Cependant, il s'avère que dans ce cas, la répétabilité des expériences n'est pas bonne, ne permettant pas de valider le modèle dont la représentation graphique est donnée en Figure 70. La grande disparité en taille observée sur les nanoparticules d'Al fournies par US Research peut être un facteur expliquant la difficile reproductibilité des expériences. Comme nous le verrons par la suite, la forte teneur en PB (20 mM) peut également être un facteur limitant la reproductibilité. En effet, la charge ionique de la solution étant supérieure, la stabilité des nanoparticules d'Al en suspension est plus difficile et moins reproductible que pour les colloïdes de CuO.

Cependant, le modèle obtenu avec ce plan d'expérience en dehors des conditions limites (pour une durée comprise entre 4 et 16 min et une masse entre 5 et 30 mg) a une allure similaire à celui obtenu dans le cas des nanoparticules de CuO. Ainsi, les hypothèses du paragraphe 2.1.1. expliquant les évolutions de diamètre hydrodynamique sont toujours valable ici.

En résumé, nous retiendrons malgré ces difficultés que **le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules d'Al en solution est minimal pour une**

sonication de 15 mg d'Al pendant 8 min. Ces paramètres seront respectés précisément dans la suite des expériences afin de maximiser la reproductibilité des colloïdes.

3.1.2. Détermination de la concentration en Al et du nombre de nanoparticules d'Al en solution

Comme pour le CuO, la concentration en nanoparticules d'Al est caractérisée par AAS. Une masse de $15 \pm 0,1$ mg de nanoparticules d'Al est versée dans 25 mL ($\pm 2\%$) de solution aqueuse avec tampon phosphate (PB) et Tween 20, puis soniquée pendant 8 min. La solution est ensuite laissée au repos pendant 24 h, puis 20 mL de surnageant sont prélevés et analysés. L'acide HNO₃ concentré à 69 % est ajouté au surnageant pour dissoudre les nanoparticules d'Al et obtenir une concentration massique en Al, notée $[Al]_m$. La concentration en nanoparticules d'Al en solution s'exprime à partir de la concentration massique en Al et du diamètre hydrodynamique par la relation suivante :

$$N_{Al} = \frac{[Al]_m \times V_{sol}}{m_{NP} \times \left(W_{Al} + 2 \times (1 - W_{Al}) \times \frac{M_{Al}}{M_{Al_2O_3}} \right)} \quad (3.8)$$

Avec :

$$m_{NP} = \rho_{Al} \times \frac{4}{3} \times \pi \times (r_{Al})^3 + \rho_{Al_2O_3} \times \frac{4}{3} \times \pi \times (r_{NP}^3 - r_{Al}^3)$$

$$m_{NP} = \frac{4}{3} \times \pi \times (r_{NP})^3 \times (\rho_{Al} \times x^3 + \rho_{Al_2O_3} \times (1 - x^3))$$

x représente ici le rapport entre le rayon de la sphère d'Al et le rayon de la nanoparticule :

$$x = \sqrt[3]{\frac{W_{Al} \times \rho_{Al_2O_3}}{\rho_{Al} + W_{Al} \times \rho_{Al_2O_3} - W_{Al} \times \rho_{Al}}}$$

Où W_{Al} correspond au rapport défini dans l'équation (3.1) ; M_{Al} , M_O et $M_{Al_2O_3}$ correspondent aux masses molaires respectives de l'Aluminium, de l'Oxygène et de l'Alumine ; ρ_{Al} et $\rho_{Al_2O_3}$ les masses volumiques de l'Aluminium et de l'Alumine ; r_{NP} et r_{Al} les rayons de la nanoparticule et du cœur d'Aluminium pur. Le détail des calculs est donné en *Annexe 9*.

3.1.3. Influence de la concentration en tampon phosphate et en surfactant sur la sédimentation des nanoparticules d'Al

L'étude du CuO ayant montré qu'il était plus intéressant de prélever le surnageant après 24 h de repos (voir paragraphe 2.1.3.), nous avons étudié ici l'influence de la

concentration de PB et de Tween sur la concentration en nanoparticules d'Al dans la solution colloïdale après sonication (t0) puis 24 h de repos (t24).

Comme pour le CuO, on fait l'hypothèse que la modification des concentrations de Tween et PB n'influent pas de façon significative sur l'optimisation des paramètres de sonication déterminées précédemment (14,5 mg, 8 min 10 sec) quelques soient les solutions préparées. Ci-dessous sont détaillées les différentes solutions préparées et analysées :

- **Al A** : 13 mg d'Al dans 25 mL de PB à 20 mM et Tween à 0,1 %
- **Al B** : 13 mg d'Al dans 25 mL de PB à 10 mM et Tween à 0,05 %
- **Al C** : 13 mg d'Al dans 25 mL de PB à 20 mM et Tween à 0,05 %
- **Al D** : 13 mg d'Al dans 25 mL de PB à 10 mM et Tween à 0,01 %
- **Al E** : 13 mg d'Al dans 25 mL de PB à 20 mM et Tween à 0,01 %

Pour chacune des solutions préparées, le diamètre hydrodynamique moyen et le potentiel Zeta après sonication (t0) puis 24 h de repos (t24) sont donnés sur le graphique de la Figure 71.

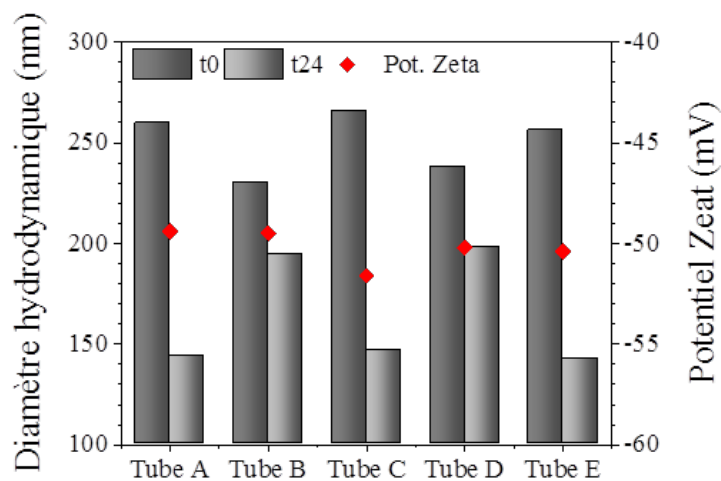


Figure 71 : Diamètre hydrodynamique moyen et potentiel Zeta de la solution colloïdale d'Al en fonction de la durée de sédimentation et de la composition de la solution colloïdale.

Quelle que soit la concentration en PB, le diamètre hydrodynamique moyen diminue après 24 h de repos. Mais nous observons une plus forte diminution pour une concentration en PB de 20 mM (**Al A**, **Al C** et **Al E**). En effet, le diamètre hydrodynamique passe de 260 nm à t0 à 140 nm à t24, alors qu'il passe de 230 nm à t0 à 190 nm à t24 pour une concentration en PB de 10 mM (**Al B** et **Al D**).

La dispersion semble moins bonne pour une concentration en PB trop élevée. La force ionique en solution est en effet plus forte, affaiblissant l'énergie de répulsion entre les nanoparticules (*cf.* Chapitre 4). Celles-ci sont donc moins bien désagrégées et forment de plus gros agrégats en fin de sonication, expliquant le diamètre plus important à t0. De

plus, ces agrégats sédimentent plus vite, expliquant la taille moins importante à t24 où seules les petites particules restent en solution.

Les valeurs de potentiel Zeta varient quant à elles entre -48 et -52 mV dans les solvants respectifs. Ces valeurs homogènes et élevées témoignent de la bonne stabilité de la solution colloïdale obtenue après sonication.

Enfin, on n'observe pas d'influence de la concentration en Tween sur le diamètre hydrodynamique moyen et le potentiel Zeta.

Pour chacune des solutions, la concentration massique en Al est déterminée par AAS et les résultats sont présentés sur le graphique (a) de la Figure 72. A partir de la concentration massique et du diamètre hydrodynamique moyen, la concentration en nanoparticules d'Al a pu être calculée à partir de l'équation (3.8) et est présentée sur le graphique (b) de la même Figure 72.

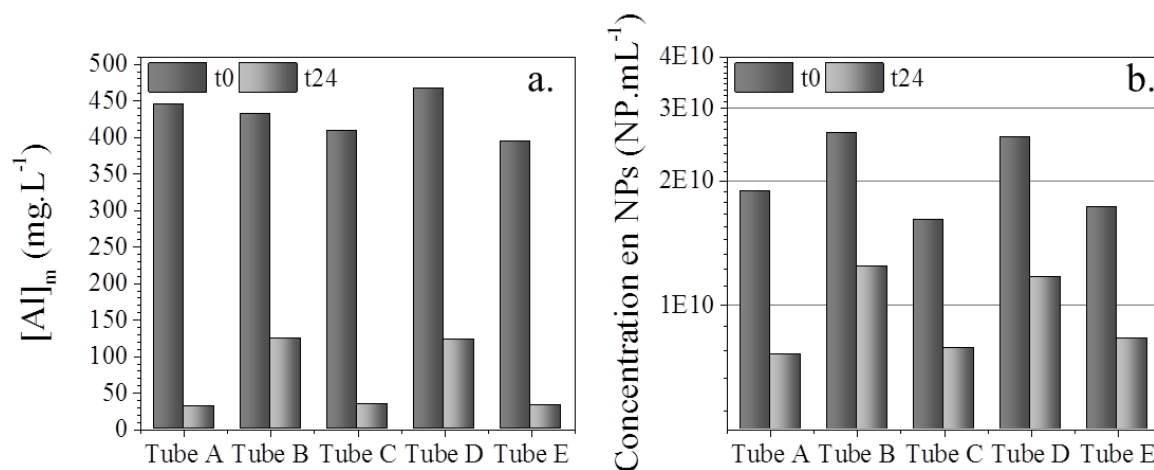


Figure 72 : Concentration massique en Al (graphique (a)) et concentration en nanoparticules d'Al (graphique (b)) pour les différentes solutions colloïdales de nanoparticules d'Al en fonction du temps de repos.

On note, comme attendu, une diminution importante de la concentration massique en Al après 24 h de repos. Les observations faites sur le diamètre hydrodynamique moyen sont confirmées ici : alors qu'après sonication (t0), on observe une concentration relativement homogène à $430 \pm 30 \text{ mg.L}^{-1}$, la concentration diminue à 30 mg.L^{-1} (7 % de la concentration à t0) pour les solutions ayant le plus faible diamètre hydrodynamique (**Al A**, **Al C** et **Al E**) et elle atteint 120 mg.L^{-1} (28 % de la concentration à t0) pour les deux autres solutions. On voit donc que la sédimentation des particules mal désagrégées pour une concentration en PB de 20 mM élimine une très grande quantité d'Al en solution.

Par ailleurs, c'est la solution **Al B** qui possède la concentration massique en Al la plus élevée (123 mg.L^{-1}), résultat identique à celui obtenu pour le CuO.

Les solutions **Al A**, **Al C** et **Al E** présentent une concentration en nanoparticules de $(1,7 \pm 0,2) \times 10^{10}$ NP.mL⁻¹ à t₀, puis de $(7,9 \pm 0,3) \times 10^9$ NP.mL⁻¹ à t₂₄, soit une diminution de 55 % de la concentration initiale après 24 h de repos de la solution.

Les solutions **Al B** et **Al D** présentent une concentration en nanoparticules plus élevée à t₀, de $(2,6 \pm 0,1) \times 10^{10}$ NP.mL⁻¹ et à t₂₄, de $(1,2 \pm 0,1) \times 10^{10}$ NP.mL⁻¹, soit une diminution de 53 % de la concentration initiale après 24 h de repos de la solution.

On constate donc aisément qu'il est plus intéressant de travailler avec une solution à faible concentration de PB, permettant d'obtenir une concentration en nanoparticules d'Al plus élevée, bien que le diamètre hydrodynamique des nanoparticules soit plus grand. Par ailleurs, comme observé lors de l'analyse de la concentration massique en Al, c'est la solution **Al B** qui possède la concentration en nanoparticules la plus élevée ($1,2 \times 10^{10}$ NP.mL⁻¹).

Nous retiendrons donc les conditions suivantes pour la dispersion des nanoparticules d'Al : **une concentration en PB de 10 mM et en Tween de 0,05 %vol.**

3.1.4. Reproductibilité du protocole de dispersion.

La reproductibilité de la dispersion en concentration massique d'Al (mg.L⁻¹) et en concentration en nanoparticules (NP.ml⁻¹) a été évaluée en répétant 5 fois le protocole de dispersion précédemment décrit. Les résultats sont présentés sur la Figure 73.

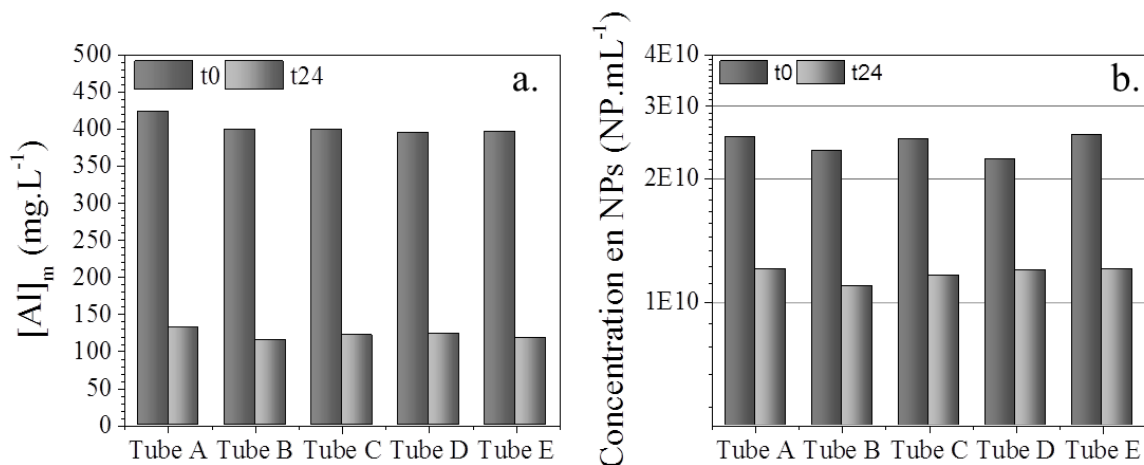


Figure 73 : Concentration massique en Al (graphique (a)) et en nanoparticules d'Al (graphique (b)) en solution à t₀ et à t₂₄ pour une solution de type Al B (PB à 10 mM et Tween à 0,05 %).

Sur le diagramme de gauche, on observe une très bonne reproductibilité de la concentration massique en Al à t₀, avec une moyenne de 403 ± 12 mg.L⁻¹. L'écart type représente une variation de 3 % autour de la valeur moyenne. Après 24 h de repos, la concentration moyenne en Al diminue à 122 ± 6 mg.L⁻¹, soit une variation de 5 %. Par

ailleurs, la perte de matière après 24 h de repos représente 70 % de la valeur initiale en Al, conformément à ce qui a été observé précédemment.

A t_0 , la concentration en nanoparticules est de $(2,42 \pm 0,14) \times 10^{10}$ NP.mL⁻¹ (variation de 6 %). A t_{24} , il ne reste plus que $(1,17 \pm 0,05) \times 10^{10}$ NP.mL⁻¹ (variation de 4 %). Ainsi, les variations après 24 h de repos se situent dans une marge d'incertitude inférieure à 5 %, ce qui, compte tenu du nombre de paramètres intervenants lors de la dispersion colloïdale, témoigne de la très bonne reproductibilité du procédé de dispersions de *nanopoudres* d'Al commerciales. Par ailleurs, la perte de concentration en nanoparticules d'Al après 24 h de sédimentation représente 50 % de la valeur initiale.

3.1.5. Bilan et caractérisation des solutions colloïdales optimisées

Nous avons établi les paramètres de dispersion des nanoparticules d'Al en solution aqueuse permettant d'obtenir une suspension colloïdale **homogène, reproductible et bien contrôlée**. La solution colloïdale d'Al ainsi obtenue contient environ $(2,4 \pm 0,2) \times 10^{10}$ NP.mL⁻¹ d'Al de **diamètre moyen de 230 nm**. Après 24 h de repos, la solution colloïdale reste homogène, avec environ $(1,2 \pm 0,1) \times 10^{10}$ NP.mL⁻¹ d'Al de **diamètre moyen 220 nm**. En 24 h de repos, la moitié des nanoparticules initialement présentes sont éliminées, ce qui représente 70 % de la masse initiale. Les concentrations en Tween et en PB optimisées pour limiter la sédimentation sont de **0,05 %vol et 10 mM pour le Tween et le PB respectivement**.

On obtient après sonication des agrégats de quelques nanoparticules, comme le confirment les observations des nanoparticules en microscopie électronique.

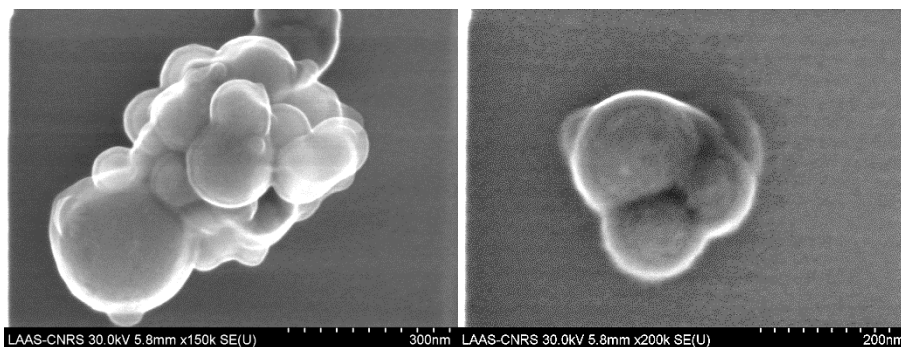



Figure 74 : Images SEM des dispersions colloïdales d'Al obtenues après sonication en solvant aqueux avec PB et Tween 20 à 10 mM et 0,05 %vol. respectivement.

Le diamètre hydrodynamique moyen et le potentiel Zeta mesurés par DLS des nanoparticules d'Al ainsi dispersées en solution colloïdale sont reportés dans le Tableau 11.

3. Bio-Fonctionnalisation de Nanoparticules d'Al

Tableau 11 : Diamètre hydrodynamique moyen et potentiel Zeta des nanoparticules d'Al dispersées en solution aqueuse avant fonctionnalisation (les incertitudes sont calculées selon la loi de Student sur 20 expériences indépendantes).

	Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	Potentiel Zeta (mV)
Solution colloïdale d'Al stabilisée	224 ± 7	$-49,9 \pm 1,2$

Le diamètre hydrodynamique moyen obtenu est de 224 ± 7 nm et montre une très faible disparité des résultats (environ 3 %). Nous pouvons donc conclure que le procédé de dispersion permet l'obtention de solutions colloïdales stables et de façon répétable.

La distribution en taille des nanoparticules d'Al et la stabilité dans le temps de la solution colloïdale sont données en Figure 75.

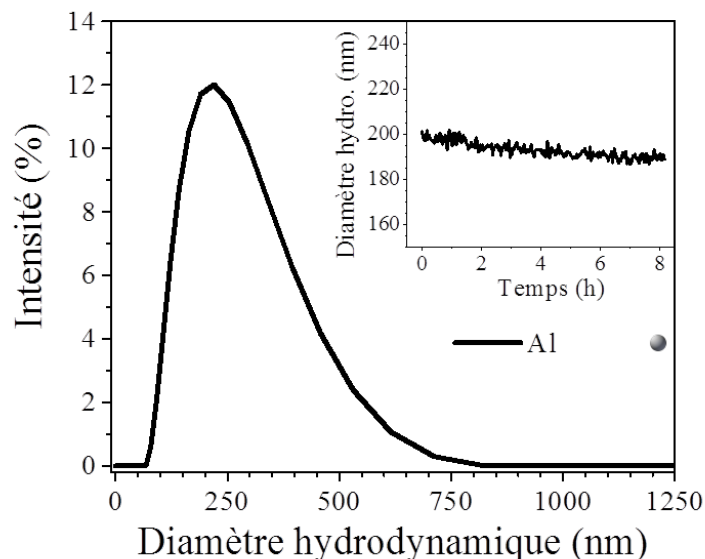


Figure 75 : Distribution en taille des nanoparticules d'Al au sein de la solution colloïdale et stabilité de la solution dans le temps (encadré supérieur droit).

Tout comme les solutions colloïdales de CuO, la distribution des nanoparticules est plus large que l'incertitude calculée sur la moyenne de la dispersion, avec des particules de taille comprise entre 50 et 700 nm. La distribution du diamètre hydrodynamique décrit une distribution en taille centrée sur 225 nm. Par ailleurs, les forts potentiels Zeta mesurés, supérieurs en valeur absolue à 40 mV et proches de ceux obtenus dans le cas du CuO, montrent que les dispersions colloïdales sont stables. La stabilité de la solution colloïdale est confirmée par le graphique présenté dans l'encadré supérieur droit.

Ces solutions colloïdales, optimisées et stabilisées, sont alors prêtes pour la prochaine étape : le greffage de la Streptavidine.

3.2. Greffage de la Streptavidine

En reprenant la méthodologie présentée à la section 2.2., nous avons estimé la surface de nanoparticules à greffer à partir de la concentration en nanoparticules d'Al et du diamètre hydrodynamique moyen mesuré.

$$S_{tot} = N_{Al} \times V \times 4\pi \times \left(\frac{\Phi_{Al}}{2} \right)^2 \quad (3.9)$$

Avec :


- $N_{Al} = (1,2 \pm 0,2) \times 10^{10} \text{ NP.mL}^{-1}$
- $V = 20 \pm 0,1 \text{ mL}$
- $\Phi_{Al} = 215 \pm 5 \text{ nm}$

On trouve pour 20 mL de solution une surface totale de $(2,9 \pm 0,1) \times 10^{-2} \text{ m}^2$.

Le volume nécessaire de solution mère en Streptavidine (1 mg.mL^{-1}) pour recouvrir uniformément la surface d'Al est de 30 μL . Afin de se placer en excès, nous retiendrons 50 μL de Streptavidine.

Après un temps d'incubation d'un minimum de 4 h (Zhang et al., 2013b), les solutions sont rincées trois fois dans une solution de PBS 0,1X et de Tween 20 à 0,05 % vol afin d'éliminer l'excès de Streptavidine. Entre chaque rinçage, la solution est centrifugée pendant 20 min à 16 000 G et les particules redispersées pendant 5 min dans un bain à ultrasons. Le potentiel Zeta et le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules d'Al fonctionnalisées avec la Streptavidine, notées **Al-Strep**, caractérisés par DLS, sont reportées dans le Tableau 12.

Tableau 12: Diamètre hydrodynamique et potentiel Zeta des nanoparticules d'Al fonctionnalisées avec la Streptavidine (les incertitudes sont calculées d'après la loi de Student sur 14 expériences indépendantes).

	Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	Potentiel Zeta (mV)
Al-Strep (PBS 0,1X)	239 ± 7	$-44,4 \pm 2,1$

Dans le PBS 0,1X, le diamètre hydrodynamique moyen est mesuré à $239 \pm 7 \text{ nm}$, avec une faible disparité (3 %). Cela représente une augmentation de 15 nm par rapport à la solution d'Al avant fonctionnalisation. On observe aussi une diminution du potentiel Zeta de 5 mV lorsque la mesure est réalisée dans le nouveau solvant PBS 0,1X, avec $-44,4 \pm 2,1 \text{ mV}$.

Contrairement à ce qui avait été observé pour le CuO, l'augmentation de 15 nm du diamètre hydrodynamique moyen est conforme à la valeur attendue, puisque la taille de la protéine est d'environ 5 nm³. Cela confirme la réussite de l'étape de greffage, et que les colloïdes à base d'Al ne sont pas soumis aux interactions faibles que nous avons observé sur les nanoparticules de CuO.

Enfin, une comparaison de la distribution du diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'Al est proposée en Figure 76, avant (courbe noire) et après greffage de la Streptavidine (courbe verte).

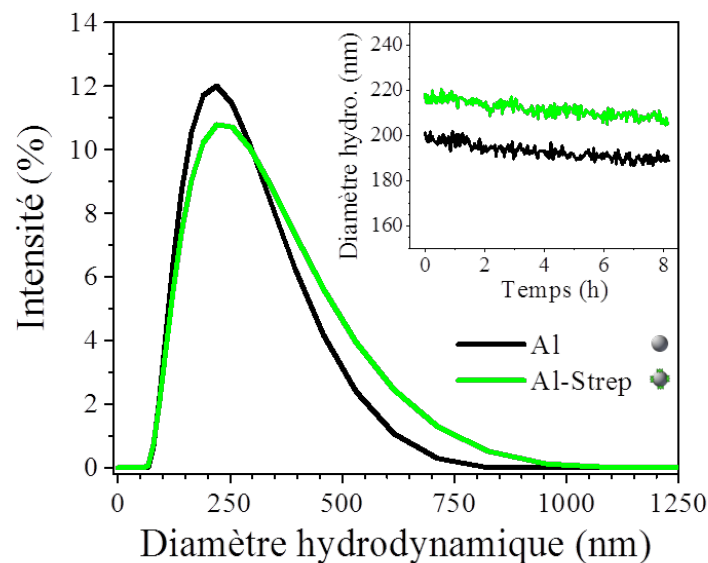


Figure 76 : Distribution en taille des nanoparticules d'Al avant (courbe noire) et après greffage de la Streptavidine (courbe verte), et stabilité dans le temps de la solution colloïdale (encadré supérieur droit).

La courbe verte montre une distribution des nanoparticules **Al-Strep** centrée sur 255 nm. Le décalage du pic de 30 nm est cohérent avec l'augmentation du diamètre hydrodynamique moyen. Les observations au SEM confirment les tailles mesurées des nanoparticules d'Al (voir Figure 77).

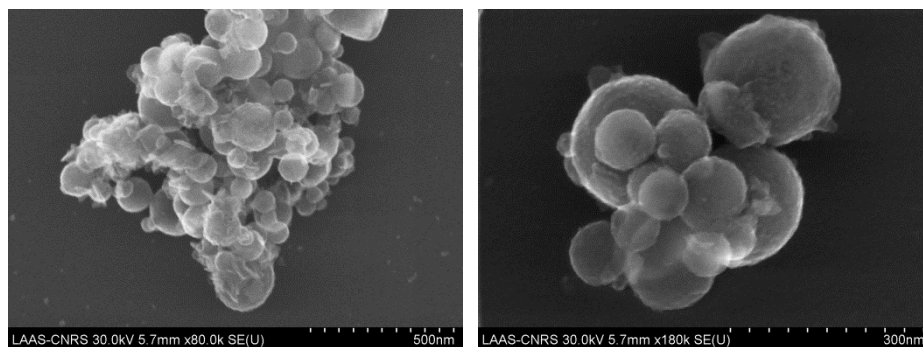


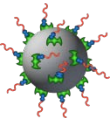
Figure 77 : Images SEM des dispersions colloïdales de nanopoudres d'Al après fonctionnalisation par la Streptavidine.

L'agrégation observée peut se produire lors du séchage de la solution colloïdale déposée sur la grille TEM, qui explique une taille d'agrégats supérieure à celle mesurée par DLS. Par ailleurs, on observe une légère modification de la surface, plus rugueuse, qui pourrait être le témoin d'un greffage biologique.

3.3. Greffage de l'ADN

Comme pour les solutions colloïdales de CuO, trois tailles d'ADN sont étudiées, et les séquences utilisées sont rappelées dans le Tableau 7 : ADN courts (15 bases), intermédiaires (30 bases) et longs (45 bases). Nous utiliserons les mêmes volumes d'ADN que dans le cas du CuO : 10 μ L de solution mère d'ADN sont ajoutés aux 20 mL de solution colloïdale **Al-Strep**. Après une incubation de 7 h (Zhang et al., 2013b), la solution colloïdale est rincée 3 fois avec une solution de PBS 0,1X et de Tween 20 à 0,05 % par 20 min de centrifugation à 16 000 G suivi de 5 min de dispersion dans un bain à ultrasons entre chaque centrifugation, afin d'éliminer l'excès d'ADN non greffé. Le diamètre hydrodynamique et le potentiel Zeta des nanoparticules fonctionnalisées obtenues, notées **Al-ADN**, sont caractérisés par DLS et les résultats pour trois longueurs d'ADN (court, intermédiaire et long) sont reportés dans le Tableau 13.

Tableau 13: Diamètres hydrodynamiques moyens et potentiels Zeta des nanoparticules d'Al fonctionnalisées avec les brins d'ADN courts (15 bases), intermédiaires (30 bases) et longs (45 bases) (les écarts types sont calculés suivant la loi de Student, à partir de 2, 6 et 11 expériences indépendantes, respectivement pour l'ADN court, intermédiaire et long).

	Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	Potentiel Zeta (mV)
Al-ADN court (ss-B ₀ , PBS 0,1 X)	249 \pm 4	-43,8 \pm 2,4
Al-ADN intermédiaire (ss-B ₁₅ , PBS 0,1 X)	238 \pm 13	-43,3 \pm 2,1
Al-ADN long (ss-B ₃₀ , PBS 0,1 X)	248 \pm 10	-44,2 \pm 1,5

Le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules d'Al est de 249 \pm 4 nm avec les ADN courts (15 bases), de 238 \pm 13 nm avec les ADN longs (30 bases) et de 248 \pm 10 nm pour les ADN longs (45 bases). Le diamètre hydrodynamique moyen après greffage de l'ADN augmente donc respectivement de 25 nm, 14 nm et de 23 nm pour les ADN courts, intermédiaires et longs, comparativement à la taille des particules d'Al avant fonctionnalisation (224 \pm 7 nm). Contrairement au CuO, ces augmentations après

greffage de l'ADN ne suivent pas les augmentations attendues de 22 nm, de 35 nm et de 40 nm respectivement, excepté pour **Al-ADN court**. Ces résultats s'expliquent probablement par l'existence d'interactions faibles ou fortes, non-désirées, entre les brins d'ADN et les nanoparticules d'Al. Le chapitre précédent ayant en effet montré l'existence d'interactions fortes entre la thymine et la surface d' Al_2O_3 , on peut supposer un étalement total ou partiel de l'ADN sur la surface pour les brins contenant un *spacer* de thymine (**Al-ADN intermédiaire** et **Al-ADN longs**), induisant une réduction du diamètre hydrodynamique par rapport à ce qui est attendu.

Le potentiel Zeta varie de $-43,8 \pm 2,4$ mV à $-43,3 \pm 2,1$ mV et $-44,2 \pm 1,5$ mV avec les ADN courts, intermédiaires et longs, respectivement. Ici, l'évolution du potentiel Zeta n'est pas aussi cohérente que dans le cas des nanoparticules de CuO : le potentiel d'**Al-ADN court** est supérieur à celui d'**Al-ADN intermédiaire**. Une nouvelle fois, l'étalement probable de l'ADN permet d'apporter une explication à cette évolution. Ces observations confirment cependant que le greffage de l'ADN est effectif sur les particules.

Pour finir, la Figure 78 donne la distribution en taille des nanoparticules d'Al après greffage de l'ADN intermédiaire (courbe rouge), de la Streptavidine (courbe verte), et avant fonctionnalisation (courbe noire). Dans l'encadré en haut à droite, l'évolution du diamètre hydrodynamique moyen pendant 8 h des nanoparticules d'**Al-ADN** est tracée sur la courbe rouge.

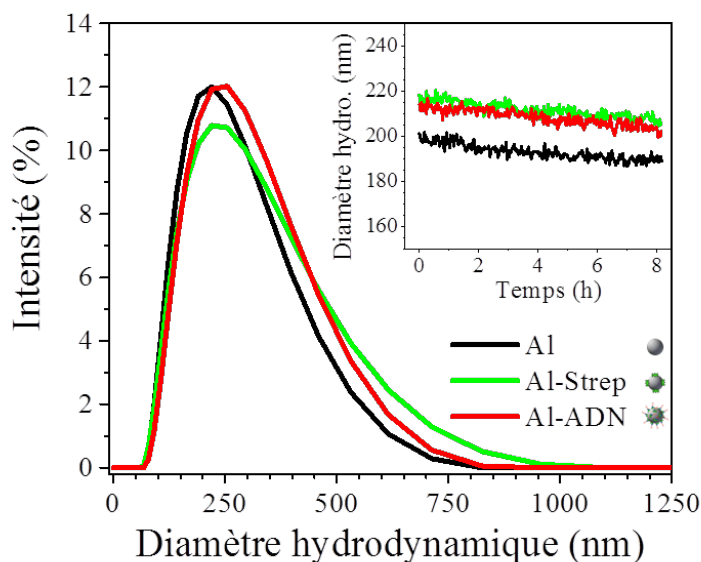


Figure 78 : Distribution en taille des nanoparticules d'Al avant (courbe noire), après greffage de la Streptavidine (courbe verte) et après greffage de l'ADN intermédiaire (courbe rouge) et stabilité des solutions colloïdales (encadré supérieur droit).

On observe un décalage du pic de 225 nm à 335 nm après greffage de l'ADN, ce qui confirme l'augmentation du diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules

observée après greffage des biomolécules. L'étalement de la distribution explique par ailleurs l'écart entre les valeurs moyennes données précédemment et le centre du pic principal. Une nouvelle fois, la solution est stable dans le temps comme le montre le graphe dans l'encadré en haut à droite.

Les observations au microscope électronique de la Figure 79 confirment la polydispersité des agrégats de quelques nanoparticules obtenues.

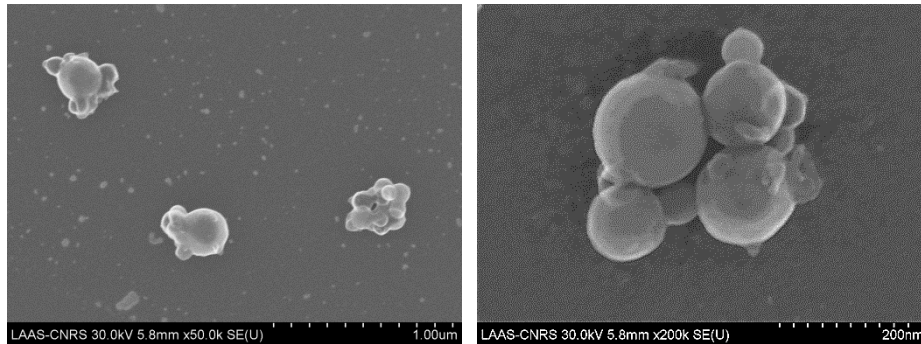


Figure 79 : Images SEM des dispersions colloïdales de nanoparticules d'Al après fonctionnalisation par l'ADN.

La surface apparaît plus rugueuse après greffage de l'ADN que celle des nanoparticules nues, mais il est difficile de conclure à un greffage à partir des clichés obtenus au SEM.

Ainsi, seule l'augmentation du diamètre hydrodynamique moyen et la valeur de potentiel Zeta permettent de valider l'étape de greffage de l'ADN.

4. Caractérisation des densités de greffage de la Streptavidine et de l'ADN sur les nanoparticules d'Al et de CuO et validation de la préservation de la fonctionnalité de l'ADN

La quantification du nombre de brins d'ADN et de Streptavidine est importante à deux niveaux. D'abord, elle permet d'estimer la proportion de matière organique dans le nanobiocomposite énergétique final, et donc d'intégrer son apport dans les propriétés énergétiques. Elle permet ensuite, en optimisant le nombre de brins d'ADN greffés à la surface en jouant sur plusieurs paramètres (durée d'incubation, sonication, concentration saline), de maximiser l'hybridation entre les brins complémentaires et d'améliorer l'assemblage des nanoparticules.

A partir de la concentration en nanoparticules déterminée précédemment, la quantité d'ADN greffée est déterminée par une méthode basée sur la fluorescence. Avant de présenter les résultats, il nous est apparu important de présenter rapidement les travaux traitant de la quantification d'ADN pour justifier l'intérêt de cette méthode qui s'impose aujourd'hui.

4.1. Etat de l'art

La quantification du nombre de brins d'ADN sur surface ou sur nanoparticules s'est développée très tôt, parallèlement à l'établissement de structures cristallines à haut degré d'ordre, mais essentiellement pour quantifier la densité de greffage de l'ADN sur nanoparticules d'or. Ainsi, dès 1995, l'équipe de Knoll étudie en solution l'hybridation de brins d'ADN sur une surface d'or fonctionnalisée avec des brins complémentaires par Résonance Plasmon de Surface (notée SPR, pour *Surface Plasmon Resonance*) (Piscevic *et al.*, 1995). Cette technique, qui étudie la variation de l'indice de réfraction d'un laser au voisinage d'une surface lors de l'hybridation d'un brin d'ADN ou de la fixation d'un ligand, a ensuite été utilisée par d'autres équipes pour quantifier la quantité d'ADN greffée sur surface d'or (Georgiadis *et al.*, 2000; Peterlinz *et al.*, 1997). Les densités de surface déterminées dans ces travaux sont de l'ordre de $(5,2 \pm 0,8) \times 10^{12}$ molécules par cm^2 (soit $8,6 \text{ pmol.cm}^{-2}$) (Peterlinz *et al.*, 1997). Notons également que l'utilisation de la méthode XPS et la variation du pic de l'azote, présentée dans le Chapitre 2, est également adaptée à la quantification d'ADN sur surface d'or, et a montré des résultats similaires : $(5,7 \pm 0,05) \times 10^{12}$ molécules par cm^2 (soit $8,6 \text{ pmol.cm}^{-2}$), avec un taux d'hybridation très élevé, de l'ordre de 60 à 100 % (Herne and Tarlov, 1997). Enfin, Castelino *et al.* ont utilisé une méthode par fluorescence pour déterminer la quantification d'ADN et de protéines sur surface d'or (Castelino *et al.*, 2005).

D'autres méthodologies ont été utilisées pour la quantification des densités de greffage sur nanoparticules d'or. Nous pouvons citer de façon non exhaustive la

diffraction dynamique de lumière (Storhoff *et al.*, 2000; Taton *et al.*, 2000), la spectroscopie Raman (Cao *et al.*, 2002, 2003), par microbalance à quartz (Patolsky *et al.*, 2000) ou encore par signal électrique ou électrochimique (Park *et al.*, 2002; Steel *et al.*, 1998). Cependant, c'est la **méthode par fluorescence qui s'impose par la suite** (Castelino *et al.*, 2005; Demers *et al.*, 2000; Hurst *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2003), **grâce à la facilité de calibration et l'instrumentation simple** à mettre en œuvre et permettant l'obtention de faibles densités de surface de précisions de l'ordre du pM (Blythe *et al.*, 2014). Demers *et al.* sont les premiers à proposer l'utilisation d'oligonucléotides pour la caractérisation des densités de greffage sur nanoparticules d'or (Demers *et al.*, 2000). L'idée est simple et repose sur la réversibilité de la liaison thiol – surface. Ainsi, la quantification se déroule en quatre étapes essentielles, schématisées en Figure 80 :

1. Le greffage de brins d'ADN fluorescent à la surface de nanoparticules par la formation de la liaison thiol – surface d'or.
2. Lavage de la solution et élimination des ADN en excès, non-greffés à la surface des particules.
3. Détachement des ADN greffés à la surface par ajout de l'agent réducteur DiThioThréitol (noté DTT), permettant la rupture de la liaison S-Au.
4. Elimination des nanoparticules par centrifugation, et mesure de l'intensité de fluorescence de la solution contenant les ADN fluorescents initialement attachés à la surface des nanoparticules.

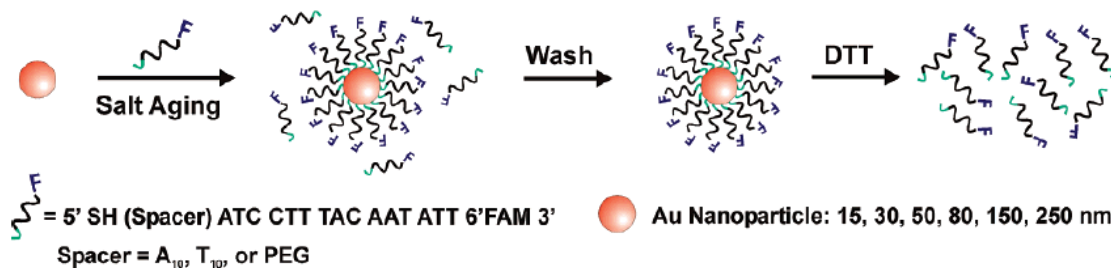


Figure 80 : Principe de la quantification de brins d'ADN sur nanoparticules d'or, utilisant la réversibilité de la liaison thiol - or en présence de DTT (Hurst *et al.*, 2006).

Ces publications ont permis de mieux comprendre le rôle et l'influence de ces paramètres sur la densité et la spécificité du greffage de brins d'ADN sur surface d'or. Hurst *et al.* ont ainsi montré que la concentration saline optimale de leur système était un compromis inévitable entre écrantage des charges répulsives des brins d'ADN et stabilité de la solution colloïdale, s'établissant dans leur système de nanoparticules d'or à 0,7 M. Ils ont également montré que l'utilisation d'un *spacer* organique comme du PolyÉthylène Glycol (noté PEG) plutôt qu'un *spacer* constitué de bases T permettait l'éloignement des brins d'ADN chargés de la surface, et donc de limiter de la gêne stérique et répulsive.

L'utilisation de sonication de courte durée (10 sec) permet également une augmentation de la densité de greffage si le *spacer* utilisé est à base de brins d'ADN, car il permet de rompre les liaisons faibles entre bases ADN et surface d'or. Enfin, ils ont montré que plus la particule était grosse, plus le taux de greffage était faible, à cause du rayon de courbure diminuant grandement avec l'augmentation de la taille de la particule. Cette étude a permis ainsi d'améliorer les procédés de fonctionnalisation et d'assemblage de nanoparticules, et la fluorescence est devenue la méthode de base pour la quantification d'ADN sur nanoparticules (Cutler *et al.*, 2012).

C'est pourquoi nous avons adapté la méthode par fluorescence pour quantifier de façon rigoureuse, et pour la première fois à notre connaissance, la quantité d'ADN et de Streptavidine greffés à la surface de nanoparticules d'Al et de CuO. De façon similaire à la publication de Hurst *et al.*, nous avons examiné l'impact de trois paramètres expérimentaux sur la densité de greffage : la force ionique, le temps d'incubation et sonication, et la composition du brin d'ADN.

Nous présentons dans le prochain paragraphe les trois méthodes de quantification mises en place pour caractériser les densités de greffage de la Streptavidine et de l'ADN et pour valider la conservation de la fonctionnalité de l'ADN.

4.2. Méthode de caractérisation de la densité de greffage de la Streptavidine

Du fait de la non-réversibilité de l'accroche de la Streptavidine sur les surfaces des nanoparticules, nous avons élaboré une méthode de quantification de la quantité de Streptavidine greffée à la surface indirecte en trois étapes, schématisée en Figure 81.

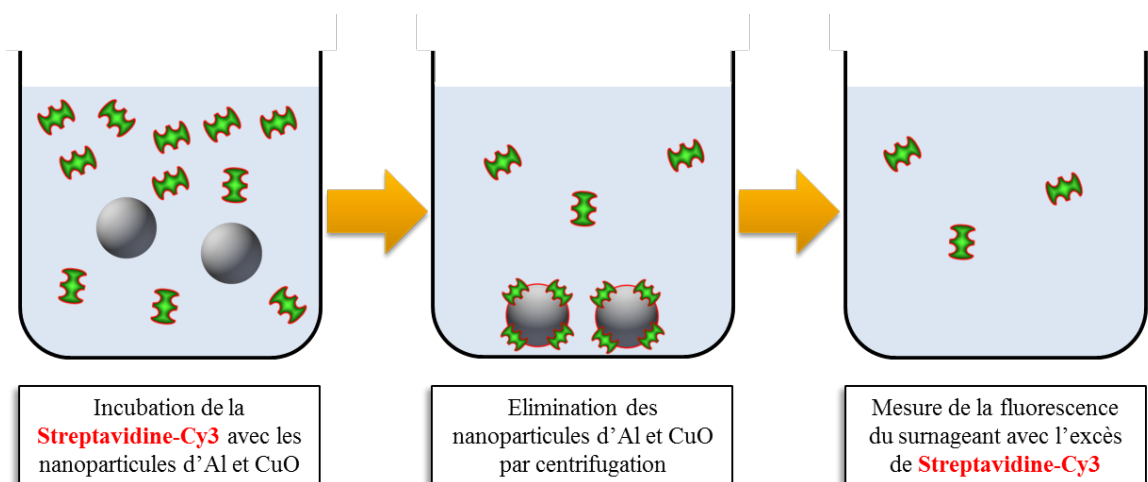


Figure 81 : Schéma présentant la stratégie de quantification indirecte de la Streptavidine fluorescente (en rouge) greffée sur les nanoparticules d'Al ou de CuO, en trois étapes.

D'abord, 1,25 μL de solution mère de Streptavidine concentré à $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ dans 500 μL est ajoutée à la solution colloïdale de nanoparticules de CuO ou d'Al, préparées suivant le protocole décrit en 2.2 et 3.2 respectivement. La solution est ensuite laissée au repos pendant 24 h avec ré-homogénéisation régulière (**étape 1**). Le surnageant est récupéré après centrifugation de la solution colloïdale pendant 10 min à 16 000 G (**étape 2**), et les nanoparticules récupérées et suspendues dans un volume équivalent (500 μL). L'intensité en fluorescence du surnageant est mesurée et comparée à un échantillon témoin composé de 1,25 μL de Streptavidine avec 500 μL de solvant PB 10 mM (**étape 3**). La concentration en Streptavidine est calculée par titration (après réalisation d'une courbe d'étalonnage) et la quantité de protéines attachées à la surface des nanoparticules déduite par différence entre la concentration en Streptavidine du témoin et la concentration en Streptavidine du surnageant. La densité de greffage est enfin obtenue en normalisant la concentration en Streptavidine calculée par le nombre de nanoparticules en solution déterminé par AAS.

4.3. Caractérisation du greffage de l'ADN

Le complexe [biotine-Streptavidine] peut se dissocier dans des conditions expérimentales précises. Ainsi, nous avons observé expérimentalement la rupture du complexe après chauffage d'une solution colloïdale composée de billes de polystyrène recouvertes de Streptavidine complexée avec des brins d'ADN fluorescents, après chauffage à 80 °C dans une solution de DodécylSulfate de Sodium (noté SDS, pour *Sodium Dodecyl Sulfate*) à 0,1 % pendant 10 min. Cependant, nous n'avons pu observer cette rupture dans le cas des nanoparticules d'Al et de CuO. Nous avons donc mis au point une méthode indirecte en trois étapes, similaire à celle présentée pour la Streptavidine, schématisée en Figure 82.

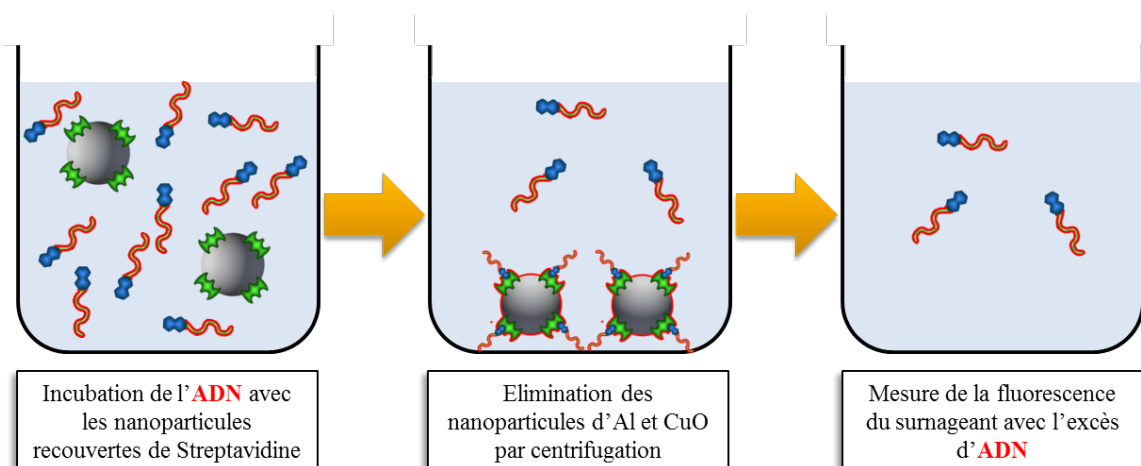


Figure 82 : Schéma de la méthode de quantification indirecte par fluorescence de l'ADN fluorescent (en rouge) greffé à la surface des nanoparticules d'Al ou de CuO en trois étapes.

La première étape consiste à greffer sur les nanoparticules de **CuO-Strep** ou d'**Al-Strep** des brins d'ADN fonctionnalisés avec un fluorophore (FAM) et un groupe biotine, en ajoutant 1 μL de solution d'ADN fluorescent dans 500 μL de solution colloïdale. Après incubation, les nanoparticules sont éliminées par centrifugation à 16 000 G pendant 10 min (étape 2), et le surnageant contenant l'excès d'ADN non greffé est récupéré et son intensité en fluorescence mesurée et comparée à un échantillon témoin (étape 3). Le nombre de brins d'ADN greffés sur les nanoparticules est obtenu par différence entre la concentration initiale en ADN (échantillon témoin) et la concentration du surnageant. Les nanoparticules résultantes et fonctionnalisées, notées **CuO-ADN**, sont redispersées et rincées trois fois par centrifugation dans un solvant aqueux de PBS 0,1 X et Tween 0,05 % vol.

4.4. Caractérisation de la fonctionnalité de l'ADN

Enfin, la fonctionnalité¹⁶ de l'ADN greffée, *i.e.* la spécificité du greffage de l'ADN par le groupe biotine et la préservation de la séquence hybridable avec le brin complémentaire, peut être évaluée par incubation d'ADN fluorescent complémentaire dans la solution de **CuO-ADN** ou **Al-ADN**. Après incubation pendant 24 h, le surnageant est récupéré et l'intensité en fluorescence est analysée. L'échantillon contenant les nanoparticules fonctionnalisées avec des brins d'ADN hybridés avec des brins complémentaires est redispersé, puis chauffé et centrifugé. Le surnageant, contenant l'ADN complémentaire initialement hybridé aux brins d'ADN greffés à la surface des nanoparticules, est récupéré et son intensité en fluorescence mesurée. Un schéma représentant la caractérisation de la fonctionnalité de l'ADN est présenté en Figure 83 ci-dessous.

¹⁶ La définition et le schéma de principe du greffage fonctionnel de l'ADN à la surface de nanoparticules ont été donnés dans le Chapitre 2.

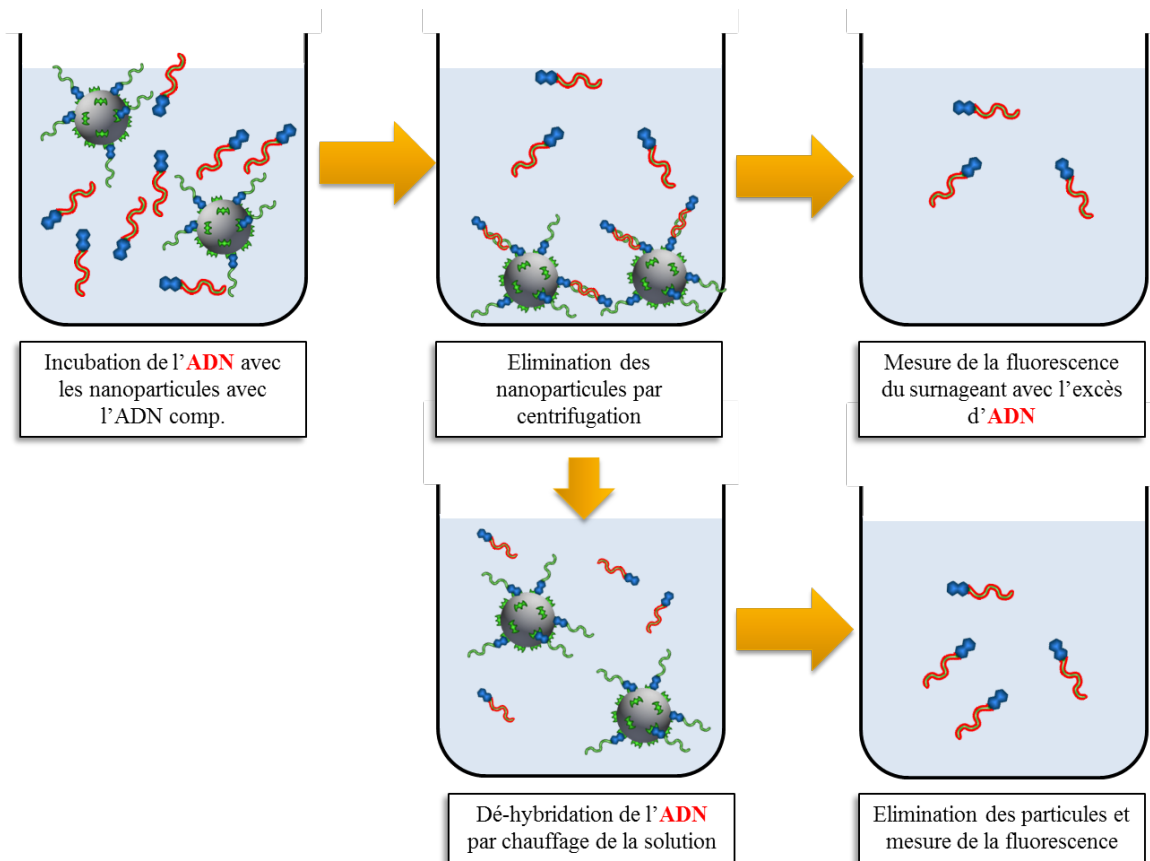


Figure 83 : Schéma de la méthode de quantification de la fonctionnalité de l'ADN greffé à la surface des nanoparticules d'Al ou de CuO par hybridation puis dé-hybridation avec un ADN complémentaire fluorescent (en rouge).

4.5. Quantification du greffage de la Streptavidine

4.5.1. Influence de la durée d'incubation.

L'évolution de la concentration de Streptavidine dans le surnageant a été mesurée en fonction de la durée d'incubation, étudiée entre 1 h et 30 h, est présentée sur la Figure 84. Les échantillons sont préparés par ajout de 1,25 μL de Streptavidine fluorescent avec 500 μL de solution colloïdale de nanoparticules de CuO (courbe rouge), ou d'Al (courbe noire). La concentration initiale en Streptavidine dans le surnageant est donc établie à 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, confirmée par mesure d'un échantillon témoin ($2,48 \pm 0,04 \mu\text{g.mL}^{-1}$), et matérialisée par la ligne pointillée sur la Figure 84.

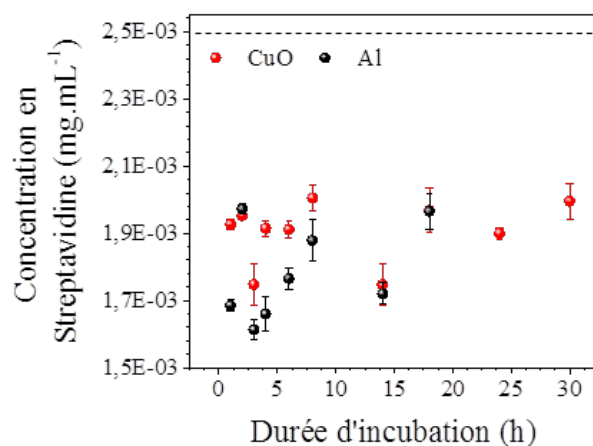


Figure 84 : Concentration en Streptavidine dans le surnageant d'une solution colloïdale de CuO (courbe rouge) et d'Al (courbe noire) en fonction de la durée d'incubation. La concentration initiale en Streptavidine est matérialisée à $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mg.mL}^{-1}$ par la ligne pointillée. Les barres d'erreurs sont calculées par propagation des incertitudes.

On observe que la concentration en Streptavidine dans le surnageant est inférieure à la concentration initiale de $2,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans les deux cas, et est globalement stable quelle que soit la durée d'incubation à $1,9 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour CuO, et $1,8 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour Al. Le minimum est obtenu après 3 h et 14 h d'incubation ($1,75 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) et le maximum après 8 h et 30 h d'incubation ($2,01 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$).

La différence entre la quantité de Streptavidine initiale ($2,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) et la quantité de Streptavidine dans le surnageant ($1,9 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) permet de déterminer la quantité de Streptavidine éliminée avec la centrifugation, et donc greffée à la surface des particules. Afin d'exploiter ces résultats, il est nécessaire de normaliser cette quantité de Streptavidine calculée par la concentration en nanoparticules de CuO et Al déterminée par AAS. Les résultats du nombre de protéines en fonction de la durée d'incubation sont présentés dans la Figure 85 ci-dessous.

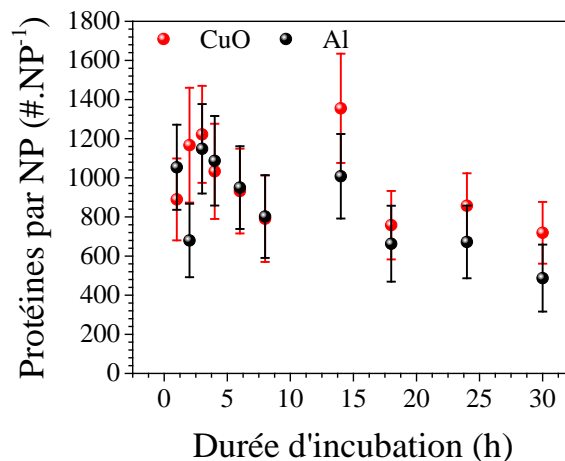


Figure 85 : Evolution du nombre de Streptavidine greffées sur les nanoparticules de CuO (courbe rouge) et d'Al (courbe noire) en fonction de la durée d'incubation. Les barres d'erreurs sont calculées par propagation des incertitudes.

Globalement, la densité de greffage est constante à 940 ± 200 et 860 ± 215 protéines par nanoparticule, pour CuO et Al respectivement, quelle que soit la durée d'incubation, bien que les écarts types soient importants (entre 20 et 25 %). On constate en effet que l'on greffe entre 500 et 1 400 protéines par nanoparticule, représentant une surface de recouvrement de 9 à 15 % pour le CuO et entre 7 et 12 % pour l'Al, en considérant comme taille de la Streptavidine ses dimensions caractéristiques de $4 \times 4,2 \times 5 \text{ nm}^3$ (Weber *et al.*, 1989). La densité atteint un maximum à $1 300 \pm 160$ protéines par nanoparticules après 14 h d'incubation pour le CuO, et $1 150 \pm 160$ protéines par nanoparticules pour l'Al, puis se stabilise à une valeur plus basse à 750 ± 150 protéines par nanoparticule pour de longues durée d'incubation (supérieures à 18 h). Ces valeurs de recouvrement correspondent à une densité de greffage surfacique de $(7,3 \pm 1,2) \times 10^{11}$ et $(5,3 \pm 1,3) \times 10^{11}$ protéines par cm^2 pour les nanoparticules de CuO et d'Al respectivement. Elles sont comparables avec les valeurs de $4,6 \times 10^{11}$ protéines par cm^2 obtenues par l'équipe de Castelino (Castelino *et al.*, 2005).

De façon générale, ces résultats nous indiquent que le greffage de la Streptavidine est rapide et spontané à température ambiante. La densité est répétable, bien que les écarts types soient importants à cause d'incertitudes sur le nombre de nanoparticules en solution et la concentration en Streptavidine déterminée de façon indirecte.

4.5.2. Influence de la concentration saline

L'influence de la concentration saline étuïée entre 0, 15, 70 et 140 mM en NaCl sur la densité de greffage de la Streptavidine après 8 h d'incubation est donnée en Figure 86.

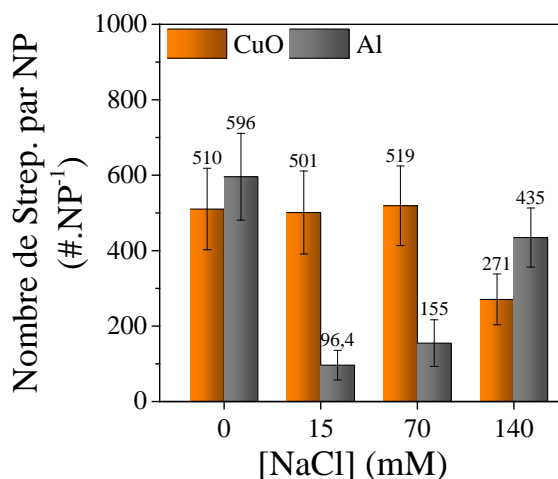


Figure 86: Nombre de Streptavidine greffées sur les nanoparticules d'Al et de CuO en fonction de la concentration saline du solvant de dispersion, après 8 h d'incubation. Les barres d'erreurs sont calculées par propagation des incertitudes.

Pour le CuO, le nombre de protéines par nanoparticules est constant, à environ 500 protéines par nanoparticule, quelle que soit la concentration saline entre 0 et 70 mM. Cependant, la quantité de Streptavidine diminue d'un facteur 2 lorsque la concentration est augmentée à 140 mM. Notons qu'à cette concentration, le potentiel Zeta diminue à $-20,5 \pm 0,9$ mV. Ceci implique que la répulsion électrostatique entre particules de CuO est trop faible, et qu'une agrégation de nanoparticules est induite par l'augmentation de la force ionique. Cette agrégation induit donc une diminution de la surface disponible pour le greffage, et donc une diminution de la densité de greffage.

L'effet du sel sur la densité de greffage de la protéine sur les nanoparticules d'Al est par contre inattendu : une forte diminution de la densité est observée lorsque la concentration saline passe de 0 à 15 mM passant de 600 à 100 protéines par nanoparticule. Cependant, lorsque la concentration en sel augmente, la densité augmente, passant de 100 à 435 protéines par nanoparticule de 15 à 140 mM. Cependant, ce taux de greffage reste inférieur à celui obtenu lorsqu'il n'y a pas d'ajout de sel, pour les mêmes raisons que celles données pour le CuO.

Ces résultats nous permettent de conclure que le taux de greffage est maximisé dans une solution de PB 10 mM sans ajout de charge ionique comme NaCl, pour les deux types de nanoparticules.

4.5.3. Effet de la sonication

Enfin, nous avons étudié l'effet de la sonication sur la densité de greffage de la Streptavidine sur les nanoparticules d'Al et de CuO, en appliquant une certaine durée de sonication après ajout de la Streptavidine à la solution colloïdale (0 sec, 30 sec, et 5 min). Les résultats sont donnés en Figure 87.

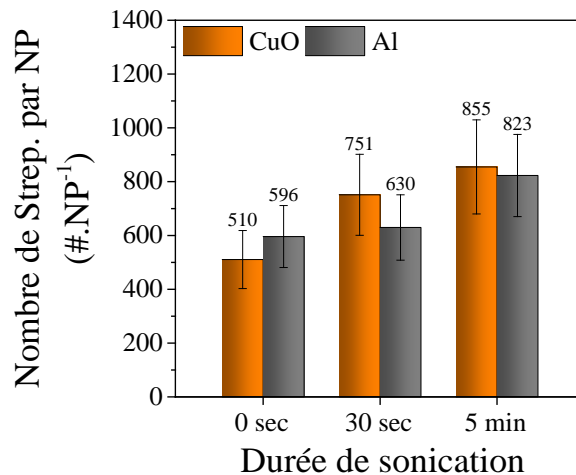


Figure 87: Nombre de Streptavidine greffées sur les nanoparticules d'Al et de CuO dispersées dans du PB 10 mM et Tween 0,05 % en fonction de la durée de sonication après ajout de la Streptavidine, après 8 h d'incubation. Les barres d'erreurs sont calculées par propagation des incertitudes.

Pour les nanoparticules de CuO, le nombre de protéines augmente de 510 à 855 après 5 min de sonication. Pour les nanoparticules d'Al, on observe une augmentation du nombre de Streptavidine par nanoparticule de 600 à 825 après 5 min de sonication. Ces résultats sont cohérents avec les résultats déjà publiés dans le cas de l'ADN greffé sur nanoparticules d'or (Hurst *et al.*, 2006).

Nous pouvons conclure que les conditions qui permettent un taux de recouvrement maximal sont l'incubation de la Streptavidine dans une solution colloïdale de nanoparticules d'Al ou de CuO dans du PB 10 mM et du Tween concentrés à 10 mM et 0,05 % respectivement, après 5 min de sonication. Ces paramètres sont donc appliqués par la suite dans la préparation des solutions colloïdales **CuO-Strep** et **CuO-ADN**. Notons que la durée d'incubation de la Streptavidine sera maintenue à 24 h lors de la fonctionnalisation d'un volume important de solution colloïdale (supérieure à 10 mL), l'effet du volume n'ayant pas été étudié.

4.6. Quantification du greffage de l'ADN

A partir des solutions **CuO-Strep** et **Al-Strep** préparées dans les conditions permettant de maximiser les densités de greffage de Streptavidine, nous avons étudié le greffage d'ADN par le groupe biotine sur les nanoparticules fonctionnalisées avec la Streptavidine et avons quantifié l'influence de plusieurs paramètres, tels que la durée d'incubation, la concentration saline et la longueur du *spacer* du brin d'ADN.

4.6.1. Influence de la durée d'incubation

Dans la Figure 88 sont reportés les résultats donnant la densité de greffage des brins d'ADN $ss-A_{30}$ (avec 30 bases T) sur les nanoparticules de CuO (courbe noire) et d'Al (courbe rouge) en fonction de la durée d'incubation, entre 1 h et 30 h.

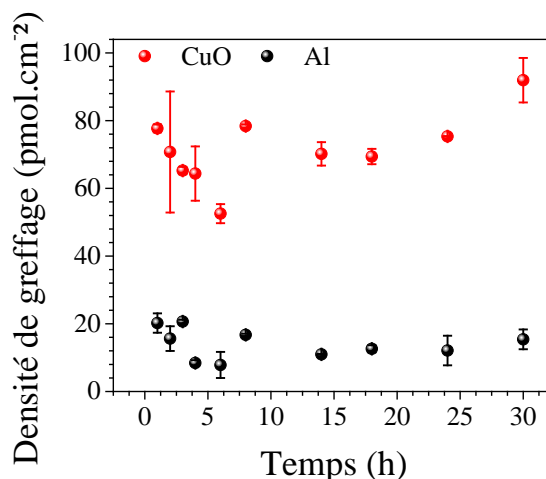


Figure 88 : Densité de greffage de brins d'ADN ($ss-A_{30}$) greffés sur les nanoparticules de CuO (courbe noire) et d'Al (courbe rouge) en fonction de la durée d'incubation. La dispersion est réalisée dans une solution de PBS 0,1X et de Tween 0,05 %. Les barres d'erreurs sont calculées par propagation des incertitudes.

Comme pour la Streptavidine, les densités d'ADN sur les nanoparticules d'Al et de CuO semblent indépendantes de la durée d'incubation, impliquant que les cinétiques de greffage sont rapides, comme attendu pour la formation du complexe biotine-Streptavidine (Srisa-Art *et al.*, 2008). On note cependant une période où la densité de greffage est variable entre 1 h et 6 h d'incubation, puis se stabilise. Nous retiendrons donc une durée d'incubation supérieure à 6 h dans le protocole de fonctionnalisation. **Les densités de greffage obtenues sont respectivement de 15 ± 5 pmol.cm⁻² et 70 ± 10 pmol.cm⁻² pour les nanoparticules d'Al et de CuO.** Les densités de greffage obtenues correspondent aux ordres de grandeurs obtenus sur des nanoparticules d'or entre 15 et 20 pmol.cm⁻² pour des particules de diamètre équivalent, entre 150 et 250 nm et des brins d'ADN de longueur équivalent (Hurst *et al.*, 2006).

4.6.2. Influence de la concentration saline

L'influence de la concentration saline étudiée entre 15 et 150 mM en NaCl sur les densités de greffage de brins d'ADN $ss-A_{30}$ sur les nanoparticules d'Al et de CuO après incubation pendant 8 h est présentée en Figure 89.

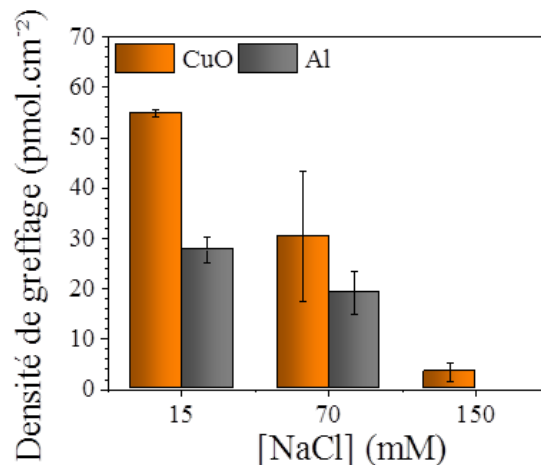


Figure 89 : Densités de greffage de l'ADN (ss-A30) sur nanoparticules d'Al et de CuO en fonction de la concentration saline en NaCl, étudiée à 15, 70 et 150 mM, pour une durée d'incubation de 8 h.

On observe une forte dépendance de la densité de greffage d'ADN avec la concentration en NaCl. Pour les particules de CuO, on note une diminution de 55 ± 1 pmol.cm⁻², puis 30 ± 13 pmol.cm⁻² et enfin 4 ± 2 pmol.cm⁻² pour une concentration en NaCl passant de 15 à 70 puis 150 mM. De façon similaire, la densité de greffage diminue fortement dans le cas des nanoparticules d'Al lorsque la concentration augmente. On mesure en effet une densité de greffage de 28 ± 2 pmol.cm⁻², 20 ± 5 pmol.cm⁻² et 2 ± 1 pmol.cm⁻² pour une concentration en NaCl de 15, 70 et 150 mM, respectivement. Ces résultats sont contradictoires avec ceux publiés pour les nanoparticules d'or. En effet, l'augmentation de la concentration saline s'accompagne généralement d'une augmentation de la densité de greffage, grâce à l'écrantage des charges répulsives des brins d'ADN. La saturation de l'effet de sel intervient généralement autour de 0,7 M dans le cas de nanoparticules d'or (Hurst *et al.*, 2006) ou à 0,2 M pour le cas de surfaces d'or (Castelino *et al.*, 2005).

Dans notre cas, l'effet est inverse : l'augmentation de la force ionique de la solution implique une déstabilisation des nanoparticules en solution, et donc une agrégation non-désirée et irréversible. Cette déstabilisation intervient très tôt, pour de faibles charges ioniques (inférieures à 0,2 M). En conséquence, l'agrégation implique une diminution de la surface disponible pour le greffage de l'ADN, et donc une diminution de la densité de greffage. Nous pouvons donc conclure qu'il est nécessaire de conserver le solvant PBS 0,1 X pour maximiser la densité de greffage de l'ADN. De même que pour la Streptavidine, nous garderons une durée d'incubation de 24 h afin d'obtenir une solution colloïdale de volume supérieure à 10 mL stable et homogène.

Terminons cette étude par une comparaison entre le taux de greffage de l'ADN et de la Streptavidine sur les particules d'Al et de CuO. En effet, en convertissant les densités de greffage en nombre de brins d'ADN par nanoparticule, on obtient environ $40\,000 \pm$

4000 brins de ss-A₃₀ par particule (Al ou CuO). Ce nombre est 30 à 80 fois supérieur à celui du nombre de Streptavidine par nanoparticule de CuO ou d'Al. Bien que la Streptavidine possède quatre sites d'accroche, ce nombre supérieur peut s'expliquer par un recouvrement surfacique relativement faible de la protéine (entre 7 et 15 %). Ainsi, une grande surface reste disponible pour des interactions des brins d'ADN avec les surfaces oxydées des nanoparticules, qui sont très favorables comme vu dans le Chapitre 2 (Calais *et al.*, 2015).

4.6.3. Influence de la longueur du *spacer* sur le taux d'hybridation

Nous étudions dans ce dernier paragraphe la densité de greffage et le taux d'hybridation des ADN greffés à la surface des nanoparticules en fonction de la longueur du *spacer*. Nous considérons alors trois longueurs de *spacer*, composé de 0 (ss-A₀), 15 (ss-A₁₅) ou de 30 (ss-A₃₀) bases Thymines. Les résultats sont synthétisés dans le Tableau 14 ci-dessous, et donnés en nombre de brins d'ADN par nanoparticule (#.NP⁻¹) afin de pouvoir être plus facilement comparables. Le protocole suivant a été suivi :

1. Deux solutions colloïdales de CuO et d'Al sont fonctionnalisées avec des protéines Streptavidine Cy3. Le nombre de Streptavidine par nanoparticule est déterminé par la méthode décrite précédemment.
2. Les solutions de CuO-Strep et Al-Strep résultantes sont fonctionnalisées après lavage avec des brins d'ADN fluorescents de trois longueurs différentes (ss-Af₀, ss-Af₁₅ et ss-Af₃₀). Le nombre de brins d'ADN greffés sur la nanoparticule est déterminé par la méthode précédemment décrite.
3. De nouvelles solutions colloïdales de CuO-ADN et Al-ADN fonctionnalisées avec des brins d'ADN non fluorescents de trois tailles différentes sont préparées (avec ss-B₀, ss-B₁₅ et ss-B₃₀). Ces solutions sont incubées dans une solution dont la concentration en NaCl est de 35 mM, et contenant un brin d'ADN complémentaire fluorescent, ss-Af₁₅. Le nombre de brins d'ADN « greffés » à la surface, ou plutôt hybridés, est déterminé par la méthode précédente.
4. Les solutions résultantes sont rincées, puis chauffées à 80 °C pendant 5 min. Après centrifugation, l'intensité en fluorescence du surnageant est mesurée de façon directe, et le nombre de brins d'ADN « dé-hybridés » est calculé.

Chaque échantillon est répété trois fois, afin de déterminer une moyenne. Les écart-types sont établis en suivant la méthode de calcul de la propagation des incertitudes.

Tableau 14 : Densité de greffage d'ADN à la surface de nanoparticules d'Al et de CuO, et taux d'hybridation des ADN greffés en fonction de la longueur du spacer.

	CuO		
Nombre de Streptavidine par nanoparticule (#.NP ⁻¹)	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^3$		
Longueur du spacer	0	15	30
Nombre de brins d'ADN par nanoparticule (#.NP ⁻¹)	$(2,7 \pm 0,8) \times 10^4$	$(2,3 \pm 0,8) \times 10^4$	$(2,2 \pm 0,9) \times 10^4$
Nombre de brins d'ADN complémentaires hybridés par nanoparticule (#.NP ⁻¹)	$(1,6 \pm 0,8) \times 10^4$	$(1,0 \pm 0,8) \times 10^4$	$(1,7 \pm 0,8) \times 10^4$
Nombres de brins d'ADN complémentaires dé-hybridés par chauffage (#.NP ⁻¹)	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^3$	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^3$	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^3$
Taux d'hybridation (%)	5 ± 1	5 ± 1	5 ± 1
	Al		
Nombre de Streptavidine par nanoparticule (#.NP ⁻¹)	$(4,9 \pm 0,5) \times 10^2$		
Longueur du spacer	0	15	30
Nombre de brins d'ADN par nanoparticule (#.NP ⁻¹)	$(6,3 \pm 0,8) \times 10^3$	$(6,0 \pm 0,9) \times 10^3$	$(6,8 \pm 0,7) \times 10^3$
Nombre de brins d'ADN complémentaires hybridés par nanoparticule (#.NP ⁻¹)	$(3,2 \pm 0,6) \times 10^3$	$(2,3 \pm 0,5) \times 10^3$	$(2,9 \pm 0,2) \times 10^3$
Nombres de brins d'ADN complémentaires dé-hybridés par chauffage (#.NP ⁻¹)	$(5,5 \pm 0,8) \times 10^2$	$(5,5 \pm 0,8) \times 10^2$	$(5,0 \pm 0,8) \times 10^2$
Taux d'hybridation (%)	9 ± 2	9 ± 3	7 ± 2

Tout d'abord, on note que les densités de greffage de la Streptavidine sont conformes à ceux obtenus précédemment pour les deux nanoparticules, avec $(1,2 \pm 0,2) \times 10^3$ et $(4,9 \pm 0,5) \times 10^2$ protéines par nanoparticule après 24 h d'incubation. Ensuite, le nombre de brins d'ADN greffés par nanoparticule évolue peu avec la taille du spacer, pour Al et CuO, avec $\sim 6\,500$ et $12\,000$ ADN.NP⁻¹ respectivement. Encore une fois, ces résultats sont proches de ceux obtenus par Hurst *et al.* avec des nanoparticules d'or de diamètre 250 nm (Hurst *et al.*, 2006).

Dans un deuxième temps, on observe que le nombre de brins d'ADN complémentaires hybridés à la surface de nanoparticules de CuO-ADN et Al-ADN est inférieur aux densités de greffage de brins d'ADN obtenus précédemment, conformément à ce qui est attendu, avec respectivement environ 15 000 et 2 800 brins d'ADN par

nanoparticule. On ne note cependant pas de dépendance nette avec la taille du *spacer*. Ce nombre bien supérieur à la densité de greffage de la Streptavidine suggère qu'un nombre important de brins d'ADN est greffé de façon non-spécifique à la surface des nanoparticules.

Ces solutions ont donc été chauffées afin de provoquer la dé-hybridation des brins d'ADN complémentaires et fluorescents à la surface. Après chauffage, la mesure de l'intensité en fluorescence du surnageant a permis la détermination de la concentration en ADN dé-hybridé de façon directe. **Les résultats sont homogènes pour CuO, avec $1\,200 \pm 200$ brins par nanoparticule, et donc en totale correspondance avec le nombre de Streptavidine greffées par nanoparticule. Les résultats pour l'Al sont à peine moins homogènes, avec 550 ± 80 brins par nanoparticule pour ss-A₀ et ss-A₁₅, et 500 ± 80 pour ss-A₃₀.** Ces nombres sont du même ordre de grandeur que le nombre de Streptavidine greffées en surface (490 ± 50). Notons cependant que le plus faible taux de brins d'ADN hybridés lorsque le *spacer* est composé de 30 bases T peut provenir d'un étalement du brin sur la surface.

En conséquence, le taux d'hybridabilité final est faible dans les deux cas : 5 ± 1 % pour CuO et 9 ± 3 et 7 ± 2 % pour Al. Afin de l'améliorer, il est nécessaire dans un premier temps d'optimiser le greffage de la Streptavidine par préparation chimique de la surface de la nanoparticule. Par exemple, Gang *et al.* proposent de fonctionnaliser la surface des nanoparticules par des groupements COOH afin de former des liaisons amides entre la protéine et la surface (Zhang et al., 2013b). Cette réaction est par ailleurs optimisée par ajout d'EDC (1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl).



5. Conclusion


Ce dernier paragraphe résume les caractéristiques des solutions colloïdales d'Al et de CuO déterminées par les différentes techniques présentées dans ce chapitre, sous forme de deux tableaux pour chacune des solutions colloïdales (voir Tableau 15 pour CuO et Tableau 16 pour Al).

Nanoparticules de CuO

Les paramètres permettant l'obtention d'une solution colloïdale optimisée en terme de diamètre et concentration des nanoparticules sont une étape de sonication de 8 min de 13 mg de CuO dans 25 mL d'une solution aqueuse de PB 10 mM et de Tween 0,05 %.

Tableau 15 : Récapitulatif des caractéristiques des solutions colloïdales de CuO, à chaque étape de la fonctionnalisation.


	Solution colloïdale de CuO
Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	187 ± 5
Potentiel Zeta (mV)	$-46,4 \pm 1,0$
Concentration en NP après 24 h de sédimentation (NP.mL ⁻¹)	$(5,2 \pm 0,2) \times 10^9$
Surface totale (m ² .mL ⁻¹)	$(5,6 \pm 0,4) \times 10^4$
	CuO-Strep
Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	230 ± 14
Potentiel Zeta (mV)	$-44,1 \pm 1,8$
Densité de greffage de Streptavidine (#.NP ⁻¹)	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^3$
Densité de greffage de Streptavidine (pmol.cm ⁻²)	$(7,3 \pm 1,2) \times 10^{11}$
Recouvrement surfacique	10 - 15 %


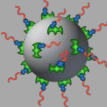
	CuO-ADN court	CuO-ADN intermédiaire	CuO-ADN long
Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	209 ± 18	222 ± 9	238 ± 10
Potentiel Zeta (mV)	-43,0 ± 2,1	-43,7 ± 1,0	-44,1 ± 2,3
Densité de greffage de brins d'ADN (#.NP ⁻¹)	(4,4 ± 0,3) × 10 ⁴	(3,3 ± 0,5) × 10 ⁴	(3,4 ± 0,4) × 10 ⁴
Densité de greffage de brins d'ADN (pmol.cm ²)	(1,2 ± 0,2) × 10 ³	(1,2 ± 0,2) × 10 ³	(1,2 ± 0,2) × 10 ³
Taux d'hybridation (%)	5 ± 1	5 ± 1	5 ± 1

Nanoparticules d'Al

Les paramètres permettant l'obtention d'une solution colloïdale optimisée en terme de diamètre et concentration des nanoparticules sont une étape de sonication de 8 min de 15 mg de *nanopoudres* d'Al dans 25 mL d'une solution aqueuse de PB 10 mM et de Tween 0,05 %.

Tableau 16 : Récapitulatif des caractéristiques des solutions colloïdales de CuO, à chaque étape de la fonctionnalisation.

	Solution colloïdale d'Al
Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	224 ± 7
Potentiel Zeta (mV)	-49,9 ± 1,2
Concentration en NP après 24 h de sédimentation (NP.mL ⁻¹)	(1,2 ± 0,1) × 10 ¹⁰ NP.mL ⁻¹
Surface totale (m ² .mL ⁻¹)	(14,5 ± 0,5) × 10 ⁻³ m ²

	Al-Strep		
Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	239 ± 7		
Potentiel Zeta (mV)	-44,4 ± 2,1		
Densité de greffage de Streptavidine (#.NP ⁻¹)	(4,9 ± 0,5) × 10 ²		
Densité de greffage de Streptavidine (pmol.cm ⁻²)	(5,3 ± 1,3) × 10 ¹¹		
Recouvrement surfacique	7 – 12 %		
	Al-ADN court	Al-ADN intermédiaire	Al-ADN long
Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	249 ± 4	238 ± 13	248 ± 10
Potentiel Zeta (mV)	-43,8 ± 2,4	-43,3 ± 2,1	-44,2 ± 1,5
Densité de greffage de brins d'ADN (#.NP ⁻¹)	(3,9 ± 0,5) × 10 ⁴	(3,3 ± 0,4) × 10 ⁴	(2,7 ± 0,4) × 10 ⁴
Densité de greffage de brins d'ADN (pmol.cm ²)	(5,5 ± 0,8) × 10 ²	(5,5 ± 0,8) × 10 ²	(5,0 ± 0,8) × 10 ²
Taux d'hybridation (%)	9 ± 2	9 ± 3	7 ± 2

Chapitre 4.
Etude de l'Assemblage, de la Structure
et des Propriétés Energétiques de
Nanobiocomposites Al-CuO

Nous rapportons dans ce dernier chapitre l'étude de l'agrégation des solutions colloïdales, préparées et stabilisées suivant les procédés présentés dans le Chapitre 3, et leurs caractérisations structurale et énergétique. Ce chapitre est composé de cinq parties. Une première section donne les notions fondamentales gérant l'agrégation de nanoparticules et résume les principales solutions de la littérature explorées pour déclencher, comprendre et maîtriser les cinétiques d'agrégation de nanoparticules. Dans notre système, l'agrégation devant être contrôlée par l'hybridation des deux brins d'ADN, une seconde partie s'attache à la conception des séquences complémentaires de chacun des brins : deux couples de brins seront choisis, un tiré de la littérature et un optimisé par une méthode algorithmique développée au cours de cette thèse. Les résultats de cette section ont fait l'objet d'une publication dans la référence (Calais et al., 2016)¹⁷. Ensuite, nous étudions l'influence de la concentration saline, de la température et de la séquence des oligonucléotides sur les cinétiques d'agrégation et les structures des agrégats obtenus. Enfin, nous évaluons l'apport de l'assemblage des nanoparticules Al et CuO par ADN sur les propriétés énergétiques des matériaux ainsi élaborés appelés nanobiocomposites en pointant l'influence des structures obtenues sur les performances mesurées.

¹⁷ Calais, T., Baijot, V., Djafari Rouhani, M., Gauchard, D., Chabal, Y. J., Rossi, C., & Esteve, A. (2016). General Strategy for the Design of DNA Coding Sequences Applied to Nanoparticle Assembly. *Langmuir*, 32(37), 9676-9686.

1. Agrégation de nanoparticules : cinétique et structure

L'étude de l'agrégation de nanoparticules en solutions colloïdales est un sujet de recherche majeur trouvant des applications au-delà du domaine des nanoparticules métalliques fonctionnalisées par des ligands ou oligonucléotides. Depuis maintenant trois décennies, de nombreuses équipes observent, caractérisent et cherchent à comprendre et prédire les mécanismes dirigeant l'agrégation des nanoparticules (Family and Landau, 1984). Rappelons d'abord que la stabilité d'une solution colloïdale est généralement décrite par le modèle de Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek, noté DLVO (Verwey et al., 1948), déjà évoquée dans le Chapitre 3 sur le potentiel Zeta. Grâce à la barrière énergétique répulsive de nature Coulombienne (E_b) liée à la charge surfacique de la particule et à la longueur d'écrantage l_s , liée à la charge ionique de la solution, les particules ne s'agrègent pas (Lin *et al.*, 1990). Cette barrière énergétique, appelée également **potentiel d'interaction** (V_T) est la somme des **interactions de Van der Waals** (V_{vdw}) et des **interactions électrostatiques** (V_{Elec}), toutes deux fonction de la distance (x) entre deux nanoparticules (Verwey et al., 1948).

$$V_T(x) = V_{vdw}(x) + V_{Elec}(x) \quad (4.1)$$

Notons que les interactions de Van der Waals sont toujours de nature attractive, mais s'appliquent à de très courtes distances, tandis que les interactions électrostatiques peuvent être répulsives ou attractives si les deux nanoparticules ont un potentiel de surface de même charge ou de charge opposée, respectivement. La courbe de la Figure 90 représente graphiquement la somme des deux contributions.

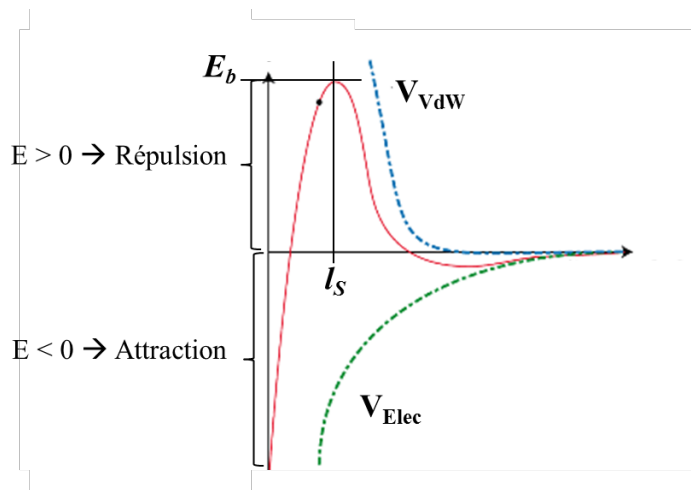


Figure 90 : Visualisation graphique du potentiel d'interaction s'appliquant entre deux nanoparticules, comme étant la somme du potentiel électrostatique (ici interaction répulsive) et du potentiel de Van der Waals, interaction attractive. Représentation de la barrière énergétique E_b et de la longueur d'écran l_s .

La **probabilité d'adhérence** (γ) caractérisant la capacité des particules à s'agréger s'écrit en fonction d' E_b de la façon suivante (Weitz *et al.*, 1985a):

$$\gamma \propto e^{-\frac{E_b}{k_B T}} \quad (4.2)$$

Avec k_B la constante de Boltzman ($1,3806 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$) et T la température de la solution.

Lorsque le colloïde est stable, la **probabilité d'adhérence** γ est nulle, car E_b est largement supérieure à $k_B T$ et l_S vaut $\sim 10 \text{ nm}$ (Weitz *et al.*, 1985a). Afin d'initier l'agrégation, E_b doit devenir bien inférieur à $k_B T$, afin que la **probabilité d'adhérence** γ devienne très grande. Cela est possible soit en réduisant la charge surfacique de la particule par greffage d'un ligand ou l'adsorption d'ions de charge opposée, ou en augmentant la charge ionique de la solution et la compression de la couche de solvation (réduction de l_S).

Ces deux stratégies ont été illustrées dans la littérature sur nanoparticules d'or (Kim *et al.*, 2008; Pamies *et al.*, 2014; Trinh *et al.*, 2009; Weitz *et al.*, 1985a). Weitz *et al.* ont initié l'agrégation de nanoparticules d'or par **adsorption d'un composé organique**, la pyridine, qui s'adsorbe à la surface des particules et écranter les charges négatives répulsives les stabilisant, sans pour autant modifier la charge ionique en solution. Ainsi, E_b diminuant fortement devant $k_B T$, la probabilité d'adhérence augmente fortement et ils observent des cinétiques d'agrégation très rapides et irréversibles. Les auteurs ont également montré que si la quantité de pyridine ajoutée est faible, E_b restant supérieur mais proche de $k_B T$, la vitesse d'agrégation est beaucoup plus lente et dépendante de la concentration en pyridine. Deux régimes d'agrégation à la cinétique différente sont donc mis en évidence : un régime rapide, limité par la seule diffusion des particules et où la masse de l'agrégat évolue linéairement avec le temps, appelé DLCA pour *Diffusion Limited Colloid Aggregation*, et un régime lent, limité par la probabilité d'adhérence des particules liée à la chimie de surface où la masse de l'agrégat évolue exponentiellement avec le temps, appelé RLCA pour *Reaction Limited Colloid Aggregation*.

Pamiès *et al.* ont étudié l'agrégation de nanoparticules d'or par **augmentation de la charge ionique de la solution**, en augmentant la concentration en NaNO_3 (Pamies *et al.*, 2014) et ont déterminés trois régimes différents. Entre 0 et 0,05 M, le régime est lent de type RLCA, entre 0,1 et 1 M, le régime est rapide de type DLCA, et enfin entre 0,07 et 0,1 M, le régime est intermédiaire et composé d'un mélange des deux régimes.

Enfin, Kim *et al.* ont étudié l'agrégation de nanoparticules d'or par ajout d'un agent flocculant, le benzyle mercaptan, **agissant doublement sur la charge surfacique des particules et la charge ionique de la solution** (Kim *et al.*, 2005, 2008). Ils ont évalué expérimentalement et théoriquement l'influence de l'agent flocculant sur E_b , qui diminue dans les premiers temps de l'agrégation, puis augmente lorsque la taille des agrégats

atteint une dimension critique, stoppant l'agrégation. Les cinétiques obtenues dans ces travaux sont présentées en Figure 91, où l'on observe la dépendance de la cinétique d'agrégation en fonction de la concentration en benzyle mercaptant.

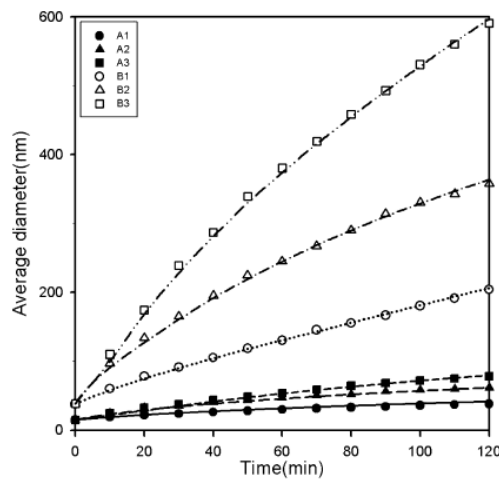


Figure 91 : Evolution du diamètre hydrodynamique moyen de nanoparticules d'or en solution au cours du temps en fonction de la concentration de benzyle mercaptan ajouté. Les lignes pointillées correspondent au modèle théorique (Kim *et al.*, 2008).

D'autres auteurs ont développé expérimentalement et théoriquement d'autres stratégies d'agrégation par la fonctionnalisation de nanoparticules et étudié l'influence de cette fonctionnalisation sur les cinétiques d'agrégation. Parmi ces stratégies, on trouve l'agrégation de nanoparticules d'or fonctionnalisées par un groupe biotine dont l'agrégation est assurée par l'ajout de Streptavidine (Connolly *et al.*, 2001). Souza *et al.* ont étudié la structure d'agrégats de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des brins d'ADN en fonction de la longueur du brin et de la concentration en oligonucléotide et ont montré une influence de ces deux paramètres sur la densité des agrégats obtenus (Souza and Miller, 2001). Plus récemment, Ananth *et al.* ont utilisé la théorie DLVO pour calculer l'énergie barrière de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des brins d'ADN monobases (à partir de bases A et bases C), en fonction du temps et du pH afin d'évaluer la stabilité des solutions colloïdales (Ananth *et al.*, 2013). Ils ont ainsi montré qu'après un premier temps d'instabilité, les particules de 50 nm fonctionnalisées avec des brins composés uniquement de bases C s'agrégeaient en agrégat de 260 nm, plus stables, conformément à une énergie barrière calculée plus importante, comme illustré en Figure 92.

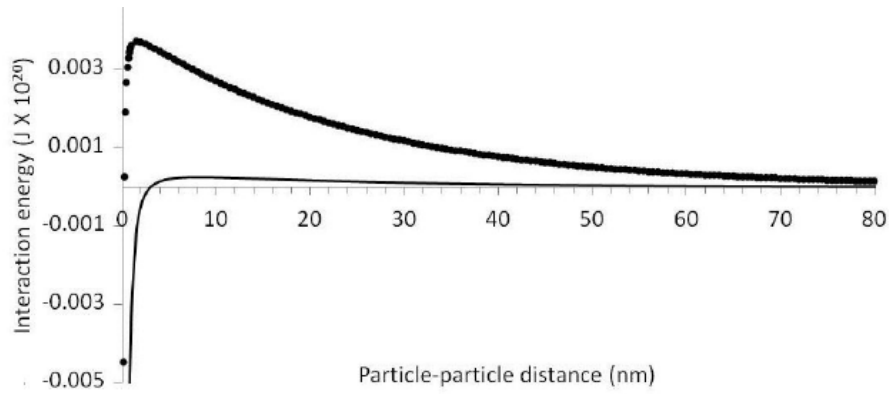


Figure 92 : Energie d'interaction entre deux nanoparticules en fonction de la distance de séparation et du temps. La courbe pleine est obtenue juste après synthèse des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec les brins d'ADN composés de bases C, tandis que la courbe discontinue est obtenue après douze jours de vieillissement.

Dans ces travaux étudiant la cinétique d'agrégation de nanoparticules, la DLS est la technique la plus utilisée pour mesurer l'évolution du rayon hydrodynamique R_H des particules en solution colloïdale en fonction du temps suivant une loi puissance, caractérisée par un exposant α (Meakin *et al.*, 1985; Trinh *et al.*, 2009; Weitz *et al.*, 1984, 1985b) :

$$R_H(t) \propto R_H(0)^\alpha \quad (4.4)$$

Avec :

$$\alpha \equiv \frac{z}{d_f} \quad (4.4a)$$

Et :

$$z = \frac{1}{1 - \lambda} \quad (4.4b)$$

L'indice d_f étant la « dimension fractale de l'agrégat obtenu, caractérisant sa compacité et avec z caractérisant les mécanismes d'agrégation à travers le paramètre d'homogénéité λ (Ball *et al.*, 1987; Broide and Cohen, 1992) :

- Lorsque $\lambda = 0$, le régime est limité par la diffusion des particules.
- Lorsque $\lambda = 1$, le régime est limité par la probabilité d'adhérence des particules.
- Lorsque $z > 1$, les agrégats les plus gros s'agrègent le plus vite, entraînant une augmentation moyenne de la masse des agrégats plus importante que lors d'un régime limité par la diffusion (Trinh *et al.*, 2009).

- Lorsque $z < 1$, la probabilité d'adhérence des petits agrégats entre eux est plus grande que la probabilité d'adhérence des gros agrégats, impliquant une augmentation de la masse moyenne plus lente.

La compacité de l'agrégat obtenu, caractérisée par le coefficient d_f , est très dépendante du régime d'agrégation. La dimension fractale caractéristique des structures obtenues en DLCA est $\sim 1,8$. Les agrégats obtenus en DLCA apparaissent fortement dendritique et peu denses (Weitz *et al.*, 1985b), alors que ceux obtenus en RLCA sont plus compacts, avec une dimension fractale $\sim 2,1$.

Enfin, nous pouvons rajouter que le régime DLCA est qualifié « d'universel », car indépendant de la nature chimique des particules (*cf.* Figure 93) (Klein and Meakin, 1989). Les images TEM de la Figure 93 ci-dessous illustrent l'universalité de la structure fractale des colloïdes obtenus en fonction du régime d'agrégation.

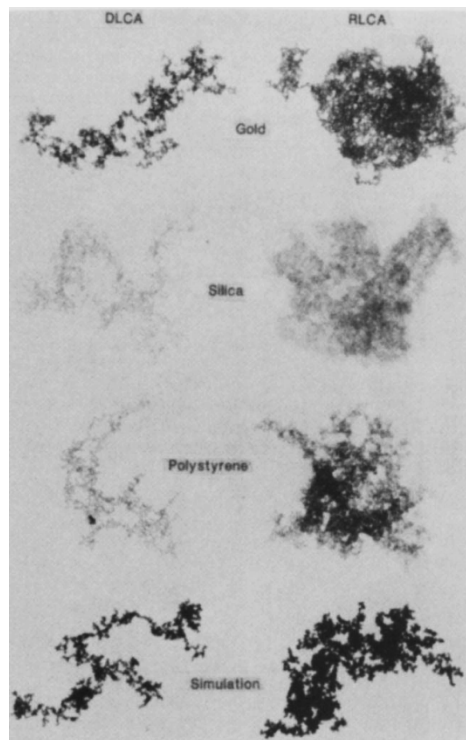


Figure 93 : Images TEM d'agrégats de nanoparticules d'or, d'oxyde de silicium et de polystyrène obtenus en régime DLCA (gauche) et RLCA (droite), ainsi que le résultat de simulations (images du bas). On peut noter la similarité des structures obtenues ainsi que la différence morphologique des agrégats suivant le régime d'agrégation : ouverts lorsque le régime est limité par la diffusion, et plus denses lorsque le régime est limité par la réaction.

A partir de ces quelques exemples tirés de la littérature, nous percevons la complexité des mécanismes qui régissent l'agrégation de nanoparticules, dépendant fortement de la nature de la solution, de la chimie de surface des particules, de la température... Les expériences, supportées par des modèles permettant d'avoir des valeurs de référence de force ionique et d'exposants α pour rationaliser les cinétiques d'agrégation obtenues dans

notre cas. Nous retiendrons donc que les cinétiques d'agrégation peuvent être caractérisées par deux régimes d'agrégation de nanoparticules :

1. **Régime Limité par la Diffusion**, notée DLCA. La cinétique d'agrégation est, dans ce cas, directement dépendante du taux de collision des particules en solution, et donc de leur diffusion. La distribution en masse des agrégats au cours du temps augmente de façon homogène et linéaire.
2. **Régime Limité par la Réaction**, notée RLCA. Ici, la cinétique d'agrégation dépend de la probabilité d'adhérence entre deux nanoparticules. Elle est donc beaucoup plus lente que dans le premier cas et directement dépendante de la force ionique de la solution et de la charge surfacique des particules.

Nous retiendrons également que la compacité et la dimension fractale de l'agrégat obtenu dépend du régime d'agrégation : $\sim 1,8$ en DLCA et $\sim 2,1$ en RLCA.

En transposant ces observations à notre cas d'étude, *i.e.* les colloïdes d'Al et de CuO, nous proposons d'initier et contrôler l'agrégation des nanoparticules en jouant sur la charge ionique de la solution, par ajout de NaCl, puisque nous ne pouvons *a priori* pas greffer une autre espèce sur la surface des nanoparticules, qui pourrait entraîner une dégradation de la fonctionnalité de l'ADN. A la lumière de l'état de l'art, il apparaît donc nécessaire de se placer **dans un régime RLCA**, où les cinétiques d'agrégation sont plus lentes et les agrégats obtenus plus compacts. En effet, dans ce régime d'agrégation, l'hybridation des brins d'ADN est favorisée et dirige l'assemblage, alors qu'en régime DLCA, l'agrégation des particules est indépendante de la fonctionnalisation ADN.

Avant d'étudier les paramètres expérimentaux (concentration ionique et température) favorables à un régime RLCA, nous proposons dans la prochaine section de déterminer la séquence du brin d'ADN optimale d'un point de vue thermodynamique et topologique pour favoriser une hybridation complète, rapide et stable des deux nanoparticules.

2. Conception des brins d'ADN

Nous avons vu dans l'état de l'art précédent et le Chapitre 1 que de nombreux paramètres (longueur et nature du *spacer*, concentration en NaCl...) pouvaient impacter l'assemblage et la cristallisation de l'agrégat. Cependant, la question de la définition de la séquence a été peu abordée, et de nombreuses stratégies d'hybridation impliquant des brins à la séquence variable en taille et dans le code ADN ont été étudiées (*cf.* Chapitre 1). C'est pourquoi nous proposons dans cette section de définir la séquence que l'on utilisera pour la réalisation de nanobiocomposites. Ces résultats ont été publiés dans l'article (Calais *et al.*, 2016).

2.1. Choix d'une séquence d'oligonucléotide de la littérature

Nous nous sommes d'abord appuyés sur les travaux d'Oleg Gang, qui font référence dans le domaine, et avons sélectionné les séquences proposées dans l'article (Zhang *et al.*, 2013b), présentant une méthode générique pour la fonctionnalisation de différents types de nanoparticules (or, palladium, oxyde de fer ou *quantum dots*). Le brin d'ADN est constitué d'un *spacer* de 15 bases T répétées de façon à éloigner la partie « codée » destinée à s'hybrider de la surface de la particule, elle-même composée de 15 bases. De plus, suivant le type de greffage choisi, l'extrémité du brin d'ADN peut être modifiée par une fonction biotine ou thiol. Les séquences, tirées de (Zhang *et al.*, 2013b) et notées **ssA-Lit** et **ssB-Lit**, sont reportées dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Séquences des brins d'ADN tirées de (Zhang *et al.*, 2013b).

Nom	Modification (5')	Séquence (5' à 3')
ssA-Lit	Biotine	(T) ₁₅ -AAT-AGG-TGA-AGG-TTA
ssB-Lit	Biotine	(T) ₁₅ -TAA-CCT-TCA-CCT-ATT

Cependant, une analyse précise de la séquence nous a permis de remarquer qu'une hybridation partielle entre deux brins complémentaires était possible à cause de la répétition des quatre bases AGGT deux fois dans la séquence (AAT-AGG-TGA-AGG-TTA). De plus, un repliement du brin sur lui-même est possible lorsque le *spacer* est composé de bases T, la séquence devenant ((T)₁₂-TTT-AAT-AGG-TGA-AGG-TTA). Ce possible repliement est critique car peut empêcher toute hybridation avec le brin complémentaire. En outre, ce repliement peut se traduire par des interactions « brin à brin » lorsqu'une quantité importante de brins à la séquence identique est en solution. Ces interactions parasites sont schématisées en Figure 94.

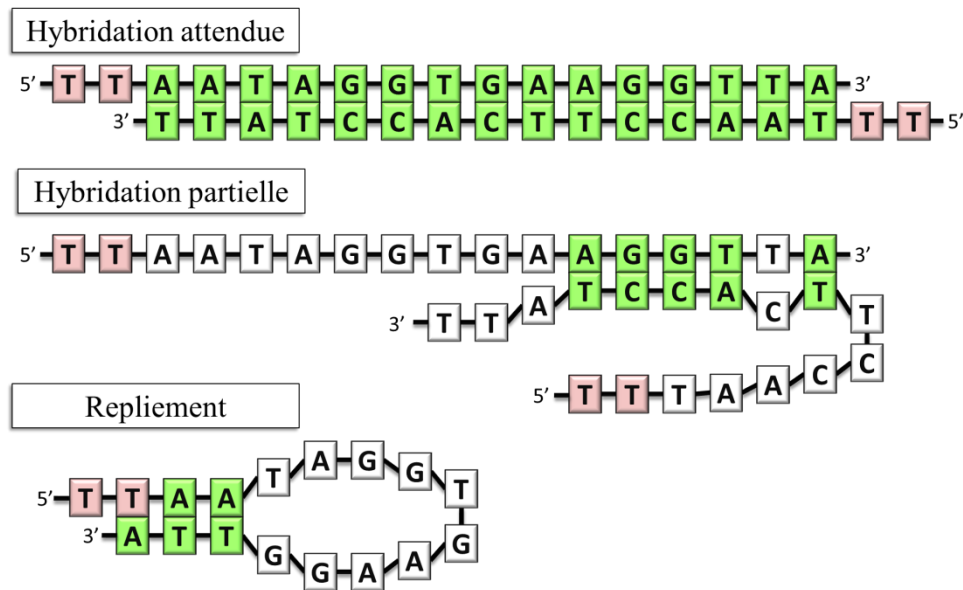


Figure 94 : Schéma représentant les interactions parasites possibles du brin d'ADN à la séquence issue de (Zhang et al., 2013b). (a) hybridation attendue, sur la totalité du brin d'ADN, (b) hybridation partielle avec un brin complémentaire, (c) repliement du brin sur lui-même ou, a fortiori, avec un brin identique. Les doubles bases vertes indiquent les bases hybridées, les bases rouges indiquent les bases intégrant le spacer, et les bases blanches indiquent les bases neutres vis-à-vis de l'hybridation.

Nous pensons que ces interactions parasites peuvent provoquer des perturbations dans le processus d'agrégation des particules par hybridation des brins complémentaires. Compte tenu de la littérature peu développée sur la génération d'une séquence de brins d'ADN optimisée d'une longueur proche de celle nécessaire ici, nous avons élaboré un algorithme permettant de définir une séquence en supprimant les interactions non-spécifiques.

2.2. Optimisation de la séquence de l'oligonucléotide

2.2.1. Définition du problème et de la démarche suivie

Nous cherchons à définir une séquence d'oligonucléotide courte permettant l'auto-assemblage de nanoparticules par l'hybridation de brins d'ADN complémentaires d'une longueur variant entre 4 et 40 bases, tout en supprimant des interactions non-désirables, telles que le repliement d'un brin sur lui-même ou un appariement de deux brins non-désiré.

Notons tout d'abord que le nombre possible de séquences d'ADN d'une longueur de N bases est de 4^N . Ce nombre atteint ainsi rapidement des valeurs incalculables par ordinateur dès lors que N dépasse 5 bases. Il n'apparaît donc pas judicieux de construire toutes les séquences possibles, mais plutôt de construire la séquence en prenant en compte les contraintes du système afin de diminuer le nombre de séquences possibles. Le nombre

de contraintes influe donc directement sur la longueur et le nombre de séquences, qu'elles soient d'ordre thermodynamique, cinétique ou topologique. Nous proposons donc de générer toutes les séquences possibles, base à base, par une approche *bottom-up*, où à chaque étape, la base ajoutée (A, T, G ou C) n'est retenue que si la séquence résultante répond aux contraintes que nous devons fixer. Nous avons considéré principalement quatre types de contraintes, schématisées en Figure 95. Les oligonucléotides sont représentés par les barres : les barres rouges correspondent au *spacer* (par exemple une série de bases T), une partie qui n'est pas destinée à interagir, les barres bleues correspondent aux brins d'ADN dont la séquence est déterminée par l'algorithme, et les barres vertes correspondent aux brins dont la séquence est le parfait complémentaire de celle calculée par l'algorithme.

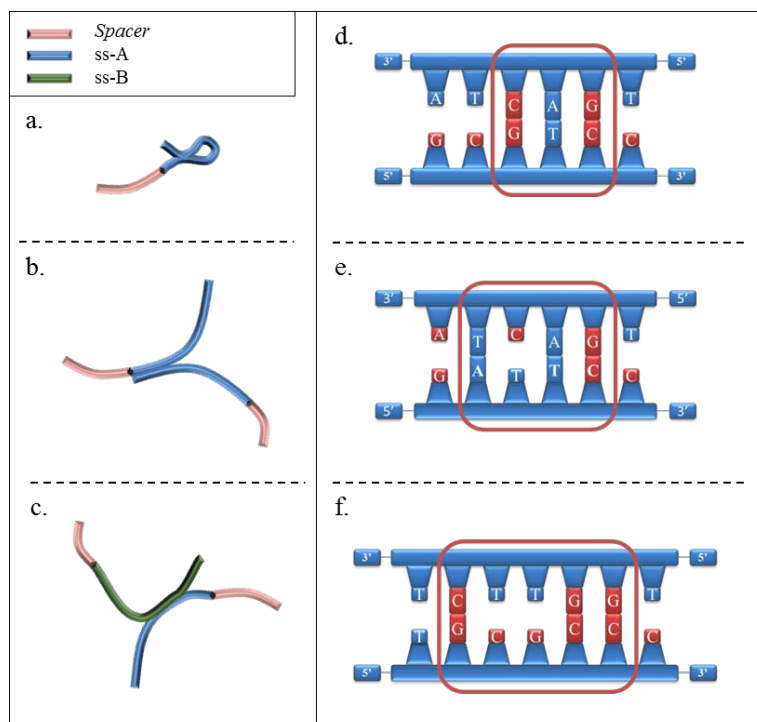


Figure 95 : Illustration des contraintes utilisées dans l'algorithme. (a) Le repliement de l'oligonucléotide sur lui-même n'est pas possible. (b) Les interactions partielles ou totales entre deux brins d'ADN identiques est évité. (c) L'hybridation partielle entre deux brins complémentaires n'est pas possible. (d-f) Conditions locales d'hybridation entre deux brins complémentaires. (d) Définition du nombre minimum de bases adjacentes nécessaire pour une hybridation. (e,f) Prise en compte d'une ou deux bases non-complémentaires entre les bases complémentaires dans l'hybridation.

Tout d'abord, le brin d'ADN généré ne doit pas se replier sur lui-même, afin de conserver sa spécificité biologique (Figure 95 (a)). En effet, une complémentarité courte sur une partie de la séquence (trois ou quatre bases) peut potentiellement créer ce repliement. La boucle de repliement est un paramètre d'entrée de l'algorithme et est initialement fixée à 4 bases. Ensuite, il est nécessaire que le brin ne possède aucune complémentarité, totale ou partielle, avec un brin à la séquence identique (Figure 95 (b)).

Dans la perspective de l'utilisation du brin d'ADN en solution, il est en effet inévitable de retrouver de nombreux brins identiques capables d'interagir les uns avec les autres. Enfin, il est primordial que le brin considéré s'hybride sur la totalité de la partie complémentaire de l'autre brin, de façon à mieux contrôler l'hybridation (Figure 95 (c)). Notons par ailleurs que la contrainte (b) est plus restrictive que la contrainte (a), car elle ne nécessite pas de boucle pour l'hybridation : l'application de la contrainte (b) inclut donc la contrainte (a).

Le quatrième type de contraintes repose sur la définition des critères d'hybridation (Figure 95 (d-f)). L'utilisateur choisit d'abord de considérer le nombre minimum de bases adjacentes générant une hybridation (noté NM) (d), en ayant la possibilité d'inclure une (e) ou deux bases (f) non-complémentaires entre ces bases adjacentes. La valeur de NM est fixée par défaut à 3, conformément aux énergies de Gibbs reportées dans la littérature (John SantaLucia and Hicks, 2004).

De cette façon, le nombre de possibilités est suffisamment réduit pour un calcul par ordinateur. Une représentation schématique de la génération de la séquence « base à base » dite « en forme d'arbre » est donnée en Figure 96.

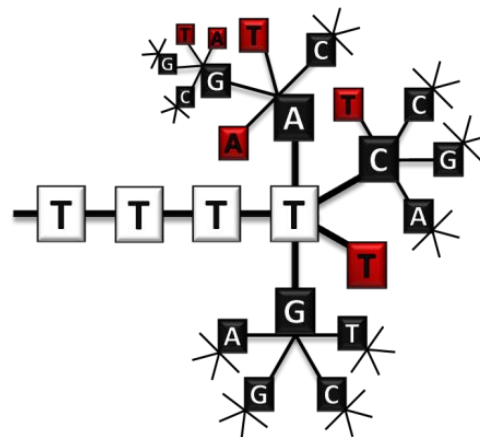


Figure 96 : Exemple schématique de la construction base par base de l'algorithme. A chaque étape, l'ajout des 4 bases A, T, G et C est réalisée (les bases en noir sur le schéma). La séquence est ensuite évaluée par rapport aux contraintes choisies, et les séquences dont la dernière base ajoutée ne convient pas (en rouge sur le schéma) sont arrêtées et récupérées.

Notons que cette approche ne peut pas prendre en compte des contraintes d'ordre thermodynamiques qui nécessitent une évaluation *a posteriori* de la séquence construite. Grâce à la méthode de Santa Lucia (John SantaLucia and Hicks, 2004), les paramètres telles que la température de fusion ou l'énergie d'hybridation de deux brins complémentaires sont calculées en fixant la concentration en NaCl à 1 mM et 1 M respectivement (John SantaLucia and Hicks, 2004). Les séquences sont ensuite classées suivant la température de fusion, qui est facilement interprétable en termes de stabilité des brins hybridés pour l'expérimentateur. Ce choix propre à notre utilisation peut naturellement être modifié suivant l'application visée.

Enfin, notons que pour notre application, nous avons considéré l'existence d'un *spacer* constitué de plusieurs bases T répétées conformément à la séquence d'Oleg Gang (représentées en rouge dans la Figure 95 (a-c)), pris en compte dans la construction de la séquence par l'algorithme. Le détail du fonctionnement de l'algorithme, codé en C, est disponible dans le *Supplementary File* de la référence (Calais et al., 2016).

2.2.2. Génération de séquences optimisées

Le nombre de séquences étant dépendant des contraintes appliquées, nous avons dans un premier temps fixé le nombre de bases adjacentes permettant une hybridation à deux bases, et avons fixé la longueur du *spacer* à sept bases T¹⁸. Le nombre de séquences générées en fonction de la longueur de la séquence et des contraintes appliquées est présenté dans la Figure 97. La courbe rouge correspond à la prise en compte des contraintes (b, c) (hybridation partielle entre deux brins identiques ou complémentaires), tandis que la courbe bleue correspond à la prise en compte des contraintes (a, c) (repliement du brin sur lui-même et hybridation partielle entre deux brins complémentaires). Pour chaque longueur de séquence, la température de fusion du brin d'ADN est calculée par la méthode de Santa Lucia avec une concentration en ADN et en NaCl respectivement fixées à 1 mM et 1 M.

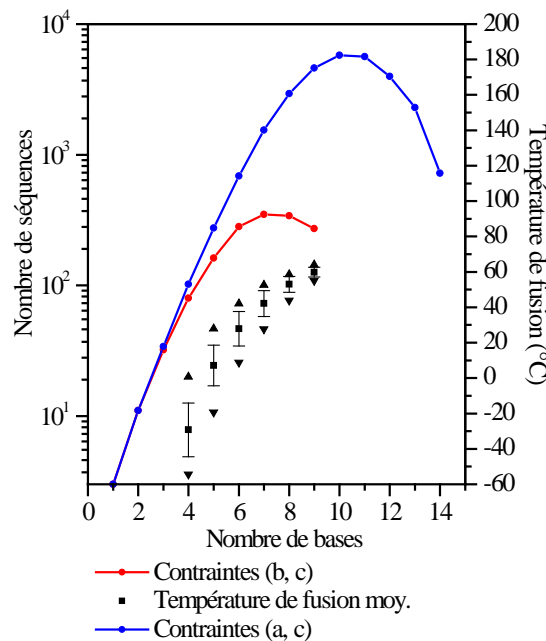


Figure 97 : Nombre de séquences calculées en fonction du nombre de bases de la séquence en considérant l'hybridation possible dès deux bases adjacentes et les contraintes (b, c) pour la courbe rouge, et les contraintes (a, c) pour la courbe bleue. La température de fusion moyenne de l'ensemble des séquences calculées pour chaque longueur est donnée avec son écart type en noir et est encadrée par les valeurs minimales et maximales.

¹⁸ Ici, la longueur du *spacer* n'a pas d'impact sur la séquence générée. Ainsi, les séquences générées sont équivalentes quelle que soit la longueur du *spacer*, qu'il soit composé de 7 ou 15 bases.

Dans le cas très restrictif où l'hybridation partielle entre deux mêmes brins ou entre deux brins complémentaires est interdite (courbe rouge), le nombre maximal de séquences est de 350, atteint rapidement pour une longueur de 7 bases, puis diminue rapidement à 0 dès que la séquence atteint 10 bases. Ainsi, seules 2 % des 16 384 (soit 4^7) séquences possibles avec sept bases respectent ce niveau de contraintes. On note par ailleurs une température de fusion relativement élevée compte tenu de la longueur des séquences, de 42 °C à 60 °C pour une longueur comprise entre 7 et 9 bases, témoignant d'une bonne stabilité des brins hybridés à température ambiante.

En relaxant les contraintes, *i.e.* en considérant uniquement le repliement du brin sur lui-même (courbe bleue), on observe que le nombre maximal de séquence est augmenté d'un facteur 10, avec 5 766 possibilités obtenues pour une longueur de 10 bases. Le nombre de possibilités diminue également rapidement au-delà de cette longueur pour atteindre 0 pour une longueur de 15 bases.

La relaxation des contraintes a donc permis l'obtention de longueurs du brin davantage conformes à ce qui est utilisé dans la littérature (entre 7 et 40 bases). Cependant, l'utilisation de la contrainte (a) impose l'utilisation de brins d'ADN isolés, ce qui est rarement le cas dans les nanotechnologies ADN pour l'auto-assemblage de particules. De plus, les températures de fusion restent faibles, car la longueur du brin d'ADN reste trop courte. Il est donc nécessaire d'alléger encore les contraintes, afin de disposer d'une plus large gamme de longueurs de brins et de températures.

Nous relaxons donc les contraintes en augmentant le nombre minimal de bases adjacentes permettant l'hybridation à trois, en retenant les contraintes (b-e), *i.e.* l'interdiction d'avoir des hybridations partielles entre brins identiques ou brins complémentaires et inclusion de bases non-complémentaires entre les trois bases adjacentes. On trouve alors un nombre maximal de séquences possibles de 31 018 possibilités, atteint pour une longueur de 14 bases. Ce nombre décroît ensuite rapidement pour atteindre 0 au-delà de 29 bases (*cf.* courbe rouge de la Figure 98). Un brin de 29 bases offre une longueur adapté au besoin technologique d'assemblage de nanoparticules. Notons que les températures moyennes calculées sur l'ensemble des séquences croissent très rapidement de 5 °C à 75 °C pour une longueur de 5 bases à 15 bases, avant de se stabiliser à 90 °C (*cf.* courbe noire de la Figure 98). Nous pouvons considérer que les températures de fusion obtenues au-delà de 10 bases, donc supérieures à 75 °C, sont suffisamment élevées pour autoriser un usage technologique des brins d'ADN ainsi conçus.

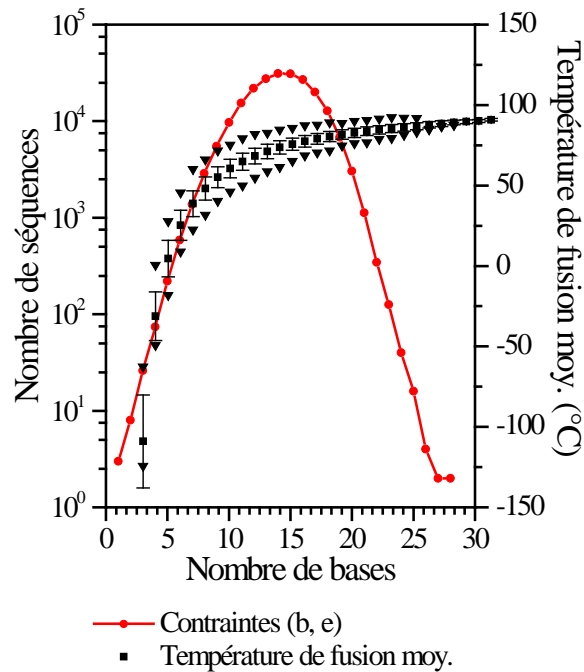


Figure 98 : Nombre de séquences obtenues en fonction du nombre de bases en considérant trois bases adjacentes nécessaires à l'hybridation et les contraintes (b, e) avec inclusion de bases non-complémentaires entre les trois bases adjacentes (courbe rouge).

Dans le Tableau 18 sont répertoriés les séquences générées par l'algorithme possédant la température de fusion la plus élevée. Pour ne pas alourdir le manuscrit, seules quelques séquences sont répertoriées dans le Tableau 18 ci-dessous, le tableau complet étant donné en *Annexe 10*.

Tableau 18 : Liste de séquences optimisées de longueur de 4 à 31 bases obtenues après tri des séquences en fonction de leur température de fusion. Ces séquences prennent en compte un spacer constitué de 7 bases T.

Nombre de bases	Séquence	Température de fusion (°C)
4	GCGA	1
5	CCG CA	28
6	CCG CAC	42
...
14	ACG GCA CCT CGC TT	85
15	AGC GGG TGC CTT GGA	86
...
27	CCT AAT GTA TCG CAG AGT TGA CGG GCT	87
28	GGT AAT CTA TGC GAC ACT TCA GCC CGT T	87

Rappelons que ces séquences ont été conçues en considérant un *spacer* de 7 bases T pour chaque brin. Ce dernier peut être remplacé par sept bases A, ou supprimé et remplacé par un *spacer* organique comme le Poly-Ethylène Glycol (PEG), ce qui modifie les séquences. Le résultat des séquences modifiées est disponible dans le *Supplementary File* de la référence (Calais *et al.*, 2016).

2.3. Synthèse

Parmi la liste de séquences reportées dans le tableau 2, nous sélectionnons la séquence d'une longueur de 15 bases en considérant un *spacer* de 15 bases T pour être comparable avec les séquences d'Oleg Gang. Ces séquences, appelées **ssA-Opt** et **ssB-Opt** ou « **brins optimisés** », sont répertoriées dans le Tableau 19 avec les séquences tirées de la littérature (Zhang *et al.*, 2013b), appelées **ssA-Lit** et **ssB-Lit** ou « **brins non-optimisés** » dans le reste de l'étude. Les valeurs théoriques de la température de fusion des deux brins sont également données (pour une concentration en ADN de 1 mM et une concentration en NaCl à 1 M). On peut par ailleurs noter une valeur théorique supérieure de 15 °C lorsque le brin d'ADN est optimisé par le logiciel, démontrant le gain de stabilité à température ambiante des **brins optimisés**.

Tableau 19 : Séquences des brins d'ADN utilisés pour l'auto-assemblage de nanoparticules d'Al et de CuO et températures de fusion théoriques correspondantes, calculées pour une concentration en ADN et en NaCl de 1 mM et 1 M respectivement.

Nom	Modification (5')	Séquence (5' à 3')	Température de fusion théorique (°C)
ssA-Opt	Biotine	(T) ₁₅ -AGC-GGG-TGC-CTT-GGA	85,8 °C
ssB-Opt	Biotine	(T) ₁₅ -TCC-AAG-GCA-CCC-GCT	
ssA-Lit	Biotine	(T) ₁₅ -AAT-AGG-TGA-AGG-TTA	69,8 °C
ssB-Lit	Biotine	(T) ₁₅ -TAA-CCT-TCA-CCT-ATT	

3. Synthèse de nanobiocomposites Al-CuO : Protocole d'assemblage

L'auto-assemblage de nanoparticules d'Al et de CuO pour former le nanobiocomposite énergétique est obtenu en mélangeant les deux solutions colloïdales après fonctionnalisation des nanoparticules par les brins d'ADN complémentaires précédemment choisis (*cf.* Tableau 19). Avant tout, nous définissons ici le **rapport stœchiométrique Φ** décrivant la proportion relative des deux types de nanoparticules par l'équation ci-dessous :

$$\Phi = \frac{N_{Al}}{N_{CuO}} \quad (4.6)$$

Avec N_{Al} et N_{CuO} le nombre de nanoparticules d'Al et de CuO présents dans le mélange de solutions colloïdales.

Sauf mention contraire, les mélanges sont effectués en **proportion stœchiométrique**, *i.e.* le **rapport stœchiométrique Φ** est égal à 1, compte tenu du diamètre hydrodynamique moyen en solution très proche pour les deux particules.

Ainsi, 4,5 mL de solutions colloïdales de nanoparticules d'Al sont mélangées à 9,5 mL de solution colloïdale de CuO. Quelques dizaines de microlitres de solution mère NaCl de concentration 2 M sont ensuite ajoutés à la solution pour initier l'agrégation. Sauf mention contraire, la concentration en NaCl est fixée à 35 mM. La concentration en nanoparticules d'Al ou de CuO est alors évaluée à $3,8 \times 10^9$ NP.mL⁻¹. Les cinétiques d'agrégation sont suivies par DLS dont la méthode a été décrite dans le chapitre précédent.

Afin de valider que l'agrégation soit bien contrôlée par l'hybridation des deux brins d'ADN complémentaires greffés à la surface des nanoparticules d'Al et de CuO, nous avons comparé l'évolution du diamètre hydrodynamique d'une solution colloïdale de nanoparticules non-fonctionnalisées avec celle de nanoparticules fonctionnalisées par des brins d'ADN complémentaires optimisés. De plus, chaque solution colloïdale a été soumise à un cycle de température caractérisé par une alternance de périodes à température ambiante (25 °C) avec des périodes de chauffage (80 °C) de 30 min, pour valider la réversibilité de l'hybridation des brins d'ADN. La concentration en NaCl est dans les deux cas fixée à 35 mM. Les résultats sont présentés dans la Figure 99.

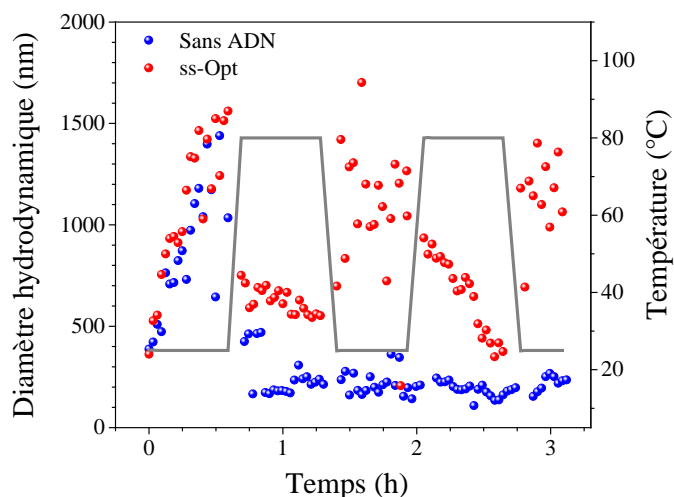


Figure 99 : Evolution du diamètre hydrodynamique moyen d'une solution colloïdale de nanoparticules d'Al et de CuO non-fonctionnalisées (courbe bleue) et fonctionnalisées avec des brins d'ADN complémentaires (courbe rouge) pour une concentration en NaCl de 35 mM en fonction de la température (courbe grise).

On observe de façon nette les agrégations à température ambiante et désagréations à 80 °C successives des nanoparticules d'Al et de CuO fonctionnalisées avec des brins d'ADN complémentaires (courbe rouge). Le diamètre hydrodynamique passe de 250 nm à 1 500 nm lors des premières 30 min à température ambiante, puis décroît de 800 à 500 nm lors de la première montée en température. Le diamètre hydrodynamique augmente à nouveau lors du refroidissement à température ambiante, passant de 500 à 1 300 nm, puis diminue à 400 nm à la fin du deuxième palier à 80 °C.

Au contraire, on n'observe pas d'agrégation contrôlée sur les solutions d'Al et de CuO non-fonctionnalisées (courbe bleue). On note cependant, aux premiers instants, une augmentation du diamètre hydrodynamique rapide, similaire à la courbe rouge (diamètre passant de 250 à 1 500 nm) avant de chuter quelques minutes avant le chauffage pour atteindre une valeur de 200 nm après 1 h d'expérience. Puis le diamètre hydrodynamique reste constant quelle que soit la température. Ceci démontre que le phénomène d'agrégation observé lors de la première demi-heure repose sur des interactions irréversibles non-spécifiques.

Cette première expérience démontre bien que l'agrégation des nanoparticules d'Al et de CuO est régie par l'hybridation des brins d'ADN greffés à leur surface, mais nous voyons aussi qu'il existe des phénomènes d'agrégation non-spécifiques et non-réversibles dans nos conditions expérimentales. La section qui suit a pour objectif d'analyser plus en détail l'influence des paramètres expérimentaux sur l'assemblage et d'identifier les interactions à l'origine de l'agrégation.

4. Etude des cinétiques d'agrégation de nanoparticules d'Al et de CuO : Influence des conditions expérimentales et des brins d'ADN

4.1. Influence de la concentration en NaCl

Nous avons vu en début de chapitre que la charge ionique de la solution est un paramètre clé dans l'agrégation des particules influençant fortement les régimes d'agrégation. Dans notre cas, les nanoparticules sont fortement chargées négativement à cause de la répulsion électrostatique due au potentiel négatif renforcé par le greffage des brins d'ADN et rendant la solution stable (potentiels Zeta inférieurs à 45 mV dans les deux cas (*cf.* Chapitre 3)). Il est alors nécessaire d'écranter les charges négatives pour initier l'agrégation. Nous avons choisi d'augmenter progressivement la force ionique de la solution par ajout de sel NaCl. Conformément à la majorité des publications, la concentration saline sera réglée entre 15,5 mM (état initial de la solution colloïdale à base de PBS 0,1 X) et 250 mM, tout en maintenant constant la concentration en nanoparticules.

L'évolution du diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules en solution, fonctionnalisées par des **brins d'ADN non-optimisés (ss-Lit)** ou **optimisés (ss-Opt)** est suivie au cours du temps par DLS et les courbes obtenues en fonction de la concentration saline sont présentées en Figure 100.

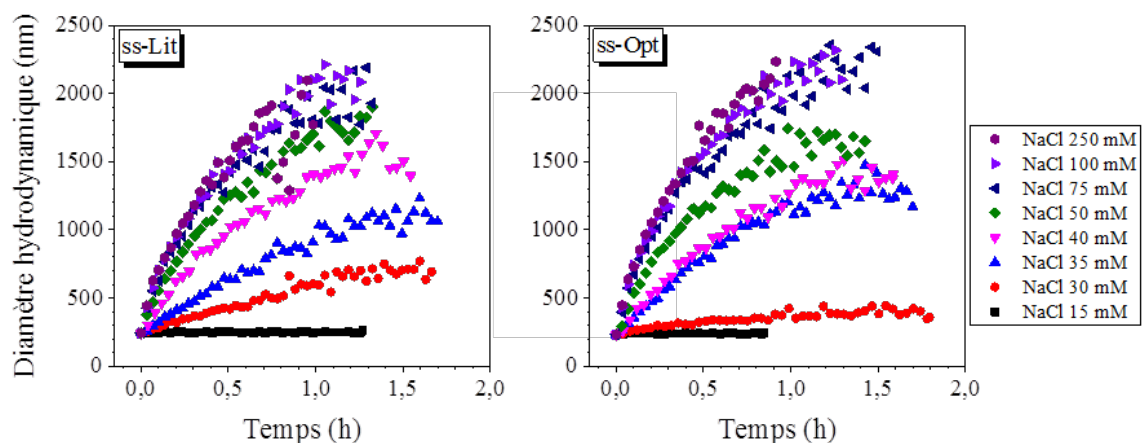


Figure 100 : Evolution du diamètre hydrodynamique moyen des agrégats Al-CuO au cours du temps, en fonction de la concentration en NaCl.

On distingue de façon nette sur ces courbes les deux régimes présentées en section 1. du chapitre :

1. **Agrégation de Colloïdes Limitée par Réaction (RLCA)** pour une concentration en NaCl variant de 30 à 50 mM.
2. **Agrégation de Colloïdes Limitée par Diffusion (DLCA)** pour une concentration en NaCl supérieure à 75 mM.

Dans le régime RLCA, les cinétiques sont fortement dépendantes de la concentration en sel, de façon homogène et régulière. L'agrégation des particules est régie par l'hybridation des brins d'ADN. L'approche de deux particules fonctionnalisées entraîne une hybridation des brins complémentaires. La cinétique de cette réaction impose alors la cinétique d'agrégation. Plus la force ionique de la solution augmente, moins l'énergie nécessaire à l'hybridation de deux brins est importante, ce qui accélère la cinétique d'hybridation et explique l'évolution des cinétiques observée.

Au-delà de 75 mM de NaCl, les cinétiques ne dépendent plus de la concentration en sel. Les cinétiques sont rapides et identiques, avec un diamètre hydrodynamique moyen passant de 250 nm à 2 250 nm. Par ailleurs, la mesure du diamètre hydrodynamique est ici arrêtée quand celui-ci diminue à nouveau, à cause de la sédimentation des plus gros éléments. Dans ce cas, l'agrégation est régie par la rencontre des nanoparticules, et n'est donc plus limitée que par la diffusion de ces dernières dans le solvant. Leur collision entraîne une agrégation irréversible, où l'hybridation des brins d'ADN n'intervient plus directement.

Notons qu'en deçà d'une concentration saline de 30 mM, aucune agrégation n'est observée, prouvant la stabilité des solutions colloïdales analysée dans le Chapitre 3.

Pour confirmer le changement de régime, nous avons utilisé une régression non-linéaire par une loi puissance d'exposant α (cf. équation 4.4) pour décrire les cinétiques d'agrégation en fonction de la concentration en NaCl. L'évolution du coefficient α est donnée en Figure 101. Pour comparaison, nous avons également étudié l'évolution du coefficient α pour des nanoparticules non fonctionnalisées. La correspondance entre les courbes expérimentales et les équations obtenues sont présentées en *Annexe 11*.

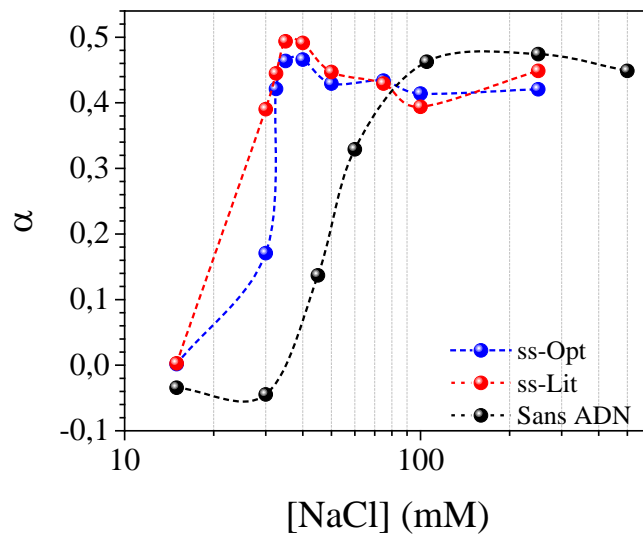


Figure 101 : Evolution du coefficient puissance α en fonction de la concentration saline décrivant les cinétiques de trois composites, avec ADN optimisés, ADN non-optimisés et sans ADN. Les lignes pointillées sont tracées en tant que support visuel.

On identifie clairement sur le graphique les deux régimes d'agrégation de nanoparticules fonctionnalisées. De 15 à 40 mM, le coefficient α augmente de 0 à 0,5. Au-delà de 50 mM, le coefficient diminue et se stabilise à environ 0,42. Ces résultats sont conformes aux résultats de (Pamies *et al.*, 2014). De plus, on peut remarquer l'influence de la fonctionnalisation des nanoparticules car, sans ADN, le coefficient α augmente de 30 mM à 100 mM dont l'allure rappelle celle obtenue par (Trinh *et al.*, 2009), démontrant une limite entre les deux régimes décalée de 15 mM environ. La caractérisation plus pointue du coefficient α avec la détermination des coefficients z et d_f nécessitent par contre d'autres analyses qui n'ont pas pu être réalisées dans ces travaux. On constate cependant qu'en approximant le coefficient z à 0,8 conformément aux mesures expérimentales reportées dans la littérature (Lin *et al.*, 1990; Trinh *et al.*, 2009), on obtient une dimension fractale entre 1,78 et 2,0 en régime DLCA, soit très proches des résultats donnés dans la littérature ($d_f = 1,8 \pm 0,1$) (Lin *et al.*, 1990).

La Figure 102 donne le potentiel Zeta de ces mêmes solutions, c'est-à-dire pour les **brins non-optimisés** (courbe rouge) et pour les **brins optimisés** (courbe noire) en fonction de la concentration saline.

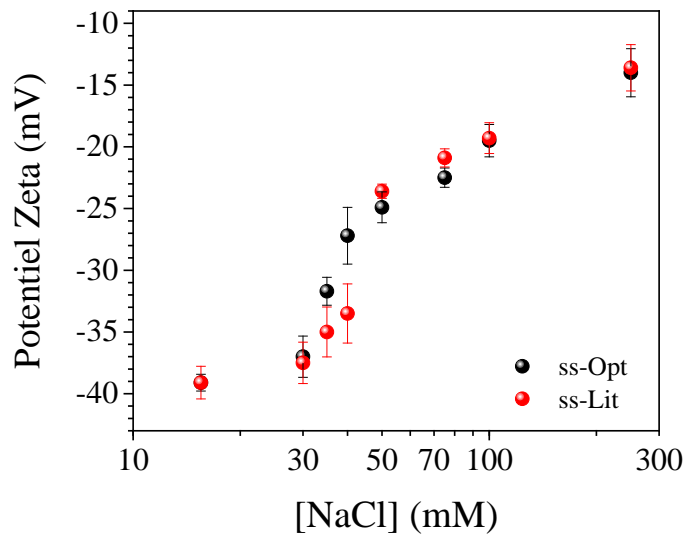


Figure 102 : Evolution du potentiel Zeta de nanoparticules Al et CuO fonctionnalisées avec des brins complémentaires non-optimisés (courbe rouge) et optimisés (courbe noire), en fonction de la concentration en NaCl. Les mesures sont prises aux premiers temps de l'agrégation.

Comme attendu, le potentiel Zeta évolue très fortement avec la concentration saline, passant de -39 mV pour une concentration initiale en NaCl de 15 mM, à -15 mV pour une concentration en NaCl de 250 mM. Plus précisément, on observe un saut de potentiel entre 30 et 50 mM. Le saut de potentiel est plus marqué pour les colloïdes fonctionnalisés avec les **brins non-optimisés**, passant de -33 mV à -23 mV entre 40 et 50 mM, tandis que le saut de potentiel est plus homogène pour les colloïdes fonctionnalisés avec les **brins optimisés**, entre 30 et 40 mM.

La chimie de surface complexe intervenant dans les deux cas rend difficile toute interprétation de ces légères différences observées suivant l'optimisation de la séquence. Cependant, ces résultats confirment les observations sur les cinétiques d'agrégation avec notamment le changement de régime entre RLCA et DLCA entre 50 et 75 mM.

A partir de ces résultats, la gamme de concentration en NaCl favorisant l'agrégation des nanoparticules d'Al et CuO par l'hybridation des brins complémentaires en régime RLCA est de 35 à 45 mM, car les cinétiques obtenues à 50 mM sont trop proches de celles obtenues en régime DLCA au-delà de 75 mM, notamment lorsque les brins ne sont pas optimisés.

Nous choisirons pour la suite une concentration en NaCl égale à 35 mM.

4.2. Influence de la séquence de l'oligonucléotide

Nous comparons ici les cinétiques d'agrégation présentées en Figure 103 de cinq mélanges de nanoparticules Al et CuO réalisées dans les mêmes conditions expérimentales, avec une concentration en NaCl de 35 mM à 25 °C :

1. Agrégation entre nanoparticules d'Al et de CuO fonctionnalisées avec des **brins complémentaires et optimisés (ssA-Opt + ssB-Opt)** (symboles bleus pleins).
2. Agrégation entre nanoparticules d'Al et de CuO fonctionnalisées avec des **brins complémentaires non-optimisés (ssA-Lit + ssB-Lit)** (symboles rouges pleins).
3. Agrégation entre nanoparticules d'Al et de CuO fonctionnalisées avec des **brins optimisés** mais identiques, donc supposés **non-complémentaires (ssA-Opt)** pour les deux types de particules) (symboles bleus vides).
4. Agrégation entre nanoparticules d'Al et de CuO fonctionnalisées avec des **brins optimisés** et identiques, supposés **non-complémentaires (ssA-Lit)** pour les deux types de particules) (symboles rouges vides).
5. Agrégation entre nanoparticules d'Al et de CuO **non-fonctionnalisées**, *i.e.* sans brin d'ADN ou de Streptavidine à la surface (symboles noirs).

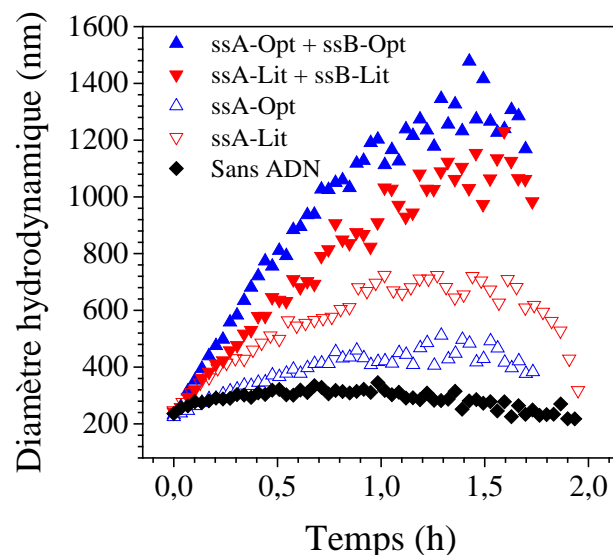


Figure 103 : Evolution du diamètre hydrodynamique des agrégats Al-CuO : nanoparticules non-fonctionnalisées (courbe noire) ; fonctionnalisées avec brins optimisés complémentaires ssA-Opt et ssB-Opt (symboles bleus pleins) et non-complémentaires ssA-Opt (symboles bleus vides) ; fonctionnalisées avec brins avec brins non-optimisés complémentaires ssA-Lit et ssB-Lit (symboles rouges pleins) et non-complémentaires ssA-Lit (symboles rouges vides).

Tout d'abord, on observe qu'il n'y a pas ou peu d'agrégation entre nanoparticules d'Al et de CuO **non-fonctionnalisées** (courbe noire), dont le diamètre hydrodynamique évolue entre 250 et 300 nm. Cette expérience permet donc de vérifier l'absence d'interactions non-spécifiques entre particules dans ces conditions.

Intéressons-nous ensuite aux nanoparticules d'Al et de CuO fonctionnalisées avec des brins identiques, supposés **non-complémentaires**, **ssA-Opt** et **ssA-Lit** respectivement en symboles vides bleu et rouge. Alors qu'il est attendu une absence d'agrégation, on note dans les deux cas une augmentation du diamètre hydrodynamique au cours du temps, supérieure à la courbe noire, correspondant aux particules d'Al et de CuO **non-fonctionnalisées**. Lorsque la séquence des brins d'ADN utilisés a été **optimisée** (courbe bleue), l'augmentation du diamètre hydrodynamique est limitée, atteignant 500 nm après 1 h 30. Au contraire, lorsque les brins d'ADN **n'ont pas été optimisés** (courbe rouge), le diamètre hydrodynamique atteint 725 nm après 1 h. Dans ces deux cas, l'agrégation est causée par des interactions non-spécifiques entre les nanoparticules fonctionnalisées avec ADN. Ces interactions peuvent être de différente nature et seront discutées plus tard. **Cependant, on peut noter que ces interactions sont nettement limitées lorsque la séquence est optimisée par notre algorithme.**

Enfin, on observe une agrégation prononcée et rapide lorsque les nanoparticules sont fonctionnalisées avec des **brins d'ADN complémentaires, optimisés** ou **non**. Le régime d'agrégation diffère suivant la nature de la séquence, avec une cinétique plus rapide lorsque la séquence est optimisée. Plus précisément, le diamètre hydrodynamique augmente de 250 nm à 1,5 μm après 1 h 30 min d'agrégation avec les **brins optimisés**, contre 1,2 μm avec les **brins non-optimisés**.

Les interactions non-spécifiques, associées donc à la présence de l'ADN à la surface des nanoparticules, peuvent s'établir entre un brin d'ADN d'une particule et la surface d'une autre particule, ou entre des brins d'ADN de deux particules de façon non-spécifique, car **non-complémentaires**. Une illustration schématique de ces deux scénarii est proposée en Figure 104.

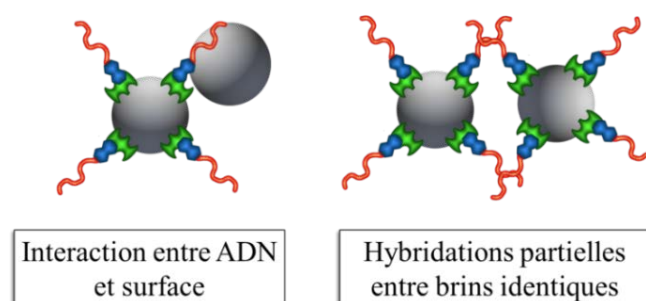


Figure 104 : Schéma illustrant les interactions non-spécifiques possibles entre nanoparticules fonctionnalisées avec des brins d'ADN identiques : entre les brins d'ADN et la surface vierge d'autres nanoparticules (image de gauche), ou entre plusieurs brins d'ADN par hybridation partielle non-spécifique, telle que décrite dans la section 3.1.

La deuxième possibilité est favorisée pour la séquence **non-optimisée** (symboles rouges vides) à cause des nombreuses hybridations parasites possibles vu dans le paragraphe 2.1.

Par contre, compte tenu des interactions fortes entre les bases ADN et la surface d'alumine montrées au Chapitre 2, la première possibilité (greffage de l'ADN sur la surface des particules) se retrouve dans les deux cas, et est fortement probable à cause du faible recouvrement de la nanoparticule par les brins d'ADN déterminé au Chapitre 3.

D'autre part, il est important de noter que les effets observés dans le cas d'agrégation de nanoparticules fonctionnalisées avec des brins **non-complémentaires** (symboles vides rouges et bleus) se retrouvent dans les courbes obtenues lorsque les nanoparticules sont fonctionnalisées avec les **brins complémentaires** (symboles pleins rouges et bleus de la Figure 103). Ainsi, on peut considérer que l'agrégation de nanoparticules fonctionnalisées avec des **brins optimisés et complémentaires** repose principalement et majoritairement sur l'hybridation complète des brins complémentaires, où l'agrégation assurée par des phénomènes non-spécifiques ont une contribution entre 10 et 20 %. Au contraire, l'agrégation observée dans le cas de nanoparticules fonctionnalisées avec **des brins complémentaires non-optimisés** repose essentiellement sur des interactions non-spécifiques, représentant autour de 50 % des phénomènes observés.

En résumé, d'un point de vue qualitatif, la différence entre les deux courbes rouge est largement moins importante qu'entre les deux courbes bleues. D'un point de vue purement cinétique, on peut comparer les courbes en linéarisant l'augmentation du diamètre hydrodynamique aux temps courts (*cf.* Figure 105). On note que le régime linéaire s'étend sur une plus courte période lorsque les nanoparticules sont fonctionnalisées avec des brins non-complémentaires.

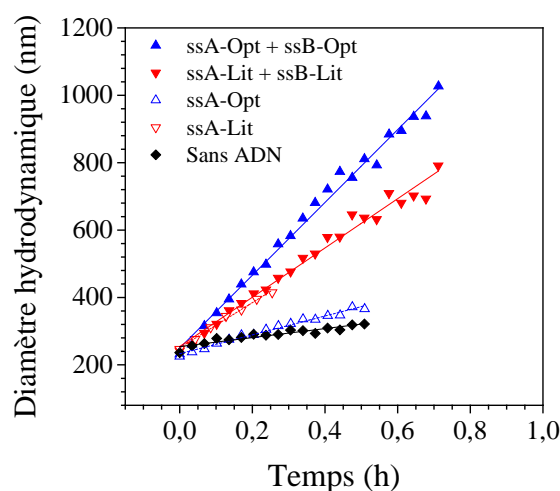


Figure 105 : Régression linéaire des premiers instants des cinétiques d'agrégation présentées en Figure 103.

La Figure 105 permet de mettre en évidence les importantes disparités entre les cinétiques d'agrégation : lorsque les nanoparticules sont fonctionnalisées avec des **brins optimisés** (courbes bleues), la pente passe de $280 \pm 10 \text{ nm.h}^{-1}$ à $1\,080 \pm 25 \text{ nm.h}^{-1}$ pour des **brins identiques (ssA-Opt)** ou **complémentaires (ssA-Opt et ssB-Opt)**, respectivement. En comparaison, le coefficient de régression lorsque les nanoparticules ne sont pas fonctionnalisées par l'ADN est de $135 \pm 15 \text{ nm.h}^{-1}$. Au contraire, les pentes sont très proches lorsque les nanoparticules fonctionnalisées avec des **brins non-optimisés**, passant de 670 ± 25 à $730 \pm 25 \text{ nm.h}^{-1}$.

L'utilisation de séquences optimisées permet donc d'obtenir une cinétique d'agrégation plus rapide pour une concentration saline de 35 mM, et permet surtout de limiter grandement les interactions non-spécifiques entre ADN et nanoparticules.

Nous pouvons noter que dans le cas de la **séquence non-optimisée**, trois modes d'hybridation peuvent expliquer les cinétiques d'agrégation plus faibles :

- (i) Hybridation partielle entre deux brins identiques sur 4 bases de la séquence.
- (ii) Hybridation partielle entre deux brins complémentaires sur 4 bases de la séquence.
- (iii) Hybridation complète entre deux brins complémentaires sur 15 bases de la séquence.

Ces trois modes illustrés en Figure 94 font intervenir un nombre variable de bases. Or, plus le nombre de bases mises en jeu lors de l'hybridation est faible, moins la concentration saline doit être élevée pour favoriser l'agrégation, comme l'attestent les énergies d'hybridations calculées par Santa Lucia (John Santa Lucia and Hicks, 2004). Cela peut expliquer la cinétique d'agrégation beaucoup plus rapide observée lorsque les nanoparticules sont fonctionnalisées avec des brins d'ADN **non-optimisés** à une concentration saline de 30 mM (*cf.* Figure 100), alors que l'agrégation n'est quasiment pas visible dans le cas de **brins optimisés**, où l'hybridation ne peut se faire que sur 15 bases. Par ailleurs, les cinétiques sont semblables pour les deux systèmes, au-delà de 40 mM, car la charge ionique est suffisante pour amorcer l'hybridation sur 15 bases. Il est intéressant de noter qu'à une concentration saline de 35 mM, le brin optimisé est avantage par rapport au brin non-optimisé.

4.3. Influence de la température

Nous étudions maintenant l'évolution du diamètre hydrodynamique des agrégats Al-CuO en fonction de la température pour les deux types d'assemblage : avec **séquence optimisée** et **non-optimisée**. Le calcul des températures théoriques de fusion des brins d'ADN optimisés et non-optimisés pour la concentration saline de 35 mM conformes aux

conditions de notre expérience donne 64,2 °C et 46,1 °C pour les **séquences optimisées** et **non-optimisées**, respectivement.

Ainsi, les nanobiocomposites sont auto-assemblés à température ambiante, puis sont chauffés pendant 30 min à 50 °C ou 70 °C. Après la période de chauffage, la solution est de nouveau refroidie à température ambiante. Ce cycle est répété trois fois, le diamètre hydrodynamique est suivi par DLS et les courbes obtenues reportées en Figure 106. Une période de transition de 5 min est respectée entre chaque changement de température.

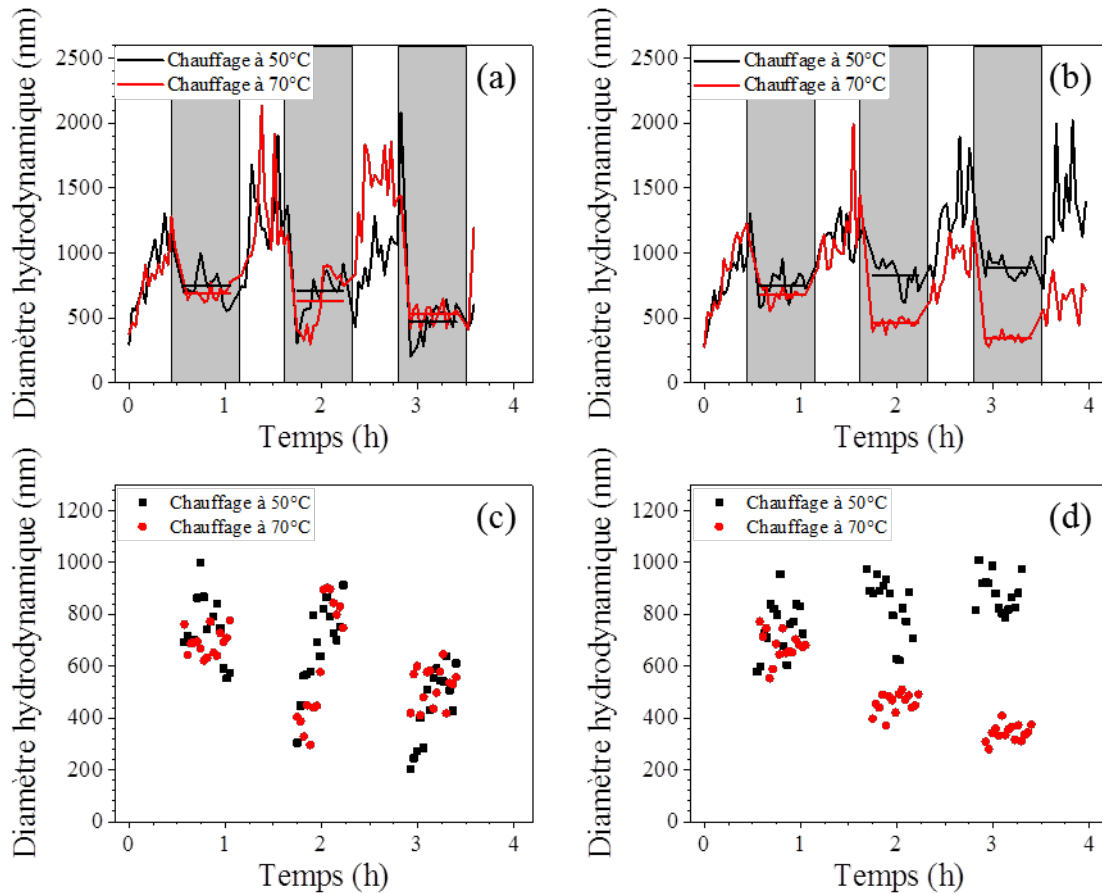


Figure 106 : Evolution du diamètre hydrodynamique des agrégats Al-CuO fonctionnalisés avec des brins d'ADN complémentaires non-optimisés (a, c) et optimisés (b, d) en fonction de la température. Les traits dans les zones grises correspondent au diamètre moyen des nanocomposites sur la période de chauffage considérée.

L'évolution du diamètre hydrodynamique des agrégats obtenus par hybridation de **brins d'ADN non-optimisés (ssA-Lit et ssB-Lit)** est donnée en Figure 106 (a). Sur la Figure 106 (c) sont tracés les points correspondants aux périodes de chauffage, afin d'améliorer la lisibilité.

Tout d'abord, on note que le diamètre hydrodynamique varie fortement avec la température, bien qu'on ne distingue pas de différence de comportement entre un chauffage à 50 °C et un chauffage à 70 °C. A température ambiante, le diamètre

augmente de 250 à 1 250 nm lors du premier cycle. En chauffant, il diminue de façon nette, de 1 250 à 750 nm lors du premier cycle. On note en effet que le diamètre hydrodynamique ne retrouve pas sa valeur initiale, démontrant l'existence d'interactions non-spécifiques et non-réversibles, déjà détectées précédemment. Cependant, le diamètre hydrodynamique diminue avec la succession des périodes de chauffage, passant d'environ 800 nm à 500 nm. La diminution progressive du diamètre hydrodynamique moyen avec l'augmentation du nombre de cycle dans le cas de **brins non-optimisés** (Figure 106 (c)), pouvant s'expliquer par une sédimentation progressive des plus gros éléments formés au cours des périodes à température ambiante.

L'évolution du diamètre hydrodynamique des nanobiocomposites obtenus par hybridation de **brins d'ADN optimisés (ssA-Opt et ssB-Opt)** est donnée en Figure 106 (b). Sur la Figure 106 (d) sont tracés les diamètres mesurés pendant les périodes de chauffage. Contrairement au cas précédent, on observe une différence de comportement entre 50 et 70 °C. Le diamètre hydrodynamique ne diminue pas franchement lorsque la température est de 50 °C et a même tendance à augmenter (*cf.* les points noirs à ~1 000 nm sur la Figure 106 (d)), alors qu'une nette diminution du diamètre hydrodynamique est observée lors du chauffage à 70 °C. Cette différence montre que les agrégats obtenus avec les **brins d'ADN optimisés** sont plus stables en température, comparativement à ceux obtenus avec les **brins non-optimisés**. Cette observation est en accord avec la température de fusion calculée de 64,2 °C des **brins d'ADN optimisés**. Un tableau résumant les valeurs numériques obtenues dans ces graphes est proposé en *Annexe 12*.

Il reste cependant difficile d'interpréter avec précision les cinétiques d'agrégation en considérant uniquement l'hybridation spécifique ou non des brins d'ADN, parce qu'elles sont liées à de nombreux autres facteurs comme la densité de greffage et les interactions entre ADN et particule, ou particules et particules. On observe dans les deux cas que le diamètre hydrodynamique moyen diminue de 40 à 60 % après chaque période de chauffage, que l'on peut attribuer à la modification de l'accrochage des brins d'ADN à la surface des nanoparticules. Nous avons en effet vu dans le Chapitre 2 que l'élévation de la température en solution pouvait favoriser l'adsorption de bases T à la surface, rendant le brin inefficace pour une prochaine hybridation. Ces phénomènes peuvent expliquer les grandes variations de diamètre hydrodynamique sur la période de chauffage, particulièrement marquée lorsque les brins d'ADN ne sont pas optimisés. De plus, la température a également un effet sur la valeur de l'énergie barrière entre nanoparticules qui peut favoriser l'agrégation malgré la dé-hybridation des brins d'ADN.

Concluons enfin que l'homogénéité des mesures observées avec les **brins optimisés** et la diminution plus prononcée du diamètre hydrodynamique lors des périodes de chauffage confirment l'intérêt de bien définir la séquence de l'ADN pour optimiser et mieux contrôler l'assemblage.

4.4. Validation de l'hybridation des brins d'ADN complémentaires

Nous proposons ici une expérience complémentaire pour valider que l'hybridation des brins d'ADN gouverne effectivement l'assemblage des particules Al et CuO. Elle consiste à interrompre l'agrégation en saturant la solution colloïdale d'Al en brins d'ADN complémentaires par ajout de quelques μL de solution mère d'ADN. Ces derniers n'étant pas attachés à la surface des particules, leur coefficient de diffusion est plus élevé que celui des particules et peuvent venir s'hybrider sur les brins d'ADN greffés sur les nanoparticules et ainsi désactiver l'ensemble des sites fonctionnels nécessaires à l'agrégation. La concentration en NaCl est toujours de 35 mM et la température fixée à 25 °C.

Les cinétiques d'agrégation présentées sur la Figure 107 sont comparées à celles obtenues pour un assemblage non-interromp.

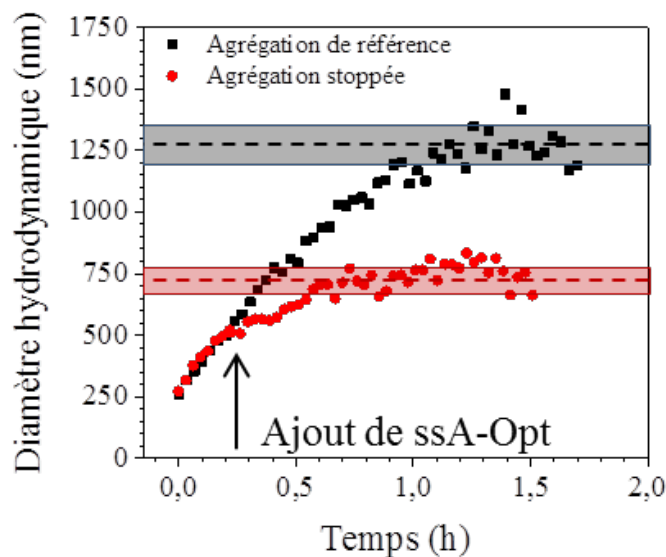


Figure 107 : Evolution du diamètre hydrodynamique des agrégats Al-CuO fonctionnalisés avec des brins d'ADN complémentaires. Pour la courbe rouge, 2 μL de solution de ssA-Opt (concentration initiale de 0,5 mM) sont ajoutées aux 150 μL de solution colloïdale après 15 min d'agrégation.

Sur la Figure 107, les encadrés noir et rouge correspondent au diamètre hydrodynamique moyen en fin d'expérience et son écart type. Sans interruption de l'assemblage, le diamètre hydrodynamique moyen passe de 250 nm à $1\,280 \pm 80$ nm en moins d'une heure. Dans l'expérience avec interruption de l'agrégation, on note, après ajout des brins d'ADN complémentaires à ceux greffés sur les nanoparticules d'Al, un arrêt net de l'agrégation pendant une quinzaine de minute, puis l'agrégation redémarre à nouveau et le diamètre hydrodynamique se stabilise à une valeur de 745 ± 50 nm.

La diminution nette de 500 nm du diamètre hydrodynamique moyen final des agrégats lorsque l'assemblage est perturbé par ajout de brins d'ADN complémentaires

démontre que l'assemblage est effectivement contrôlé par l'hybridation des brins d'ADN complémentaires greffés à la surface des deux types de nanoparticules.

Cependant, la reprise de l'assemblage après un arrêt de 15 min témoigne de la présence d'interactions non-spécifiques entre particules fonctionnalisées, comme déjà évoquée dans les paragraphes précédents. Ces interactions n'avaient pas été observées dans le cas de particules d'or (Cobbe *et al.*, 2003).

4.5. Influence de la taille du *spacer* et de la Streptavidine

Nous évaluons ici l'influence de la stratégie de greffage sur les cinétiques d'agrégation, plus précisément l'impact de la longueur du *spacer* utilisé et la présence de Streptavidine. Pour cela, nous avons comparé les cinétiques d'agrégation de nanoparticules d'Al et de CuO fonctionnalisées avec des brins d'ADN avec ou sans greffage préalable de la Streptavidine. Enfin, ces expériences ont été réalisées pour trois longueurs d'ADN en faisant varier le nombre de bases T du *spacer* (0, 15 ou 30 bases T, notées T_0 , T_{15} , T_{30}) et dans trois concentrations en NaCl (30 mM, 45 mM et 60 mM). Notons que la séquence est ici optimisée et composée de 15 bases (*cf.* Tableau 19). Les cinétiques sont présentées en Figure 108.

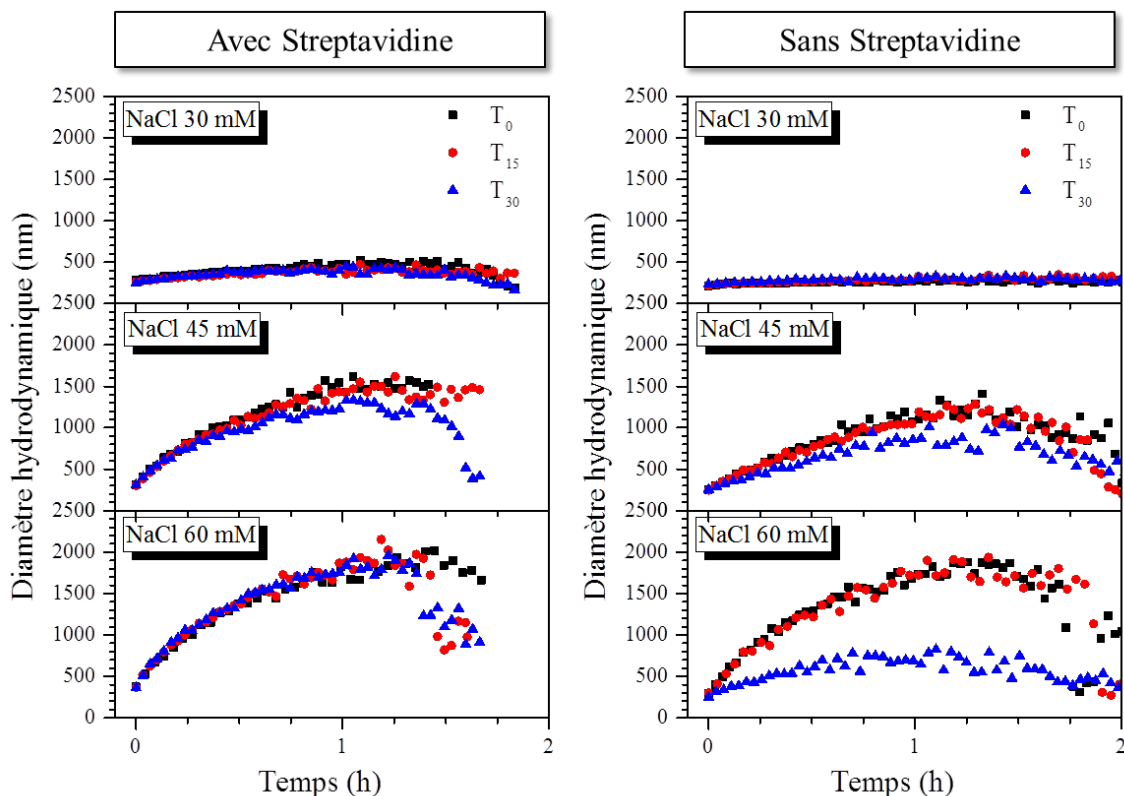


Figure 108 : Evolution du diamètre hydrodynamique moyen des agrégats Al-CuO fonctionnalisés avec des brins d'ADN complémentaires, avec et sans Streptavidine préalablement greffée à la surface pour trois concentrations salines (30 mM, 45 mM et 60 mM) et trois tailles de *spacer* (0, 15 et 30 bases T).

Intéressons-nous tout d'abord à la variation du diamètre hydrodynamique de nanoparticules fonctionnalisées avec la Streptavidine (graphes de gauche). Dès 30 mM de NaCl, on observe une agrégation très légère des nanoparticules. En augmentant la concentration en NaCl, l'agrégation est plus marquée et les diamètres hydrodynamiques atteignent ~ 1 500 nm. On note enfin que les cinétiques sont identiques quelle que soit la longueur du *spacer*, bien qu'une sédimentation plus rapide soit détectée pour T₃₀ à 45 mM, et pour T₁₅ et T₃₀ à 60 mM. Cette observation pourrait être expliquée par une densité variable des agrégats en suspension, entraînant une sédimentation à différents moments ; une confirmation de ces hypothèses nécessiterait des analyses complémentaires.

Les cinétiques d'assemblage des nanoparticules d'Al et de CuO sans Streptavidine (graphes de droite), se différencient en plusieurs points. D'abord, on n'observe pas d'agrégation à 30 mM. Ensuite, les tailles d'agrégats maximales obtenues à 45 mM sont légèrement inférieures à celles de leurs homologues avec Streptavidine : 1 200 nm contre 1 500 nm avec Streptavidine. Les tailles d'agrégats sont identiques à 60 mM dans les deux cas, avec 1 900 nm de diamètre maximal. Enfin, la différence majeure tient aux cinétiques d'agrégation de T₃₀ (courbes bleues), qui apparaissent légèrement plus lentes à 45 mM et nettement plus lentes à 60 mM (900 nm et 700 nm pour T₃₀ à 45 et 60 mM, contre 1 200 et 1 900 nm pour T₀ et T₁₅), tandis que les cinétiques de T₀ et T₁₅ restent similaires dans les deux cas.

Ces observations nous permettent de conclure que **pour des brins d'ADN courts (T₀ ou T₁₅), l'assemblage est peu influencé par la présence ou non de la Streptavidine**. En effet, la cinétique moins rapide à 45 mM peut s'expliquer par une moins bonne disponibilité des brins d'ADN greffés à la surface lorsqu'il n'y a pas de Streptavidine (*cf.* Chapitre 3). Cependant, la présence d'un nombre suffisant de brins d'ADN disponibles permet l'hybridation et l'agrégation. Par contre, pour les brins d'ADN longs (T₃₀), la cinétique est très différente. Il semble que l'adsorption des brins d'ADN de façon non-spécifiques sur les surfaces oxydées (Al₂O₃ et CuO) soit amplifiée à cause du nombre important de bases T dans le *spacer*. Ces derniers se retrouveraient donc couchés sur la surface, et non disponibles pour l'hybridation, ce qui expliquerait le ralentissement de la cinétique d'agrégation.

Afin de confirmer ces hypothèses, nous avons étudié le comportement des agrégats avec ou sans Streptavidine en température, *i.e.* en appliquant des paliers de 30 min à 70 °C. Les courbes sont reportées sur la Figure 109.

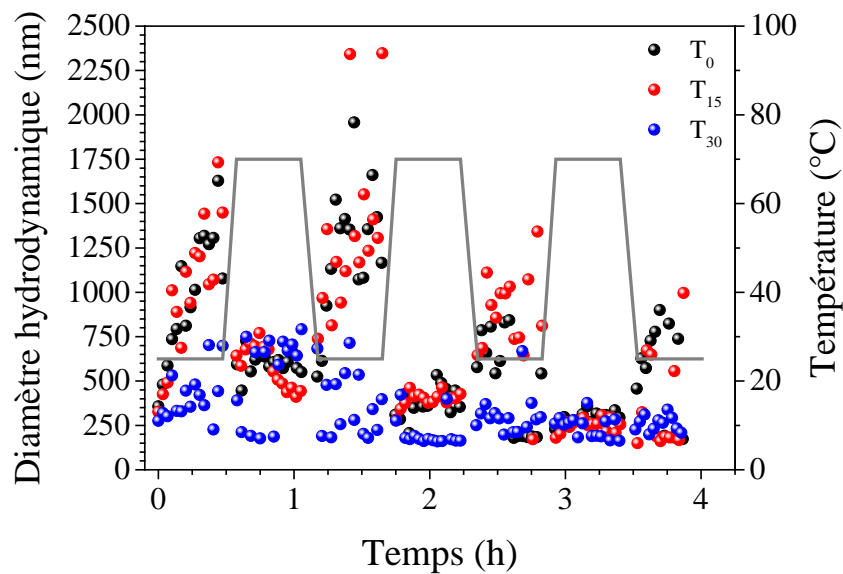


Figure 109 : Evolution du diamètre hydrodynamique moyen des agrégats Al-CuO fonctionnalisés avec des brins d'ADN complémentaires de trois tailles de spacer (0, 15 et 30 bases T) en fonction de la température entre 25 °C et 70 °C.

Les résultats confirment les conclusions précédentes. Pour T_0 et T_{15} , les augmentations et réductions du diamètre hydrodynamique en fonction de la température sont conformes aux observations des paragraphes 3 et 4.3. Cependant, pour T_{30} , on n'observe pas de variation du diamètre hydrodynamique avec la température. Le diamètre varie en effet entre 250 et 750 nm indépendamment de la température, confirmant que l'agrégation est principalement contrôlée par des interactions non-spécifiques car irréversibles. **Cela valide l'hypothèse de l'adsorption non-spécifique de brins d'ADN sur les surfaces oxydées.**

En conclusion, cette étude permet de questionner l'utilisation de la Streptavidine pour améliorer la spécificité du greffage, visiblement efficace à partir d'une longueur suffisamment importante du brin.

5. Caractérisation structurale des nanobiocomposites

Comme précisé dans le Chapitre 3, les observations au SEM ont été réalisées après dépôt de quelques gouttes de solution colloïdale sur une grille de Ni recouverte d'un film de carbone. Le même protocole est appliqué pour les observations au TEM, effectués au Centre de MicroCaractérisation Raimond Castaing à Toulouse, avec l'appareil JEOL JEM-ARM 200F à émission de champ corrigé sonde, couplé à un spectromètre EDX.

5.1. Nanobiocomposites Al-CuO

Deux images TEM de nanobiocomposites Al-CuO auto-assemblés par **brins d'ADN complémentaires optimisés** suivant le protocole décrit dans le paragraphe 3, sont présentées en Figure 110. On y distingue nettement les nanoparticules d'Al, sphériques et claires de diamètre entre 50 et 150 nm, et les nanoparticules de CuO, beaucoup plus sombres et petites, mais fortement agglomérées. Sur l'image au plus faible grossissement, on observe la répartition homogène d'agglomérats de 500 nm² environ de nanoparticules d'Al et de CuO. Sur l'image au plus gros grossissement, on distingue une nanoparticule d'Al connectée en trois points avec les nanoparticules de CuO disposées autour, laissant supposer une hybridation en trois points de la particule.

L'existence d'agglomérats assez gros d'un type de nanoparticules se justifie d'une part par le diamètre hydrodynamique assez élevé des nanoparticules avant mélange (environ 250 à 300 nm, *cf.* Chapitre 3), et d'autre part par l'existence d'interactions non-spécifiques décrites précédemment, probablement due également à un faible taux de recouvrement d'ADN.

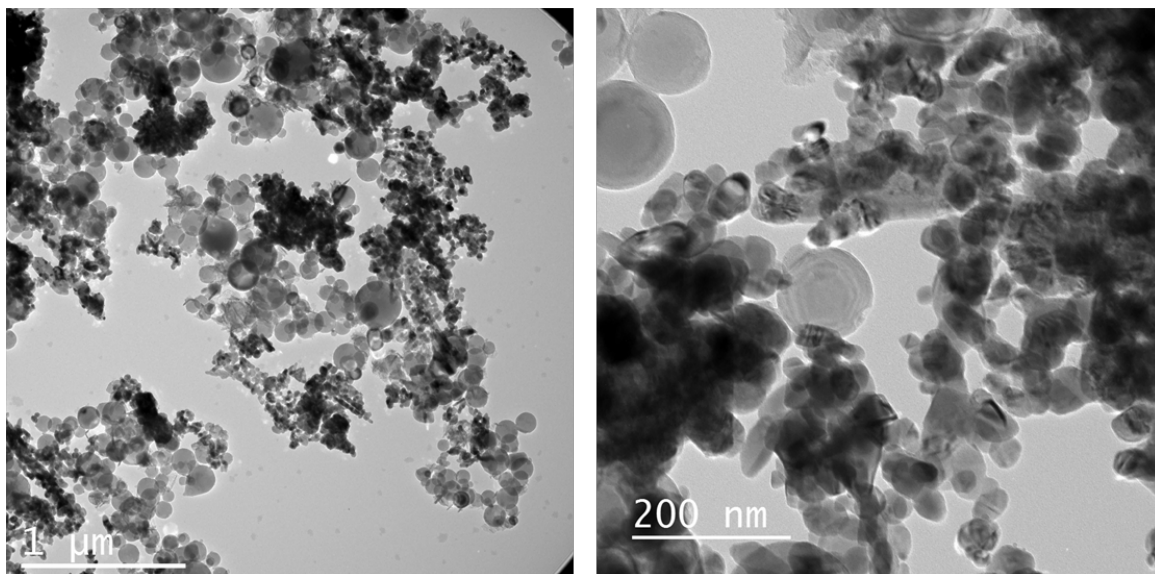


Figure 110 : Images TEM de nanobiocomposites Al-CuO auto-assemblés par ADN.

5.2. Influence de la séquence de l'oligonucléotide sur la structure

Les images SEM des composites obtenus après assemblage de nanoparticules d'Al et de CuO fonctionnalisés avec des brins optimisés et non-optimisés sont présentées en Figure 111. Peu de différences morphologiques sont notables à cette échelle entre les composites agrégés par des **brins d'ADN complémentaires optimisés ou non** (Figure 111 (a, b)) : la taille des agrégats varie entre 1 et 3 μm , et on observe une structure dense avec une composition Al / CuO homogène dans les deux cas, confirmant le mode d'agrégation RLCA.

Nous avons ensuite observés des agrégats obtenus après assemblage de nanoparticules d'Al et de CuO fonctionnalisés avec des **brins d'ADN non-complémentaires** avec des séquences **optimisées** et **non-optimisées** (Figure 111 (c, d)). Les agrégats obtenus lorsque les brins sont **non-optimisés** sont plus gros, entre 700 nm et 1 μm , que ceux obtenus lorsque les brins sont optimisés dont la taille atteint au maximum 500 nm. De plus, l'homogénéité semble moins bonne lorsque les brins sont **non-complémentaires** comparativement aux agrégats obtenus avec des **brins complémentaires**, comme en témoignent l'agrégat composé uniquement de nanoparticules d'Al (Figure 111 (a)) ou de nanoparticules de CuO (Figure 111 (d)).

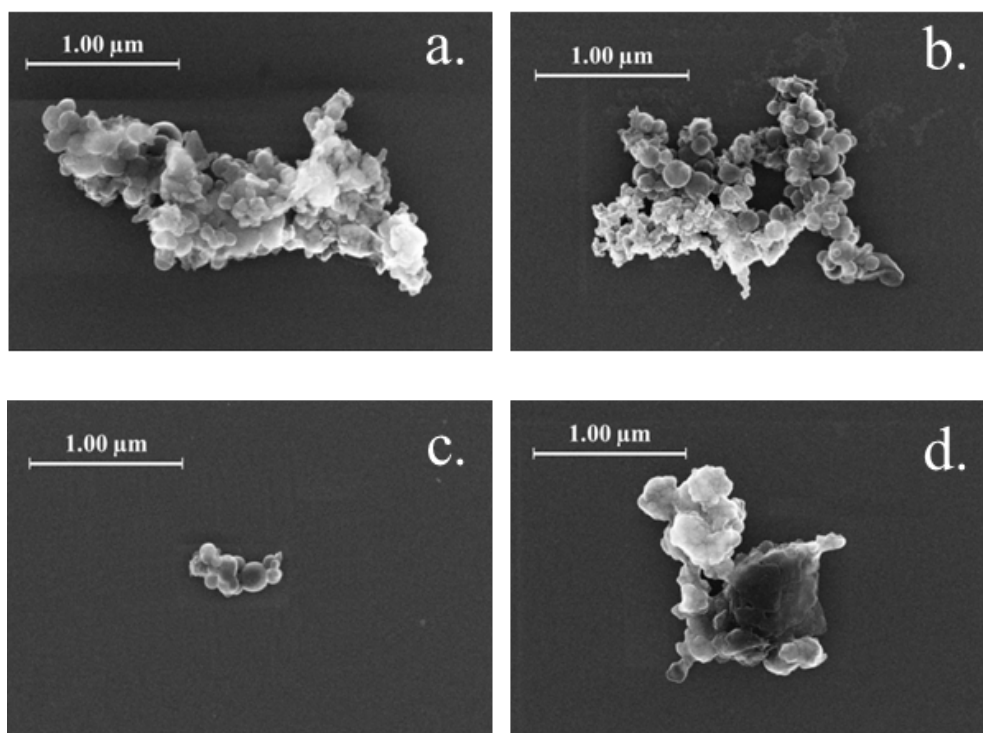


Figure 111 : (a, b) Images SEM de nanobiocomposites Al-CuO obtenus par agrégation de nanoparticules fonctionnalisées avec des brins d'ADN optimisés, complémentaires et non-complémentaires respectivement. (c, d) Images SEM de nanobiocomposites Al-CuO obtenus par agrégation de nanoparticules fonctionnalisées avec des brins d'ADN non-optimisés, complémentaires et non-complémentaires respectivement.

5.3. Influence de la séquence sur la composition chimique

Une analyse EDX obtenue par HR-TEM dont les résultats sont présentés en Figure 112 a permis également de comparer la disposition des éléments Al et Cu dans les agrégats obtenus à partir de nanoparticules d'Al et de CuO fonctionnalisés avec des **brins complémentaires optimisés** et **non-optimisés** (figures du haut et du bas respectivement).

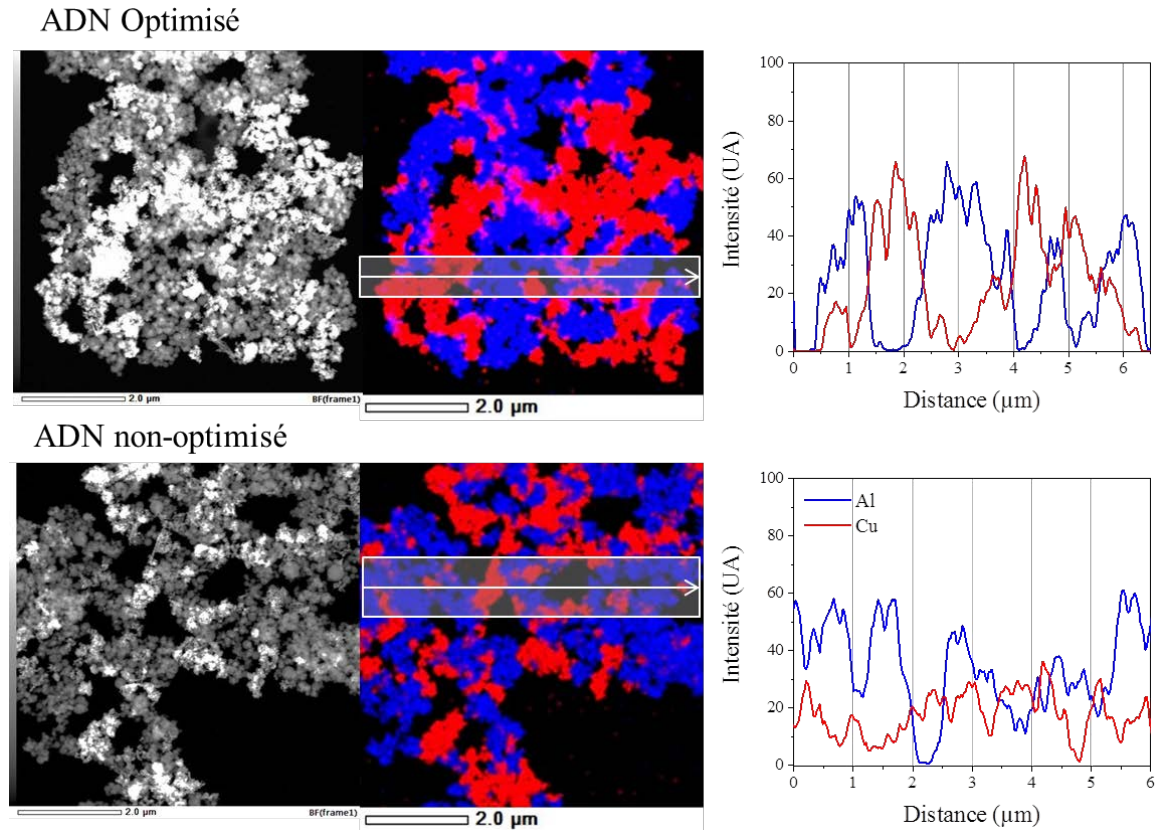


Figure 112 : Images TEM en champs sombre, cartographies élémentaires de l'Al (en bleu) et du Cu (en rouge), et composition élémentaire sur une tranche de nanobiocomposites obtenus à partir de nanoparticules d'Al et de CuO fonctionnalisés avec des brins complémentaires optimisés et non-optimisés (figures du haut et du bas respectivement).

Ces observations confirment les images SEM : dans les deux, la structure apparaît dense malgré la présence de vide de diamètre compris entre 0,2 et 0,7 μm . La distribution des éléments Al (en bleu) et Cu (en rouge) est plus fine dans le cas de **brins d'ADN non-optimisés**. Avec les **brins d'ADN optimisés**, on observe que la distribution des éléments Al et Cu est comprise entre 0,2 et 0,5 μm , correspondant exactement aux diamètres hydrodynamiques des solutions colloïdales avant agrégation (*cf.* Chapitre 3).

Pour l'heure, ces observations fines des nanobiocomposites ne permettent pas de distinguer des différences fortes sur l'homogénéité de la distribution des éléments Al et Cu entre agrégats obtenus avec des brins d'ADN optimisés et ceux obtenus avec les brins non-optimisés.

6. Caractérisation thermiques des nanobiocomposites Al-CuO

6.1. Analyse des propriétés thermiques

Cette dernière section évalue les performances énergétiques des nanobiocomposites en fonction des conditions de synthèse. Après évaporation du solvant dans une enceinte sous vide pendant quelques heures, les agrégats sont récupérés et analysés par Calorimétrie Différentielle à Balayage, notée DSC pour *Differential Scanning Calorimetry*, permettant de mesurer les réactions exothermiques et endothermiques sous l'effet de la température. Les analyses ont été réalisées à l'aide de l'appareil METTLER-Toledo équipé d'un capteur HSS8. Le principe de fonctionnement de la DSC est développé en *Annexe 1*.

Environ 1 mg de nanobiocomposite Al-CuO est placé dans un creuset en Platine de volume 40 μL . Un même creuset vide est placé en vis-à-vis de l'échantillon, pour la référence. Les échanges de chaleur entre l'échantillon et la référence sont mesurés sous une rampe de température de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $700\text{ }^{\circ}\text{C}$, sous atmosphère inerte (Ar pur à 99,999 % après passage dans un piège à oxygène). Cette méthode de caractérisation est classiquement utilisée pour l'analyse des réactions de matériaux nanothermites (Bahrami *et al.*, 2014; Glavier *et al.*, 2015; Marín *et al.*, 2015; Stamatis *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2006).

6.2. Influence de la stœchiométrie dans les performances énergétiques

Comme vu dans le Chapitre 1, les proportions stœchiométriques peuvent avoir une influence forte sur les propriétés énergétiques des nanothermites. Nous commençons par étudier ici l'influence de la proportion de nanoparticules d'Al sur les enthalpies de réactions, déterminées par DSC. La maîtrise de la stœchiométrie du mélange est assurée grâce à la méthodologie développée dans le Chapitre 3.

Trois nanocomposites contenant une proportion de nanoparticules d'Al et de CuO variable ont été réalisés en mélangeant deux solutions colloïdales de nanoparticules d'Al et de CuO sans ADN. Les proportions des nanoparticules d'Al et de CuO ont été adaptées pour obtenir les différents rapports stœchiométriques Φ de 1, 2 et 4. Rappelons que lorsque Φ est égal à 1, le mélange contient autant de nanoparticules d'Al que de CuO. Par contre, lorsque Φ devient plus grand que 1, la proportion de nanoparticules d'Al dans le mélange augmente par rapport à la proportion de nanoparticules de CuO.

Le mélange des solutions colloïdales est réalisé dans une solution aqueuse de PBS 0,1 X et Tween 20 à 0,05 % dans laquelle la concentration saline en NaCl est de 45 mM.

Afin de valider l'agrégation, même sans ADN, les cinétiques ont été caractérisées par DLS et présentées en Figure 113.

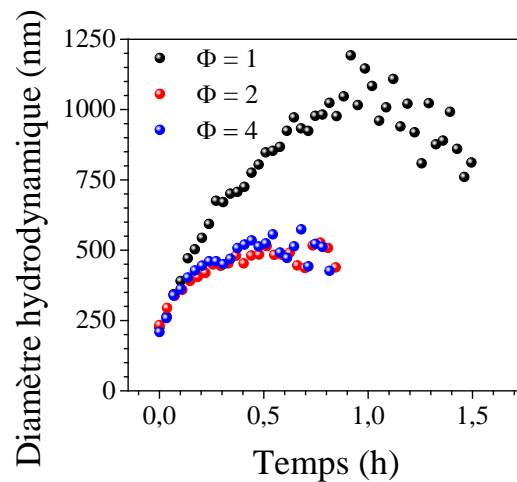


Figure 113 : Evolution du diamètre hydrodynamique moyen des nanocomposites Al-CuO au cours du temps, ayant un rapport stœchiométrique Φ égal à 1, 2 et 4 (courbes noire, rouge et bleue respectivement).

Lorsque Φ est égal à 1, le diamètre hydrodynamique augmente rapidement suivant une loi puissance, passant de 230 nm à 1 250 nm en 1 h. Le diamètre hydrodynamique diminue ensuite rapidement, à cause de la sédimentation des particules. Par contre, lorsque Φ est supérieur à 1, l'augmentation du diamètre hydrodynamique est moins marquée, dépassant difficilement 500 nm. La connaissance limitée de la chimie de surface des nanoparticules et des interactions rend ici difficile toute interprétation de ces résultats.

Les agrégats obtenus ont été visualisés au SEM et leur composition analysée par EDX. Les images SEM sont présentées en Figure 114 et les résultats de l'analyse élémentaire en Figure 115.

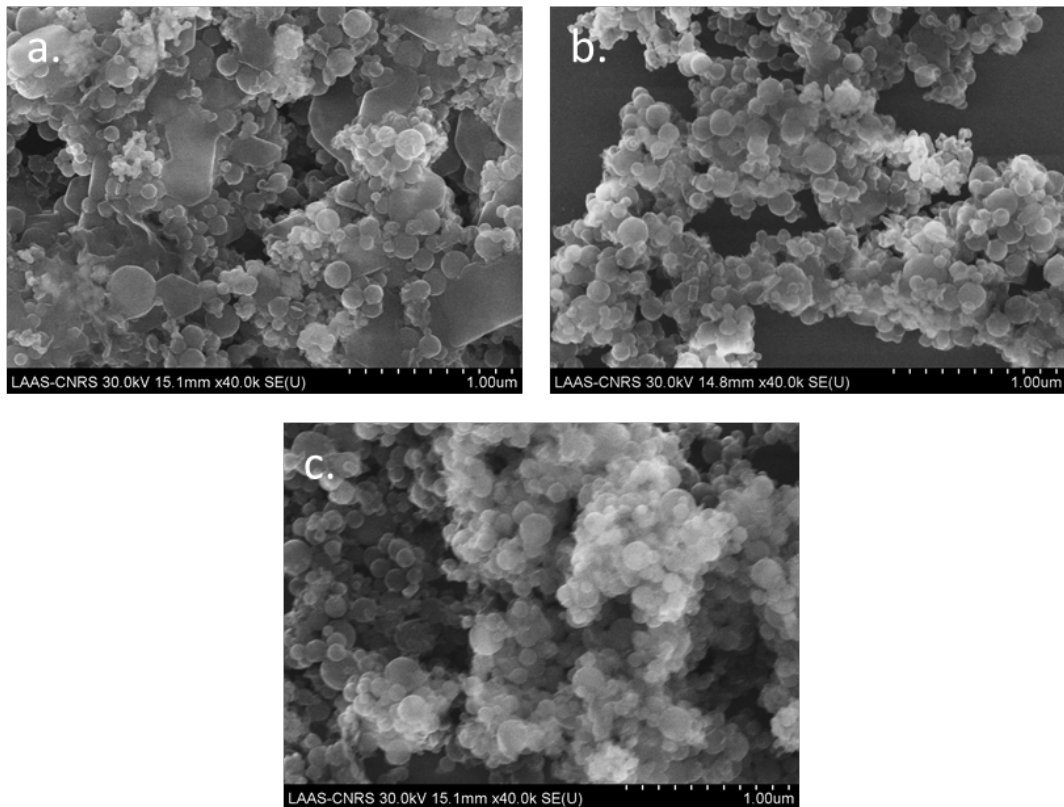


Figure 114 : Images SEM caractéristiques des nanocomposites Al-CuO ayant un rapport stœchiométrique de 1, 2 et 4 (images (a), (b) et (c) respectivement).

Quand Φ augmente, on note une moindre proportion de nanoparticules de CuO. Cela est particulièrement visible entre les images (a) et (c) de la Figure 114. Sur cette dernière, les nanoparticules de CuO ne sont quasiment plus visibles. La quantification élémentaire des éléments Al, Cu, O et Cl en plusieurs endroits, pour trois grossissements différents ($\times 5\,000 / \times 10\,000 / \times 40\,000$) confirme ces observations.

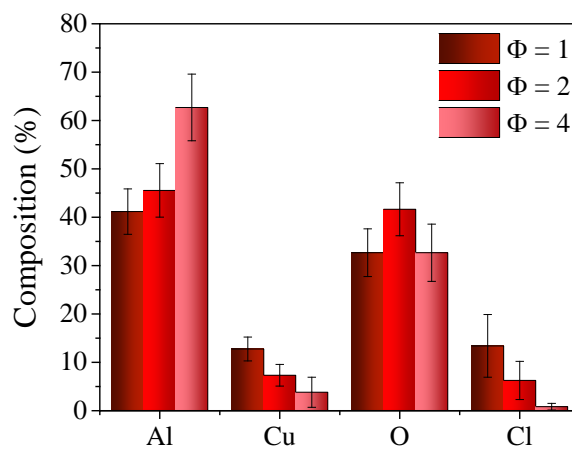


Figure 115 : Quantification des éléments Al, Cu, O et Cl dans les nanocomposites Al-CuO ayant des rapports stœchiométriques différents (Φ de 1, 2 et 4).

Quand Φ passe de 1 à 4, la proportion d'Al passe de $40 \pm 5 \%$ de la composition totale à $64 \pm 7 \%$ et la proportion de Cu diminue de $15 \pm 5 \%$ à $4 \pm 3 \%$. De façon intéressante, le signal du Cl (lié à NaCl) suit l'évolution du signal du cuivre, passant de 15 % à quasiment 0 %. Le signal d'O est plus difficile à commenter, car il est présent dans les deux types de nanoparticules.

Les réponses DSC des trois nanocomposites sont données en Figure 116. La zone colorée représente la zone où l'aire sous la courbe a été calculée, de façon à déterminer l'enthalpie massique libérée lors de la réaction entre 480 et 620 °C, annotée sur les graphes.

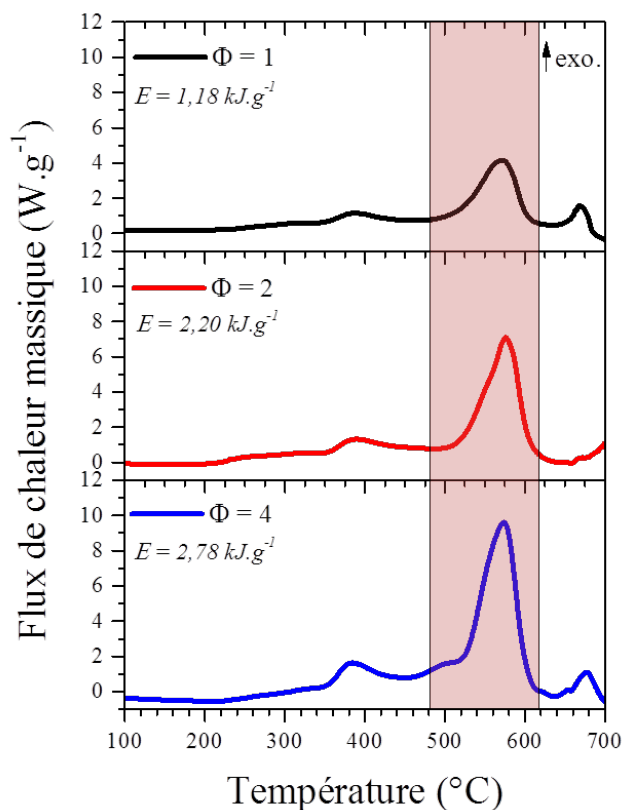


Figure 116 : Courbes DSC de trois nanocomposites (Φ de 1, 2 et 4).

Les courbes DSC présentent la même allure caractéristique du comportement calorimétrique des nanothermites Al-CuO. En effet, elles présentent toutes un pic exothermique principal centré sur 565 ± 5 °C. On note également un pic endothermique de très faible intensité à 680 °C, correspondant à la fusion de l'aluminium restant. L'attribution des pics exothermiques secondaires observés avant 400 °C n'est pas claire, et peut être liée à la présence de pollutions liées à l'utilisation de solution aqueuse ionique.

Le pic exothermique principal centré à 565 °C, s'étalant de 480 °C à 620 °C, est clairement associé à la réaction d'oxydoréduction de l'Al par l'oxygène libéré par le CuO

(Bahrami *et al.*, 2014; Glavier *et al.*, 2015; Marín *et al.*, 2015). L'intégration de l'aire sous la courbe entre 480 et 620 °C permet de calculer l'enthalpie de réaction. Les résultats (1,18 kJ.g⁻¹, 2,20 kJ.g⁻¹ et 2,78 kJ.g⁻¹ pour $\Phi = 1, 2$ et 4 respectivement) montrent clairement que plus la proportion de nanoparticules d'Al est importante, plus l'enthalpie de réaction est importante. Or, les travaux de la littérature ont montré qu'une nanothermite riche en métal Al possède des propriétés thermiques moins élevées, à cause d'un apport insuffisant d'oxygène (Bahrami *et al.*, 2014). Il semble donc qu'il existe dans notre système un apport d'espèce oxydante supplémentaire qui permette l'oxydation de l'Al. Cet apport peut venir de la synthèse en milieux aqueux salin et de l'utilisation de tampons phosphate, riches en oxygène et en phosphate.

L'idée de ces travaux de thèse étant de réaliser un composite où l'organisation spatiale des nanoparticules d'Al et CuO est optimisée, nous travaillerons dans la suite avec un rapport stœchiométrique $\Phi = 1$, de manière à avoir le même nombre de particules en solution, bien que l'énergie libérée de ce composite soit moins importante.

6.3. Apport de l'assemblage des nanoparticules dirigé par ADN

La Figure 117 donne les signaux DSC de trois types de nanocomposites au mode d'assemblage varié :

1. Assemblage de nanoparticules d'Al et de CuO fonctionnalisées avec des brins d'ADN **optimisés et complémentaires** (courbe bleue).
2. Assemblage de nanoparticules d'Al et de CuO fonctionnalisées avec des brins d'ADN **optimisés mais non-complémentaires** (courbe rouge)
3. Assemblage de nanoparticules d'Al et de CuO **sans fonctionnalisation ADN**, mixées en solution aqueuse (courbe noire) ou en solution organique à base d'hexane (courbe grise pointillée).

Les nanobiocomposites assemblés en solution aqueuse ont été réalisés avec une concentration en NaCl de 35 mM, à 25 °C (*cf.* cinétiques d'agrégation en Figure 103). Comme précédemment, les enthalpies de réaction sont annotées sur les graphes, obtenues à partir de l'aire sous la courbe entre 480 et 620 °C, mise en évidence par la zone colorée.

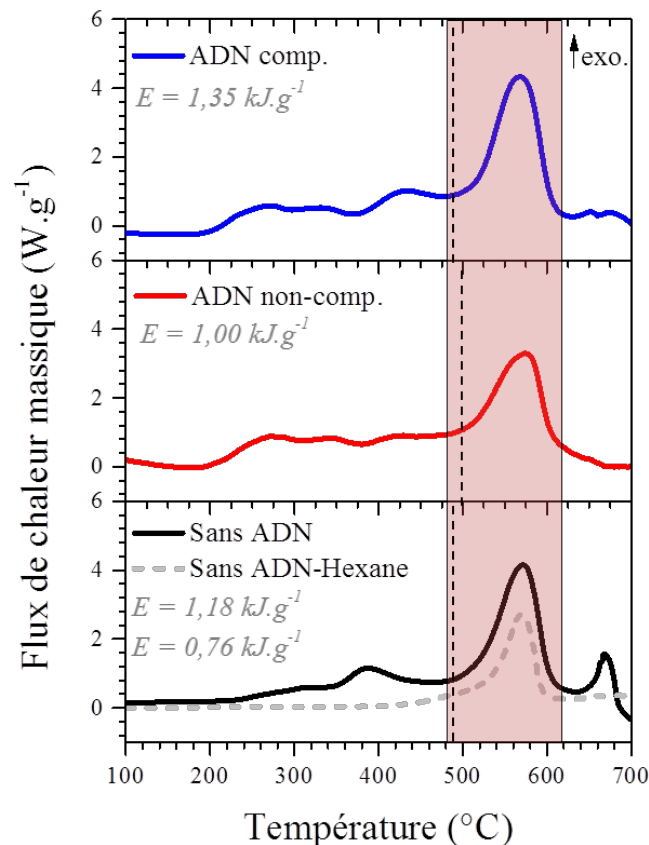


Figure 117 : Courbes DSC de différents nanobiocomposites Al-CuO obtenus par assemblage de nanoparticules d'Al et de CuO : avec brins d'ADN optimisés et complémentaires (courbe bleue), avec brins d'ADN optimisés et non-complémentaires (courbe rouge) et non-fonctionnalisés en solution aqueuse (courbe noire) ou dans l'hexane (courbe grise pointillée).

Tout d'abord, les trois courbes présentent un profil similaire. Quelques pics exothermiques sont détectés à partir de 200 °C, associés à des pollutions liés au solvant aqueux ionique utilisé pour l'agrégation des particules. Ensuite, le pic exothermique principal est centré sur 570 °C pour les trois nanocomposites. Enfin, la température d'initiation correspondant au début de la réaction, mise en évidence en pointillés sur la Figure 117, est située à environ 490 °C.

Les nanocomposites obtenus à partir d'agrégation de nanoparticules sans fonctionnalisation ADN en solution aqueuse et obtenus à partir de l'assemblage de nanoparticules fonctionnalisées avec des brins d'ADN complémentaires s'initient à plus basse température que lorsque les brins d'ADN ne sont pas complémentaires, avec 490 °C contre 500 °C. Les enthalpies de réaction sont également les plus élevées avec 1,18 et 1,35 kJ.g^{-1} respectivement. Les composites obtenus par assemblage de nanoparticules fonctionnalisées avec des **brins d'ADN non-complémentaires sont nettement moins performant avec 1,00 kJ.g^{-1}** . Enfin, notons que les nanocomposites réalisées dans l'hexane (méthode la plus couramment utilisée dans la littérature et présentée dans le

Chapitre 1) présentent une température d'initiation bien inférieure à environ 440 °C, mais une enthalpie de réaction faible à 0,76 kJ.g⁻¹.

Ces résultats confirment l'apport de l'ADN dans la nanostructuration des agrégats Al-CuO, comme en témoigne l'augmentation de 135 % de l'enthalpie de réaction lorsque les brins d'ADN sont complémentaires. L'ADN a donc un véritable impact dans l'organisation des nanoparticules. Cependant, de façon surprenante, l'enthalpie de réaction de l'agrégat sans ADN est également très élevée. Ceci s'explique par la structure de ces composites. Ainsi, sont présentées en Figure 118 les images TEM des deux composites.

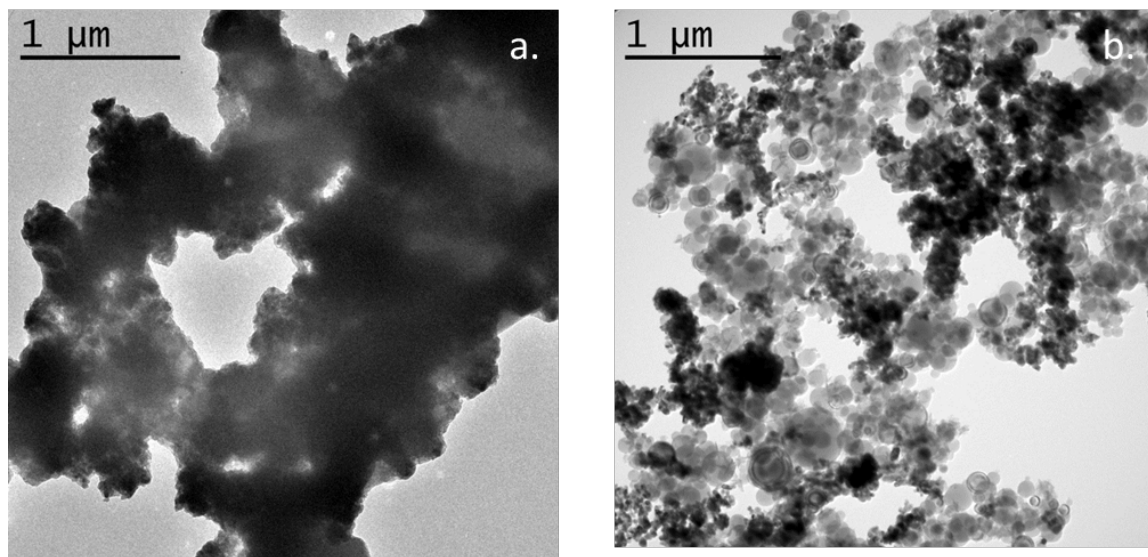


Figure 118 : Images TEM des nanocomposites réalisés par mélange de nanoparticules d'Al et de CuO (a) et par assemblage avec des brins d'ADN optimisés et complémentaires (b).

Le nanocomposite **sans ADN** apparaît tout d'abord beaucoup plus épais que celui réalisé avec les **brins d'ADN complémentaires**, qui est plus étalé sur la surface. On note également des figures géométriques nettes dans le premier cas, témoins de la présence de cristaux de NaCl qu'on ne retrouve pas dans le nanobiocomposite. Cette épaisseur plus importante dans le cas du nanocomposite **sans ADN** montre que l'agrégation des particules se fait de façon équivalente dans toutes les directions de l'espace de façon irréversible, gardant cette structure au moment du séchage.

L'analyse EDX en HR-TEM de ces deux poudres, présentée en Figure 119, confirme que les processus d'agrégation diffèrent dans les deux cas.

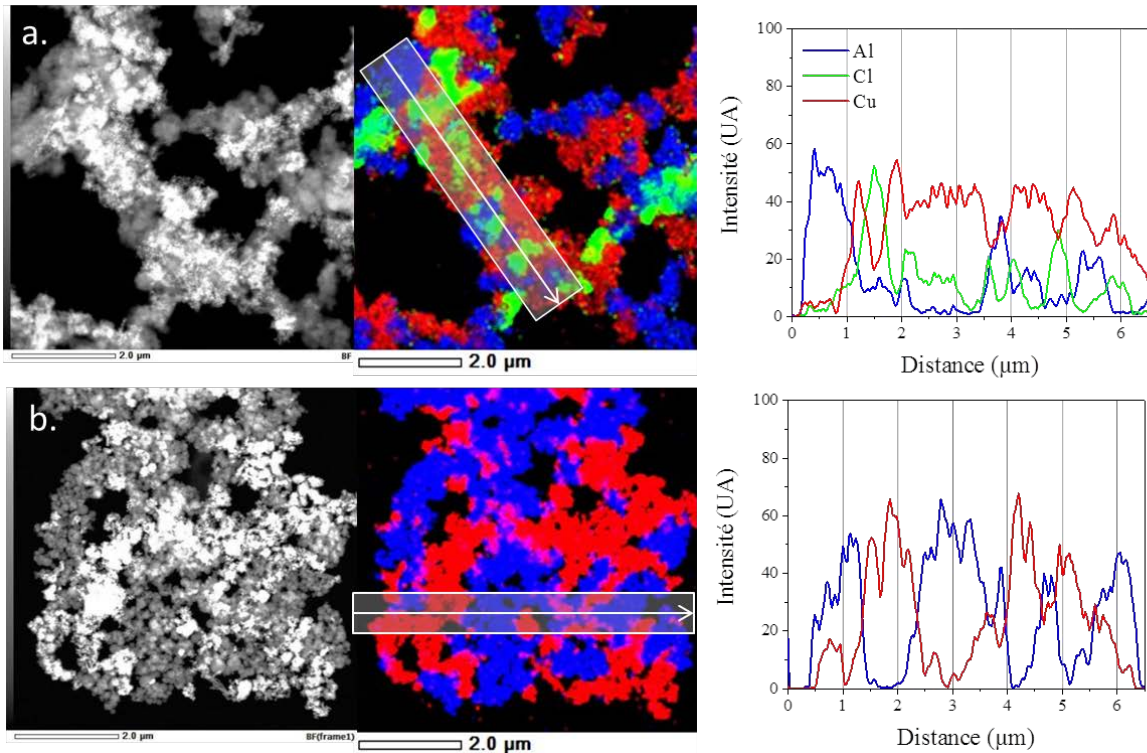


Figure 119 : Images TEM en champs sombre, cartographies élémentaires de l'Al (bleu), du Cu (rouge) et du Cl (vert), et composition élémentaire d'une tranche de nanocomposites Al-CuO obtenus par agrégation de nanoparticules d'Al et de CuO sans ADN (a) et par assemblage avec des brins optimisés et complémentaires (b).

On observe de façon nette la présence de l'élément Cl dans le nanocomposite sans ADN, qui témoigne de la présence de cristaux de NaCl comme ossature du composite compte tenu de sa disposition. Par ailleurs, on note que la distribution des éléments Al et Cu est très fine avec l'alternance d'éléments entre 200 et 500 nm. Par contre, les cristaux de NaCl sont totalement absents du nanobiocomposite (avec ADN), mais l'homogénéité semble du même ordre de grandeur que celui sans ADN. Une analyse quantitative des éléments Al, Cu, O et Cl analysée en plusieurs endroits du composite et à différents grossissements confirme l'absence de Cl dans les composites avec ADN et est donnée en *Annexe 13*.

Ces résultats permettent de comprendre comment l'organisation du nanocomposite se met en place durant l'agrégation et surtout le séchage. Lorsqu'il n'y a pas d'ADN pour diriger le placement des particules, l'organisation se fait de façon aléatoire et autour des cristaux NaCl lors de leur formation, au moment du séchage. Si la quantité de NaCl est suffisamment faible, l'intimité des particules est très bonne et leur alternance très fine, ce qui explique les propriétés thermiques élevées.

Au contraire, lorsque les particules sont fonctionnalisées avec ADN, leur assemblage se fait en solution aqueuse de façon dirigée et optimisée. Au moment du séchage, le composite est déjà créé et NaCl ne cristallise pas au sein du matériau. Les performances

énergétiques sont également très bonnes grâce à une intimité forte des particules et à une distribution très homogène. **Le caractère aléatoire des enthalpies de réaction ne se retrouve pas lorsque l'assemblage des particules est assuré par ADN, avec un résultat moyen de $1,25 \pm 0,05 \text{ kJ.g}^{-1}$** obtenus à partir de quatre échantillons distincts (les trois autres échantillons obtenus avec des longueurs de *spacer* différentes sont présentés en *Annexe 14*).

Enfin, les performances énergétiques faibles du composite réalisé dans l'hexane s'explique par une distribution des nanoparticules d'Al et de CuO très mauvaise car non contrôlée, comparativement aux deux nanocomposites précédents. L'observation TEM et analyse EDX de ces agrégats, présentées en Figure 120, montrent en effet d'importants amas de CuO entre 0,5 et 1,5 μm de diamètre et un taux d'Al bien moins important. La cartographie élémentaire et le graphique présentant la distribution des éléments confirment cette impression visuelle : le nanocomposite est composé à 75 % de CuO et 25 % d'Al.

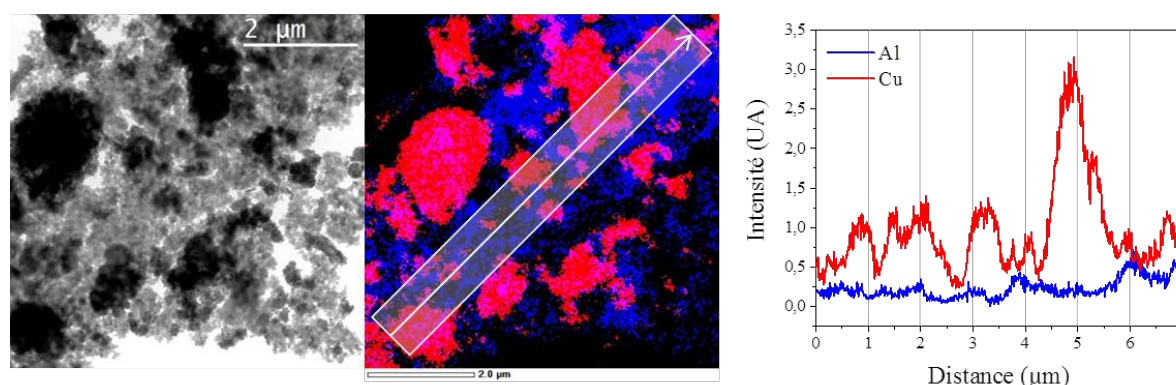


Figure 120 : Image TEM, cartographies élémentaires de l'Al (bleu) et du Cu (rouge) et composition élémentaire d'une tranche d'un agrégat Al-CuO obtenu dans l'hexane.

6.4. Influence de la structure et de la cinétique d'agrégation sur les propriétés énergétiques des nanocomposites

Nous souhaitons tout d'abord déterminer l'influence de la structure du nanobiocomposite, impactée par la cinétique d'agrégation des particules, sur les performances énergétiques. Pour cela, nous avons réalisé deux systèmes :

1. Un nanobiocomposite obtenu à forte concentration en NaCl (250 mM), suivant donc une cinétique de type DLCA et produisant un agrégat dendritique, ouvert et peu dense.

2. Un nanobiocomposite obtenu à faible concentration de NaCl (35 mM) suivant une cinétique d'agrégation de type RLCA et produisant un agrégat plus dense.

Pour chacun de ces deux systèmes, les brins d'ADN sont des **brins optimisés**, composés d'une partie « codée » de la séquence de 15 bases (*cf.* Tableau 19) et d'un *spacer* de 15 bases T. Les cinétiques d'agrégation sont présentées en Figure 121 et les structures observées au SEM en Figure 122.

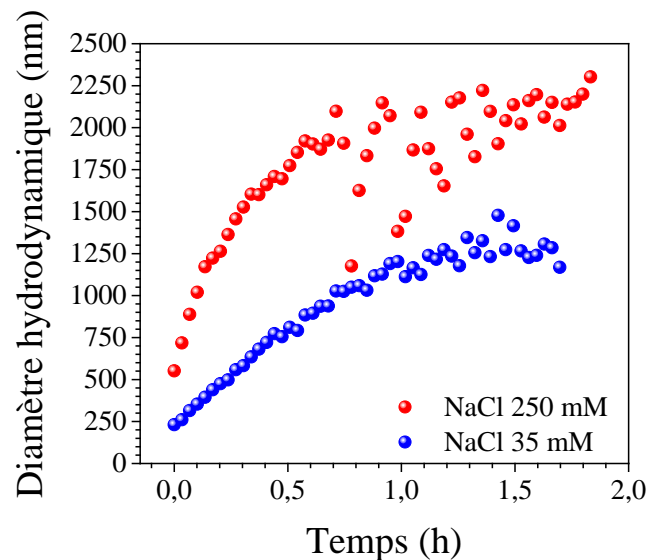


Figure 121 : Cinétique d'agrégation des nanobiocomposites Al-CuO obtenus avec des brins d'ADN complémentaires optimisés pour une concentration en NaCl de 250 mM (courbe rouge) et de 35 mM (courbe bleue).

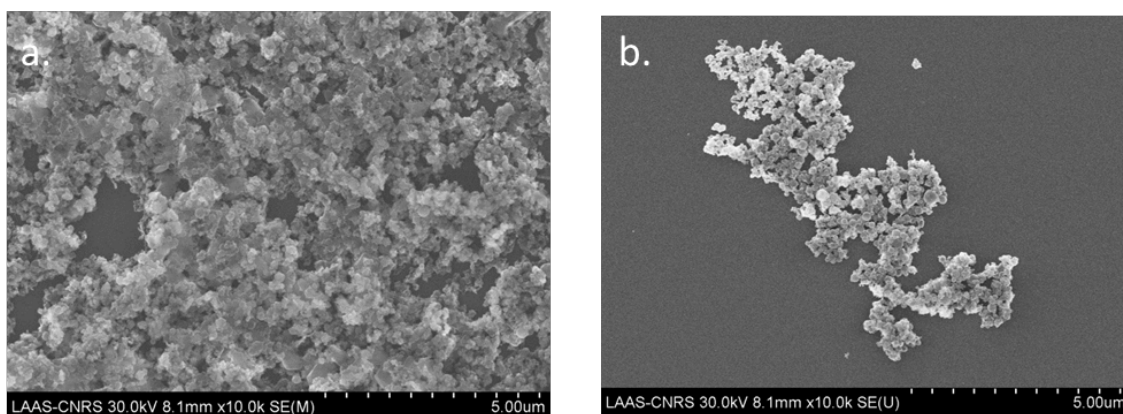


Figure 122 : Images SEM des nanobiocomposites Al-CuO obtenus avec des brins d'ADN complémentaires et optimisés pour une concentration en NaCl de 250 mM (a) et de 35 mM (b).

Les images SEM montrent une bonne homogénéité dans le mélange de nanoparticules d'Al et de CuO, mais également des différences structurelles fortes. A faible concentration de NaCl (Figure 122 (b)), l'agrégat est plus étalé, moins gros, et assez dense malgré la présence de quelques trous de taille toujours inférieure à 1 μm , conformément à la cinétique d'agrégation lente assurée par l'hybridation des brins complémentaires de la Figure 121, propre au régime RLCA. A forte concentration de NaCl (Figure 122 (a)), la taille de l'agrégat est beaucoup plus importante, et les particules semblent agglomérées sur plus de 10 μm^2 . On peut également noter que les particules semblent prisonnières de cristaux de NaCl, qui se distinguent clairement par leur forme géométrique bien définie. L'aspect dendritique attendu pour le régime d'agrégation DLCA est peu visible ici à cause du nombre beaucoup plus important de nanoparticules. Or, la structure contient tout de même de nombreux trous de taille plus importante et variable entre 0,2 μm et 8 μm , comme le confirment d'autres images SEM présentées en *Annexe 15*. De plus, on peut observer que l'aspect visuel dense de l'image (a) est induit par la superposition des nanoparticules, renforçant l'impression de compacité.

Cependant, les signaux DSC de ces deux nanobiocomposites présentés en Figure 123 confirment la différence structurelle forte des deux agrégats.

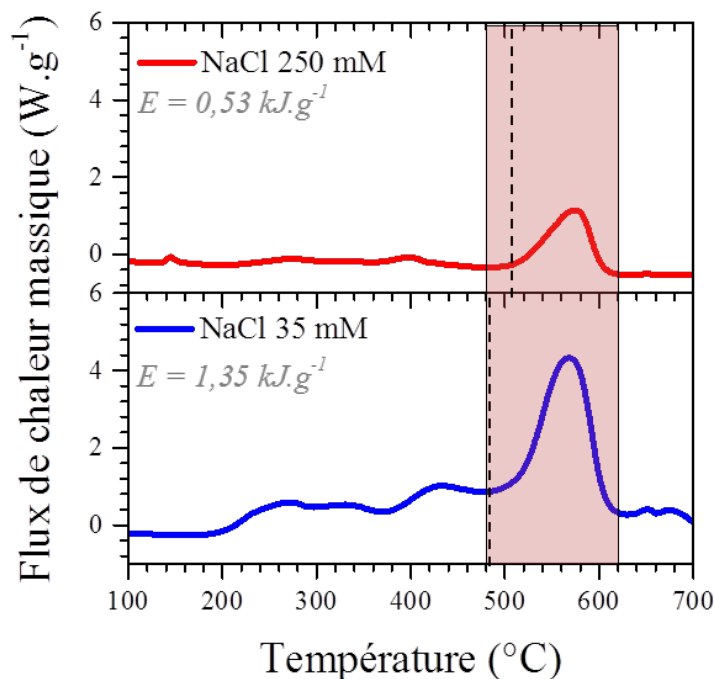


Figure 123 : Courbes DSC des nanobiocomposites Al-CuO obtenus avec des brins d'ADN complémentaires optimisés pour une concentration en NaCl de 250 mM (courbe rouge) et de 35 mM (courbe bleue).

Les performances énergétiques du nanobiocomposite Al-CuO obtenu avec une concentration en NaCl élevée de 250 mM sont très nettement inférieures à celles du composite réalisé avec une concentration en NaCl faible de 35 mM, avec une enthalpie de réaction de seulement $0,53 \text{ kJ.g}^{-1}$ et une température d'initiation de $505 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ces performances amoindries s'expliquent d'une part par l'inclusion des particules dans les cristaux de NaCl. Or, NaCl étant un matériau réfractaire, il ne participe pas à la production de chaleur et flegmatise le composite en éloignant les nanoparticules d'Al et de CuO et empêchant le transfert d'oxygène de l'oxyde au métal. D'autre part, la présence de trous et la structure dendritique ouverte imposée par le régime d'agrégation DLCA, bien que peu mise en évidence sur les images SEM, participent également à la flegmatisation du matériau. Lors de la combustion, en plus d'éloigner les éléments Al et CuO, ces trous d'air refroidissent localement le matériau, limitant de fait la diffusion des espèces.

Ces résultats justifient donc le choix du régime d'agrégation RLCA.

Pour finir, l'effet de la taille du brin d'ADN sur les performances énergétiques a également été étudié, et est présentée en *Annexe 14*. Ce paramètre ne semble pas avoir d'influence forte sur les enthalpies de réaction.

7. Conclusion

Nous avons montré dans ce chapitre que la fonctionnalisation de nanoparticules d'Al et de CuO par des brins d'ADN a une réelle influence dans l'organisation des nanoparticules dans le nanobiocomposite final, et impacte fortement ses propriétés énergétiques.

Plus précisément, nous avons validé que l'ADN dirigeait l'assemblage, pour une concentration saline comprise entre 35 et 45 mM. Nous avons mis en évidence les deux régimes d'agrégation en fonction de la concentration saline, impactant la densité des structures des nanocomposites finaux. Nous avons également identifié l'existence d'interactions non-spécifiques intervenant dans les processus d'agrégation, dont nous avons grandement limitées l'influence en optimisant la partie « codée » de la séquence du brin d'ADN.

Nous avons montré que l'utilisation de brins d'ADN pour assembler les nanoparticules améliore de 135 % l'enthalpie de réaction des nanobiocomposites. Cependant, nous avons démontré que les nanocomposites élaborés à partir de nanoparticules d'Al et de CuO non-fonctionnalisées permettait d'obtenir des performances énergétiques équivalentes, voire supérieures, ce qui est expliqué par une densité plus forte des composites.

En conclusion, le contrôle de l'organisation des nanoparticules d'Al et de CuO, clairement améliorée par la fonctionnalisation ADN, n'est pas le seul paramètre clé pour optimiser l'enthalpie de réaction, mais l'intimité physique des particules et la densité du composite semblent impacter tout autant ces propriétés énergétiques. Cette discrimination n'avait alors jusqu'à présent jamais été démontrée, et renforce l'idée de l'utilisation de l'ADN comme organisateur du composite. En variant sa taille ou les conditions expérimentales d'agrégation, il serait possible de contrôler l'intimité des particules et la densité du matériau final.

8. Perspectives : vers une optimisation du procédé d'assemblage et une intégration de nanobiocomposites Al-CuO

8.1. Traitement thermique des nanoparticules agrégées

Nous avons vu dans les travaux de la littérature l'intérêt du recuit des assemblages à une température proche de la température de fusion des brins d'ADN. L'idée repose sur la désagrégation complète des nanocomposites en se plaçant à une température supérieure à la température de fusion des brins afin de « réinitialiser » l'agrégation, puis de se placer à une température juste inférieure à la température de fusion afin de se placer dans les conditions thermodynamiques favorables à l'hybridation d'un maximum de brins et d'optimiser l'organisation des particules. Des expériences préliminaires ont montré qu'il est ainsi possible d'améliorer la distribution et la cristallisation des particules par recuit des nanobiocomposites. Les Figure 124 et Figure 125 montrent les cinétiques d'agrégation et les analyses de composition des agrégats réalisées par HR-TEM.

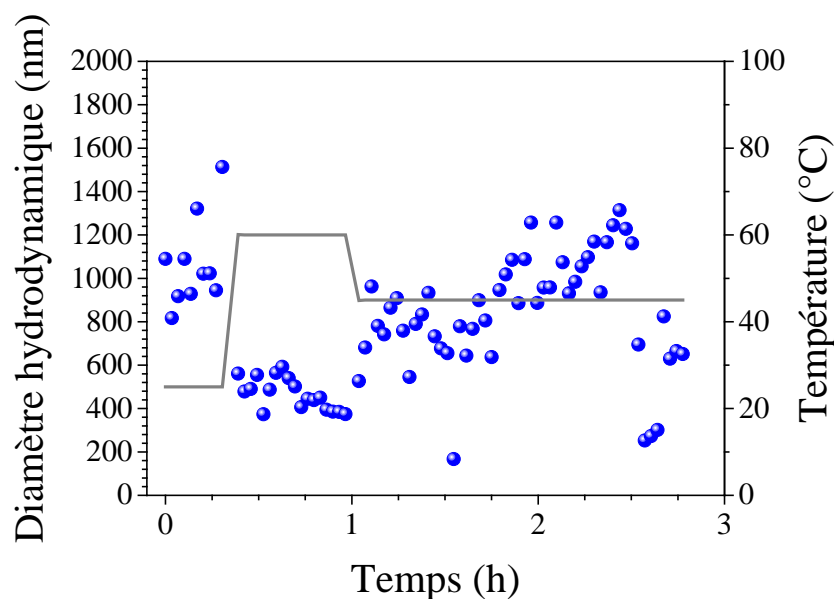


Figure 124 : Evolution du diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules d'Al et CuO fonctionnalisées avec des brins d'ADN complémentaires en fonction de la température, pour une concentration en NaCl de 45 mM.

Le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules d'Al et de CuO fonctionnalisées avec des brins d'ADN complémentaires optimisés en fonction de la température est donné sur la Figure 124. Après assemblage à 25 °C, la température est augmentée à 60 °C pendant 30 min pour dé-hybrider l'ADN, avant de repasser à 45 °C pendant 10 h. On observe alors que le diamètre hydrodynamique diminue à 400 nm alors

qu'il était de 1 500 nm après l'assemblage. A 45 °C, le diamètre hydrodynamique moyen augmente à nouveau progressivement, avec une cinétique d'agrégation plus lente, jusqu'à atteindre 1 400 nm, permettant d'obtenir un agrégat plus dense.

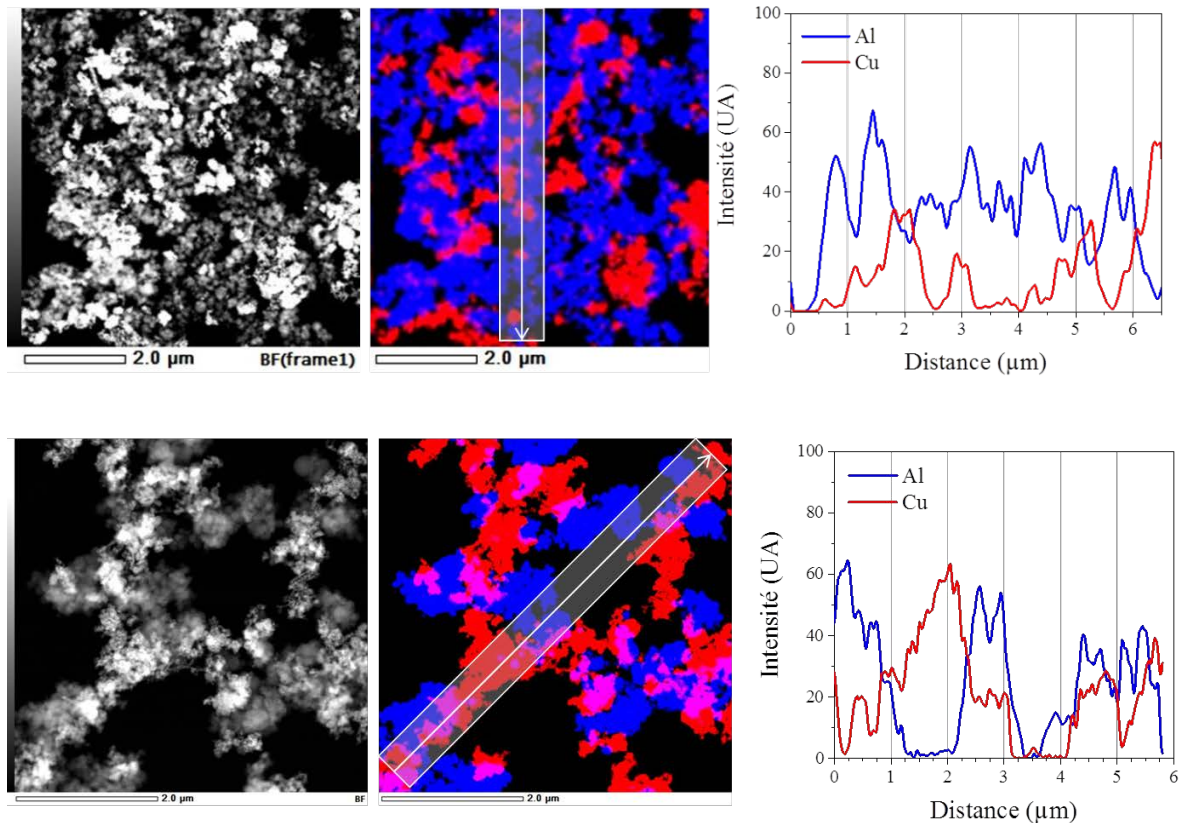


Figure 125 : Image TEM en champs sombre, cartographies élémentaires de l'Al (bleu) et du Cu (rouge) et la composition élémentaire d'une tranche du nanobiocomposites Al-CuO ayant subi des recuits en température pendant l'assemblage.

Les images et cartographies élémentaires obtenues par HR-TEM présentées en Figure 125 montrent en effet un agrégat particulièrement dense et bien distribué, comme en témoignent les diagrammes montrant l'alternance des éléments Al et Cu (inférieure à 0,5 μm) sur la tranche analysée. Ces observations ont été confirmées par l'analyse quantitative des éléments, moyennée sur plusieurs endroits de l'échantillon à différentes échelles, et comparée à celles présentées précédemment et reportée en Figure 126.

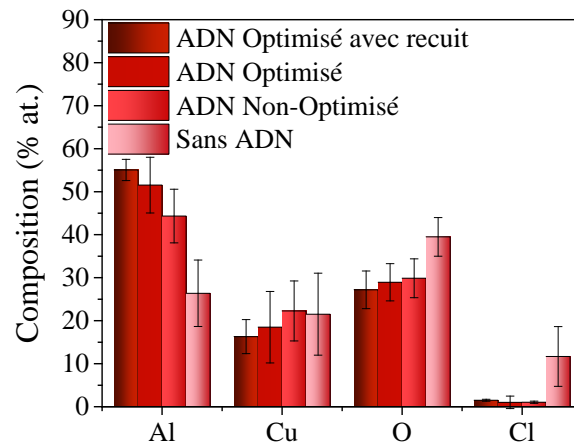


Figure 126 : Comparaison de la composition de nanocomposites Al-CuO Sans ADN, Avec ADN optimisé, avec ADN non-optimisé et avec ADN optimisé et recuit en température.

L'écart type sur les éléments Al et Cu sont bien moins importants que sur les agrégats n'ayant pas subi de recuits en température (ADN Optimisé, ADN Non-Optimisé et Sans ADN, sur la Figure 126).

8.2. Intégration des nanobiocomposites sur puce électronique

Enfin, la perspective principale de ces travaux tient dans l'intégration de ces nanobiocomposites à la structure et aux propriétés thermiques maîtrisées sur puces microélectroniques, à l'image des travaux menés au LAAS depuis une décennie avec des matériaux nanothermites sous forme de multicouches d'Al et de CuO déposées par pulvérisation cathodique.

8.2.1. Impression Jet d'encre

La première voie d'intégration explorée au LAAS consiste à utiliser la technologie « Jet d'encre » pour déposer alternativement des microgouttelettes de solutions colloïdales. La technologie est schématisée en Figure 127 ci-dessous.

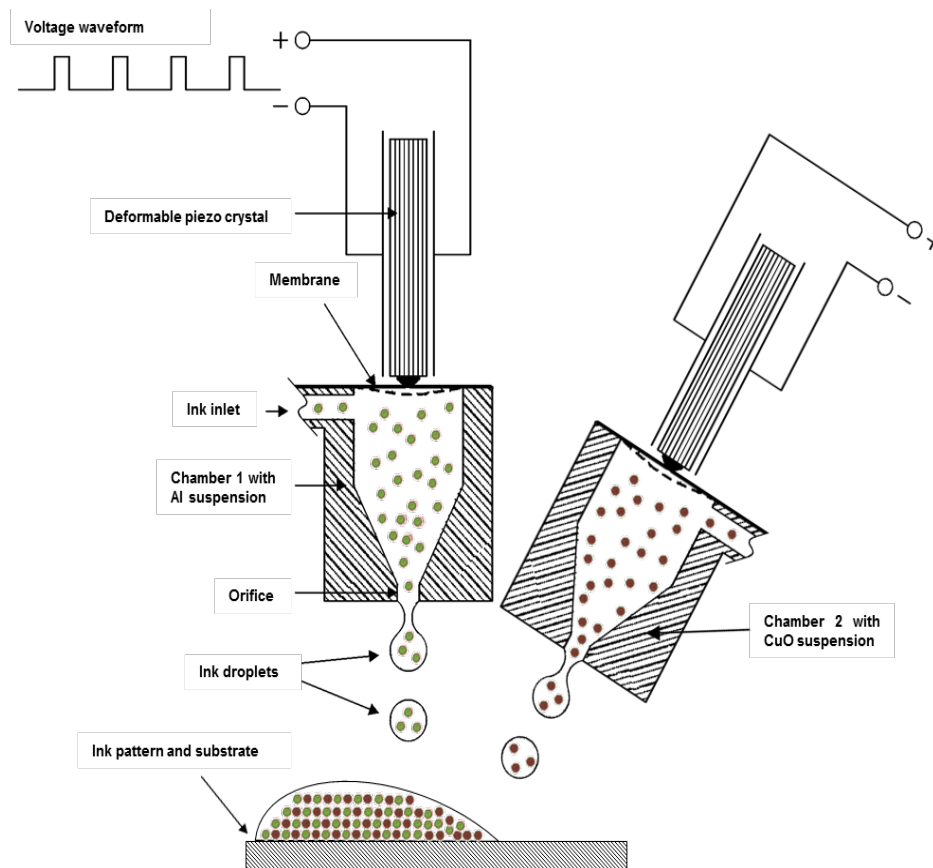


Figure 127 : Schéma représentant le fonctionnement de la technologie « Jet d'encre ».

L'idée consiste à former des microgouttelettes par application d'un champ électrique à un cristal piézo-électrique qui, en se déformant, appuie sur une membrane en contact avec la chambre contenant la solution colloïdale. L'extrémité de la chambre est constituée d'une buse de diamètre $260\ \mu\text{m}$. Cette technique permet de contrôler le volume de gouttes déposées, d'alterner les gouttes de chacune des deux solutions colloïdales, et donc possiblement de maîtriser l'assemblage des nanoparticules au fur et à mesure du dépôt de gouttes. Celles-ci sont déposées sur des puces microélectroniques de dimension $1,8 \times 3,8\ \text{mm}^2$, dont une photographie est donnée en Figure 128.

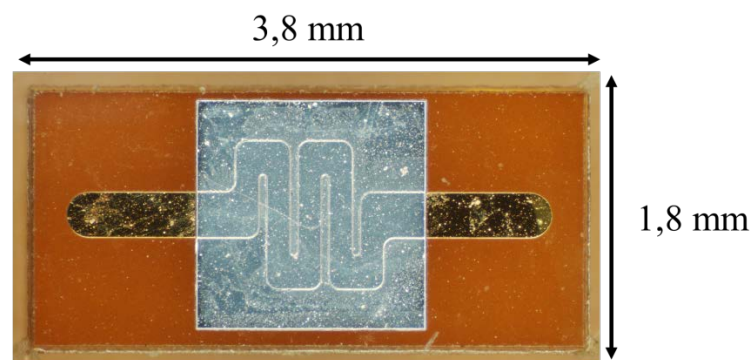


Figure 128 : Photographie de puces micro-électroniques utilisées pour le dépôt de nanoparticules d'Al et de CuO.

Les difficultés principales de cette technologie sont liées à la solution aqueuse utilisée dans notre cas, contenant des tensioactifs et des sels rendant difficile la répétabilité des dépôts. Beaucoup de paramètres sont également à prendre en compte, liées à l'encre (concentration en nanoparticules, composition, tension de surface et mouillabilité, pH...), à la surface utilisée (mouillabilité, fonctionnalisation pour faire adhérer les nanoparticules, température) et aux conditions de dépôt (tension appliquée au cristal piezo-électrique, fréquence du cristal, nombre de gouttes successives...). Des études préliminaires réalisées dans le cadre de cette thèse ont permis de mettre en place le protocole de dépôt successif d'encres composées de nanoparticules d'Al et de CuO fonctionnalisées avec des brins d'ADN, ainsi que l'influence de certains paramètres comme le nombre de gouttes successivement déposées nécessaire au dépôt d'une monocouche de nanoparticules (phénomène illustré en Figure 129). Mais un important travail d'optimisation est aujourd'hui nécessaire pour d'une part couvrir complètement la puce de nanobiocomposites, mais aussi pour en assurer l'adhérence sur la puce.

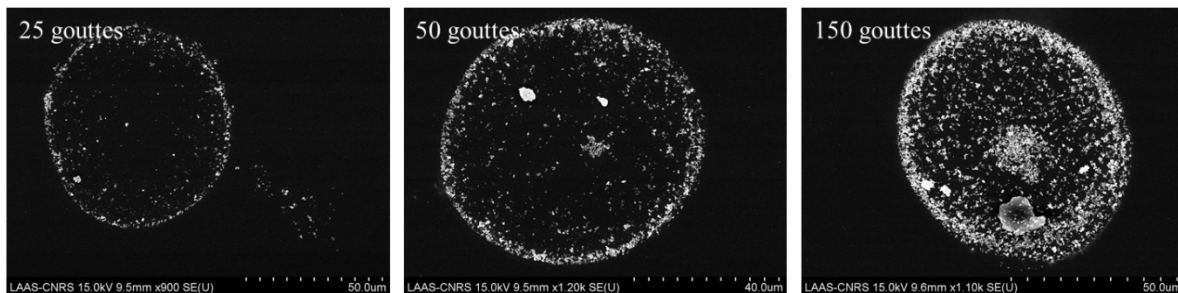


Figure 129 : Illustration de l'influence du nombre de gouttes déposées sur la taille et l'homogénéité du dépôt.

8.2.2. Dépôt par électrophorèse

La deuxième voie de dépôt étudiée dans le cadre de cette thèse est le dépôt par électrophorèse. Le principe de base consiste à faire migrer des nanoparticules chargées et dispersées en solution colloïdale par application d'un champ électrique exercé entre deux électrodes. Le principe est schématisé en Figure 130.

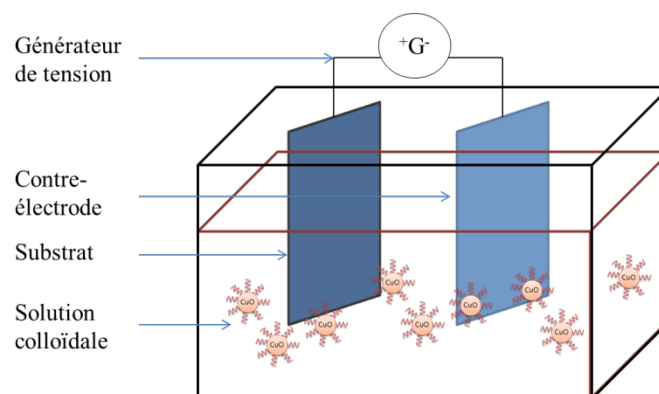
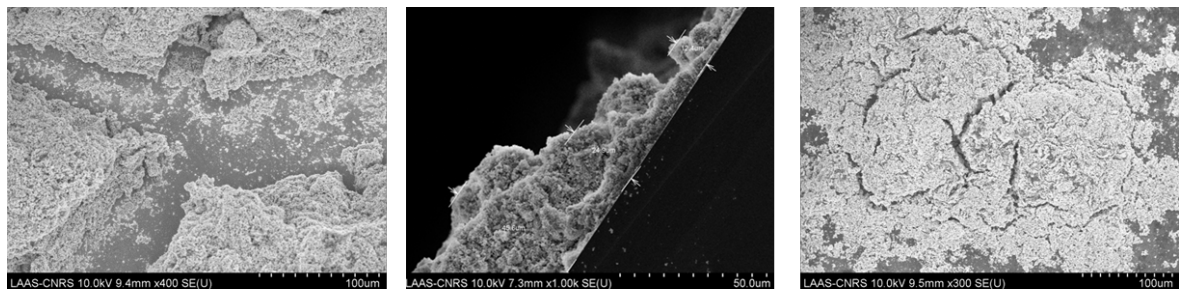


Figure 130 : Schéma présentant le principe de fonctionnement de l'électrophorèse.

La qualité du dépôt dépend là encore de nombreux paramètres liées à la solution colloïdale (concentration en nanoparticules et charge de surface, composition de la solution...), à la surface utilisée comme électrode (nature de la surface) et aux conditions de dépôt (valeur de la tension, courant alternatif ou continu, durée d'expérimentation...). Cette technique a l'avantage de pouvoir traiter simultanément de grosses quantités de nanoparticules. De même, l'alternance de solutions colloïdales d'Al et de CuO est envisageable pour réaliser des multicouches de nanoparticules. L'inconvénient majeur de la technique tient par contre en la quasi-obligation d'utiliser un solvant non-aqueux. En effet, l'eau sous l'effet du champ électrique s'hydrolyse, produisant du dihydrogène gazeux responsable de la formation de bulles sur la surface où le dépôt est réalisé.

Quelques travaux préliminaires ont pu être réalisés permettant de mettre en place la technologie et de valider la faisabilité du procédé de dépôt de nanoparticules d'Al ou de CuO non-fonctionnalisées et dispersées dans une solution composée d'eau et d'éthanol (10 et 90 % vol. respectivement). Le dépôt a pu être réalisé sur surface d'or et de silicium. Les images MEB illustrent le type de dépôt obtenu en fonction de la tension appliquée et la durée d'expérimentation. Nous pouvons voir que les dépôts sont denses et épais, de l'ordre du μm . Cependant, la présence de craquelures est détectée et le dépôt n'est pas homogène sur l'ensemble de la surface.



Dépôt de CuO sur or
(14 min, 250 V)

Dépôt d'Al sur Si
(6 min, 100 V)
Faciès de rupture

Dépôt de CuO sur Si
(10 min, 250 V)

Un important travail d'optimisation des paramètres de dépôt est nécessaire pour obtenir des dépôts homogènes, moins épais et non-fragmentés. La réalisation de multicouches nécessite également un travail sur le procédé d'alternance des bains colloïdaux. Mais les travaux préliminaires valident l'efficacité de la méthode, qui apparaît plus rapide que la technologie « Jet d'encre ». Dans ces travaux, les nanoparticules n'ont pas été fonctionnalisées par ADN. L'intérêt de cette fonctionnalisation pour ce procédé doit en effet être étudié et discuté dans les travaux futurs.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans un contexte de recherche poursuivi au LAAS depuis maintenant plusieurs années, portant sur la synthèse de matériaux énergétiques et leur intégration dans des dispositifs micro-électroniques. Cette thématique portée par une équipe de recherche multidisciplinaire dirigée par Carole Rossi et Alain Estève tient sa richesse dans l'accompagnement et le développement du matériau, de sa phase d'élaboration à son intégration et à son utilisation, d'un point de vue aussi bien expérimental que théorique. Dans ce cadre, mes travaux de thèse ont porté sur l'ouverture des méthodes de synthèse de matériaux énergétiques de type nanothermite traditionnellement étudiées dans l'équipe, l'élaboration de multicouches d'Al et d'oxydes, à un procédé d'élaboration particulièrement innovant mais source de nombreuses difficultés : l'utilisation de l'ADN pour la manipulation de nanoparticules et le contrôle de leur assemblage. Cette utilisation de l'ADN, inspirée par les importants progrès en biologie génétique, pour organiser et ordonner un système hétérogène composé de deux matériaux, l'Al et le CuO, à l'échelle nanométrique et parvenir ainsi à un contrôle des performances énergétiques, est à ce jour encore très originale dans la thématique.

En introduction générale, nous avons identifié trois enjeux principaux sur le développement de cette biotechnologie pour la synthèse de matériaux énergétiques :

- **Technologique**, en développant des procédés de fonctionnalisation fiables et reproductibles de nanoparticules d'Al et CuO propres à une utilisation technologique.
- **Compréhension du matériau**, en développant les outils et méthodologies permettant de comprendre les mécanismes de greffage des bioéléments sur les particules inorganiques d'une part, puis les interactions régissant l'agrégation des particules d'autre part.
- **Applicatif**, en optimisant les deux premiers points en vue de développer un matériau énergétique aux performances contrôlées et modifiables, puis en explorant les technologies de report de ces matériaux sur puce électronique.

Dans le Chapitre 1, nous avons présenté et défini les nanothermites, une classe de matériaux énergétiques composites alliant deux éléments, un métal et un oxyde métallique. L'avancement de la recherche sur ces matériaux au cours des dernières décennies a montré que la nanostructuration était une voie prometteuse pour l'amélioration des performances énergétiques. Cependant, de nombreux verrous technologiques liés à la manipulation et le contrôle des nano-particules et aux problématiques d'interface devenant primordiales à cette échelle nécessitent le développement de nouvelles solutions technologiques. A ce titre, les nanotechnologies ADN apparues et développées depuis plus de deux décennies apparaissent être le candidat idéal en réponse à cette problématique. Cependant, ces nanotechnologies portant

quasiment exclusivement sur les matériaux nobles ou plasmoniques comme l'or, nécessitent un vrai développement pour s'adapter aux constituants des matériaux énergétiques de type thermites. Nous avons cependant pu identifier une stratégie générique de fonctionnalisation puis d'assemblage de nanoparticules d'Al et de CuO, en quatre étapes :

1. Stabilisation des nanoparticules en solution aqueuse.
2. Greffage de l'intermédiaire protéinique, la Streptavidine, en surface des nanoparticules.
3. Greffage des brins d'ADN complémentaires fonctionnalisés par un groupe biotine à une des deux extrémités sur la surface des nanoparticules par la formation du complexe biotine-Streptavidine
4. Mélange des deux solutions colloïdales et agrégation des nanoparticules dirigée par l'hybridation des brins d'ADN complémentaires en nanobiocomposite énergétique.

Avant de développer les protocoles de fonctionnalisation des nanoparticules, nous nous sommes intéressés dans le Chapitre 2 aux interactions physico-chimiques entre brins d'ADN et surfaces oxydées. Après avoir identifié les fortes affinités chimiques entre la base Thymine de l'ADN et la surface d'alumine à travers l'exploration de nombreuses conditions expérimentales, cette étude nous a permis de répondre à deux questions. D'abord, nous avons justifié par cette étude la stratégie de greffage de l'ADN identifiée dans le Chapitre 1, basée sur la reconnaissance biomoléculaire entre la biotine, groupe fonctionnel présent sur le brin d'ADN, et la Streptavidine, préalablement greffée à la surface. Sans cette stratégie, la conservation de la spécificité de l'ADN peut être perdue à cause d'un étalement du brin sur la surface de la nanoparticule. Ensuite, nous avons identifié une source potentielle d'interactions non-spécifiques entre nanoparticules indésirables pour la mise en place de protocoles reproductibles.

Dans le Chapitre 3, nous avons présenté un protocole précis et répétable permettant la fonctionnalisation de nanoparticules d'Al ou de CuO avec des brins d'ADN. Nous avons caractérisé précisément chaque étape de la fonctionnalisation, rappelées ci-dessus, et avons montré la préservation de la fonctionnalité de l'ADN après greffage. Enfin, les densités de greffage de chaque espèce biologique ont pu être déterminées et optimisées.

Enfin, dans le Chapitre 4, nous avons démontré l'influence de la fonctionnalisation des brins d'ADN sur les cinétiques d'agrégation de nanoparticules, la structure et l'organisation des agrégats obtenus, et en conséquence sur les performances énergétiques des nanobiocomposites ainsi synthétisés. Aussi, nous avons établi l'impact de la densité globale du nanobiocomposite et l'intimité des nanoparticules qui le composent sur les performances énergétiques finales. Nous avons montré la possibilité de contrôler les

performances énergétiques par la stratégie d'agrégation choisie. Pour finir, la fonctionnalisation des nanoparticules d'Al et de CuO par des brins d'ADN a permis de leur donner une réactivité chimique spécifique qui peut s'avérer primordiale et prometteuse pour leur intégration sur dispositifs micro-électroniques.

* *
*

Nous pouvons identifier maintenant plusieurs pistes de travail pour faire suite à ces travaux de thèse. D'abord, la compréhension théorique initiée sur les mécanismes de greffage de l'ADN et la détermination des interactions physico-chimiques peut être poursuivie en plusieurs points. En premier lieu, il serait intéressant de comparer les interactions des différentes bases ADN avec les surfaces oxydées de type Al_2O_3 , à l'image des travaux réalisés sur l'or, afin de mieux déterminer la nature du *spacer* à utiliser. Il serait intéressant dans un deuxième temps de transposer la méthodologie appliquée à l'alumine à l'autre surface oxydée d'intérêt : l'oxyde de cuivre, notamment.

D'autre part, de nombreuses pistes peuvent être explorées pour améliorer l'organisation des nanoparticules dans les nanobiocomposites à court ou long terme, dont quelques-unes ont pu être abordées dans le manuscrit. Tout d'abord, il apparaît intéressant de poursuivre les analyses de composition élémentaires par EDX et microscopie électronique, afin de qualifier et quantifier l'influence de brins d'ADN optimisés par rapport à des brins non-optimisés ou non-complémentaires sur une plus large gamme d'échantillons, afin d'obtenir des tendances statistiquement pertinentes. Ensuite, il serait intéressant de poursuivre les analyses thermiques des assemblages réalisés sans ADN, afin de valider le caractère aléatoire des propriétés énergétiques par rapport au nanobiocomposite auto-assemblé par ADN. L'exploration d'autres voies d'écrantage de nanoparticules fonctionnalisées permettant d'initier l'agrégation sont également à explorer, comme l'utilisation d'autres sels plus volatils à base de carbonates, ou l'utilisation de sels pouvant participer à la combustion des nanobiocomposites.

Il apparaît également primordial de caractériser in-situ, *i.e.* en solution aqueuse, la morphologie des nanocomposites et comparer leur organisation au cours de leur formation. La technologie couplant microscopie électronique et cryogénie peut être une voie intéressante, en gelant la solution à un instant bien choisi de l'agrégation. De même, le suivi optique de l'agrégation des particules est également possible en même temps que l'étude par DLS.

Le développement des technologies de report doit également être poursuivi, et de nombreuses voies d'amélioration peuvent être explorées. En premier lieu, la préparation de la surface d'intérêt par la fonctionnalisation de groupes chimiques, à base d'ADN ou non, est la première étape à l'établissement d'un nanobiocomposite organisé et fiable sur puce micro-électronique. Ensuite, il peut être nécessaire de transposer les procédés de fonctionnalisation dans d'autres solvants plus adaptés aux procédés de micro-

électronique : éthanol, éthylène glycol, isopropanol... En effet, des procédés de solidification de liaisons ADN par encapsulation silanées ont déjà été mis au point et peuvent être adaptés à notre cas d'étude.

Enfin, la maîtrise de la synthèse par voie liquide des nanoparticules d'Al et CuO permettrait une amélioration conséquente sur l'élaboration de solutions colloïdales de nanoparticules fonctionnalisées. En effet, elle permettrait d'une part de maîtriser et de réduire la taille des nanoparticules, et donc de limiter leur disparité, identifiée dans ces travaux comme réelle difficulté. D'autre part, il pourrait être possible de fonctionnaliser directement les nanoparticules lors de leur formation. Cette perspective fait l'objet d'une thèse démarrée en 2016 au LAAS en collaboration avec le Laboratoire de Chimie de Coordination de Toulouse.

Après avoir exploré ces voies d'amélioration pour mieux maîtriser la cristallisation de l'assemblage organisé de nanoparticules, la complexification du système sera envisageable. Ainsi, ajouter une troisième ou une quatrième nanoparticule ou ajouter des fonctions chimiques sur les brins d'ADN offre de réelles perspectives à plus long terme pour rendre le nanobiocomposite multifonctionnel et intelligent, c'est-à-dire adaptable à son environnement. Ce travail constitue donc les bases d'un vaste champ de recherche

Annexes

Annexe 1. Description des techniques expérimentales

Spectroscopie FTIR

La spectroscopie FTIR permet l'analyse précise de la composition chimique d'un matériau ou d'une surface par l'étude de son absorbance du rayonnement Infra-Rouge. Typiquement, l'absorbance du matériau est analysée dans la gamme moyen IR (4 000 à 400 cm^{-1}), correspondant au domaine vibrationnel des atomes. Le principe de base repose sur l'existence d'une fréquence spécifique à laquelle des atomes liés peuvent effectuer des mouvements couplés, fréquence dépendant de la masse des atomes et de la force de liaison. Chaque liaison possède un mode vibratoire propre, dépendant de la nature des atomes en jeu et de leur environnement proche (nombre et nature des liaisons, symétries du groupe d'atomes). Ainsi, en balayant l'échantillon à analyser dans une large gamme spectrale, il est possible de déterminer la signature IR du matériau et d'identifier les bandes d'absorbance des différents groupements moléculaires le composant.

Deux méthodes principales permettent une analyse de l'énergie absorbée pour chaque longueur d'onde :

- Analyser l'absorbance IR du matériau en faisant varier successivement les longueurs d'ondes de lumières monochromatiques. C'est le principe de la **spectrométrie dispersive**, utilisé pour la spectroscopie UV-visible.
- Envoyer simultanément une combinaison de lumières monochromatiques et moduler cette combinaison au cours du temps. Les pertes en absorbance sont collectées dans un interférogramme puis converties en spectre par ordinateur. C'est le principe de la **Transformée de Fourier**.

L'analyse IR par Transformée de Fourier permet une mesure plus rapide que l'analyse dispersive en étudiant simultanément l'absorbance de l'échantillon à plusieurs longueurs d'onde tout en améliorant la résolution spectrale. La lumière utilisée, dite à large bande car couvrant tout le moyen IR, traverse un interféromètre de Michelson, composé de deux miroirs, un fixe et un mobile, permettant de moduler les fréquences traversant le matériau. Le dispositif expérimental est schématisé en Figure 131. En déplaçant le miroir mobile motorisé à différentes vitesses, il est possible de faire varier la combinaison de fréquences du faisceau traversant l'échantillon en bloquant certaines fréquences. Le signal obtenu se présente sous la forme d'un interférogramme, *i.e.*, montrant l'intensité lumineuse en fonction de la position du miroir (en cm), puis est traité par la transformée de Fourier en convertissant l'interférogramme en spectre, *i.e.*, montrant l'intensité lumineuse en fonction du nombre d'onde, exprimée en cm^{-1} .

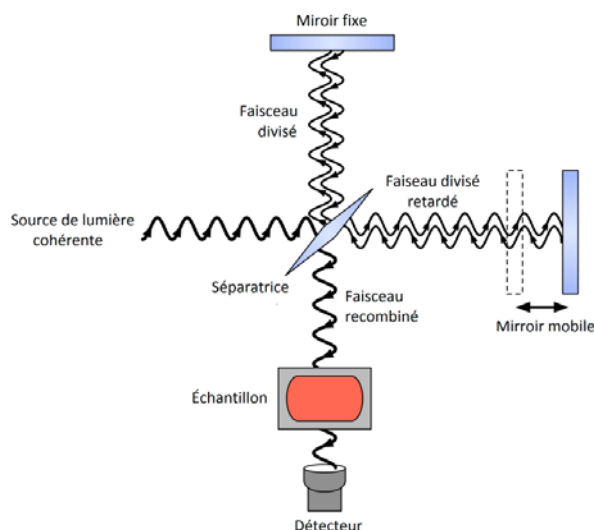


Figure 131 : Schéma de principe de l'utilisation de l'interféromètre de Michelson dans le cas de l'analyse Infra-Rouge par Transformée de Fourier. Un rayon cohérent émis par une source lumineuse IR est divisé sur une séparatrice en deux faisceaux. Le premier faisceau est réfléchi par un miroir fixe sur la séparatrice tandis que le deuxième est réfléchi sur un miroir mobile, imposant un retard par rapport au premier. Les deux faisceaux sont enfin recombinés en un faisceau à combinaison de longueur d'onde variable traversant l'échantillon. Le faisceau résultant est enfin détecté, collecté pour plusieurs positions du miroir mobile en un interférogramme, puis traité par transformée de Fourier.

Comme dit précédemment, le spectre obtenu après analyse FTIR donne les fréquences absorbées par l'échantillon, correspondant aux liaisons atomiques présentes dans l'échantillon. L'intensité de l'absorbance à chaque fréquence absorbée est directement corrélée à la concentration de la liaison chimique. Donc l'analyse du spectre peut être aussi bien qualitative que quantitative. Pour s'affranchir de la pollution des échantillons et de l'absorbance IR du substrat, un premier spectre de l'échantillon est réalisé avant sa modification (spectre de référence), qui est soustrait aux spectres réalisés après modification de la surface. Le spectre résultant de la soustraction est le spectre analysé.

Enfin, il existe de nombreux montages expérimentaux FTIR permettant l'analyse d'une large gamme d'échantillons, qu'ils soient surfaciques, particulaires, en solution ou sous forme de gel. Nous nous sommes focalisés dans cette étude sur deux montages expérimentaux :

- **Par transmission** : le faisceau IR traverse le substrat. Cette technique a été utilisée pour déterminer les spectres d'absorbance des surfaces avant et après réaction avec la dTMP.
- **Par Réflectance Totale Atténuée (ATR)** : le faisceau est réfléchi au sein d'un cristal type diamant de façon perpendiculaire puis est analysé. Cette méthode a été utilisée pour la mesure des spectres IR de la dTMP gélifiée commerciale.

Une description succincte des deux méthodes et de leur différence est proposée dans les deux sections suivantes.

Spectroscopie FTIR par transmission

En traversant l'échantillon, une partie de l'intensité du faisceau IR est absorbée. A sa sortie, le faisceau modifié est collecté et son intensité mesurée. En considérant I_0 l'intensité du faisceau à l'entrée de l'échantillon, et I l'intensité en sortie, on définit la transmission T , ou transmittance, par le rapport :

$$T = I/I_0 \quad (\text{A.1})$$

Usuellement, on définit l'absorbance A du matériau par rapport à la transmittance de la façon suivante :

$$A = \log\left(I_0/I\right) \quad (\text{A.2})$$

Après conversion du signal de l'intensité lumineuse en fonction de la position du miroir par transformée de Fourier, on définit le spectre soit en transmittance, soit en absorbance, Dans la suite du chapitre, on étudiera les spectres en absorbance.

Dans notre cas, les spectres IR des films minces en transmission sont obtenus avec un angle de 70° entre l'échantillon et le faisceau lumineux, et une résolution de 4 cm^{-1} en utilisant le spectromètre Thermo Nicolet 6700 FTIR équipé d'un détecteur DTGS, Les mesures sont réalisées dans une boîte à gant sous atmosphère neutre (N_2 avec une concentration en O_2 et H_2O contrôlée et inférieure à 0,1 ppm). Les spectres d'absorbance réalisés dans le moyen IR ($4\,000 - 399 \text{ cm}^{-1}$) sont calculés par différence de trois spectres de 500 scans des échantillons modifiés avec trois spectres de 500 scans des échantillons avant modification. Les neuf spectres obtenus sont finalement moyennés.

Spectroscopie FTIR par ATR

L'ATR repose sur le principe de la réflectance totale d'un faisceau lumineux à la surface de l'échantillon ou à l'interface entre deux milieux (solide-liquide par exemple). L'échantillon est déposé sur un cristal à haut indice de réfraction (le diamant par exemple), transparent aux IR. Un rayon incident traverse le cristal puis est réfléchi à l'interface entre le cristal et l'échantillon, possédant généralement un indice de réfraction inférieur. Or, une onde issue du faisceau IR pénètre sur quelques μm l'échantillon, c'est le phénomène de réflectance optique. Une partie de l'intensité de cette onde, appelée onde évanescente, est absorbée par le matériau. C'est donc la réflectance totale atténuée qui est analysée après réflexion sur le cristal. Afin d'augmenter la qualité du signal, le faisceau est réfléchi plusieurs fois au sein du cristal. Le schéma de principe est présenté en Figure 132.

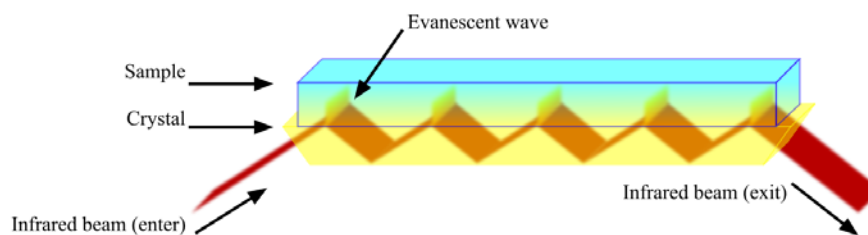


Figure 132 : Schéma de principe de la Réflectance Totale Atténuée (ATR).

La réflectance R du matériau se définit par le rapport entre I_0 , l'intensité réfléchie d'un matériau non-absorbant, et I_R l'intensité réfléchie du matériau étudié :

$$R = I_R / I_0 \quad (\text{A.3})$$

Spectroscopie XPS

La spectroscopie XPS est une méthode d'analyse surfacique permettant d'obtenir la composition chimique d'un matériau sur une profondeur d'une dizaine de nanomètres. Tous les éléments sont détectables par cette technique, à l'exception de l'hydrogène et de l'hélium. Elle repose sur l'émission de photoélectrons des éléments de surface après radiation par une source de rayons X. Les photons produits par la source de rayons X possèdent alors une énergie suffisante pour arracher les électrons de cœur, par effet photoélectronique. Ces électrons, appelés photoélectrons, passent alors dans le vide avec une énergie cinétique E_C . Ils sont collectés par un analyseur et classés suivant leur énergie cinétique. On peut déterminer leur énergie de liaison E_B par la relation de conservation d'énergie :

$$E_B = h \cdot \nu - E_C \quad (\text{A.4})$$

Avec h la constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J.s), ν la fréquence de radiation (en s^{-1}) et $h \cdot \nu$ l'énergie du photon incident, E_B l'énergie de liaison de l'électron avant ionisation et E_C l'énergie cinétique de l'électron dans le vide, en eV.

D'un point de vue pratique, l'équipement XPS est constitué de trois parties majeures : la source de rayons X, l'échantillon, et l'analyseur déterminant les énergies des électrons collectés, couplé à un système de détection et de comptage. Leur disposition est schématisée en Figure 133.

Les rayons X sont produits par une source monochromatique, qui est constituée d'une anode recouverte d'un élément comme l'Al irradié par un faisceau d'électrons de très haute énergie. La surface est ensuite ionisée, et les électrons émis sont collectés par un analyseur hémisphérique filtrant l'énergie des électrons de façon à déterminer leur énergie cinétique. Après tri, les électrons sont comptés et le spectre est obtenu par traitement informatique, montrant l'intensité électronique en fonction de l'énergie de liaison. Ainsi, des pics apparaissent au niveau des énergies de liaison des atomes détectés. Typiquement, une

première expérience consiste à balayer la gamme d'énergie de la source (1 486,6 eV pour la raie $K\alpha$ de l'Al) afin de déterminer l'ensemble des éléments. Une analyse plus précise est effectuée dans un second temps élément par élément. La mesure se fait sous ultra-vide (10^{-9} à 10^{-10} mbar).

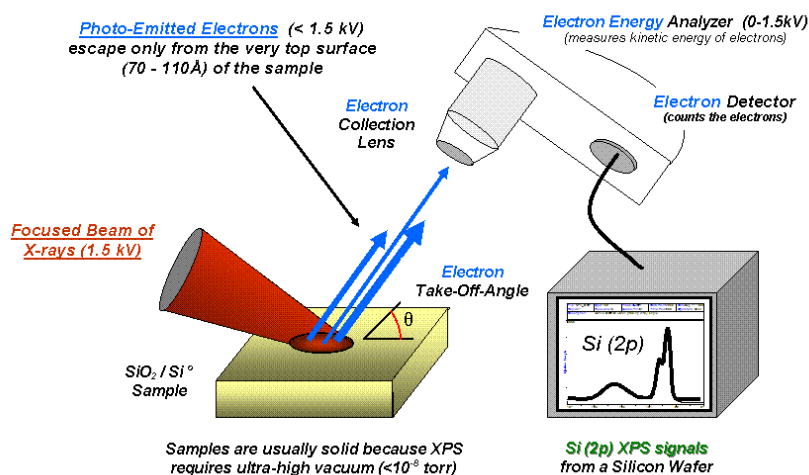


Figure 133 : Schéma de principe de la Spectroscopie Photoélectronique par rayon X (XPS).

Cette méthode permet une détermination des éléments atomiques, leur proportion respective par intégration des pics, et la nature de leur liaison ou degré d'oxydation pouvant induire des décalages de pics à cause de variations d'énergies des électrons de cœur d'atomes engagés dans des liaisons.

Analyse DSC

Sous l'effet de la chaleur, les matériaux changent et se transforment. Ces transformations de phase peuvent nécessiter de l'énergie extérieure ou dégager de l'énergie dans le système. Ces phénomènes sont alors de nature endothermique ou exothermique. Typiquement, lors de la combustion d'une nanothermite, l'oxydation de l'Al est de nature exothermique, tandis que la fusion de l'Al est endothermique. La DSC permet de mesurer ces transformations de phase.

Deux échantillons sont placés dans une même enceinte : un échantillon est vide et ne subit pas de transformation de phase, il sert de référence, tandis que l'autre contient l'échantillon à analyser. L'appareil mesure ensuite la puissance électrique (en Watts) nécessaire pour maintenir une température identique pour l'échantillon et la référence. Seule l'analyse DSC permet une évaluation quantitative des chaleurs de réaction, ou enthalpies, par la mesure de différence d'énergie. Cette technique se différencie de l'Analyse Thermique Différentielle, qui mesure une différence de température entre deux échantillons dans des enceintes distinctes.

Annexe 2. Assignment du spectre IR de la dTMP par DFT

Tableau 20 : Assignment des bandes d'absorption de la dTMP mesurées par ATR et calculées par DFT sur la molécule isolée. La numérotation des atomes suit celle de la Figure 28. Les parties Thymine, Sucre et Phosphate sont notées T, S et P respectivement. Les modes de vibration sont notés st, (stretching), tw, (twisting), ro, (rocking), wa (wagging), b, (bending), sc, (scissoring), um, (umbrella), sy, (symmetric), as (asymmetric). Enfin, les intensités sont notées vs pour très intense, s intense, m moyenne, w faible, vw très faible.

Fréquences IR	Intensité	Fréquences calculées	Intensités calculées	Assignment aux modes vibrationnels
1682	vs	1691	vs	T: C2=O2 st., NH b,
1662	vs	1662	vs	T: C4=O4 st., NH b,
		1643	w	T: C5=C6 st., CH b,
1478, 1438	m	1446-1417	w	T: CH ₃ sc, S: CH b., CH ₂ sc,
1369	vw	1273-1389	vw	T: NH b., CH b., CH ₃ um, S: OH b., CH b., CH ₂ ro,
1274,5	m	1257	ms	T: N1-C6 st., CH b., NH b, S: CH b., OH b., CH ₂ ro,
1201	vw	1167-1218	mw	T: C2-N3 st., C5-CH ₃ st., CH b, S: OH b., CH b, CH ₂ tw,
1060 (1020-1160)	vs	1099, 1120	vs	P: P-O as, st, S: CH tw,
		1109	ms	T: N1-C2 st., C2-N3 st, TS: N1-C1' st, S: C1'-C2' st., CH ₂ tw,
		1087	m	T: N1-C2, C2-N3 st, TS: N1-C5' st, S: C3'-C4' st., C4'-C5' st., CH ₂ tw,
		1053	m	T: N1-C2, C2-N3 st, TS: N1-C1' st, S: C3'-C4' st., C4'-C5' st., CH ₂ tw, S, P: C5'-O st,
		1041	s	S: C1'-C2' st., C2'-C3' st., CH ₂ tw, S, P: C5'-O st,
		1022	s	S: C-C st,
971 (920-990)		1001	m	T: CH ₃ wa,
		969	m	S: C2'-C3' st,
		955	s	T: CH ₃ ro, S: C4'-O st,
		928	s	P-O-Al sy, st,
		919	w	S: C4'-O st., C1'-O st,
740-856		896	w	S: CH ₂ tw., CH tw,
		889	w	T: CH out of plane b,
		851	w	S: CH ₂ wa,
		766	w	T: in plane ring deformation S: ring deformation
		762	m	T: out of plane ring deformation
		730	w	T: out of plane ring deformation S: ring deformation

Annexe 3. Configuration de la dTMP sur surface Al_2O_3 dans les calculs DFT

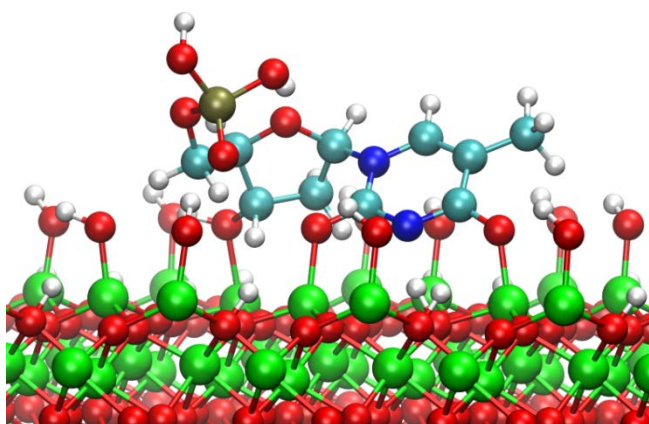
Configuration 1

Mode d'adsorption : Couché avec groupe P relevé

Thermodynamique : 3 molécules d'eau désorbées

Interactions covalentes et électrostatiques :

- * T : 2 C-O-Al + transfert de H du NH
- * S : -Al-OH-C
- * P : Liaison hydrogène entre (-OH) et P=O



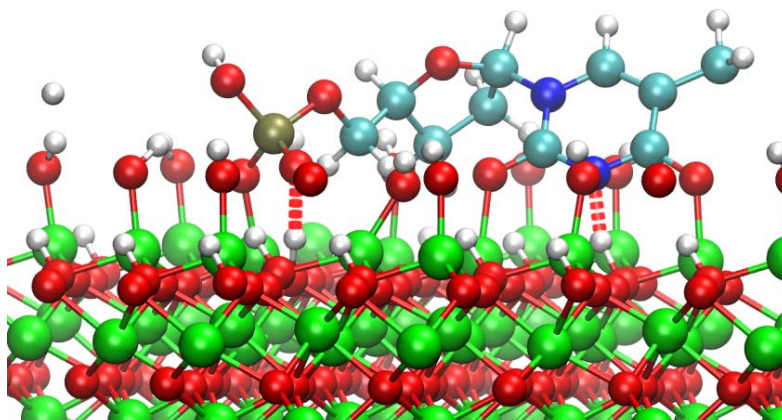
Configuration 2

Mode d'adsorption : Couché

Thermodynamique : 4 molécules d'eau désorbées

Interactions covalentes et électrostatiques :

- * P : P=O devient P-O-Al
H venant de P-OH forme liaison H entre -H et le nouveau -P=O
- * T : 2 C-O-Al + transfert de H du NH
- * S : Al ---OH-C



Configuration 3

Mode d'adsorption : Couché avec les C=O de T relevées

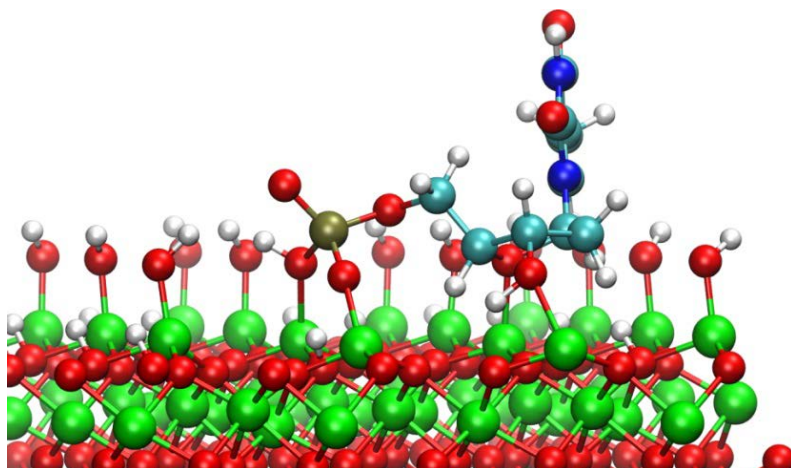
Thermodynamique : 4 molécules d'eau désorbées

Interactions covalentes et électrostatiques :

* P : P-OH forme P-OH-Al + P-OH forme P-O-Al + avec transfert d'H entre les 2

* S : Al ---OH-C + O - Al

* T : Pas d'interaction à cause d'une forte répulsion



Configuration 4

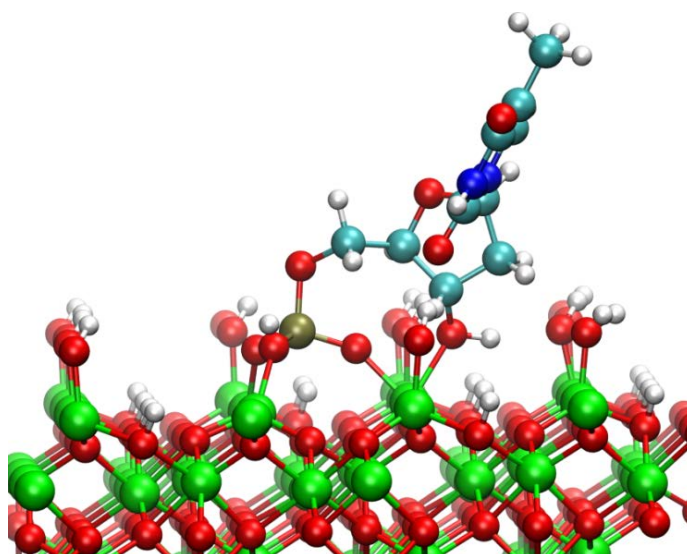
Mode d'adsorption : Debout avec T relevée

Thermodynamique : 3 molécules d'eau désorbées

Interactions covalentes et électrostatiques :

* P : 2 x P-OH forment 2 x P-O-Al + avec transfert d'H + P=O forme P-O-Al

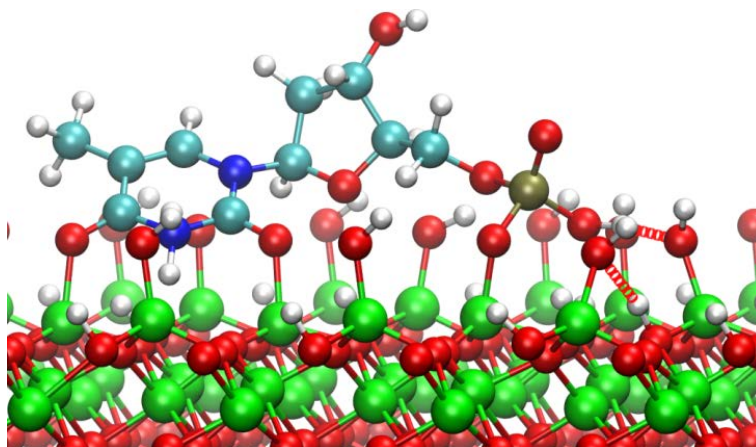
* S : Al ---OH



Configuration 5**Mode d'adsorption :** Couché**Thermodynamique :** 3 molécules d'eau désorbées**Interactions covalentes et électrostatiques :**

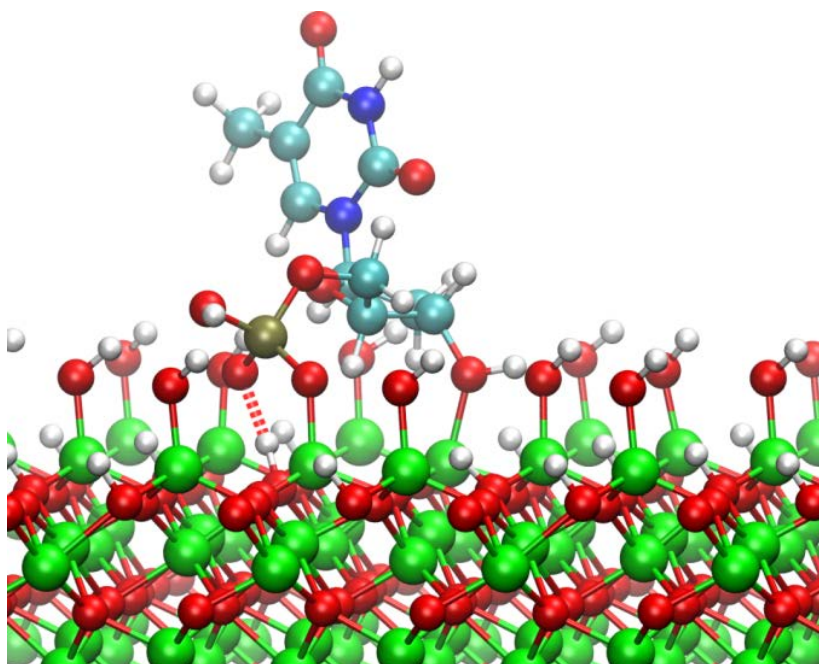
* P : P-OH forme P-O-Al + transfert d'H+ 2 liaisons H entre P-OH et 2(-OH)

* T : 2 C-O-Al

**Configuration 6****Mode d'adsorption :** Debout avec T relevée**Thermodynamique :** 2 molécules d'eau désorbées**Interactions covalentes et électrostatiques :**

* P : P=O forme P-O-Al + transfert d'H de P-OH en liaison H entre -H et P=O

* S : Al --- OH



Configuration 7

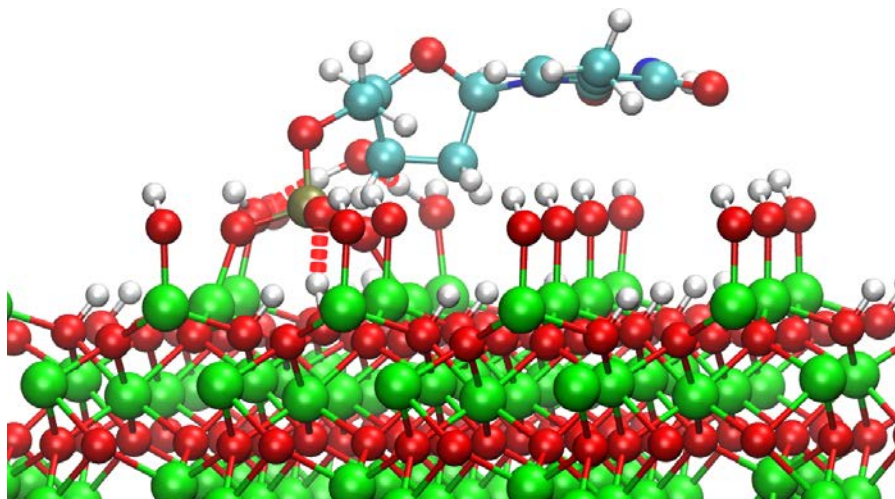
Mode d'adsorption : Debout

Thermodynamique : 2 molécules d'eau désorbées

Interactions covalentes et électrostatiques :

* P : P=O forme P-O-Al + P-OH forme -O-Al + H transfer + P-O ---H-
de la surface

* S : Liaison H entre -OH et (-OH)de la surface



Configuration 8

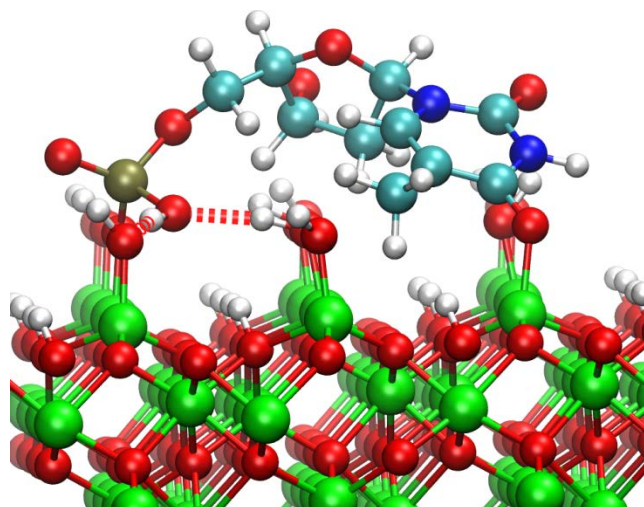
Mode d'adsorption : Couché

Thermodynamique : 2 molécules d'eau désorbées

Interactions covalentes et électrostatiques :

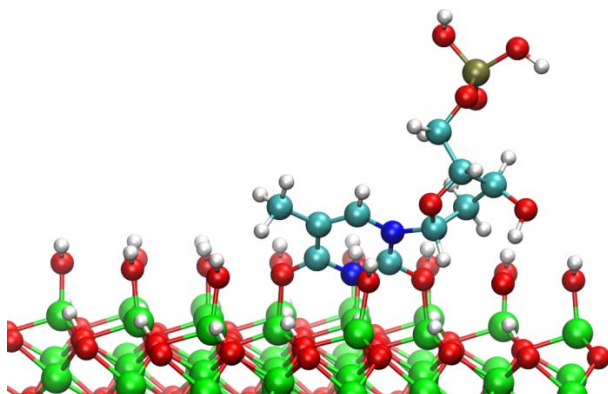
* P : P=O forme P-O-Al + Liaison H entre P-OH et -(OH) de la surface

* T : C-O-Al



Configuration 9**Mode d'adsorption :** Debout avec P relevé**Thermodynamique :** 2 molécules d'eau désorbées**Interactions covalentes et électrostatiques :**

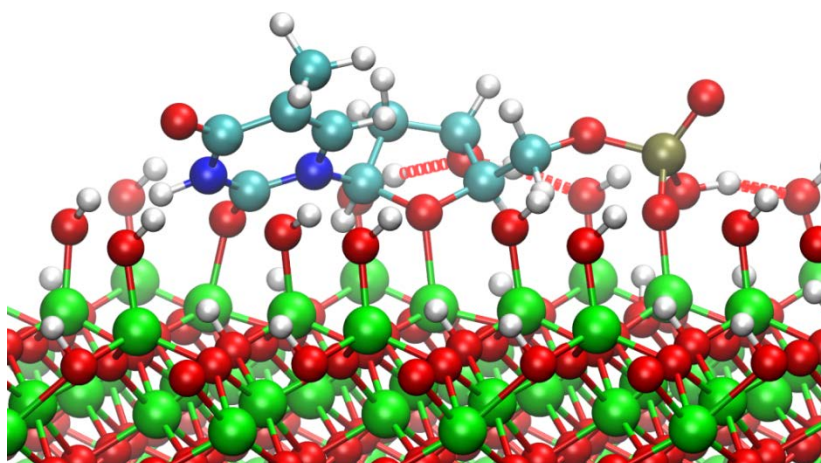
* T : 2 x C-O-Al + transfert d'H de NH

**Configuration 10****Mode d'adsorption :** Couché**Thermodynamique :** 3 molécules d'eau désorbées**Interactions covalentes et électrostatiques:**

* P : P-OH forme P-O-Al + avec transfert d'H + Liaison H entre P-OH et -(OH) de la surface

* T : C-O-Al

* S : O-Al



Annexe 4. Energies correspondants aux 10 configurations de la dissociation de la dTMP sur Al₂O₃

Tableau 21 : Calcul des énergies de dissociation de la dTMP sur surface d'Al₂O₃ pour les 10 configurations présentées en Annexe 3.

Position / Interacting species	Observations (adsorption mode, bonding nature)	Ads, E (eV)
1 / T, S	Lying flat: P up, 3 desorbed molecular water * T: 2 C-O-Al + H transfer from NH * S: -Al-OH-C * P: Hydrogen Bond between (-OH)surf and P=O	-0,95
2 / P, T, S	Lying flat, 4 desorbed molecular water * P: P=O → P-O-Al + H transfer from P-OH forming H bond btw -H and new -P=O * T: 2 C-O-Al + H transfer from NH * S: Al ---OH-C	-1,59
3 / P, S	Lying flat – T: C=O bonds up, 4 desorbed molecular water * P: P-OH → P-OH-Al + P-OH → P-O-Al + H transfer * S: Al ---OH-C + O – Al * T: High repulsive area – no interacting species dTMP deformation: T-S-P angle: 80°	1,24
4 / P, S	Standing: T up, 3 desorbed molecular water * P: 2 x P-OH → 2 x P-O-Al + H transfer + P=O → P-O-Al * S: Al ---OH	0,13
5 / P, T	Lying flat, 3 desorbed molecular water * P: P-OH → P-O-Al + H transfer + 2 H bond between P-OH and 2(-OH) surf * T: 2 C-O-Al	-1,35
6 / P, S	Standing: T up, 2 desorbed molecular water * P: P=O → P-O-Al + H transfer from P-OH forming H bond btw -H and new -P=O * S: Al --- OH	-1,64
7 / P	Standing – no fragment up, 2 desorbed molecular water * P: P=O → P-O-Al + P-OH → -O-Al + H transfer + P-OH → P-O ---H-surface * S: H bond btw -OH and (-OH)surf	-1,15
8 / P, T	Lying flat, 2 desorbed molecular water * P: P=O → P-O-Al + H bond between P-OH and -(OH)surf * T: C-O-Al	-2,01
9 / T	Standing: P up, 2 desorbed molecular water * T: 2 x C-O-Al + H transfer from NH	-1,11
10 / P, T, S	Lying flat, 3 desorbed molecular water * P-OH → P-O-Al + H transfer + H bond between P-OH and -(OH)surf * T: C-O-Al * S: O-Al	-1,63

Annexe 5. Pollution de la surface d' Al_2O_3 lors du dépôt d'ALD

Afin de comprendre l'origine de la contamination liée aux dépôts ALD réalisés, plusieurs analyses XPS ont été réalisées sur substrat SiO_2 après un séjour de 30 min dans la chambre de dépôt ALD, et après traitement de nettoyage décrit dans la section 4.2. du Chapitre 2. Les résultats XPS sont présentés en Figure 134. On peut observer une augmentation de 60 % du taux de carbone après le séjour dans la chambre, surtout dans la zone 284-288 eV qui correspond à la principale contribution du carbone observé à l'XPS avant dépôt de dTMP sur les surfaces d' Al_2O_3 . La même observation est faite après le nettoyage de la surface : une augmentation de 30 % du carbone est observée dans la zone 284-288 eV. Ces expériences confirment l'origine de la pollution des surfaces par des hydrocarbures notée dans les analyses XPS.

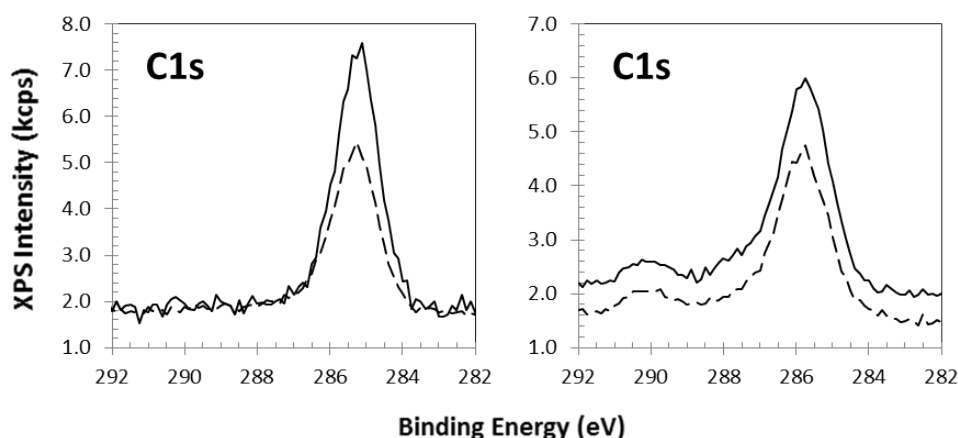


Figure 134 : Spectres XPS de l'élément C sur substrat de SiO_2 avant (ligne pointillée) et après (ligne continue) un séjour de 30 min dans la chambre ALD (spectre de gauche) et après nettoyage de la surface par le protocole décrit en section 4.2. du Chapitre 2.

Annexe 6. Caractérisation de la taille des nanoparticules et de leur potentiel Zeta

Diamètre hydrodynamique

L'appareil Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) permet de mesurer le diamètre hydrodynamique des nanoparticules dispersées en solution, déterminé par Diffusion Dynamique de la Lumière, noté DLA pour *Dynamic Light Scattering*. La technique DLS consiste à étudier la diffusion d'un faisceau laser (He-Ne de longueur d'onde 632,8 nm) par les particules à l'aide d'un détecteur placé à 173° de l'émetteur. Le logiciel détermine à partir de la diffraction du laser une valeur correspondant au diamètre d'une particule sphérique possédant le même coefficient de diffusion en solution que la particule analysée. En solution, dans un solvant de type polaire, la surface des particules se charge à cause de l'adsorption d'ions. Par exemple, en solution aqueuse, la molécule H₂O peut se dissocier et perdre un proton qui s'adsorbe sur l'oxygène de l'oxyde de cuivre ou d'aluminium, fortement électronégatif. La concentration de protons H⁺ à la surface entraîne une différence de potentiel entre la surface et la solution, qui diminue de façon exponentielle en s'éloignant de la surface. Cette différence de potentiel est décrite par le modèle de Gouy-Chapman-Stern établi au début du XX^{ème} siècle (Masliyah and Bhattacharjee, 2006), et définissant deux couches, la couche compacte, dite « de Stern », et la couche diffuse, dite « de Gouy-Chapman » (*cf.* Figure 135). La Figure 135, schéma adapté des travaux de Masliyah *et al.*, (Masliyah and Bhattacharjee, 2006), montre la décroissance exponentielle du potentiel en fonction de la distance de la surface de la particule.

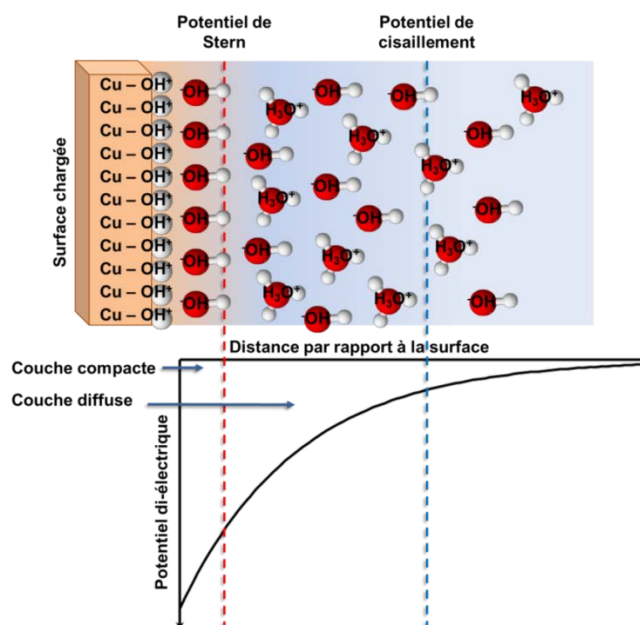


Figure 135 : Schéma représentant le modèle de double couche de Gouy-Chapman-Stern (Masliyah and Bhattacharjee, 2006) présente à la surface de particules solvatées.

La couche la plus proche de la surface correspond à la couche de Stern, où le potentiel est le plus élevé. La deuxième couche correspond à la couche diffuse où l'on observe le potentiel de cisaillement, plus faible, où est mesuré le potentiel Zêta. Ainsi, le diamètre hydrodynamique d'une particule mesuré par DLS correspond au diamètre d'une sphère qui aurait le même comportement de diffusion que la particule. Il prend donc en compte le diamètre de la particule, et l'épaisseur de la double couche de solvation. Le schéma présenté en Figure 136 illustre l'épaisseur du diamètre hydrodynamique moyen tenant compte de cette double couche. Ainsi, le diamètre hydrodynamique moyen dépend de nombreux paramètres, tels que le pH, la concentration en ions, la température et évidemment les espèces chimiques greffées sur la particule, qui influent sur la taille de la particule et l'épaisseur de la double couche.

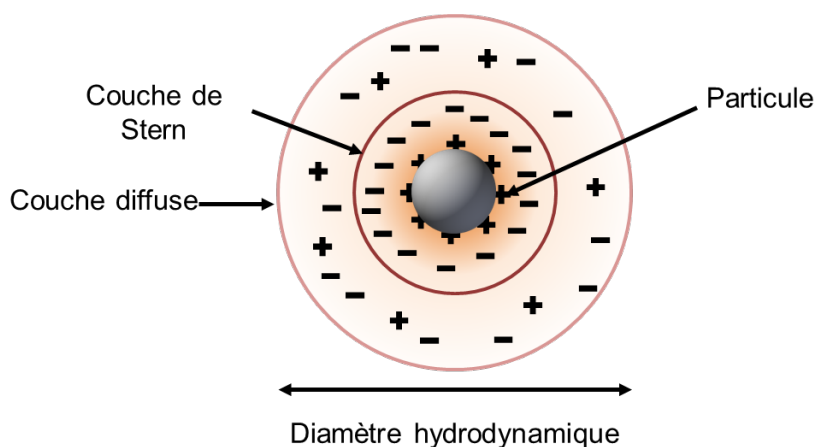


Figure 136 : Schéma représentant le diamètre hydrodynamique d'une particule en solution.

Mesure du potentiel Zêta en surface des nanoparticules

Commençons tout d'abord par définir les termes utilisés par la suite qui décrivent le comportement de particules en solution polaire. Ces termes sont issus des travaux de Robert Hunter (Hunter, 2013).

Electrophorèse : mise en mouvement de particules solides ou liquides dans un liquide ou un gaz sous effet d'un champ électrique. Si ce champ est connu, il est possible de connaître le potentiel de surface. La vitesse de déplacement des particules dépend alors du potentiel Zêta, du champ électrique, de la viscosité du milieu et de la taille de la particule.

Electro-osmose : mise en mouvement d'un liquide autour d'un solide immobile (un solide poreux ou un capillaire par exemple) sous effet d'un champ électrique. Ce champ va mettre en mouvement les ions en solution, qui vont tirer le liquide et le faire bouger. La mesure de la vitesse du liquide donne une information sur la charge de surface et le potentiel électrique proche de la surface.

Potentiel de cisaillement : Lorsque le liquide est mis sous pression à travers un capillaire, il y a création d'un potentiel proche de la paroi dû à l'accumulation de charges amenées par le liquide qui s'oppose à la mise en mouvement du liquide.

Potentiel de sédimentation : Lorsque les particules chargées se mettent en mouvement de sédimentation sous l'effet de la gravitation ou de la centrifugation, elles créent un potentiel de sédimentation. Un mouvement d'ions s'organise autour des particules.

La mesure du potentiel Zêta se base sur l'effet Doppler et est mesuré à l'aide d'un laser He-Ne de longueur d'onde 632,8 nm, identique à celui utilisé pour la détermination du diamètre hydrodynamique. Ce potentiel Zêta correspond à la zone du potentiel de cisaillement après la couche de Stern (voir Figure 135). Il contribue à la stabilité de la solution colloïdale grâce à la répulsion électrostatique, au même titre que le greffage de polymère ou, comme dans notre cas, d'oligonucléotides stabilise les colloïdes grâce à la répulsion stérique. Il est, comme le diamètre hydrodynamique, très dépendant du pH, de la concentration en ions, et de la température. La théorie établie dans les années 40 par Derjaguin, Verway, Landau et Overbeek, dite DVLO, décrit la stabilité d'une solution colloïdale comme la somme de la répulsion électrique de la double couche de la particule (Stern et ionique) et l'attraction de Van der Waals.

La loi de Henry est la loi utilisée pour relier le potentiel Zêta ζ à la mobilité de la particule μ . Elle s'écrit de la façon suivante :

$$\zeta = \frac{3 \times \mu \times \eta}{2 \times \varepsilon \times f(\kappa\alpha)} \quad (\text{A.5})$$

avec ζ le potentiel Zêta, $f(\kappa\alpha)$ la fonction de Henry où κ est le paramètre de Debye et α le rayon de la particule, ε constante diélectrique du milieu, μ la mobilité électrophorétique et η la viscosité dynamique du milieu.

Deux approximations permettent alors de déterminer la valeur de la fonction de Henry. La première approximation, dite de Smoluchowski, considère que la concentration en ions est si élevée que la double couche de solvatation est comprimée. Dans ce cas, la fonction de Henry vaut 1,5. Au contraire, si l'on considère la double couche comme non nulle, la fonction de Henry vaut 1. Dans notre cas, *i.e.* pour les milieux salins et solvants polaires, l'hypothèse de Smoluchowski est l'hypothèse appliquée. Dans ce cas, la loi de Henry est simplifiée et s'écrit :

$$\zeta = \frac{\mu \times \eta}{\varepsilon} \quad (\text{A.6})$$

avec ζ le potentiel Zêta, ε constante diélectrique du milieu, μ la mobilité électrophorétique et η la viscosité dynamique du milieu.

Sous l'effet d'un champ électrique, les nanoparticules se mettent en mouvement qui induit une diffusion de la lumière avec un décalage en fréquence par rapport à la lumière incidente, à cause de l'effet Doppler : c'est-à-dire une fréquence plus élevée à l'avant de la particule et moins élevée à l'arrière. La Figure 137 illustre le phénomène Doppler. Ainsi, en divisant le faisceau incident en deux faisceaux (un faisceau référence ne traversant pas l'échantillon, l'autre traversant l'échantillon), l'appareil recombine les faisceaux et compare leur décalage en fréquence et en phase.

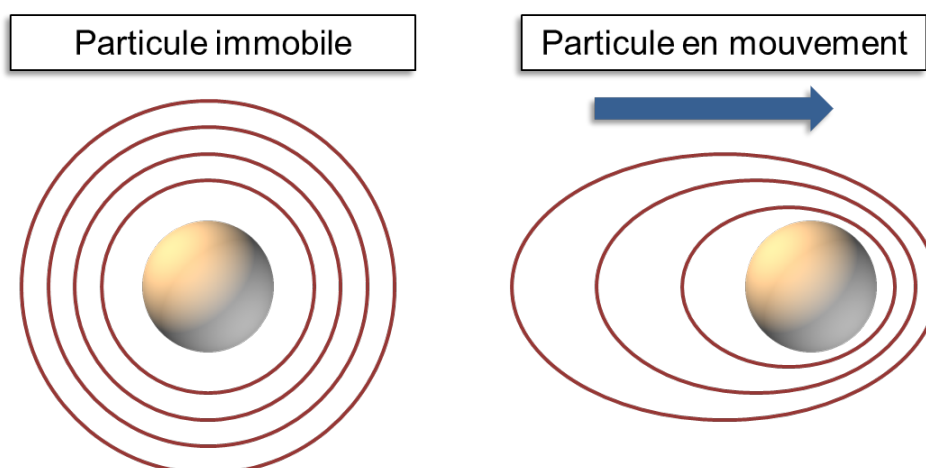


Figure 137 : Schéma présentant la diffusion de la lumière pour une particule fixe, se comportant comme une source ponctuelle (particule de gauche) et une particule en mouvement qui diffuse la lumière avec effet Doppler.

Il est nécessaire de dissocier les deux phénomènes induits par l'application d'un potentiel sur le liquide, *i.e.* le mouvement des particules (électrophorèse) et du liquide (électro-osmose), afin de déterminer le potentiel Zêta. Ainsi, une inversion rapide du potentiel permet de limiter la polarisation des électrodes, et également de rendre l'électro-osmose négligeable devant l'électrophorèse, tandis qu'une inversion lente induit nécessairement une part importante d'électrophorèse. Une combinaison de ces deux modes de polarisation permet d'obtenir un résultat précis du potentiel et est utilisée par l'appareil.

Annexe 7. Plan d'expériences de CuO et d'Al

Tableau 22 : Définition des limites du plan d'expérience de Doelhart à partir desquelles sont définies les sept expériences variant durée de sonication et masse de nanopoudre soniquée pour les solutions colloïdales d'Al et de CuO.

Limites du plan pour CuO	Durée (min)	Masse (mg)		Limites du plan pour Al	Durée (min)	Masse (mg)
min	1	0		min	1	0
max	20	20		max	20	40
	Durée (min)	Masse (mg)	Diamètre moyen expérimental	Durée (min)	Masse (mg)	Diamètre moyen expérimental
Expérience 1	10,5	10	181,9	10,5	10	154,9
Expérience 2	20	10	195,1	20	10	188,3
Expérience 3	15,25	18,66	196,4	15,25	18,66	144,7
Expérience 4	5,75	18,66	185	5,75	18,66	150,3
Expérience 5	1	10	191,8	1	10	159,2
Expérience 6	5,75	1,34	203,3	5,75	1,34	159,1
Expérience 7	15,25	1,34	208,4	15,25	1,34	156,3

Ce plan d'expérience permet d'étudier l'impact de la durée de sonication et la masse de nanopoudre commerciale soniquée sur le diamètre hydrodynamique des particules dispersées en solution colloïdale. Dans le Tableau 22 sont donnés les paramètres de sonication et les diamètres hydrodynamiques des solutions colloïdales correspondantes obtenus. A partir de ces résultats, un modèle est calculé dont la représentation graphique est donnée en section 2.1.1. et 3.1.1. du Chapitre 3.

Annexe 8. Diamètres hydrodynamiques et potentiels Zeta de solutions colloïdales d'Al-Strep et CuO-Strep

Tableau 23 : Diamètres hydrodynamiques et potentiels Zeta de solutions colloïdales de nanoparticules d'Al et de CuO sans fonctionnalisation, avec Streptavidine et avec ADN dans un solvant composé de PB 10 mM et Tween 0,05 %vol.

	Al		CuO	
Sans fonctionnalisation	224	-49,9	187	-46,4
Avec Streptavidine	240	-61,0	230	-60,9
Avec ADN	250	-56,3	240	-57,7

La modification importante des potentiels Zeta du Tableau 23 démontrent le greffage effectif des molécules biologiques, après greffage de la Streptavidine et de l'ADN, avec un gain respectif de -10 et -6,5 mV pour les nanoparticules d'Al, et de -14,5 et 11,3 mV pour les nanoparticules de CuO.

Annexe 9. Calcul du nombre de nanoparticules d'Al

Sachant que la quantité de matière d'Al dans la nanoparticule s'écrit comme la somme de la quantité de matière d'Al dans la sphère d'Al n_{Al}^0 et la quantité de matière d'Al dans la coque d'Al₂O₃ n_{Al}^1 (voir Figure 53 pour la structure cœur-coquille de la particule d'Al) :

$$n_{Al} = n_{Al}^0 + n_{Al}^1 \quad (\text{A.6})$$

La relation peut alors s'écrire sous cette forme :

$$n_{Al} = \frac{m_{Al}}{M_{Al}} + 2 * \frac{m_{Al_2O_3}}{M_{Al_2O_3}} \quad (\text{A.7})$$

En utilisant le rapport massique W_{Al} , on peut exprimer la quantité de matière Al présente dans une nanoparticule de la façon suivante :

$$n_{Al} = \frac{W_{Al} * m_{NP}}{M_{Al}} + 2 * \frac{(1 - W_{Al}) * m_{NP}}{M_{Al_2O_3}} \quad (\text{A.8})$$

On obtient donc le nombre N_{Al} de nanoparticules en solution en fonction de la concentration massique en Al déterminée par AAS par la relation suivante :

$$N_{Al} = \frac{[Al]_m * V_{sol}}{M_{Al} * n_{Al}} \quad (\text{A.9})$$

Soit :

$$N_{Al} = \frac{[Al]_m * V_{sol}}{m_{NP} * \left(W_{Al} + 2 * (1 - W_{Al}) * \frac{M_{Al}}{M_{Al_2O_3}} \right)} \quad (\text{A.10})$$

Annexe 10. Liste des séquences optimisées par algorithme

Tableau 24 : Liste de séquences optimisées de longueur de 4 à 31 bases obtenues après tri des séquences en fonction de leur température de fusion. Ces séquences prennent en compte un spacer constitué de 7 bases T. La température de fusion est calculée en fixant la concentration en NaCl à 1 mM et 1 M respectivement (John SantaLucia and Hicks, 2004)

Nombre de bases	Séquence	Température de fusion (°C)
4	GCGA	1
5	CCG CA	28
6	CCG CAC	42
7	ACC GCA G	52
8	ACG CAG GA	58
9*	ACA GCC GAT	64
10	CCG TGG GCG A	75
11	AGC GGG TGC CT	79
12	AGC GGG TGC CTT	82
13	ACG GCA CCT CGC T	83
14	ACG GCA CCT CGC TT	85
15	AGC GGG TGC CTT GGA	86
16	ACC TTG GCT CCC GCA T	87
17	ACG ACA CCT TGC GGG CT	88
18	ACC CTG TGC TTC CGC CAA	89
19	ACC CTG TGC TTC CGC CAA C	89
20	AGG CGG TTG CTC TGG GAC AC	90
21	ACC CTG TGC TTC CGC CAA CGA	91
22	ACC CTG TGC TTC CGC CAA CGA G	92
23	ACC ACA GCG TCT CCT TGC CCG AA	92
24	ACC ACA GCG TCT CCT TGC CCG AAC	92
25	ACC ACA GCG TCT CCT TGC CCG AAC T	92
26	GAT AGG GAC TTC GTG TAA TGC TGG CG	85
27	CCT AAT GTA TCG CAG AGT TGA CGG GCT	87
28	GGT AAT CTA TGC GAC ACT TCA GCC CGT T	87
29	ACA ACG ACC ATC ACT CCC GCA GCC TTC TA	93
30	ACA ACC CGT CAC TAT GGA GCA GGC GAA GAT	92
31	ACA ACC ACG ACT CCC TAT GCC GCT GAA GAT T	91

Annexe 11. Régression non-linéaire par loi puissance des cinétiques d'agrégation

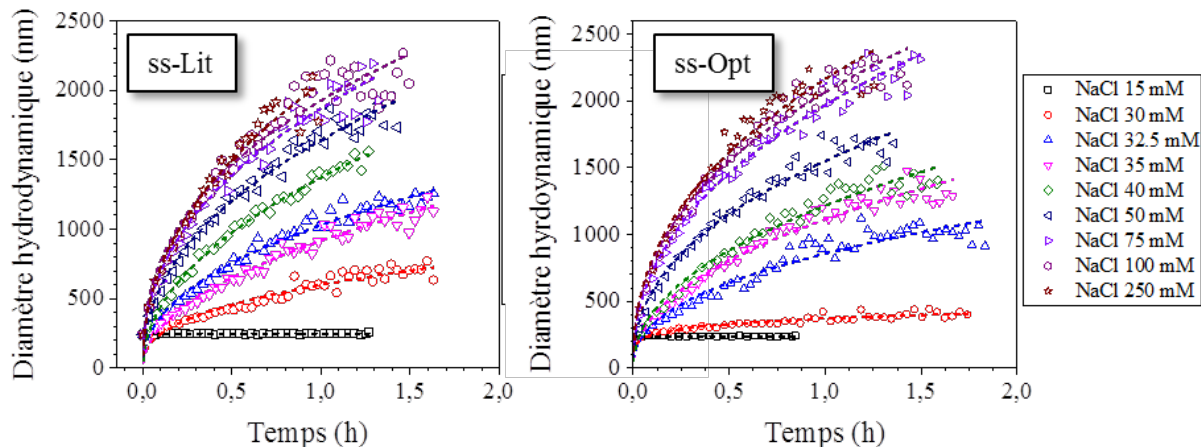


Figure 138 : Evolution du diamètre hydrodynamique moyen des agrégats Al-CuO au cours du temps, en fonction de la concentration en NaCl, pour les brins d'ADN non-optimisés (graphe de gauche) et optimisés (graphe de droite), et régression non-linéaire par une loi puissance représentée en ligne pointillée.

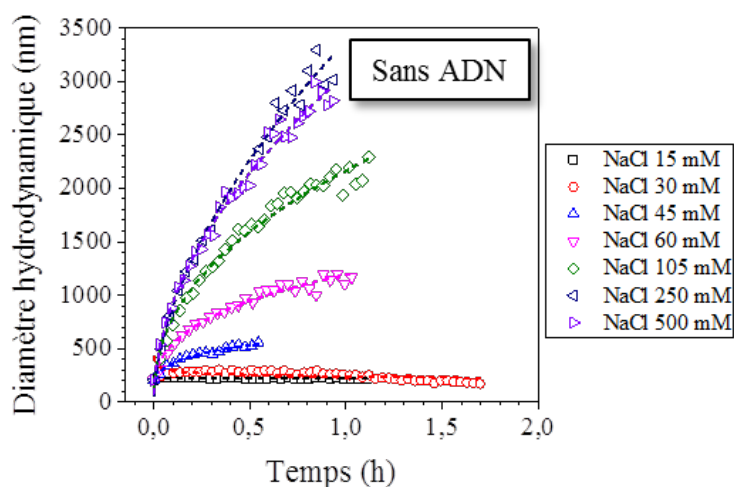


Figure 139 : Evolution du diamètre hydrodynamique moyen des agrégats Al-CuO au cours du temps, en fonction de la concentration en NaCl, pour des nanoparticules non-fonctionnalisées, et régression non-linéaire par une loi puissance représentée en ligne pointillée.

Annexe 12. Données numériques soulignant la stabilité thermique des agrégats

Tableau 25 : Valeurs numériques autour de la Figure 111 du manuscrit, soulignant la bonne stabilité thermique des agrégats.

ADN	Température de Chauffage	Numéro de cycle	Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	Variation du diamètre hydrodynamique moyen entre avant et après chauffage (nm)
Brins d'AND optimisés (ss-Opt)	50 °C	1	760 ± 100	255
	50 °C	2	830 ± 110	230
	50 °C	3	890 ± 70	540
	70 °C	1	670 ± 55	470
	70 °C	2	460 ± 35	755
	70 °C	3	345 ± 35	835
ADN	Température de Chauffage	Numéro de cycle	Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	Variation du diamètre hydrodynamique moyen entre avant et après chauffage (nm)
Brins d'AND non-optimisés (ss-Lit)	50 °C	1	750 ± 125	360
	50 °C	2	700 ± 130	705
	50 °C	3	470 ± 130	800
	70 °C	1	690 ± 50	325
	70 °C	2	630 ± 230	645
	70 °C	3	530 ± 70	975

Annexe 13. Analyse quantitative de la composition des agrégats Al-CuO suivant le mode d'agrégation

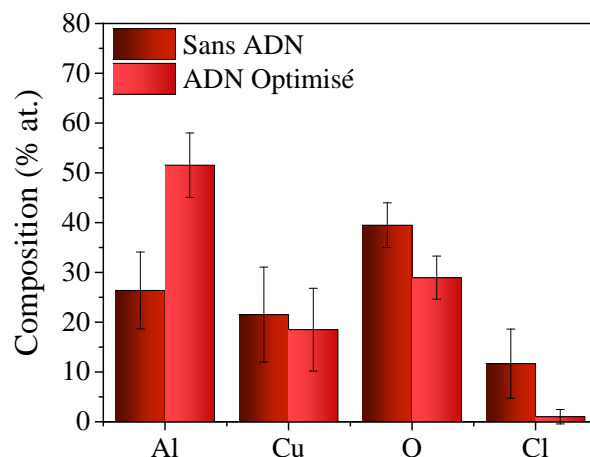


Figure 140 : Composition élémentaire en Al, Cu, O et Cl des nanocomposites avec ou sans ADN ($\times 50\,000$ / $\times 100\,000$ / $\times 150\,000$),

La présence de Cl dans les nanocomposites sans ADN est confirmée par l'analyse quantitative, avec 12 ± 7 % contre $1,0 \pm 0,3$ % lorsque le nanocomposite est réalisé avec ADN, La quantité de Cu semble par contre équivalente dans les deux cas, avec 22 ± 9 % et 19 ± 8 % sans ou avec ADN, respectivement, Encore une fois, la quantité d'O est difficile à commenter à cause de sa présence dans la couche d'alumine et l'oxyde de cuivre, Enfin, on remarque une différence majeure sur la proportion d'Al dans les deux composites : alors qu'on détecte 26 ± 8 % d'Al dans l'échantillon sans ADN, l'échantillon avec ADN contient 52 ± 7 % d'Al.

Annexe 14. Courbes DSC d'agrégats Al-CuO en fonction de la taille du spacer

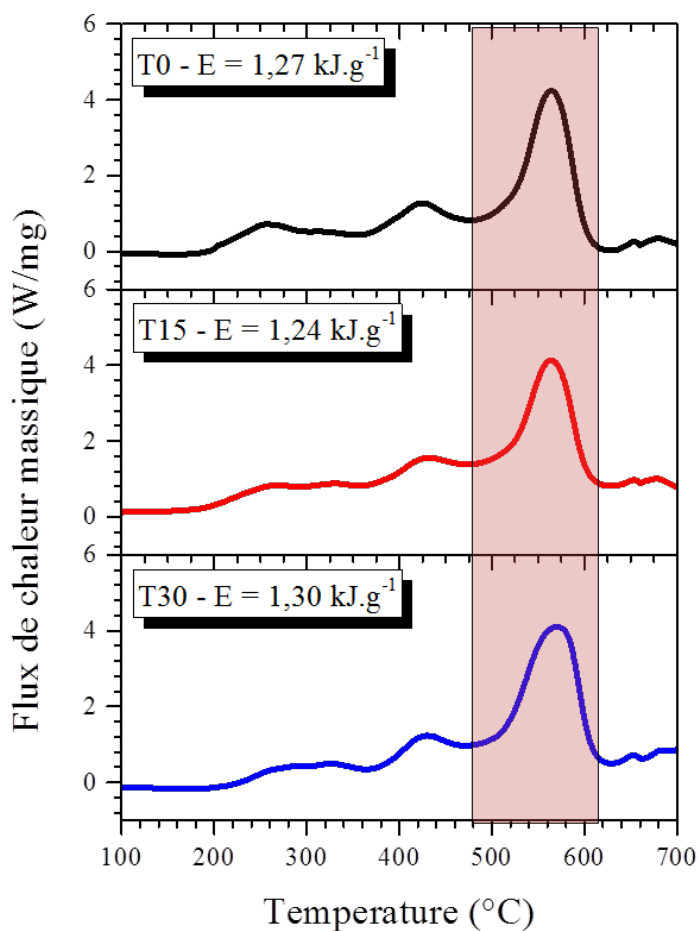


Figure 141 : Courbes DSC de nanobiocomposites Al-CuO en fonction de la taille du spacer des ADN complémentaires et optimisés.. Les nanobiocomposites ont été assemblés dans une solution de 35 mM en NaCl.

On n'observe pas d'impact de la longueur du spacer sur les enthalpies de réaction des nanobiocomposites Al-CuO. On peut remarquer cependant la bonne reproductibilité des résultats obtenus en terme d'enthalpie de réaction, avec en moyenne $1,29 \pm 0,05 \text{ kJ.g}^{-1}$.

Annexe 15. Images SEM de nanobiocomposites assemblés en régime DLCA

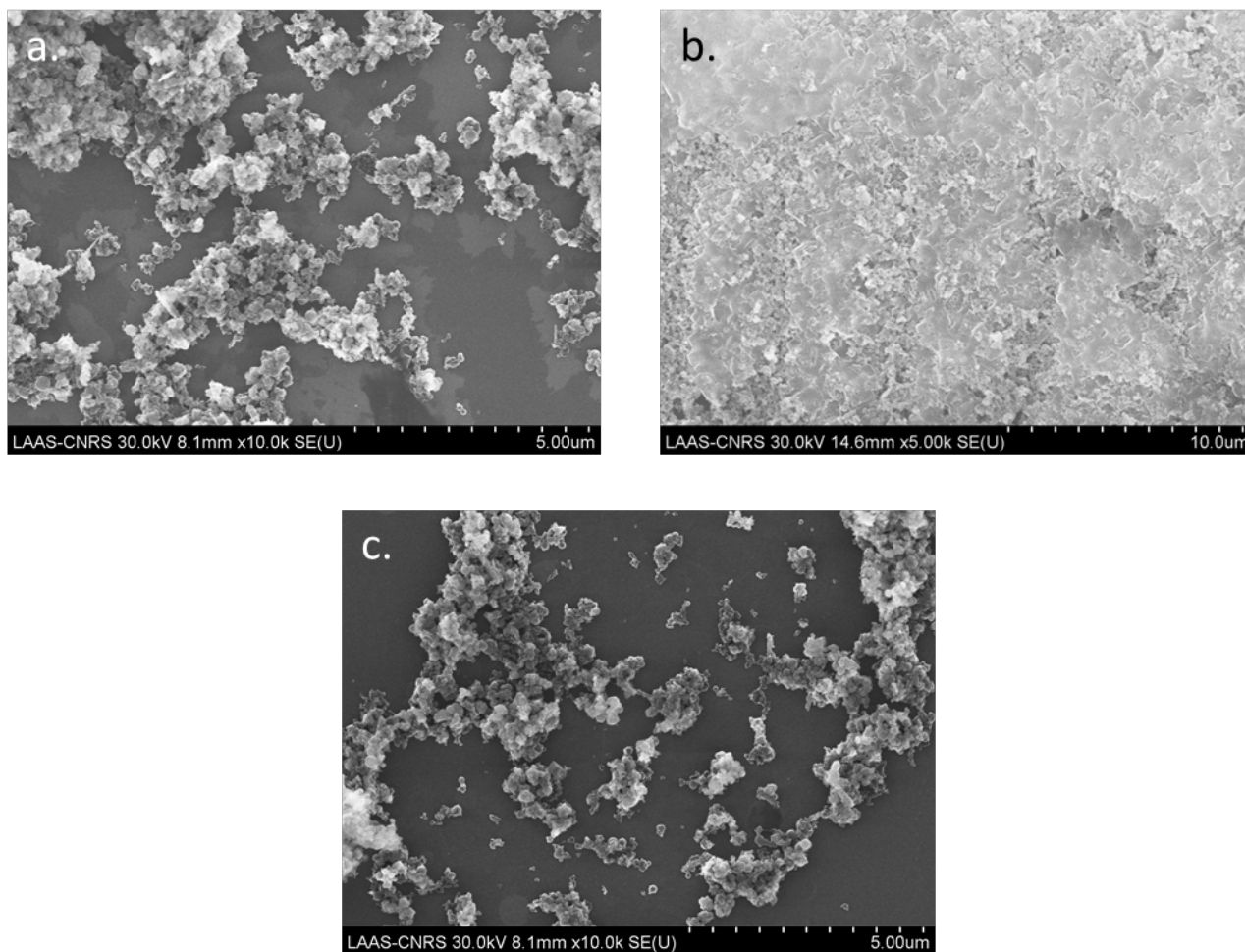


Figure 142 : Images SEM des nanobiocomposites Al-CuO obtenus avec des brins d'ADN complémentaires et optimisés pour une concentration en NaCl 250 mM.

On observe sur les images SEM de la Figure 142 la structure particulière des agrégats obtenus en régime DLCA. Sur les images (a) et (c), on peut distinguer nettement la structure dendritique des agrégats obtenus, et la présence de nombreux vides au sein de l'agrégat. Sur l'image (b), on observe de façon nette les particules prises dans les cristaux NaCl.

Bibliographie

Bibliographie

Ahlich, R.; Bär, M.; Häser, M.; Horn, H.; Kölmel, C. Electronic structure calculations on workstation computers: The program system turbomole. *Chemical Physics Letters* **1989**, *162* (3), 165-169.

Ahn, J. Y.; Kim, J. H.; Kim, J. M.; Lee, D. W.; Park, J. K.; Lee, D.; Kim, S. H. Combustion characteristics of high-energy Al/CuO composite powders: The role of oxidizer structure pellet density. *Powder Technology* **2013**, *241*, 67-73.

Ahn, J. Y.; Kim, S. B.; Kim, J. H.; Jang, N. S.; Kim, D. H.; Lee, H. W.; ... Kim, S. H. A microchip initiator with controlled combustion reactivity realized by integrating Al/CuO nanothermite composites on a microhotplate platform. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2015**, *26* (1), 015002.

Alivisatos, A. P.; Johnsson, K. P.; Peng, X.; Wilson, T. E.; Loweth, C. J.; Bruchez Jr, M. P.; Schultz, P. G. Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA. *Nature* **1996**, *382* (6592), 609-611.

Amir, Y.; Ben-Ishay, E.; Levner, D.; Ittah, S.; Abu-Horowitz, A.; Bachelet, I. Universal computing by DNA origami robots in a living animal. *Nature Nanotechnology* **2014**, *9* (5), 353-357.

Ananth, A. N.; Ghosh, G.; Umapathy, S.; Rajan, M. J. Oligonucleoside assisted one pot synthesis and self-assembly of gold nanoparticles. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* **2013**, *4* (4), 045014.

André, B.; Coulet, M. V.; Esposito, P. H.; Rufino, B.; Denoyel, R. High-energy ball milling to enhance the reactivity of aluminum nanopowders. *Materials Letters* **2013**, *110*, 108-110.²

Apperson, S. J.; Bezmelnitsyn, A. V.; Thiruvengadathan, R.; Gangopadhyay, K.; Gangopadhyay, S.; Balas, W. A.; ... Nicolich, S. M. Characterization of nanothermite material for solid-fuel microthruster applications. *Journal of Propulsion and Power* **2009**, *25* (5), 1086-1091.

Armstrong, R. W.; Baschung, B.; Booth, D. W.; Samirant, M. Enhanced propellant combustion with nanoparticles. *Nano Letters* **2003**, *3* (2), 253-255.

Aumann, C. E.; Skofronick, G. L.; Martin, J. A. Oxidation behavior of aluminum nanopowders. *Journal of Vacuum Science and Technology B* **1995**, *13* (3), 1178-1183.

Auyeung, E.; Macfarlane, R. J.; Choi, C. H. J.; Cutler, J. I.; Mirkin, C. A. Transitioning DNA-Engineered Nanoparticle Superlattices from Solution to the Solid State. *Advanced Materials* **2012**, *24* (38), 5181-5186.

- Auyeung, E.; Li, T. I.; Senesi, A. J.; Schmucker, A. L.; Pals, B. C.; de La Cruz, M. O.; Mirkin, C. A. DNA-mediated nanoparticle crystallization into Wulff polyhedra. *Nature* **2014**, *505* (7481), 73-77.
- Auyeung, E.; Morris, W.; Mondloch, J. E.; Hupp, J. T.; Farha, O. K.; Mirkin, C. A. Controlling Structure and Porosity in Catalytic Nanoparticle Superlattices with DNA. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137* (4), 1658-1662.
- Bahrani, M. **2013**. *Nanothermites multicouches Al/CuO: caractérisation et application* (Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier-Toulouse III).
- Bahrani, M.; Taton, G.; Conédéra, V.; Salvagnac, L.; Tenaillon, C.; Alphonse, P.; Rossi, C. Magnetron Sputtered Al-CuO Nanolaminates: Effect of Stoichiometry and Layers Thickness on Energy Release and Burning Rate. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics* **2014**, *39* (3), 365-373.
- Motlagh, E. B.; Khaki, J. V.; Sabzevar, M. H. Welding of aluminum alloys through thermite like reactions in Al-CuO-Ni system. *Materials Chemistry and Physics* **2012**, *133* (2), 757-763.
- Ball, R. C.; Weitz, D. A.; Witten, T. A.; Leyvraz, F. Universal kinetics in reaction-limited aggregation. *Physical Review Letters* **1987**, *58* (3), 274.
- Barber, M.; Clark, D. T. Molecular core binding energies; carbon and nitrogen 1 s levels for cytosine and thymine. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications* **1970**, (1), 24-25.
- Biancaniello, P. L.; Kim, A. J.; Crocker, J. C. Colloidal interactions and self-assembly using DNA hybridization. *Physical Review Letters* **2005**, *94* (5), 058302.
- Biancaniello, P. L.; Crocker, J. C.; Hammer, D. A.; Milam, V. T. DNA-mediated phase behavior of microsphere suspensions. *Langmuir* **2007**, *23* (5), 2688-2693.
- Bidault, S.; Polman, A. Water-based assembly and purification of plasmon-coupled gold nanoparticle dimers and trimers. *International Journal of Optics* **2012**, *2012*.
- Blythe, K. L.; Titus, E. J.; Willets, K. A. Triplet-State-Mediated Super-Resolution Imaging of Fluorophore-Labeled Gold Nanorods. *ChemPhysChem* **2014**, *15* (4), 784-793.
- Bockmon, B. S.; Pantoya, M. L.; Son, S. F.; Asay, B. W.; Mang, J. T. Combustion velocities and propagation mechanisms of metastable interstitial composites. *Journal of Applied Physics* **2005**, *98* (6), 64903-64903.
- Boemo, M. A.; Turberfield, A. J.; Cardelli, L. **2015**. Automated Design and Verification of Localized DNA Computation Circuits. In *International Workshop on DNA-Based Computers* (pp. 168-180). Springer International Publishing.

- Boemo, M. A.; Lucas, A. E.; Turberfield, A. J.; Cardelli, L. The Formal Language and Design Principles of Autonomous DNA Walker Circuits. *ACS Synthetic Biology* **2015**, *5* (8), 878-884.
- Bogdan, D.; Morari, C. Effect of van der Waals Interaction on the Geometric and Electronic Properties of DNA Nucleosides Adsorbed on Cu (111) Surface: A DFT Study. *Journal of Physical Chemistry A* **2013**, *117* (22), 4669-4678.
- Broide, M. L.; Cohen, R. J. Measurements of cluster-size distributions arising in salt-induced aggregation of polystyrene microspheres. *Journal of Colloid and Interface Science* **1992**, *153* (2), 493-508.
- Bruchez, M.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* **1998**, *281* (5385), 2013-2016.
- Brun, C.; Carmignani, C.; Tidiane-Diagne, C.; Torrenco, S.; Elchinger, P. H.; Reynaud, P.; ... Filoramo, A. First Integration Steps of Cu-based DNA Nanowires for interconnections. *Additional Papers and Presentations* **2016**, *2016*, 000650-000679.
- Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, (7), 801-802.
- Buffat, P.; Borel, J. P. Size effect on the melting temperature of gold particles. *Physical Review A* **1976**, *13* (6), 2287.
- Calais, T.; Playe, B.; Ducéré, J. M.; Veyan, J. F.; Rupich, S.; Hemeryck, A.; ... Estève, A. Role of Alumina Coatings for Selective and Controlled Bonding of DNA on Technologically Relevant Oxide Surfaces. *Journal of Physical Chemistry C* **2015**, *119* (41), 23527-23543.
- Calais, T.; Baijot, V.; Djafari Rouhani, M.; Gauchard, D.; Chabal, Y. J.; Rossi, C.; Esteve, A. General Strategy for the Design of DNA Coding Sequences Applied to Nanoparticle Assembly. *Langmuir* **2016**, *32* (37), 9676-9686.
- Camafeita, L. E.; Sánchez-Cortés, S.; García-Ramos, J. V. SERS of guanine and its alkyl derivatives on gold sols. *Journal of Raman Spectroscopy* **1996**, *27* (7), 533-537.
- Cao, Y. C.; Jin, R.; Mirkin, C. A. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science* **2002**, *297* (5586), 1536-1540.
- Cao, Y. C.; Jin, R.; Nam, J. M.; Thaxton, C. S.; Mirkin, C. A. Raman dye-labeled nanoparticle probes for proteins. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (48), 14676-14677.
- Castelino, K.; Kannan, B.; Majumdar, A. Characterization of grafting density and binding efficiency of DNA and proteins on gold surfaces. *Langmuir* **2005**, *21* (5), 1956-1961.

- Cederquist, K. B.; Keating, C. D. Curvature effects in DNA: Au nanoparticle conjugates. *Acs Nano* **2009**, *3* (2), 256-260.
- Chaalane, A. **2008**. *Microsystème de propulsion à propergol solide sur silicium: application au contrôle d'assiette de micro-drone* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- Chen, Q.; Frankel, D. J.; Richardson, N. V. Self-assembly of adenine on Cu (110) surfaces. *Langmuir* **2002**, *18* (8), 3219-3225.
- Chung, S. W.; Gulians, E. A.; Bunker, C. E.; Hammerstroem, D. W.; Deng, Y.; Burgers, M. A.; ... Buckner, S. W. Capping and passivation of aluminum nanoparticles using alkyl-substituted epoxides. *Langmuir* **2009**, *25* (16), 8883-8887.
- Church, G. M.; Gao, Y.; Kosuri, S. Next-generation digital information storage in DNA. *Science* **2012**, *337* (6102), 1628-1628.
- Cobbe, S.; Connolly, S.; Ryan, D.; Nagle, L.; Eritja, R.; Fitzmaurice, D. DNA-controlled assembly of protein-modified gold nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107* (2), 470-477.
- Connolly, S.; Cobbe, S.; Fitzmaurice, D. Effects of ligand-receptor geometry and stoichiometry on protein-induced aggregation of biotin-modified colloidal gold. *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105* (11), 2222-2226.
- Cutler, J. I.; Auyeung, E.; Mirkin, C. A. Spherical nucleic acids. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (3), 1376-1391.
- Dai, M.; Kwon, J.; Halls, M. D.; Gordon, R. G.; Chabal, Y. J. Surface and interface processes during atomic layer deposition of copper on silicon oxide. *Langmuir* **2010**, *26* (6), 3911-3917.
- Daniel, S.; Rao, T. P.; Rao, K. S.; Rani, S. U.; Naidu, G. R. K.; Lee, H. Y.; Kawai, T. A review of DNA functionalized/grafted carbon nanotubes and their characterization. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2007**, *122* (2), 672-682.
- Demers, L. M.; Mirkin, C. A.; Mucic, R. C.; Reynolds, R. A.; Letsinger, R. L.; Elghanian, R.; Viswanadham, G. A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles. *Analytical Chemistry* **2000**, *72* (22), 5535-5541.
- Demers, L. M.; Östblom, M.; Zhang, H.; Jang, N. H.; Liedberg, B.; Mirkin, C. A. Thermal desorption behavior and binding properties of DNA bases and nucleosides on gold. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (38), 11248-11249.

- De Stefano, M.; Vesterager Gothelf, K. Dynamic Chemistry of Disulfide Terminated Oligonucleotides in Duplexes and Double-Crossover Tiles. *ChemBioChem* **2016**, *17* (12), 1122-1126.
- Diagne, C. T.; Brun, C.; Gasparutto, D.; Baillin, X.; Tiron, R. A DNA Origami Mask for Sub-Ten Nanometer Lithography. *ACS Nano* **2016**, *10* (7), 6458-6463.
- Dippel, M.; Maier, A.; Gimple, V.; Wider, H.; Evenson, W. E.; Rasera, R. L.; Schatz, G. Size-dependent melting of self-assembled indium nanostructures. *Physical Review Letters* **2001**, *87* (9), 095505.
- Doneux, T.; Fojt, L. Interaction of Cytidine 5'-Monophosphate with Au (111): An In Situ Infrared Spectroscopic Study. *ChemPhysChem* **2009**, *10* (9-10), 1649-1655.
- Douglas, S. M.; Bachelet, I.; Church, G. M. A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. *Science* **2012**, *335* (6070), 831-834.
- Dutro, G. M.; Yetter, R. A.; Risha, G. A.; Son, S. F. The effect of stoichiometry on the combustion behavior of a nanoscale Al/MoO₃ thermite. *Proceedings of the Combustion Institute* **2009**, *32* (2), 1921-1928.
- Dwyer, C.; Johri, V.; Cheung, M.; Patwardhan, J.; Lebeck, A.; Sorin, D. Design tools for a DNA-guided self-assembling carbon nanotube technology. *Nanotechnology* **2004**, *15* (9), 1240.
- Eckert, J.; Holzer, J. C.; Ahn, C. C.; Fu, Z.; Johnson, W. L. Melting behavior of nanocrystalline aluminum powders. *Nanostructured Materials* **1993**, *2* (4), 407-413.
- Esteban-Fernández de Ávila, B.; Martín, A.; Soto, F.; Lopez-Ramirez, M. A.; Campuzano, S.; Vásquez-Machado, G. M.; ... Wang, J. Single Cell Real-Time miRNAs Sensing Based on Nanomotors. *ACS Nano* **2015**, *9* (7), 6756-6764.
- Fahrenkopf, N. M.; Rice, P. Z.; Bergkvist, M.; Deskins, N. A.; Cady, N. C. Immobilization Mechanisms of Deoxyribonucleic Acid (DNA) to Hafnium Dioxide (HfO₂) Surfaces for Biosensing Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2012**, *4* (10), 5360-5368.
- Family, F.; Lenormand, R.; Zarcone, C.; Landau, D. P. Kinetics of Aggregation and Gelation. *Kinetics of Aggregation and Gelation* **1984**.
- Fan, J. A.; He, Y.; Bao, K.; Wu, C.; Bao, J.; Schade, N. B.; ... Capasso, F. DNA-enabled self-assembly of plasmonic nanoclusters. *Nano Letters* **2011**, *11* (11), 4859-4864.
- Fattaccioli, J. **2006**. *Mouillage spécifique d'émulsions sur substrats biomimétiques* (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).
- Fischer, S. H.; Grubelich, M. C. **1998**. *Theoretical energy release of thermites, intermetallics, and combustible metals*. Sandia National Labs.; Albuquerque, NM (US).

Foley, T. J.; Johnson, C. E.; Higa, K. T. Inhibition of oxide formation on aluminum nanoparticles by transition metal coating. *Chemistry of Materials* **2005**, *17* (16), 4086-4091.

Furukawa, M.; Yamada, T.; Katano, S.; Kawai, M.; Ogasawara, H.; Nilsson, A. Geometrical characterization of adenine and guanine on Cu (110) by NEXAFS, XPS, and DFT calculation. *Surface Science* **2007**, *601* (23), 5433-5440.

Geerts, N.; Schmatko, T.; Eiser, E. Clustering versus percolation in the assembly of colloids coated with long DNA. *Langmuir* **2008**, *24* (9), 5118-5123.

Geinguenaud, F.; Souissi, I.; Fagard, R.; Lalatonne, Y.; Motte, L. Easily controlled grafting of oligonucleotides on $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles: Physicochemical characterization of DNA organization and biological activity studies. *Journal of Physical Chemistry B* **2014**, *118* (6), 1535-1544.

Georgiadis, R.; Peterlinz, K. P.; Peterson, A. W. Quantitative measurements and modeling of kinetics in nucleic acid monolayer films using SPR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122* (13), 3166-3173.

Giese, B.; McNaughton, D. Surface-enhanced Raman spectroscopic and density functional theory study of adenine adsorption to silver surfaces. *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106* (1), 101-112.

Glavier, L.; Taton, G.; Ducéré, J. M.; Baijot, V.; Pinon, S.; Calais, T.; ... Rossi, C. Nanoenergetics as pressure generator for nontoxic impact primers: Comparison of Al/Bi 2O_3 , Al/CuO, Al/MoO 3 nanothermites and Al/PTFE. *Combustion and Flame* **2015**, *162* (5), 1813-1820.

Goldman, N.; Bertone, P.; Chen, S.; Dessimoz, C.; LeProust, E. M.; Sipos, B.; Birney, E. Towards practical, high-capacity, low-maintenance information storage in synthesized DNA. *Nature* **2013**, *494*(7435), 77-80.

Goldschmidt, H. **1895**. Verfahren zur Herstellung von Metallen oder Metalloiden oder Legierungen derselben. *Process for the production of metals or metalloids or alloys of the same*'), *Kaiserliches (German) Patent*, 96317.

González, M.; Argara  a, C. E.; Fidelio, G. D. Extremely high thermal stability of streptavidin and avidin upon biotin binding. *Biomolecular Engineering* **1999**, *16* (1), 67-72.

Granier, J. J.; Pantoya, M. L. Laser ignition of nanocomposite thermites. *Combustion and Flame* **2004**, *138* (4), 373-383.

Grass, R. N.; Heckel, R.; Puddu, M.; Paunescu, D.; Stark, W. J. Robust Chemical Preservation of Digital Information on DNA in Silica with Error-Correcting Codes. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54* (8), 2552-2555.

Green, N. M. Avidin. 4. Stability at extremes of pH and dissociation into sub-units by guanidine hydrochloride. *Biochemical Journal* **1963**, 89 (3), 609.

Green, N. M. Avidin and streptavidin. *Methods in enzymology* **1990**, 184, 51-67.

Hagyard, T.; Williams, J. R. Potential of aluminium in aqueous chloride solutions. Part 1. *Transactions of the Faraday Society* **1961**, 57, 2288-2294.

Haiss, W.; Roelfs, B.; Port, S. N.; Bunge, E.; Baumgärtel, H.; Nichols, R. J. In-situ infrared spectroscopic studies of thymine adsorption on a Au (111) electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1998**, 454 (1), 107-113.

Hammerstroem, D. W.; Burgers, M. A.; Chung, S. W.; Gulians, E. A.; Bunker, C. E.; Wentz, K. M.; ... Jelliss, P. A. Aluminum nanoparticles capped by polymerization of alkyl-substituted epoxides: ratio-dependent stability and particle size. *Inorganic Chemistry* **2011**, 50 (11), 5054-5059.

Herne, T. M.; Tarlov, M. J. Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, 119 (38), 8916-8920.

Hilbert, M.; López, P. The world's technological capacity to store, communicate, and compute information. *Science* **2011**, 332 (6025), 60-65.

Hill, H. D.; Macfarlane, R. J.; Senesi, A. J.; Lee, B.; Park, S. Y.; Mirkin, C. A. Controlling the lattice parameters of gold nanoparticle FCC crystals with duplex DNA linkers. *Nano Letters* **2008**, 8 (8), 2341-2344.

Hunter, R. J. **2013**. *Zeta potential in colloid science: principles and applications* (Vol. 2). Academic press.

Hurst, S. J.; Lytton-Jean, A. K.; Mirkin, C. A. Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes. *Analytical Chemistry* **2006**, 78 (24), 8313-8318.

Jacob, R. J.; Jian, G.; Guerieri, P. M.; Zachariah, M. R. Energy release pathways in nanothermites follow through the condensed state. *Combustion and Flame* **2015**, 162 (1), 258-264.

Jiang, W.; Yatsui, K. Pulsed wire discharge for nanosize powder synthesis. *IEEE Transactions on Plasma Science* **1998**, 26 (5), 1498-1501.

Jiang, Q.; Song, C.; Nangreave, J.; Liu, X.; Lin, L.; Qiu, D.; ... Ding, B. DNA origami as a carrier for circumvention of drug resistance. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134 (32), 13396-13403.

Jin, R.; Wu, G.; Li, Z.; Mirkin, C. A.; Schatz, G. C. What controls the melting properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies? *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125 (6), 1643-1654.

- Jones, M. R.; Macfarlane, R. J.; Lee, B.; Zhang, J.; Young, K. L.; Senesi, A. J.; Mirkin, C. A. DNA-nanoparticle superlattices formed from anisotropic building blocks. *Nature Materials* **2010**, *9* (11), 913-917.
- Jouet, R. J.; Warren, A. D.; Rosenberg, D. M.; Bellitto, V. J.; Park, K.; Zachariah, M. R. Surface passivation of bare aluminum nanoparticles using perfluoroalkyl carboxylic acids. *Chemistry of Materials* **2005**, *17* (11), 2987-2996.
- Kalsin, A. M.; Fialkowski, M.; Paszewski, M.; Smoukov, S. K.; Bishop, K. J.; Grzybowski, B. A. Electrostatic self-assembly of binary nanoparticle crystals with a diamond-like lattice. *Science* **2006**, *312* (5772), 420-424.
- Kappagantula, K. S.; Farley, C.; Pantoya, M. L.; Horn, J. Tuning energetic material reactivity using surface functionalization of aluminum fuels. *Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (46), 24469-24475.
- Kelly, R. E.; Xu, W.; Lukas, M.; Otero, R.; Mura, M.; Lee, Y. J.; ... Besenbacher, F. An Investigation into the Interactions Between Self-Assembled Adenine Molecules and a Au (111) Surface. *Small* **2008**, *4* (9), 1494-1500.
- Kim, S. H.; Zachariah, M. R. Enhancing the rate of energy release from nanoenergetic materials by electrostatically enhanced assembly. *Advanced Materials* **2004**, *16* (20), 1821-1825.
- Kim, A. J.; Biancaniello, P. L.; Crocker, J. C. Engineering DNA-mediated colloidal crystallization. *Langmuir* **2006**, *22* (5), 1991-2001.
- Kim, A. J.; Scarlett, R.; Biancaniello, P. L.; Sinno, T.; Crocker, J. C. Probing interfacial equilibration in microsphere crystals formed by DNA-directed assembly. *Nature Materials* **2009**, *8* (1), 52-55.
- Kim, T.; Lee, K.; Gong, M. S.; Joo, S. W. Control of gold nanoparticle aggregates by manipulation of interparticle interaction. *Langmuir* **2005**, *21* (21), 9524-9528.
- Kim, T.; Lee, C. H.; Joo, S. W.; Lee, K. Kinetics of gold nanoparticle aggregation: experiments and modeling. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, *318* (2), 238-243.
- Klamt, A.; Schuurmann, G. J. G. J. COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. *Journal of the Chemical Society* **1993**, *Perkin Transactions 2*, (5), 799-805.
- Klein, R.; Meakin, P. Universality in colloid aggregation. *Nature* **1989**, *339* (3).
- Klumb, L. A.; Chu, V.; Stayton, P. S. Energetic roles of hydrogen bonds at the ureido oxygen binding pocket in the streptavidin-biotin complex. *Biochemistry* **1998**, *37* (21), 7657-7663.

- Knorowski, C.; Travesset, A. Self-assembly and crystallization of hairy (f-star) and DNA-grafted nanocubes. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (2), 653-659.
- Kundu, J.; Neumann, O.; Janesko, B. G.; Zhang, D.; Lal, S.; Barhoumi, A.; ... Halas, N. J. Adenine- and adenosine monophosphate (AMP)- gold binding interactions studied by surface-enhanced raman and infrared spectroscopies. *Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113* (32), 14390-14397.
- Kwon, J.; Ducéré, J. M.; Alphonse, P.; Bahrami, M.; Petrantoni, M.; Veyan, J. F.; ... Chabal, Y. J. Interfacial chemistry in Al/CuO reactive nanomaterial and its role in exothermic reaction. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013**, *5* (3), 605-613.
- Kwon, S. H.; Hong, B. J.; Park, H. Y.; Knoll, W.; Park, J. W. DNA-DNA interaction on dendron-functionalized sol-gel silica films followed with surface plasmon fluorescence spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, *308* (2), 325-331.
- Kwon, Y. S.; Jung, Y. H.; Yavorovsky, N. A.; Illyn, A. P.; Kim, J. S. Ultra-fine powder by wire explosion method. *Scripta Materialia* **2001**, *44* (8), 2247-2251.
- Lalander, C. H.; Zheng, Y.; Dhuey, S.; Cabrini, S.; Bach, U. DNA-directed self-assembly of gold nanoparticles onto nanopatterned surfaces: controlled placement of individual nanoparticles into regular arrays. *ACS Nano* **2010**, *4* (10), 6153-6161.
- Lanthony, C.; Guiltat, M.; Ducéré, J. M.; Verdier, A.; Hémercyck, A.; Djafari-Rouhani, M.; ... Estève, A. Elementary surface chemistry during CuO/Al nanolaminate-thermite synthesis: copper and oxygen deposition on aluminum (111) surfaces. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2014**, *6* (17), 15086-15097.
- Larangot, B. **2004**. *Conception, fabrication et caractérisation de matrices de micropulseurs pyrotechniques sur silicium* (Doctoral dissertation, Toulouse 3).
- Le, J. D.; Pinto, Y.; Seeman, N. C.; Musier-Forsyth, K.; Taton, T. A.; Kiehl, R. A. DNA-templated self-assembly of metallic nanocomponent arrays on a surface. *Nano Letters* **2004**, *4* (12), 2343-2347.
- Lee, J. S.; Ulmann, P. A.; Han, M. S.; Mirkin, C. A. A DNA-gold nanoparticle-based colorimetric competition assay for the detection of cysteine. *Nano Letters* **2008**, *8* (2), 529-533.
- Lermusiaux, L.; Bidault, S. Increasing the Morphological Stability of DNA-Templated Nanostructures with Surface Hydrophobicity. *Small* **2015**, *11* (42), 5696-5704.
- Lermusiaux, L.; Sereda, A.; Portier, B.; Larquet, E.; Bidault, S. Reversible switching of the interparticle distance in DNA-templated gold nanoparticle dimers. *ACS Nano* **2012**, *6* (12), 10992-10998.

- Lermusiaux, L.; Maillard, V.; Bidault, S. Widefield spectral monitoring of nanometer distance changes in DNA-templated plasmon rulers. *ACS Nano* **2015**, *9* (1), 978-990.
- Levitas, V. I.; Pantoya, M. L.; Chauhan, G.; Rivero, I Effect of the alumina shell on the melting temperature depression for aluminum nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C* . **2009**, *113* (32), 14088-14096.
- Lewis, W. K.; Rosenberger, A. T.; Gord, J. R.; Crouse, C. A.; Harruff, B. A.; Fernando, K. S.; ... Bunker, C. E. Multispectroscopic (FTIR, XPS, and TOFMS– TPD) Investigation of the Core–Shell Bonding in Sonochemically Prepared Aluminum Nanoparticles Capped with Oleic Acid. *Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114* (14), 6377-6380.
- Lin, M. Y.; Lindsay, H. M.; Weitz, D. A.; Klein, R. C. B. R.; Ball, R. C.; Meakin, P. Universal diffusion-limited colloid aggregation. *Journal of Physics: Condensed Matter* **1990**, *2* (13), 3093.
- Liu, J. Adsorption of DNA onto gold nanoparticles and graphene oxide: surface science and applications. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2012**, *14* (30), 10485-10496.
- Liu, J.; Lu, Y. Fast colorimetric sensing of adenosine and cocaine based on a general sensor design involving aptamers and nanoparticles. *Angewandte Chemie* **2006**, *118* (1), 96-100.
- Lund, K.; Manzo, A. J.; Dabby, N.; Michelotti, N.; Johnson-Buck, A.; Nangreave, J.; ... Winfree, E. Molecular robots guided by prescriptive landscapes. *Nature* **2010**, *465* (7295), 206-210.
- Macfarlane, R. J.; Lee, B.; Hill, H. D.; Senesi, A. J.; Seifert, S.; Mirkin, C. A. Assembly and organization processes in DNA-directed colloidal crystallization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106* (26), 10493-10498.
- Macfarlane, R. J.; Jones, M. R.; Senesi, A. J.; Young, K. L.; Lee, B.; Wu, J.; Mirkin, C. A. Establishing the Design Rules for DNA-Mediated Programmable Colloidal Crystallization. *Angewandte Chemie* **2010**, *122* (27), 4693-4696.
- Macfarlane, R. J.; Lee, B.; Jones, M. R.; Harris, N.; Schatz, G. C.; Mirkin, C. A. Nanoparticle superlattice engineering with DNA. *Science* **2011**, *334* (6053), 204-208.
- Macfarlane, R. J.; Jones, M. R.; Lee, B.; Auyeung, E.; Mirkin, C. A. Topotactic interconversion of nanoparticle superlattices. *Science* **2013**, *341* (6151), 1222-1225.
- Malchi, J. Y.; Yetter, R. A.; Foley, T. J.; Son, S. F. The effect of added Al₂O₃ on the propagation behavior of an Al/CuO nanoscale thermite. *Combustion Science and Technology* **2008**, *180* (7), 1278-1294.
- Malchi, J. Y.; Foley, T. J.; Yetter, R. A. Electrostatically self-assembled nanocomposite reactive microspheres. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2009**, *1* (11), 2420-2423.

- Marín, L.; Nanayakkara, C. E.; Veyan, J. F.; Warot-Fonrose, B.; Joulie, S.; Estève, A.; ... Rossi, C. Enhancing the reactivity of Al/CuO nanolaminates by Cu incorporation at the interfaces. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7* (22), 11713-11718.
- Masliyah, J. H.; Bhattacharjee, S. **2006**. *Electrokinetic and colloid transport phenomena*. John Wiley and Sons.
- Mathlouthi, M.; Seuvre, A. M.; Koenig, J. L. FT-IR and Laser-Raman spectra of thymine and thymidine. *Carbohydrate Research* **1984**, *134* (1), 23-38.
- Maune, H. T.; Han, S. P.; Barish, R. D.; Bockrath, M.; Goddard III, W. A.; Rothmund, P. W.; Winfree, E. Self-assembly of carbon nanotubes into two-dimensional geometries using DNA origami templates. *Nature Nanotechnology* **2010**, *5* (1), 61-66.
- Maye, M. M.; Kumara, M. T.; Nykypanchuk, D.; Sherman, W. B.; Gang, O. Switching binary states of nanoparticle superlattices and dimer clusters by DNA strands. *Nature Nanotechnology* **2010**, *5* (2), 116-120.
- Meakin, P.; Vicsek, T.; Family, F. Dynamic cluster-size distribution in cluster-cluster aggregation: Effects of cluster diffusivity. *Physical Review B* **1985**, *31* (1), 564.
- Michele, L-D.; Eiser, E. Developments in understanding and controlling self assembly of DNA-functionalized colloids. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15* (9), 3115-3129.
- Millstone, J. E.; Georganopoulou, D. G.; Xu, X.; Wei, W.; Li, S.; Mirkin, C. A. DNA-Gold Triangular Nanoprism Conjugates. *Small* **2008**, *4* (12), 2176-2180.
- Mirkin, C. A. Programming the assembly of two-and three-dimensional architectures with DNA and nanoscale inorganic building blocks. *Inorganic Chemistry* **2000**, *39* (11), 2258-2272.
- Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* **1996**, *382* (6592), 607-609.
- Modi, S.; Nizak, C.; Surana, S.; Halder, S.; Krishnan, Y. Two DNA nanomachines map pH changes along intersecting endocytic pathways inside the same cell. *Nature Nanotechnology* **2013**, *8* (6), 459-467.
- Nykypanchuk, D.; Maye, M. M.; van der Lelie, D.; Gang, O. DNA-guided crystallization of colloidal nanoparticles. *Nature* **2008**, *451* (7178), 549-552.
- Östblom, M.; Liedberg, B.; Demers, L. M.; Mirkin, C. A. On the structure and desorption dynamics of DNA bases adsorbed on gold: a temperature-programmed study. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109* (31), 15150-15160.

- Pamies, R.; Cifre, J. G. H.; Espín, V. F.; Collado-González, M.; Baños, F. G. D.; de la Torre, J. G. Aggregation behaviour of gold nanoparticles in saline aqueous media. *Journal of Nanoparticle Research* **2014**, *16* (4), 1-11.
- Park, C. D.; Mileham, M.; van de Burgt, L. J.; Muller, E. A.; Stiegman, A. E. The effects of stoichiometry and sample density on combustion dynamics and initiation energy of Al/Fe₂O₃ metastable interstitial composites. *Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114* (6), 2814-2820.
- Park, S. J.; Taton, T. A.; Mirkin, C. A. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes. *Science* **2002**, *295* (5559), 1503-1506.
- Park, S. J.; Lazarides, A. A.; Storhoff, J. J.; Pesce, L.; Mirkin, C. A. The structural characterization of oligonucleotide-modified gold nanoparticle networks formed by DNA hybridization. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108* (33), 12375-12380.
- Park, S. Y.; Lytton-Jean, A. K.; Lee, B.; Weigand, S.; Schatz, G. C.; Mirkin, C. A. DNA-programmable nanoparticle crystallization. *Nature* **2008**, *451* (7178), 553-556.
- Patolsky, F.; Lichtenstein, A.; Willner, I. Amplified microgravimetric quartz-crystal-microbalance assay of DNA using oligonucleotide-functionalized liposomes or biotinylated liposomes. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122* (2), 418-419.
- Pavlov, V.; Xiao, Y.; Shlyahovsky, B.; Willner, I. Aptamer-functionalized Au nanoparticles for the amplified optical detection of thrombin. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (38), 11768-11769.
- Pennarun, P. **2006**. *Conception et intégration d'un micro-initiateur sécurisé sur silicium à base de micro-interrupteurs pyrotechniques* (Doctoral dissertation, INSA de Toulouse).
- Pergolese, B.; Bonifacio, A.; Bigotto, A. SERS studies of the adsorption of guanine derivatives on gold colloidal nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2005**, *7* (20), 3610-3613.
- Peterlinz, K. A.; Georgiadis, R. M.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J. Observation of hybridization dehybridization of thiol-tethered DNA using two-color surface plasmon resonance spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119* (14), 3401-3402.
- Peters, K. F.; Chung, Y. W.; Cohen, J. B. Surface melting on small particles. *Applied Physics Letters* **1997**, *71* (16), 2391-2393.
- Petrantoni, M. **2010**. *Nanomatériaux énergétiques sur puce: élaboration, modélisation et caractérisation* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- Petrovykh, D. Y.; Kimura-Suda, H.; Whitman, L. J.; Tarlov, M. J. Quantitative analysis and characterization of DNA immobilized on gold. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (17), 5219-5226.

- Petrovykh, D. Y.; Kimura-Suda, H.; Tarlov, M. J.; Whitman, L. J. Quantitative characterization of DNA films by X-ray photoelectron spectroscopy. *Langmuir* **2004**, *20* (2), 429-440.
- Pezous, H. **2009**. *Conception et intégration en technologie MEMS d'une micro amorce sécurisée* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- Piercey, D. G.; Klapoetke, T. M. Nanoscale aluminum-metal oxide (thermite) reactions for application in energetic materials. *Central European Journal of Energetic Materials* **2010**, *7* (2), 115-129.
- Piscevic, D.; Lawall, R.; Veith, M.; Liley, M.; Okahata, Y.; Knoll, W. Oligonucleotide hybridization observed by surface plasmon optical techniques. *Applied Surface Science* **1995**, *90* (4), 425-436.
- Prentice, D.; Pantoya, M. L.; Gash, A. E. Combustion wave speeds of sol-gel-synthesized tungsten trioxide and nano-aluminum: The effect of impurities on flame propagation. *Energy & Fuels* **2006**, *20* (6), 2370-2376.
- Preuss, M.; Schmidt, W. G.; Bechstedt, F. Coulombic amino group-metal bonding: Adsorption of adenine on Cu (110). *Physical Review Letters* **2005**, *94* (23), 236102.
- Prüfer, K.; Racimo, F.; Patterson, N.; Jay, F.; Sankararaman, S.; Sawyer, S.; ... Li, H. The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature* **2014**, *505* (7481), 43-49.
- Rodriguez, G. A. A. **2008**. *Conception, simulation et réalisation d'un micro actionneur à base de matériau énergétique pour l'actionnement microfluidique* (Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier-Toulouse III).
- Rodríguez, G. A. A.; Suhard, S.; Rossi, C.; Estève, D.; Fau, P.; Sabo-Etienne, S.; ... Chaudret, B. A microactuator based on the decomposition of an energetic material for disposable lab-on-chip applications: fabrication and test. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2008**, *19* (1), 015006.
- Roelfs, B.; Bunge, E.; Schröter, C.; Solomun, T.; Meyer, H.; Nichols, R. J.; Baumgärtel, H. Adsorption of thymine on gold single-crystal electrodes. *Journal of Physical Chemistry B* **1997**, *101* (5), 754-765.
- Rogers, P. H.; Michel, E.; Bauer, C. A.; Vanderet, S.; Hansen, D.; Roberts, B. K.; ... Pine, D. J. Selective, controllable, and reversible aggregation of polystyrene latex microspheres via DNA hybridization. *Langmuir* **2005**, *21* (12), 5562-5569.
- Rosi, N. L.; Mirkin, C. A. Nanostructures in biodiagnostics. *Chemical Reviews* **2005**, *105* (4), 1547-1562.

- Rossi, C. **1997**. *Conception et réalisation d'un système de réhydratation pour patch transdermique à partir de micro actionneurs pyrotechniques* (Doctoral dissertation, Toulouse, INSA).
- Rossi, C.; Esteve, D. Micropyrotechnics, a new technology for making energetic microsystems: review and prospective. *Sensors and Actuators A: Physical* **2005**, *120* (2), 297-310.
- Rossi, C.; Zhang, K.; Esteve, D.; Alphonse, P.; Tailhades, P.; Vahlas, C. Nanoenergetic materials for MEMS: a review. *IEEE/ASME Journal of Microelectromechanical Systems* **2007**, *16* (4), 919-931.
- SantaLucia Jr, J.; Hicks, D. The thermodynamics of DNA structural motifs. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2004**; *33*, 415-440.
- Sarathi, R.; Sindhu, T. K.; Chakravarthy, S. R. Generation of nano aluminium powder through wire explosion process and its characterization. *Materials Characterization* **2007**, *58* (2), 148-155.
- Schärer, O. D. Chemistry and biology of DNA repair. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42* (26), 2946-2974.
- Schmatko, T.; Bozorgui, B.; Geerts, N.; Frenkel, D.; Eiser, E.; Poon, W. C. A finite-cluster phase in λ -DNA-coated colloids. *Soft Matter* **2007**, *3* (6), 703-706.
- Schoenitz, M.; Ward, T. S.; Dreizin, E. L. Fully dense nano-composite energetic powders prepared by arrested reactive milling. *Proceedings of the Combustion Institute* **2005**, *30* (2), 2071-2078.
- Seelig, G.; Soloveichik, D.; Zhang, D. Y.; Winfree, E. Enzyme-free nucleic acid logic circuits. *Science* **2006**, *314* (5805), 1585-1588.
- Seeman, N. C. Nucleic acid junctions and lattices. *Journal of Theoretical Biology* **1982**, *99* (2), 237-247.
- Seeman, N.C. **1992**. Nanoengineering with DNA. In Symposium S – Biomolecular Materials, pp. 123-134.
- Seo, S. E.; Wang, M. X.; Shade, C. M.; Rouge, J. L.; Brown, K. A.; Mirkin, C. A. Modulating the Bond Strength of DNA–Nanoparticle Superlattices. *ACS Nano* **2015**, *10* (2), 1771-1779.
- Séverac, F.; Alphonse, P.; Estève, A.; Bancaud, A.; Rossi, C. High-Energy Al/CuO Nanocomposites Obtained by DNA-Directed Assembly. *Advanced Functional Materials* **2012**, *22* (2), 323-329.

- Sexton, B. A.; Hughes, A. E. A comparison of weak molecular adsorption of organic molecules on clean copper and platinum surfaces. *Surface Science* **1984**, *140* (1), 227-248.
- Shende, R.; Subramanian, S.; Hasan, S.; Apperson, S.; Thiruvengadathan, R.; Gangopadhyay, K.; ... Balas, W. Nanoenergetic Composites of CuO Nanorods, Nanowires, and Al-Nanoparticles. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics* **2008**, *33* (2), 122-130.
- Skripov, V. P.; Koverda, V. P.; Skokov, V. N. Size effect on melting of small particles. *Physica Status Solidi A: Applications and Materials Science* **1981**, *66* (1), 109-118.
- Song, T.; Garg, S.; Mokhtar, R.; Bui, H.; Reif, J. Analog Computation by DNA Strand Displacement Circuits. *ACS Synthetic Biology* **2016**, *5* (8), 898-912.
- Souza, G. R.; Miller, J. H. Oligonucleotide detection using angle-dependent light scattering and fractal dimension analysis of gold-DNA aggregates. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123* (27), 6734-6735.
- Srisa-Art, M.; Dyson, E. C.; deMello, A. J.; Edel, J. B. Monitoring of real-time streptavidin-biotin binding kinetics using droplet microfluidics. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (18), 7063-7067.
- Stacy, S. C.; Pantoya, M. L. Laser Ignition of Nano-Composite Energetic Loose Powders. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics* **2013**, *38* (3), 441-447.
- Stamatis, D.; Jiang, Z.; Hoffmann, V. K.; Schoenitz, M.; Dreizin, E. L. Fully dense, aluminum-rich Al-CuO nanocomposite powders for energetic formulations. *Combustion Science and Technology* **2008**, *181* (1), 97-116.
- Stayton, P. S.; Freitag, S.; Klumb, L. A.; Chilkoti, A.; Chu, V.; Penzotti, J. E.; ... Stenkamp, R. E. Streptavidin-biotin binding energetics. *Biomolecular Engineering* **1999**, *16* (1), 39-44.
- Steel, A. B.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J. Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold. *Analytical Chemistry* **1998**, *70* (22), 4670-4677.
- Storhoff, J. J.; Lazarides, A. A.; Mucic, R. C.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Schatz, G. C. What controls the optical properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies? *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122* (19), 4640-4650.
- Sun, J.; Pantoya, M. L.; Simon, S. L. Dependence of size and size distribution on reactivity of aluminum nanoparticles in reactions with oxygen and MoO₃. *Thermochimica Acta* **2006**, *444* (2), 117-127.
- Tan, L. H.; Xing, H.; Chen, H.; Lu, Y. Facile and efficient preparation of anisotropic DNA-functionalized gold nanoparticles and their regioselective assembly. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (47), 17675-17678.

- Taton, G. **2013**. *Conception et réalisation d'un microsysteme d'initiation pyrotechnique intelligent et sécurisé pour applications spatiales* (Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier-Toulouse III).
- Taton, T. A.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science* **2000**, *289* (5485), 1757-1760.
- Thiruvengadathan, R.; Chung, S. W.; Basuray, S.; Balasubramanian, B.; Staley, C. S.; Gangopadhyay, K.; Gangopadhyay, S. A versatile self-assembly approach toward high performance nanoenergetic composite using functionalized graphene. *Langmuir* **2014**, *30* (22), 6556-6564.
- Tillotson, T. M.; Gash, A. E.; Simpson, R. L.; Hrubesh, L. W.; Satcher, J. H.; Poco, J. F. Nanostructured energetic materials using sol-gel methodologies. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2001**, *285* (1), 338-345.
- Toomey, E.; Xu, J.; Vecchioni, S.; Rothschild, L.; Wind, S. J.; Fernandes, G. E. Comparison of Canonical versus Silver (I)-Mediated Base-Pairing on Single Molecule Conductance in Polycytosine dsDNA. *Journal of Physical Chemistry C* **2016**, *120* (14), 7804-7809.
- Trinh, L. T.; Kjøniksen, A. L.; Zhu, K.; Knudsen, K. D.; Volden, S.; Glomm, W. R.; Nyström, B. Slow salt-induced aggregation of citrate-covered silver particles in aqueous solutions of cellulose derivatives. *Colloid and Polymer Science* **2009**, *287* (12), 1391-1404.
- Trunov, M. A.; Schoenitz, M.; Zhu, X.; Dreizin, E. L. Effect of polymorphic phase transformations in Al₂O₃ film on oxidation kinetics of aluminum powders. *Combustion and Flame* **2005**, *140* (4), 310-318.
- Umbrajkar, S. M.; Schoenitz, M.; Dreizin, E. L. Control of Structural Refinement and Composition in Al-MoO₃ Nanocomposites Prepared by Arrested Reactive Milling. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics* **2006**, *31* (5), 382-389.
- Valignat, M. P.; Theodoly, O.; Crocker, J. C.; Russel, W. B.; Chaikin, P. M. Reversible self-assembly and directed assembly of DNA-linked micrometer-sized colloids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102* (12), 4225-4229.
- Verwey, E. J. W.; Overbeek, J. T. G.; Overbeek, J. T. G. **1948**. *Theory of the stability of lyophobic colloids*. Courier Corporation.
- Vo, T.; Venkatasubramanian, V.; Kumar, S.; Srinivasan, B.; Pal, S.; Zhang, Y.; Gang, O. Stoichiometric control of DNA-grafted colloid self-assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112* (16), 4982-4987.
- Wang, J.; Rivas, G.; Jiang, M.; Zhang, X. Electrochemically induced release of DNA from gold ultramicroelectrodes. *Langmuir* **1999**, *15* (19), 6541-6545.

- Wang, Y.; Wang, Y.; Zheng, X.; Ducrot, E.; Lee, M. G.; Yi, G. R.; ... Pine, D. J. Synthetic strategies toward DNA-coated colloids that crystallize. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137* (33), 10760-10766.
- Watanabe, T.; Kawanami, O.; Katoh, H.; Honda, K.; Nishimura, Y.; Tsuboi, M. SERS study of molecular adsorption: Some nucleic acid bases on Ag electrodes. *Surface Science* **1985**, *158* (1-3), 341-351.
- Weber, P. C.; Ohlendorf, D. H.; Wendoloski, J. J.; Salemme, F. R. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science* **1989**, *243* (4887), 85.
- Weismiller, M. R.; Malchi, J. Y.; Lee, J. G.; Yetter, R. A.; Foley, T. J. Effects of fuel and oxidizer particle dimensions on the propagation of aluminum containing thermites. *Proceedings of the Combustion Institute* **2011**, *33* (2), 1989-1996.
- Weitz, D. A.; Huang, J. S.; Lin, M. Y.; Sung, J. Dynamics of diffusion-limited kinetic aggregation. *Physical Review Letters* **1984**, *53* (17), 1657.
- Weitz, D. A.; Huang, J. S.; Lin, M. Y.; Sung, J. Limits of the fractal dimension for irreversible kinetic aggregation of gold colloids. *Physical Review Letters* **1985a**, *54* (13), 1416.
- Weitz, D. A.; Lin, M. Y.; Sandroff, C. J. Colloidal aggregation revisited: new insights based on fractal structure and surface-enhanced Raman scattering. *Surface Science* **1985b**, *158* (1-3), 147-164.
- Wilchek, M. B. E. A.; Bayer, E. A. Applications of avidin-biotin technology: literature survey. *Methods in enzymology* **1990**, *184*, 14-45.
- Wronski, C. R. M. The size dependence of the melting point of small particles of tin. *British Journal of Applied Physics* **1967**, *18* (12), 1731.
- Xing, H.; Wang, Z.; Xu, Z.; Wong, N. Y.; Xiang, Y.; Liu, G. L.; Lu, Y. DNA-directed assembly of asymmetric nanoclusters using Janus nanoparticles. *ACS Nano* **2011**, *6* (1), 802-809.
- Xiong, H.; van der Lelie, D.; Gang, O. Phase behavior of nanoparticles assembled by DNA linkers. *Physical Review Letters* **2009**, *102* (1), 015504.
- Xu, H.; Wu, H.; Huang, F.; Song, S.; Li, W.; Cao, Y.; Fan, C. Magnetically assisted DNA assays: high selectivity using conjugated polymers for amplified fluorescent transduction. *Nucleic Acids Research* **2005**, *33* (9), e83-e83.
- Yamada, T.; Shirasaka, K.; Takano, A.; Kawai, M. Adsorption of cytosine, thymine, guanine and adenine on Cu (110) studied by infrared reflection absorption spectroscopy. *Surface Science* **2004**, *561* (2), 233-247.

- Zakeri, B.; Lu, T. K. **2015**. DNA nanotechnology: new adventures for an old warhorse. *Current opinion in chemical biology*, *28*, 9-14.
- Zhang, K.; Rossi, C.; Tenailleau, C.; Alphonse, P.; Chane-Ching, J. Y. Synthesis of large-area and aligned copper oxide nanowires from copper thin film on silicon substrate. *Nanotechnology* **2007**, *18* (27), 275607.
- Zhang, Q.; Jiang, Q.; Li, N.; Dai, L.; Liu, Q.; Song, L.; ... Du, Y. DNA origami as an in vivo drug delivery vehicle for cancer therapy. *Acs Nano* **2014**, *8* (7), 6633-6643.
- Zhang, W.; Yin, B.; Shen, R.; Ye, J.; Thomas, J. A.; Chao, Y. Significantly enhanced energy output from 3D ordered macroporous structured Fe₂O₃/Al nanothermite film. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013a**, *5* (2), 239-242.
- Zhang, X.; Wang, Y.; Chen, Z.; Xu, J.; Cui, G. Arithmetic computation using self-assembly of DNA tiles: subtraction and division. *Progress in Natural Science* **2009**, *19* (3), 377-388.
- Zhang, Y.; Lu, F.; Yager, K. G.; van der Lelie, D.; Gang, O. A general strategy for the DNA-mediated self-assembly of functional nanoparticles into heterogeneous systems. *Nature Nanotechnology* **2013b**, *8* (11), 865-872.
- Zhao, X.; Tapeç-Dytioco, R.; Tan, W. Ultrasensitive DNA detection using highly fluorescent bioconjugated nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (38), 11474-11475.
- Zhao, Y. D.; Pang, D. W.; Hu, S.; Wang, Z. L.; Cheng, J. K.; Qi, Y. P.; ... Lin, Z. H. DNA-modified electrodes Part 3.: spectroscopic characterization of DNA-modified gold electrodes. *Analytica Chimica Acta* **1999**, *388* (1), 93-101.
- Zhirnov, V.; Zadegan, R. M.; Sandhu, G. S.; Church, G. M.; Hughes, W. L. Nucleic acid memory. *Nature Materials* **2016**, *15* (4), 366-370.
- Zhou, L.; Piekielek, N.; Chowdhury, S.; Zachariah, M. R. Time-resolved mass spectrometry of the exothermic reaction between nanoaluminum and metal oxides: the role of oxygen release. *Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114* (33), 14269-14275.
- Zuckermann, R.; Corey, D.; Schultz, P. Efficient methods for attachment of thiol specific probes to the 3'-ends of synthetic oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Research* **1987**, *15* (13), 5305-5321.
- Zulehner, W. Czochralski growth of silicon. *Journal of Crystal Growth* **1983**, *65* (1-3), 189-213.