

THESE

présentée pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'ECOLE CENTRALE DE LYON

Spécialité : matière condensée.

par

Marie-Hélène ROUILLAT

Caractérisation par microscopie à force atomique d'une puce à ADN, de l'élaboration à l'hybridation

Soutenue, le 12 juillet 2004 devant la commission d'examen :

M.	M. Labeau	Rapporteur
	B. Nysten	Rapporteur
	J.-R. Martin	Président
	Ch. Place	
Mme.	M. Phaner-Goutorbe	Directeur de thèse
M.	Y. Robach	Directeur de thèse
	T. Livache	Invité

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe nanophysique et microscopies en champ proche du Laboratoire d'Electronique, Opto-électronique et Microsystème (LEOM) de l'Ecole Centrale de Lyon. Je remercie G. Hollinger de m'avoir accueillie au laboratoire dans le cadre de cette thèse.

Je remercie l'ensemble des membres du jury qui m'ont fait l'immense plaisir de juger ce travail, et tout particulièrement Messieurs M. Labeau et B. Nysten qui ont accepté de rapporter sur cette thèse ainsi que Monsieur J.-R. Martin qui m'a fait l'honneur de présider le jury.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à Magali Phaner-Goutorbe pour m'avoir proposé ce sujet de thèse palpitant et d'avoir assuré sa direction durant ces trois années. Je la remercie pour sa confiance et la liberté dont j'ai pu bénéficier au cours de ces travaux. Je tiens également à remercier sincèrement Yves Robach pour ses conseils et sa courageuse lecture.

Chacun sait qu'une thèse n'est généralement pas le fruit du travail d'une seule personne. Aussi, je voudrais associer à ce travail l'ensemble des personnes qui ont intervenu.

Ces études sur puces à ADN ont été effectuées en collaboration avec l'équipe Biopuce du laboratoire, dirigée par J. R. Martin, et en partenariat avec la Société RosaTech, dirigée par E. Souteyrand. Je remercie chaleureusement l'ensemble des membres de ces équipes qui ont participé à ce travail et tout particulièrement V. Dugas, ingénieur de la société RosaTech, avec qui j'ai collaboré avec beaucoup de plaisir durant ces trois années et sans qui aucun des résultats présentés dans ce travail n'aurait vu le jour. Je remercie également J.-P. Cloarec pour ses explications, ainsi que G. Depré et F. Calevro pour le matériel biologique.

La description des modes oscillants de l'AFM et leur complexité n'ont pas résisté longtemps à notre spécialiste nationale de la modélisation : Geneviève Grenet... Je souhaite lui exprimer toute ma reconnaissance pour son amicale collaboration dans la lutte pour la compréhension des Oscillateurs Harmoniques Non Linéaires. Je me souviendrai longtemps de ces petites questions en apparence bien anodines qui vous occupent des semaines entières !

En outre, les réalisations expérimentales conduites en microscopie à force atomique doivent beaucoup à Roland Dubent et ses nombreuses compétences, qui par le fruit de son imagination a confectionné portes échantillons, cellule et système anti vibratoire. Un grand merci également pour les bons moments passés ensemble, le bonjour, bonsoir, et ses petits mots qui sont essentiels à la bonne vie du laboratoire. Egalement, une pensée pour notre électronicien préféré, Claude Bottella, pour ses patientes explications !

Par ailleurs, je souhaite remercier l'ensemble des membres de l'équipe Physique pour leur joie et leur bonne humeur... Merci à Alain Gagnaire, mon tuteur pédagogique, pour avoir aménagé mes enseignements et m'avoir suivie dans la formation PBL aux moniteurs. Merci à Jacques Joseph pour ses appuis dans la réalisation d'expériences pédagogiques. Merci à Ségolène Callard pour son intervention au stage PBL. Merci à Thérèse Martin pour son efficacité. Merci à Brice Devif, pour les kilos impressions et autres coups de mains.

Pour finir, je remercie l'ensemble des personnes avec qui j'ai partagé ces années de thèses.

Je commence donc par mes deux compagnons de bureaux, Nicolas et Gabriel... Un grand MERCI pour tous les bons moments passés ensemble, pour leur collaboration "à leur manière"... les rigolades, les chuts, les tiramisus, les filles... Bonne continuation à tous les deux dans les longs méandres de la thèse ! Un grand merci à notre immense acolyte du quatrième, j'ai nommé Adel, pour son humour sarcastique et ses petits passages égayant notre antre ! Je poursuis par les "chimistes" du troisième, la tribut gauloise du laboratoire... merci pour votre accueil chaleureux, avec mentions spéciales aux deux Crakers : Edouard et Medhi ! Enfin, je finirais par mes partenaires de Coffee Break... Grand Merci à la Grande Blonde, en attendant son retour en fanfare dans les hautes sphères du quatrième, à Fabien et ses précieux conseils tout domaine confondu, Christelle l'appliquée, Rémi et Sébastien les épitaxieurs, Marek le polonais, Josselin l'informaticien, Badhise, mimi Nicole et Rozenn pour leur gentillesse...

Table des matières

Introduction	9
1 Principe du microscope à force atomique	11
1.1 Principe général	11
1.2 Forces d'interaction	13
1.2.1 Interactions à longue portée	14
1.2.2 Contact et forces à courte portée	15
1.3 Les différents modes de fonctionnement de l'AFM	17
1.3.1 Le mode contact	18
1.3.2 Microscopie à force dynamique ou modes oscillants	24
1.3.3 Principe général du mode modulation en amplitude (AM-AFM)	25
1.3.4 Modélisation du comportement du levier en présence d'un potentiel d'interaction	27
1.3.5 Relation entre la dissipation d'énergie et le déphasage du levier	37
1.4 Présentation de notre système expérimental	38
1.4.1 Présentation du microscope	38
1.4.2 Discussion sur le choix des conditions d'imagerie	39
Conclusions	44
Bibliographie	45
2 Les puces à ADN	49
2.1 Les puces à ADN et applications	49
2.1.1 L'ADN, support de l'information génétique	49
2.1.2 Qu'est-ce-qu'une puce à ADN ?	53
2.1.3 Applications des puces à ADN	53
2.2 Les principales voies de fabrication	55
2.2.1 Immobilisation de brins présynthétisés - "ex-situ"	56
2.2.2 Synthèse "in-situ"	60

2.3	les puces réalisées au laboratoire LEOM	61
2.4	Les méthodes de lecture des puces	63
2.4.1	Les méthodes directes	63
2.4.2	Les méthodes indirectes	64
	Conclusions	66
	Bibliographie	69
3	Revue bibliographique des études de puces à ADN par AFM	75
3.1	Etudes AFM de molécules d'ADN supportées	76
3.1.1	Choix du substrat	76
3.1.2	Etudes des conformations de l'ADN	77
3.1.3	Etudes de la hauteur des brins d'ADN	78
3.1.4	Analyses fonctionnelles de l'ADN par AFM	82
3.2	Application de l'AFM aux puces à ADN	84
3.2.1	Etude par mesures chimiques	85
3.2.2	Etude par mesure des variations du potentiel d'interaction pointe-surface	85
3.2.3	Etudes morphologiques	86
	Conclusions	93
	Bibliographie	95
4	Etudes expérimentales de la préparation des puces à ADN par AFM	99
4.1	Caractérisation des substrats	100
4.2	La silanisation	103
4.2.1	Les protocoles	103
4.2.2	Description des résultats	104
4.3	La phase d'activation	113
4.4	L'immobilisation	116
4.4.1	Le prototype de la puce modèle à 3 plots	116
4.4.2	Analyses de systèmes complémentaires	126
	Conclusions	133
	Bibliographie	135
5	Etude expérimentale des puces hybridées par AFM	139
5.1	Analyses de tests d'hybridation par AFM	139
5.1.1	Les systèmes étudiés	140
5.1.2	Protocoles d'hybridation	141
5.1.3	Hybridation de doubles brins de 1500 bases	142

5.1.4	Hybridation de monobrins de 600 bases	149
5.1.5	Hybridation de monobrins de 84 bases	163
5.2	Premiers essais de manipulation	167
5.2.1	Essai en mode contact	168
5.2.2	Essais en mode Contact Intermittent appuyé	170
	Conclusions	174
	Bibliographie	175

Conclusion Générale **179**

Introduction

Depuis son avènement en 1986, le microscope à force atomique, ou AFM, a connu un développement exponentiel de son utilisation. Durant toutes ces années, l'AFM a subi de nombreuses évolutions dont la plus importante est probablement l'invention des modes de fonctionnement dynamiques. Dans ces modes, la pointe n'est non plus en contact permanent avec l'échantillon mais oscille à proximité de sa surface. Ces modes conventionnellement appelés *Contact-Intermittent* et *Non-contact* permettent de réduire considérablement la contrainte exercée par la pointe sur la surface de l'échantillon, élargissant ainsi l'utilisation de l'AFM aux matériaux mous et en particulier à l'étude de matériaux biologiques.

Les développements de la biologie moléculaire durant les années 90 ont montré la nécessité de mettre au point des outils permettant l'analyse simultanée d'un grand nombre de molécules. Sur le principe de l'intégration de minuscules composants sur silicium en électronique, la création de *biopuces* a ainsi vu le jour. L'ADN de part son importance dans l'ensemble des processus biologiques est certainement la molécule qui a fait l'objet du plus grand nombre de travaux. Les puces à ADN reposent sur le principe de la reconnaissance spécifique par hybridation de deux monobrins d'ADN de séquences complémentaires. Elaborées à partir d'un substrat solide fonctionnalisé sur lequel sont réalisés par greffage des plots de monobrins-sondes de séquences connues, elles permettent d'identifier dans une solution, les monobrins-cibles possédant la séquence complémentaire.

Dans la course à l'intégration de ces systèmes pour augmenter le nombre de séquences analysées sur une même puce, les tailles de plots tendent aujourd'hui à se réduire à l'échelle du micron. Or, les méthodes conventionnellement utilisées pour l'analyse des puces (fluorescence, spectroscopie infra-rouge,) ne sont pas appropriées à la détection des très faibles quantités de matière. De plus, leurs mesures étant macroscopiques, elles ne donnent pas d'informations locales sur la constitution des puces à cette échelle.

L'avènement des *nanobiotechnologies* ne peut donc s'opérer que par l'adaptation des moyens de caractérisation de ces biopuces à des échelles submicroniques. Ainsi, les microscopies en champ proche et en particulier l'AFM, par sa capacité à imager des surfaces "molles" avec une résolution moléculaire, à l'air mais aussi en solution, se présentent comme des outils bien adaptés.

Ce travail s'intéresse à la caractérisation par microscopie à force atomique de puces à ADN de leur élaboration jusqu'à l'investigation des processus d'hybridation. Cette étude se fixe deux objectifs. Le premier réside dans la compréhension des mécanismes de greffages des oligonucléotides de manière à optimiser les protocoles de préparation en vue d'une réduction de la taille des plots. Réciproquement, les puces étant des systèmes très complexes, elles offrent la possibilité d'éprouver les propriétés de caractérisation de l'AFM et de discuter l'origine des contrastes topographiques sur ces surfaces molles.

Ainsi, ce travail débutera par une description détaillée des modes de fonctionnement de l'AFM. On insistera tout particulièrement sur les avancées dans la compréhension du mode dynamique en amplitude. Une discussion sur le choix des conditions expérimentales adaptées pour notre étude sera réalisée en fin de cette partie.

Une seconde partie développera ce que sont les puces à ADN. Une revue bibliographique montrera que ces systèmes peuvent être élaborés suivant de nombreuses voies parmi lesquelles on présentera celles choisies au laboratoire.

Dans une troisième partie, on s'intéressera aux études antérieures réalisées par AFM sur des systèmes voisins identiques à nos puces, constitués de sondes immobilisées sur substrat. On présentera également les principaux points clefs de la caractérisation de l'ADN par AFM, permettant de dégager des informations concernant les conditions favorables pour accéder à une information topologique précise sur ces matériaux.

Les deux derniers chapitres seront dédiés aux études expérimentales que nous avons conduites en microscopie à force atomique sur des puces à ADN modèles. Dans une première partie, une analyse détaillée de chacune des étapes impliquées dans la préparation de nos puces à ADN sera réalisée : de la préparation du substrat à l'immobilisation des sondes. L'influence sur les morphologies des échantillons de deux paramètres a particulièrement relevé notre attention : il s'agit de la longueur et de la nature des séquences des sondes immobilisées. La compréhension des mécanismes de greffage sera au centre de nos préoccupations. Enfin, dans la dernière partie on procèdera à la caractérisation des processus d'hybridation. On discutera de l'influence de la nature et de la longueur des brins hybridés. Pour ce faire des brins de trois longueurs différentes, correspondant à 1500, 600 et 84 bases de long, ont été sélectionnés. La configuration initiale des brins sera aussi discuté qu'il s'agisse de brins non, mono et multimarqués mais aussi de simples et doubles brins.

Chapitre 1

Principe du microscope à force atomique

Inventé par Binnig en 1986 [1] le microscope à force atomique ou AFM (Atomic Force Microscopy) s'inscrit aujourd'hui comme un outil d'analyse incontournable à l'échelle de la molécule. Comme le microscope à effet tunnel, il appartient à la famille des microscopes à sonde locale, à la différence près que l'on ne s'intéresse plus au courant tunnel qui s'instaure entre la sonde et la surface de l'échantillon mais aux forces d'interaction qui existent entre la pointe et l'échantillon. L'AFM a néanmoins connu de nombreuses modifications afin de s'adapter à des domaines d'applications les plus diverses possibles. La transformation certainement la plus marquante résulte de l'avènement des modes oscillants en 1993 [2], qui a considérablement élargi le champ d'applications de l'AFM, et a ouvert, en particulier, la voie de l'imagerie sur matériaux de faible dureté. Dans ce chapitre, on présentera dans un premier temps le principe général du microscope à force atomique. On discutera ensuite deux différents modes d'imagerie qui seront utilisés par la suite dans ce travail. Puis, on détaillera le mode de fonctionnement en amplitude ainsi que les avancées dans sa compréhension et sa modélisation.

1.1 Principe général

Le principe général des microscopes à sonde locale repose sur le contrôle des déplacements d'une sonde ou pointe de taille nanométrique dans le champ proche de l'échantillon de manière à collecter des informations relatives à des caractéristiques de l'échantillon à l'échelle de la taille de la pointe.

Dans le cas du microscope à force atomique, cette pointe est montée sur un levier ou cantilever, qui se déforme élastiquement en présence des aspérités de surface. En régime quasi-statique, la force de rappel du levier compense à tout instant les forces d'interactions pointe-échantillon. Si, on ne s'intéresse qu'à la composante verticale, on a donc : $F_{pte-ech} = kz$, où k est la rai-

leur effective du système surface-levier du levier, $F_{pte-ech}$ la force d'interaction entre la pointe et l'échantillon. Ainsi, la déflexion du levier rend compte des variations des forces d'interaction pointe-échantillon et donc de la topographie de l'échantillon dans le cas où il est homogène.

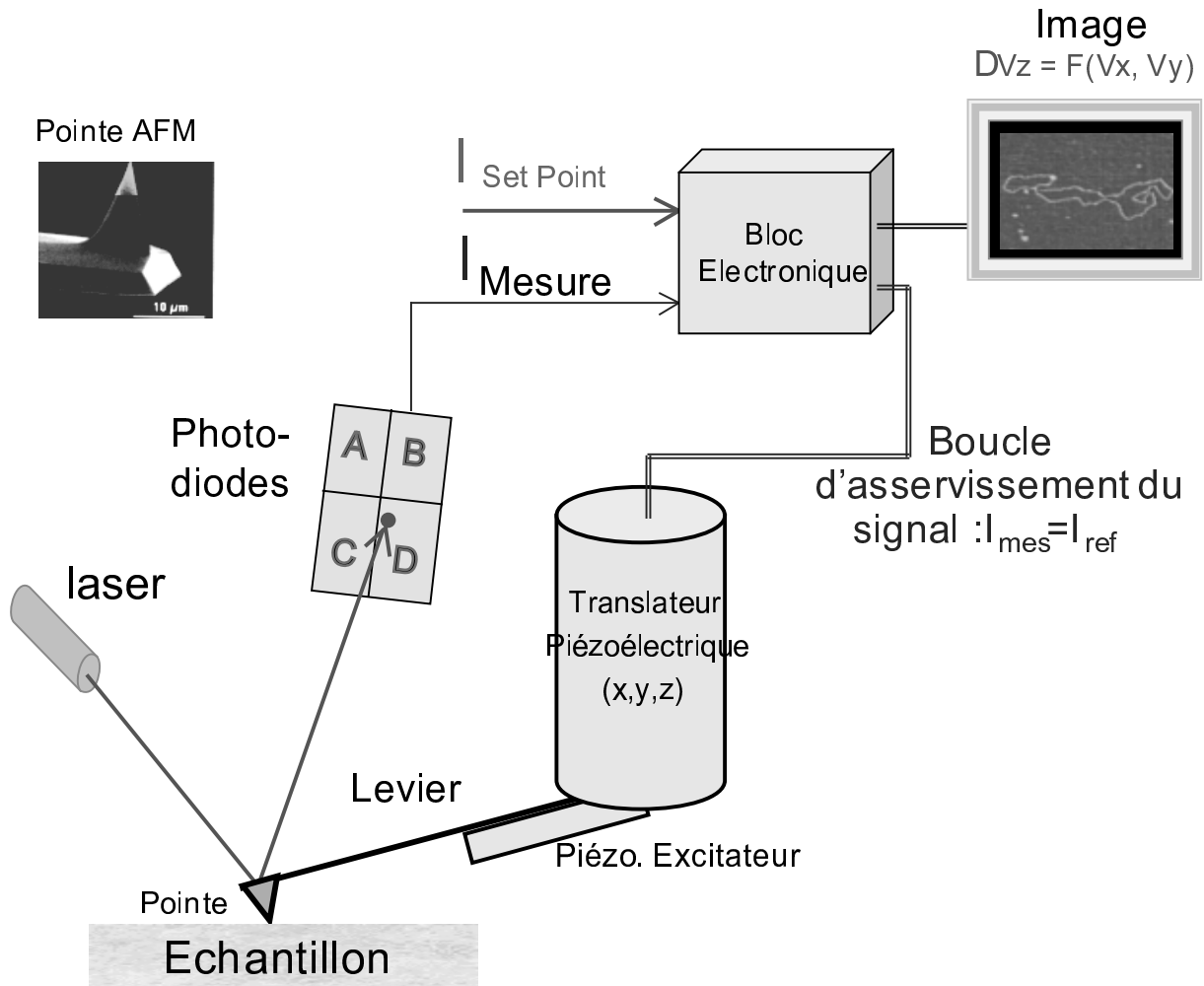


FIG.1.1 – Schéma de principe du microscope à force atomique.

La déflexion du levier est mesurée à l'aide d'un système optique élémentaire. Un laser focalisé sur l'extrémité du levier va se réfléchir en direction d'une photodiode. La photodiode est constituée de quatre cadrans qui permettent de définir précisément la position du spot du laser sur celle-ci par mesure de différences d'intensité. La déflexion verticale est donnée par le signal $(A+B) - (C+D)$ et la torsion (déflexion latérale) par $(A+C) - (B+D)$. La photodiode renvoie ensuite à un bloc électronique la valeur en intensité mesurée correspondant à la déflexion de l'instant t . Comme le levier se déforme élastiquement, en enregistrant les déflexions, on a ainsi accès à la topographie de surface d'un échantillon.

De manière générale, l'acquisition des données ne s'effectue pas de manière directe mais par

asservissement de la position de la pointe à une valeur de déflexion de référence appelée SET-POINT. Les valeurs de la déflexion du levier mesurées à tout instant sont ainsi comparées à cette valeur de référence. Si la valeur mesurée est différente de la valeur de référence, l'électronique envoie aux céramiques piézoélectriques, qui commandent les déplacements de la pointe, des tensions de manière à ce qu'elles se contractent ou se dilatent de façon à ramener la valeur de la déflexion instantanée à la valeur de référence. On parle d'asservissement ou de boucle de rétroaction. La réponse des céramiques piézoélectriques étant en première approximation linéaire en tension, la topographie de l'échantillon est obtenue en enregistrant les tensions qu'il faut appliquer aux céramiques piézoélectriques pour ramener la valeur instantanée à la valeur de référence. Ce principe de fonctionnement par asservissement ou boucle de rétroaction conduit donc à travailler à "déflexion constante" appelé encore mode à "force constante". Ce mode est le premier mis au point : il s'agit du mode contact. Le principe de fonctionnement de l'AFM repose donc sur la mesure des forces d'interaction entre la pointe et la surface.

1.2 Forces d'interaction

L'extension spatiale de l'extrémité de la pointe ainsi que la distance entre la pointe et l'échantillon sont deux paramètres qui vont déterminer la nature des forces prédominantes dans le processus d'acquisition de l'AFM. Les pointes présentent généralement un rayon de courbure de l'ordre de la dizaine de nanomètres. Donc, à la différence du microscope à effet tunnel (STM), où le courant mesuré correspond dans sa quasi totalité au courant tunnel qui passe par le dernier atome de la pointe, en microscopie à force atomique (AFM), le signal résulte d'un moyennage des forces d'interaction sur une centaine, voire quelques milliers d'atomes.

C'est dans la sensibilité de la pointe aux variations du champ de force en fonction de la distance que réside la précision de la microscopie à force atomique. En effet, la consigne de travail à force constante conduit la pointe à suivre les courbes d'isoforce. En fonction de la distance pointe-échantillon, on distinguera différents modes de fonctionnement de l'appareil.

En l'absence de champ externe, les forces dominantes sont les interactions de Van der Waals, les interactions répulsives à courte portée ainsi que les forces d'adhésion et de capillarité. Nous allons détailler dans le paragraphe suivant ces forces en précisant leur domaine d'influence et quelques ordres de grandeur compte tenues des données de notre système.

1.2.1 Interactions à longue portée

a- Les forces de Van der Waals

Les fluctuations du champ électromagnétique, résultant d'effets thermiques ou de fluctuations quantiques, sont à l'origine des forces d'interactions de Van der Waals. La description théorique de ces forces est généralement effectuée dans le cadre d'une géométrie pointe-échantillon simplifiée et ramenée à une configuration sphère-plan avec $R \gg z$ (approximation de *Derjaguin*) [3]. Dans ce cadre, la contribution des forces de Van der Waals est :

$$F_{VdW}(z) = -\frac{HR}{6z^2} \quad (1.1)$$

où H est la constante de Hamaker, R le rayon de courbure de la pointe et z la distance pointe-échantillon.

Cette force est dans la plupart des cas une force attractive et décroît lorsque la pointe s'éloigne de la surface. Les valeurs de H (en module) étant typiquement de l'ordre de 10^{-19} J, pour un rayon de courbure de la pointe de 10 nm et une distance pointe-surface de 1 nm, la force de Van der Waals exercée sur la pointe est de 0,1 nN. Cette valeur donne l'ordre de grandeur de cette contribution en AFM.

b- Les forces électrostatiques

Les forces électrostatiques constituent la seconde contribution aux forces d'interaction à longue portée. En fonction de la nature du matériau, de la pointe et des expériences, ces contributions peuvent jouer un rôle important. De nombreux modèles décrivent l'interaction entre une pointe et un substrat de nature métallique [4, 5]. Par ailleurs, dans le cas d'un échantillon isolant, la présence de deux distributions de charges, une sur la pointe et une sur l'échantillon, conduit également à une interaction électrostatique entre la pointe et la surface, décrite par les expression de Coulomb dans une géométrie sphère-plan. [6, 7]

Considérons une pointe chargée, de rayon R , représentée par un point de charge, Q situé à l'aplomb d'une région de la surface possédant une densité de charge uniforme σ . L'interaction électrostatique résultante, quand la pointe et l'échantillon sont espacés de la distance z , est donnée par l'expression :

$$F_{electrostat.}(z) = \frac{Q\sigma}{2\epsilon_0} \left[1 - \frac{z}{\sqrt{R^2 + z^2}} \right], \quad (1.2)$$

Pour une distance de 5 nm entre la pointe et l'échantillon, un point de charge sur la pointe de $1,9 \times 10^{-16} \text{C}$, une densité surfacique de charge de $2 \times 10^{-8} \text{C/cm}^2$ et un rayon de pointe de 10 nm, la force électrostatique est d'environ 1 nN. Cette valeur est donc du même ordre de grandeur que les contributions de Van der Waals.

1.2.2 Contact et forces à courte portée

En ce qui concerne les forces de courte portée, les principales contributions relèvent des forces d'adhésion et des forces de capillarité.

a- Contact et adhésion

A l'échelle de l'atome ou de la molécule, les forces répulsives proviennent généralement, soit de la répulsion ionique, soit du principe de Pauli. Dans le cas de l'AFM les aires de contact impliquent un grand nombre d'atomes, de l'ordre de quelques centaines ou quelques milliers, soit un nombre suffisamment grand pour que les propriétés à cette échelle ne soient plus décrites par des interactions atomiques mais par les théories des milieux continus et en particulier sous l'approximation du continuum d'élasticité.

En fonction de la raideur des surfaces et de la pointe utilisée on trouvera différents modèles de description du contact. Les deux paramètres principaux qui régissent le contact d'une pointe avec un échantillon sont la dureté des matériaux (pointe et surface) ainsi que leur nature chimique. Ainsi, en fonction de ces deux paramètres, la pointe pourra (ou non) déformer la surface de l'échantillon, ce qui conduira à une *indentation* de la surface par la pointe. On appellera matériau *dur* un matériau possédant un module de Young de l'ordre de 100 GPa et matériau *mou ou déformable* celui dont la valeur du module de Young est inférieure à 1 GPa. A titre d'exemple, la silice possède un module de 90 GPa tandis que l'ADN double brin possède un module de Young de 0,34 GPa suivant sa longueur.

Plusieurs modèles ont été élaborés pour décrire le contact entre deux matériaux. Historiquement le modèle de Herz (1881) [8] a permis de décrire le contact de deux objets soumis à de très faibles contraintes en négligeant les forces d'adhésion. Cette description conduit à une rupture du contact progressive. Aujourd'hui deux théories permettent de décrire deux catégories de contact. La théorie de Derjaguin-Muller-Toporov (DMT) [9] prend en compte les forces d'adhésion mais les auteurs supposent qu'elles sont incapables de déformer les surfaces. Il s'agit donc d'une description du contact entre deux surfaces "dures". Au contraire, la théorie de Johnson-Kendall-Roberts (JKR) [10] décrit le contact entre deux surfaces et la déformation des surfaces molles durant le contact. On va développer brièvement cette théorie, qui est celle qui décrit le mieux le

contact dans notre système où la surface est constituée d'objets biologiques et possède donc un faible module d'élasticité.

Dans le modèle JKR [10], les forces agissant sur l'extérieur de l'aire de contact de la pointe avec l'échantillon sont supposées très faibles et seront donc considérées comme nulles tandis que la contrainte à la ligne de contact tend vers l'infini. Ainsi, le centre du contact est répulsif alors que sa périphérie est attractive. L'énergie de surface provoque un aplatissement des surfaces et la formation d'un col adhésif. Sous ces hypothèses, le module élastique effectif du contact pointe échantillon, K , s'exprime de la manière suivante :

$$\frac{1}{K} = \frac{4}{3} \sum_{i=1,2} \frac{1 - \nu_i^2}{E_i} \quad (1.3)$$

avec, E_i le module de Young des deux matériaux (pointe et surface) et ν_i les coefficients de Poisson correspondants. La force d'adhésion, F_{adh} et a le rayon de contact sont donnés par les expressions :

$$F_{adh} = \frac{3}{2} \pi R W_{123} \quad (1.4)$$

$$a = \left[\frac{R}{K} (F + 3\pi R W_{123} + \sqrt{6\pi R F W_{123} + (3\pi R W_{123})^2}) \right]^2 \quad (1.5)$$

où, W_{123} est le travail d'adhésion des solides 1,2 dans le milieu 3, F la force appliquée sur la sphère et R le rayon de la pointe.

Enfin, on peut alors évaluer l'indentation de la pointe δ par :

$$\delta = -\frac{a^2}{R} + \frac{2}{3} \frac{a_0^{3/2}}{R} a^{1/2} \quad (1.6)$$

où, a_0 est le rayon de contact en l'absence de forces externes : $a_0 = \left(\frac{6\pi R^2 W_{123}}{K} \right)^{1/3}$ évalué à partir de l'équation 1.5.

Ainsi, l'adhésion entre une pointe de rayon 10 nm et une surface d'élastomère vaut : $F_{adh} \sim 12$ nN et $a_0 \sim 1$ nm.

b- Forces de capillarité

Enfin, une dernière contribution importante pour les expériences effectuées en mode contact sous conditions ambiantes sont les forces de capillarité. En effet, si l'énergie de surface des matériaux composant la pointe et l'échantillon est élevée, les vapeurs des liquides présents dans l'atmosphère (eau, hydrocarbures) peuvent se condenser spontanément sur ces deux objets. Au

contact il s'établit un pont capillaire entre ces deux surfaces. Le rayon de courbure du pont capillaire est relié aux pressions de vapeurs relatives P/P_{sat} par l'équation de Kelvin [11] :

$$r_k = \frac{2\gamma V}{RT \log(P/P_{sat})} \quad (1.7)$$

La force de Laplace associée à ce ménisque a une expression simple pour $R \gg r_c$:

$$F_{cap} = -4\pi\gamma R \cos\theta \quad (1.8)$$

où, θ est l'angle de contact du liquide avec l'échantillon. Un ordre de grandeur de ces forces pour $\theta = 0$, $\gamma = 20 \text{ mN/m}^2$ et $R = 10 \text{ nm}$ correspond à $F_{cap} \sim 10 \text{ nN}$, valeur tout à fait comparable aux forces adhésives.

Compte tenu des ordres de grandeur obtenus, dans les conditions ambiantes les forces capillaires et adhésives peuvent dominer les forces "moléculaires" dans le domaine de travail de l'AFM.

1.3 Les différents modes de fonctionnement de l'AFM

Dans une première analyse, on peut définir trois modes de fonctionnement de l'AFM pour l'imagerie topographique. Le mode contact (noté C), où comme son nom l'indique la pointe est en permanence en contact avec la surface de l'échantillon. Le mode non-contact (NC) utilise une pointe qui oscille à proximité de la surface avec de petites amplitudes d'oscillation ($< \text{nm}$) et ce, sans qu'il y ait contact entre la pointe et l'échantillon. Le troisième mode, appelé contact intermittent (CI), repose sur le même principe que le mode non contact (NC) à la différence près que les amplitudes d'oscillation sont généralement plus importantes ($> \text{nm}$) et que la pointe entre en "contact" avec la surface à l'extrémité de son oscillation.

Ces trois modes correspondent à des domaines de fonctionnement différents et en particulier ne mettent pas en jeu les mêmes interactions. En première approximation, on peut modéliser le potentiel d'interaction pointe-échantillon par un potentiel de Lennard-Jones, possédant une composante attractive à longue portée, une composante répulsive à très courte portée pour les distances pointe-échantillon inférieures au rayon de Bohr, a_0 , et un régime transitoire entre les deux. Le mode contact fonctionne donc exclusivement dans le domaine répulsif de forces de contact, le mode non-contact dans la région des potentiels attractifs de longue portée et le mode contact intermittent oscille entre les deux. Pour résumer, on peut se reporter au schéma de la figure 1.2.

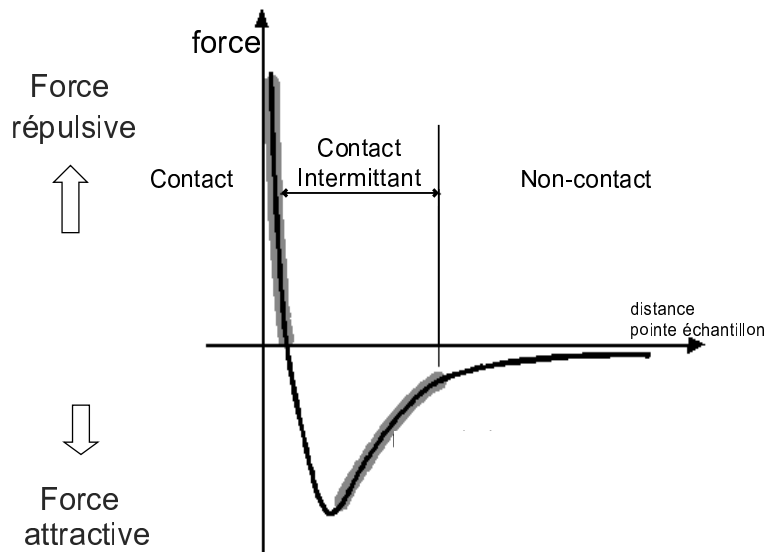


FIG.1.2 – Première approche de la définition des domaines des différentes modes de l'AFM à l'aide d'un potentiel de Lennard-Johns.

Cette description permet une présentation simple des modes de l'AFM. Elle reste néanmoins très simpliste et donc incomplète. En particulier, la distinction entre mode contact intermittent et mode non-contact n'apparaît pas aussi clairement au cours des expériences. En effet, de nombreux résultats expérimentaux [12–14], montrent qu'il est possible, par exemple, d'imager suivant le principe du mode *Contact-Intermittent* mais sans qu'il y ait contact réel entre la pointe et l'échantillon et inversement en régime répulsif pour le mode *Non-Contact*. De ce fait, depuis peu la communauté du champ proche parle davantage de mode contact et de modes oscillants. On distinguera pour les modes oscillants le mode amplitude (noté AM-AFM) et le mode fréquence (noté FM-AFM). Dans la suite de cette partie on s'attachera à décrire chacun de ces modes en spécifiant ses caractéristiques, ses avantages et ses inconvénients. On insistera sur l'origine du contraste ainsi que sur l'interprétation de l'image topographique.

1.3.1 Le mode contact

a- Mode topographique

Le mode contact est historiquement le premier mode mis au point pour le fonctionnement de l'AFM.

Dans ce mode, au cours du balayage de la surface, la pointe est en permanence en contact avec la surface. On enregistre les déflexions du levier sur lequel est montée la pointe. Le levier

se déformant élastiquement, les déflexions sont directement reliées aux variations de la hauteur de la position de la pointe ($F_{pte-ech} = kz$, où k est la raideur effective du système surface-levier du levier). Donc, en enregistrant les déplacements de la pointe on accède à la topographie de l'échantillon. On procède à un asservissement des déplacements de la pointe sur une déflexion de référence (voir fig.1.2). L'image est obtenue à déflexion constante, la rétroaction conduit à imager la surface à force constante.

La topographie de l'échantillon est donc obtenue en régime répulsif. Les forces qui interviennent sont les forces d'adhésion et les forces capillaires (section 1.2.2) qui jouent un rôle important en particulier lorsque l'imagerie est pratiquée à l'air.

Au cours d'une expérience, on peut par ailleurs enregistrer les déflexions latérales mesurées sur la photodiode. Cette déflexion permet de mettre en évidence d'éventuelles variations de rugosité sur les échantillons, mais également d'opérer une différenciation chimique entre différentes zones de la surface. Ainsi, pour un échantillon constitué de deux composants de nature chimique différente, n'induisant pas de différences topographiques, une identification pourra être réalisée en enregistrant les variations de forces latérales (voir la figure 1.3).

b- Mode spectroscopique

La microscopie à force atomique permet aussi, comme nous allons le voir ci-après, d'obtenir des renseignements sur la nature chimique d'un échantillon ainsi que des données sur les propriétés mécaniques de celui-ci. Pour ce faire, on ne balaye plus la surface de l'échantillon avec la pointe, mais on la positionne à l'aplomb d'un point et on enregistre en fonction de la distance pointe échantillon les variations des forces d'interaction. Ces courbes sont appelées des courbes de forces ou courbes approche-retrait, comme illustré sur la figure 1.4.

En 1, la distance pointe échantillon est grande, la pointe ne sent pas le potentiel de l'échantillon. La force détectée est nulle et la déflexion enregistrée renvoie la valeur de la déflexion verticale sur la photodiode après réglage initial. Généralement, cette valeur est mise à zéro. En rapprochant la pointe de la surface, la pointe rentre dans le potentiel de l'échantillon. Si la nature de la pointe et de l'échantillon donne lieu à une interaction attractive, la pointe subit alors un saut brutal et la force détectée présente un signe négatif (point n°2). A partir de 3, la pointe est en contact avec la surface de l'échantillon, si elle continue à se rapprocher, la force imposée par la pointe sur l'échantillon augmente (cf point 4). Lors du retrait, tant que la pointe est en contact avec la surface, elle suit un trajet identique à celui de l'aller. Cependant, dans le cas d'une interaction attractive entre la pointe et l'échantillon le retrait de la pointe hors du potentiel de la surface ne s'opère pas au point 3. Il

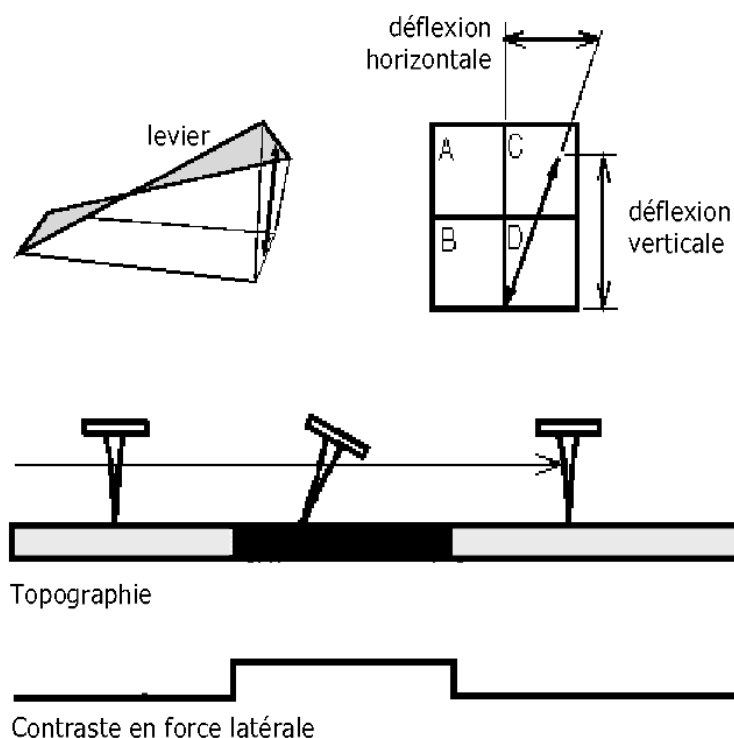


FIG.1.3 – Etude des propriétés chimiques d'un échantillon par mesure des forces latérales. Dans cet exemple l'échantillon ne présente aucune différence topographique. L'identification de deux zones de nature chimique différente s'opère en enregistrant les variations de forces latérales entre les deux zones.

faut que la pointe aille beaucoup plus loin de la surface, en raison de la force d'adhésion, jusqu'en 5 pour que le retrait s'opère. La force est alors ramenée à la valeur qu'elle avait en 1 et suit le même trajet qu'à l'aller.

Ce type de courbes sert généralement à ajuster le point de fonctionnement des conditions d'imagerie, mais elles peuvent également renseigner sur les forces d'adhésion de la pointe avec l'échantillon (mesure de la force à l'arrachement, ou "pull-off"), ainsi que donner des informations sur les propriétés d'élasticité des échantillons (raideur des surfaces [16]) à partir de la pente.

En exploitant ces informations, des images autres que topographiques peuvent être réalisées [15, 17], comme on va maintenant le détailler dans les deux exemples suivants :

Exemple n° 1 : Identification de la nature chimique des éléments en surface

Afin de bien illustrer les possibilités de ce mode, on prendra comme exemple l'étude de Frisbie *et al.* [15]. Ces auteurs ont élaboré des structures alternant des motifs carrés concentriques

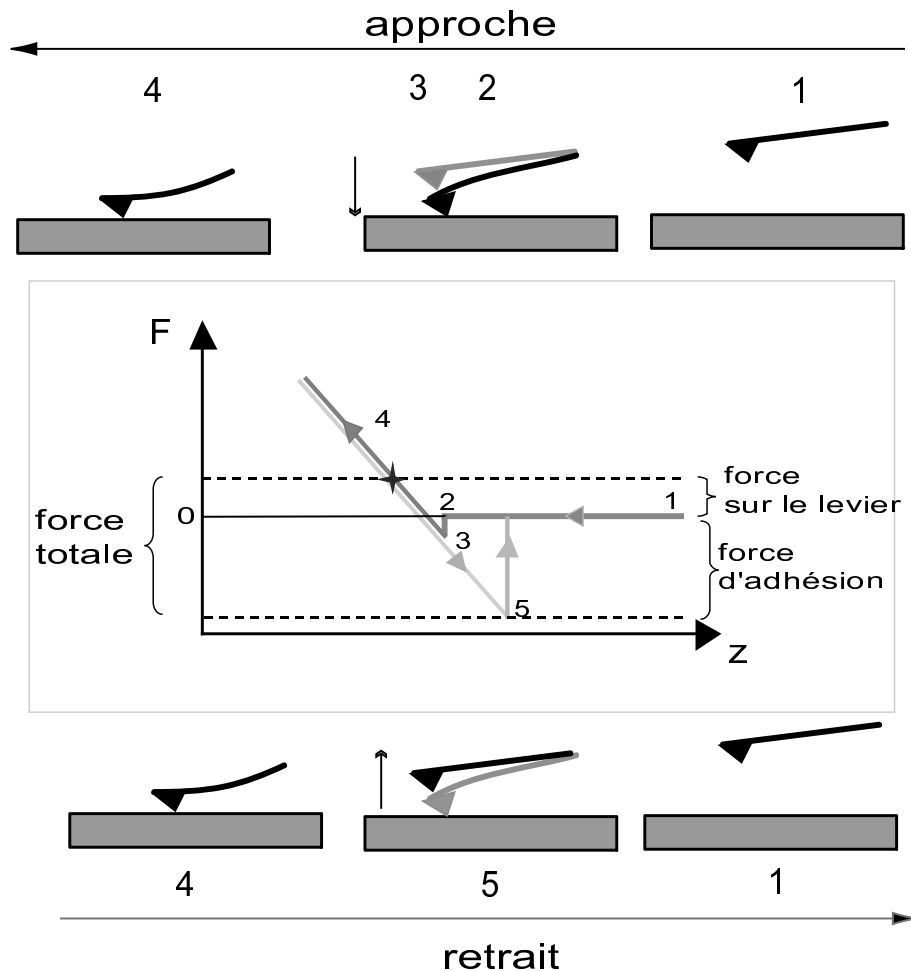


FIG.1.4 – Traduction d'une courbe de force en mode contact. L'étoile représente la valeur de la consigne de travail ou SP (SET POINT).

de molécules possédant soit une terminaison acide $-COOH$, au caractère hydrophile soit une terminaison alkyle en $-CH_3$ au caractère hydrophobe. La surface ainsi obtenue ne présente pas de relief topographique (voir fig.1.5.b). En présence d'eau, une image par microscopie optique a permis de mettre en évidence la présence des domaines couverts d'eau correspondant aux zones où sont ancrées les molécules de terminaison $-COOH$ et des domaines non recouverts associés aux molécules hydrophobes de terminaisons $-CH_3$ (voir fig.1.5.a.).

En modifiant la nature chimique des pointes, par greffage de molécules de même constitution que celles présentes sur la surface, les auteurs ont pu amplifier le contraste de l'interaction pointe-échantillon. Ils montrent qu'une pointe modifiée par des molécules de terminaison ($-CH_3$) possède une très grande adhésion avec les zones de la surface contenant des molécules de même terminaison. En revanche, la force d'adhésion de cette même pointe mesurée dans une zone re-

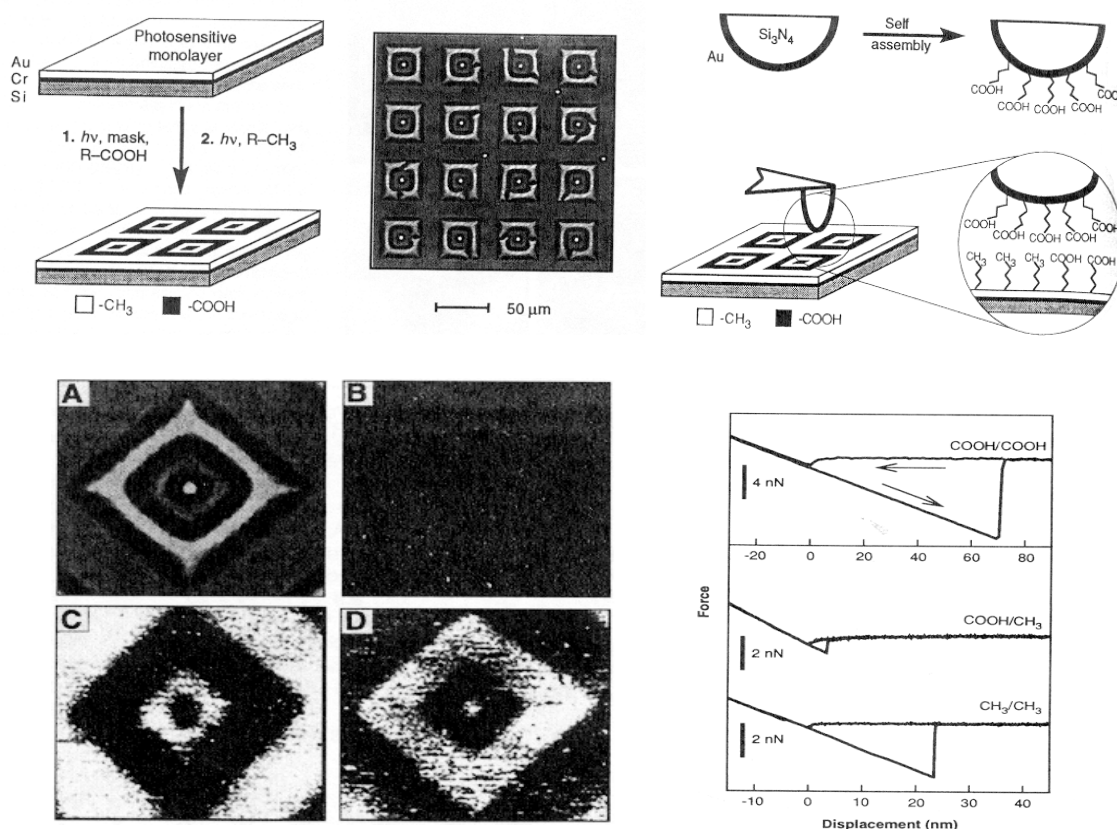


FIG.1.5 – Etude par CFM (Chemical Force Microscopy) et mesures de forces d'une surface à l'aide d'une pointe fonctionnalisée. A- Image optique d'une structure recouverte d'eau. Les domaines contenant les molécules de terminaison $-COOH$ sont recouverts d'eau tandis que les domaines contenant des molécules apparaissent "secs". B-Image topographique obtenue en AFM ne présente aucun contraste. C- et D- Images AFM obtenues avec une pointe fonctionnalisée avec des molécules de terminaison $-CH_3$ et $-COOH$ respectivement. Les courbes de forces mettent en évidence les différences de force d'interaction dans les différents cas de fonctionnalisation de pointe avec les différentes zones hydrophiles et hydrophobes.

couverte de molécules possédant une terminaison $-COOH$ sera quant à elle quasiment nulle. On obtient le résultat inverse dans le cas où la pointe a été modifiée avec des molécules de terminaison ($-COOH$). Cette procédure de fonctionnalisation de pointe en vue d'augmenter le contraste sur certaines zones d'un échantillon est généralement appelée mode chimique (Chemical Force Microscopy). On reviendra sur ce point dans la revue bibliographique consacrée à l'étude des puces à ADN par microscopie à force atomique. On verra que cette méthode est la première qui a permis d'obtenir des informations sur la lecture des puces par microscopie à force atomique.

Exemple n° 2 : Etude de nanotribologie

D'autres études peuvent être effectuées à partir des courbes de force comme l'étude de la réponse mécanique d'une surface soumise à une force par la pointe. Les modèles décrivant l'interaction d'une pointe montée sur un levier de raideur k_L interagissant avec une surface de raideur k_{ech} montrent qu'il existe une relation simple entre la pente mesurée sur les courbes approche retrait dans la zone de contact et les raideurs de la pointe et de l'échantillon [18]. Ainsi, connaissant la raideur du levier on peut ainsi évaluer la raideur de la surface à partir de l'expression :

$$p(a) = -\frac{1}{1 + \frac{k_L}{k_{ech}}} \quad (1.9)$$

Cette expression correspond à un cadre où la réponse du levier reste linéaire.

c- Applications et limites du mode contact

Le mode contact a dans un premier temps révolutionné l'imagerie en champ proche, en étendant son domaine d'étude à tout type d'échantillon et en particulier aux matériaux isolants dont l'étude n'était pas permis par le microscope à effet tunnel. Par ailleurs, les études dans des environnements très variés tels que l'imagerie en milieu liquide ou sous atmosphère contrôlée ont rapidement placé l'AFM comme un outil d'analyse à l'échelle moléculaire très polyvalent.

Cependant, des études menées sur des matériaux dits mous ou déformables ont mis en évidence des difficultés à établir la topographie exacte du fait d'une interaction trop grande entre la pointe et l'échantillon. En effet, le choix du paramètre "SET POINT" reste un choix essentiel. C'est lui qui détermine la force que la pointe va appliquer sur l'échantillon. Ainsi, pour un matériau facilement déformable, si la contrainte appliquée par la pointe, en particulier si les forces latérales de cisaillement sont trop élevées le contact induira une déformation plastique irréversible de l'échantillon [19]. Des modifications de l'appareil ont ainsi conduit à l'avènement des modes oscillants, dans lesquels la pointe est mise en oscillation à l'aide d'une céramique piézoélectrique placée sous le support du levier, et amenée à proximité de la surface de l'échantillon. Dans le mode dit contact-intermittent, la pointe entre en contact avec la surface, à l'extrémité de son oscillation. La mise en oscillation de la pointe a pour but de réduire la contrainte de cisaillement imposée par la pointe sur la surface.

Dans le cadre de ce travail, le mode contact ne sera que rarement utilisé (voir section 5.2.1). En effet, du fait de la faible rigidité des couches qui constituent les puces à ADN, le mode contact ne s'impose pas comme le mode le plus favorable d'étude, comme c'est généralement le cas pour les études de matériaux biologiques. Le mode contact reste néanmoins à l'heure actuelle, un des modes les plus utilisés dans le domaine des études de surfaces dures. Sa compréhension beaucoup

plus simple que les autres modes d'étude constitue son principal atout.

Dans la suite de ce chapitre, on va s'intéresser à la description des modes oscillants et en particulier le mode AM-AFM qui sera celui utilisé au cours de nos expériences. Le but de cette partie est d'établir un choix objectif de nos conditions de travail en s'appuyant sur une revue bibliographique sur ce domaine.

1.3.2 Microscopie à force dynamique ou modes oscillants

Depuis son avènement au début des années 90, la microscopie à force dynamique s'impose à l'heure actuelle comme une des méthodes les plus adaptées pour la caractérisation de surface à très haute résolution et ce, quelle que soit la nature de l'échantillon à analyser. Des images haute résolution de brins d'ADN et de polymères ont été réalisées à l'air ainsi qu'en solution [20]. Une véritable résolution atomique a été obtenue sur des matériaux durs tels que des surfaces semi-conductrices ou des isolants sous ultra-vide en mode non-contact [21] et tout récemment sur un cristal de polymère sous conditions ambiantes en mode contact-intermittant [22].

Dans ce mode, la pointe n'est plus statique mais oscille à une fréquence proche de la fréquence de résonance du levier auquel elle est associée. Dans ce système trois paramètres caractérisent le levier en interaction avec une surface : l'amplitude d'oscillation du levier, sa fréquence et sa phase. C'est dans la variation sensible de ces trois paramètres en fonction de la force d'interaction que se situent les fondements des modes dits oscillants.

De la même manière que le fonctionnement en mode contact repose sur un asservissement de la déflexion du levier, chacun de ces trois paramètres (amplitude, fréquence et phase) peut faire l'objet d'un asservissement. On distingue aujourd'hui deux modes dans la famille des modes oscillants. Le mode **AM-AFM** (Amplitude Modulation-AFM) [23] qui fonctionne par asservissement sur l'amplitude en maintenant la fréquence fixe. On peut par ailleurs enregistrer les variations du signal de phase, porteuses des informations relatives aux propriétés des matériaux. Le second mode est le mode **FM-AFM** (Frequency Modulation-AFM) [24] qui opère quant à lui par asservissement sur la fréquence à amplitude fixe.

Le mode FM-AFM se retrouve souvent sous la dénomination de mode non-contact, du fait de la possibilité d'imager des surfaces avec une résolution atomique sans qu'il y ait contact physique de la pointe avec la surface. Cependant, des expériences récentes ont montré la possibilité d'imager des surfaces en mode FM-AFM en régime répulsif [25]. De la même manière, des expériences en AM-AFM ont pu être réalisées sans contact réel de la pointe avec la surface [26]. La dénomination de ces modes en fonction de la possibilité qu'un contact pointe-surface s'établisse, apparaît donc

incomplète. Dans la suite de ce travail, on ne s'intéressera qu'à la description du mode AM-AFM et à ses spécificités. Pour une meilleure compréhension de ce mode, on reviendra sur la description d'un levier oscillant en présence d'un potentiel d'interaction.

1.3.3 Principe général du mode modulation en amplitude (AM-AFM)

a- Mode topographique

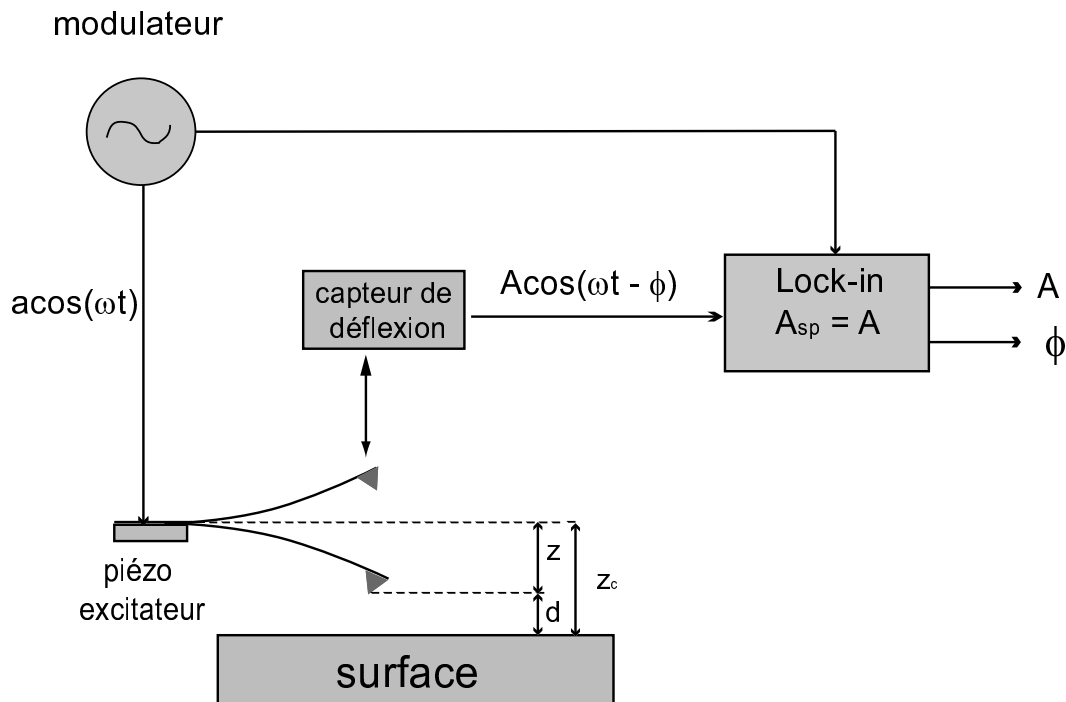


FIG.1.6 – Principe du mode contact intermittent.

Dans le mode AM-AFM, le levier sur lequel est montée la pointe est mis en oscillation par une céramique piézoélectrique à une fréquence fixe ω égale ou proche de la fréquence de résonance du levier ω_0 , avec une amplitude libre notée $A^{libre} \leq A^0$, où A^0 est l'amplitude à la résonance. La valeur de l'amplitude libre A^{libre} est commandée par la tension excitatrice appliquée à la céramique.

La rétroaction est effectuée sur une amplitude d'oscillation de référence, noté A^{SP} choisie telle que $A^{SP} \leq A^{libre}$ (à la fréquence ω). En fonction de la nature de l'interaction et de la distance pointe échantillon la courbe de résonance du levier va évoluer, modifiant ainsi la valeur de l'amplitude mesurée à la fréquence ω . La mesure de la topographie de l'échantillon sera obtenue en enregistrant les tensions qu'il faut appliquer aux céramiques piézoélectriques pour ramener à tout instant la valeur d'amplitude à la valeur de référence, appelée set-point et notée A^{SP} (voir

figure 1.6). On peut également enregistrer les variations de la phase.

b- Mode spectroscopique

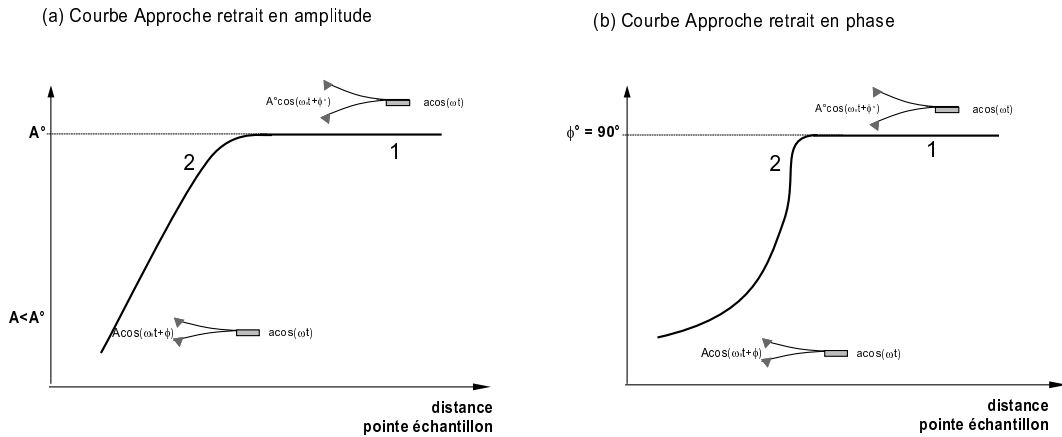


FIG.1.7 – Courbes amplitude-distance "modèles" en amplitude et en phase obtenues avec $\omega = \omega_0$, soit $A = A^0$.

Sur le même principe que les analyses spectroscopiques menées en mode contact, on pourra enregistrer la variation de l'amplitude et de la phase en fonction de la distance pointe échantillon. Les courbes ainsi obtenues sont appelées courbes approche-retrait ou courbes amplitude-distance et phase-distance. Elles ont une forme du type de celles présentées figure 1.7-a et -b et mettent en évidence trois étapes : En 1, la pointe oscille loin de la surface. Elle n'est donc pas perturbée par le potentiel d'interaction et possède l'amplitude A^L (ou ϕ^L). En 2, la pointe ressent le potentiel de la surface et l'amplitude (la phase) varie. Si l'on continue à rapprocher la pointe de la surface l'intensité du potentiel augmente ce qui conduit à diminuer l'amplitude d'oscillation (et la phase).

Ces courbes sont généralement utilisées pour choisir le point de fonctionnement d'une expérience. La zone de travail en contact intermittent se situe dans la zone de réduction d'amplitude $A^{SP} < A^{libre}$. De manière à comprendre l'origine de ces courbes afin de les interpréter convenablement il est indispensable de revenir sur le comportement de la pointe oscillante en présence d'une force d'interaction.

Dans la suite de cette partie, on s'attachera à décrire précisément le principe de fonctionnement du mode AM-AFM afin de bien comprendre l'origine du contraste topographique. Pour ce faire, on sera guidé par trois questions auxquelles on tentera de répondre : (1) Quelle est la dépendance des signaux d'amplitude et de phase avec le potentiel d'interaction ? (2) L'amplitude (la phase) doit elle augmenter ou diminuer lorsque la force augmente ? (3) Comment interpréter les images

en termes topographiques ?

1.3.4 Modélisation du comportement du levier en présence d'un potentiel d'interaction

a- Equation du mouvement d'une pointe oscillante

La compréhension du mode AM-AFM requiert la résolution de l'équation du mouvement de l'ensemble pointe-levier sous l'influence des forces d'interaction pointe-surface. Le mouvement du levier peut être ramené à un objet à une dimension :

$$EI \frac{\partial^4 w(z, t)}{\partial x^4} + \mu \frac{\partial^2 w(z, t)}{\partial t^2} = F(z, t) \quad (1.10)$$

où, $w(z, t)$ est le déplacement du levier, E , I , μ sont le module de Young, le moment d'inertie et $F(z, t)$ représente les forces d'interaction ramenées à la longueur du levier. L'équation 1.10 suppose implicitement que la pointe est un objet sans masse. La simplification et la résolution de cette équation constitue un sujet d'étude pour un grand nombre d'équipes.

Une des hypothèses la plus couramment rencontrée consiste à ramener l'ensemble pointe-levier à un système de type masse ponctuelle suspendue au bout d'un ressort, ce qui conduit à l'équation bien connue de l'oscillateur harmonique amorti soumis à une excitation forcée $F_0 \cos(\omega t)$ et à la force d'interaction pointe-échantillon $F_{pte-ech}$. On obtient ainsi une équation différentielle du second ordre :

$$m\ddot{z} + k(z - z_0) + \frac{m\omega_0}{Q}\dot{z} = F_{pte-ech} + F_0 \cos(\omega t) \quad (1.11)$$

où, Q , ω_0 , ω et k , sont le facteur de qualité, la fréquence propre du levier, la fréquence d'excitation et la raideur du levier. $F_{pte-ech}$ décrit les forces d'interaction pointe échantillon.

La validité de cette hypothèse a été étudiée par Rodriguez *et al.* [27]. Dans cet article, ils réalisent une étude comparative de la dynamique d'un ressort (équ. 1.11) avec celle d'une poutre encastree (équ. 1.10) en régime attractif ainsi qu'en régime répulsif. Ils en déduisent que pour des conditions de travail à l'air avec des amplitudes d'oscillation inférieures à 30 nm, une réduction d'amplitude de $A^{SP}/A^0 \in [0, 4 - 0, 9]$ et $Q \in [50 - 1000]$ le modèle décrivant le levier comme un ressort avec une masse ponctuelle suspendue à son extrémité donne une description précise du mouvement de la pointe.

b- Comportement de l'oscillateur en l'absence de forces d'interaction pointe-échantillon

En l'absence de toute interaction pointe-échantillon, c'est à dire $F_{pte-ech} = 0$, l'équation 1.11 est l'équation d'un oscillateur harmonique forcé et amorti. La solution de l'équation est donc de la forme :

$$z = Bexp(-\alpha t)cos(\omega_r t + beta) + A cos(\omega t - \phi) \quad (1.12)$$

Cette solution est constituée de deux termes. Le premier décrit un régime transitoire à l'établissement de l'oscillation. Son amortissement s'opère en $\tau = 2Q/\omega_0$, correspondant au temps de réponse de l'oscillateur pour travailler en régime quasi-statique. A titre indicatif, pour une fréquence de 300 kHz et un facteur de qualité de 500 le temps de réponse est d'environ 3 ms.

Le second terme est un terme harmonique, répondant à la fréquence de l'excitateur, ici la céramique piézoélectrique qui est placée sous le support de pointe. Il est décrit par deux paramètres : l'amplitude d'oscillation A et le décalage en phase par rapport à l'excitatrice ϕ .

En remplaçant cette solution dans l'équation 1.11, avec le terme d'interaction nul, on obtient :

$$A(\omega) = \frac{F_0/m}{[(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + (\omega\omega_0/Q)^2]^{\frac{1}{2}}} \quad (1.13)$$

et,

$$\tan(\phi(\omega)) = \frac{\omega_0\omega/Q}{\omega_0^2 - \omega^2} \quad (1.14)$$

Le système comme tout système oscillant est caractérisé par une amplitude d'oscillation qui suit une courbe de résonance de type Lorentzienne, avec un maximum situé à la fréquence propre de l'oscillateur. La largeur de la Lorentzienne à $A^0/\sqrt{2}$ est définie par $\Delta\omega = \omega_0/Q$. Dans le cas d'un ressort et en l'absence de forces d'interaction cette fréquence propre est donnée par l'expression suivante : $\omega_0 = \sqrt{k/m^*}$. La phase est aussi fonction de la fréquence et prend une valeur égale à $\pi/2$ à la fréquence propre de l'oscillateur, voir fig. 1.8.

c- Comportement de l'oscillateur en présence de forces d'interaction en régime linéaire

Un premier modèle prenant en compte les forces d'interaction entre la pointe et l'échantillon consiste à décrire l'oscillateur pour de petites amplitudes d'oscillation. Dans ce cas, un développement des forces d'interaction à proximité de la position d'équilibre de la pointe peut être effectué au premier ordre. On se place ainsi dans le cadre d'une description linéaire. On obtient ainsi l'expression suivante :

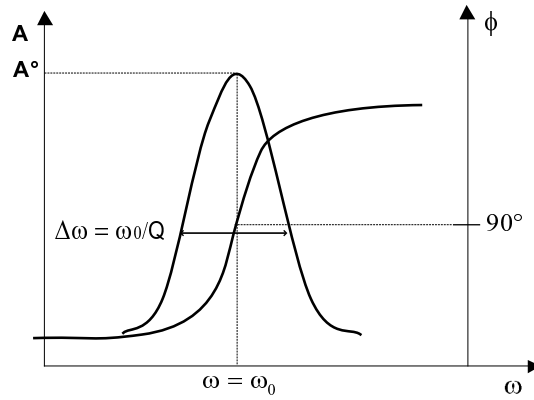


FIG.1.8 – Forme lorentzienne de la résonance en amplitude d'un levier de fréquence propre ω_0 et la variation de phase correspondante (sens montant) pour un oscillateur en l'absence de force d'interaction.

$$F = F_0 + \left(\frac{dF}{dz}\right)_{z_0}(z - z_0) \quad (1.15)$$

ce qui donne en remplaçant dans l'équation 1.11 :

$$m\ddot{z} + k_e(z - z_0) + \frac{m\omega_0}{Q}\dot{z} = F_0\cos(\omega t) \quad (1.16)$$

avec la raideur équivalente, k_e définie par :

$$k_e = -\frac{dF}{dz} = k - \left(\frac{dF_{pte-ech}}{dz}\right)_{z_0} \quad (1.17)$$

Ce qui nous donne une variation de la fréquence d'oscillation du levier en présence du gradient des forces d'interaction définie par l'expression :

$$\omega_e = \left(\frac{k - dF_{pte-ech}/dz}{m}\right)^{1/2} \quad (1.18)$$

Ceci implique à nouveau une solution de type Lorentzienne (equ. 1.13) mais à une fréquence décalée ω_e . Ainsi, pour une interaction purement attractive $F'_{pte-ech} > 0$ la résonance sera décalée vers les fréquences inférieures à la fréquence de résonance tandis que pour les interactions répulsives $F'_{pte-ech} < 0$, le décalage sera observé vers les fréquences supérieures à la fréquence de résonance.

Pour la force d'interaction attractive de Van der Waals, le gradient de la force est : $F'_{pte-ech} = HR/3z^3 > 0$ et $\omega_e < \omega_0$. Si le levier est excité à la fréquence de résonance ω_0 , le gradient induit une diminution d'amplitude de :

$$\delta A = -A^0 \frac{F'_{pte-ech}}{2k} \quad (1.19)$$

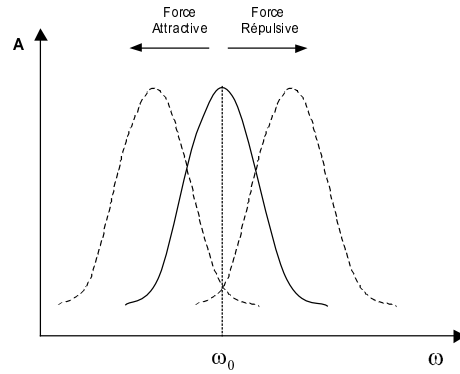


FIG.1.9 – Décalage de la fréquence de résonance en fonction du gradient.

dans l'hypothèse où $k \gg F'_{pte-ech}$. Le retard en phase quant à lui augmente de :

$$\delta\phi = \frac{F'_{pte-ech}Q}{k} \quad (1.20)$$

L'amplitude dépend de la distance moyenne pointe-échantillon selon l'expression [28] :

$$\frac{A(z_c)}{A^0} = (C^2Q^2z_c^{-6} + Cz_c^{-3} + 1)^{-1/2} \quad (1.21)$$

avec, $C = HR/3k$ et sous l'hypothèse de Q constant. En réalité le facteur de qualité du levier diminue quand la pointe s'approche de la surface. Ceci est dû à l'amortissement induit par la couche d'air confinée entre le corps du levier, la pointe et la surface [29–31].

d- Comportement de l'oscillateur en présence d'un potentiel d'interaction, en régime non-linéaire

Du point de vue fondamental, la participation des interactions attractives et répulsives et de leur caractère non-linéaire a été et est à l'origine de nombreux travaux de recherche pour tenter d'aboutir à la compréhension du mode AM-AFM [33–42]. La difficulté réside dans la résolution de l'équation différentielle 1.11 avec une contribution non-linéaire des interactions.

La coexistence de deux états stables

De nombreuses expériences ont mis en évidence la coexistence de deux états stables. Gleyzes *et al.* [32] furent les premiers à décrire les effets non linéaires du mouvement oscillant d'une pointe STM. Ils constatent que pour certaines fréquences deux valeurs d'amplitude d'oscillation peuvent être observées. Anczykowski *et al.* [33] évoquent quant à eux une bistabilité pour expliquer les effets d'hystérésis sur les courbes amplitude-distance. D'autre part, des travaux de García *et al.* [34], Nony *et al.* [35], Wang *et al.* [36] et Marth *et al.* [37] mettent en avant le caractère non-linéaire intrinsèque du mouvement de la pointe.

Si l'on revient sur l'équation du mouvement de la pointe, on constate que numériquement son mouvement possède deux solutions, puisque son mouvement est régi par une équation différentielle du second ordre. Il n'est donc pas anormal de pouvoir observer dans certains cas la coexistence des deux solutions, à partir du moment où elles sont physiquement possibles. Elles sont alors décrites par l'expression :

$$Z_{H(L)} = Z_0 + A_{H(L)} \cos(\omega t - \phi_{H(L)}) \quad (1.22)$$

On notera H la solution de plus grande amplitude et L la solution de petite amplitude. La phase correspondant à chacune de ces deux solutions portera l'appellation définie en amplitude. On définit alors deux couples de solutions : (A_H, ϕ_H) et (A_L, ϕ_L) . Dès lors, ce sont les conditions initiales qui vont déterminer la solution de fonctionnement de l'oscillateur.

A titre d'exemple, la figure 1.10 rapporte les solutions de faible et grande amplitude publiées par García *et al.* [34] obtenues par résolution numérique avec les paramètres suivants : $R = 20nm$, $A^0 = 10nm$, $f = f_0 = 350kHz$, $k_{levier} = 40N/m$, $Q = 400$, $H = 6,4 \times 10^{20}J$, $\gamma = 30mJ/m^2$ et $E^* = 1,51GPa$.

La collection des solutions L et H en amplitude (1.10-A) donne lieu à la formation de deux branches de solutions présentes sur la quasi-totalité des distances pointe-échantillon. Suivant les deux branches, le comportement observé se caractérise par une décroissance de l'amplitude avec la réduction de la distance entre la pointe et l'échantillon. Dans toute la suite, on utilisera les dénominations de *branche H* pour la branche de grande amplitude et *branche L* pour la branche des solutions de faibles amplitudes.

L'observation de la phase correspondant aux deux branches identifiées en amplitude met en évidence un comportement très différent pour ces deux branches. Les solutions de phase associées à la branche L augmentent continûment à partir de la valeur de la phase libre, $\phi_{libre} = 90^\circ$. La phase est dans ce cas comprise entre 90 et 180° . En revanche, pour les solutions associées à la branche H, la phase décroît continûment depuis la valeur de la phase libre jusqu'à 0° . Les solutions associées à chacune de deux branches en amplitude apparaissent donc totalement distinctes.

L'évolution des forces d'interaction pour chacune des deux branches de solutions, figure 1.10-C, montre que pour la branche L, ce sont les forces d'interaction attractives ($F_{pte-ech} < 0$) qui dominent tandis que pour la branche H ce sont les forces répulsives ($F_{pte-ech} > 0$). Il en résulte une absence de contact entre la pointe et la surface de l'échantillon pour les solutions de faibles amplitudes figure 1.10-D.

Ainsi, les branches de solutions définies en amplitude peuvent donc être caractérisées par la nature de la force d'interaction qui s'instaure entre la pointe et l'échantillon. La branche de faible amplitude peut donc être associée à un fonctionnement en régime attractif, où la phase reste

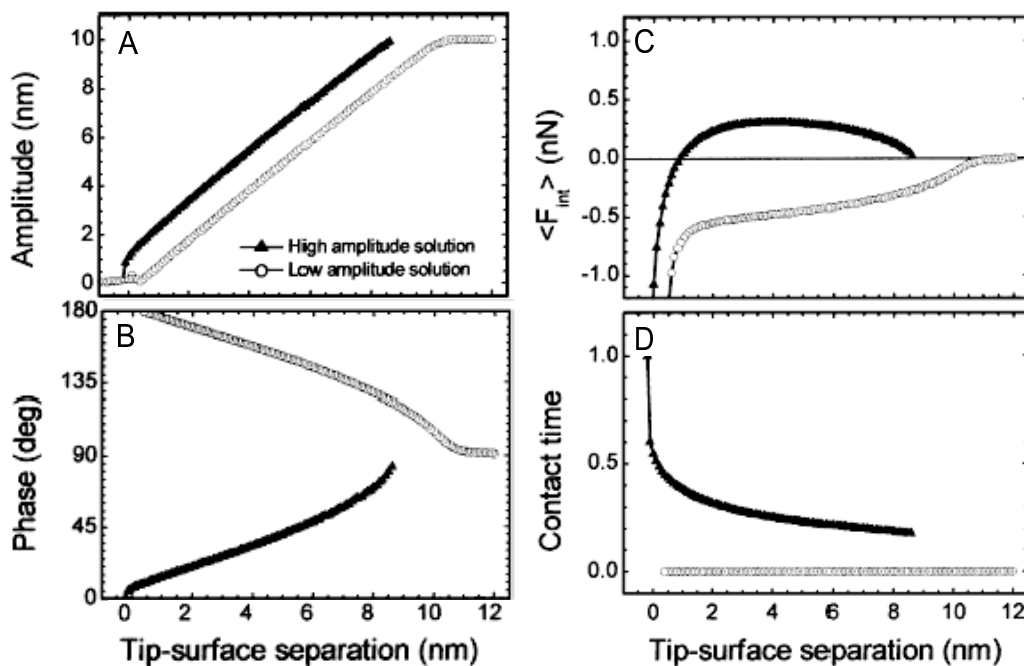


FIG.1.10 – Evolution de A- l'amplitude, B- la phase, C- la force moyenne et D- le temps de contact, en fonction de la distance pointe- échantillon. La coexistence des deux solutions en amplitude pour différentes distances donne lieu à la formation de deux branches : notées H (High amplitude solutions) et L (Low amplitude solutions). Les solutions correspondantes pour la phase (B) traduisent deux régions de fonctionnement très distinctes : la branche de grande amplitude pour laquelle la phase est inférieure à 90° (comprise entre 0 et 90°) et les solutions en phase associées à la branche L dont les valeurs sont comprises entre 90 et 180° . Les variations de la force moyenne (C) révèlent que dans la branche H, la force moyenne passe de valeurs positives à des valeurs négatives pour des distances pointe-échantillon très petites. On remarque sur le graphique (D) l'absence de contact pour la branche des solutions de faible amplitude D'après [34].

supérieure à 90° et la pointe n'entre jamais en contact avec la surface. À l'inverse la branche de solution de grande amplitude, H, peut être associée à un fonctionnement en régime répulsif où la phase prend des valeurs inférieures à 90° . Du point de vue expérimental, la prépondérance d'une branche sur l'autre conduira à n'observer à tout instant qu'une solution sur les deux. L'origine de cette prédominance d'une branche sur une autre, relève des propriétés de l'interaction, en particulier du module d'élasticité et de la force d'adhésion...

En reprenant les mêmes simulations avec une amplitude d'oscillation de 50 nm à la résonance, García *et al.* [38] obtiennent des profils différents pour la force d'interaction. Un extrait des résultats est reporté à la figure 1.11. Dans ce cas, la distinction entre régime attractif et régime répulsif est loin d'être aussi nette que dans le cas précédent. En effet, la force d'interaction est tout

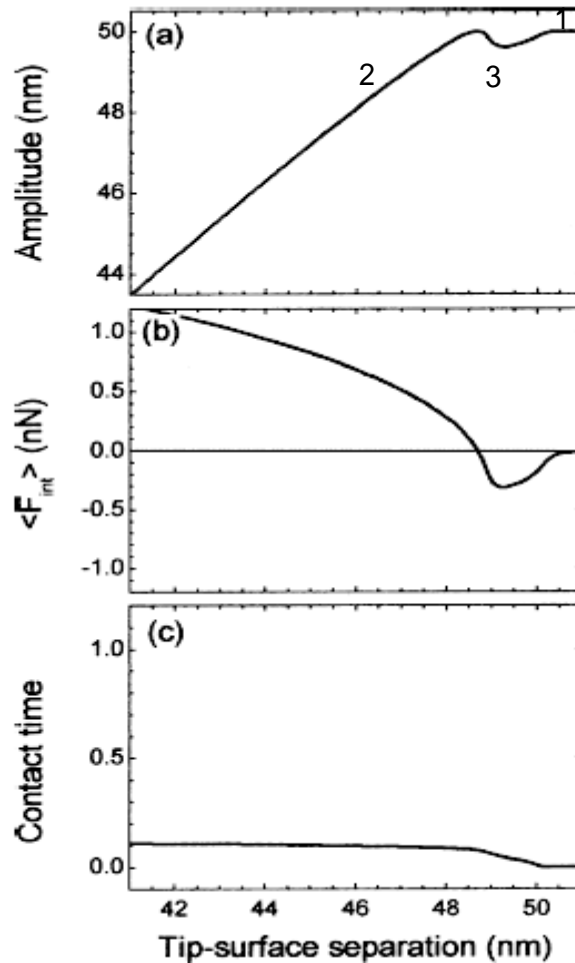


FIG.1.11 – Evolution de A- l'amplitude, B- la force moyenne et C- le temps de contact, en fonction de la distance pointe- échantillon. Une transition continue est observée du régime attractif au régime répulsif. D'après [38].

d'abord négative traduisant ainsi un fonctionnement en régime attractif. Cependant, cette force décroît jusqu'à atteindre un minimum. La présence de ce minimum traduit la compétition entre des interactions attractives et répulsives. On ne pourra donc pas parler de régime purement attractif ou répulsif, mais plutôt de régime attractif dominant, correspondant à la zone 1 de la courbe A-figure 1.11, et de régime répulsif dominant en zone 2. Entre ces deux zones se situe la transition entre les deux branches H et L durant laquelle le système passe d'un régime attractif dominant au régime répulsif dominant. On peut remarquer que le temps de contact augmente progressivement quand on passe d'un régime à l'autre.

Relation avec la courbe de résonance

La coexistence de deux états stables pour l'amplitude d'oscillation résulte d'une compétition

entre les contributions attractives et répulsives de la force d'interaction. García *et al.* [39] montrent que les contributions des forces attractives dévient la courbe de résonance vers les fréquences inférieures à la fréquence de résonance ($\omega < \omega_0$) tandis que les contributions répulsives contrebalancent cet effet et provoquent une distorsion de la résonance vers les fréquences supérieures à la fréquence de résonance ($\omega > \omega_0$). La figure 1.12 présente l'évolution de la forme de la courbe de résonance pour une hauteur du levier constante : $z_c=10$ nm et différentes valeurs de l'amplitude à la résonance, A^0 . Ils observent que pour les petites valeurs de A^0 , la courbe de résonance n'est pas déformée. En augmentant la valeur de A_0 , la courbe se déforme vers les fréquences inférieures à la fréquence ω_0 , marquant ainsi l'entrée de la pointe dans la partie attractive du potentiel d'interaction. Enfin, si A^0 est proche de la distance pointe-échantillon z_c , la résonance se déforme traduisant ainsi la compétition entre les potentiels attractifs et répulsifs.

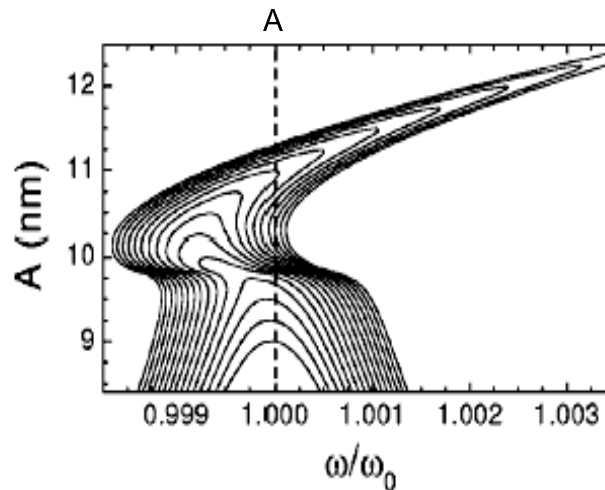


FIG.1.12 – Evolution de la courbe de résonance en fonction de l'amplitude d'oscillation A^0 à z_c fixé. $A^0 \in [9; 12, 4]$ nm et $z_c = 10$ nm. A la fréquence de résonance, $\omega = \omega_0$, on trouve trois solutions possibles pour les amplitudes $A^0 \in [11, 12]$. D'après [39].

Du point de vue des courbes amplitude-distance, la déformation des courbes de résonance va permettre de remonter à l'origine des deux branches d'amplitude d'oscillation (L et H). En effet, la distorsion de la courbe de résonance peut donner lieu à plusieurs solutions pour une même valeur de distance pointe-échantillon, à ω fixée. En représentant qualitativement l'évolution des courbes de résonance en fonction de la distance pointe-échantillon (figure 1.13), on observe qu'à $\omega = \omega_0$, l'amplitude ne possède qu'une solution quand la pointe est loin de la surface et deux puis trois solutions lorsque la pointe se rapproche de la surface de l'échantillon. Ces trois solutions résultent de la déformation de la courbe de résonance lorsque la pointe entre dans le champ des interactions répulsives. Les solutions physiques représentées dans la branche L et H correspondent aux solutions d'amplitude la plus faible et la plus élevée. [39].

Expérimentalement les deux branches de solutions ne peuvent être mise en évidence simultanément pour une valeur de z donnée. Les courbes amplitude-distance rendent compte de la solution physique la plus stable pour chaque distance entre la pointe et l'échantillon. Une transition entre la branche L et la branche H de solution peut être observée, comme en 3 sur la figure 1.13-amplitude.

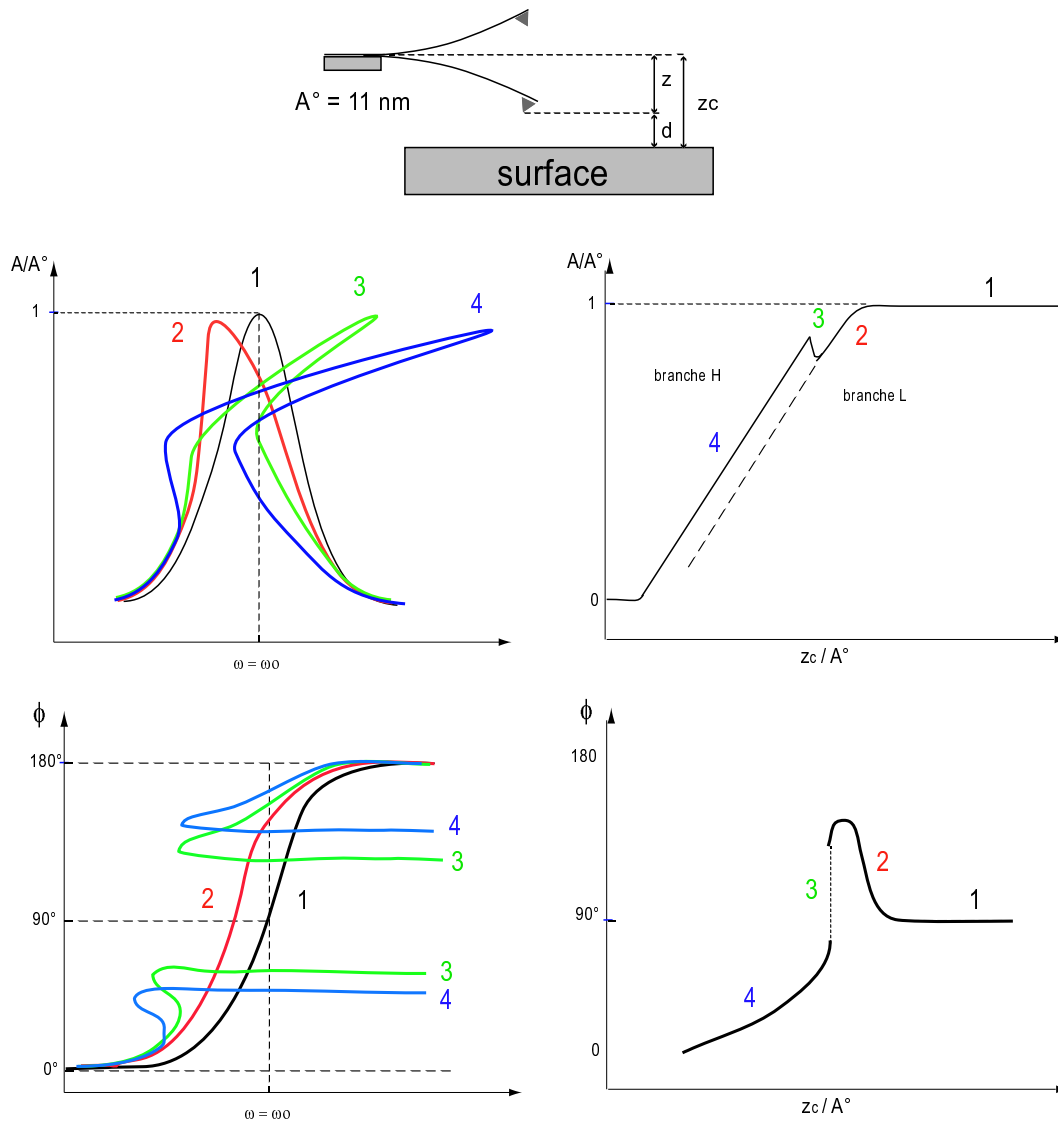


FIG.1.13 – Relations entre les courbes de résonance et les courbes amplitude-distance, ainsi qu'entre les variations de phase en fonction de la fréquence et les courbes phase-distance. Les courbes (résonance ou phase) en noire correspondent à la pointe oscillant en l'absence du potentiel d'interaction, celle en rouge au cas où l'interaction est attractive et celles en vert et bleu au cas du fonctionnement en régime répulsif dominant.

Lorsque la transition s'opère entre les branches H et L, la phase change également de régime de manière plus ou moins brutale pour passer des valeurs supérieures à 90° caractérisant le régime

attractif à des valeurs inférieures à 90° traduisant la présence de forces répulsives dominantes. Cette transition peut également être mise en relation avec les variations de la phase en présence des forces d'interaction attractives et répulsives 1.13-phase.

Les courbes amplitude-distance et phase-distance permettent donc de définir le régime de fonctionnement du levier en fonction de la fréquence d'excitation, de l'amplitude et de la distance qui sépare la pointe de la surface de l'échantillon. Ces courbes seront donc systématiquement étudiées au cours des expériences de manière à définir avec précision les conditions d'opération du levier au cours des expériences.

Conditions sur le saut d'une branche à l'autre

Les conditions de transition d'une branche à l'autre sont principalement gérées par les perturbations inhérentes aux expériences. La sensibilité du levier, les conditions de travail choisies et les différences de hauteur de la surface analysée permettent d'évaluer la possibilité qu'a la pointe d'effectuer une transition d'un état à l'autre. Ces conditions de transition vont jouer un rôle fondamental pour la stabilité en mode imagerie. En effet, les perturbations brutales peuvent provoquer un écart entre la condition d'asservissement et la hauteur réelle de la pointe et ainsi permettre la transition entre la branche H et la branche L et réciproquement. Du point de vue expérimental, la présence d'un objet de hauteur plus importante que les autres présent en surface peut provoquer un "saut" de branche. Pour ce faire, il faut que le décalage en hauteur induit par la perturbation corresponde ou soit supérieur à l'écart en z séparant les deux branches H et L.

García *et al.* [34] ont évalué les conditions dans lesquelles pouvait s'opérer une transition de la branche L vers la branche H dans les conditions expérimentales décrites plus haut sur la figure 1.10.

1. $A/A^{libre} = 95\%$ correspond à ΔZ (H vers L) = 0,1 nm et ΔZ (L vers H) = -1,6 nm
2. $A/A^{libre} = 70\%$ correspond à ΔZ (H vers L) = 1,4 nm et ΔZ (L vers H) = -1,6 nm
3. $A/A^{libre} = 50\%$ correspond à ΔZ (H vers L) = -3,5 nm et ΔZ (L vers H) = 7,5 nm

Ainsi, les expériences avec une forte réduction d'amplitude ($A/A^{libre} = 50\%$) seront les plus stables. Le changement d'état nécessite la présence de variations de hauteur importantes, entre 3,5 et 7,5 nm pour opérer un changement de branche. De plus, la branche H est plus stable que la branche L. Au contraire, pour une faible réduction de l'amplitude d'oscillation, la branche L est la plus stable, mais reste relativement sensible même à de faibles perturbations. Ceci montre que pour opérer sur la branche L, il est préférable de travailler avec une très faible réduction d'amplitude, mais ceci implique d'avoir un système très peu sensible aux perturbations et une surface d'échantillon peu rugueuse.

Les descriptions analytiques

Jusqu'à présent, les résultats présentés étaient issus de simulations purement numériques reposant sur l'intégration de l'équation différentielle par des méthodes de type Runge Kutha. Ces résultats permettent d'aborder convenablement l'explication des phénomènes observés. En revanche, ils ne donnent pas d'expressions analytiques des variations de l'amplitude d'oscillation. La description analytique du comportement des amplitudes d'oscillation fait l'objet, encore à l'heure actuelle, de nombreuses études [40, 42].

Trois approches différentes ont été élaborées pour décrire de manière analytique ou semi-analytique notre système. Aimé *et al.* [40] ont développé une approche variationnelle fondée sur le principe de moindre action. Ils obtiennent ainsi une relation entre l'amplitude d'oscillation et la distance pointe-échantillon pour les trois cas : régime attractif pur, répulsif pur et un mélange des deux. Wang *et al.* [41] s'appuient sur l'approximation asymptotique de Krylov-Bogoliubov-Mitroposki pour obtenir les expressions de la phase et de l'amplitude en fonction de la fréquence d'excitation. Enfin, San Paulo et García [42] ont choisi une approche plus énergétique reposant sur l'application du théorème du Viriel, sous la condition supplémentaire que dans un état stable l'énergie fournie à la pointe doit être égale à l'énergie dissipée par l'hydrodynamique et les forces d'interaction pointe-échantillon. Nous ne développerons pas davantage ces différentes descriptions qui ne sont pas l'objet de ce travail.

1.3.5 Relation entre la dissipation d'énergie et le déphasage du levier

Pour compléter cette description du mode AM-AFM, une analyse de la relation entre les décalages en phase et l'énergie dissipée peut être effectuée. Une modélisation fondée sur un bilan d'énergie du levier pendant une période d'oscillation a été proposé par Cleveland *et al.* [43]. Leur modèle est fondé sur l'hypothèse que l'oscillateur opère sur un état stable, ils supposent alors que l'énergie moyenne fournie au levier par le piézo exciteur (E_{exc}) est égale à l'énergie dissipée par les frottements hydrodynamiques du milieu (E_{hydro}) et par les interactions inélastiques entre la pointe et la surface (E_{diss}).

$$E_{exc} = E_{hydro} + E_{diss} \quad (1.23)$$

Considérons un levier tel que $Q \gg 1$ et dont le mouvement est considéré comme sinusoïdal sur l'ensemble de sa période (ce qui correspond aux conditions de non contact ou de contact intermittent "léger", soit A^{SP} proche de A^0), on peut alors évaluer E_{exc} et E_{hydro} .

$$E_{exc} = \frac{1}{2Q} k A A^0 \omega \sin \phi \quad (1.24)$$

$$E_{hydro} = \frac{m\omega_0}{2Q} A^2 \omega^2 \quad (1.25)$$

où, k , Q , ω , ω_0 , A et A^0 sont la raideur du levier, le facteur de qualité, la fréquence d'excitation, la fréquence propre du levier, son amplitude de travail et l'amplitude à la résonance respectivement. En remplaçant les expressions 1.24 et 1.25 dans l'expression 1.23, on obtient l'expression de l'énergie dissipée, E_{diss} :

$$E_{diss} = \frac{kA^2\omega}{2Q} \left[\frac{A^0 \sin \phi}{A} - \frac{\omega}{\omega_0} \right] \quad (1.26)$$

L'expression 1.26 montre que la phase est directement reliée à l'énergie dissipée par le levier lorsque la pointe interagit de manière inélastique avec la surface. En mode AM-AFM, l'amplitude étant maintenue constante par l'asservissement de sa valeur à la valeur de référence A^{SP} , les variations du signal en phase seront donc porteuses des informations sur l'énergie dissipée par la pointe sur l'échantillon.

L'expression précédente reste valable tant que l'asservissement s'opère parfaitement. En effet, l'erreur sur l'asservissement liée à la présence d'objets de taille "importante", quelques nanomètres, peut générer des contributions que l'on appellera "topographiques" au signal de phase. Ces contributions ont été analysées en détail par Stark *et al.* [44]

1.4 Présentation de notre système expérimental

Dans cette partie, nous allons maintenant présenter le dispositif expérimental utilisé. Nous discuterons ensuite du choix des conditions expérimentales sélectionnées pour l'étude menée sur les puces à ADN.

1.4.1 Présentation du microscope

Le microscope à force atomique dont nous disposons est un appareil commercial, il s'agit du Stand Alone SMENA, représenté fig.1.14-B, développé par la société NT-MDT (Russie) [45]. Il fonctionne suivant une configuration à balayage de pointe et permet ainsi d'imager des échantillons sans contrainte de taille. Un détail de la "tête" est donné fig.1.14-C. La position de l'échantillon est pilotée avec deux platines micrométriques contrôlant les déplacements du porte-échantillon avec une précision de $5\mu\text{m}$. La fenêtre de caractérisation définie par les céramiques piézoélectriques est dans notre cas de $50 \times 50 \times 2,5 \mu\text{m}$ et le pas minimum pour les déplacements est de $0,012 \text{ nm}$ en x et y et de $0,006 \text{ nm}$ en z . La sensibilité de cet appareil définie par le constructeur est inférieure à 1 \AA (RMS, Root Mean Square, suivant la direction verticale z), soit un niveau de résolution

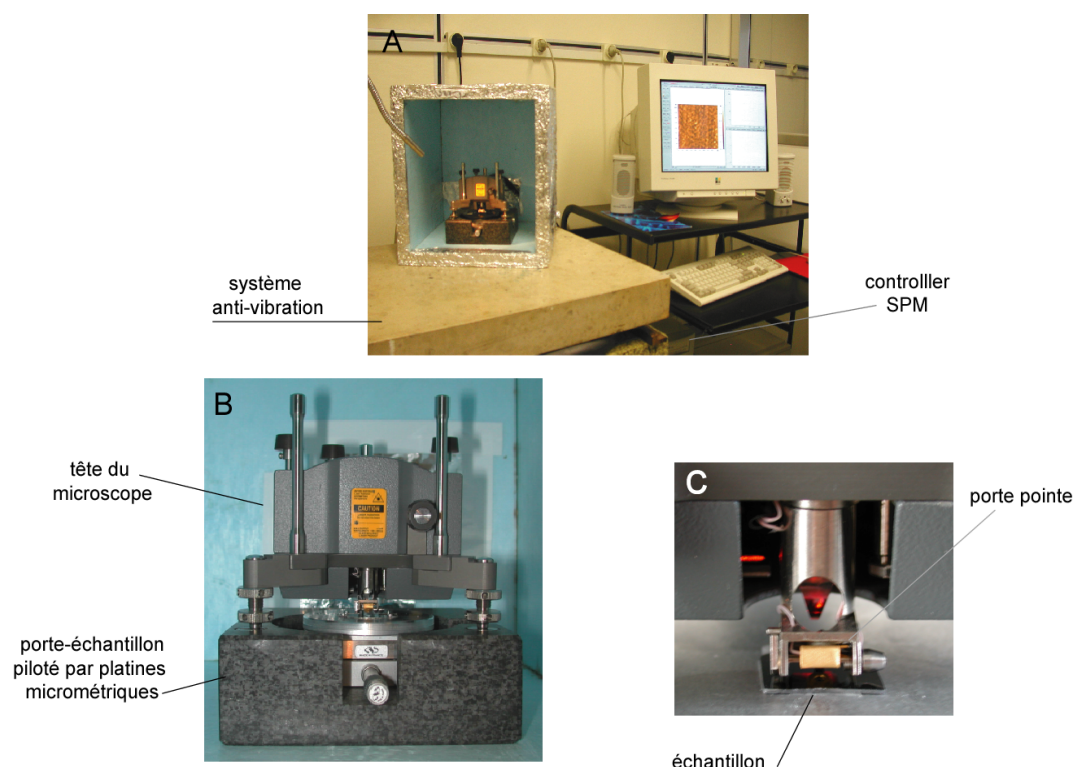


FIG.1.14 – Photographie du montage expérimental.

correspondant à la marche atomique. Cette sensibilité a pu être dépassée en ajoutant un système anti-vibratoire constitué d'un marbre reposant sur 3 chambres à air communiquant entre-elles, un système de protection acoustique (boîte en polypropylène recouverte de feutre isolant acoustique), pour atteindre environ $0,1 \text{ \AA}$ (RMS, suivant la direction verticale z).

Les leviers sélectionnés pour nos expériences sont des leviers rectangulaires en silicium adaptés aux expériences en mode oscillant. Ils possèdent des fréquences de résonance comprises entre 150 et 315 kHz, pour des raideurs allant de 4,5 à 14 N/m. Les pointes montées à l'extrémité des ces leviers possèdent une hauteur d'environ $10 \mu\text{m}$ et un rayon de courbure d'environ 10 nm [46].

1.4.2 Discussion sur le choix des conditions d'imagerie

Comme nous l'avons dit précédemment, chacune des branches de solution de l'oscillateur possède des caractéristiques bien particulières. La branche L décrit un régime où les forces attractives dominent, dans lequel le contact entre la pointe et l'échantillon est quasiment absent. En revanche, la branche H correspond à un mode de fonctionnement en régime répulsif dominant où

le contact entre la pointe et la surface est toujours présent. Dans ce contexte nous allons analyser l'influence de ces deux branches sur l'imagerie de nos échantillons.

Pour ce faire, on se propose de comparer la morphologie d'une couche de monobrin d'ADN de 25 bases, portant un groupement fluorescent immobilisés sur un substrat de silice silanisée, dans différentes conditions de travail. L'expérience a été réalisée avec une amplitude à la résonance de 26 nm et la fréquence de travail est choisie égale à la fréquence de résonance. Les images de la figure 1.15 présentent la morphologie obtenue pour les valeurs d'amplitude de travail de 24 nm, pour la zone notée A, de 20 nm pour la zone B et 18 nm pour la zone C. La courbe amplitude-distance (D) obtenue sur les monobrin montre la variation de l'amplitude et de la phase en fonction de la distance pointe-échantillon. On observe la transition entre la branche H et la branche L autour des amplitudes de travail de 20 nm.

L'image A, obtenue dans les conditions de faible réduction d'amplitude d'oscillation $A^{SP}/A^0 = 92\%$, pour $A^{SP} = 24$ nm, met en évidence une organisation des monobrin sous forme de structures en îlots de forme oblongue. Les îlots sont aisément identifiables et se distinguent relativement bien les uns des autres. Dans ces conditions, l'oscillateur fonctionne sur la branche L. En abaissant la valeur de consigne à 20 nm (zone B), l'oscillateur rentre dans la région de transition entre la branche L et la branche H. La conséquence de ces transitions se traduit par l'apparition de stries claires ou sombres. Ces stries marquent la différence de hauteur que la céramique piézoélectrique compense, lorsque la pointe opère un saut de la branche L à la branche H et inversement. Il ne s'agit donc pas de contribution à la topographie mais d'artéfacts liés au choix de l'amplitude de travail dans la zone de transition entre les deux branches de solutions. Enfin, lorsque l'amplitude de travail est inférieure à la zone où s'opèrent les transitions entre les branches H et L, les îlots observés dans la zone C apparaissent de façon moins distincts que dans la zone A. Le contraste vertical entre le substrat et les îlots est plus faible, de l'ordre de 2 nm contre 2,5 nm dans les conditions de l'image A. L'oscillateur fonctionne ici sur la branche H de solution avec un rapport A^{SP}/A^0 de 70%. La réduction du contraste vertical entre les monobrin et le substrat ainsi que la baisse de la résolution sur les îlots traduit le contact de la pointe avec l'échantillon. L'ADN étant un matériau "mou", ces effets sont probablement le résultat de la déformation de l'ADN par la pointe.

Aussi, pour les échantillons que nous aurons à analyser, il sera préférable de travailler sur la branche L de l'oscillateur, avec une faible réduction de l'amplitude d'oscillation de manière à éviter tout contact entre la pointe et la surface de nos échantillons.

Dans les conditions de travail sur la branche L, nous allons maintenant analyser l'influence de l'amplitude d'oscillation sur le contraste des images et la résolution des objets. Dans une

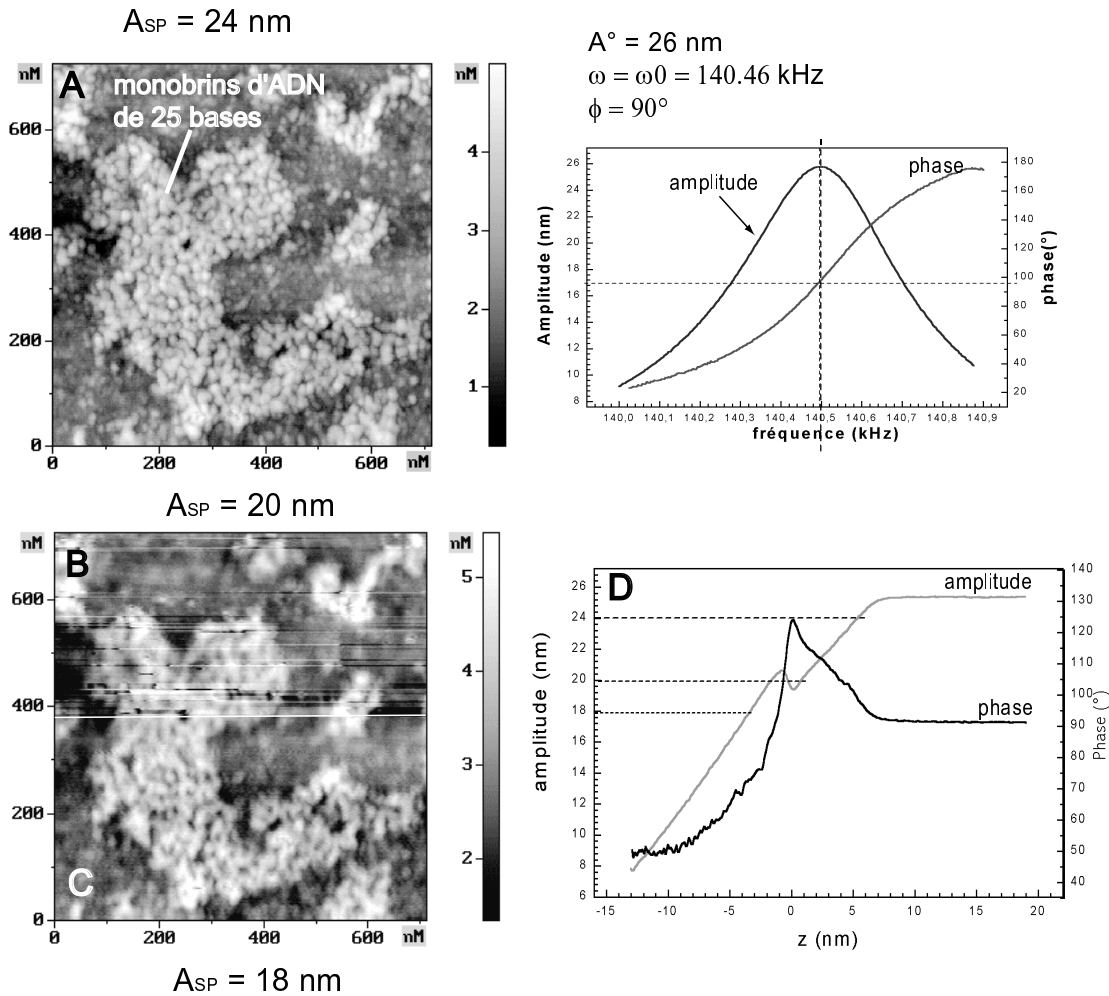


FIG.1.15 – Etude de l'influence de la valeur de l'amplitude de travail sur les conditions d'imagerie d'une surface de monobrin d'ADN de 25 bases de long possédant un marqueur fluorescent à leur extrémité et déposés sur une surface de silice silanisée. L'amplitude libre est de 26 nm et est égale à l'amplitude à la résonance, $\omega = \omega_0$. Les images présentent le résultat de l'imagerie de cette surface avec des valeurs de l'amplitude de travail de 24 (A), 20 (B) et 18 nm (C). La courbe approche retrait (D) rend compte de la branche sur laquelle se situe l'oscillateur pour ces trois valeurs de travail.

expérience, on analyse les modifications de la morphologie d'une couche de monobrin d'ADN de 25 bases de long toujours déposée sur un substrat de silice silanisée, en fonction des valeurs choisies pour amplitudes d'oscillation. On maintient le rapport entre l'amplitude de travail et l'amplitude libre constant à 94%, soit $A^{SP}/A^0 = 94\%$ avec ici $\omega = \omega_0$, et on fait varier la valeur de l'amplitude libre A^0 . La figure 1.16 présente la morphologie de la couche pour trois valeurs de l'amplitude libre : 8,3 nm (fig.1.16-A), 16,6 nm (fig.1.16-B) et 25 nm (fig.1.16-C), avec les courbes amplitude-distance correspondantes.

Dans les conditions où l'amplitude d'oscillation est faible, $A^0 = 8,3 \text{ nm}$, les monobrin s'orga-

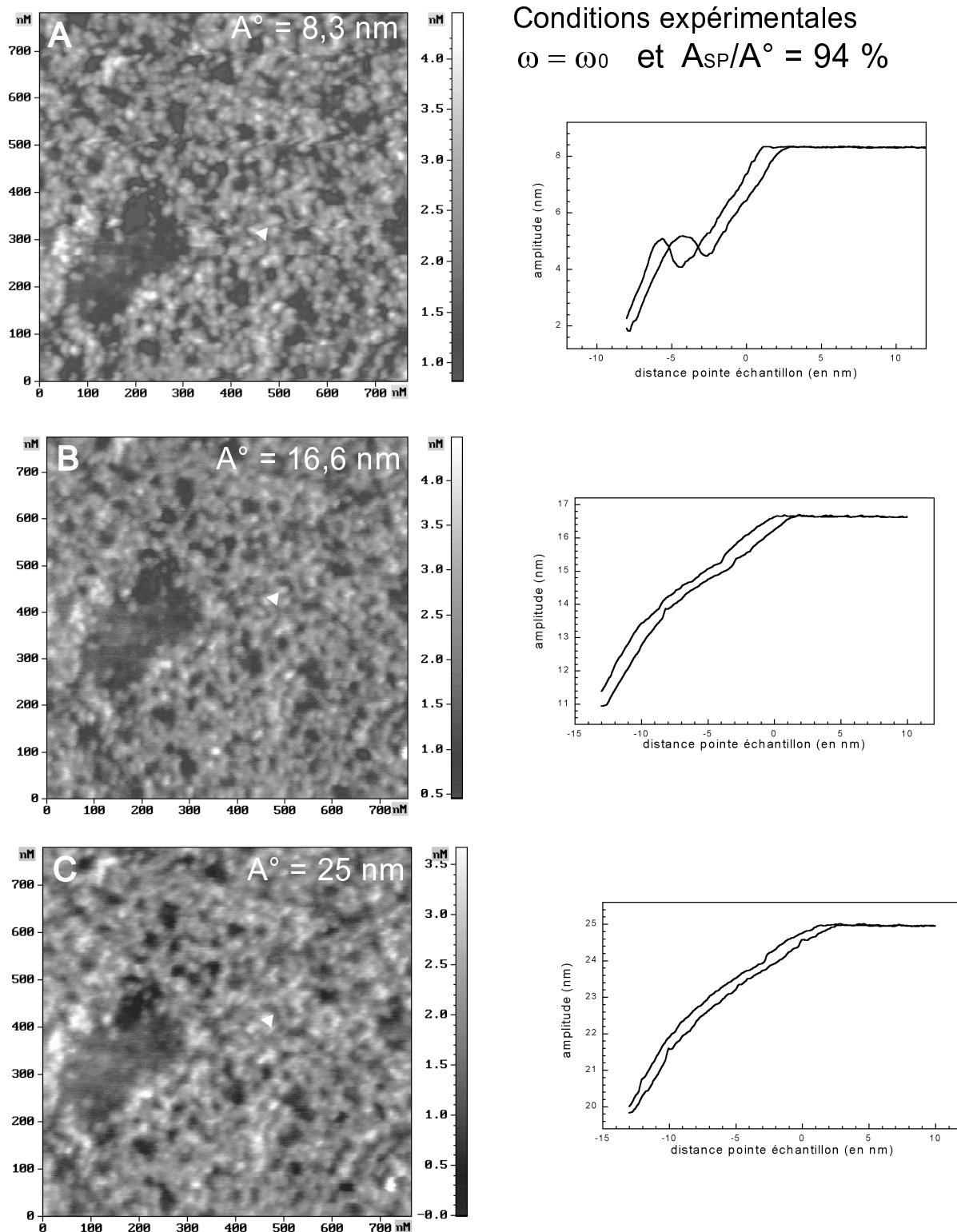


FIG.1.16 – Etude de l'influence de l'amplitude d'oscillation sur une surface constituée d'un tapis de monobrans d'ADN de 25 bases de long déposés sur un substrat de silice fonctionnalisée par silanisation. Le rapport entre l'amplitude de travail, A^{SP} et l'amplitude libre A^{libre} est maintenu constant à 94% et la fréquence de travail est égale à la fréquence de résonance, d'où $A^0 = A^{libre}$. Les images et les courbes approche retrait correspondantes sont présentées pour trois amplitudes libres de 8,3 nm (A), 16,6 nm (B) et 25 nm (C). Le triangle blanc indique le lieu où ont été acquises les courbes amplitude-distance.

nisent sous forme de structures en petits îlots circulaires de 20 nm de diamètre juxtaposés les uns à côté des autres. On observe par ailleurs la présence de trous dans la couche de petite taille environ 100 nm de diamètre et d'une zone plus sombre à gauche de l'image. Quand on augmente l'amplitude libre à 16,6 nm, figure 1.16-B, le contraste entre les îlots et le substrat diminue. Les îlots n'apparaissent plus de manière isolés mais sous forme de ramifications autour des petits trous de la couche. Enfin, à l'amplitude libre de 25 nm (figure 1.16-C) l'image apparaît floue et le contraste vertical entre les trous et les îlots devient plus faible. L'évolution de la forme des courbes approche retrait en amplitude acquises pour les trois amplitudes de 8,3, 16,6 et 25 nm met en évidence une atténuation progressive de la transition entre les branches de solutions L et H. Ceci tend à montrer que le passage du régime attractif dominant au régime répulsif dominant s'opère de manière continue quand l'amplitude d'oscillation augmente. L'origine de cette évolution se situe dans l'amplitude d'oscillation. Plus l'amplitude de travail augmente, moins la pointe passe de temps dans la région où le potentiel d'interaction est élevé. Il en résulte un contrôle des déplacements de la pointe moins sensible au potentiel d'interaction et donc une perte de contraste pour les objets de petite taille. Ici, la gamme de hauteur des monobrins d'ADN est de 1 à 2 nm. En travaillant avec une amplitude de 25 nm la pointe oscille très loin de la surface pendant une grande partie de sa période d'oscillation. La sensibilité de la pointe aux modifications de la force d'interaction est donc amoindrie pour les grandes amplitudes entraînant une perte d'informations.

Ainsi, compte tenu de la taille des objets que nous aurons à caractériser sur les puces à ADN, qui sont d'épaisseur 1 à 2 nm, il sera préférable de sélectionner des amplitudes de travail assez petites, inférieures à 20 nm de manière à ce que la pointe travaille dans un domaine de hauteur où le potentiel d'interaction est relativement important sur l'ensemble de sa période d'oscillation de manière à être sensible à ses variations.

Conclusions

Ce chapitre a présenté une revue générale sur les modes de fonctionnement de l'AFM. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes principalement intéressées à la compréhension du mode oscillant fonctionnant par rétroaction sur l'amplitude, appelé AM-AFM. Les avancées dans sa compréhension ont mis en avant l'importance du caractère non-linéaire du comportement du levier oscillant en présence d'un potentiel d'interaction possédant des contributions attractives et répulsives. La compétition des contributions attractives et répulsives du potentiel d'interaction donne naissance à deux branches distinctes de fonctionnement : une branche dite de grande amplitude et une branche de petites amplitudes. Ces deux branches possèdent des propriétés extrêmement différentes qu'il est nécessaire de bien prendre en compte, de manière à choisir les conditions les plus adaptées pour caractériser nos échantillons. En effet, les solutions de grande amplitude d'oscillation correspondent à un fonctionnement en régime répulsif dominant dans lequel la pointe entre en contact avec la surface à l'extrémité de chacune des oscillations. Au contraire, la branche des solutions de faible amplitude correspond à un fonctionnement en régime attractif dominant caractérisé pour les faibles réductions d'amplitude par l'absence de contact entre la pointe et l'échantillon.

En fonction de la nature des échantillons à analyser il sera préférable de se placer sur une branche plutôt qu'une autre. Les échantillons que nous avons étudiés dans ce travail sont des puces à ADN. Ces échantillons appartiennent à la catégorie des matériaux mous. Il sera donc nécessaire de contrôler avec précision les conditions expérimentales de manière à limiter le plus possible le contact de la pointe avec l'échantillon. On se placera donc sur un point de fonctionnement de la branche des solutions de faibles amplitudes, avec une très faible réduction d'amplitude entre l'amplitude de travail et l'amplitude libre telle que : $A^{libre}/A^0 \in [0, 92-0, 98]$. La réduction d'amplitude étant très faible et les objets à analyser sur nos surfaces présentant une faible épaisseur, il sera également important de sélectionner des amplitudes de travail assez petites de manière à ce que la pointe "baigne" le plus longtemps possible dans une zone où le potentiel est important. On travaillera donc en général avec des amplitudes inférieures à 15 nm.

Bibliographie

- [1] G. Binnig, C.F. Quate and C.H. Gerber, Atomic Force Microscope, *Phys. Rev. Lett.*, 56, p.930, 1986.
- [2] Q. Zhong, D. Inniss, K. Kjoller and V.B. Elings, Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy, *Academic Press*, 1992.
- [3] J. N. Israelachvili, Intermolecular and Surface Forces, *Surface Science Letters*, 290, p.L688, 1993.
- [4] S. Belaidi, P. Girard, and G. Leveque, Electrostatic forces acting on the tip in atomic force microscopy : Modelization and comparison with analytic expressions *Appl. Phys. Lett.*, 81, p.1023, 1997.
- [5] S. Sounilhac, E. Barthel, and F. Creuzet, Simultaneous atomic force microscopy measurement of long range forces and adhesion energy between tungsten and oxide surfaces under ambient atmosphere and ultrahigh vacuum *J. Appl. Phys.*, 85, p.222, 1999.
- [6] J. E. Stern, B. D. Terris, H. J. Mamin and D. Rugar, Deposition and imaging of localized charge on insulator surfaces using a force microscope, *Appl. Phys. Lett.*, 53, p.2717, 1988.
- [7] N.A. Burnham, R. J. Colton and H. M. Pollock, Work function anisotropies as an origine of long rang surface forces, *Phys. Rev. Lett.*, 69, p.144, 1992.
- [8] H. Hertz, *J. Reine Angew. Math.*, 92, p.156, 1882.
- [9] B. V. Derjaguin, V. M. Muller and Y. P. Toporov, *J. Colloid Interface Sci.*, 53, p.314, 1975.
- [10] K.L. Johnson, K. Kendall, and A.D. Roberts, *Proc. Soc. London A*, 324, p.301, 1971.
- [11] A. W. Adamson, Physical Chemistry of Surfaces, First Edition, *Ed. John Wiley and Sons*, 1990.

- [12] A. San Paulo and R. García, High-Resolution Imaging of Antibodies by Tapping-Mode Atomic Force Microscopy : Attractive and Repulsive Tip-Sample Interaction Regimes, *Biophys. J.*, 78, p.1599, 2000.
- [13] R. García and A. San Paulo, Dynamics of a vibrating tip near or in intermittent contact with a surface, *Phys. Rev B.*, 61, p.R13381, 2000.
- [14] R. García and R. Pérez, Dynamic atomic force microscopy methods, *Surface Science Reports*, 47, p.197, 2002.
- [15] C. D. Frisbie, L. F. Rozsnyai, A. Noy, M. S. Wrighton and C. M. Lieber, Functional group imaging by Chemical Force Microscopy *Science*, 265, p. 2071, 1994.
- [16] Bertrand-Lambotte, P., Loubet, J. L., Verpy, C. and Pavan, S., Nano-indentation, scratching and atomic force microscopy for evaluating the mar resistance of automotive clearcoats : study of the ductile scratches, *Thin Solid Films*, 398, p.306, 2001.
- [17] L. T. Mazzola, C. W. Frank, S. P. A. Fodor, C. Mosher, R. Lartius, and E. Henderson, Discrimination of DNA Hybridization Using Chemical Force Microscopy, *Biophys. J.*, 76, p.2922, 1999.
- [18] P. E. Mazeran and J. L. Loubet, Normal and lateral modulation with a scanning force microscope, an analysis : Implication in quantitative elastic and friction imaging, *Tribology letters* , 7, p.199, 1999.
- [19] B. Pignataro, L. Chi, S. Gao, B. Anczykowski, C. Niemeyer, M. Adler and H. Fuchs, Dynamic scanning force microscopy study of self-assembled DNA-protein nanostructures *Applied physics. A*, 74, p.447, 2002.
- [20] B. Drake, C. B. Prater, A. L. Weisnhorn, S. A. C. Gould, T. R. Albrecht, C. F. Quate, D. S. Cannell, H. G. Hansma and P. K. Hansma, *Science*, 243, p.1586, 1989.
- [21] F. J. Giessibl, Atomic resolution of the Silicon (1,1,1)-(77) surface by atomic force microscopy *Science*, 267, p.68, 1995.
- [22] D. Klinov and S. magonov , True molecular resolution in tapping-mode atomic force microscopy with high-resolution probes force microscopy, *Appl. Phys. Lett.*, 84, p.2697, 2004.

- [23] Q. Zhong and D. Inniss, K. Kjoller and V. B. Elings, Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy, *Surface Science*, 290, p.L688, 1993.
- [24] T. R. Albrecht, P. Grütter, D. Horne, and D. Rugar, Frequency modulation detection using high-Q cantilevers for enhanced force microscope sensitivity, *Journal of Applied Physics*, 69, p. 668, 1991.
- [25] B. Gotsmann, C. Seidel, B. Anczykowski, and H. Fuchs, Conservative and dissipative tip-sample interaction forces probed with dynamic AFM, *Phys. Rev. Letters*, 60, p.11051, 1999.
- [26] J. P. Aimé, R. Boisgard, L. Nony and G. Couturier, Influence of non contact dissipation in tapping mode : Attempt to exact quantitative information on the surface properties with the local force probe method, *J. Chem. Phys.*, 114, p.4945, 2001.
- [27] T. R. Rodriguez and R. García, Tip motion in amplitude modulation (tapping-mode) atomic-force microscopy : Comparison between continuous and point-mass models, *Appl. Phys. Lett.*, 80, p.1646, 2002.
- [28] Y. Martin, C.C. Williams and H.K. Wickramasinghe, Atomic Force Microscope-force mapping and profiling on a sub 100- Å scale, *J. Appl. Phys.*, 61, p. 4723, 1987.
- [29] G. Leveque, P. Girard, S. Belaidi et G. W. Cohen-Solal, Effect of air damping in non contact resonant force microscopy, *Rev. Sci. Instrum.*, 68, p. 4137, 1997.
- [30] P. Fontaine, P. Guenoun and J. Daillant, A critical look at surface force measurements using a commercial atomic force microscope uin the non contact mode, *Rev. Sci. Instrum.*, 68, p. 4145, 1997.
- [31] L.D. Landeau and E. M. Lifshitz, *Fluide Mechanics*, Pergamon Press, 1959.
- [32] P. Gleyzes, P. K. Kuo, and A. C. Boccara, Bistable behavior of a vibrating tip near a solid surface *Appl. Phys. Lett*, 58, p.2989, 1991.
- [33] B. Anczykowski, D. Krüger, and H. Fuchs, Cantilever dynamics in quasinoncontact force microscopy : Spectroscopic aspects, *Phys. Rev. B*, 53, p. 15485, 1996.
- [34] Ricardo García and Alvaro San Paulo, Attractive and repulsive tip-sample interaction regimes in tapping-mode atomic force microscopy, *Phys. Rev. B*, 60, p.4961, 1999.

- [35] L. Nony, R. Boisgard and J. P. Aimé, Nonlinear dynamical properties of an oscillating tip-cantilever system in the tapping mode, *J. Chem. Physics*, 111, p.1615, 1999.
- [36] Lugen Wang, The role of damping in phase imaging in tapping mode atomic force microscopy, *Surface Science*, 429, p.178, 1999.
- [37] M. Marth, D. Maier, J. Honerkamp, R. Brandsch and G. Bar, A unifying view on some experimental effects in tapping-mode atomic force microscopy, *J. Appl. Phys*, 85, p.7030, 1999.
- [38] Ricardo García and Alvaro San Paulo, Amplitude curves and operating regimes in dynamic atomic force microscopy, *Ultramicroscopy*, 82, p.79, 2000.
- [39] Alvaro San Paulo and Ricardo García, Unifying theory of tapping-mode atomic force microscopy, *Phys. Rev. B.*, 66, p.041406, 2002.
- [40] J. P. Aimé, R. Boisgard, L. Nony, and G. Couturier, Nonlinear Dynamic Behavior of an Oscillating Tip-Microlever System and Contrast at the Atomic Scale, *Phys. Rev. Letter*, 82, p.3388, 1999.
- [41] L. Wang, Analytical descriptions of the tapping-mode atomic force microscopy response, *Appl. Phys. Letter*, 73, p.3781, 1998.
- [42] A. San Paulo and R. García, Dynamics of a vibrating tip near or in intermittent contact with a surface, *Phys. Rev. B*, 61, p.R13381, 2000.
- [43] J. P. Cleveland, B. Angczykowski, A.E. Schmid and V.B. Elings, Energy dissipation in tapping mode atomic force microscopy, *Appl. Phys. Lett.*, 72(20), p.2613, (1998).
- [44] M. Stark, C. Möller, D. Müller and R. Guckenberger, From Images to interactions : High resolution Phase imaging in Tapping-Mode Atomic Force Microscopy, *Biophys. J.*, 80, p.3009, 2001.
- [45] site web : www.ntmdt.com
- [46] site web : www.spmtips.com

Chapitre 2

Les puces à ADN

2.1 Les puces à ADN et applications

2.1.1 L'ADN, support de l'information génétique

L'ADN, Acide DésoxyriboNucléique, est certainement l'une des molécules les plus étudiées actuellement. Découvert en 1869 par un biochimiste suisse, F. Miescher, son implication dans l'hérédité ne sera mise en avant qu'en 1944 par le bactériologiste O.T.Avery, qui montrera que les caractères héréditaires sont transmissibles d'une bactérie à une autre par des molécules d'ADN purifiées. C'est en 1953 que des analyses par diffraction des rayons X de spécimens d'ADN étirés permirent à Watson et Crick d'établir la structure de l'ADN. Selon le modèle de Watson et Crick [1], l'ADN est un polymère hélicoïdal bicaténaire, composé de deux chaînes ou brins. La structure bicaténaire de ces deux chaînes est liée à l'*appariement* d'une grosse base purique (A : Adénine ou G : Guanine) avec une petite de type pyrimidique (T : Thymine ou C : Cytosine). Des expériences biochimiques antérieures suggèrent l'existence de **paires de bases complémentaires**, également appelées **paires de bases de Watson et Crick**, respectivement A et T et G et C (voir figure 2.1-a).

Ainsi, l'ADN se compose de deux brins accolés formant une structure en double hélice. Ces brins sont constitués d'une succession de nucléotides. Un nucléotide est issu de l'assemblage d'un sucre (désoxyribose), d'un groupement phosphate et d'une base azotée (Adénine, Guanine, Thymine ou Cytosine). Les nucléotides sont reliés par des ponts phosphodiester qui unissent le carbone 5' d'un groupement désoxyribose au carbone 3' du suivant (voir figure 2.1-b).

L'assemblage des deux chaînes est alors réalisé selon les règles d'appariement des bases azotées : l'Adénine avec la Thymine, impliquant deux liaisons hydrogène et la Guanine avec la Cytosine impliquant trois liaisons hydrogène (voir figure 2.1-c). L'information génétique est alors contenue dans la succession des différents nucléotides. Une séquence de nucléotides responsable

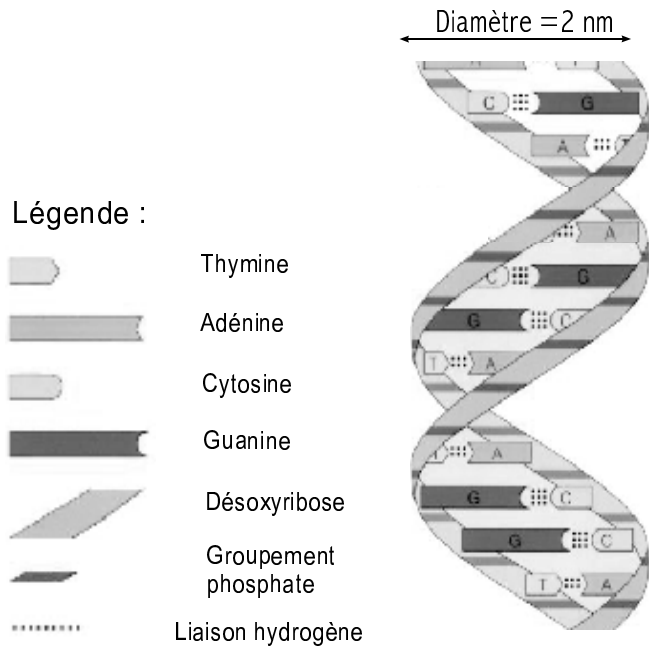
de la synthèse d'une protéine est appelée **gène**. Par convention, une chaîne d'oligonucléotides sera toujours décrite de l'extrémité 5' à la terminaison 3', comme sur la figure 2.1-c.

Compte tenu de sa complexité, la molécule d'ADN, présente plusieurs arrangements spatiaux définissant ainsi différentes conformations. On présente sur la figure 2.2 quelques-unes d'entre elles, qui sont les plus couramment observées : il s'agit des conformations B, les plus connues, mais aussi les conformations A et Z. Chacune de ces conformations conduit à des caractéristiques légèrement différentes du point de vue du diamètre et de la longueur de la molécule (voir tableau 2.1). Pour une revue plus détaillée, on pourra consulter l'article de Leslie [2].

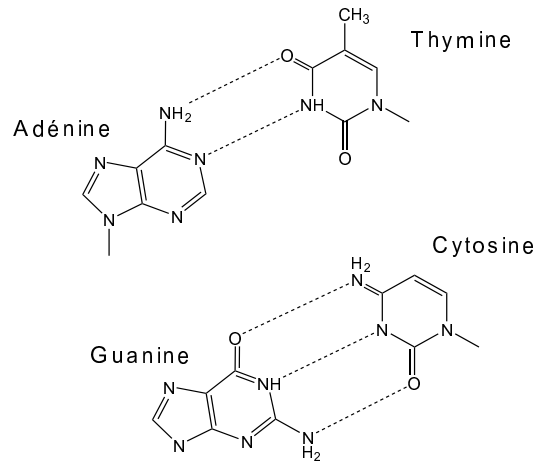
- Conformation B : dans cette conformation, les paires de bases sont perpendiculaires à l'axe de la molécule. Les groupements phosphates sont donc situés à l'extérieur de la molécule. Cette forme est favorisée en milieu aqueux salin, permettant ainsi la neutralisation de la charge négative présente sur les groupements phosphates par les ions positifs de la solution. Le diamètre de la molécule est alors de 2,37 nm et la longueur par paire de base est de 0,34 nm.
- Conformation A : dans cette forme, les bases sont repoussées vers l'extérieur de la molécule, augmentant ainsi son diamètre. Les groupements phosphates sont donc moins accessibles aux molécules d'eau. Cette conformation est favorisée lorsque l'humidité du milieu environnant la molécule diminue drastiquement ($R_h < 20\%$). La molécule adopte ainsi une forme 30% plus compacte en longueur que la conformation B. Le diamètre de la molécule est alors de 2,55 nm et la longueur par paire de base de 0,23 nm.
- Conformation Z : cette forme est généralement obtenue par alternance des paires de bases C-G au sein de la séquence. L'appariement C-G ayant un encombrement stérique plus important que la paire de bases A-T, l'alternance de paire de bases C-G conduit à une déformation importante du squelette sucrophosphate, qui prend alors une forme en zig-zag (origine du nom de cette conformation), avec un hélicité gauche. Il en résulte que les groupements phosphates sont alternativement proches et très éloignés, ce qui provoquent une déstabilisation et une élévation de la molécule. Cette forme est présente dans le cas de concentration saline importante, suffisante pour écranter la répulsion électrostatique entre groupements phosphates proches. La molécule étirée par rapport à la conformation B a une longueur par paire de bases de 0,38 nm et un diamètre de 1,84 nm.

Les monobrin d'ADN quant-à eux sont présentés comme une chaîne linéaire d'oligonucléotides de diamètre inférieur à la molécule double brin, possédant une grande flexibilité et la possibilité de subir d'importantes déformations. Ils sont généralement modélisés par des chaînes de

(a) Structure schématique de l'ADN



(c) Appariement de quatre bases azotées



(b) Structure développée de l'ADN

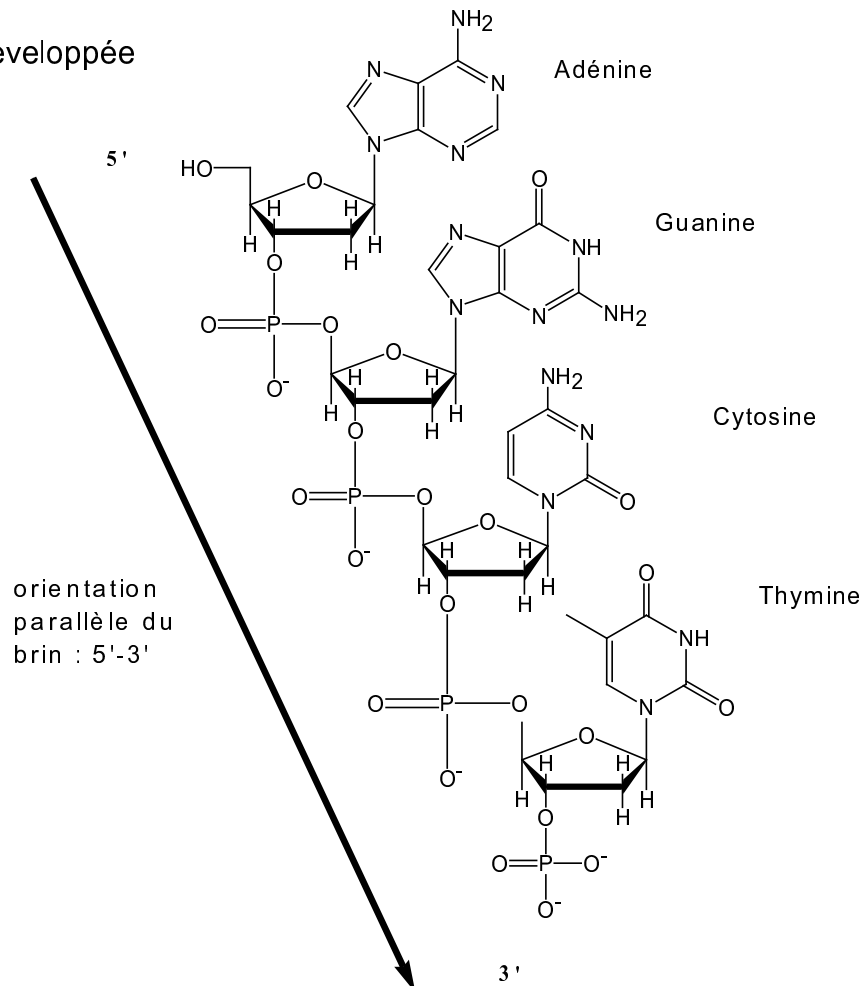


FIG.2.1 – Structure de l'ADN

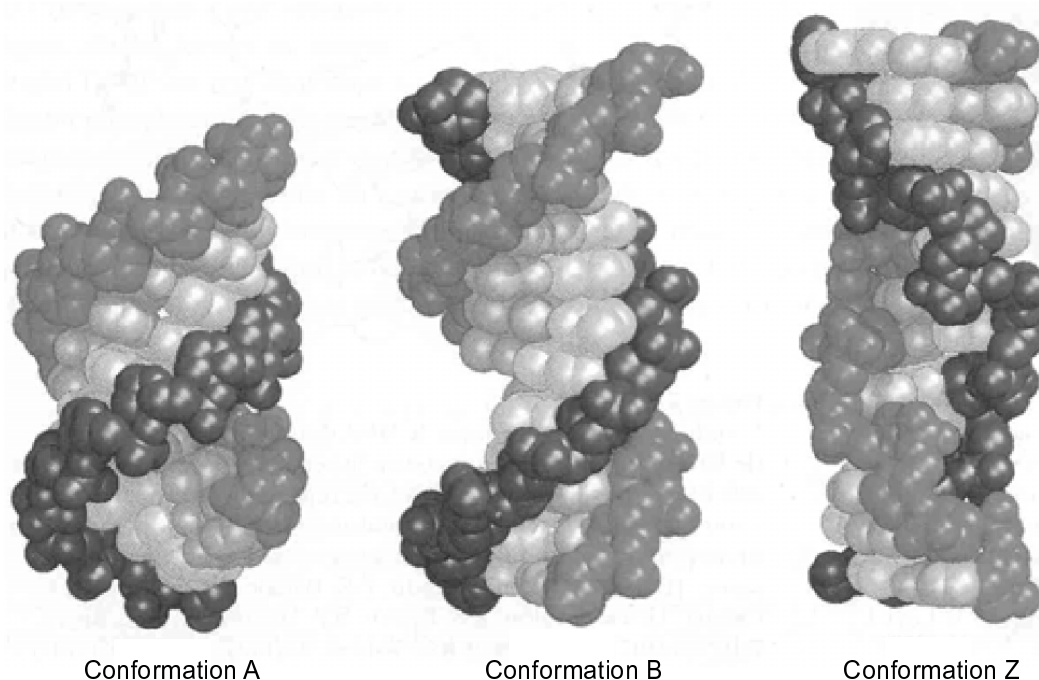


FIG.2.2 – Description des différentes conformations, A, B et Z de la molécule d'ADN double-brin. Les boules noires et gris foncé représentent les deux chaînes des groupements sucrophosphates et les boules gris très claire les bases azotées hybridées

type polymères gaussiens [3], c'est-à-dire que chaque monomère peut être représenté par un vecteur orienté aléatoirement, avec une prise en compte des interactions électrostatiques de répulsion entre les groupements phosphates et les appariements entre bases. Ce modèle décrit relativement bien le comportement des simples brins. On notera que la molécule simple brin, dans des conditions de faible concentration en sel a tendance à occuper une conformation étirée sur le substrat [4], tandis que dans des conditions de forte concentration en sel, des appariements entre bases complémentaires d'un même brin s'opèrent, facilités par la présence de contre-ions qui neutralisent la charge des groupements phosphates [5].

Caractéristiques	Forme A [6]	Forme B [6]	Forme Z	Simple brin
diamètre (nm)	2,55	2,38	1,84	1-1,5 [7]
longueur paires de bases (nm)	0,23	0,34	0,38	0,43 [8]

TAB. 2.1 – Caractéristiques de différentes conformations possibles de l'ADN double brin et simple brin.

Deux phénomènes jouent un rôle primordial dans les réactions naturelles de réplication de

séquence d'ADN. Il s'agit des phénomènes d'hybridation et de dénaturation. L'hybridation correspond à la phase d'appariement spécifique de deux brins possédant des séquences complémentaires, la dénaturation constitue l'opération inverse conduisant à la séparation de deux brins complémentaires (voir figure 2.3).

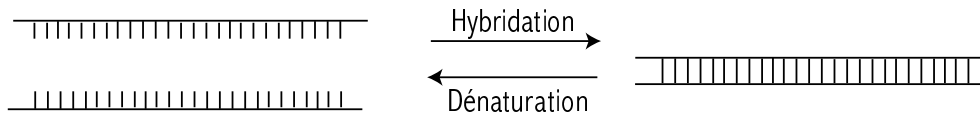


FIG.2.3 – Cycle d'hybridation et de dénaturation

Beaucoup de techniques de la biologie moléculaire reposent sur le principe de reconnaissance spécifique de deux brins d'ADN par hybridation [9]. C'est en particulier le cas pour les puces à ADN.

2.1.2 Qu'est-ce-qu'une puce à ADN ?

Le grand programme du décryptage complet du génome humain qui a démarré au début des années 1990, a nécessité la mise au point d'outils permettant l'analyse simultanée d'un grand nombre de séquences d'ADN. Ces outils d'analyse en masse sont aujourd'hui appelés puce à ADN, en référence aux puces à semi conducteur, intégrant non plus dans leur cas un grand nombre de composants électroniques, mais un grand nombre de séquences d'ADN.

Les puces à ADN reposent sur le principe de reconnaissance spécifique de deux brins dont les séquences sont complémentaires. Une puce à ADN est constituée d'un substrat solide fonctionnalisé sur lequel on crée un ensemble de plots actifs, contenant chacun un type de monobrins d'ADN de séquence connue, appelés monobrins *sondes*, voir figure 2.4-a. Ce bio-récepteur à ADN permet l'identification de monobrins *cibles*, inconnus, par la reconnaissance spécifique du site actif sur lequel s'est opérée l'hybridation 2.4-c. Les dénominations de *sondes* et *cibles*, introduites par B.Phimister [10] sont aujourd'hui les noms conventionnellement utilisés.

2.1.3 Applications des puces à ADN

Depuis quelques années déjà, les puces à ADN ont franchi le pas des laboratoires d'étude, pour aller vers leurs applications effectives dans de nombreux domaines. On donnera ici quelques exemples d'applications des puces dans des domaines divers allant du diagnostic médical à la détection de microorganismes dans l'agroalimentaire. Pour une présentation plus détaillées des

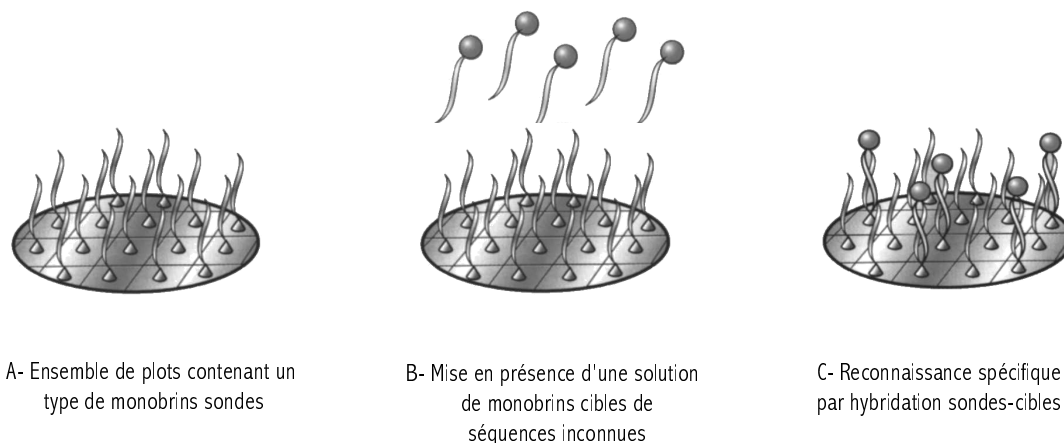


FIG.2.4 – A-Schéma de principe d'une puce à ADN. B- Puce en présence d'une solution de brins inconnus. C-Reconnaissance spécifique de monobrins cibles par hybridation d'oligonucléotides sondes et cibles complémentaires

applications des puces à ADN, on pourra se reporter à un article de J. P. Clewley [11].

Le diagnostic génétique constitue certainement aujourd'hui un des champs d'application les plus importants des puces à ADN. En effet, l'introduction du diagnostic génétique dans le milieu médical s'affiche comme un outil puissant d'analyse pour les maladies ainsi que pour l'adaptation individualisée des thérapies. La nécessité de comprendre comment une modification de l'expression des gènes est transférée en terme d'effets fonctionnels au niveau cellulaire, est l'un des aspects les plus importants des recherches actuelles. Le but est d'établir un schéma de classification des maladies. Dans ce paragraphe, on donne quelques exemples de systèmes de puces de génotypage qui ont été mis au point pour le diagnostic clinique.

Un des exemples les plus marquants de ces dix dernières années est très certainement la fabrication d'une puce à ADN permettant l'identification du virus du SIDA. Cette puce appelée : HIV1 GeneChip[®] a été développée par *Affymetrix*. C'est d'ailleurs la première puce commerciale destinée à des applications cliniques. Elle comportait 12000 plots d'oligonucléotides de 15 bases de long, élaborés pour tester la position des gènes codant pour deux enzymes responsables du virus du SIDA : la protéase et la transcriptase (HIV1) [12]. Depuis, un grand nombre de systèmes de reconnaissance de virus ont été mis au point. On citera à titre d'exemple, une puce construite en 2002, par Wang *et al.*[13], de 1600 oligonucléotides de 70 bases, permettant de tester simultanément 140 séquences caractéristiques de virus pathogènes des affections respiratoires et celle de Rota *et al.* en 2003, qui a permis de détecter le virus du SRAS à l'aide d'une puce 11000 plots de 70 bases [14].

D'autres applications dans le milieu médical ont vu le jour. On trouve aujourd'hui un grand nombre de puces fabriquées dans le but de détecter des mutations pathogènes, permettant en particulier de détecter des cancers. Golub *et al.* propose une classification de nombreuses tumeurs en fonction de l'expression de certains gènes caractéristiques [15]. Ainsi, les puces peuvent aider au diagnostic clinique de plusieurs cancers dont les plus fréquents : cancer du sein chez la femme [16] et de la prostate chez l'homme [17].

Enfin, les biopuces peuvent également être utilisées pour tester les interactions possibles entre traitements, et analyser la toxicité dans le corps humain de certaines molécules actives. Par exemple, dans le cas de traitements contre le cancer, telles que la chimiothérapie et l'immunothérapie, qui s'avèrent généralement être assez toxiques, des polymorphismes spécifiques permettent d'identifier la catégorie de patients pour qui le traitement sera efficace [18].

Un autre champ d'application qui connaît de plus en plus de succès, est le développement de contrôles bactériologiques dans l'agroalimentaire. Des puces permettant la détection par génotypage de microbactéries ont rapidement vu le jour. Un partenariat entre Affymetrix, bioMérieux et la Lyonnaise des Eaux a conduit par exemple à la mise au point de puces d'analyses microbactériennes de l'eau [19]. W.-S. Jung *et al.* [20] ont publié récemment les résultats obtenus sur la mise au point d'une puce permettant une détection multiple des micro-organismes nocifs (tels que les salmonelles) que l'on trouve dans les produits alimentaires.

La détection d'agents bactériologiques est également utilisée dans des applications militaires. Dans la crainte actuelle de l'utilisation d'armes biologiques dans les domaines militaires et civils, de nombreux pays ont dopé la recherche pour l'élaboration d'outils fins de détection d'agents pathogènes. Les chercheurs du centre Lawrence Livermore National Laboratory, USA, ont par exemple développé une puce de 53660 plots capables d'identifier cinq virus, onze procaryotes et deux eucaryotes, considérés comme agents pathogènes [21].

2.2 Les principales voies de fabrication

Depuis la première puce réalisée par l'équipe russe de Mirzabekov en 1989 [22], ces systèmes ont grandement évolué pour atteindre aujourd'hui des densités de plots immobilisés avoisinant les 400000 plots par cm^2 . Dans cette partie, on présentera les différentes stratégies d'élaboration des puces à ADN et leurs voies de synthèse. Ce travail bibliographique s'appuie sur plusieurs rapports récents rédigés sur le sujet [23, 24].

On distinguera deux grandes voies pour la préparation des puces à ADN. La première consiste à fixer des brins présynthétisés, on parle alors de méthode "*ex-situ*". La seconde procède à la construction des sondes base par base directement sur la puce. Il s'agit de la méthode "*in-situ*". Chacune d'elles conduit à des puces de caractéristiques très différentes en fonction de la stratégie choisie.

2.2.1 Immobilisation de brins présynthétisés - "*ex-situ*"

Le principe de la synthèse "*ex situ*" repose sur l'immobilisation de monobrins d'ADN préalablement synthétisés et purifiés. Elle permet donc l'élaboration de puces avec une grande pureté, mais cette technique reste limitée à de faibles densités de plots (< 1000 plots) dans le cadre de la synthèse d'un faible nombre de puce, en raison du coût important imposé par la synthèse préalable des sondes. Dans ce cas on parlera de puce de **faible densité**.

La fixation d'oligonucléotides sur un support solide est réalisée depuis longtemps sur des plaques de microtitration en plastique et sur bandelettes en nitrocellulose. Cependant, en raison du faible nombre de sondes qu'elles permettent d'immobiliser, ces techniques ont été abandonnées au profit de nombreuses innovations. Plusieurs types de supports ont ainsi été retenus, pour leur capacité à offrir des voies d'immobilisation pour les acides nucléiques. On trouve la famille des verres, silice et silicium [30–33], qui nécessite une fonctionnalisation préalable, mais aussi des gels polymères [25, 26] tels le polypropylène et le polyacrylamide et des métaux comme l'or [34].

Parmi les principaux protocoles mis au point, on distinguera les protocoles d'immobilisation par adsorption des sondes, de ceux qui impliquent un greffage covalent des monobrins d'ADN avec les molécules du support.

a- Immobilisation par adsorption

L'équipe russe de Mirzabekov a développé un protocole d'immobilisation de brins d'ADN par gel [25]. Dans cette procédure, l'immobilisation de sondes s'opère par une simple polymérisation d'un gel de polyacrylamide auquel les sondes sont préalablement couplées par réaction entre les groupements amines des sondes et des groupements hydrazides du gel.

Une autre procédure consiste à immobiliser des sondes par polymérisation d'une résine. C'est sur ce principe que la société française *Cis-Bio* en collaboration avec le CEA-LETI à Grenoble a développé une technique originale d'immobilisation. Un mélange d'oligonucléotides et de résine de polypyrrole est déposé sur un substrat de silicium recouvert d'un réseau de minuscules électrodes d'or. Chaque électrode peut être polarisée indépendamment l'une de l'autre pour provoquer la po-

lymérisation de la résine et ainsi l'immobilisation des brins voir figure 2.5 [26].

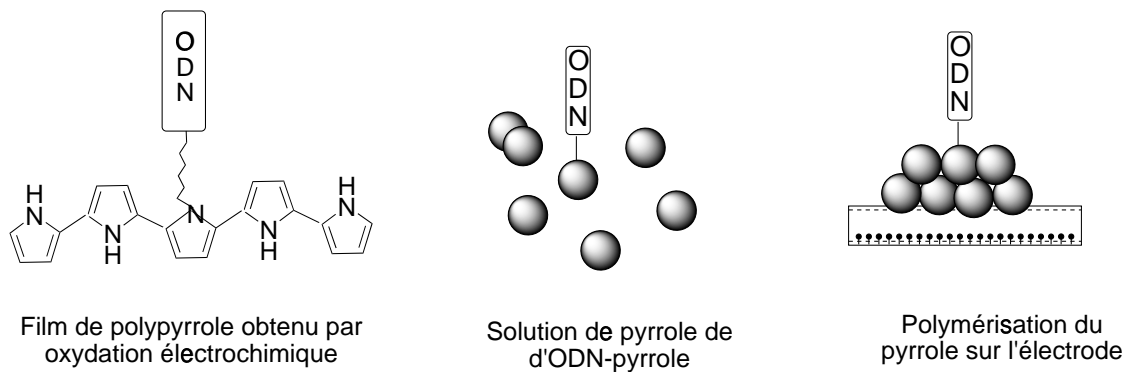


FIG.2.5 – Accrochage de monobrans d'ADN (ODN) par polymérisation du polypyrrole piloté par électrode. D'après Livache et al. [26]

Sur le même principe, la société *Nanogen* utilise des électrodes en platine sur un substrat de silicium [27]. La puce est recouverte d'un gel d'agarose contenant de la streptavidine et les sondes à immobiliser sont porteuses d'une biotine. Les sondes se fixent ainsi par association antigène/anticorps. Ces protocoles présentent une excellente reproductibilité mais sont là encore limités à des synthèses de puces de basses densités.

Le groupe de Patrick Brown et Mark Schena de l'université de *Stanford* a quant à lui développé un procédé fondé sur la grande capacité de la polylysine à adsorber des molécules d'ADN [28]. Des gouttes (de quelques microlitres) contenant les oligonucléotides sondes à immobiliser, sont déposées sur des lames de microscope recouvertes de polylysine. Le dépôt s'effectue via une pointe ou tube capillaire à l'aide d'un robot [29]. Ce procédé est désormais largement utilisé et est conventionnellement appelé "*Spotter*". Cette technique, facile à mettre en oeuvre, présente cependant quelques inconvénients pour la réalisation de dépôts homogènes et reproductibles. En effet, l'étalement ainsi que l'hétérogénéité du séchage des gouttes déposées sont des facteurs limitant la reproductibilité du processus.

b- Immobilisation par greffage covalent - des puces réutilisables

L'immobilisation d'oligonucléotides par greffage covalent est certainement l'une des voies qui a suscité le plus grand nombre de travaux de recherche. En effet, la réalisation d'une fixation chimique, stable en milieu aqueux, et présentant une bonne tenue en température dans la gamme 0-100°, confère aux puces une grande résistance de leur structure aux rinçages. Les puces ainsi

élaborées sont donc réutilisables, ce qui constitue un avantage certain du point de vue commercial.

L'immobilisation par voie chimique implique la formation d'une couche dite *d'accrochage* qui établit le lien entre le substrat et l'oligonucléotide à fixer. On peut souligner que les oligonucléotides utilisés actuellement sont quasiment toujours modifiés. Ils possèdent en particulier un espaceur (composé généralement d'une chaîne carbonée) qui a pour objectif d'augmenter l'accessibilité de la sonde immobilisée dans la phase d'hybridation. La fonction située à l'extrémité de l'espaceur constitue le site actif de réaction entre la couche d'accrochage et l'oligonucléotide, appelée fonction d'accrochage. Deux liaisons stables doivent donc être établies : la première entre le substrat et la couche d'accrochage, la seconde entre les groupements terminaux des molécules de la couche d'accrochage et l'espaceur de l'oligonucléotide.

Deux types de substrat ont ainsi été retenus en raison de leur capacité à établir des liaisons covalentes stables dans les conditions précédemment mentionnées. On trouve ainsi la famille des verres, silice et silicium qui peuvent établir des pont siloxanes (Si-O-Si) entre leurs groupements silanols de surface Si-OH et la fonction terminale Si-X d'un organosilane (X-Si-(CH₂)_n-Y) et des surfaces recouvertes d'or vaporisé qui établissent des liaisons stables avec les thiols (H-S-(CH₂)_n-Z).

Les organosilanes constituent une famille extrêmement vaste. On citera ici quelques exemples de molécules utilisées, mais cet exposé reste non exhaustif. En règle générale, on trouvera au niveau du groupement Si-X une fonction facilement hydrolysable comme les alkoxy, les chloro ou des amino et leurs composés, qui s'éliminera sous la forme X-H (après établissement du pont siloxane).

Le choix du groupement actif situé à l'autre extrémité de l'organosilane peut être varié. On répertorie différents groupements terminaux : des amines (APTS, Joss [30]), des acides (TETU, DDSUM, Ecole Centrale de Lyon-Rosatech [33]), des époxy (GPTS, Southern [31]), des thiols (MPTS, Rogers [32])... (voir figure 2.6). La nature chimique des groupements terminaux choisis dépend de la nature des fonction d'accrochage de l'espaceur. Dans le cas des amines beaucoup de fonctions d'accrochage peuvent être utilisées, parmi elles nous citerons la fonction acide carboxylique. Pour une fonction d'accrochage de type époxy, l'espaceur devra porter une fonction ammonium. Pour les thiols, la réaction se fait par une réaction d'échange thiol/disulfide...

De même, sur les substrats d'or, le greffage covalent s'effectue entre le groupement réactif terminal de la molécule thiolée et la fonction située à l'extrémité de l'espaceur. On retrouvera par exemple un groupement terminal acide du thiol, en vue de l'établissement d'une liaison avec la fonction ammonium de l'espaceur [34].

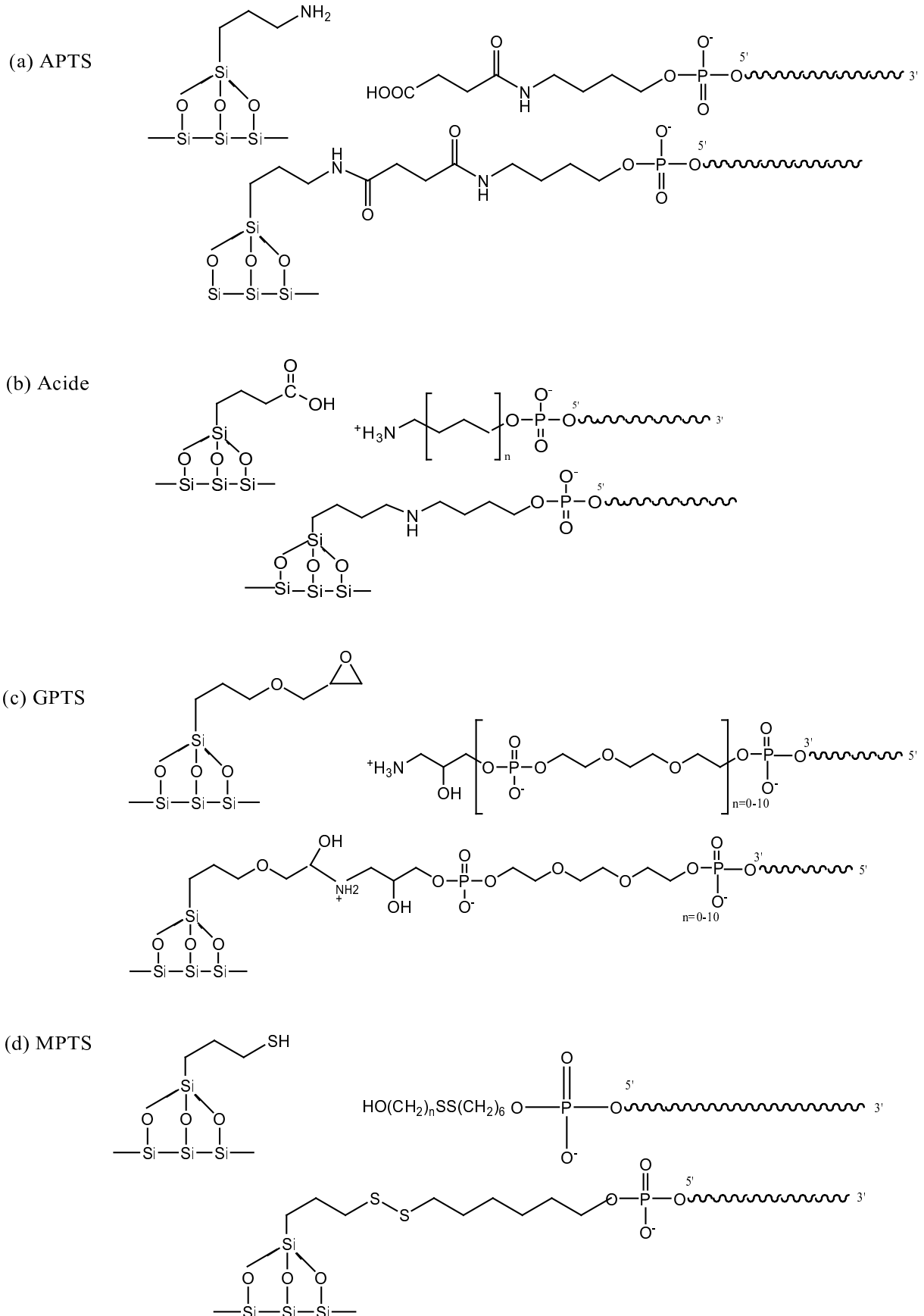


FIG.2.6 – Réaction de fonctionnalisation des surfaces de type verre silice et silicium avec différents silanes : (a)- APTS, aminopropyltriméthoxysilane, (b)- TETU,acide undécanoïque-triméthoxysilane, (c)- GPTS, glycidoxypropyltriméthoxysilane, (d)- MPTS, 3-mercaptopropyltriméthoxysilane.

2.2.2 Synthèse "in-situ"

La fabrication in situ consiste à synthétiser base par base les séquences d'ADN désirées, directement sur le support par des réactions localisées. Le principal avantage de la synthèse "in situ" est qu'elle permet la synthèse d'un nombre beaucoup plus important de sondes de séquences différentes, allant jusqu'à 400000 plots [35]. En opposition aux puces élaborées par immobilisation d'oligonucléotides, on parlera de puces de **haute densité**. On distingue deux procédures utilisées : la synthèse par voie photochimique et la synthèse par microprojection. Chacune d'elles comporte deux étapes principales : la déprotection et le couplage.

a- Synthèse par voie photochimique

Ce procédé a été principalement développé par la société *Affymetrix*, qui s'affiche aujourd'hui comme leader mondial de cette approche [36].

La construction des sondes se fait par cycle successifs d'injection de l'un des nucléotides correspondant aux quatre bases azotées. Les nucléotides injectés sont protégés par des groupements photolabiles pouvant être éliminés par radiation UV. Ainsi, à l'aide de masques similaires à ceux utilisés en photolithographie, on sélectionne les plots auxquels on souhaite ajouter une base de nature donnée. La zone est alors déprotégée par radiation UV, libérant ainsi le groupement de surface du groupement photolabile et permettant l'établissement de la liaison entre le support et la première base. La liaison entre bases s'effectuera ensuite de la même façon. La base précédente sera tout d'abord déprotégée de son groupement photolabile par radiation UV. Son amine sera alors accessible pour établir la liaison avec le nucléotide suivant (voir figure 2.7). Ce principe repose sur le principe de la chimie combinatoire. Pour obtenir une puce de 4^k oligonucléotides, où k est le nombre de bases par sonde, il faudra donc $4 \times k$ cycles de synthèse.

b- Synthèse localisée par microprojection

La fabrication par microprojection est inspirée des techniques d'impression des imprimantes jet d'encre. Un système de microprojection par injecteurs piézo-électriques, permet de déposer les quatre bases en très petites quantités (de l'ordre de la centaine de picolitres) à la surface d'un support. Les réactions de couplage ont lieu par confinement des produits soit grâce à une micro-structure gravée sur le support (Ecole Centrale de Lyon : micropuits avec un silane actif au fond), soit par l'élaboration d'un substrat micro-structuré chimiquement. La société *Protogen* [37] définit par exemple des zones hydrophiles et hydrophobes en utilisant une grille de téflon posée sur une lame de verre. Les réactions opérées sur ces supports passent par la déprotection du site de la liaison, l'apport de la liaison et la protection des sites réactifs jusqu'à la réaction suivante. Ces procédés s'appuient sur la chimie des phosphoramidites. La difficulté de cette méthode réside

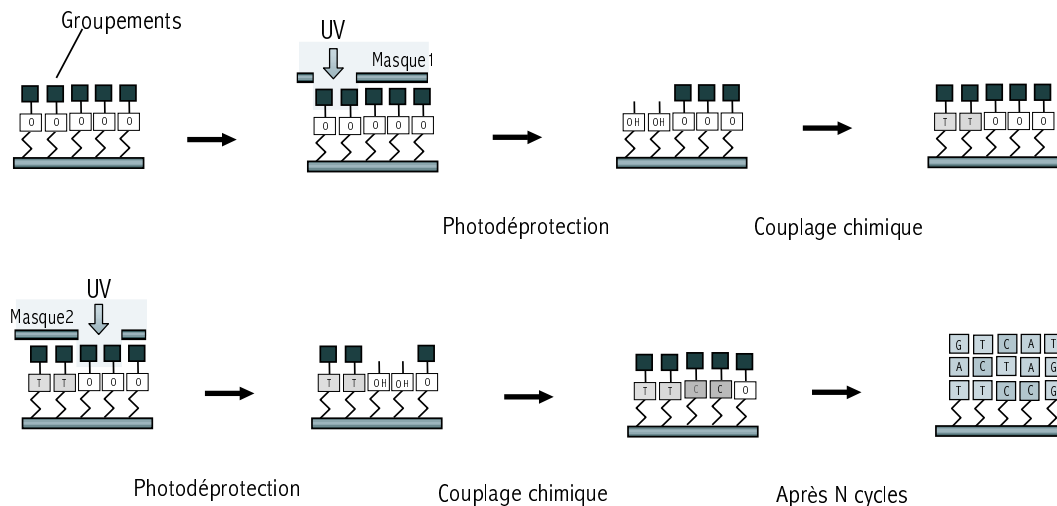


FIG.2.7 – Description des différentes étapes impliquées dans la synthèse photochimique G. McGall et al. [36].

dans l'injection successive sur un même plot.

2.3 les puces réalisées au laboratoire LEOM

De nombreuses voies existent donc pour la préparation des puces à ADN. Nous présentons maintenant les puces à ADN qui sont réalisées et développées au laboratoire, dans l'équipe *Bio-puce* dirigée par J. R. Martin. L'avancement des travaux de recherche réalisés depuis le milieu des années 1990 a donné naissance en 2001 à la start-up *Rosatech*.

La stratégie choisie pour la synthèse de puces à ADN repose sur l'implication de liaisons covalentes à chacune des étapes de la préparation des puces. Cette stratégie présente deux avantages considérables : elle permet d'obtenir des puces réutilisables (jusqu'à plus de 20 fois, travaux de la thèse de Marlène Bras [38]) et d'atteindre un bon niveau de reproductibilité.

Les substrats choisis sont la silice et le verre. La réalisation de la couche d'accrochage par silanisation a fait l'objet de nombreuses études (thèses de Vincent Dugas [39] et François Bessueille [40]). La molécule retenue pour la réalisation de la couche d'accrochage est un monochlorosilane. Le silane sélectionné est le [diméthyl(diméthylamino)silyl] undécanoate, noté DDSUM. On procède à la déprotection de la terminaison ester en terminaison acide de manière à établir une liaison amide entre la sonde et la molécule de silane activée. Contrairement à la quasi totalité des silanes rencontrés dans la littérature qui sont des silanes trifonctionnels possédant trois groupes réactifs sur leur terminaison silylée, la sélection d'un silane monofonctionnel constitue un choix objectif en vue d'obtenir la meilleure robustesse possible de la couche d'accrochage. En effet, les silanes trifonctionnels permettent l'ancrage de la molécule par établissement d'un pont

siloxane avec un groupement silanol de la surface du substrat, mais ils peuvent également interagir entre eux et établir des liaisons siloxanes latéralement. Ce phénomène se rencontre généralement dans le cas de couche dense où les molécules de silanes sont très proches les unes des autres. Il en résulte une interaction entre chaînes carbonées. La couche ainsi constituée possède donc une bonne cohésion, dans le sens où les molécules s'organisent autour d'une conformation verticale, parfois inclinée, appelée dans ce cas configuration "trans". Cependant, bien qu'offrant une forte cohésion à la couche d'accrochage, l'interaction latérale des molécules peut s'avérer être également un inconvénient, car la réalisation de ponts siloxanes entre molécules de silanes n'assure pas l'établissement d'un point d'ancrage au substrat pour chacune des molécules de silanes [41, 42]. Le choix d'un silane monofonctionnel permet de s'affranchir de ces problèmes d'interactions latérales entre molécules conduisant à la formation d'une monocouche et garantit donc un ancrage fort par liaison chimique pour chacune des molécules de la couche d'accrochage.

Cette couche d'accrochage permet par la suite de développer la synthèse de puce à ADN suivant les deux voies de synthèse mentionnées précédemment : par immobilisation d'oligonucléotides présynthétisés, synthèse *ex-situ*, ou par combinaison base par base par voie de synthèse *in-situ*. Les deux voies ont été développées parallèlement au laboratoire pour produire des puces destinées à des applications variées.

a- Procédé d'immobilisation ex-situ

Ces puces par immobilisation d'oligonucléotides présynthétisés sont réalisées à l'heure actuelle avec une machine de 256 microprojecteurs à vanne de 5 nL. Ce procédé permet une grande vitesse de fabrication des puces jusqu'à 50 puces de 256 plots par heure. La machine travaille sous atmosphère contrôlée (Température et Taux d'humidité) et possède des projecteurs isolés les uns des autres ce qui permet de s'affranchir des contaminations. Ces puces, compte tenu de leur petit nombre de plots et de leur rapidité de fabrication, sont destinées à la production de masse pour le diagnostic.

b- Procédé d'immobilisation in-situ

En ce qui concerne la synthèse *in situ*, on trouve deux niveaux de développement. A l'heure actuelle, une machine opère la synthèse base après base par projection des nucléotides sous forme de gouttes de 5 nL. La réaction de couplage base à base repose sur la chimie des phosphoramidites. La localisation de la projection est obtenue en utilisant des masques de silicone, qui définissent des puits permettant ainsi de confiner les constituants contenus dans l'acétonitrile qui est un solvant extrêmement mouillant. Les masques peuvent comprendre jusqu'à 600 plots de 500 μm de diamètre espacés de 750 μm centre à centre. On parle de basse à moyenne intégration pour ces

systèmes. Ce procédé permet une fabrication rapide et flexible de puces en quelques exemplaires. Elles sont principalement destinées à la mise au point de protocoles biologiques.

La mise au point d'un procédé de synthèse *in situ* à haute intégration est à l'heure actuelle en cours de développement. La voie choisie repose également sur la chimie des phosphoramidites, et passe par la projection de très petits volumes : 3 pL. Ce procédé devrait permettre d'atteindre rapidement des puces beaucoup plus intégrées.

2.4 Les méthodes de lecture des puces

De nombreuses méthodes existent pour lire les puces, on se contentera de présenter dans cette partie celles qui sont le plus souvent utilisées, en précisant leurs avantages et inconvénients. Ces techniques sont conventionnellement classées en deux grandes catégories : les méthodes dites directes, qui ne nécessitent pas d'opérations supplémentaires dans les protocoles d'élaboration et d'hybridation, et celles qui sont indirectes, qui requièrent une étape de marquage préalable afin de détecter les molécules cibles.

Chacune d'entre-elles est caractérisée par trois paramètres : la résolution spatiale (le plus petit élément de surface détectable), le seuil de détection (correspondant au plus bas signal analysable) et la sensibilité (définissant les plus petits écarts décelables). Ces paramètres sont difficilement comparables d'une méthode à l'autre, car les procédés mis en jeu peuvent être extrêmement différents. On établira tout de même une comparaison entre les deux méthodes qui seront utilisées par la suite dans le cadre de cette thèse : la microscopie de fluorescence et l'analyse par radioactivité.

2.4.1 Les méthodes directes

Parmi les méthodes directes de lecture des puces, on trouve des techniques anciennes comme les microbalances à quartz mais aussi des procédés originaux comme la spectroscopie de plasmon de surface et les mesures d'impédance électrochimiques. Toutes ces techniques ne seront pas développées ici.

Le principe de la microbalance à quartz est fondé sur le fait que la fréquence de résonance du quartz varie inversement à la masse déposée sur la surface du quartz. Ainsi, les différences de masse mesurées avant et après hybridation informeront sur la présence ou non de brins hybridés [43]. Cette méthode présente l'avantage d'être assez rapide et sensible, mais reste limitée à des puces de faible densité, puisque chaque plot doit être réalisé sur un quartz.

Une analyse directe des processus d'hybridation peut aussi être réalisée en mesurant les variations de la résonance de plasmon de surface. Les variations d'intensité d'une onde réfléchie à la surface de la puce sont enregistrées en fonction de l'angle de réflexion. L'intensité de l'onde réfléchie est modulée par la présence de composant biologique à la surface et peut donc rendre compte de manière in-situ et en temps réel des processus d'hybridation à la surface de la puce [44].

Une troisième méthode directe consiste à utiliser le principe de mesure d'impédance électrochimique pour caractériser l'état d'hybridation d'une puce à ADN. Cette méthode est mise en place à partir de structures à base de semi-conducteurs, appelées *EDS* (Electrolyte/ Dielectrique/ Semi-conducteur), qui permettent de mettre en évidence par mesure d'impédance une modification de la densité de charge présente sur leur surface. Ainsi, le nombre de molécules hybridées en surface peut être déterminé car l'hybridation conduit à une augmentation du nombre de groupements phosphates provoquant un accroissement de la densité de charges négatives en surface. Cependant, l'évaluation de l'impédance étant réalisée sur l'ensemble de la surface de la structure, cette procédure se limite à donner des informations globales de l'état d'hybridation en surface de la puce. Dans le but d'accéder à des informations locales sur les phénomènes d'hybridation, un laser modulé peut être utilisé. L'illumination modulée de la surface de la puce produit alors une oscillation du nombre de paires électron-trou à proximité de l'interface de la jonction. Il est alors possible d'établir une cartographie de l'impédance différentielle locale de la puce avant et après hybridation. Pour être utilisée, cette technique nécessite donc que les puces soient élaborées sur semi-conducteur, le silicium pour des raisons de coût apparaît être un très bon candidat. Ce procédé aujourd'hui couramment appelé mesure électrochimique a été développé par l'équipe de J. R. Martin à l'Ecole Centrale de Lyon [45, 46].

2.4.2 Les méthodes indirectes

Aujourd'hui, les méthodes indirectes de lecture des puces les plus répandues sont les méthodes de mesures par radioactivité et la microscopie de fluorescence.

Dans le cas de l'analyse par mesures de radioactivité, la détection de molécules sondes et cibles nécessite un marquage préalable de ces molécules avec des atomes radioactifs, par exemple du ^{32}P . La détection s'opère alors par comptage des particules émises par les atomes radioactifs introduits dans la molécule. Cette méthode permet une mesure quantitative des sondes ou cibles présentes à la surface de la puce. Elle permet également d'obtenir une cartographie de la surface de la puce, avec une bonne sensibilité. Cependant, cette méthode reste assez limitée sur le plan de la résolution spatiale. En effet, les meilleurs scanners commercialisés sur le marché atteignent au maximum la résolution de $25 \mu\text{m}^2$ pour des temps d'acquisition extrêmement long, d'environ 20h. Le seuil de détection est par contre relativement bas et se situe aux alentours de 10^5 molécules par

cm².

La méthode, qui est aujourd'hui la plus utilisée dans le domaine de la lecture de l'hybridation des puces à ADN, est très certainement la microscopie de fluorescence. Cette fois-ci, le marquage est opéré par incorporation de molécules fluorescentes, soit directement sur les acides nucléiques, soit sur les amorces utilisées dans le cas où la synthèse est obtenue par PCR (Polymérase Chaîne Reaction). Dans le premier cas, les cibles possèdent plusieurs groupements fluorescents (proportion généralement exprimée en % du nombre de base dans le brin), tandis que dans le second cas la molécule ne possède qu'un groupement fluorescent, celui de l'amorce. La présence des brins d'ADN se fait donc par détection de la fluorescence, après excitation avec un laser accordé sur la longueur d'onde d'excitation des molécules fluorescentes. Elle est donc applicable à tout type de puces : puces de basse, moyenne et haute densité. Cette méthode permet elle aussi d'établir une cartographie de la surface avec une résolution spatiale élevée qui peut atteindre les 5 μm pour les systèmes les plus performants. De plus cette mesure est quasiment instantanée, ce qui lui confère un avantage certain sur les méthodes de mesure par radioactivité. Cependant, son seuil de détection, qui est de l'ordre de 10^7 molécules/cm², reste 100 fois plus élevé que celui des mesures de radioactivité.

Conclusions

Ainsi, de nombreuses équipes de part le monde travaillent à la mise au point de puces à ADN. Comme nous l'avons vu dans ce chapitre, il existe de nombreuses voies de préparation de ces systèmes. Les principales voies développées sont résumées dans le tableau 2.2.

Société	Groupe	Fonctionnalisation de surface	Densité (sondes/cm ²)
Stanford	Schena	Brins présynthétisés adsorbés avec de la poly-syine	NC
CIS Bio	Téoule	Brins présynthétisés fixés par polymérisation du polypyrrole pilotée par électrodes de platine	10 ¹²
Nanogène	Heller	Brins présynthétisés fixés par association antigène/anticorps pilotée par électrodes	1,6.10 ¹²
Affymetrix	Trulson	Synthèse in situ par processus photochimique	10 ¹²
Protogene	Brennan	Synthèse in situ sur motif hydrophile/hydrophobe	1,3.10 ¹²
Rosatech	Souteyrand	Brins présynthétisés fixés par silanisation	4.10 ¹¹
Rosatech	Souteyrand	Synthèse in situ, avec fixation covalente sur verre silanisé	10 ¹¹

TAB. 2.2 – Tableau récapitulatif des différents procédés de préparation des puces à ADN.

La course à la miniaturisation de ces systèmes, dans le but d'augmenter le nombre de plots et de réduire les quantités de matériaux biologiques nécessaires, a engagé la recherche vers une réduction massive de la taille des plots. Les systèmes les plus "intégrés" atteignent, à l'heure actuelle, des diamètres de plots de l'ordre de la dizaine de microns. Afin d'atteindre cette miniaturisation, de nouveaux problèmes sont aujourd'hui à résoudre.

Le premier réside bien évidemment dans la réalisation de plots de plus petite taille. Ceci passe par le contrôle de volumes plus petits que ceux utilisés aujourd'hui (inférieur au pL).

Un deuxième problème concerne la sensibilité des méthodes de lecture, car la réduction de la taille des plots va diminuer la quantité de matière hybridée sur chacun d'eux. Ceci impose donc une amélioration des méthodes de lecture afin d'optimiser leur sensibilité et d'abaisser leur seuil de détection.

Le dernier point à prendre en compte et non le moindre porte sur le contrôle de la qualité des dépôts du point de vue de leur homogénéité à des échelles en taille de l'ordre du micron. En effet, la réduction de la surface des plots ne peut s'opérer correctement que si la couche de greffage et les processus d'immobilisation sont homogènes à l'échelle de la surface de ces nouveaux plots.

Ainsi, une étude détaillée des protocoles de préparation des puces à ADN à l'échelle submicro-nique a été engagée. L'objectif consiste à analyser l'organisation de couches d'accrochages et de molécules sondes immobilisées afin de sélectionner les protocoles les plus adaptés en vue d'une miniaturisation de ces systèmes. Aussi, les méthodes de caractérisation et de lecture des puces ne sont pas toutes adaptées à cette nouvelle problématique. La microscopie à force atomique, par sa capacité à imager des surfaces, à l'échelle moléculaire, à l'air mais également en solution, se présente comme un outil performant pour conduire cette étude. C'est le choix que nous avons fait dans le cadre de cette thèse.

Bibliographie

- [1] J. D. Watson, and F. H. C. Crick, Genetic Implications of the Structure of Nucleic Acid. A structure of DNA, *Nature*, 171, p.964, 1953.
- [2] A. G. W. Lesli, S. Arnott, R. Chandrasekaran and R. L. Ratliff, *J. Mol. Biol.*, 143, p.49, 1980.
- [3] Y. Zhang, H. Zhou, and Z. C. Ou-Yang, Stretching Single-Stranded DNA : Interplay of Electrostatic, Base-Pairing, and Base-Pair Stacking Interactions, *Biophys. J.*, 81, p.1133, 2001.
- [4] B. Maier, D. Bensimon and V. Croquette, Replication by a single DNA polymerase of a stretched single-stranded DNA, *PNAS*, 97, p.12002, 2000.
- [5] A. Montanari and M. Mézard, Hairpin Formation and Elongation of Biomolecules, *Phys. Rev. Lett.*, 86, p.2178, 2000.
- [6] V. A. Bloomfield, D. M. Crothers, I. Tinoco, Nucleic Acids : Structures, Properties, and Functions, *University Science Books : Herndon VA*, 2000.
- [7] M. C. Olmsted, C. F. Anderson and M. T. Record, Importance of oligoelectrolyte end effects for the thermodynamics of conformational transitions of nucleic acid oligomers : a grand canonical Monte Carlo analysis, *Biopolymers*, 31(13), p.1593, 1991.
- [8] B. Tinland, A. Pluen, J. Sturm, and G. Weill, Persistence Length of Single-Stranded DNA, *Macromolecules*, 30, p.5763, 1997.
- [9] E. M. Southern, Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.*, 98, , p.5003, 1975.
- [10] B. Phimister, Going global *Nature Genetics*, 21, p.1, 1999.
- [11] J. P. Clewley, A role for arrays in clinical virology : fact or fiction ?, *Journal of Clinical Virology*, 29(1), p.2, 2004.

- [12] M. J. Kozal, N. Shah, N. Shen, R. Yang, R. Fucini, T. C. Merigan, D. D. Richman, D. Morris, E. Hubbell, M. Chee and T. R. Gingeras, Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays, *Nature Medicine*, 2, p.753, 1996.
- [13] D. Wang, L. Coscoy, M. Zylberberg, P. C. Avila, H. A. Boushey, D. Ganem, and J. L. DeRisi, Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, p.15687, 2002.
- [14] P. A. Rota, M. S. Oberste, S. S. Monroe, W. A. Nix, R. Campagnoli, J. P. Icenogle, S. Peñaranda, B. Bankamp, K. Maher, M. Chen, S. Tong, A. Tamin, L. Lowe, M. Frace, J. L. DeRisi, Q. Chen, D. Wang, D. D. Erdman, T. C. T. Peret, C. Burns, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, A. Sanchez, S. Liffick, B. Holloway, J. Limor, K. McCaustland, M. Olsen-Rasmussen, R. Fouchier, S. Günther, A. D. M. E. Osterhaus, C. Drosten, M. A. Pallansch, L. J. Anderson and W. J. Bellini, Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome, *Science*, 300, p.1394, 2003.
- [15] T. R. Golub, D. K. Slonim, P. Tamayo, C. Huard, M. Gaasenbeek, J. P. Mesirov, H. Coller, M. L. Loh, J. R. Downing, M. A. Caligiuri, C. D. Bloomfield, and E. S. Lander, Molecular Classification of Cancer : Class Discovery and Class Prediction by Gene Expression Monitoring *Science*, 286, p.531, 1999.
- [16] L. J. Van't Veer, H. Dai, M. J. Van de Vijver, Y. D. He, A. A. M. Hart, M. Mao, H. L. Peterse, K. Van der Kooy, M. J. Marton, A. T. Witteveen, G. J. Schreiber, R. M. Kerkhoven, C. Roberts, P. S. Linsley, R. Bernard and S. H. Freind, Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer *Nature*, 415, p.53, 2002.
- [17] J. Luo, D. J. Duggan, Y. Chen, J. Sauvageot, C. M. Ewing, M. L. Bittner, J. M. Trent, and W. B. Isaacs, Human Prostate Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia : Molecular Dissection by Gene Expression Profiling, *Cancer Res.*, 61, p.4683, 2001.
- [18] Allen D. Roses, Genome-based pharmacogenetics and the pharmaceutical industry, *Nature Rev. Drug. Disc.*, 1, p.541, 2002.
- [19] A. Troesch, H. Nguyen, C. G. Miyada, S. Desvarenne, T. R. Gingeras, P. M. Kaplan, P. Cros, and C. Mabilat, Mycobacterium Species Identification and Rifampin Resistance Testing with High-Density DNA Probe Arrays, *J. Clin. Microbiol.*, 37, p.49, 1999.

- [20] W.-S. Jung, S. Kim, S.-I. Hong, N.-K. Min, C.-W. Lee and S.-H. Paek, DNA probe chip system for multiple detection of food poisoning microorganisms, *J. Clin. Microbiol.*, 24, p.47, 2004.
- [21] W. J. Wilson, C. L. Strout, T. Z. DeSantis, J. L. Stilwell, A. V. Carrano and G. L. Andersen, Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology, *Molecular and Cellular Probes*, 16, p.119, 2002.
- [22] K. Khrapko., Y. Lysov, A. Khorlin, V. Shick, V. Florentiev, and A. Mirzabekov, An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing, *FEBS Letters*, 256, p.118, 1989.
- [23] M. C. Pirrung, How to Make a DNA Chip, *Angewandte Chemie International Edition*, 41(8), p.1276, 2002.
- [24] S. L. Beaucage, Strategies in the preparation of DNA oligonucleotide Arrays for Diagnostic Applications, *Current Medical Chemistry*, 8, p.1213, 2001.
- [25] K. R. Khrapko, Yu P. Lysov, A. A. Khorlyn, V. V. Shick, V. L. Florentiev and A. D. Mirzabekov, An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing, *J. Mol. Biol.*, 256, p.118, 1989.
- [26] T. Livache, A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan, and R. Teoule, Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group, *Nucleic Acids Res.*, 22, p.2915, 1994.
- [27] J. Cheng, E. L. Sheldon, L. Wu, A. Uribe, L. O. Gerrue, J. Carrino, M. J. Heller, and J. P. O'Connell, Preparation and hybridization analysis of DNA/RNA from *E. coli* on microfabricated bioelectronic chips, *Nature Biotechnology*, 16, p.541, 1998.
- [28] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown, Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray, *Science*, 270, p.467, 1995.
- [29] M. Schena, D. Shalon, R. Heller, A. Chai, P. O. Brown, and R. W. Davis, Parallel human genome analysis : Microarray-based expression monitoring of 1000 genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, p.10614, 1996.
- [30] B. Joos, H. Kuster and R. Cone, Covalent attachment of hybridizable oligonucleotides to glass supports, *Anal. Biochem.*, 247, p.96, 1997.

- [31] U. Maskos, E. M. Southern, Oligonucleotide hybridizations on glass supports : a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesised in situ, *Nucl. Acids. Res.*, 20, p.1679,1992.
- [32] Y.H. Rogers, P. Jiang-Baucom, Z. J. Huang, V. Bogdanov, S. Anderson and M. T. Boyce-Jacino, Immobilization of oligonucleotides onto a glass support via disulfide bonds : A method for preparation of DNA microarrays, *Analytical biochemistry*, 266, p.23, 1999.
- [33] V. Dugas, Y. Chevalier, G. Dupret, X. Nesme and E. Souteyrand, The immobilisation of DNA strands on silica surface by means of chemical grafting, *Prog. Colloid. Polym. Sci.*, 123, p.275, 2004.
- [34] M. Boncheva, L. Scheibler, P. Lincoln, H. Vogel and B. Akerman, Design of oligonucleotide arrays at interfaces, *Langmuir*, 15,p.4317,1999.
- [35] S. P. A. Fodor, DNA Sequencing Massively Parallel Genomics, *Science*, 277, p.393, 1997.
- [36] G. McGall, J. Labadie, P. Brock, G. Wallraff, T. Nguyen, W. Hinsberg, Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, p.13555, 1996.
- [37] J. H. Butler, M. Cronin, K. M. Anderson, G. M. Biddison, F. Chatelain, M. Cummer, D. J. Davi,L. Fisher, A. W. Fraundorf, F. W. Frueh, C. Gjerstad, T. F. Harper, S. D. Kernahan, D. Q. Long, M. Pho, J. A. Walker and T. M. Brennan, In Situ Synthesis of Oligonucleotide Arrays by Using Surface Tension, *J. Am. Chem. Soc.*, 123(37), p.8887, 2001.
- [38] M. Bras, Validation et caractérisation de la lecture des puces à ADN par spectroscopie de fluorescence, *Thèse de l'Université Claude Bernard-Lyon1*, 2001.
- [39] V. Dugas, Immobilisation d'oligonucléotides par greffage sur silice pour la réalisation de puce à ADN, *Thèse de l'Ecole Centrale de Lyon*, 2001.
- [40] F. Bessueille, Contribution à l'élaboration et à la lecture des puces à ADN, *Thèse de l'Ecole Centrale de Lyon*, 2001.
- [41] J. B. Brzoska, I. Ben Azouz and F. Rondelez, Silanization of Solid Substrats : A step toward Reproducibility, *Langmuir*, 10, p.4367, 1994.

- [42] K. Kojio, A. Takahara and T. Kajiyama, Formation mechanism of *n*-octadecyltrichlorosilane monolayer prepared at air/water interface, *Colloids and Surfaces A.*, 169, p.295, 2000.
- [43] T. Abe and M. Esashi, One-chip multichannel quartz crystal microbalance (QCM) fabricated by Deep RIE, *Sensors and actuators B*, 82, p.139, 2000.
- [44] C. E. Jordan, A. G. Frutos, A. J. Thiel, and R. M. Corn, Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of DNA Hybridization Adsorption and Streptavidin/DNA Multilayer Formation at Chemically Modified Gold Surfaces, *Anal. Chem.*, 69, p.4939, 1997.
- [45] E. Souteyrand, J. P. Cloarec, J. R. Martin, C. Wilson, I. Lawrence, S. Michelsen and M. Lawrence, Direct detection of the hybridization of synthetic homo-oligomer DNA sequences by field effect, *J. Phys. Chem. B, Materials, Surfaces, Interfaces and Biophysical*, 101, p.2980, 1997.
- [46] E. Souteyrand, C. Chen, J. P. Cloarec, X. Nesme, P. Simonet, I. Navarro, and J. R. Martin, Comparison between electrochemical and optoelectrochemical impedance measurements for detection of DNA hybridization, *Applied biochemistry and biotechnology*, 89, p.195, 2000.

Chapitre 3

Revue bibliographique des études de puces à ADN par AFM

La microscopie à force atomique, par sa capacité à imager des objets conducteurs, semi-conducteurs et isolants, dans tout type de milieux : à l'air, sous ultra-vide mais aussi en solution, est aujourd'hui un des outils les plus utilisés pour la caractérisation d'objets biologiques à l'échelle submicronique. Depuis leur invention, les microscopies à sonde locale nourrissent l'espoir de la résolution de la molécule d'ADN de manière isolée et dans l'espace direct. Ce n'est qu'en 1989, que les premières images d'ADN réalisées par microscopie à effet tunnel (STM) ont été publiées par le groupe de Lindsay [1]. Drake et al. [2] quant à eux présentaient également en 1989, les premières images d'ADN obtenues en microscopie à force atomique en mode contact. Depuis, les études de l'ADN par AFM concernent un véritable domaine de recherche à part entière [6, 7, 11–24].

Ce chapitre a pour objectif de présenter un état de l'art des études conduites par microscopie à force atomique sur des puces à ADN ou systèmes apparentés (immobilisation de molécules d'ADN, simple ou double brin). Avant d'aborder les travaux réalisés sur ces systèmes qui sont relativement complexes, nous aborderons dans une première partie les principaux problèmes soulevés par l'imagerie AFM de brins d'ADN isolés déposés sur une surface. Dans un second temps, nous présenterons un bilan des avancées des différents groupes travaillant à la caractérisation de puces à ADN ou de l'immobilisation de brins d'ADN, ce qui constitue coeur des travaux réalisés au cours de cette thèse.

3.1 Etudes AFM de molécules d'ADN supportées

Les premières études AFM sur des brins d'ADN ont mis en évidence la nécessité d'une bonne fixation des brins sur le substrat. Ainsi, en 1992, deux articles originaux de C. Bustamante [3] et T. Thundat [4], rapportent la possibilité de réaliser **des images reproductibles de l'ADN par fixation** de la molécule sur un substrat de mica par traitement ionique par ions multivalents comme le Mg^{2+} . Depuis, cette condition a largement été reprise dans la littérature. Par ailleurs, ces deux articles mentionnent d'ores et déjà l'influence de plusieurs paramètres, qui s'avèrent jouer un rôle déterminant pour l'imagerie, comme par exemple la déformation de la molécule d'ADN sous l'action de la force exercée par la pointe, ou l'élargissement latéral de la molécule lié à la dilatation de la pointe avec l'objet et enfin, l'influence du taux d'humidité sur le contraste vertical obtenu.

3.1.1 Choix du substrat

Un des premiers aspects importants à prendre en compte pour la caractérisation de molécules d'ADN réside dans le choix du substrat. Compte tenu de la taille relativement petite des molécules à imager (voir tableau 2.1, chapitre 2), les substrats envisageables pour supporter des molécules d'ADN en vue d'une étude AFM sont peu nombreux et doivent satisfaire à deux critères : présenter la rugosité de surface la plus faible possible et disposer de sites chimiquement réactifs aux ligands nécessaire à la fixation de la molécule.

La première étude par AFM a été réalisée sur des molécules d'ADN déposées sur du mica. Ce substrat est encore aujourd'hui le plus utilisé pour sa faible rugosité de surface (RMS = 0,2 nm) mais aussi pour la possibilité qu'il offre de fixer les molécules d'ADN par interaction électrostatique entre les charges négatives portées par les groupements phosphates du squelette de l'ADN et des ions positifs liés à la surface de mica. D'autres équipes évaporent un film mince d'or, d'épaisseur 4-6 nm, sur du mica pour favoriser l'ancrage des molécules d'ADN [14]. Leur fixation est alors réalisée par réaction d'un groupement terminal thiolé (préalablement fixé sur l'extrémité 5' de l'ADN) avec les atomes d'or de la surface. Par ailleurs, l'importance du critère de faible rugosité des substrats a naturellement orienté la recherche vers des surfaces de type cristallines. Ainsi, Yoshimoto *et al.* [5] proposent l'utilisation de la surface cristalline ultra-lisse du saphir α - Al_2O_3 (RMS = 0,3 nm), qui après traitement par Na_3PO_4 possède un caractère hydrophile permettant l'adhésion de l'ADN. Arai *et al.* [6] quant à eux, utilisent la face (1,1,1) du silicium vicinal (RMS = 0,3 nm). Cette fois-ci, l'immobilisation de l'ADN sur la surface du semi-conducteur se fait par interaction des dipôles de la molécule d'ADN avec ceux de la surface.

3.1.2 Etudes des conformations de l'ADN

Dans le cadre des études en microscopie à force atomique, on notera que l'ADN n'est plus libre mais supportée sur une surface. Sa structure n'est donc plus tout à fait la structure à trois dimensions de la molécule libre en solution. Dans toute la suite on supposera que la molécule supportée sur une surface peut-être représentée par la projection de la structure de la molécule libre (3D) sur la surface. L'étude des propriétés structurales de l'ADN par AFM constitue un grand champ d'investigation. Nous nous limiterons à donner quelques exemples d'études de conformations [7, 11–16].

a- Longueur de brins et transition entre deux conformations

C. Rivetti *et al.* [7], publient en 2001 des travaux dans lesquels ils montrent qu'une transition de la conformation B vers la conformation A de brins déposés sur mica s'opère lorsque la concentration en sel diminue, réduisant ainsi la longueur totale des brins de 30%. Par ailleurs, ils discutent de la précision des différents algorithmes évaluant théoriquement la longueur d'un brin. Ils comparent dans leurs conditions expérimentales les méthodes fondées sur l'estimation de Freeman[8], celle de Kulpa [9] et un modèle d'ajustement avec un polynôme de degré 3 [10] et montrent que la longueur de la molécule est presque parfaitement ajustée avec le modèle polynomial. Les méthodes d'estimation de la longueur de brins d'ADN et la comparaison entre les modèles et la lecture de longueur sur des images AFM sont rapportés dans plusieurs articles. On donne à titre d'exemple celui de V. Ph. Pastushenko[11].

Dans le prolongement de cette étude, J. Zheng *et al.*[12] s'intéressent à cette même transition (entre conformations A et B) en regardant plus spécifiquement l'influence de la nature des ions présents dans la solution d'hybridation, à concentration constante. Ils en déduisent un ordre d'efficacité des ions étudiés à provoquer la transition de la conformation B des molécules vers une conformation A : $\text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$.

Les changements de conformation ont non seulement été étudiés en fonction des concentrations en sel des solutions mais également en fonction du pH des solutions utilisées. L. S. Shlyakhtenko *et al.*[13] rapportent par exemple la transition entre une conformation en triple hélice, interne à une molécule d'ADN double brin, vers une conformation B en augmentant le pH du milieu de 5 à 7. Les mécanismes impliqués dans cette transition apparaissent extrêmement complexes passant par un nombre d'états transitoires important.

b- Quelques conformations exotiques

L'ADN, loin de présenter toujours une structure linéaire simple, peut comporter des conformations exotiques provenant soit d'interactions entre bases d'un même brin, produisant par exemple des structures en "épingle" ou "hairpin", soit d'interactions entre bases appartenant à des brins d'ADN différents, donnant alors des triplexes.... Ces structures sont généralement rencontrées sous la dénomination d'hétéroduplexes. Ces formes exotiques sont principalement naturelles dans le sens où elles peuvent être obtenues lors de processus biologiques. La zoologie des structures observables pouvant être assez variée, on donne ici quelques exemples.

E. A. Oussatcheva *et al.* [15] étudient l'influence de la formation d'épingles dans des brins sur leur mobilité dans les processus d'électrophorèse. Cette étude, conduite par AFM, révèle quelques-unes des structures formées (voir figure 3.1).

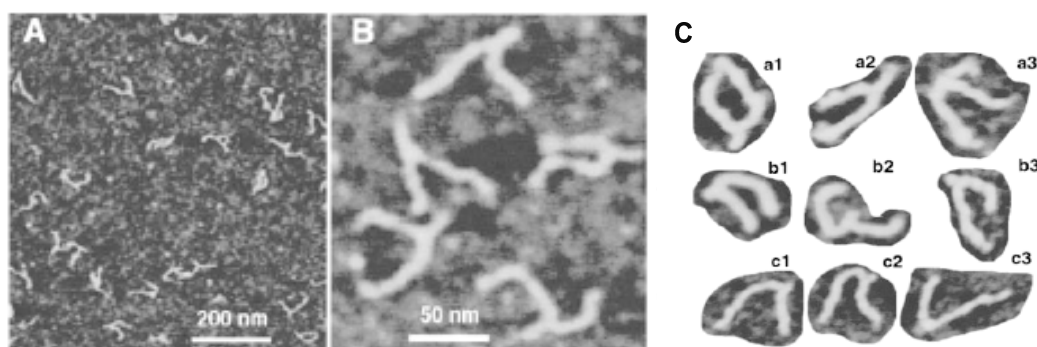


FIG.3.1 – Image AFM d'hétéroduplexes. A- fragments de 301 paire de bases (pb) contenant des épingles de 50 pb. B- Image à plus haute résolution des mêmes hétéroduplexes. C- Comparaison entre des molécules présentant des épingles de 50 pb (a), 27 pb (b), 18 pb (c). E. A. Oussatcheva *et al.* [15]

Dans des travaux similaires [16], le même groupe montre, par analyse structurale de molécules d'ADN de type super hélice, que l'on peut trouver des structures locales, appelées cruciformes, qui correspondent à des recombinaisons de portions d'ADN analogues. Ils obtiennent ainsi des structures en forme de H ou de X, correspondant à deux conformations différentes. Dans le cas des structures de type H, les brins d'ADN se recombinent avec une orientation antiparallèle, tandis que dans le cas de structures de type X, la recombinaison s'effectue suivant le sens parallèle (voir figure 3.2).

3.1.3 Études de la hauteur des brins d'ADN

En ce qui concerne les mesures de la hauteur d'un double brin déposé sur un substrat, beaucoup de publications ont été écrites sur le sujet [17–24]. La mesure de la hauteur d'objets biologiques, dits "mous" (de module d'Young peu élevé), et en particulier de l'ADN, constitue une des grandes

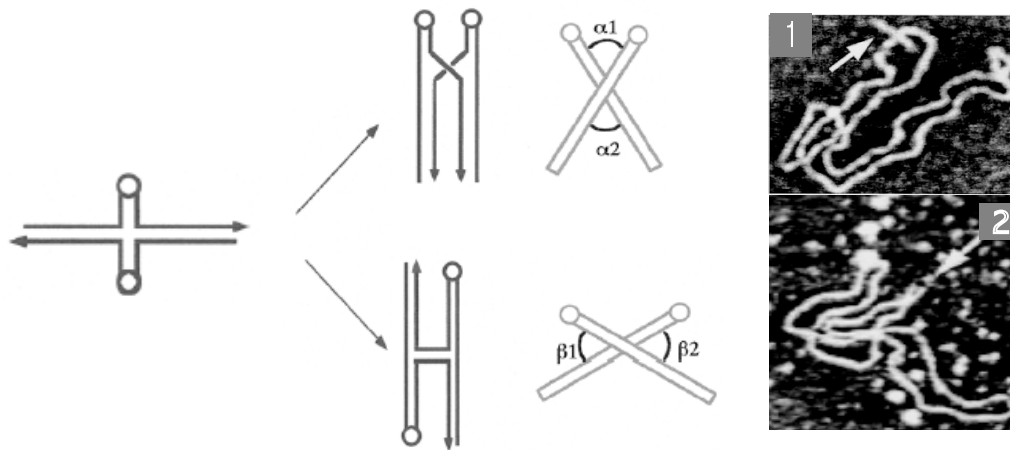


FIG.3.2 – Etude AFM des différentes conformations obtenues par recombinaison de portions d'ADN analogues. L'interaction entre brins analogues conduit à deux recombinaisons : recombinaison de manière parallèle ou antiparallèle, conduisant à des structures dites en H ou X respectivement. L.Shlyakhtenko et al. [16]

problématiques dans la communauté du champ proche. En effet, le contraste vertical observé sur des molécules d'ADN est très nettement en dessous de la valeur attendue de 2,34 nm (conformation B). Différents groupes rapportent des valeurs de hauteur allant de 0,28 à 1,7 nm [17, 18]. Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer ces écarts à la valeur théorique :

- Une dissipation différente entre l'objet biologique et le substrat, lorsque la pointe oscillante passe de l'un à l'autre [19],
- Une déformation mécanique liée à l'action (indentation) de la pointe sur un matériau mou [21],
- Une adhésion de la molécule au substrat [22],
- L'effet de l'humidité et de la déshydratation de la molécule d'ADN [20],
- La présence d'une couche de contaminant entourant la molécule [24].

On peut remarquer que les deux premiers éléments mentionnés ci-dessus, ne sont pas évaluables séparément, ce qui rend difficile l'analyse de leur impact de manière individualisée. Un grand nombre de groupes de recherche travaillent encore actuellement à la mise en évidence de l'origine de ces artéfacts de mesures de hauteur sur des matériaux mous. Plusieurs expériences, dont les paramètres mentionnées ci-dessus sont contrôlés avec précision, ont été publiées et concluent sur un effet dominant de l'une ces contributions.

Les premières études se sont concentrées sur les problèmes de déformation d'échantillons mous par indentation mécanique de la pointe. Une étude portant sur ce sujet est celle de Pignataro *et al.* [21], qui s'intéressent à l'influence du mode d'imagerie sur les mesures de hauteur d'objets biologiques. Pour ce faire, ils analysent un réseau de molécules d'ADN déposées sur du mica dans les différents régimes du mode dynamique en amplitude, soit les régimes "attractif" et "répulsif", et comparent les images ainsi obtenues.

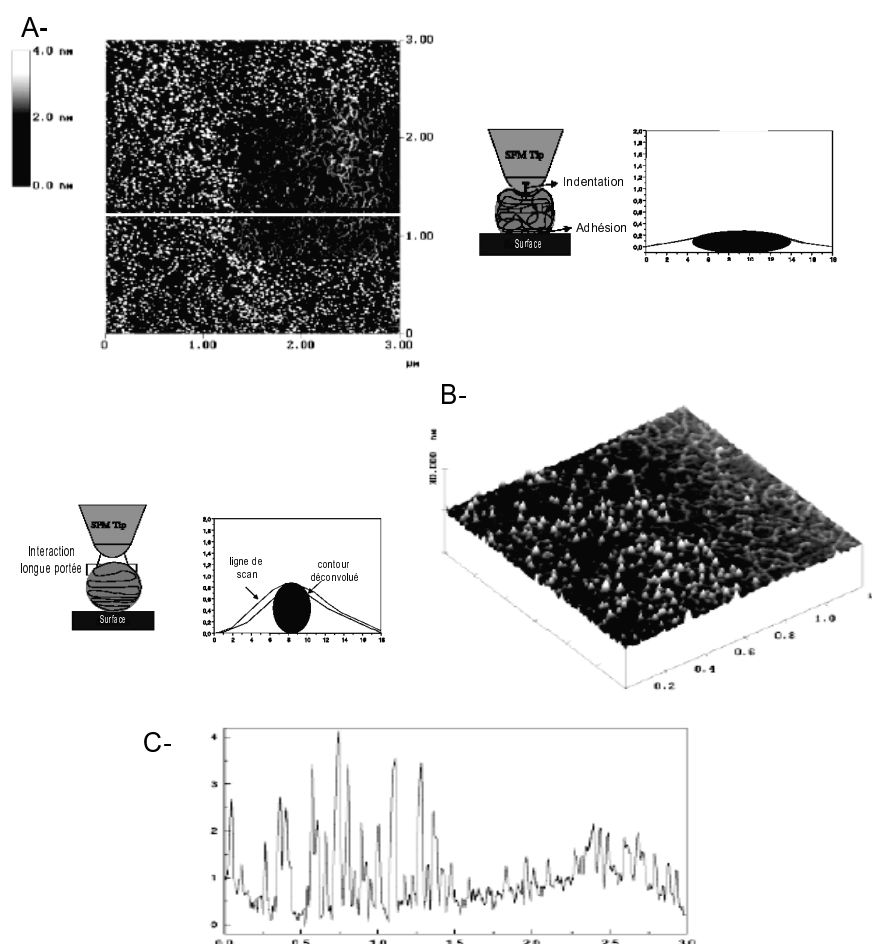


FIG.3.3 – Déformations moléculaires résultant de conditions d'imagerie en mode dynamique répulsif. A- image en régime attractif après une image réalisée en régime répulsif (la fenêtre du scan précédent apparaît à droite de l'image), B- visualisation à 3 dimensions de la frontière entre zone endommagée et zone non-endommagée. C- Coupe en hauteur sur image A. B. (Pignataro *et al.* [21]).

Ainsi, après imagerie en régime répulsif, ils observent que le réseau d'ADN a subi des déformations irréversibles, aisément identifiables en régime attractif (carré situé à droite de l'image sur les figures 3.4-A et -B). Dans cette région, la coupe de la figure 3.4-C montre que les différences de hauteur mesurées sur l'échantillon sont bien inférieures à celles observées dans la zone imagée uniquement en régime attractif, passant de $2.(\pm 0,5)$ nm à $0,75.(\pm 0,25)$ nm. Cette expérience met

donc en évidence que dans des conditions de régime répulsif dominant en mode dynamique, la pointe est suffisamment longtemps en contact avec la surface pour lui communiquer de l'énergie et ainsi induire des déformations irréversibles sur la surface. Les molécules d'ADN sont donc écrasées sur la surface, elles apparaissent ainsi plus larges et moins hautes. Donc, pour obtenir des images AFM définissant l'ADN avec précision, il semble donc important que les conditions expérimentales soient contrôlées avec précision de manière à se placer en régime attractif pour limiter le contact de la pointe avec l'échantillon.

Outre l'indentation de la pointe dans l'échantillon, on peut s'intéresser à l'interaction de l'ADN avec son substrat. Il s'agit ici de justifier l'écart en hauteur par le fait que la molécule d'ADN est déformée par son interaction avec le substrat. Elle apparaît très souvent aplatie sur la surface et présente alors une hauteur inférieure à la valeur théorique. Pour mettre en évidence cet effet, le groupe de J. Vesenka [22] propose de comparer la morphologie observée par AFM pour des duplexes et des quadruplexes d'ADN déposés sur du mica, qui présentent des hauteurs théoriques quasiment identiques, mais des structures internes différentes. On précise que les quadruplexes sont des structures rassemblant quatre brins de séquence identique, généralement (polyG)₄.

Ils mesurent sur leurs images une hauteur de 0,5 nm pour les duplexes, ce qui correspond approximativement à 25% de la hauteur attendue, tandis que les quadruplexes présentent une hauteur de 2 nm proche de la valeur référencée. Ils proposent de reformuler le problème en terme d'interaction de la molécule d'ADN avec son substrat. En effet, le traitement cationique utilisé pour la fixation de l'ADN sur des substrats de mica génèrent des ponts cationiques entre la structure sucrophosphate et la surface de mica traitée. Si la contrainte exercée par ces ponts est importante, la molécule peut alors se déformer pour venir se plaquer sur la surface, il s'en suit une réduction de sa hauteur. Ainsi, cette expérience démontre qu'une partie des artéfacts de mesure observés au cours d'étude sur les objets biologiques trouve son origine dans la fixation de la molécule à son substrat.

Un troisième axe de recherche consiste à analyser l'influence d'une couche de contaminant de surface sur les mesures de hauteur. Un des premiers effets mis en évidence concerne l'influence du taux d'humidité. Une étude assez complète a été conduite par X. Ji *et al.* [23]. Ils montrent que la hauteur apparente des brins imagés en mode oscillant varie de manière quadratique avec le taux d'humidité. Il constate que plus le taux d'humidité est élevé, plus la hauteur de la molécule est faible. Or, ce résultat va à l'encontre des interprétations mentionnant une transition entre deux conformations. En effet, plus le taux d'humidité augmente dans l'environnement de la molécule, plus la conformation B est favorable. La hauteur de la molécule devrait donc être proche de la

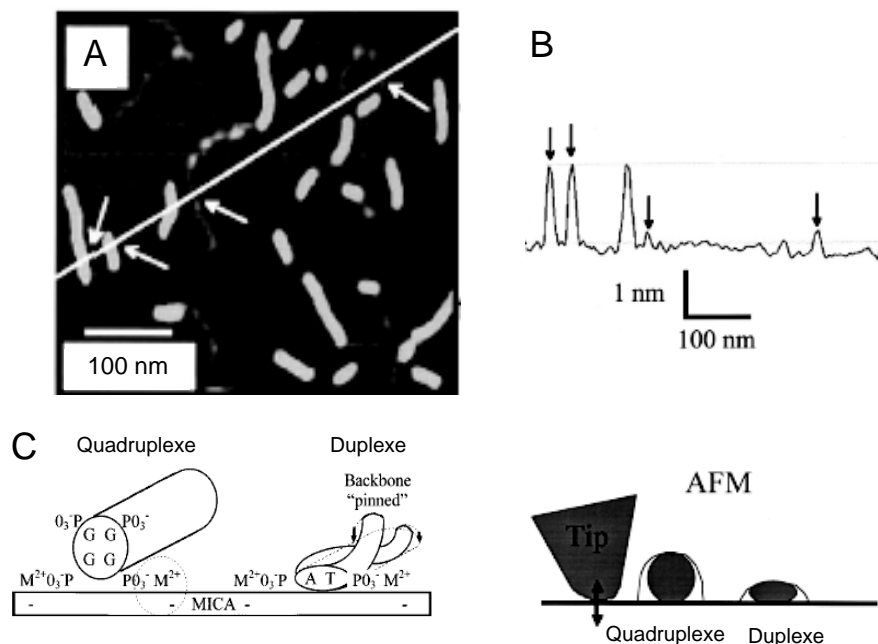


FIG.3.4 – A-Image de duplexes et quadruplexes obtenus à l'air, adsorbés sur du mica. B- Section correspondante (fig A) sur duplexe et quadruplexe. Les flèches indiquent les hauteurs sur les quadruplexes et duplexes intersectés. On remarque que la hauteur du duplexe représente 25% de la hauteur du quadruplexe. C- Schéma d'interprétation par une déformation plus importante des duplexes que des quadruplexes. Muir et al. [22]

valeur attendue. Aussi, interprètent-ils cette diminution de contraste vertical par la limitation imposée par la couche d'eau contaminatrice apparaissant pour des taux d'humidité supérieurs à 40 %.

L'influence d'une couche de contaminant sur les mesures de hauteur effectués dans les conditions ambiantes a été rediscutée par le groupe de Barò [24] dans un article entièrement dédié à ce problème. Ils étudient un système de brins d'ADN déposés sur du mica. Leur étude se concentre autour d'un trou (voir figure 3.5-A) dans la couche de contaminant. Ils constatent que les molécules d'ADN dans le trou présentent une hauteur de $1,5 \pm 0,2$ nm (figure 3.5-B), alors que celle entourée par la couche de contaminant ne mesure que $0,7 \pm 0,2$ nm d'épaisseur. La couche contaminante possédant une épaisseur de $0,8 \pm 0,2$ nm (figure 3.5-C), il constate que la réduction de hauteur de la molécule d'ADN correspond à l'épaisseur de la couche entourant la molécule.

3.1.4 Analyses fonctionnelles de l'ADN par AFM

Par ailleurs, le champ des études AFM sur ADN ne s'est pas limité à des analyses de structure. Un grand nombre de groupes de recherche ont rapidement ouvert l'analyse par AFM au champ

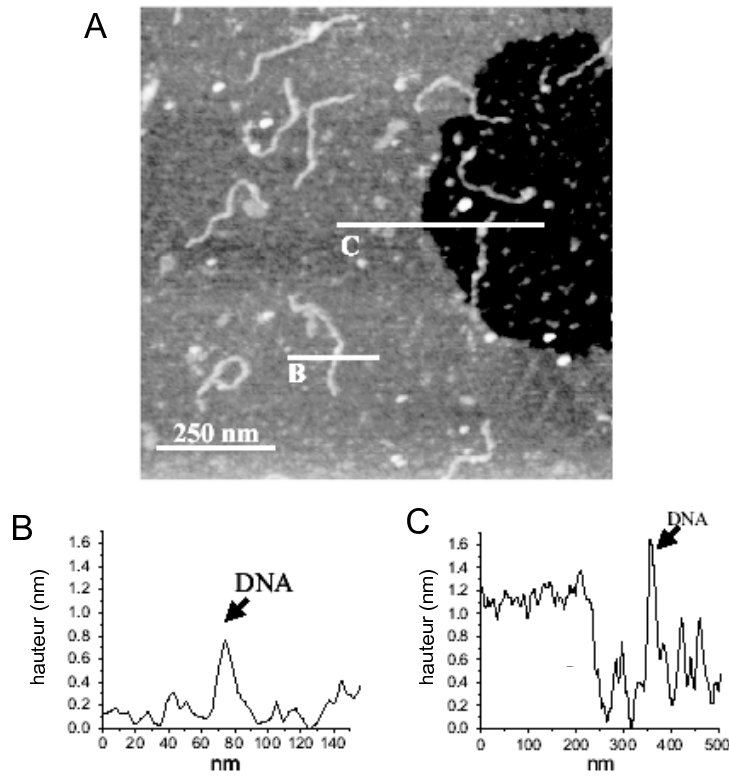


FIG.3.5 – A- Image AFM obtenue en non contact à l'air sur de l'ADN déposé sur mica. Les molécules semblent être entourées d'une couche de sel, clairement identifiable par le trou visible sur la partie droite de l'image. Deux coupes ont été réalisées sur cette image, B- renseigne sur la hauteur des molécules emprisonnées dans la couche de sel, C- permet d'évaluer la hauteur des molécules en dehors de la couche de sel ainsi que celle de la couche de sel. F. Moreno-Herrero et al. [24]

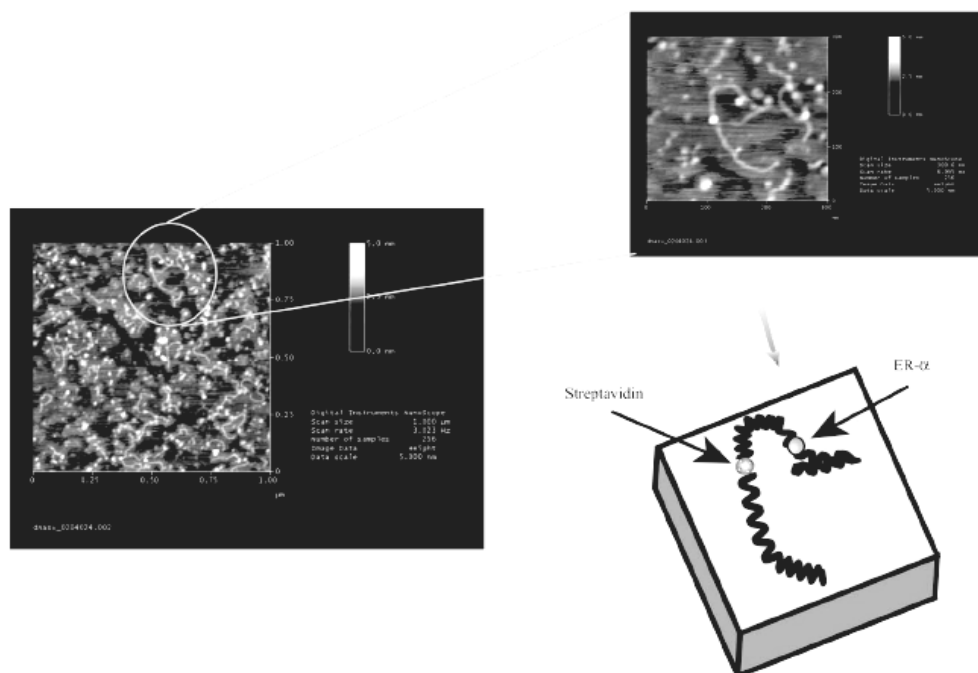


FIG.3.6 – Wicaksono *et al.* utilisent la Streptavidine comme marqueur de position sur un brin d'ADN, afin de connaître le site d'ancrage de la protéine ER- α en mesurant la distance relative entre la Streptavidine et la protéine ER- α [28]

des études fonctionnelles des molécules biologiques à l'échelle de la molécule [25–28]. En effet, la possibilité de travailler en milieu liquide confère à l'AFM une configuration très favorable pour suivre les processus biologiques dans un milieu proche de leur environnement naturel. A titre d'exemple, on peut citer des études concernant la dégradation de l'ADN par l'enzyme DNase I [25], l'observation de la transcription de l'ADN par l'ARN polymérase [26], mais aussi la localisation des sites d'ancrage de protéines sur l'ADN [27, 28], voir figure 3.6.

Deux revues détaillées ont récemment été publiées par N. C. Santos [29] et L. Tiefenauer [30] sur les applications de l'AFM au domaine de la biologie et en particulier à l'ADN.

3.2 Application de l'AFM aux puces à ADN

Les études de molécules d'ADN isolées supportées couvrent un vaste domaine de la littérature. En revanche, les études conduites autour de systèmes plus denses en molécules et en particulier sur des systèmes de brins immobilisés voisins des puces à ADN sont assez rares. Pour ces études, la voie morphologique se présente donc comme une possibilité mais ce n'est pas l'unique ! La spécificité de la reconnaissance entre deux brins d'ADN constitue un système idéal pour effectuer une caractérisation en CFM (Chemical Force Macroscopy). Par ailleurs, la modification de la

charge de surface de la molécule d'ADN entre son état de simple brin et son état de double brin offre un système favorable à l'étude par mesure de forces.

3.2.1 Etude par mesures chimiques

On a vu dans le chapitre 1 que l'AFM pouvait être utilisée pour sonder entre la pointe et la surface les mécanismes de reconnaissance moléculaire. Ce procédé, généralement appelé CFM (Chemical Force Microscopy), nécessite la fonctionnalisation de la pointe avec un "récepteur" susceptible d'interagir spécifiquement avec les molécules de la surface. Dans ce cas, la force d'interaction entre la pointe et la surface est utilisée pour amplifier le contraste et mettre en évidence les différences chimiques présentes sur la surface.

L. Mazzola *et al.* [31] utilisent le principe de reconnaissance spécifique de deux monobrans d'ADN complémentaires pour identifier par CFM les zones de la surface possédant les monobrans d'ADN complémentaires de monobrans fixés à la pointe. Ainsi, une pointe standard, modifiée avec une bille de latex, puis fonctionnalisée avec des brins de séquence : $3'$ -CAG-TTC-TAC-GAT-GGC-AAGTC, présente une grande affinité avec les zones de la surface possédant les sondes de séquence complémentaire : $5'$ -GTC-AAG-ATG-CTA-CCG-TTCAG, et une affinité plus faible pour les autres zones comportant des séquences non complémentaires au brin fixé sur la pointe.

Ils observent une force de friction importante liée à l'appariement partiel des deux brins complémentaires, cette force de friction étant bien inférieure sur les zones de la surface ne présentant pas les sondes complémentaires des brins fixés à la pointe. Ils obtiennent ainsi des images d'un réseau de monobrans d'ADN en contraste de force latérale (voir figure 3.7), différenciant nettement les zones présentant les monobrans complémentaires à la pointe des autres régions de la puce.

3.2.2 Etude par mesure des variations du potentiel d'interaction pointe-surface

Une autre voie possible, "non morphologique", consiste à analyser les variations de la densité de charge de surface par mesure des forces électrostatiques entre la pointe et la surface. Cette approche a été utilisée par J. Wang *et al.* [32] pour étudier les processus d'immobilisation et d'hybridation de manière indirecte. Ils procèdent à l'immobilisation de molécules d'ADN simple et double brins sur un substrat d'or préalablement traité avec une solution contenant des ions aluminium(III). L'immobilisation des molécules d'ADN s'effectue par l'affinité ionique des groupements phosphates du squelette de l'ADN avec les ions Al^{3+} de la surface.

La détection de l'état d'hybridation des molécules s'effectue par mesure de la force de répulsion électrostatique entre une pointe modifiée avec une bille de silice, chargée négativement, et les

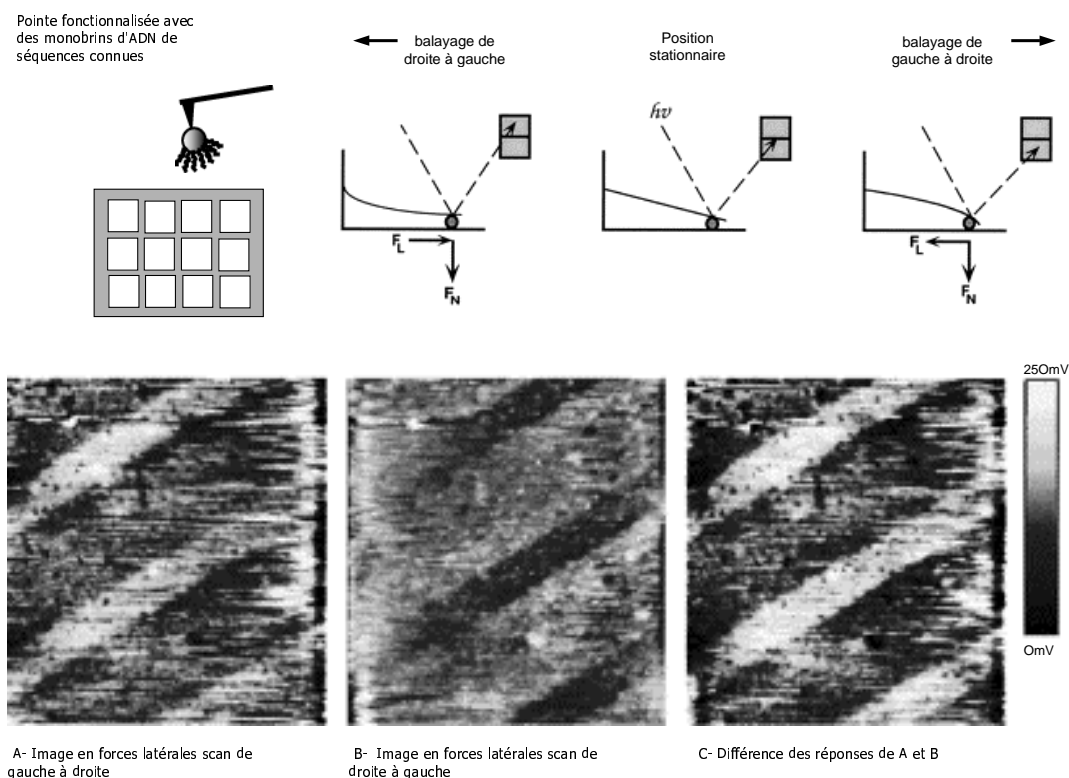


FIG.3.7 – Images en forces latérales d'un damier de monobrins d'ADN réalisées avec une pointe fonctionnalisée avec un monobrin d'ADN complémentaire à certaines zones du damier. Les images sont acquises dans les deux sens de balayage et soustraites afin d'augmenter le contraste en forces latérales. (Mazzola et al. [31]).

charges négatives que portent les groupements phosphates présents en surface. Les mesures de forces conduites en AFM montrent une importante augmentation de la force répulsive pour des substrats présentant des molécules d'ADN hybridées. Cette force répulsive (électrostatique) est due à l'augmentation de la charge négative sur la surface, correspondant à l'augmentation du nombre de groupements phosphates après hybridation, comme montré figure 3.8.

3.2.3 Etudes morphologiques

Un second axe de recherche développé pour la caractérisation par AFM de puces à ADN consiste à analyser les différences morphologiques entre les couches successives élaborées au cours de la réalisation de puces. Cette voie bien qu'assez conventionnelle, n'a donné lieu que récemment à des publications.

Les protocoles de préparation des biopuces étant très divers (voir chapitre 2), il en résulte de grandes disparités en terme d'organisation de couches étudiées, de leur rugosité, en fonction

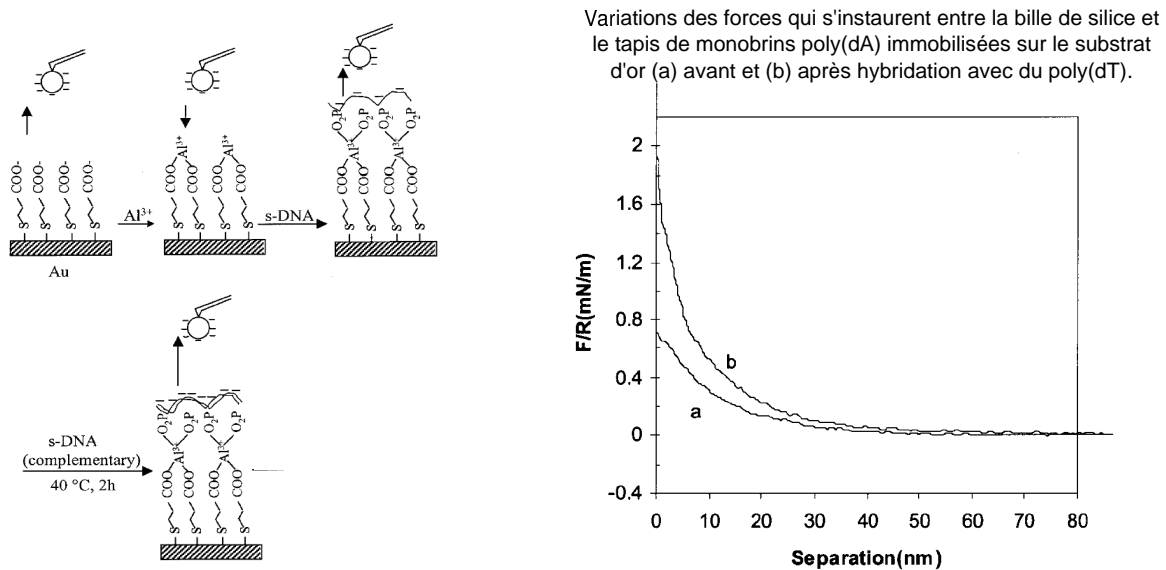


FIG.3.8 – Identification par mesure de forces de la présence de brins simples ou hybridés sur une surface. La répulsion électrostatique augmente quand les molécules sont hybridées induisant une densité surfacique de charge négative plus importante sur la surface (Wang *et al.* [32]).

des voies utilisées pour la synthèse. De manière générale, les procédés de préparation des puces nécessitent une fonctionnalisation du substrat. La synthèse s'effectue donc en plusieurs étapes. Compte tenu de la complexité de la préparation de ces systèmes, les études morphologiques par AFM proposent une caractérisation de chacune des étapes impliquées dans leur préparation.

En 2001, Ralf Lenig *et al.* [33] publie la première étude morphologique de puces à ADN, du substrat à l'immobilisation et procèdent également à un test d'hybridation. Les puces étudiées sont réalisées sur des substrats de silicium. Les monobrins sondes sont immobilisés de manière covalente par établissement d'une liaison disulfide entre les molécules de silanes MPTS de la couche d'accrochage et une fonction thiolée placée sur la terminaison 5' des monobrins d'ADN.

Dans cette étude, ils corroborent les analyses AFM à des analyses ellipsométriques, ou menées par XPS ou par mesure d'angle de contact. Les mesures d'ellipsométrie effectuées sur la couche de MPTS donnent une épaisseur ($h_{\text{moy}} \sim 3,88$ nm) nettement supérieure à celle de la monocouche. Ils en déduisent que les molécules de MPTS ont très certainement polymérisé au cours du dépôt de la couche d'accrochage. La rugosité de cette couche, bien que n'étant pas donnée, peut être supposée comme relativement importante (quelques nm). En ce qui concerne l'immobilisation des sondes, la couche formée par les sondes apparaît peu dense, et présente des motifs réguliers suggérant un certain arrangement entre molécules-sondes. Les modèles d'ellipsométrie n'étant pas bien adaptés à de très faibles quantités de matière (monocouche incomplète) l'estimation de l'épaisseur de la

couche d'oligonucléotides sondes par ellipsométrie reste difficile à réaliser.

L'interprétation des images AFM est rendue délicate par l'absence d'échelle verticale correspondant au niveau de gris des images. Ralf Lenigk *et al.* [33] analysent, dans leur article, la surface des îlots observés pour les sondes comparativement à la surface de îlots allongés observés après hybridation (voir images 3.9 -c et -d). Ils mesurent 250 nm^2 pour les objets observés à l'étape de l'immobilisation et 1500 nm^2 après hybridation qu'ils identifient comme étant des structures liées à la présence de molécules hybridées.

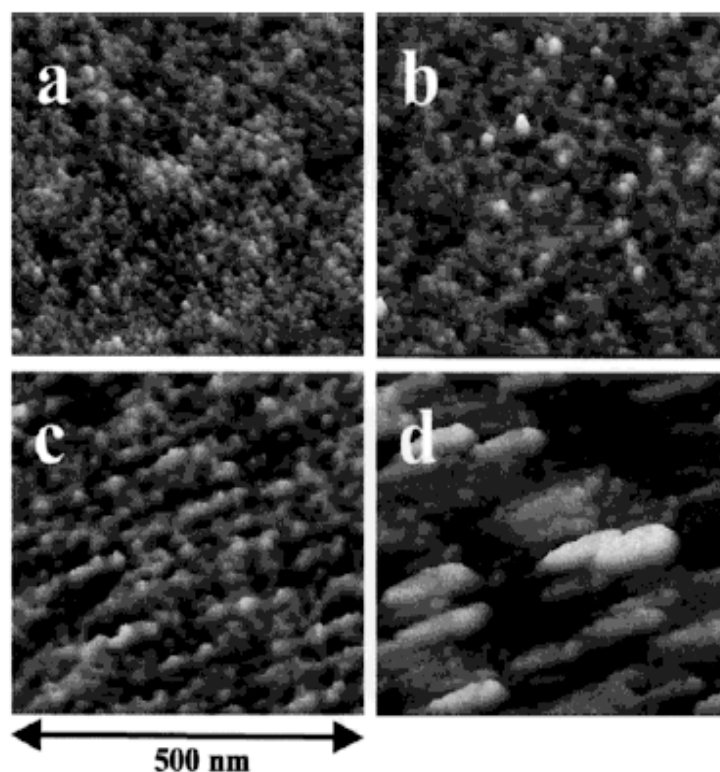


FIG.3.9 – Etude de différentes étapes de préparation d'une puce à ADN sur substrat de silicium. (a) Silice rehydroxylée, (b) couche autoassemblée de MPTS, (c) oligonucléotides sondes immobilisés sur la couche de silane, (d) surface de la puce après hybridation de cibles complémentaires. (R. Lenick *et al.* [33]).

Comme le mentionnent les auteurs, dans leur étude, l'importante rugosité des couches déposées constitue un facteur extrêmement limitant pour la précision de mesures par AFM et ellipsométrie. Cet aspect sera pris en compte tout au long de notre étude. Les protocoles sélectionnés pour chacune des étapes de préparation des puces à ADN seront ceux conduisant à des couches de plus faible rugosité possible.

Cette condition a d'ailleurs été reprise un peu plus tard par le groupe de T. Tätté, qui publie en 2003 des résultats concernant un protocole de préparation permettant d'élaborer des couches lisses

en vue de l'immobilisation de biomolécules [34]. Dans leur protocole, ils élaborent la couche d'accrochage par silanisation avec du 3-aminopropyltriméthoxysilane polymérisé linéairement (APTMS-LPS), par la méthode des sols-gels, sur laquelle ils procèdent ensuite à l'immobilisation de monobrin d'ADN de 25 bases de long. L'analyse AFM (figure 3.10) montre que la couche d'accrochage de APTMS -LPS réalisée par sol-gel est parfaitement lisse. Ils précisent que la rugosité mesurée sur ces surfaces est en dessous du niveau de résolution de l'AFM commercial utilisé. Après immobilisation d'oligonucléotides, une morphologie granulaire apparaît, identifiée comme représentatives des sondes immobilisées.

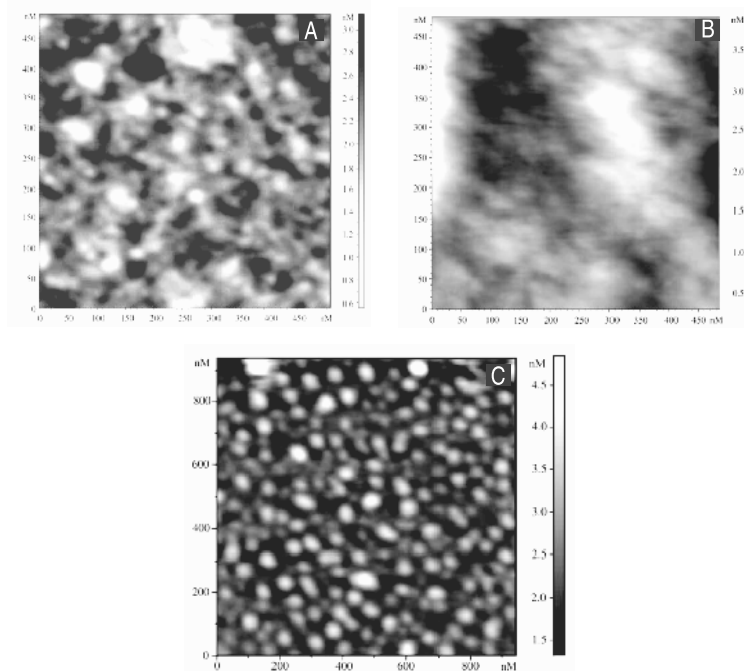


FIG.3.10 – Image AFM des différentes étapes de préparation pour l'immobilisation de monobrin sondes de 25 bases de long. A- le substrat de mica hydroxylée, B- couche d'APTMS-LPS élaborée par gel après nettoyage, C- sondes de 25 bases immobilisées sur la couche de APTMS-LPS (T. Tätté *et al.* [34]).

Une troisième étude dans ce registre a été publiée en 2003 par E. Casero *et al.* [35]. Ils étudient en microscopie à force atomique l'immobilisation et l'hybridation d'oligonucléotides sur un substrat d'or, suivant un procédé classique. Ils adsorbent des monobrin d'ADN présentant une terminaison fonctionnelle thiolée sur un substrat d'or. Les brins sélectionnés dans cette étude sont des brins "modèles" : (HS-polyA). Ils opèrent ensuite l'hybridation avec une solution de monobrin (polyT) et observent des changements de morphologies à chacune des étapes du dépôt. Ainsi, la couche de sondes polyA immobilisée sur la face cristalline (1,1,1) de l'or, apparaît texturée et se démarque ainsi nettement de la morphologie de la surface d'or. Ils mesurent une périodicité de 20

nm, dans les motifs observés sur la couche immobilisée. Après hybridation de brins polyT, la morphologie de couche se lisse, conduisant à une augmentation de la largeur des structures observées atteignant les 50 nm. (voir figure 3.11).

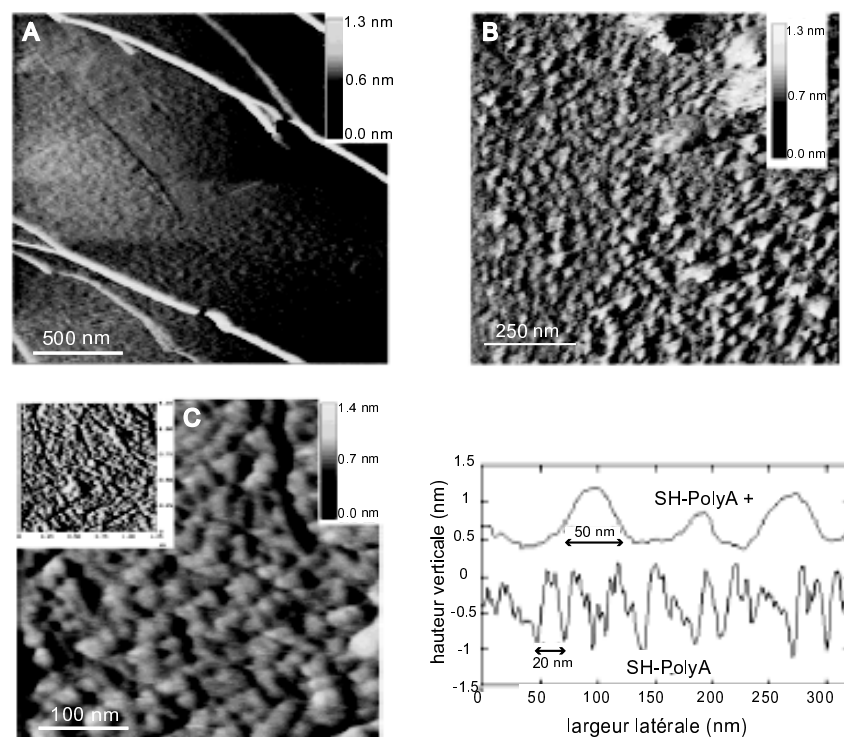


FIG.3.11 – Image AFM des oligonucléotides (polyA) adsorbés sur un substrat d’or -A-, avant -B- et après -C- hybridation avec des (polyT) (E. Casero et al. [35]).

L’ensemble de ces études reposent sur une comparaison de la morphologie des couches obtenues à chacune des étapes de préparation, du substrat à l’hybridation en passant par l’immobilisation des sondes. Ces résultats restent cependant qualitatifs, et dans les trois études rapportées ci-dessus, la résolution atteinte n’est pas suffisante pour permettre une quantification du nombre de molécules immobilisées ou hybridées.

Dans le but de permettre une quantification de la densité de molécules immobilisées, une solution consiste à utiliser des marqueurs aisément détectables topographiquement en microscopie à force atomique. Cette idée a conduit A. Czàki *et al.* [36] à utiliser des brins d’ADN préalablement marqués avec des nanoparticules d’or de 30 nanomètres de diamètre. Ces nanoparticules, compte tenu de leur taille ”importante”, permettent d’accéder à une résolution latérale sans équivoque.

Dans cette publication, le système de séquences retenues comporte un seul type de molécules sondes de séquence : $5'GGG-CGG-CGA-CCT3'-(CH_2)_6-HS$, et deux types de molécules cibles :

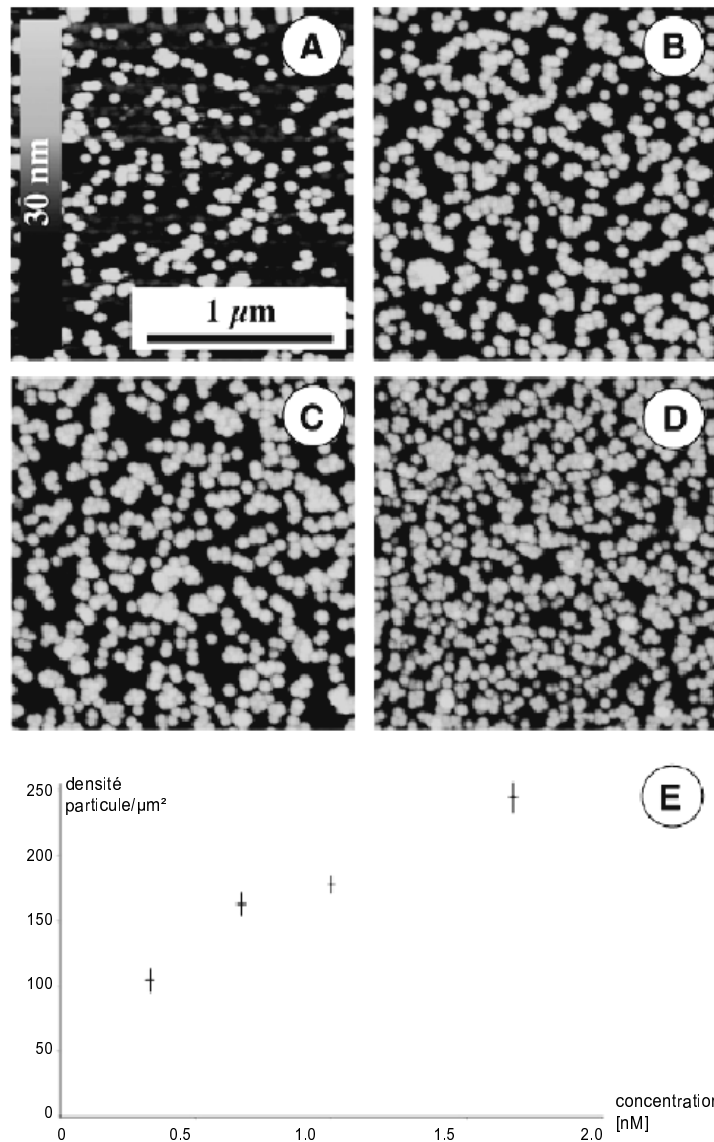


FIG.3.12 – Quantification de l'hybridation de monobrins d'ADN cibles modifiés avec des nanoparticules d'or pour différentes concentrations de molécules cibles dans les solutions d'hybridation, A- 1M, B- 2M, C- 3M et D- 5M. Le graphique E présente l'évolution de la concentration en molécules hybridées, détectées par comptage des nanoparticules d'or, par rapport à la concentration en molécules cibles dans la solution d'hybridation (A. Czàki et al. [36]).

la séquence $5' \text{AGG-TCG-CCG-CCC}^{3'}-(\text{CH}_2)_6\text{-S-nanoparticule}$, complémentaires à la sonde et $5' \text{TGC-TTT-TAT-CGG-GCG-GAA-TG}^{3'}-(\text{CH}_2)_6\text{-S-nanoparticule}$ jouant le rôle de cible non-complémentaire. On remarquera que les séquences choisies ici sont relativement courtes (entre 12 et 20 bases) ce qui rend quasiment impossible la résolution par AFM de ces molécules sans marquage préalable.

En reprenant le principe d'une analyse étape par étape, ils mettent en évidence chacun des

brins par la détection de la bille d'or qui leur est accolée, et obtiennent ainsi par comptage des billes la densité de surface en brins immobilisés ou hybridés. On remarquera que l'extension spatiale des billes limitera cette voie d'investigation aux systèmes comportant de faible densité en molécules immobilisées. Ils peuvent ainsi suivre l'évolution du nombre de molécules hybridées en fonction de la concentration en brins de la solution d'hybridation, jusqu'à atteindre une densité maximale de 250 particules/ μm^2 . (voir figure-3.12). Cette étude rend compte de la possibilité de qualifier la qualité des dépôts dans les processus d'immobilisation et de quantifier les processus d'hybridation.

Conclusions

Dans ce chapitre, on a vu que les études AFM sur les brins d'ADN isolés supportés sur substrat constituaient un vaste champ d'investigation allant de l'étude des conformations de la molécule à l'analyse fonctionnelle d'un brin d'ADN impliqué dans un processus biologique. Les études présentées ont mis en évidence la difficulté d'accéder à une topographie exacte de ces molécules, en particulier pour la mesure de leur hauteur (ou diamètre). Plusieurs paramètres ont été discutés pour tenter de justifier les écarts observés entre les mesures expérimentales et les valeurs théoriques attendues. Il a été montré que les conditions de fonctionnement en mode oscillant (régime attractif ou répulsif) jouent un rôle déterminant. Par ailleurs, l'interaction de la molécule avec son substrat peut conduire à un aplatissement de la molécule d'ADN, réduisant par conséquent son épaisseur. Enfin, un troisième élément à considérer est la présence d'une couche de contaminant, qui contribue à réduire le contraste vertical accessible à la pointe. Chacun de ces éléments joue donc un rôle fondamental dans le bon déroulement des expériences. Il sera donc nécessaire de ne pas les perdre de vue au moment de la discussion des résultats.

Jusqu'à présent les études morphologiques conduites par microscopie à force atomique sur des systèmes proches des puces à ADN ont principalement été effectuées par différenciation des couches les unes par rapport aux autres. Les études sont donc organisées autour d'une caractérisation de chacune des étapes impliquées dans la préparation des puces. Un niveau d'analyse supplémentaire a été atteint par A. Czàki *et al.*, qui ont pu quantifier la densité des molécules immobilisées ou hybridées en surface à l'aide de billes d'or préalablement fixées aux molécules d'ADN. Ces marqueurs topographiques leur permettent de s'affranchir des problèmes de résolution liés à la dilatation de la pointe avec des objets de très petite taille.

C'est dans ce cadre que se situe ce travail, qui propose une étude *topographique* de puces à ADN modèles. Cette étude a été conduite autour d'une procédure reposant sur l'analyse de chacune des étapes de préparation impliquées dans la fabrication des puces. Pour ce faire, les protocoles de préparation seront adaptés en fonction des contraintes imposées par l'analyse en microscopie à force atomique comme la nécessité de travailler avec une rugosité de surface la plus faible possible.

Bibliographie

- [1] S. M. Lindsay, T. Thundat, L.A. Nagahra, U. Knipping and R. Rill, *Science*, 244, p.1063, 1989.
- [2] B. Drake, C. B. Prater, A. L. Weisnhorn, S. A. C. Gould, T. R. Albrecht, C. F. Quate, D. S. Cannell, H. G. Hansma and P. K. Hansma, *Science*, 243, p.1586, 1989.
- [3] C. Bustamante, J. Vesenka, C. L. Tang, W. Rees, M. Guthold, and R. Keller, Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy, *Biochemistry*, 31, p.22, 1992.
- [4] T. Thundat, R. J. Warmack, D. P. Allison, L. A. Bottomley, A. J. Lourenco, and T. L. Ferrell, Atomic force microscopy of deoxyribonucleic acid strands adsorbed on mica : The effect of humidity on apparent width and image contrast, *J. Vac. Technol. A*, 10, p.630, 1992.
- [5] K. Yoshida, M. Yoshimoto, K. Sasaki, T. Ohnishi, T. Ushiki, J. Hitomi, S. Yamamoto, and M. Sigeno, Fabrication of a New Substrate for Atomic Force Microscopic Observation of DNA Molecules from an Ultrasoath Sapphire Plate, *Appl. Surf. Science*, 188, p.474, 2002.
- [6] T. Arai, M. Tomitori, M. Saito and E. Tamiya, DNA molecules sticking on a vicinal Si(111) surface observed by noncontact atomic force microscopy, *Biophys. J.*, 74, p.1654, 1998.
- [7] C. Rivetti and S. Codeluppi, Accurate length determination of DNA molecules visualized by atomic force microscopy : evidence for a partial B- to A-form transition on mica, *Ultramicroscopy*, 87, p.55, 2001.
- [8] H. Freeman, in : B.S. Lipkin, A. Rosenfeld (Eds.), Picture Processing and Psychopictorics, *Academic Press, New York*, p.241, 1970.
- [9] Z. Kupla, *Computer Graphics Image Process.*, 6, p.434, 1977.

- [10] C. Rivetti, M. Guthold and C. Bustamante, Scanning Force Microscopy of DNA Deposited onto Mica : Equilibration versus Kinetic Trapping Studied by Statistical Polymer Chain Analysis, *J. Mol. Biol.*, 264, p.919, 1996.
- [11] V. Ph. Pastushenko, R. Kaderabek, M. Sip, C. Borcken, F. Kienberger, P. Hinterdorfer, Reconstruction of DNA Shape from AFM Data, *Single Molecules*, 3, p.111, 2002.
- [12] J. Zheng, Z. Li, A. Wu and H. Zhou, AFM studies of DNA structures on mica in the presence of alkaline earth metal ions, *Biophysical Chemistry*, 104, p.37, 2003.
- [13] L. S. Shlyakhtenko, A. A. Gall, A. Filonov, Z. Cerovac, A. Lushnikov and Y. L. Lyubchenko, Silatrane-based surface chemistry for immobilization of DNA, protein-DNA complexes and other biological materials, *Ultramicroscopy*, 97, p.279, 2003.
- [14] O. Medalia, J. Englander, R. Guckenberger and J. Sperling AFM imaging in solution of protein - DNA complexes formed on DNA anchored to a gold surface, *Ultramicroscopy*, 90, p.103, 2002.
- [15] E. A. Oussatcheva, L. S. Shlyakhtenko, R. Glass, R. R. Sinden, Y. L. Lyubchenko and V. N. Potaman, Structure of branched DNA molecules : gel retardation and atomic force microscopy studies, *J.Mol.Biol.*, 292, p.75, 1999.
- [16] L. S. Shlyakhtenko, V. N. Potaman, R. R. Sinden and Y. L. Lyubchenko, Structure and dynamics of supercoil-stabilized DNA cruciforms, *J.Mol.Biol.*, 280, p.61, 1998.
- [17] Y. L. Lyubchenko, P. I. Oden, D. Lampner, S. M. Lindsay, and K. A. Dunker, Atomic force microscopy of DNA and bacteriophage in air, water and propanol : the role of adhesion forces, *Nucleic Acids Res.*, 21, p.1117, 1993.
- [18] H. G. Hansma, R. Golan, W. Hsieh, C. P. Lollo, P. Mullen-Ley, and D. Kwoh, DNA condensation for gene therapy as monitored by atomic force microscopy, *Nucleic Acids Res.*, 26, p.2481, 1998.
- [19] A. P. Quist, L. P. Bjorck, C. T. Reimann, S. O. Oscarsson and B. U. R. Sundqvist, A scanning force microscopy study of human serum albumin and porcine pancreas trypsin adsorption on mica surfaces, *Surf.Sci.*, 325, p.L406, 1995.
- [20] C. Bustamante, J. Vesenka, C. L. Tang, W. Rees, M. Guthold and R. Keller, Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy, *Biochemistry*, 31, p. 22, 1992.

- [21] B. Pignataro, L. Chi, S. Gao, B. Anczykowski, C. Niemeyer, M. Adler, H. Fuchs, Dynamic scanning force microscopy study of self-assembled DNA-protein nanostructures, *Applied Physics A*, 74, p.447, 2002.
- [22] T. Muir, E. Morales, J. Root, I. Kumar, B. Garcia, C. Vellandi, D. Jenigian, T. Marsh, E. Henderson, and J. Vesenka, The morphology of duplex and quadruplex DNA on mica, *J.Vac.Sci.Technol.A*, 16(3), p.1172, 1998.
- [23] X. Ji, J. Oh, A. K. Dunker and K. W. Hipps, Effects of relative humidity and applied force on atomic force microscopy images of the filamentous phage fd, *Ultramicroscopy*, 72, p.165, 1998.
- [24] F. Moreno-Herrero, J. Colchero and A. M. Barò, DNA height in scanning force microscopy, *Ultramicroscopy*, 96, p.167, 2003.
- [25] M. Bezanilla, B. Drake, E. Nudler, M. Kashlev, P. K. Hansma and H. G. Hansma, Motion and enzymatic degradation of DNA in the atomic force microscope, *Biophys. J.*, 67, p.2454, 1994.
- [26] S. Kasas, N. H. Thomson, B. L. Smith, H. G. Hansma, X. Zhu, M. Guthold, C. Bustamante, E. T. Kool, M. Kashlev and P. K. Hansma, Escherichia coli RNA Polymerase Activity Observed Using Atomic Force Microscopy, *Biochemistry*, 36, p.461, 1997.
- [27] S. D. Jett, D. I. Cherny, V. Subramaniam and T. M. Jovin, Scanning force microscopy of the complexes of p53 core domain with supercoiled DNA1, *J. Mol. Biol.*, 299, p.585, 2000.
- [28] D. H. B. Wicaksono, T. Ebihara, H. Funabashi, M. Mie, Y. Yanagida, M. Aizawa and E. Kobatake, On-chip biosensing of estrogen receptor- α at single molecular level, *Biosensors and Bioelectronics*, in press, 2004.
- [29] N. C. Santos and M. A. R. B. Castanho, An overview of biological applications of atomic force microscopy, *Biophys. Chem.*, 107, p.133, 2004.
- [30] L. Tiefenauer and R. Ros, Biointerface analysis on a molecular level. New tools for biosensor research, *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 23, p.95, 2002.
- [31] L. T. Mazzola, C. W. Frank, S. P. A. Fodor, C. Mosher, R. Lartius, and E. Henderson, Discrimination of DNA Hybridization Using Chemical Force Microscopy, *Biophys. J.*, 76, p.2922, 1999.

- [32] J. Wang and A. J. Bard, Monitoring DNA Immobilization and Hybridization on Surfaces by Atomic Force Microscopy Force Measurements, *Analytical Chem.*, 73, p.2210, 2001.
- [33] R. Lenigk, M. Carles, N. Y. Ip, and N. J. Sucher, Surface Characterization of a Silicon-Chip-Based DNA Microarray, *Langmuir*, 17(8), p.2499, 2001.
- [34] T. Tätte, K. Saal, I. Kink, A. Kurg, R. Löhmus, U. Mäeorg, M. Rahi, A. Rinke, A. Löhmus, Preparation of smooth siloxane surface for AFM visualisation of immobilized biomolecules, *Surface Science*, 532-535, p.1085, 2003.
- [35] E. Casero, M. Darder, D. J. Diaz, F. Pariente, J. A. Martin-Garo, H. Abruna and A. Lorenzo, XPS and AFM Characterization of Oligonucleotides Immobilized on Gold Substrates, *Langmuir*, 19, p.6230, 2003.
- [36] A. Czàki and R. Müller and W. Straube and J.M. Köhler and W. Fritzsche, DNA monolayer on gold substrates characterized by nanoparticle labeling and scanning force microscopy, *Nucleic Acids Research*, 16, p.e81, 2001.

Chapitre 4

Etudes expérimentales de la préparation des puces à ADN par AFM

La revue bibliographique du chapitre 2 a montré que les puces à ADN constituent des systèmes extrêmement complexes tant par leur mode de préparation que par le grand nombre de facteurs qu'elles impliquent pour leur bon fonctionnement. Aussi, comme le mentionnent plusieurs publications [1–3] s'intéressant à la caractérisation AFM de puces à ADN ou de systèmes apparentés (voir chapitre 3), la complexité des puces à ADN suggère d'entamer notre étude par une analyse détaillée de chacune des étapes de préparation.

Dans notre cas, cette démarche présente plusieurs objectifs. Le premier point concerne l'étude de la reproductibilité des protocoles à l'échelle de l'analyse AFM, c'est à dire à l'échelle du micron et en dessous. Le second objectif consiste à sélectionner les protocoles de fonctionnalisation du substrat les plus adaptés à notre étude par microscopie à force atomique. En effet, dans le chapitre 3 nous avons vu que les brins d'ADN étaient, dans la quasi-totalité des cas, couchés sur la surface du substrat. Ainsi, afin de favoriser la détection de molécules hybridées de manière isolée, il sera crucial de sélectionner les protocoles conduisant à des couches de faible rugosité.

Par ailleurs, les systèmes de puces étudiés ne sont pas directement les systèmes développés au laboratoire en vue d'applications commerciales mais une adaptation de ceux-ci entièrement dédiés à notre étude. L'AFM ne permettant pas une lecture massive et simultanée, les puces étudiées ne possèdent donc que quelques plots, de 2 à 7, de manière à analyser un nombre limité de paramètres dans des conditions bien contrôlées. Dans le cadre de ce travail, les préparations des puces modèles ont été réalisées par Vincent Dugas.

Comme nous l'avons présenté dans la partie 2.3, les puces réalisées au laboratoire et au sein

de la société *Rosatech* impliquent à chacune des étapes de préparation une liaison covalente. La voie choisie repose sur la réalisation d'une couche d'accrochage par silanisation d'un silane monofonctionnel. La modification de la terminaison non silylée permet ensuite l'immobilisation des oligonucléotides sondes par liaison amide. La préparation des puces peut donc être schématisée en quatre étapes : la préparation du substrat, la réalisation de la couche d'accrochage par silanisation, l'activation de la fonction terminale du silane et enfin l'immobilisation des sondes. Ce chapitre sera structuré autour des différentes étapes de préparation des puces à ADN. Pour des questions de lisibilité, la description des protocoles de préparation des échantillons est incluse dans chaque section présentant une étape de préparation. L'ensemble des expériences présentées dans cette partie a été réalisé en contact intermittent à l'air. Les conditions de travail pour l'AFM sont celles décrites et sélectionnées au chapitre 1, soit $A/A^{libre}=95\%$, en régime attractif, avec $A^{libre} \in [10-15]$ nm.

4.1 Caractérisation des substrats

L'analyse des substrats constitue la première phase de notre étude. La réalisation de la couche d'accrochage par silanisation impose de sélectionner des substrats présentant des groupements Si-OH en surface. Deux solutions sont alors possibles : il s'agit du verre ou de la silice. Dans notre cas, les substrats de verre sont des lames de microscope standard et les substrats de silice sélectionnés sont des plaquettes de silicium commerciaux possédant une couche d'oxyde thermique de 120 Å d'épaisseur.

De manière à augmenter le nombre de sites d'ancrage en vue de la phase de silanisation, les substrats vont subir dans un premier temps une hydrolyse des ponts siloxanes établis entre les groupements silanols de surface. Cette hydrolyse est effectuée par immersion des substrats dans une solution de piranha ($H_2SO_4/H_2O_2, 7 : 3$) pendant 1 heure à 80°C. Elle est suivie de rinçages intensifs à l'eau ultrapure. En outre, ce traitement assure un excellent nettoyage des substrats.

Les images obtenues sur chacun de ces substrats sont reportées sur les figures 4.1 et 4.2. La surface de la silice thermique apparaît lisse et propre. On mesure une rugosité RMS (Root-Mean-Square) de 0,2 nm et une amplitude des variations de hauteur de l'ordre de $0,4 \pm 0,1$ nm, ce qui est en parfait accord avec les valeurs répertoriées dans la littérature [5]. On remarquera cependant la présence de stries aisément identifiables sur les images à grande échelle (fig. 4.1-A), attribuables au polissage de la surface. Ces stries restent visibles même après traitement piranha.

Les lames de verre présentent une morphologie de surface beaucoup plus accidentée avec des variations de hauteur supérieure au double de celles observées sur la silice. La rugosité de surface

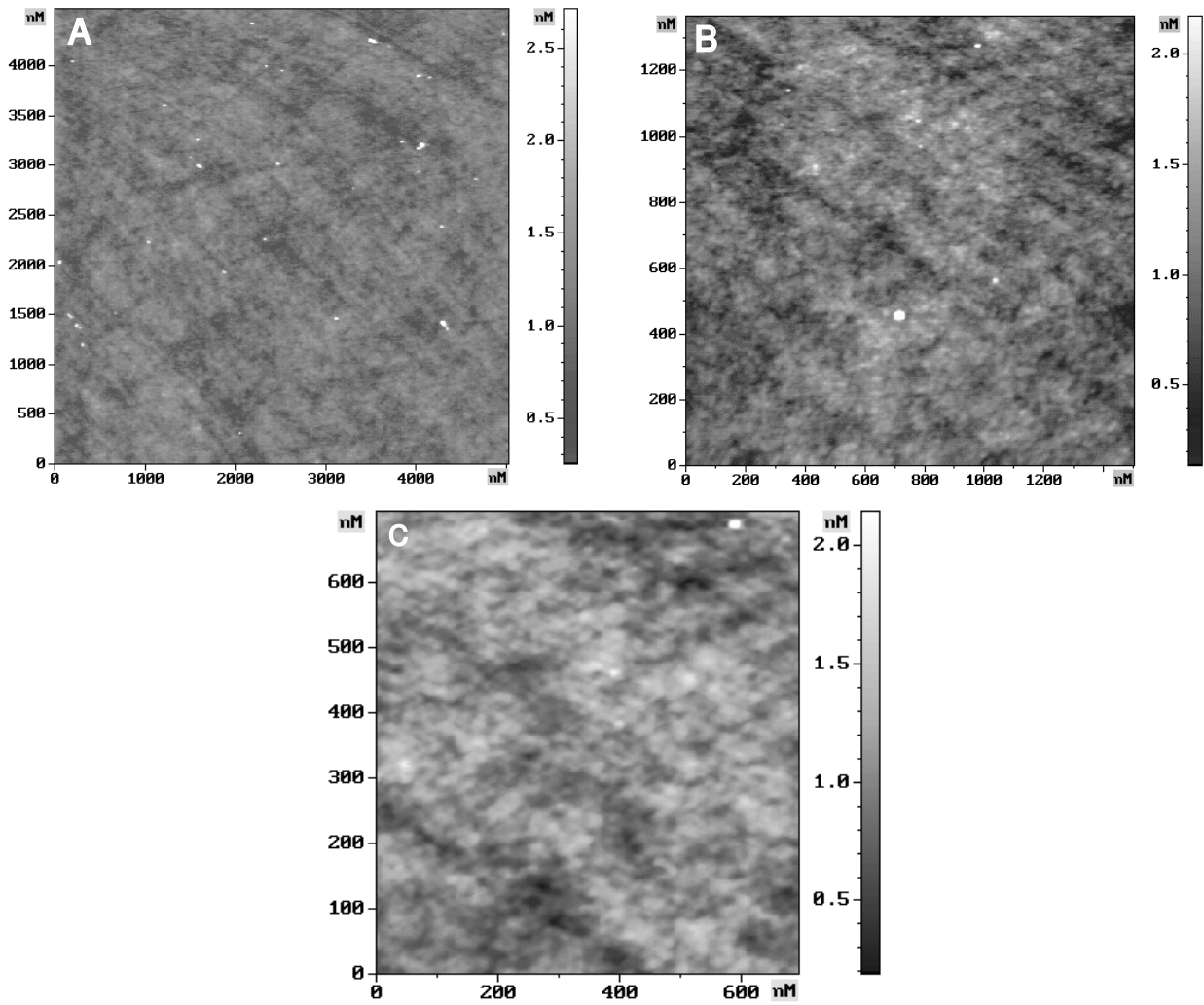


FIG.4.1 – Images de la silice thermique avant traitement piranha. A- à grande échelle : $5000 \times 5000 \text{ nm}^2$, B- à moyenne échelle $1500 \times 1500 \text{ nm}^2$ et C- à petite échelle $700 \times 700 \text{ nm}^2$.

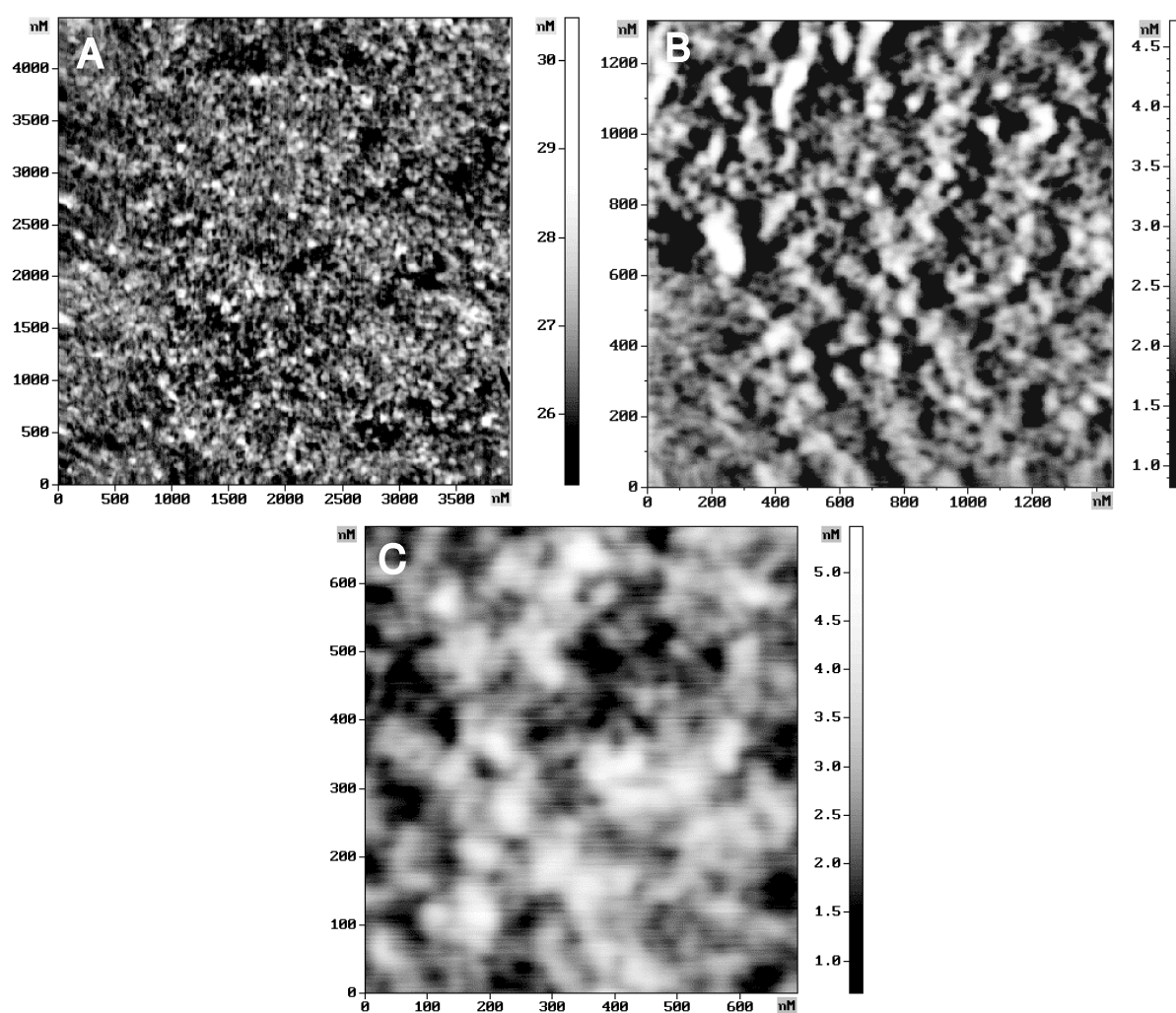


FIG.4.2 – Images du verre avant traitement piranha. A- à grande échelle $5000 \times 5000 \text{ nm}^2$, B- à moyenne échelle $1500 \times 1500 \text{ nm}^2$ et C- à petite échelle $700 \times 700 \text{ nm}^2$.

(RMS) évaluée sur les lames de verre est de 0,8 nm, ce qui équivaut à quatre fois la valeur mesurée sur la silice. L'amplitude des variations de hauteur mesurées sur cette surface est de l'ordre de $1,5 \pm 0,2$ nm.

Après traitement piranha aucune modification de la surface des substrats n'a été observée.

4.2 La silanisation

La couche d'accrochage est la couche qui assure la fixation entre le support inorganique solide (substrat) et les molécules biologiques. Elle joue donc un rôle primordial dans la fabrication des puces. Au laboratoire, de nombreuses études ont été réalisées afin de sélectionner les silanes les plus adaptés à la réalisation d'une monocouche homogène [6]. Le silane retenu est un silane monofonctionnel, c'est-à-dire qu'il ne possède qu'un groupement réactif à son extrémité silylée qui établit le pont siloxane, avec des groupements Si-OH du substrat. Il s'agit du [diméthyl (diméthylamino)silyl] undécanoate de méthyl, noté DDSUM (Figure 4.3). Sa préparation pourra être trouvée dans la référence [7] et fait l'objet d'un brevet [8]. Pour l'étape de silanisation à proprement parler, deux protocoles ont été mis au point : un protocole dit en *phase gaz*, et un protocole par *imprégnation*.

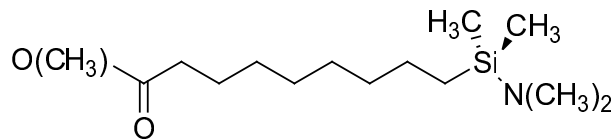


FIG.4.3 – Formule développée du silane DDSUM.

4.2.1 Les protocoles

a- Silanisation en phase gaz

La silanisation est réalisée sous **atmosphère anhydre** dans un réacteur en verre sous flux d'argon. Avant toute opération, les substrats sont donc séchés à 140°C pendant deux heures. A l'issue de cette première phase, les silanes sont injectés sous forme liquide dans le réacteur. La pression est ensuite abaissée jusqu'à 10^{-2} mbar et la température est portée à 140°C, pendant douze heures, provoquant ainsi l'évaporation du silane. D'abondants rinçages sont ensuite effectués avec du tétrahydrofurane (THF) puis de l'eau ultra-pure.

b- Silanisation par imprégnation

De la même manière que dans le protocole en phase gaz, les substrats sont placés dans un réacteur en verre sous flux d'argon et subissent une première phase de séchage identique. La silanisation s'effectue ensuite en deux étapes. Dans un premier temps, le silane, en solution avec du pentane, est injecté dans le réacteur et maintenu à une température inférieure à 4°C. Le pentane est ensuite évaporé par tirage sous vide conduisant au dépôt des silanes sous forme de film sur les substrats. C'est la phase d'*imprégnation*. Dans un second temps, la réaction de greffage à proprement parler s'effectue par chauffage à 140°C pendant douze heures, toujours sous flux d'argon. C'est l'étape de *condensation*. D'abondants rinçages sont ensuite effectués comme dans le cas du protocole en phase gaz.

4.2.2 Description des résultats

L'analyse de la couche d'accrochage par AFM a donc été menée suivant les deux protocoles de silanisation, en *phase gaz* et par *imprégnation*, sur les deux substrats précédemment présentés : le verre et la silice. Les résultats obtenus sur les substrats de verre sont présentés figure 4.4 pour les protocoles en phase gaz, figure 4.5 pour les protocoles par imprégnation, et pour les substrats de silice figure 4.6 pour le protocole en phase gaz, et enfin figure 4.7 pour le protocole d'imprégnation.

L'étude de la silanisation en phase gaz réalisée sur substrat de verre traduit un changement de morphologie notable de l'état de surface. Le dépôt de silane laisse apparaître dès les images à grande échelle 4.4-A, une organisation en îlots légèrement allongés de taille relativement homogène. A une échelle plus petite de $1800 \times 1800 \text{ nm}^2$, image 4.4-B, on observe que ces îlots semblent se superposer les uns sur les autres ce qui rend difficile la mesure de leur hauteur. En moyenne la hauteur de ces îlots avoisine 3 à 4 nm. A petite échelle, figure 4.4-C, on obtient un détail de quelques uns d'entre eux nous permettant d'évaluer leur taille autour de $150 \times 80 \text{ nm}^2$. La rugosité RMS est d'environ 1,5 nm soit deux fois la valeur trouvée sur les lames de verre nu, et traduit bien la rugosification de la surface liée à la présence de ces îlots de silanes.

L'élaboration de la couche d'accrochage par le protocole d'imprégnation toujours sur verre donne des résultats bien différents. En effet, l'image à grande échelle, figure 4.5-A, présente un état de surface proche de celui observé sur le verre. C'est sur l'image de taille $1800 \times 2000 \text{ nm}^2$, figure 4.5-B, que les différences commencent à être perceptibles. En effet, la couche de silane semble se structurer également sous forme d'îlots, mais de bien plus petite taille que ceux obtenus par le protocole en phase gaz. A petite échelle, figure 4.5-C, on observe des petits îlots de taille $50 \times 30 \text{ nm}^2$, de hauteur $1,5 \pm 0,3 \text{ nm}$, qui suivent la rugosité de la lame de verre. La rugosité RMS mesurée sur ce dépôt est de 0,86 nm correspond à celle mesurée sur le verre nu. Il semble que la topographie de la couche de silanes reflète ici parfaitement celle du substrat.

Le dépôt de silane en phase gaz sur le substrat de silice conduit comme dans le cas du verre à

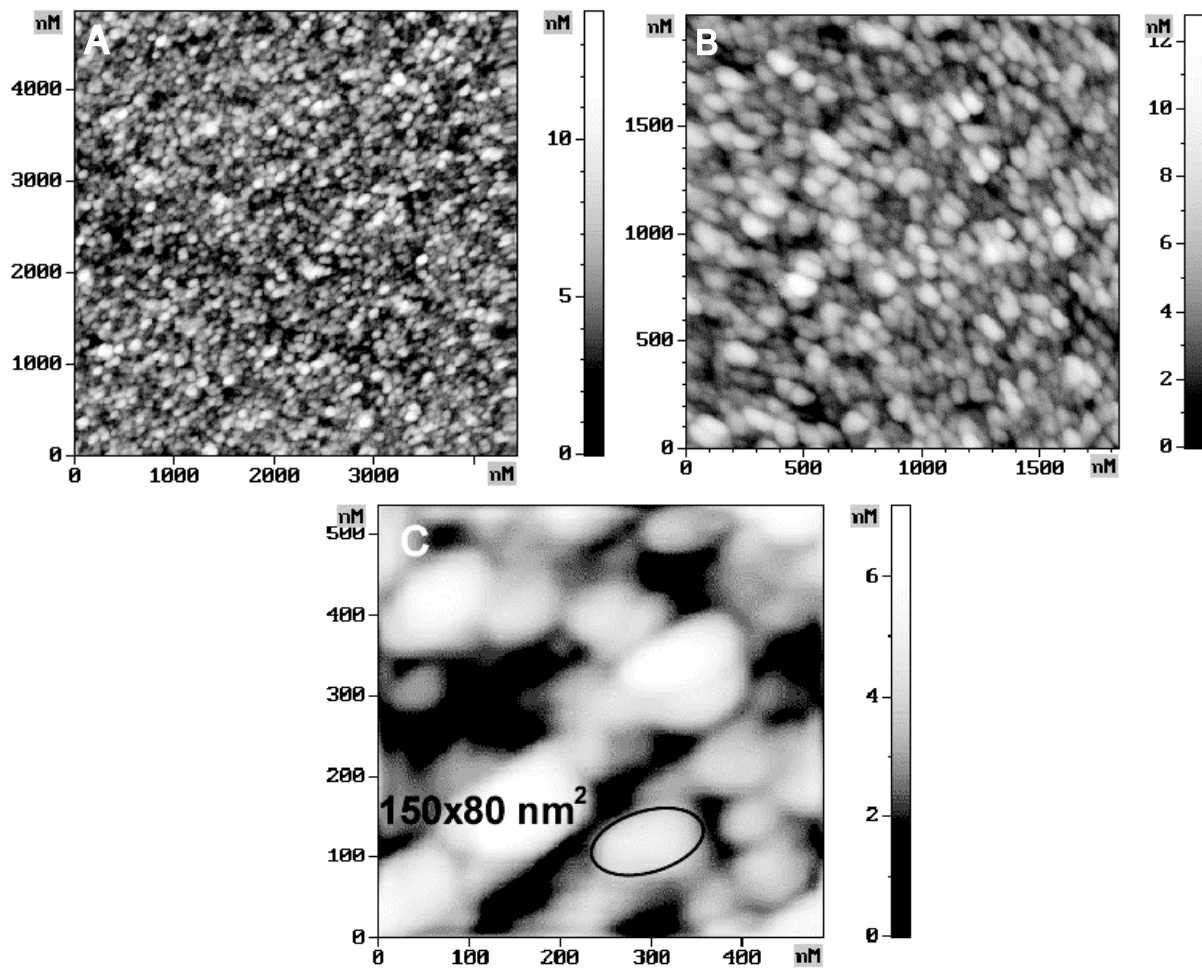


FIG.4.4 – Images de la couche de silane déposée sur les lame de verre en *phase gaz*. A- à grande échelle : $5000 \times 5000 \text{ nm}^2$, B- moyenne échelle $1800 \times 1800 \text{ nm}^2$ et C- à petite échelle $500 \times 500 \text{ nm}^2$.

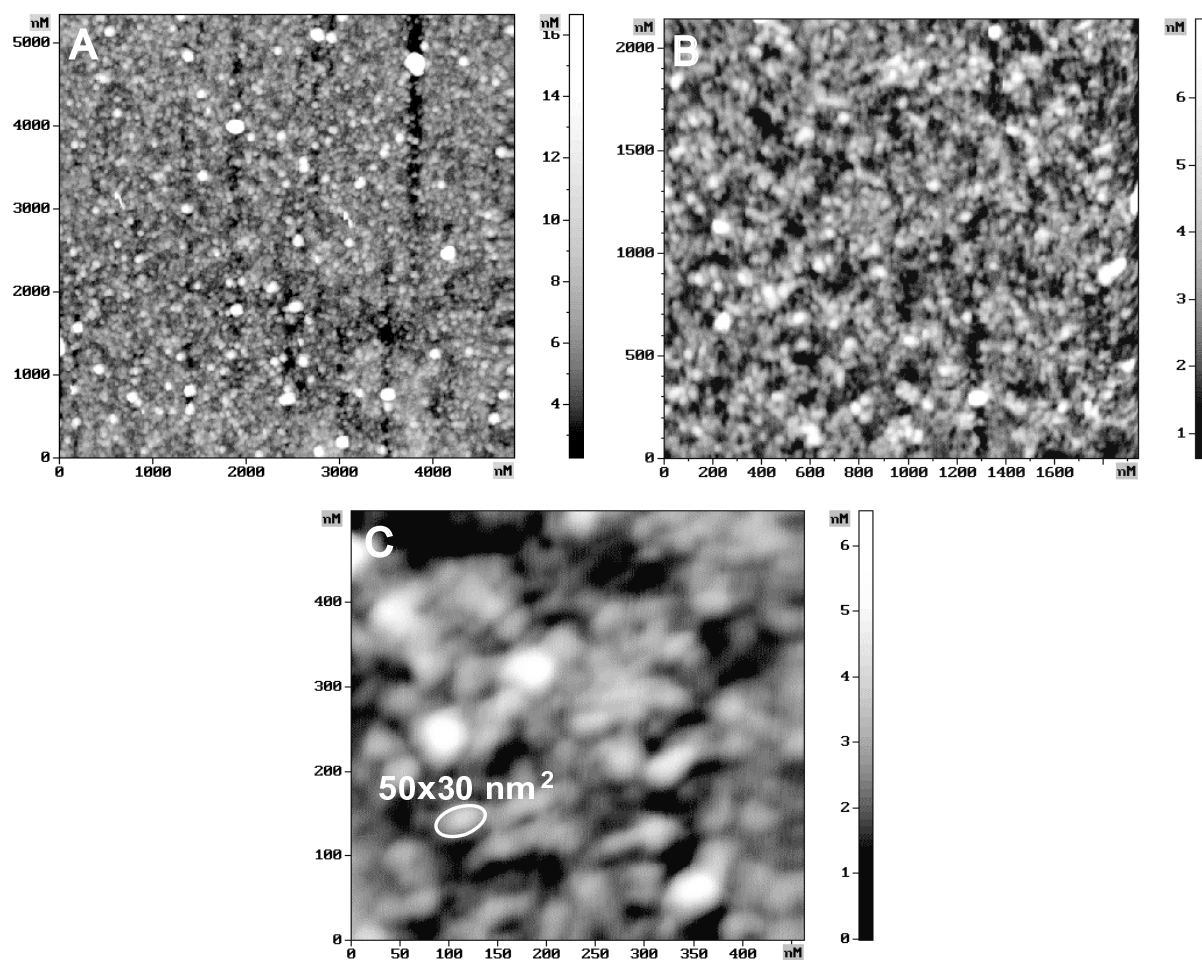


FIG.4.5 – Images de la couche de silane déposée sur les lame de verre par *imprégnation*. A- à grande échelle : $5000 \times 5000 \text{ nm}^2$, B- à moyenne échelle $1800 \times 2000 \text{ nm}^2$ et C- à petite échelle $500 \times 500 \text{ nm}^2$.

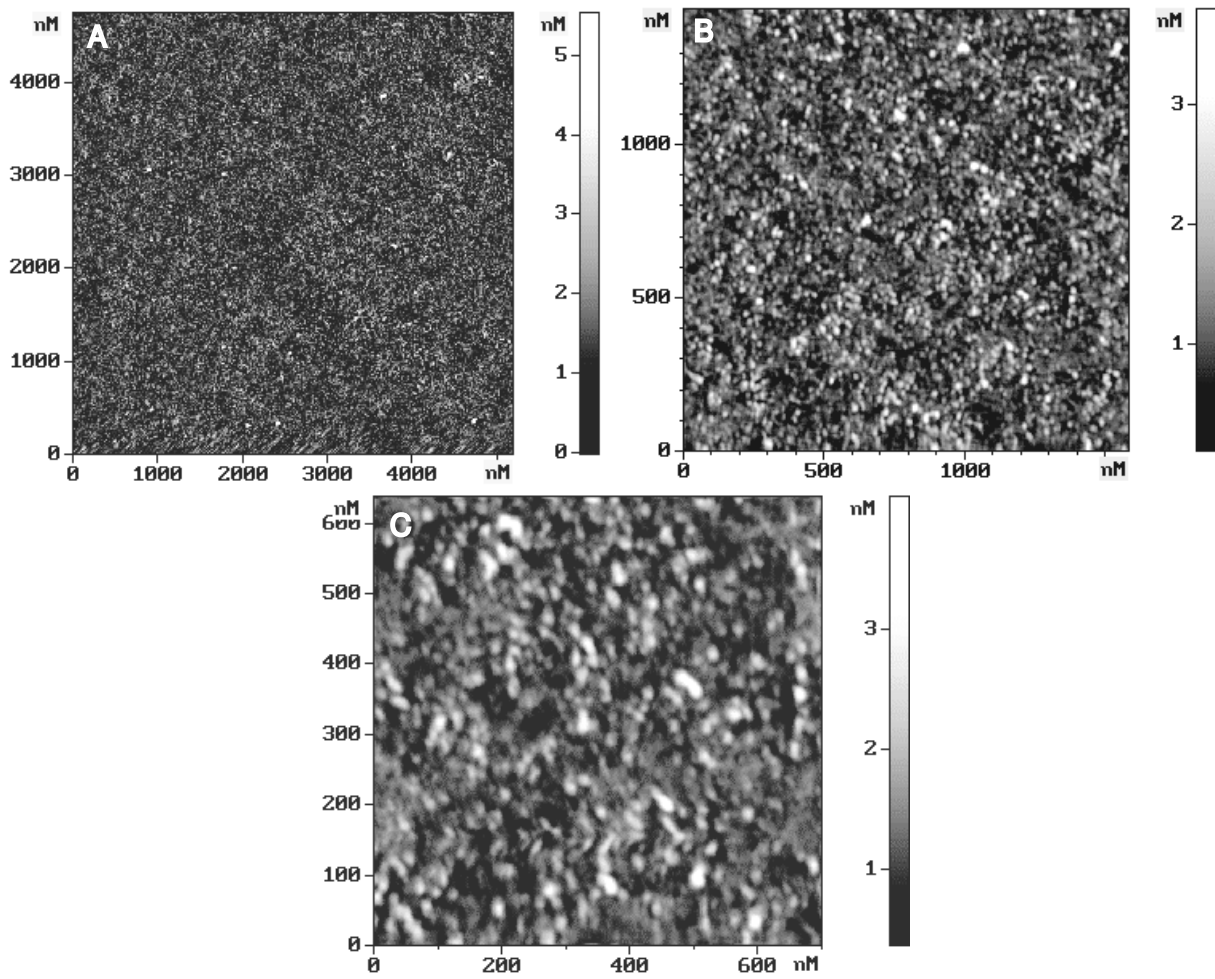


FIG.4.6 – Images de la couche de silane déposée sur les substrats de silice thermique en **phase gaz**. A- à grande échelle : $5000 \times 5000 \text{ nm}^2$, B- à moyenne échelle $1500 \times 1500 \text{ nm}^2$ et C- à petite échelle $700 \times 700 \text{ nm}^2$.

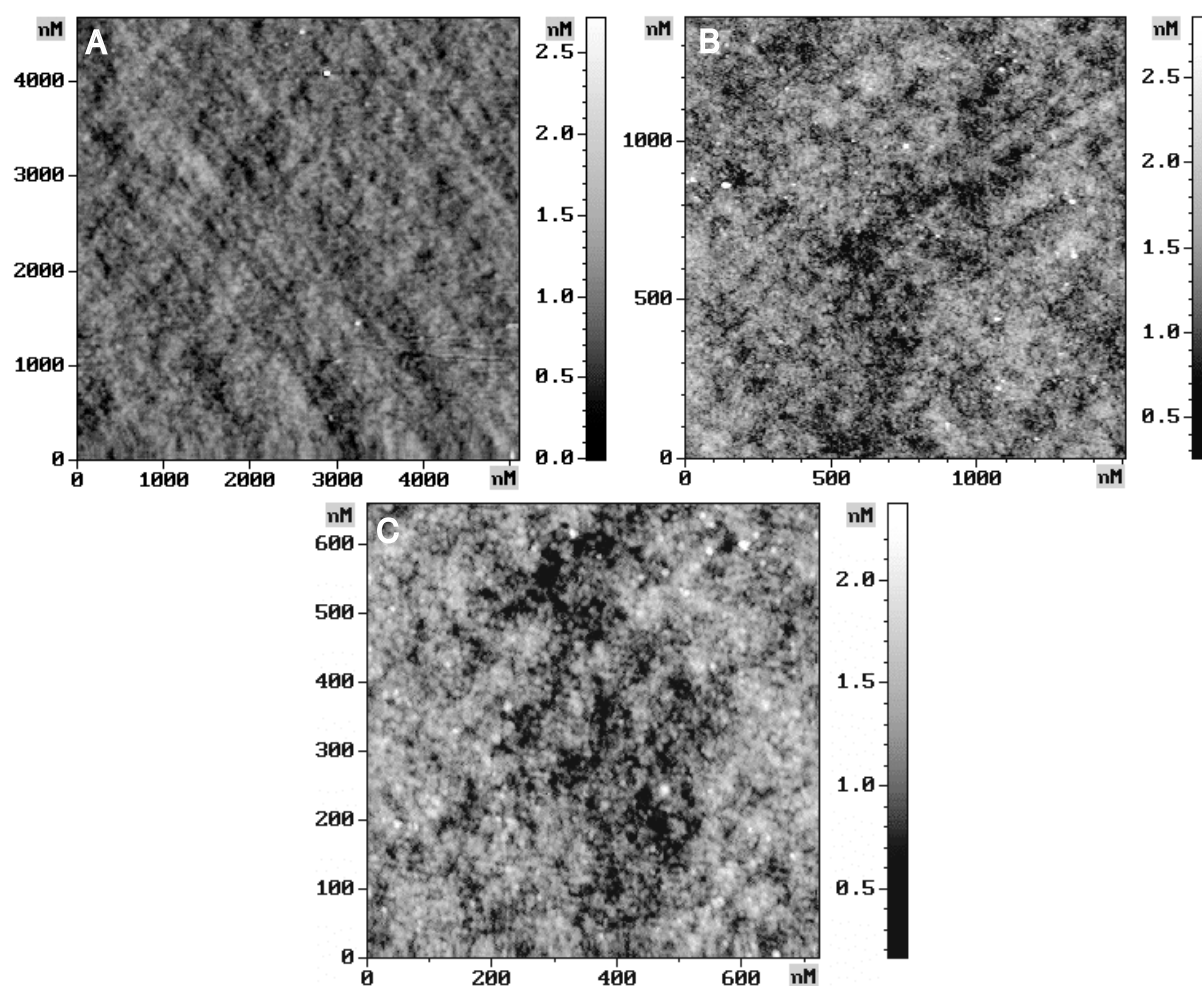


FIG.4.7 – Images de la couche de silane déposée sur les substrats de silice thermique par *imprégnation*. A- à grande échelle : $5000 \times 5000 \text{ nm}^2$, B- à moyenne échelle $1500 \times 1500 \text{ nm}^2$ et C- à petite échelle $700 \times 700 \text{ nm}^2$.

une rugosification de la surface (voir figure 4.6). A grande échelle, fig 4.6-A, les stries observées sur la silice ont disparu laissant place à une structure en grains très fins. Les images à plus petite échelle, fig 4.6-B et 4.6-C, mettent en évidence des petits îlots, de taille variable, de $1,5 \pm 0,2$ nm de haut et orientés aléatoirement. La rugosité de cette couche est de 0,45 nm, soit une valeur quasiment deux fois supérieure à celle mesurée sur la silice ($RMS_{silice}=0,24$ nm).

Enfin, les images de la figure 4.7 présentent la morphologie de la couche de silanes déposée par imprégnation sur les substrats de silice thermique. Ces images montrent que la couche d'accrochage n'apporte rien à la surface. En effet, à grande échelle, Fig 4.7-A, les stries vues sur la silice sont encore nettement observables après dépôt de la couche d'accrochage. Sur les images à moyenne B- et petite échelle C- la présence de la couche se traduit par l'apparition d'une structure légèrement piquetée. La rugosité (RMS) mesurée sur cette couche d'accrochage est de 0,24 nm, valeur quasiment identique à celle mesurée sur le substrat nu et les variations de hauteur observées sur les couches, de l'ordre de 0,5 nm, sont quant à elles très légèrement supérieures à celles observées sur le substrat ($\Delta z = 0,4$ nm).

L'ensemble de ces images a fait l'objet de mesures statistiques de rugosité RMS et des mesures systématiques des tailles caractéristiques des objets identifiés sur ces couches (hauteur, longueur et largeur). Ces données sont reportées dans le tableau 4.1.

substrats	verre		silice	
	phase gaz	imprégnation	phase gaz	imprégnation
δz (nm)	3-4	1,5	1,5	0,5
RMS (nm)	1,5	0,86 (=RMS _{verre})	0,45	0,24 (= RMS _{silice})
taille caractéristique	$150 \times 80 \text{ nm}^2$	$50 \times 30 \text{ nm}^2$	non	non

TAB. 4.1 – Tableau récapitulatif des caractéristiques des différentes couches de silanes étudiées en fonction de la nature du substrat et du protocole employé.

Ces résultats mettent en évidence une faible influence du substrat sur l'organisation du dépôt des molécules. En effet, deux morphologies en îlots ont été obtenues pour le protocole en phase gaz sur verre et sur silice. De même, les couches obtenues par imprégnation sur le verre et la silice semblent dans les deux cas reproduire la surface initiale, conservant ainsi les caractéristiques du substrat (différence de hauteur et rugosité RMS). Ainsi, chaque protocole conduit une même organisation des molécules de silanes pour les deux substrats.

Pour interpréter l'organisation des molécules de silanes, des expériences complémentaires ont été réalisées par spectroscopie infrarouge et par mesures d'angle de contact. Les mesures d'angle

de contact conduisent à une valeur commune de 90° (à l'avancement) pour l'ensemble des dépôts (en phase gaz et par imprégnation). Or, dans le cas où les molécules de silanes occuperaient une conformation verticale, constituant ainsi une couche compacte, elles présenteraient en surface leur terminaison ester, hydrophyle, qui devrait conduire à un angle de contact de l'ordre de 50° . La valeur mesurée de 90° rend donc compte d'un état de surface plus hydrophobe, qui suggère une présence massive en surface de groupements CH_2 , des chaînes alkyl de silanes. Ainsi, il semble que les molécules de silanes occupent une conformation très désordonnée.

Par ailleurs, ces résultats coïncident avec des mesures réalisées en spectroscopie Infra-Rouge, sur les couches de silanes obtenues par imprégnation. En effet, cette étude révèle la présence de bandes correspondant aux molécules de $-CH_2$ à 2852 et 2921 cm^{-1} , ne traduisant pas une organisation moléculaire au sein du film telle qu'on peut l'observer dans le cas des couches auto-assemblées, mais caractéristique d'une couche non organisée, de densité, autour de 9×10^{13} silanes/cm², qui se trouve être inférieure à la monocouche (3×10^{14} molécules/cm²).

La couche de silanes est donc une couche **peu dense** de molécules, probablement **couchées** sur la surface.

A ce jour, peu de publications traitent du dépôt de molécules de silanes monofonctionnelles. En revanche, les mécanismes impliqués dans les protocoles de silanisation des molécules trifonctionnelles, et plus particulièrement les trichlorosilanes, est bien décrit dans la littérature [9–18]. La richesse de cette littérature provient du fait qu'un grand nombre de paramètres jouent un rôle important dans la formation de ces dépôts, comme la présence d'eau en surface, la température de dépôt [13, 15], la nature du substrat [16] et la longueur des molécules de silanes [17].

Une première approche de ces mécanismes a été proposée par Brzoska *et al.* [13]. Ils étudient la formation de couches **auto-assemblées** de molécules de trichlorosilanes sur des substrats de silice. Ils établissent un schéma en quatre étapes pour expliquer les processus d'organisation : la première phase décrit la physisorption des molécules de trichlorosilanes sur la fine couche d'eau présente en surface du substrat. Cette couche est nécessaire pour que s'effectue l'étape suivante d'hydrolyse avec la transformation des trichlorosilanes $Si(Cl)_3$ en trisilanols $Si(OH)_3$. Elle permet aussi aux molécules de se déplacer latéralement dans le plan par mouvement brownien. La troisième étape est l'étape de greffage à proprement parler où les molécules de silanes établissent un pont siloxane Si-O-Si avec les groupement silanols de surface de la silice. Enfin, une fois les molécules de silanes greffées, si les distances entre les molécules et leur orientation sont favorables, des liaisons intermoléculaires se forment alors ("cross-linking") par les têtes tri-silanols. Cette quatrième étape s'appelle phase de *réticulation* ou de *condensation latérale*. On obtient ainsi un réseau 2D de polysiloxanes.

Quels sont les paramètres qui jouent sur l'organisation des molécules de silanes ?

Brzoska *et al.* [14] ont démontré par mesures d'angles de contact l'existence d'une **température critique** T_c au delà de laquelle la couche ne s'auto-organise plus. Ils observent que la tension de surface de gouttelettes possédant à leur interface une couche de trichlorosilanes évolue en fonction de la température. A basse température, une valeur constante d'environ 20,5 mN/m est obtenue quelle que soit la longueur des chaînes du silane (de 10 à 22 groupements $-CH_2$). Puis, la tension de surface augmente progressivement à partir d'une température donnée, traduisant ainsi la présence d'un mélange de groupements CH_2 et CH_3 à l'interface air/monocouche, et non plus les seules terminaison CH_3 . Ceci marque donc l'apparition de désordre dans la couche de trichlorosilanes.

Ils ont montré que cette température critique constituait une propriété intrinsèque du silane et variait en fonction de la longueur de chaîne. Ils donnent des valeurs $T_c = 0^\circ C$, $T_c = 28^\circ C$ et $T_c = 38^\circ C$ pour $n=10$, $n=18$ et $n=22$ respectivement. Cependant, K. Iimura *et al.* [15] proposent d'autres valeurs pour des dépôts réalisés sur lame de verre ($n=16$ $T_c = 0^\circ C$, $n=18$ $T_c = 10^\circ C$ et $n=22$ $T_c = 30^\circ C$) et attribuent ces différences à la nature du substrat et à sa préparation.

A ce sujet, Bierbaum *et al.* [18] ont suivi la formation du dépôt de molécules d'octadécyltrichlorosilane, communément noté OTS, sur silice. Au bout de quelques secondes d'immersion, une couche se forme par nucléation d'îlots de quelques microns de diamètre de forme dendritique. Au bout de quelques minutes, une seconde nucléation de petits îlots se produit, remplissant l'espace entre les premiers. Une monocouche complète est ainsi obtenue au bout de 30 à 40 minutes. La taille des îlots obtenus dès les premières minutes varie suivant les conditions de dépôt. Au cours de ce dépôt, deux phénomènes sont en compétition : d'une part, les chaînes alkyles peuvent interagir entre-elles, permettant ainsi une organisation latérale des molécules entre elles, d'autre part le greffage par formation d'un pont siloxane entre la terminaison silyl de l'OTS et un groupement silanol Si-OH du substrat. On peut ainsi définir deux voies de formation de la couche de silane : soit les molécules se rassemblent formant des clusters mobiles et ordonnés de taille importante qui viennent ensuite se fixer par quelques points d'ancrage sur la surface, soit les molécules se fixent individuellement sur la surface et forment des petits îlots immobiles entre lesquels viennent se placer d'autres molécules.

Ainsi, quand le substrat présente beaucoup de sites d'ancrage, le greffage prédomine. Bierbaum *et al.* [18] ont montré que pour une même température de dépôt, des îlots plus petits se formaient sur un substrat soumis à une exposition prolongée à l'air (3 heures) et dans l'eau (4 heures) puis séché. Sous conditions ambiantes, la présence de quelques monocouches d'eau adsorbées sur la surface favorise la création de liaisons Si-OH et donc de sites d'ancrage. La diffusion des molécules est limitée par le grand nombre de sites possibles. Les molécules se fixent alors directement sur le substrat.

L'étude de l'influence des sites d'ancrage du substrat sur le dépôt a été poursuivie par Brunner

et al. [16]. Ils analysent les différences de cinétique entre deux dépôts d'OTS réalisés sur mica et sur du mica pur et sur du mica recouvert d'une monocouche de silice. Ils observent que pour une durée de dépôt identique, ils obtiennent deux états d'avancement dans la formation de la couche. La couche formée sur mica atteignant plus rapidement un état dense que celle réalisée sur de la silice. Ils justifient ces disparités par la différence de densité de site d'ancrage entre le mica et la silice. En effet, le mica présente peu de sites d'ancrage Si-OH, la diffusion des molécules sera alors favorisée et la croissance des îlots s'effectue latéralement avant greffage sur la surface.

La présence d'eau à l'interface, la faible densité de sites d'ancrage, une température faible, une longueur de chaîne importante sont ainsi des facteurs favorables à la formation de couches denses par condensation latérale.

Alors que les phénomènes de condensation latérale entre chaîne semblent être un facteur important pour la réalisation de couche dense nous allons maintenant discuter de facteurs limitant cette stabilité. L'organisation verticale des chaînes dans une couche auto-assemblée est favorisée par l'énergie de cohésion entre les groupements CH_2 de 2 molécules. Ces énergies augmentent linéairement en fonction du nombre de groupements CH_2 . Israelachvili [19] donne une valeur de 6 à 7,5 kJmol^{-1} par groupement CH_2 présent dans les molécules aliphatiques. Ainsi, l'énergie de cohésion entre deux molécules augmente quand le nombre d'interaction entre groupements CH_2 augmente, soit lorsque la longueur de chaîne s'accroît. Il sera donc toujours plus difficile de positionner les molécules en conformation trans lorsque leur chaîne alkyle est courte. Ces considérations ont été observées expérimentalement par Y. Z. Du *et al.* [17] qui ont comparé le dépôt de C11Ac et de C16 Ac ($\text{Cl}_3 - \text{Si} - \text{C}_n\text{H}_{2n} - \text{OCOCH}_3$) sur du silicium à température ambiante. Ils trouvent que le taux de croissance est inversement proportionnel à la taille, les couches de C₁₁Ac se forment plus rapidement que les couches de C₁₆Ac par agglomération de petits îlots très proches les uns des autres.

Toutes ces considérations nous permettent de mieux comprendre la morphologie de nos couches. Les silanes C10 présentent deux facteurs favorables au greffage direct sur la surface. Comme ce sont des chaînes courtes, l'énergie de cohésion entre les molécules est faible, les interactions entre chaînes seront donc faibles et comme ils sont monofonctionnels, aucun phénomène de réticulation ne peut être observé. De plus, les substrats utilisés, verre et silice, présentent un nombre de sites d'ancrage très important (environ 10^{14} site/ cm^2) et voisins.

Toutefois, les deux protocoles de dépôt ne conduisent pas à la même morphologie. Bien qu'ils soient tous deux réalisés sous atmosphère sèche (anhydre) et à la pression de 10^{-2} mbar, un facteur important diffère : la température. Elle est avant la phase de condensation dans les deux cas (4°C pour l'imprégnation et 140°C pour le protocole en phase gaz) supérieure à la valeur cri-

tique T_c définie par Brzoska (pour $n=10$, : $T_c = 0^\circ\text{C}$) et traduit ainsi l'impossibilité de réaliser des couches organisées. Cependant, pour la phase gaz, la température est de 140°C , très supérieure à la température critique T_c et on peut alors supposer que les molécules se groupent entre elles de façon désordonnée en petits agrégats par conversion partielle des groupements esters en groupements acides plus réactifs. La morphologie obtenue avec des îlots larges disposés les uns sur les autres peut être le résultat du dépôt de *gouttelettes* qui viennent se greffer sur le substrat les unes après les autres. Ces gouttelettes adoptent une forme stable définie par les conditions de dépôt (température, pression). Elles n'apparaissent pas dans le dépôt réalisé par imprégnation, car la température de dépôt de 4°C n'est pas favorable à leur formation. Les molécules de silanes se déposent de façon isolée sur le substrat. Comme leur densité de greffage est faible, 9×10^{13} molécules/cm², elles peuvent donc se coucher sur la surface.

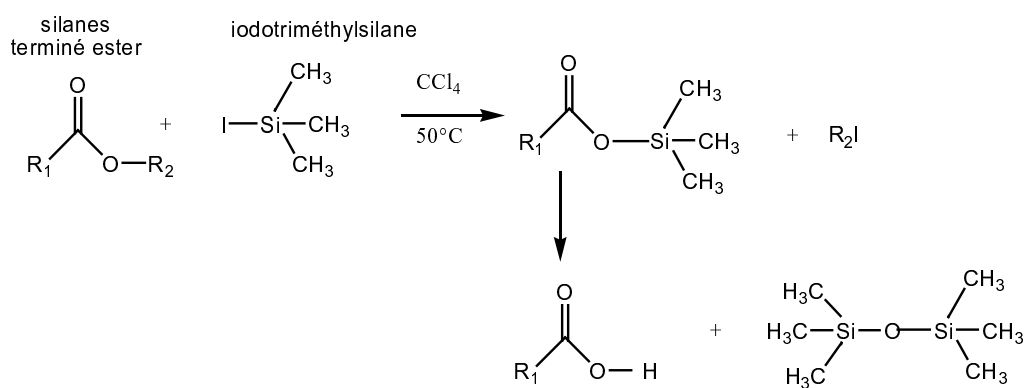
En reprenant les critères de sélection énoncés au début de ce chapitre, on rappelle que, pour la suite de notre étude, seuls les protocoles conduisant aux états de surface de plus faible rugosité seront retenus. Ainsi, dans la suite de ce travail, l'élaboration de la couche d'accrochage sera réalisée sur des substrats de **silice thermique** suivant le **protocole d'imprégnation**. On garde donc en mémoire les caractéristiques de cette couche : molécules couchées sur la surface du substrat, variations en hauteur de l'ordre de 0,5 nm et une rugosité extrêmement faible égale à celle du substrat de silice de 0,24 nm.

4.3 La phase d'activation

Afin de fixer les oligonucléotides, une évolution chimique de l'extrémité libre du silane est nécessaire. La terminaison ester du silane greffé est modifiée en acide activé, afin d'établir la liaison amide entre l'amine de l'espaceur des sondes et le silane. La terminaison ester est transformée en terminaison acide par action d'une solution de iodothriméthylsilane de 0,1M dans du CCl_4 sous atmosphère sèche à 60°C pendant douze heures puis hydrolysée : c'est la phase de *déprotection* de l'ester en acide carboxylique. Les substrats sont ensuite séchés sous vide et l'acide obtenu à l'étape précédente est activé par réaction simultanée de l'acide avec du NHS (N-hydroxysuccinimide) 0,1M et du di(isopropyl)carbodiimide 0,1M dans du THF pendant cinq heures. Les substrats sont ensuite abondamment rincés avec du THF et stockés sous atmosphère sèche (voir figure 4.8). C'est la phase d'*activation*.

Les images de la figure 4.9 montrent l'évolution morphologique après activation. Les stries observées sur le substrat et la couche non activée sont encore observables. La rugosité de la couche d'accrochage reste néanmoins très faible, aux environs de 0,29 nm, soit très légèrement supérieure à celle mesurée sur la couche avant modification, soit 0,24 nm. Cependant, la résolution des images

(a) Etape de déprotéction



(b) Activation de l'acide carboxylique

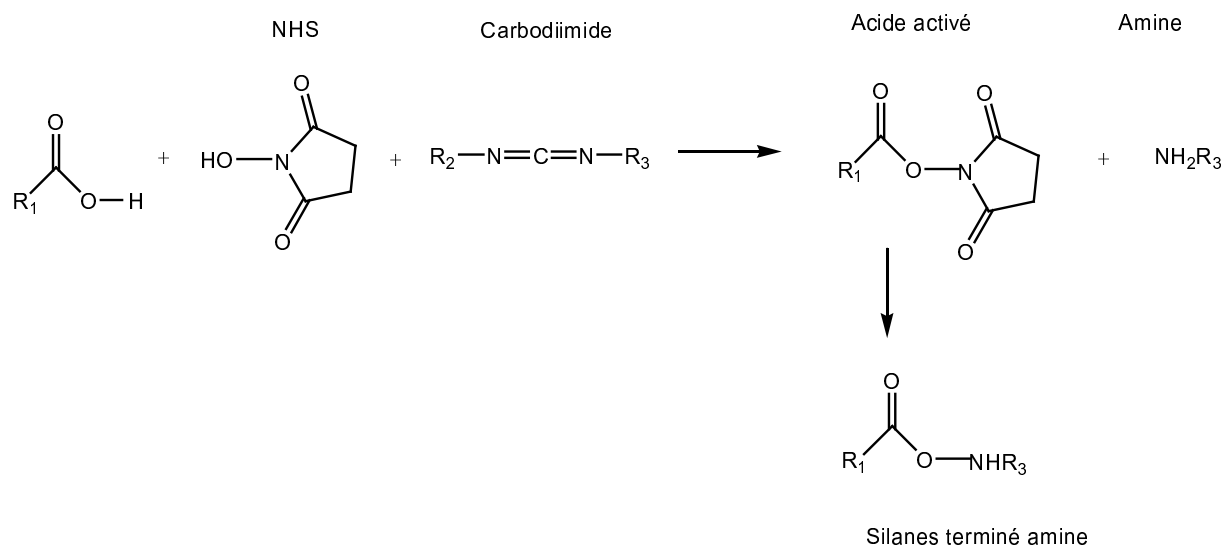


FIG.4.8 – Réactions successives transformant la terminaison ester du silane en acide activé. (a) Etape de déprotéction de l'ester en acide. (b) Activation de l'acide.

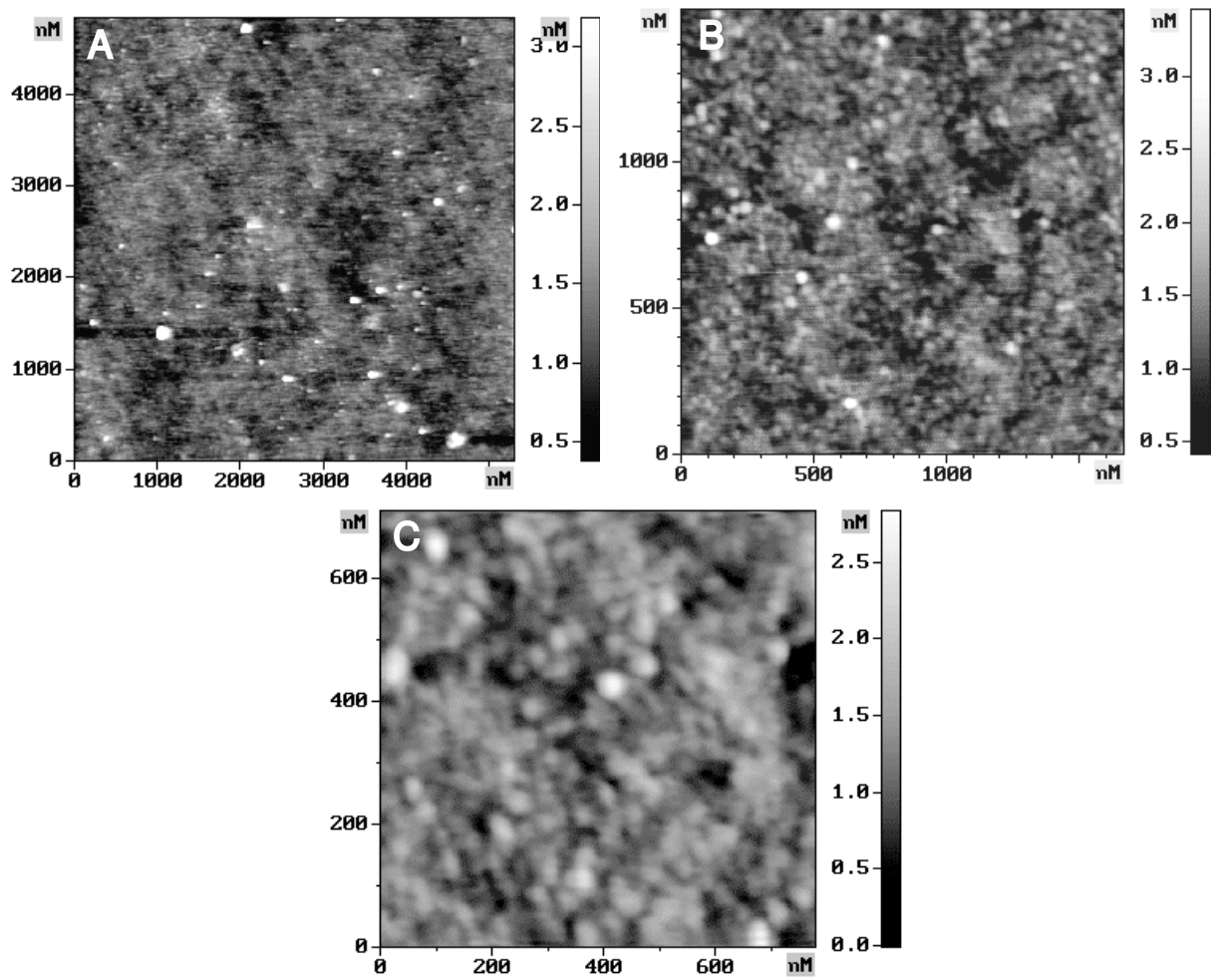


FIG.4.9 – Images de la couche de silanes déprotégée au TMSI et déposée sur les substrats de silice thermique par imprégnation. A- à grande échelle : $5000 \times 5000 \text{ nm}^2$, B- à moyenne échelle $1500 \times 1500 \text{ nm}^2$ et C- à petite échelle $700 \times 700 \text{ nm}^2$.

à moyenne (figure 4.9-B) et petite échelle (figure 4.9-C) est moins bonne que celle obtenue sur les images avant déprotection. Cette différence peut trouver son origine dans le changement de la nature chimique de la surface, qui devient plus hydrophile quand la terminaison ester est transformée en terminaison acide.

4.4 L'immobilisation

L'immobilisation d'oligonucléotides sondes est l'étape ultime de la préparation des puces à ADN. Dans cette étude, on souhaite regarder l'influence de la **longueur des brins** ainsi que celle de la **nature des séquences** sur la morphologie des couches immobilisées. Pour ce faire, des puces modèles regroupant trois types de longueur correspondant à 12, 25 et 36 bases ont été analysées, avec dans le cas des sondes de 12 bases deux types de sondes de séquences voisines et dans le cas des sondes de 25 et 36 bases des sondes de séquences totalement différentes. De nombreuses puces modèles ont été réalisées comprenant de 2 à 5 plots comportant des sondes de 12, 25 et/ou 36 bases.

4.4.1 Le prototype de la puce modèle à 3 plots

Pour débiter notre étude une première série d'expériences a été effectuée sur des puces modèles à trois plots. L'objectif est de tester dans un premier temps le niveau de résolution que l'on peut atteindre sur ce type de systèmes et de définir les critères suivant lesquels on pourra discuter la morphologie des sondes immobilisées. Cette puce comporte trois sondes de 25 bases de long (voir figure 4.10). Deux plots sont constitués de sondes de 25 bases de séquences totalement différentes l'une de l'autre. Dans la suite du manuscrit, elles seront notées : 25C pour la séquence : $5' \text{GCT-AAT-CCA-ACG-CGG-GCC-AAT-CCT-T}^{3'}$ et 25NC, $5' \text{CTC-CTA-CCA-TGC-GGA-CGA-TCC-ATA-G}^{3'}$, où la notation "C" (et "NC") fait référence à la complémentarité (non-complémentarité) de la sonde avec une des cibles choisies. Le troisième plot, noté 25C+ CY^3 , comporte les sondes 25C dotées d'un chromophore CY^3 fixé à leur extrémité 5'. La réalisation de ce plot a pour objectif de vérifier le bon déroulement des processus d'immobilisation par microscopie de fluorescence avant d'engager l'étude par AFM [21].

L'ensemble des sondes utilisées sont dotées d'un espaceur fixé à la terminaison 3' des brins, $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_6-3'$, de manière à favoriser leur accessibilité durant la phase d'hybridation.

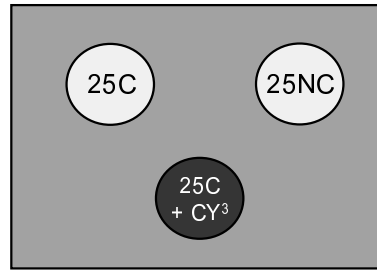


FIG.4.10 – Prototype de la puce modèle à trois plots. Il comporte deux plots constitués de sondes de 25 bases : 25C et 25NC et un plot témoin constitué des sondes 25C munies d'un marqueur fluorescent CY^3 .

a- Protocole d'immobilisation des sondes

Les sondes seront toutes immobilisées dans les mêmes conditions et ce simultanément pour chacune des puces réalisées. Les brins-sondes sont fournis sous forme lyophilisés. Ils sont dans un premier temps solubilisés dans une solution tampon appelée PBS (Phosphate Buffered Saline solution [150mM NaCl , $2,7\text{ mM KCl}$, $4,3\text{mM Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1,4\text{mM K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$]), à une concentration de $25\mu\text{M}$. L'immobilisation des brins s'effectue par évaporation, sous condition ambiante, de petites gouttes de volume de $2,5\ \mu\text{L}$ déposées sur la surface fonctionnalisée. La puce est ensuite abondamment rincée dans une solution de 10% de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) dans de l'eau ultrapure à 80° durant une heure. Les échantillons sont ensuite passés aux ultrasons à 80° dans de l'eau ultrapure pour éliminer des traces de SDS. Enfin, une dernière étape de préparation consiste à neutraliser les sites actifs de la couche d'accrochage n'ayant pas réagi, en transformant par addition de méthyle amine, l'ester activé du silane en amide (NH_2). C'est la phase de protection appelée capping. Cette étape joue un rôle crucial au moment de la phase d'hybridation, car elle interdit la réaction d'immobilisation pour les brins cibles.

Chacune des puces ainsi préparées est soumise à une analyse par microscopie de fluorescence [21]. Elle permet de vérifier que la phase d'immobilisation s'est bien déroulée en contrôlant le rendement d'immobilisation des sondes 25C marquées.

b- Etude AFM de la puce à trois plots :

Nous avons choisi de qualifier l'état de surface des puces suivant trois tailles d'images caractéristiques : $(5000 \times 5000)\text{ nm}^2$, $(1600 \times 1600)\text{ nm}^2$ et $(400 \times 400)\text{ nm}^2$, caractérisant chacune un niveau d'organisation de la couche de molécules immobilisées.

Les images à grande échelle $(5000 \times 5000)\text{ nm}^2$ (voir figure 4.11) ont comme objectif de nous renseigner sur l'homogénéité des dépôts ainsi que sur l'état de propreté de nos surfaces.

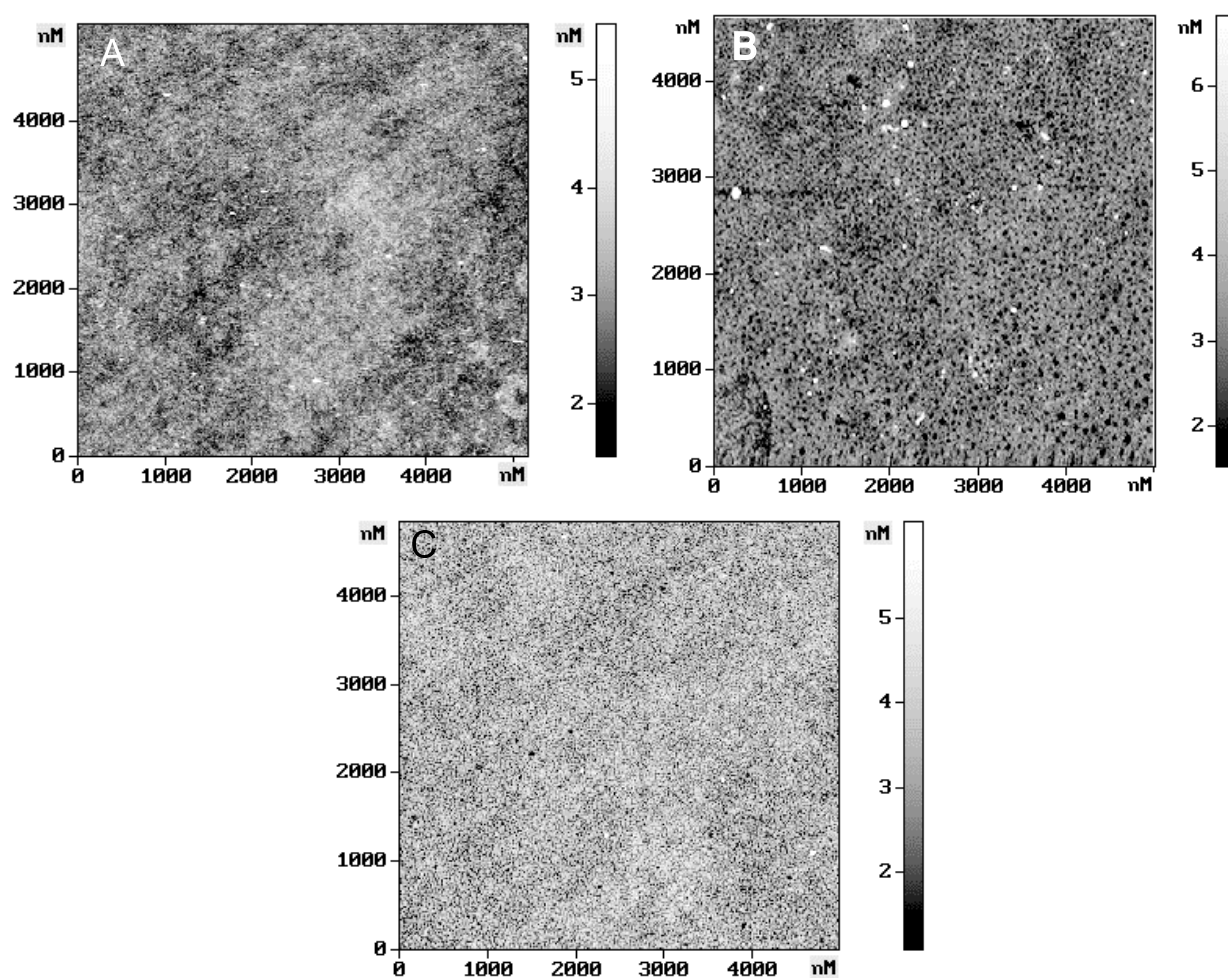


FIG.4.11 – Etude de l'immobilisation des sondes par AFM. Images de grandes tailles $5000 \times 5000 \text{ nm}^2$. A- les sondes 25C, B- les sondes 25NC, et C- les sondes de 25C marquées.

Ces images mettent en évidence un bon état de propreté des surfaces, puisqu'en moyenne le nombre d'impuretés observées se situe autour de 1-2 impuretés/ μm^2 . Par ailleurs, l'étude morphologique réalisée sur les trois plots à l'échelle de $(5000 \times 5000) \text{ nm}^2$, montre que l'immobilisation conduit à des dépôts légèrement différents pour chacune des trois sondes. Les sondes 25C semblent parfaitement reproduire la surface de silanes, laissant transparaître les structures striées observées sur les substrats de silice à cette échelle (voir image 4.1). Au contraire, les sondes 25NC s'organisent non pas en un tapis homogène et lisse mais autour de petits trous tandis que les sondes marquées, 25C + CY³, semblent former un dépôt dense et homogène masquant totalement les stries du substrat. L'absence de régions de moins grande densité, indique que ce dépôt est probablement plus compact que celui observé sur les sondes 25C et 25NC.

Les images de la figure 4.12 rendent compte des morphologies observées sur ces trois plots avec plus de détails sur des régions de $1600 \times 1600 \text{ nm}^2$.

On retrouve les différences déjà évoquées sur les images à grande échelle. On constate que les sondes 25C (fig. 4.12-A) s'organisent sous forme de structures en petits îlots d'épaisseur $1,5 \pm 0,1 \text{ nm}$, distribués de manière homogène sur la surface. Le dépôt ainsi constitué possède une rugosité (RMS) toujours faible de 0,45 nm. Les sondes 25NC (fig. 4.12-B) semblent également s'arranger sous forme d'une structure en îlots d'épaisseur $1,8 \pm 0,2 \text{ nm}$, valeur légèrement supérieure à celle des sondes 25C. En revanche, elles se démarquent des sondes 25C par leur organisation correspondant à une structure en dentelle dont les trous présentent une bonne homogénéité en taille, d'environ 100 nm de diamètre sur l'image présentée. L'hétérogénéité de ce dépôt conduit à une légère augmentation de la rugosité (RMS) qui est de 0,55 nm. Les sondes 25C dotées d'un chromophore CY³ se structurent quant-à elles en plateaux denses (fig. 4.12-C). Les hauteurs d'îlots mesurées sur ces images sont de $2,5 \pm 0,1 \text{ nm}$ soit une valeur nettement supérieure à celles observées sur les sondes non marquées, 25C et 25NC. La rugosité RMS mesurée sur ces plateaux est de 0,46 nm.

Le tableau 4.2 donne les caractéristiques obtenues par des mesures statistiques sur chacun de ces plots.

Sondes	Silanes	25C	25N	25C+CY ³
Δz (nm)	$0,5 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,1$
RMS (nm)	0,27	0,45	0,55	0,46

TAB. 4.2 – Tableau récapitulatif des caractéristiques des trois types de sondes : mesure de la hauteur des îlots et mesure de la rugosité (rms) sur les images de $(1600 \times 1600) \text{ nm}^2$.

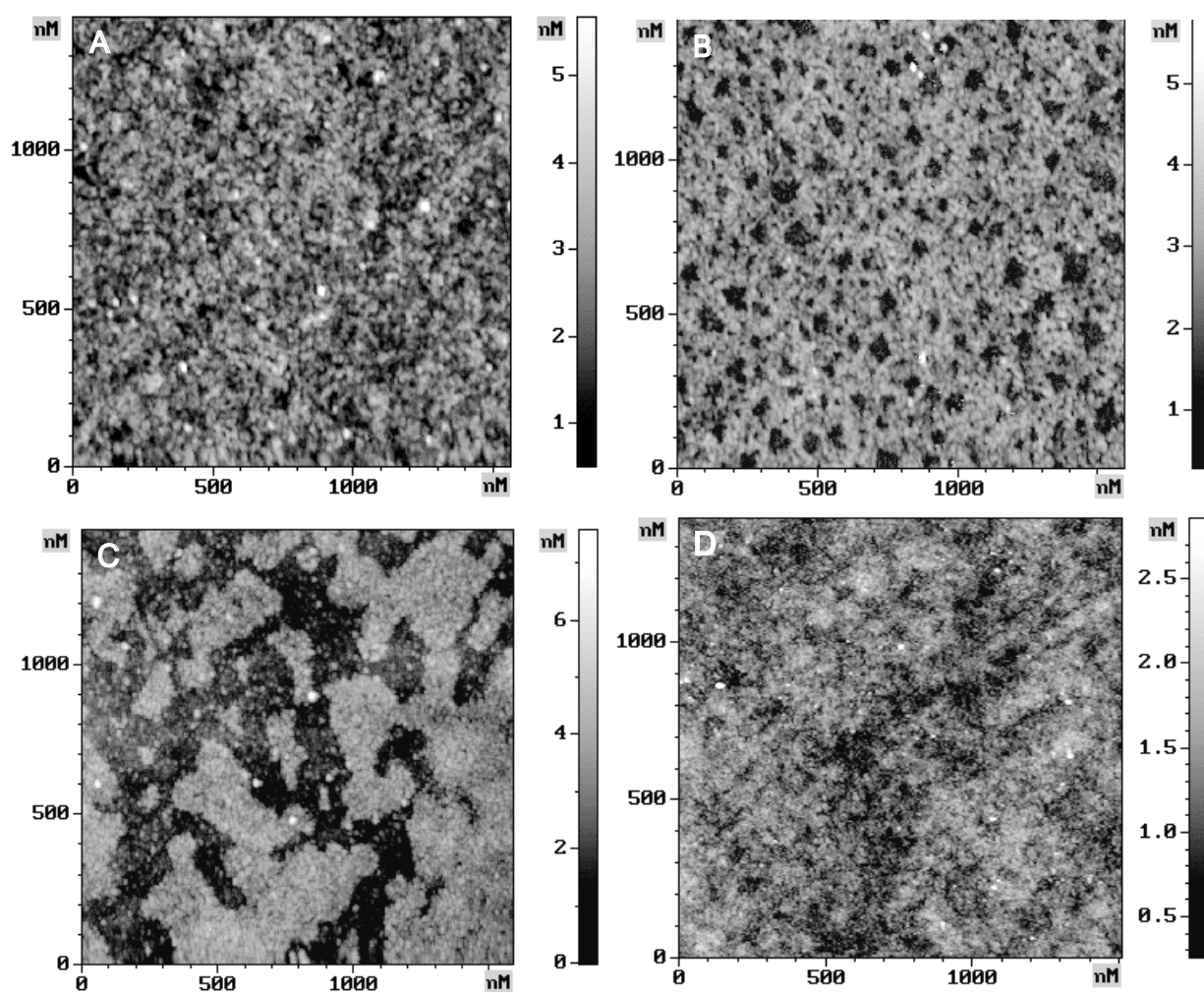


FIG.4.12 – Etude de l'immobilisation des sondes par AFM. Images de taille moyenne $1600 \times 1600 \text{ nm}^2$. A- les sondes 25C, B- les sondes 25NC, C- les sondes de 25C marquées et D- la couche de silanes avant immobilisation.

A la première observation de ces images, on constate donc une différence morphologique notoire entre l'état de surface avant (fig. 4.12-D) et après immobilisation (fig. 4.12-A,-B et -C) et ce quel que soit le plot analysé. Alors que le dépôt de silanes obtenu par imprégnation conduisait à une couche lisse et homogène dont les différences de hauteur se situaient autour de 0,5 nm et la rugosité (RMS) autour de 0,27 nm, les morphologies observées sur les sondes présentent toutes les trois des structurations (plateaux, morphologie en dentelle ou dépôt homogène d'îlots). De plus, l'augmentation de la rugosité de la surface (RMS) de 0,27 nm pour les silanes à des valeurs autour de 0,5 nm après dépôts des sondes et le passage des différences de hauteur de 0,5 nm à des valeurs comprises entre 1,5 et 2,5 nm, traduisent également la présence effective des sondes après immobilisation. On est donc capable d'identifier par différence morphologique la présence de sondes après immobilisation.

Pour poursuivre notre analyse, revenons un instant sur les caractéristiques des objets imagés. Les sondes immobilisées dans les trois plots de cette puce sont toutes constituées de 25 bases. La taille de ces sondes peut donc en première approximation être estimée à partir de la longueur par base dans un monobrin définie par Tinland *et al.* [22]. La longueur d'un monobrin de N bases est alors donnée par l'expression :

$$L_{Nbases}(nm) = 1,5(\text{espaceur}C6) + N \times 0,43 \quad (4.1)$$

On remarquera que les valeurs de longueur par base (définies tableau 2.1, chapitre 2) correspondent à des brins libres et en solution. Dans le cadre de ce travail, les conditions d'études sont différentes puisque d'une part la caractérisation est effectuée à l'air et d'autre part les brins sont immobilisés sur un substrat. Cependant, les études sur les brins d'ADN, présentées au chapitre 3, ont montré que l'on pouvait, en première approximation, attribuer la longueur mesurée à l'air à celle de la conformation correspondante en milieu liquide.

Ainsi, pour les sondes de 25 bases, on s'attend à une longueur de 12,3 nm. Or, sur les images obtenues après immobilisation, les différences de hauteur mesurées sont comprises entre 1,5 et 2,5 nm, soit des valeurs très inférieures aux 12,3 nm attendus. On peut donc en conclure que les sondes immobilisées sont **couchées** sur la surface de la puce, comme les molécules de silane.

En ce qui concerne les différences morphologiques mises en évidence pour ces sondes, la présence de trous observés de manière reproductible sur les sondes 25NC, avec une structure en dentelle plus ou moins aérée, n'est jamais observée sur les sondes 25C, qui semblent toujours se distribuer de manière homogène sur la surface. Ces morphologies ayant été obtenues sur l'ensemble des puces analysées, une dizaine environ, nous pouvons donc écarter tout effet des conditions de dépôt sur ces organisations. Il reste à discuter l'interaction entre molécules sondes au moment de l'immobilisation. Les sondes 25C et 25NC présentant des séquences totalement différentes, il est donc probable qu'elles interagissent différemment entre elles. Aussi, ces différences morpholo-

giques mettent-elles peut-être en évidence un effet lié à la séquence des bases.

L'organisation des sondes marquées par un groupement CY^3 s'avère très différente de celle observée sur les mêmes sondes 25C mais non marquées. Cette différence confirme l'influence des molécules mises en jeu et de leurs interactions latérales au moment du dépôt.

A plus petite échelle, les trois images reportées sur la figure 4.13 montrent que les trois dépôts obtenus avec les sondes 25C, 25NC et les sondes 25C marquées, possèdent tous une structure de base en îlots. Les îlots identifiés sur les plots des sondes non marquées présentent une forme légèrement allongée, on les caractérisera donc par deux grandeurs, une largeur et une longueur. Ainsi, des mesures statistiques sur les sondes 25C nous donne une longueur de $22,3 \text{ nm} \pm 1,3 \text{ nm}$ pour une largeur de $12,4 \text{ nm} \pm 0,9 \text{ nm}$ et pour les sondes 25NC, une longueur de $19,1 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$ et une largeur de $11,2 \text{ nm} \pm 0,7 \text{ nm}$. Du point de vue de l'organisation morphologique de ces îlots, on constate qu'ils apparaissent plutôt distants les uns des autres sur la zone des sondes 25NC, tandis que sur le plot des sondes 25C, ils semblent se chevaucher par endroit.

Les îlots observés dans la zone correspondant aux sondes $25C+CY^3$ ont quant-à eux un aspect différent. Ils sont de forme oblongue de taille caractéristique, environ $10 \times 50 \text{ nm}^2$, soit d'extension spatiale légèrement supérieure à ceux observés sur les sondes non marquées. Ils semblent plats sur le haut et se démarquent fortement les uns des autres.

Compte tenu des tailles extrêmement faibles des objets identifiés sur nos surfaces, environ 10 nm, il est indispensable de s'interroger quant-à l'impact de l'extension spatiale de nos pointes sur ces mesures. Aussi, pour poursuivre notre analyse il sera nécessaire de s'intéresser aux problèmes de dilatation de pointe sur des objets dont la taille caractéristique est proche de celle-ci. Un modèle couramment utilisé pour ces discussions est le modèle géométrique de dilatation d'une pointe d'extrémité sphérique avec un objet de section circulaire (on pourra se référer à l'article d'Ikai [23]). On peut modéliser la situation par le schéma de la figure 4.14.

Dans ce cadre, l'élargissement induit par la pointe est donné par l'expression :

$$W = \frac{4(Rc + Rm)\sqrt{Rm(Rc - Rm)}}{Rc} \quad (4.2)$$

pour $Rm \ll Rc$ où, Rc est le rayon de courbure de l'extrémité de la pointe, Rm le rayon de l'objet circulaire imagé et W l'élargissement résultant.

Dans notre cas, on approximera donc nos îlots par des objets de section circulaire, dont les rayons seront définis par la demi hauteur des îlots. En évaluant à partir des images les élargissements W des îlots liés à la dilatation de la pointe, on peut ainsi remonter à une valeur approximative du rayon de courbure des pointes utilisées durant ces expériences. Les résultats obtenus sont reportés

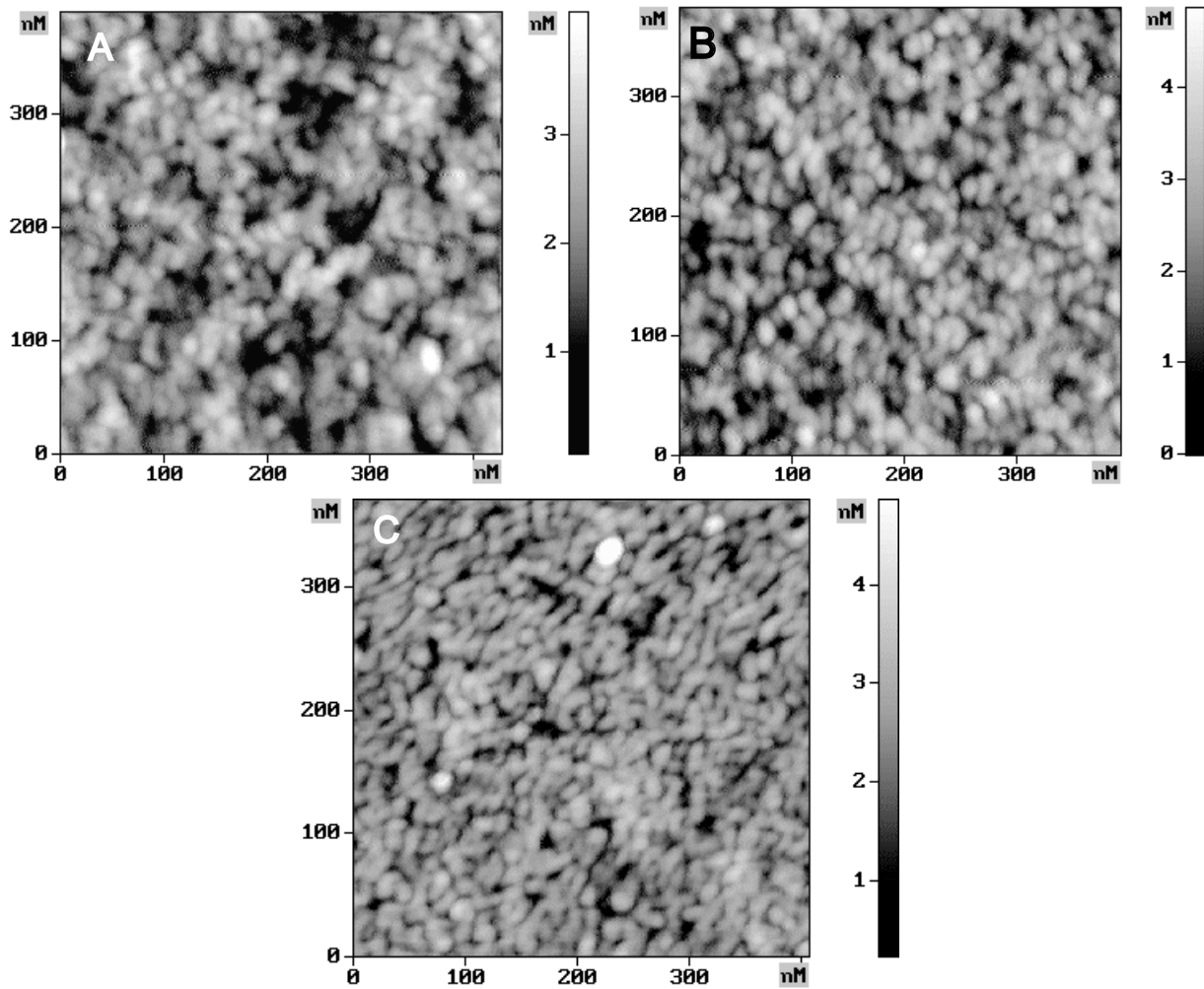


FIG.4.13 – Etude de l'immobilisation des sondes par AFM. Images de petite taille $400 \times 400 \text{ nm}^2$. A- les sondes 25C, B- les sondes 25NC et C- les sondes 25C + CY^3 .

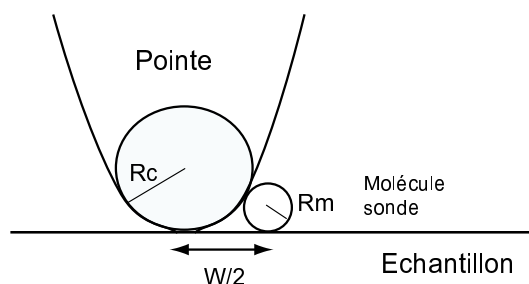


FIG.4.14 – Dilatation géométrique d'une pointe de rayon de courbure R_c avec un objet de section approximée circulaire de rayon R_m , conduisant à l'élargissement total noté W .

dans le tableau 4.3.

Sondes	Longueur -L et Largeur - W (nm)	Hauteur-H	Rc -rayon de courbure pointe
25C	W=12,4±0,9 nm - L=22,3±1,3 nm (38)	H = 1,5 nm	Rc=11,2 nm
25NC	W=11,2±0,7 nm - L=19,1±1 nm (40)	H = 1,8 nm	Rc=7,9 nm

TAB. 4.3 – Analyse de la taille des îlots observés sur les plots 25C et 25NC. Toutes les valeurs sont données en nanomètre. Les nombres indiqués entre parenthèses indiquent le nombre de points expérimentaux moyennés. Les valeurs de R_c ont été calculées à partir de l'expression 4.2.

L'évaluation du rayon de courbure ainsi opérée, montre que les pointes utilisées durant ces expériences possédaient de très bonnes spécifications. On notera tout particulièrement la valeur de 8 nm de rayon de courbure mesurée à partir d'une série d'images (dont une seule est présentée ici) sur le dépôt des sondes 25NC. Cette valeur, relativement faible, se trouve être inférieure aux spécifications données par le constructeur [24]. Pour la suite des discussions, considérons un rayon de courbure moyen de nos pointes de 10 nm.

Précédemment, nous avons indiqué que les sondes adoptaient probablement une configuration couchée sur la surface et que la longueur attendue pour un monobrin de 25 bases de long était de 12,3 nm. Aussi, les îlots observés ne peuvent-ils pas être chacun une sonde ?

Si l'on s'intéresse aux îlots observés sur le plot des sondes 25NC, on constate qu'ils possèdent une longueur de 19,1 nm et une largeur de 11,2 nm, l'image étant obtenue par l'intermédiaire d'une pointe de 8 nm de rayon de courbure. Or, la dilatation d'un objet de 12,3 nm de long avec une pointe de 8 nm de rayon de courbure donne une image de la longueur d'objet attendue autour de 20 nm. Ce qui est en bon accord avec la mesure de longueur obtenue pour les îlots. **Il semble donc que chaque îlot corresponde à une sonde.**

Par ailleurs, une évaluation de la densité surfacique des îlots a été effectuée sur plusieurs

images de petite taille, pour les plots 25C et 25NC. Le nombre d'îlots trouvés se situe entre 70 et 90 par aire de $200 \times 200 \text{ nm}^2$ pour ces deux plots, correspondant à une densité de l'ordre de $2 \pm 0,25 \cdot 10^{11} \text{ sondes/cm}^2$. Cette valeur se trouve être en parfait accord avec la densité surfacique de sondes mesurée par des mesures de radioactivité (marquage des sondes avec du ^{32}P). Une densité surfacique "macroscopique" moyenne de $2 \cdot 10^{11} \text{ sondes/cm}^2$ est alors évaluée [25]. Cette comparaison nous conforte donc dans notre interprétation où chaque îlot est associé à une sonde. Ainsi, ces résultats montrent que l'AFM permet d'opérer un comptage des sondes de 25 bases molécule par molécule et donc d'évaluer à l'échelle locale, la densité moléculaire en sondes immobilisées avec une bonne précision (erreur de 25%). **Ce résultat constitue la première caractérisation à l'échelle moléculaire de la densité en sonde immobilisée.** Ces expériences sont à rapprocher de l'étude publiée par A. Csàki *et al.* en 2001 [26] où ils opèrent un comptage des sondes immobilisées par l'intermédiaire de marqueur topographique, de billes d'or de 30 nm de diamètre.

Enfin, la forme oblongue des îlots observés sur les sondes marquées et leur taille légèrement plus importante, ne nous permettent de conclure sur l'identification du nombre de sondes qu'ils comprennent. Ces différences morphologiques peuvent être discutées autour de quelques hypothèses. La molécule de CY^3 étant une molécule très apolaire, une idée consisterait à considérer que dans la solution aqueuse, la partie comportant le chromophore aura tendance à fuir le solvant. Le regroupement des molécules sondes formant des structures de type micellaire serait alors favorisé avec les molécules fluorescentes (hydrophobes) au centre de l'assemblage et les chaînes de bases azotées (plus hydrophiles) à l'extérieur de la structure. Au moment du dépôt, ces structures fondées sur des interactions faibles vont pouvoir être conservées dès lors qu'une molécule de l'assemblage sera immobilisée. Les autres seront contraintes, du fait de cette interaction au sein de l'assemblage moléculaire, à s'ancrer à proximité de la première sonde fixée. Ceci permet donc la conservation de ces assemblages une fois les molécules sondes supportées sur la surface. Une question reste tout de même en suspens : quelle place occupe le chromophore dans cette configuration ?

On rappelle que la couche de molécules sondes marquées possède une épaisseur plus importante ($\Delta z = 2,5 \text{ nm}$) que celle mesurée sur les mêmes sondes non marquées ($\Delta z \leq 1,8 \text{ nm}$). Ceci nous invite, du fait de l'homogénéité de la hauteur des plateaux observés sur les sondes marquées, à supposer que la molécule fluorescente est couchée sur ou sous les sondes. La configuration où le chromophore serait couché sous les sondes apparaît plus plausible du fait que le substrat fonctionnalisé au moment du dépôt présente un caractère plutôt hydrophobe.

4.4.2 Analyses de systèmes complémentaires

Les analyses conduites sur les puces modèles à trois plots, ne comportant que des sondes de 25 bases de long, ont montré que la résolution moléculaire des sondes était accessible. Nous allons maintenant nous intéresser à des brins de différentes longueurs de manière à définir l'impact de la longueur des brins sur l'organisation des sondes et le niveau de résolution de nos expériences. Deux autres longueurs de brins ont ainsi été sélectionnées : des brins de 12 bases et des brins de 36 bases de long. De plus, l'organisation des sondes semble être caractéristique de l'interaction des sondes entre elles au moment du dépôt et donc probablement de la nature des séquences des monobrins d'ADN sélectionnés. Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, nous analyserons l'organisation du dépôt de sondes de séquence quasiment identique, à l'exception d'une base.

Plusieurs puces présentant des plots diversifiés en sondes ont ainsi été élaborées et étudiées par AFM. On résumera ici l'ensemble de ces études autour d'un modèle de puce à 4 plots. Ces puces comportent deux plots de sondes de 12 bases de long, dont les séquences sont identiques à une base près. On les appellera dans toute la suite 12C, "C" comme Complémentaire à la cible correspondante, la séquence $5' \text{AGC-CCG-GAG-GCA}^{3'}$ et 12NC, "NC" comme Non-Complémentaires, la séquence $5' \text{AGC-CCA-GAG-GCA}^{3'}$. Les deux autres plots se composent quant à eux de deux sondes de 36 et 37 bases de long de séquences totalement différentes, appelées 36C pour la séquence $5' \text{GTA-AAC-GTA-GTA-TAC-TCA-CGC-CAC-CTC-AAT-ATG-CAG}^{3'}$ et 37NC, $5' \text{ATT-CTG-ATC-GGT-ATT-TCG-ATC-TAA-GAT-CAA-ATG-CATT}^{3'}$ (voir figure 4.15).

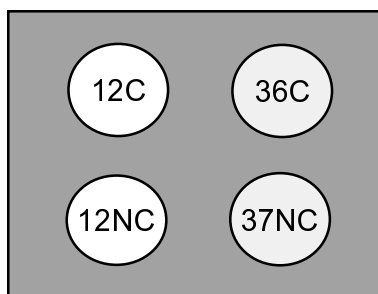


FIG.4.15 – Schéma des puces modèles complémentaires analysées. Elles comportent deux plots de sondes courtes de 12 bases : 12C et 12NC ne possédant qu'une base d'écart, et deux plots de sondes plus longues de 36 et 37 bases notés 36C et 37NC.

L'immobilisation a toujours été opérée suivant le protocole décrit au paragraphe 4.4.1, avec des solutions de concentration identique ($25\mu\text{M}$) pour l'ensemble des sondes étudiées.

A nouveau, l'étude d'images à grande échelle de $5000 \times 5000 \text{ nm}^2$ (voir fig. 4.16), rend compte de l'état de propreté des surfaces. Tandis que les plots des sondes de 12 bases font apparaître (images 4.16-A et -B), en particulier sur le plot 12NC, quelques impuretés en surface, aucune n'a

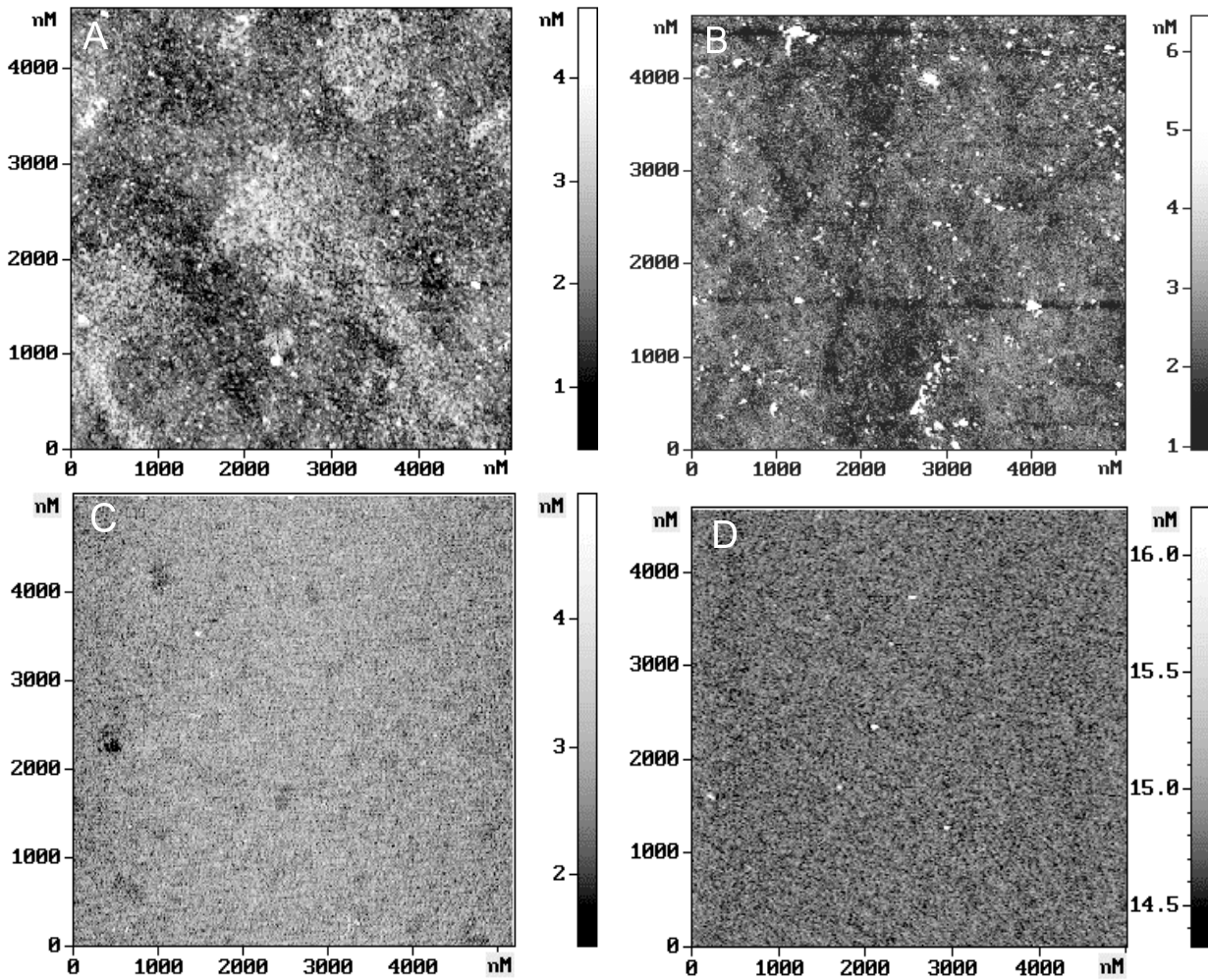


FIG.4.16 – Etude de l'immobilisation des sondes par AFM. Images de grandes tailles $5000 \times 5000 \text{ nm}^2$. A- les sondes 12C, B- les sondes 12NC, C- les sondes 36C, et D- les sondes 37NC.

été observée sur les plots de 36C et 37NC (figure 4.16-C et -D).

Les dépôts des sondes de 36 et 37 bases de long (images 4.16-C et -D) apparaissent parfaitement lisses et homogènes. Quelques petites taches plus sombres apparaissent sur l'image du dépôt des sondes 36C, correspondant à des régions de plus faible densité. Les stries observées sur la silice ayant ici totalement disparu, les sondes semblent donc napper parfaitement la surface. En ce qui concerne les sondes de 12 bases, leur dépôt est moins homogène, s'agrégeant par endroit en plateaux plus denses, particulièrement visibles sur l'image 4.16-A.

A moyenne échelle, on obtient les images caractéristiques présentées sur la figure 4.17-A à D.

Du point de vue morphologique, les sondes de 12 bases décrites par les images 4.17-A et -B, présentent une organisation en petits îlots, d'épaisseur environ 1,2-1,3 nm, distribués de manière homogène sur la surface. Cette organisation est proche de celle observée sur les sondes 25C (voir

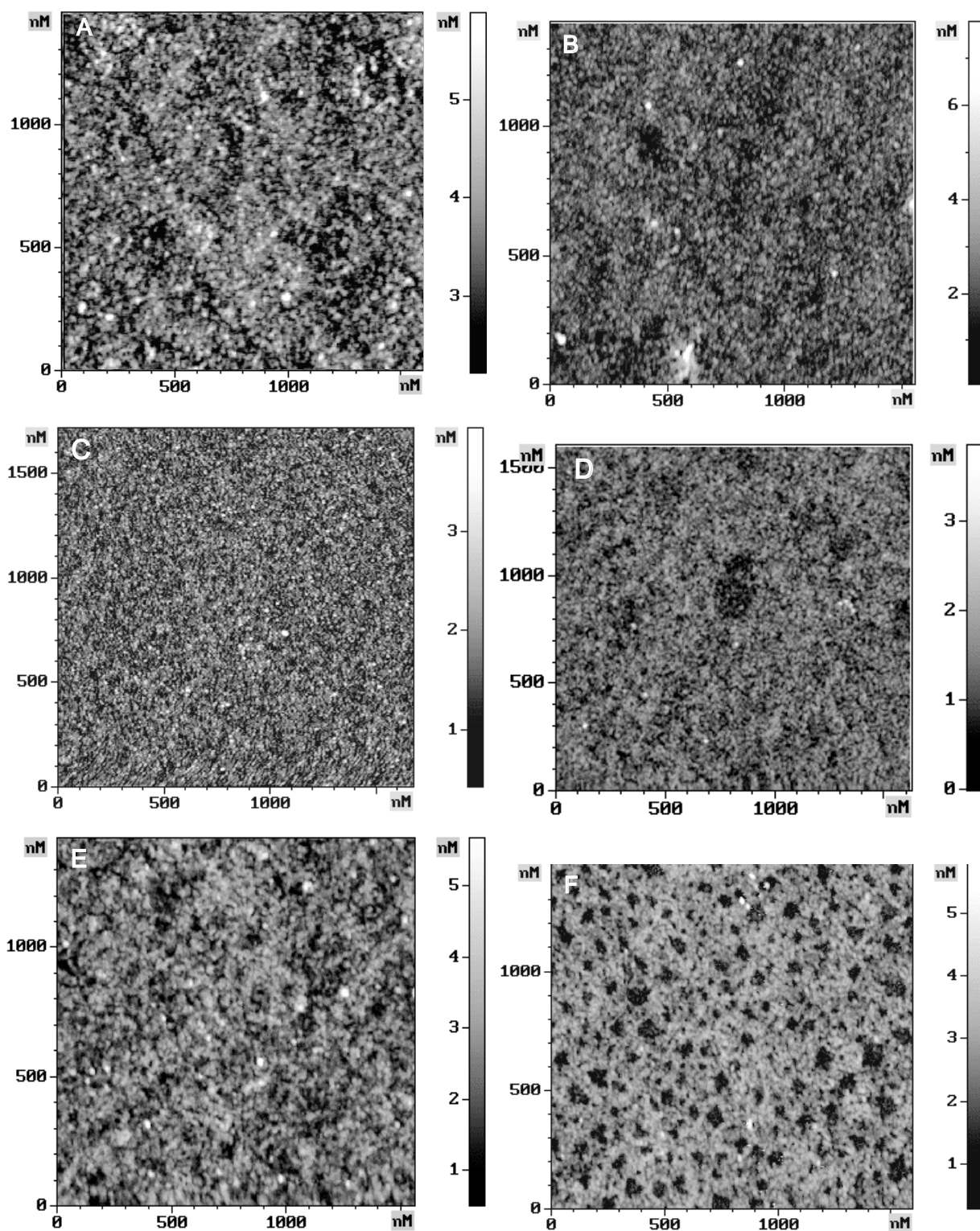


FIG.4.17 – Etude de l'immobilisation des sondes par AFM. Images de taille moyenne $1600 \times 1600 \text{ nm}^2$ des sondes A- 12C, B- 12NC, C- 36C, D- 37NC, en référence à la morphologie des sondes 25C image E-.

image 4.17-E). Les sondes de 36 bases de long possèdent également une structure en îlots, dont l'identification à cette échelle semble plus délicate. L'image 4.17-D, met en évidence en son centre un trou de $300 \times 200 \text{ nm}^2$, illustrant probablement une densité en sondes immobilisées plus faible que la zone présentée sur le dépôt de sondes 36C (image 4.17-C). Les îlots possèdent ici une épaisseur de 1,1 à 1,2 nm, égale à celle mesurée sur les îlots des sondes de 12 bases. La rugosité (RMS) de ces couches (sondes 36C et 37NC) est située autour de 0,4 nm, valeur plus faible que celle mesurée sur l'ensemble des autres dépôts de sondes. Cette diminution de la rugosité (RMS) de surface est à rapprocher de l'homogénéité des dépôts constitués sur les sondes de 36 et 37 bases de long, dont la caractérisation des îlots apparaît plus difficile à analyser.

Les principales grandeurs caractéristiques obtenues sur les différents plots sont reportées dans le tableau 4.4.

Sondes	12C	12NC	36C	37NC	25C	25NC	Silanes
Δz (nm)	$1,2 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,1$
RMS (nm)	0,47	0,49	0,4	0,39	0,45	0,55	0,27

TAB. 4.4 – *Tableau récapitulatif des caractéristiques des différentes sondes : mesure de la hauteur des îlots et de la rugosité (rms) des dépôts des sondes 12C, 12NC, 36C, 37NC en référence avec celles obtenues sur les sondes 25C, 25NC et les silanes (images de $1600 \times 1600 \text{ nm}^2$).*

Aussi, les mesures effectuées sur les sondes de 12 et 36 bases de long mettent-elles en évidence à nouveau une différence morphologique entre l'état de surface avant et après immobilisation des sondes. L'augmentation de la rugosité (RMS) de 0,27 nm à des valeurs supérieures à 0,4 nm, ainsi que l'augmentation du contraste vertical qui passe de 0,5 nm sur les silanes à environ 1,2 nm sur les dépôts des sondes traduisent bien la présence des sondes. La longueur des sondes ne semble pas jouer sur l'épaisseur de la couche, car les sondes de 12 et 36 bases de long conduisent à un dépôt d'épaisseur identique de 1,2 nm, tandis que les sondes de 25 bases possèdent une épaisseur de 1,5 à 1,8 nm. Or, si l'on se reporte à l'expression 4.1, on évalue la longueur des sondes de 12 bases à 6,7 nm et celle des sondes de 36 bases à 17 nm. On constate alors que les différences de hauteur mesurées sont toujours bien inférieures aux longueurs des molécules sondes. On peut donc en déduire que l'ensemble des sondes dans nos études occupent une conformation **couchée** sur la surface.

Par ailleurs, l'organisation des sondes semble dans la quasi totalité des cas constituer une couche homogène d'îlots de petite taille, dont on a vu qu'ils étaient attribuables aux molécules sondes pour les oligonucléotides de 25 bases (voir partie puces à 3 plots, 4.4.1). Seules les sondes 25NC possèdent une organisation différente, s'arrangeant autour d'une structure en dentelle, où les

sondes semblent se repousser les unes les autres. Dans la partie précédente, nous avons avancé le fait que cette différence pouvait peut-être trouver son origine dans une interaction entre molécules au cours du dépôt. Or, l'étude des morphologies observées sur les plots des sondes de 12 bases, 12C et 12NC, qui ne possèdent qu'une base d'écart, s'avère identique ce qui semble conforter notre hypothèse. En revanche, les sondes 36C et 37NC, qui possèdent des séquences respectives totalement différentes l'une de l'autre, conduisent toutes les deux à la formation d'une distribution homogène d'îlots constituant les plots.

Cette étude montre qu'un travail plus poussé s'avère indispensable pour mieux comprendre l'origine des interactions laterales entre molécules.

L'analyse à petite échelle réalisée sur les puces à quatre plots est présentée sur les images de la figure 4.18. Elles montrent que la structure commune en entités îlots observée sur les sondes de 25 bases, se retrouve également sur les sondes de 12 et 36 bases.

Les îlots identifiés sur le dépôt des sondes 12C et 12NC présentent non plus une forme allongée comme on a pu l'observer sur les sondes de 25 bases, mais possèdent une géométrie circulaire de $11,1 \pm 0,5$ nm de diamètre pour les sondes 12C et de $10 \pm 0,6$ nm pour les sondes 12NC. Ces îlots sont distribués de manière homogène sur la surface et sont bien distincts les uns des autres. A l'inverse, les îlots des sondes de 36 bases présentent une forme allongée, comme on a pu l'observer sur les sondes de 25 bases. On définit pour ces îlots les caractéristiques suivantes : longueur de $15 \text{ nm} \pm 0,5$ nm et largeur de $8,9 \text{ nm} \pm 0,3$ nm pour les sondes de 36C et longueur de $19,33 \text{ nm} \pm 0,8$ nm et largeur de $11 \text{ nm} \pm 0,3$ nm pour les sondes de 37NC. Leur distribution en surface est relativement homogène et d'apparence moins dense que celle observée sur les sondes plus courtes de 12 et 25 bases.

Ainsi, les sondes de 12 bases présentent une structure en îlots de plus petites tailles que ceux observés sur les sondes de 25 et 36 bases de long. En revanche, les îlots observés sur les sondes de 36 bases possèdent une extension spatiale équivalente à celle des sondes de 25 bases. La suite de l'analyse de ces images nécessite d'opérer une évaluation des contributions de la pointe à l'extension spatiale des objets, à l'aide du petit modèle géométrique de dilatation déjà utilisé section 4.4.1. Les données obtenues sont résumées dans le tableau 4.5.

Les rayons de courbure des pointes utilisées lors des études sur les sondes de 12 bases sont estimés entre 10 et 11 nm. En dépit du fait que les spécifications de ces pointes sont tout à fait remarquables, elles ne nous garantissent pas d'atteindre la résolution moléculaire sur les sondes de 12 bases, qui sont extrêmement courtes ($l = 6,7$ nm, avec l'espaceur). Ainsi, sur les sondes de 12 bases de long un îlot peut contenir une ou deux sondes.

En ce qui concerne les sondes de 36 bases de long ($l = 17$ nm), un raisonnement similaire peut

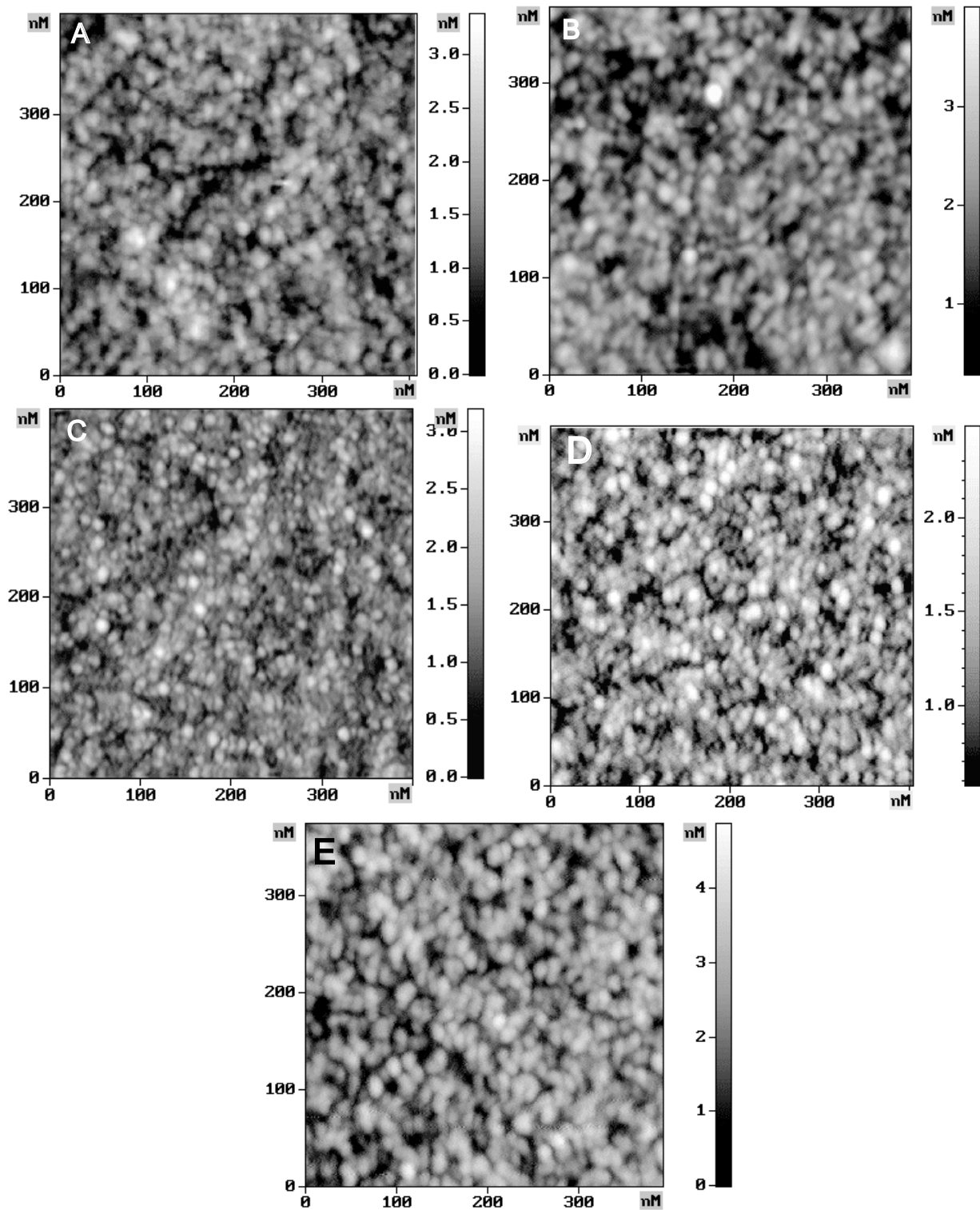


FIG.4.18 – Etude de l'immobilisation des sondes par AFM. Images de taille moyenne $400 \times 400 \text{ nm}^2$ des sondes A- 12C, B- 12NC, C- 36C, D- 37NC, en référence à la morphologie des sondes 25NC images E-.

Sondes	Longueur -L et Largeur - W (nm)	Hauteur-H	Rc -rayon de courbure pointe
12C	W=11,1±0,5 nm (16)	H = 1,3 nm	Rc=11,2 nm
12NC	W=10±0,6 nm (32)	H = 1,2 nm	Rc=9,8 nm
36C	W=8,9±0,3 nm - L=15±0,5 nm (17)	H=1,2 nm	Rc=7,7 nm
37NC	W=11±0,3 nm - L=19,33±0,8 nm (12)	H=1,1 nm	Rc=12 nm
25NC	W=11,2±0,7 nm - L=19,1±1 nm (40)	H = 1,8 nm	Rc=7,9 nm

TAB. 4.5 – Bilan des tailles d'îlots mesurées sur les plots 12C, 12NC, 36C, 36 NC et 25NC des puces. Toutes les valeurs sont données en nanomètre. Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de points expérimentaux moyennés. Les valeurs de Rc ont été calculées à partir de l'expression 4.2.

être conduit. Les pointes utilisées possédant également de bonnes spécifications, entre 7 et 12 nm pour le rayon de courbure, on peut en conclure que chaque îlot observé peut être associé à une molécule sonde. A nouveau pour les sondes de 36 et 37 bases de long, **la résolution moléculaire** a pu être atteinte.

Cependant, un fait marquant est qu'elles apparaissent plus courtes que celles de 25 bases de long, alors que le rayon de courbure des pointes utilisées reste du même ordre de grandeur. Plus surprenant, la longueur moyenne évaluée sur les sondes 36C est inférieure à la longueur attendue pour une sonde de 36 bases étendues qui est de 17 nm (avec l'espaceur de 1, 5 nm). Pour justifier ce résultat, une hypothèse serait de considérer que les sondes n'occupent pas une conformation complètement étendue mais qu'elles soient légèrement repliées sur elles-mêmes. Cette hypothèse s'appuie sur des travaux de Steel et al.[27], dans lesquels ils ont étudié l'effet de la longueur des sondes sur leur organisation au sein d'une couche immobilisée. Ils montrent que le taux de couverture en sondes immobilisées sur une surface d'or thiolée diminue quand la longueur des sondes augmente. Ils expliquent cet effet par une configuration polymérique des sondes de longueur supérieure à 24 bases, qui peuvent donc prendre des formes de pelote, induisant ainsi une réduction de la longueur apparente et une diminution du taux d'ancrage des sondes. Ainsi, la légère diminution de la densité en sondes immobilisées observée sur les images AFM pour les sondes de 36 bases (figure 4.18-C et D) et la réduction de leur taille apparente sont en bon accord avec l'interprétation donnée par Steel *et al.* [27]. On retiendra cette explication pour justifier la réduction de la taille des îlots observée dans le cas des sondes de 36 bases.

Conclusions

L'étude de l'ensemble des étapes de préparation des puces à ADN a été réalisée suivant une procédure d'analyse étape par étape, par comparaison de la morphologie des couches obtenues à l'issue de chacune des phases. Dans le cadre de notre travail, ces analyses successives ont permis de sélectionner les protocoles de préparation conduisant à l'état de surface répondant aux deux critères énoncés au début de cette partie : une bonne homogénéité des protocoles à l'échelle du micron ainsi qu'une rugosité des couches la plus faible possible. Ainsi, la préparation des puces a rapidement été orientée vers l'élaboration de la couche d'accrochage sur les substrats de silice thermique suivant les protocoles d'imprégnation. A l'issue de la phase de silanisation, il a été montré que les molécules de la couche d'accrochage constituée étaient couchées sur la surface ($\Delta z=0,5$ nm), permettant ainsi de conserver une rugosité (RMS) proche de celle du substrat, évaluée à 0,24 nm. L'étude de la phase d'immobilisation a montré que les molécules sondes modifiaient considérablement la morphologie de la surface, apparaissant organisée autour d'îlots de petite taille, diamètre ~ 10 nm, et d'épaisseur comprise entre 1 et 2 nm. Ces résultats montrent que, comme pour les silanes, les sondes apparaissent couchées sur la surface. L'immobilisation conduit par ailleurs à une augmentation de la rugosité (RMS) de 0,24 nm à des valeurs autour de 0,5 nm, traduisant ainsi la présence des sondes.

L'originalité de ce travail réside dans la caractérisation des sondes à l'échelle moléculaire. En effet, la seule approche quantitative de l'immobilisation de sondes publiée à ce jour concerne des sondes possédant un marqueur topographique, des billes d'or de 30 nm de diamètre. Ceci avait permis à A. Csàki *et al.* [28] de contourner la difficulté de la résolution latérale liée au rayon de courbure des pointes. Dans notre étude, la **résolution moléculaire sur les sondes de longueur supérieure ou égale à 25 bases a été obtenue**, permettant d'accéder à la densité de sondes immobilisées, à l'échelle microscopique, par un comptage à partir des images AFM des molécules sondes. On retrouve la densité en sondes évaluées par mesure de radioactivité de $2 \pm 0,25 \cdot 10^{11}$ sondes/cm², valeur qui se trouve être en parfait accord avec des mesures macroscopiques réalisées par radioactivité. Notre étude montre que l'AFM s'avère être un outil très performant pour caractériser de manière quantitative le nombre de sondes immobilisées par une caractérisation morphologique directe sans avoir recours à l'utilisation de marqueurs topographiques.

Enfin, la longueur des sondes et la nature des séquences des monobrins sondes sont apparues comme deux paramètres jouant un rôle fondamental sur l'organisation des couches déposées et donc la morphologie observée. En effet, les tailles caractéristiques mesurées sur îlots-sondes de 36 bases se sont avérées inférieures à celles rapportées sur les sondes de 25 bases. Cet effet

s'explique par un phénomène de repliement des monobrins sondes sur eux-mêmes, tel qu'on peut le trouver dans le cas des polymères, dès qu'ils dépassent une taille critique située autour de 25 bases. En revanche, l'analyse des effets des interactions entre molécules au moment du dépôt a montré un effet notoire de la présence ou non de chromophore, ainsi qu'un rôle important de la nature des séquences sur l'organisation des sondes immobilisées. Ainsi, deux séquences quasiment identiques, comme celles des sondes 12C et 12NC, conduisent à deux dépôts identiques. Au contraire, deux séquences totalement différentes comme les sondes 25C et 25NC conduisent à deux arrangements totalement différents des sondes. Ces études ne constituent que les premières constatations d'un effet séquence observé à l'échelle moléculaire et nécessitent d'être poursuivies.

Bibliographie

- [1] J. Wang and A. J. Bard, Monitoring DNA Immobilization and Hybridization on Surfaces by Atomic Force Microscopy Force Measurements, *Analytical Chem.*, 73, p.2210, 2001.
- [2] R. Lenigk, M. Carles, N. Y. Ip, and N. J. Sucher, Surface Characterization of a Silicon-Chip-Based DNA Microarray, *Langmuir*, 17(8), p.2499, 2001.
- [3] T. Tütte, K. Saal, I. Kink, A. Kurg, R. Löhmus, U. Mäeorg, M. Rahi, A. Rinke, A. Löhmus, Preparation of smooth siloxane surface for AFM visualisation of immobilized biomolecules, *Surface Science*, 532-535, p.1085, 2003.
- [4] E. Casero, M. Darder, D. J. Diaz, F. Pariente, J. A. Martin-Garo, H. Abruna and A. Lorenzo, XPS and AFM Characterization of Oligonucleotides Immobilized on Gold Substrates, *Langmuir*, 19, p.6230, 2003.
- [5] L. Henke, N. Nagy and U. J. Krull, An AFM determination of the effects on surface roughness caused by cleaning of fused silica and glass substrates in the process of optical biosensor preparation, *Biosensors and Bioelectronics*, 17, p.547, 2002.
- [6] V. Dugas, Immobilisation d'oligonucléotides par greffage sur silice pour la réalisation de puce à ADN, *Thèse de l'Ecole Centrale de Lyon*, 2001.
- [7] V. Dugas, G. Depret, Y. Chevalier, X. Nesme, E. Souteyrand, Immobilisation of single-strands DNA fragments to solid surface and their repeatable specific hybridization. Covalent binding or adsorption, *Sensors and Actuators B*, 101, p.112, 2004.
- [8] Inventeur : V. Dugas, Y. Chevalier and E. Souteyrand, N = 0109082 - Brevet déposé le 9 juillet 2001, *Procédé de fonctionnalisation de supports solides, support solides fonctionnalisés et leurs applications*.
- [9] Mark E. McGovern, Krishna M. R. Kallury, and Michael Thompson, Role of Solvent on the Silanization of Glass with Octadecyltrichlorosilane, *Langmuir*, 10, p.3607, 1994.

- [10] J. V. Davidovits, V. Pho, P. Silberzan and M. Goldmann, Temperature influence on the formation of silanized monolayers on silica : an atomic force microscopy study, *Thin Solid Film*, 352-354, p.369, 1996.
- [11] David W. Britt and Vladimir Hlady, An AFM Study of the Effects of Silanization Temperature, Hydration, and Annealing on the Nucleation and Aggregation of Condensed OTS Domains on Mica, *J. Colloid and Interface Sci.*, 178, p.775, 1996.
- [12] M. Goldmann, J. V. Davidovits and P. Silberzan, Kinetics of self-assembled silane monolayers at various temperatures : evidence of 2D foam, *Thin Solid Film*, 327-329, p.166, 1998.
- [13] J. B. Brzoska, I. Ben Azouz, and F. Rondelez, Silanization of Solid Substrates : A Step Toward Reproducibility, *Langmuir*, 10, p.4367, 1994.
- [14] J. B. Brzoska, N. Shahidzadzeh, and F. Rondelez, Evidence of a transition temperature for the optimum deposition of grafted monolayer coating, *Nature*, 360, p.719, 1992.
- [15] K. Iimura, Y. Nakajima and T. Kato, A study on structures and formation mechanisms of self-assembled monolayers of n-alkyltrichlorosilanes using infrared spectroscopy and atomic force microscopy, *Thin Solid Films*, 379, p.230, 2000.
- [16] H. Brunner, T. Vallant, U. Mayer, H. Hoffmann, B. Basnar, M. Vallant, and G. Friedbacher, Substrate Effects on the Formation of Alkylsiloxane Monolayers, *Langmuir*, 15, p.1899, 1999.
- [17] Y. -Z. Du, Laurie L. Wood and S. S. Saavedra, Growth behavior and structure of alkyltrichlorosilane monolayers bearing thioacetate and acetate tailgroups , *Materials Science and Engineering : C*, 7, p.161, 2000.
- [18] K. Bierbaum, M. Grunze, A. A. Baski, L. F. Chi, W. Schrepp, and H. Fuchs, Growth of Self-Assembled n-Alkyltrichlorosilane Films on Si(100) Investigated by Atomic Force Microscopy, *Langmuir*, 15, p.2143, 1995.
- [19] J. Israelachvili, Intermolecular and surface forces, *Ed. Academic Press*, 1992.
- [20] F. Bessueille, Contribution à l'élaboration et à la lecture des puces à ADN, *Thèse de l'Ecole Centrale de Lyon*, 2001.
- [21] M. Bras, Validation et caractérisation de la lecture des puces à ADN par spectroscopie de fluorescence, *Thèse de l'Université Claude Bernard-Lyon1*, 2001.

- [22] B. Tinland, A. Pluen, J. Sturm, and G. Weill, Persistence Length of Single-Stranded DNA, *Macromolecules*, 30, p.5763, 1997.
- [23] A. Ikai STM and AFM of bio/organic molecules and structures, *Surface Science Reports*, 26, p261, 1991.
- [24] Pointe UltraSharp, leviers NCS12 www.spmtips.com.
- [25] V. Dugas, Y. Chevalier, G. Dupret, X. Nesme and E. Souteyrand The immobilisation of DNA strands on silica surface by means of chemical grafting *Progr Colloid Polymer Sci.*, 123, 2004.
- [26] A. Czàki and R. Müller and W. Straube and J.M. Köhler and W. Fritzsche, DNA monomayer on gold substrates characterized by nanoparticle labeling and scanning force microscopy *Nucleic. Acids Research*, 16, p.e81, 2001.
- [27] A. B. Steel, R. L. Levicky, T. M. Herne, and M. J. Tarlov, Immobilization of Nucleic Acids at Solid Surfaces : Effect of Oligonucleotide Length on Layer Assembly, *Biophys. J.*, 79, p.975, 2000.
- [28] A. Czàki and R. Müller and W. Straube and J.M. Köhler and W. Fritzsche, DNA monomayer on gold substrates characterized by nanoparticle labeling and scanning force microscopy, *Nucleic. Acids Research*, 16, p.e81, 2001.

Chapitre 5

Etude expérimentale des puces hybridées par AFM

La finalité des puces à ADN étant d'opérer la reconnaissance de séquences de brins inconnus en solution, une seconde partie de ce travail a été consacrée à la lecture de tests d'hybridation par microscopie à force atomique. L'ensemble de ces tests a été réalisé sur les puces modèles présentées précédemment. L'objectif de cette étude était dans un premier temps de tester si l'AFM permettait de réaliser la lecture d'un test d'hybridation et, si oui, quelle précision pouvait être atteinte. L'étude morphologique conduite jusqu'à présent a donc été poursuivie jusqu'à la lecture de tests d'hybridation. Enfin, on présentera quelques essais de manipulations par pointe.

Pour l'ensemble de l'étude morphologique les conditions expérimentales seront identiques à celles utilisées jusqu'à présent et définies dans le chapitre 1. En revanche, elles seront très différentes pour les études par nanomanipulation, on les précisera au moment de la description de chacune des expériences effectuées.

5.1 Analyses de tests d'hybridation par AFM

L'étude a été guidée par l'analyse de l'influence de deux paramètres : la longueur et la "nature" des brins cibles utilisés. Ainsi, trois longueurs de brins ont été testées : 84, 600 et 1500 bases de long. En ce qui concerne la nature des brins cibles, deux caractéristiques principales seront à prendre en compte : la présence ou non de molécules fluorescentes le long du brin, ainsi que la configuration monobrin ou double brin des cibles utilisées. Les caractéristiques seront détaillées au moment de la présentation des résultats.

5.1.1 Les systèmes étudiés

Les trois cibles utilisées sont présentées ci-dessous. Le schéma de la figure 5.1 met en évidence le positionnement de la zone d'hybridation sur le brin cible.

a- Les cibles de 1500 bases complémentaires des sondes 25C :

La cible de 1500 bases de long est issue de réaction d'amplification sur le gène 16S de l'*Agrobacterium Tumefaciens* (bactérie des sols) souche B6 par PCR. Ces brins possèdent une séquence de 1500 bases de long et s'hybrident avec les sondes de 25C, de la base n° 185 à la base n° 210 (Sens antiparallèle : 3' - 5'). Les brins cibles utilisés seront de plusieurs types : **doubles brins monomarqués** (ne possèdent qu'un groupement fluorescent CY³, comme sur la figure [1]) ou **doubles brins multimarqués CY³ (possèdent plusieurs groupements fluorescents par molécule)** (voir figure : 5.1-a) [1].

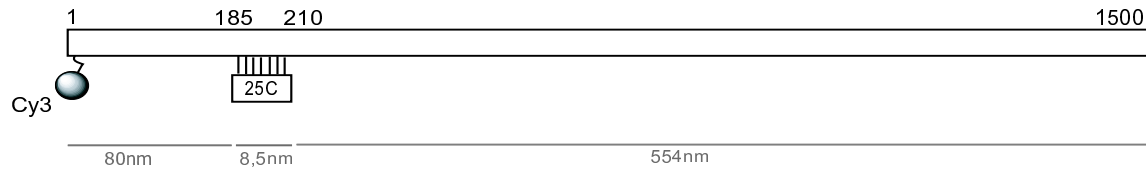
b- Les cibles de 600 bases complémentaires des sondes 36C :

La cible correspondante aux sondes 36C est un **monobrin** de 600 bases de long. On notera que la position de la zone d'hybridation est située à 164 bases de la terminaison 3' des brins (voir figure : 5.1-b). Ces brins sont élaborés par synthèse enzymatique, à l'aide de la *Reverse Transcriptase*, à partir de brins issus d'une bactérie symbiotique du puceron appelée Buchnera. Il s'agit donc de **monobrins non marqués ou multimarqués** . Dans le cas où les brins sont marqués, les groupements fluorescents sont exclusivement portés par les bases Thymine. Un comptage à l'issue de la synthèse donne un taux de 90% de thymines marquées, ainsi en moyenne, 24% de la longueur de la séquence totale est marquée. La taille des cibles est donnée avec une distribution de ± 100 bases autour de la longueur de 600 bases, correspondant à une progression plus ou moins avancée de l'enzyme en fin de synthèse [2]. Le sens de propagation de l'enzyme étant de 5' en 3' sur l'ARN complémentaire à notre brin, on ne peut donc connaître avec précision la position de la zone d'hybridation que par rapport à l'extrémité 3' du brin.

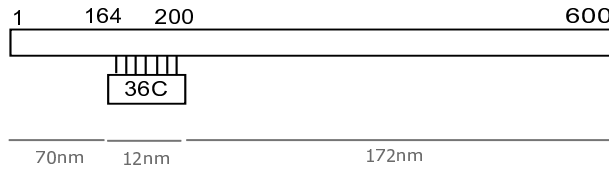
c- Les cibles de 84 bases de long complémentaires des sondes 12C :

La cible correspondante aux sondes 12C est un **monobrin** de 84 bases de long, monomarqué avec une molécule de CY³ dont la séquence est : - CY³-5' TGG-GCT-CCT-GTC-TTA-CAG-GCC-CTG-CCT-CCG-GGC-TCA-CCT-CGC-TGT-GAC-CTG-AAG-GAG-AAT-CTG-CTG-AAG-GAT-AAC-TGT-GCC-CCA^{3'}. La portion de séquence en gras indique le lieu de l'hybridation avec la sonde complémentaire 12C (voir figure : 5.1-c). Ces monobrins sont préparés par synthèse chimique.

(a) 1500 bases :



(b) 600 bases :



(c) 84 bases :

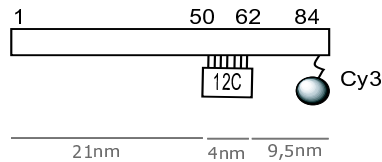


FIG.5.1 – Trois systèmes ont été étudiés : (a) des sondes de 25 bases de long, avec une cible correspondante de 1500 bases, (b) des sondes de 36 bases de long, avec une cible de 500 bases, et (c) des sondes de 12 bases de long, avec une cible correspondante de 84 bases. Les cibles sont présentées dans le sens 3' - 5'.

5.1.2 Protocoles d'hybridation

Les cibles nous sont fournies sous forme lyophilisée. Avant toute opération, elles seront donc solubilisées dans une solution de $[SSC5X] = 0,1M$ (SSC5X : 0,75 M de NaCl et 0,075M de SSC- Salt Sodium Citrate) et SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) 0,1% en masse, afin d'obtenir une solution de concentration 10^{-6} Mol (moles de brins par litre de solution) à pH de 8,5.

La phase d'hybridation effective est opérée en étalant une goutte de $50 \mu L$ sur la puce, placée entre lame et lamelle. La puce est alors placée dans un réacteur à $T_m - 5^\circ C$, où T_m est la température de fusion de chacune des cibles, sous une atmosphère saturée en vapeur d'eau, pendant environ 2 heures. Les puces sont ensuite abondamment lavées avec une solution de SSC2X (SSC2X : 0,3 M de NaCl et 0,03M de SSC- Salt Sodium Citrate) et finalement rincées brièvement à l'eau de manière à retirer les sels.

Lorsque les brins à hybrider sont fournis sous forme de doubles brins (c'est en particulier

le cas de brins de 1500 bases de long) une étape supplémentaire est nécessaire avant la phase d'hybridation. Il s'agit de la dénaturation des brins. Pour ce faire, la solution d'hybridation est chauffée à 95°C pendant 10 minutes de manière à briser les liaisons hydrogènes établies entre les deux brins hybridés. On obtient ainsi la séparation du double brin en deux monobrins isolés. La solution est ensuite immédiatement déposée sur la puce et le processus d'hybridation peut débuter.

On pourra remarquer que les conditions d'hybridation des puces à ADN retenues dans le cadre de ce travail sont assez différentes des protocoles généralement rencontrés, dans lesquels la phase d'hybridation dure souvent beaucoup plus longtemps, environ douze heures. Notre objectif consiste à optimiser les conditions d'hybridation. En choisissant des temps courts, on favorise l'hybridation spécifique aux dépens de l'adsorption des molécules cibles sur la puce. Par ailleurs, les abondants rinçages contribuent à retirer les brins qui malgré tout se seraient adsorbés. En définitive, on pourra supposer que, dans ces conditions, tout brin cible présent sur la puce est hybridé.

Pour contrôler le bon déroulement des processus d'hybridation, les puces, dont les cibles sont marquées, seront analysées par microscopie de fluorescence.

5.1.3 Hybridation de doubles brins de 1500 bases

Les premières études sur l'hybridation ont été réalisées avec des brins de grande taille, brins de 1500 bases, de manière à s'affranchir autant que possible des problèmes de résolution. Comme nous l'avons dit plus haut, ces brins sont des brins issus de PCR et nous ont été fournis sous forme de **doubles brins**. L'étape de dénaturation par chauffage a donc été réalisée avant d'opérer la phase d'hybridation.

La figure 5.2 présente une caractérisation par microscopie de fluorescence d'une puce après le processus d'hybridation et les rinçages. Seuls les plots correspondant aux sondes 25C et 25C+CY³ renvoient un signal de fluorescence. Si, sur le plot 25C+CY³, le signal est principalement dû aux sondes, sur le plot 25C, il est représentatif de l'hybridation. Toutefois, le niveau de signal d'hybridation est relativement faible, $S_{hybrid}=0,075$ u.a., et ne se situe que très légèrement au dessus du niveau de bruit $S_{bruit}=0,045$ u.a. La densité en brins hybridés avoisine donc la limite de résolution de la microscopie de fluorescence, soit une densité de brins hybridés de l'ordre de 10^8 brins/cm².

La figure 5.3 présente les images AFM obtenues sur la zone hybridée des sondes 25C.

L'image de grande taille, fig. 5.3-A, met aisément en évidence un nombre important de brins, couchés sur la surface. Ces brins sont distribués de manière homogène sur la surface et présentent des orientations aléatoires. Du point de vue morphologique, ils apparaissent tantôt isolés, tantôt ils

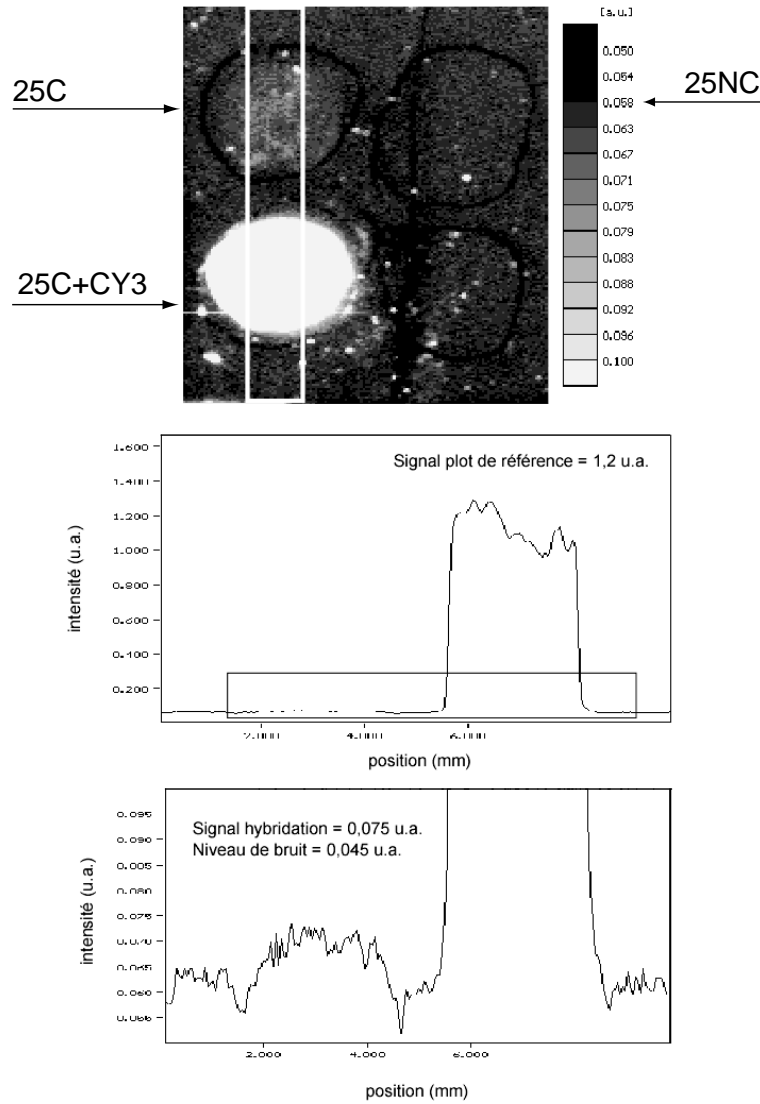


FIG.5.2 – Spectre de fluorescence obtenu après hybridation des molécules cibles de 1500 bases de long. Le niveau de signal obtenu sur le plot hybridé est de 0,075 u.a. pour un niveau de bruit de 0,045 u.a. avec comme signal de référence celui obtenu sur les sondes marquées qui est le 1,2.

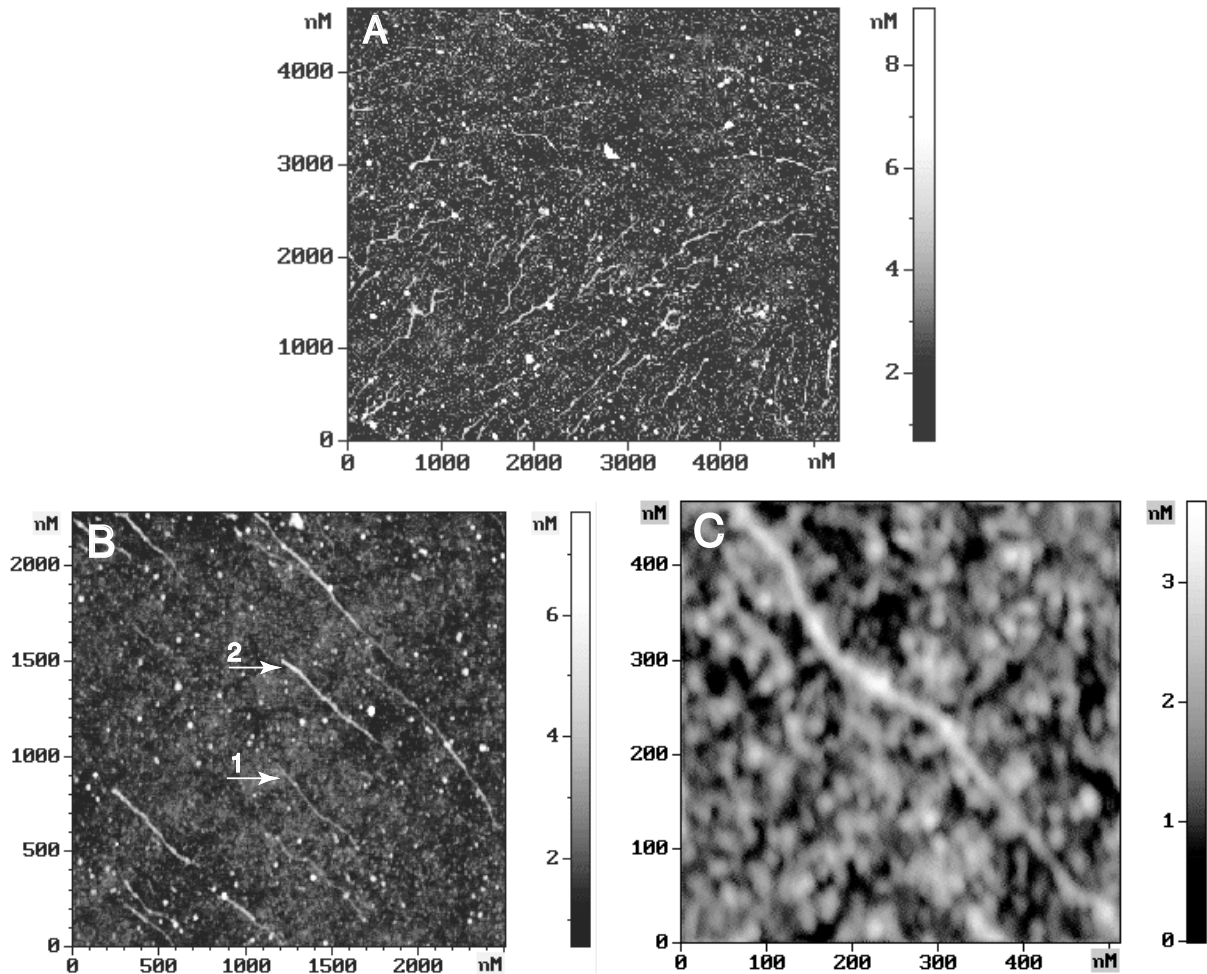


FIG.5.3 – Images AFM, obtenues après hybridation de brins monomarqués de longueur 1500 bases. A- A grande échelle : $5000 \times 5000 \text{ nm}^2$, à moyenne échelle : $2500 \times 2500 \text{ nm}^2$ et enfin -C à petite échelle $400 \times 400 \text{ nm}^2$

se chevauchent conduisant à des structures plus complexes, observables en particulier sur la partie centrale de l'image. Une mesure statistique du nombre de brins hybridés, sur plusieurs images, donne une densité des brins hybridés de $5 \text{ brins}/\mu\text{m}^2$, ce qui équivaut à $5 \cdot 10^8 \text{ brins}/\text{cm}^2$.

L'image 5.3-B, de plus petite taille, rend compte avec plus de détails des conformations prises par ces brins. Dans cette zone, contrairement à l'image de grand format, les brins semblent tous être orientés dans la même direction. Cet effet provient probablement des conditions de rinçages pratiqués sur la puce. Une analyse plus précise de ces brins montre qu'ils ne présentent pas tous les mêmes caractéristiques. Deux catégories peuvent être identifiées : des brins identiques à celui indiqué par la flèche 1, possédant une longueur moyenne d'environ 650 nm, une largeur de 12 nm, avec sur une grande partie de leur longueur une hauteur de 1 nm. On remarquera aux 5/6 de

la longueur du brin une petite zone de contraste plus claire de hauteur 2 nm. La flèche 2 indique le second type de brins qui possèdent quant à eux une longueur comprise entre 550 et 650 nm, une largeur de 22 nm, et une hauteur plus importante située entre 2 et 3 nm sur la totalité de la longueur du brin.

Les images des figures 5.3-C et 5.4, réalisées à petite échelle, présentent une vue plus détaillée des brins 1 et 2 respectivement. On retrouve en arrière plan, la morphologie en îlots de taille $13 \times 22 \text{ nm}^2$ correspondant aux sondes 25C.

L'image 5.4-A met en évidence un brin de longueur environ 600 nm, hybridé avec une sonde du plot 25C. L'image 5.4-B est un zoom sur la zone représentée par le cadre blanc de l'image A-. Les coupes notées 1 et 2 sont reportées à droite de l'image 5.4-B. Ce brin présente donc une hauteur moyenne située autour de 1 nm, comme le montre la section 1 à l'exception de la zone indiquée par le pointeur sur l'image A- qui présente un contraste vertical de 2 nm sur une longueur de 25 nm et qui est située à environ 85 nm du début du brin.

Sur chacune des puces analysées, les zones non-complémentaires ont été systématiquement imagées. Ces caractérisations n'ont jamais mis en évidence la présence de brins cibles adsorbés. A titre d'exemple, la figure 5.5 présente deux images obtenues sur le plot des sondes 25NC après hybridation des molécules cibles de 1500 bases de long. Comme le montre ces images obtenues sur deux zones différentes, la surface est complètement dépourvue de cibles. On retrouve ainsi la morphologie en dentelle plus ou moins aérée des sondes 25NC présentées au chapitre précédent 4. Nos résultats semblent indiquer que les brins observés sont bien effectivement hybridés et que les rinçages sont suffisamment efficaces pour retirer tout matériau biologique adsorbé de manière non spécifique à la surface des puces.

Discussion

De façon générale, l'ensemble de nos images AFM démontre que les brins cibles sont aisément identifiables sur les zones des sondes complémentaires et uniquement sur elles. Ils apparaissent allongés sur la surface, parfois orientés comme sur l'image de $2500 \times 2500 \text{ nm}^2$ (figure 5.3). Une analyse plus précise des brins hybridés a mis en évidence deux catégories de brins témoignant de l'existence de plusieurs "conformations" possibles. On rappelle que l'hybridation a été effectuée avec une solution contenant les brins complémentaires aux sondes 25C, non pas sous forme de monobrins mais sous forme de doubles brins préalablement dénaturés. La solution d'hybridation contient donc le brin complémentaire des sondes 25C mais également le complémentaire de celui-ci. Ainsi, les deux types de brins peuvent être analysés comme deux processus d'hybridation différents. En effet, le brin de type 1 semble correspondre à la configuration simple, initialement attendue et décrite sur la figure 5.6-A. Le monobrin complémentaire hybridé à une sonde 25C

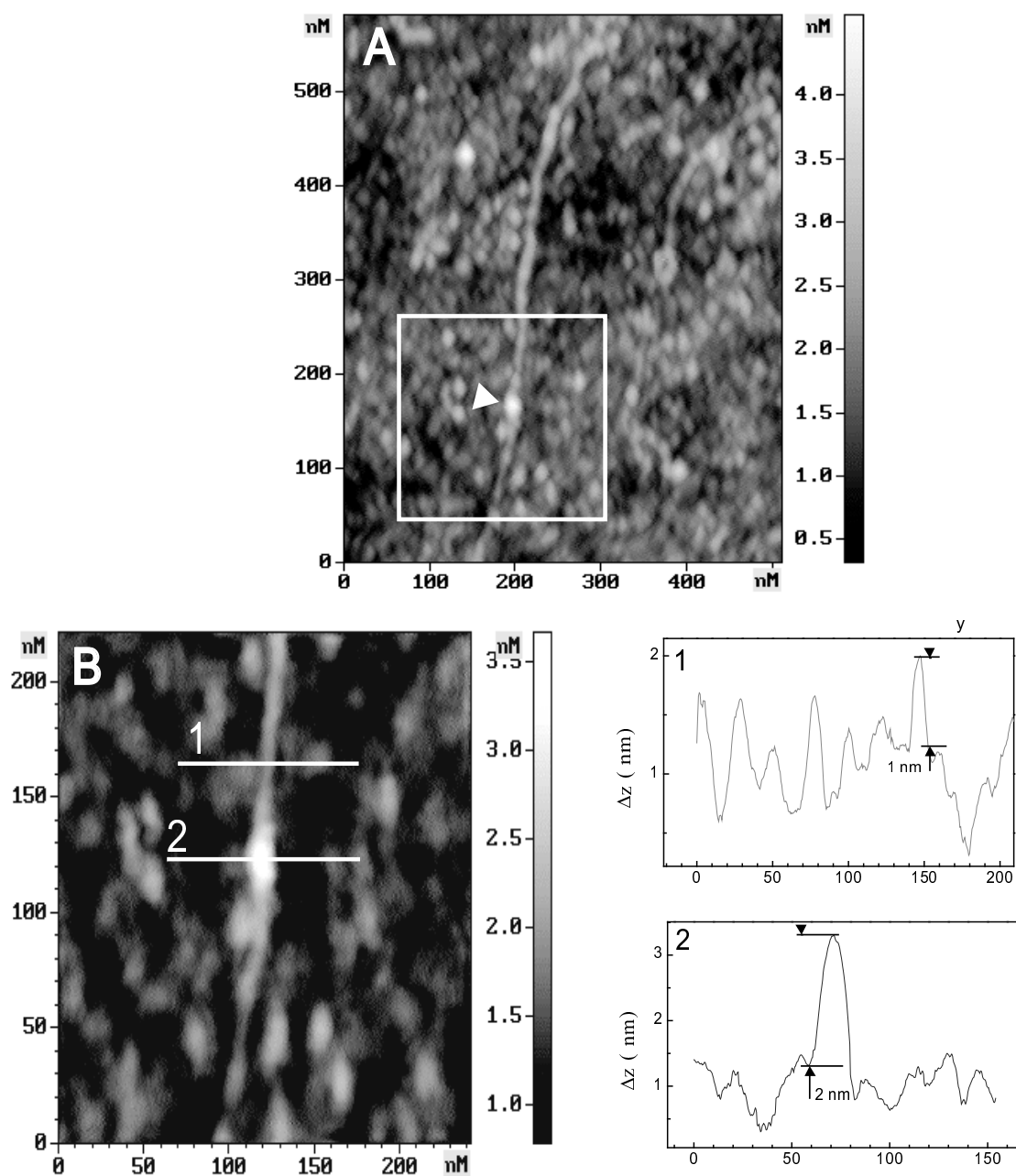


FIG.5.4 – Zoom sur un brin hybridé de 1500 bases sur les sondes de type 25C. L'image A présente le brin dans sa globalité. Le zoom, image B, dont la zone est représentée par le carré blanc sur l'image A met en évidence la zone d'hybridation avec les coupes correspondantes à droite.

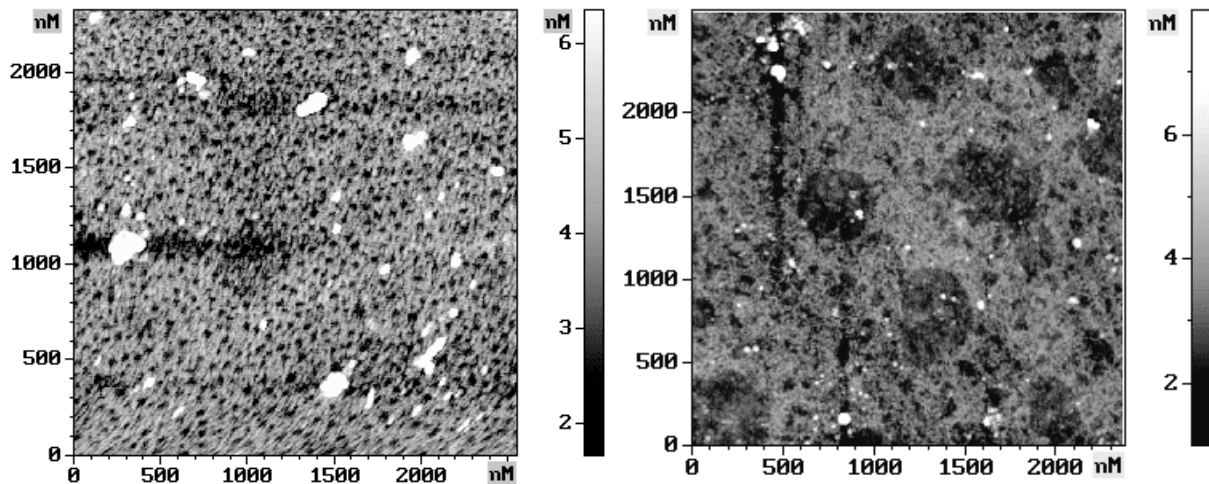


FIG.5.5 – Images AFM obtenues sur le plot des sondes non complémentaires 25NC, après hybridation des brins de 1500 bases de long.

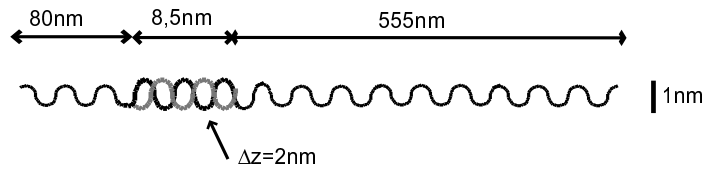
possède ainsi sur la quasi totalité de sa longueur une épaisseur correspondant au monobrin, soit les 1 nm mesurés, et sur une petite zone, une hauteur de 2 nm pouvant correspondre à la zone où a été opérée l'hybridation.

Le brin de type 2 serait le résultat de deux hybridations successives : l'une du brin PCR avec la sonde et l'autre entre la cible hybridée et son complémentaire également présent dans la solution. Cette hypothèse est en bon accord avec les hauteurs mesurées sur les brins de cette catégorie, comprises entre 2 nm dans le cas où on a un double brin et de 3 nm pour le lieu de la première hybridation. Ces configurations bien que surprenantes sont en fait très présentes à l'état naturel, puisqu'on peut les obtenir à chaque fois qu'il y a transcription d'une séquence par l'intermédiaire d'un ARNm (ARN messenger) [3].

Les images de petite taille 5.4-A et -B réalisées dans le cas de l'hybridation "simple" montrent la présence d'une zone de contraste vertical nettement plus important passant de 1 nm à 2 nm sur une longueur de 25 nm. Par ailleurs, la position de cette zone a été évaluée à 85 nm du début du brin. En reprenant le schéma présentant les différents systèmes sélectionnés pour les tests d'hybridation 5.1, on constate que dans le cas des brins cibles de 1500 bases de long, la zone d'hybridation est située à 185 bases de l'extrémité 3', correspondant à une longueur de 80 nm. Compte tenu de la convolution de la pointe, ces deux distances peuvent être mises en relation et on peut donc en conclure que la zone de hauteur 2 nm est **la zone d'hybridation** entre les monobrins sondes et cibles.

Une évaluation théorique de la longueur des brins cibles peut être effectuée en prenant 0,43 nm [5] pour la longueur par base dans le cas d'un monobrin et 0,34 nm [4] pour la longueur

A- Cas n°1 : Hybridation simple



B- Cas n°2 : Réhybridation du complémentaire de la cible

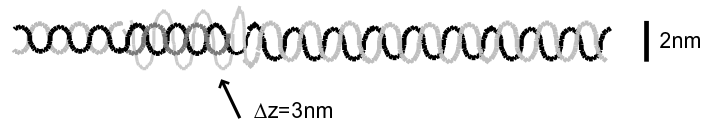


FIG.5.6 – Interprétation des configurations observées sur les brins de 1500 bases. A- la configuration attendue où une molécule cible s’hybride avec une sonde 25C. On notera cette catégorie : 1. B- Une configuration plus complexe correspondant à la précédente avec le complémentaire à la cible qui se réhybride sur l’ensemble de sa longueur. Cette catégorie est notée 2.

d’une base dans le cas d’un double brin (en conformation B). On obtient ainsi pour les brins de la catégorie 1 une longueur de 643 nm et pour ceux de la catégorie 2 une longueur de 510 nm. On constate que dans le cas des brins de type 1, les longueurs mesurées ($L_{\text{expe}} \sim 650$ nm) sont en bon accord avec l’évaluation théorique ($L_{\text{th}} \sim 643$ nm). En revanche, dans le cas des brins de type 2, l’intervalle de longueur trouvé expérimentalement ($L_{\text{exp}} \in [550 - 650]$ nm) est important et les longueurs mesurées sont quasiment toujours supérieures à la valeur théorique ($L_{\text{th}} \sim 510$ nm). Des élongations de brins d’ADN ont déjà été constatées lors d’expériences opérant par peignage moléculaire sur des doubles brins [6]. Ces expériences ont montré qu’il était possible d’atteindre une élongation des brins allant jusqu’à 30% de leur longueur initiale. Sans atteindre des effets aussi importants, il est probable que les abondants rinçages effectués après la phase d’hybridation aient conduit à étirer légèrement les brins hybridés, conduisant ainsi à une augmentation de leur longueur. On remarquera que cet effet ne se manifeste pas dans le cas des brins de type 1, car ceux-ci possèdent une flexibilité naturelle bien supérieure aux doubles brins, leur permettant ainsi de ne pas subir d’élongation de leur structure durant les rinçages.

Jusqu’à présent, on ne s’est pas étonné de mesurer des hauteurs qui se trouvaient être en excellent accord avec les valeurs obtenues par d’autres types d’expériences et en particulier les expériences par diffraction X [7]. Or, ce fait n’est pas commun dans les études par microscopie à force atomique. En effet, nous avons montré dans le chapitre 3.1.3 que la mesure des hauteurs sur l’ADN constitue un vrai débat dans la communauté du champ proche. En effet, de nombreux travaux dans la fin des années 90 et même encore aujourd’hui ont rapporté des valeurs de hauteur

d'ADN double hélice, allant de 0,7 à 1,6 nm [8, 9], valeurs bien inférieures à celle attendue de 2,34 nm (pour la conformation B). De nombreuses expériences [10–13] ont été réalisées dans le seul but de comprendre pourquoi la mesure de la hauteur de l'ADN posait tant de problèmes. Or, dans nos expériences on retrouve bien les valeurs attendues. La petite discussion qui va suivre a pour objet d'expliquer pourquoi notre expérience nous permet de mesurer des valeurs proches des valeurs théoriques.

Dans le chapitre 3, nous avons mentionné trois arguments permettant d'expliquer les artéfacts de mesures de l'épaisseur de la molécule d'ADN : l'écrasement de la molécule d'ADN par la pointe en situation de Contact Intermittent (CI), l'effet de l'adhésion de la molécule sur son substrat et enfin, les changements d'interaction entre le substrat et la molécule. En ce qui concerne le premier point, les conditions expérimentales ont été choisies pour notre étude de manière à éviter tout contact entre la pointe et les échantillons (voir la discussion des conditions expérimentales, à la fin du chapitre 1). Ce mode de travail est appelé par Garcia *et al.* [14] non contact AM-AFM, c'est-à-dire que la rétroaction est bien effectuée sur l'amplitude, comme dans le cas du mode Contact Intermittent, mais en se plaçant sur la branche de "petite amplitude" suivant laquelle la pointe n'est jamais en contact avec l'échantillon. Toute la difficulté dans nos expériences a été de trouver ces conditions expérimentales pour l'ensemble des 250 pointes utilisées. En ce qui concerne l'effet de l'adhésion de la molécule à son substrat, il est plus difficile de trancher sur ce point. En effet, rien ne peut empêcher que les bases de la cible opèrent des hybridations partielles avec des bases de sondes n'ayant pas réagi. Or, on a vu que pour les brins réhybridés, on observait une nette augmentation de l'épaisseur des molécules passant ainsi de 1 à 2 nm. Il semble donc qu'un appariement partiel aurait plutôt comme conséquence d'augmenter la hauteur de la molécule d'ADN, plutôt que de la réduire. Enfin, le dernier argument énoncé concerne les problèmes de changement de nature de l'interaction entre la pointe et la surface quand la pointe passe du substrat, ici les sondes, à la molécule d'ADN. Cet argument a en effet été souvent avancé dans les expériences étudiant des systèmes de brins d'ADN déposés sur du mica, où le changement de la nature des interactions est important [15, 16]. Or, dans notre cas, pour les brins hybridés, les brins analysés sont déposés sur un tapis de molécules de même nature, n'induisant de ce fait que peu de changement d'interaction au moment où la pointe décrit la molécule cible. Toutes les conditions sont donc favorables à une évaluation précise de la hauteur de molécules d'ADN et nous conduisent bien à mesurer des hauteurs d'objets en bon accord avec les valeurs attendues.

5.1.4 Hybridation de monobrins de 600 bases

Une deuxième étude a été engagée avec des brins de plus petite taille, 600 bases environ, fournis sous forme de **simples brins** de manière à s'affranchir des problèmes d'interprétation

des différentes configurations rencontrés dans l'étude précédente. On espère par ailleurs pouvoir confirmer la mise en évidence de la position de la zone d'hybridation attendue à 164 bases de l'extrémité 3' du brin (voir figure 5.1). Deux types de brins ont été étudiés : des brins multi-marqués, possédant 24% de leur longueur marquée et des brins non marqués.

a- Hybridation des molécules multimarquées

La première étude a été réalisée sur les brins multimarqués, de manière à pouvoir contrôler la présence effective de cibles par microscopie de fluorescence. A l'issue de la phase d'hybridation l'analyse par microscopie de fluorescence (figure 5.7) met en évidence la présence de brins hybridés sur la zone des sondes 36C, complémentaires de ces cibles. L'absence de signal sur la zone 37NC confirme que l'hybridation est bien spécifique. Le niveau du signal sur la zone hybridée est proche du niveau de bruit de fond. Une fois encore, l'analyse est réalisée dans des conditions correspondant aux limites de détection de la microscopie de fluorescence.

Par ailleurs, on constate sur cette image que le signal de fluorescence présente de grandes disparités. Sur la partie gauche du plot le niveau de signal détecté est de 0,16 u.a. et avoisine quasiment le double du signal détecté sur la zone droite du plot, qui est de 0,09. Pour expliquer cet effet, une première hypothèse serait de considérer que le dépôt de sondes est inhomogène sur l'ensemble de la surface du plot, induisant une densité surfacique en sondes immobilisées beaucoup plus importante dans la partie extérieure gauche du plot qu'ailleurs. Cependant, l'étude conduite sur les cibles de 1500 bases de long donne une densité en cibles hybridées ($\sim 10^8$ cibles/cm²) qui s'avère être 1000 fois inférieure à la densité de sondes immobilisées ($\sim 10^{11}$ sondes/cm²). On peut donc en conclure que le paramètre influant sur le rendement d'hybridation n'est pas le nombre de sondes immobilisées mais la concentration de la solution en cibles et les conditions expérimentales durant la phase d'hybridation. Reste à prendre en compte les conditions de dépôt qui n'ont pas encore été discutées. On rappelle que dans le protocole utilisé, voir 5.1.2, l'hybridation est opérée en déposant une goutte de la solution d'hybridation sur la surface. Cette goutte est ensuite étalée pour constituer un film mince entre lame et lamelle. Cette procédure, bien que limitant l'influence des perturbations extérieures, ne garantit cependant pas un étalement homogène de la solution sur l'ensemble de la surface. En particulier, la présence d'aspérité à la surface de la puce peut perturber le mouillage lors du dépôt de la solution d'hybridation et conduire à des disparités importantes sur le rendement d'hybridation.

L'analyse AFM a été effectuée sur la zone "dense" du plot. L'image à grande échelle (figure 5.8-A) permet d'identifier les brins cibles de 600 bases de long. Ils sont distribués de manière homogène sur la surface et semblent être isolés les uns des autres. Leur densité est relativement

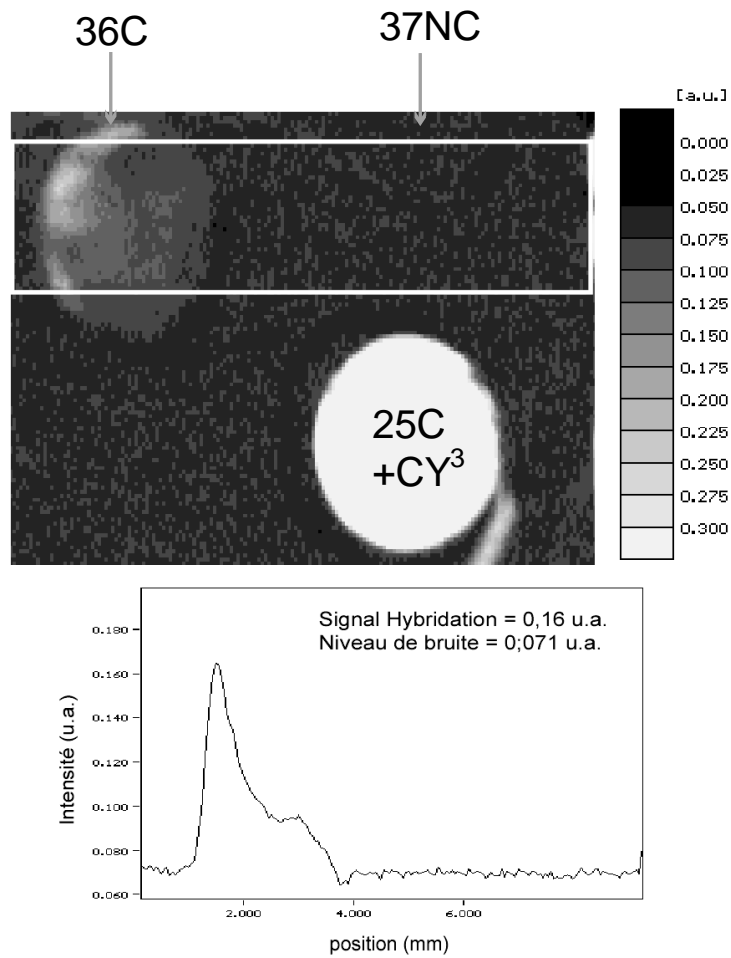


FIG.5.7 – Spectre de fluorescence obtenu après hybridation des molécules cibles de 600 bases de long. Le niveau de signal obtenu sur le plot hybridé est de 0,16 u.a. pour un niveau de bruit de 0,071 u.a. avec comme signal de référence celui obtenu sur les sondes marquées qui est le 0,7 u.a..

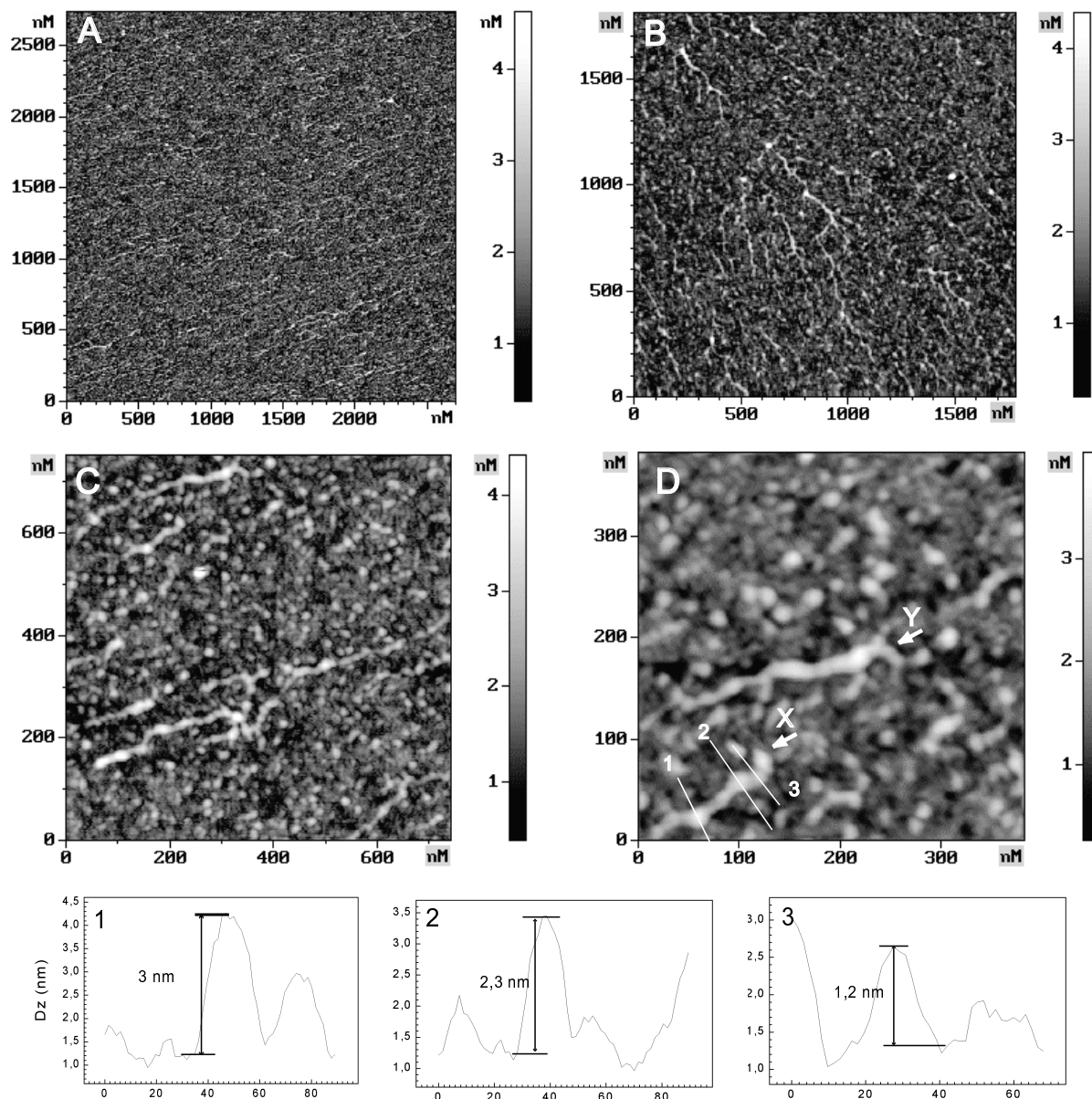


FIG.5.8 – Images AFM obtenues sur les monobriens cibles de 600 bases de long multimarqués. A- Image de "grande" taille $2700 \times 2700 \text{ nm}^2$, B- Image de $1500 \times 1500 \text{ nm}^2$, C- Image de $700 \times 700 \text{ nm}^2$ et D- Image de $400 \times 400 \text{ nm}^2$, avec les coupes correspondantes notées de 1 à 3.

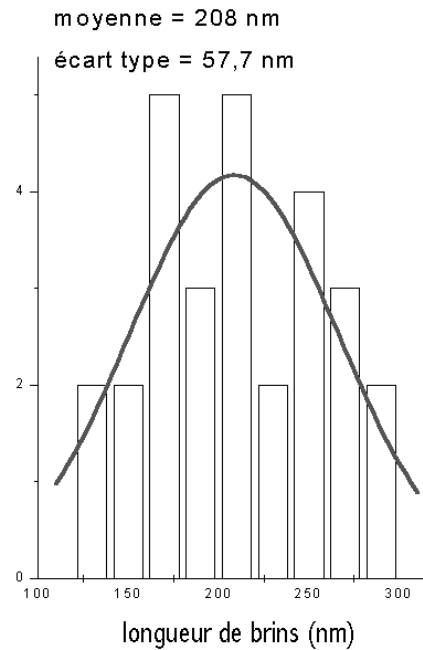


FIG.5.9 – Histogramme des longueurs des monobrins cibles de 600 bases de long.

importante et est évaluée autour de 15-20 brins/ μm^2 . L'image à moyenne échelle 5.8-B montre les brins avec plus de détails et permet d'observer quelques structures plus complexes correspondant à des assemblages de plusieurs brins, visibles en particulier au centre de l'image. A plus petite échelle, les images -C et -D mettent en évidence une structure granuleuse sur les brins cibles de 600 bases. En effet, les brins affichent sur la quasi-totalité de leur longueur des "grumeaux" d'épaisseur de 2 nm (voir coupe 2), tandis que le restant du brin possède une épaisseur de 1,2 nm (voir coupe 3). On remarquera une zone de contraste vertical allant jusqu'à 3 nm (voir coupe 1) que l'on retrouve sur un grand nombre de brins. Sur cette même image on peut par ailleurs observer une morphologie impliquant deux brins, notée Y et un brin "standard", noté X.

Des mesures de la longueur des brins de 600 bases ont été réalisées de manière à obtenir une statistique sur leur longueur. Ces résultats sont reportés sur la figure 5.9. On obtient ainsi une longueur moyenne des brins de 208 nm avec un écart type très important de 57 nm.

Discussion

Les brins de 600 bases apparaissent donc aisément identifiables à toutes les échelles présentées. Ils sont généralement isolés les uns des autres, à l'exception de quelques morphologies "exotiques". Leur morphologie grumelée conduit à une augmentation de l'épaisseur des monobrins passant de 1 nm à 2 nm sur une bonne partie de leur longueur. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cet effet. La première s'appuie sur la nature des brins. Les brins analysés ici sont des

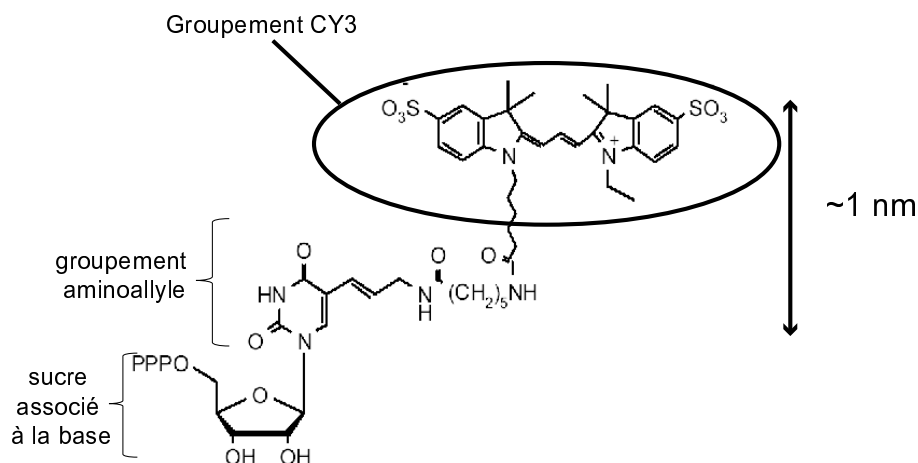


FIG.5.10 – Formule développée des molécules fluorescentes utilisées pour le marquage des brins de 600 bases de long.

monobrins multimarqués. Ils sont donc jalonnés de molécules fluorescentes CY³ sur environ 24% de la longueur de leur séquence (voir paragraphe 5.1.1 en début de ce chapitre). Aussi, ces structures en grumeaux peuvent être interprétées par la présence de ces chromophores (voir la formule développée figure 5.10), qui ajoutent une épaisseur d'environ 1 nm à la base à laquelle ils sont fixés, conduisant à une épaisseur du brin de 2 nm pour les bases marquées. Cette valeur est en bon accord avec les valeurs obtenues par les coupes sur ces objets. Une seconde hypothèse serait d'envisager des repliements au sein du monobrin multimarqué. Cette hypothèse est difficile à discuter car les simulations ne permettent pas à l'heure actuelle de prendre en compte la présence de chromophores. Or, comme un quart de la longueur de la molécule est marqué, il apparaît difficile de s'affranchir de la présence des chromophores du point de vue des simulations.

L'analyse des caractéristique des molécules rend compte d'une disparité importante de leur longueur. La distribution en taille attendue devrait être centrée autour de 254 ± 43 nm (600 ± 100 bases). Or, la statistique obtenue donne une valeur moyenne bien inférieure, centrée autour de 208 nm avec une dispersion de 57 nm autour de cette valeur. Cette distribution recouvre bien la valeur attendue de 254 nm mais ne la place pas en contribution dominante. Deux conditions peuvent être mises en avant pour expliquer ce résultat. Les longueurs de brins ont été simulées avec comme valeur de la longueur par base : 0,43 nm pour les simples brins et 0,34 nm pour les doubles brins. Or, il n'est pas exclu que la présence de chromophores limite la flexibilité des brins, conduisant ainsi à une réduction de la longueur. A titre indicatif, si l'on choisit une longueur par base de 0,34 nm pour l'ensemble de la séquence, on trouve une longueur de 204 nm pour les brins cibles, valeur qui se trouve être proche de la valeur mesurée. Le second aspect à prendre en compte concerne la méthode de préparation des brins. En effet, ces brins sont issus d'une synthèse enzymatique.

Ainsi, la longueur des brins obtenus est conditionnée par deux paramètres : le temps de réaction et le moment où l'enzyme a débuté la synthèse. Il est donc probable que pour ces brins le temps de la synthèse ait été légèrement plus court que le temps caractéristique permettant d'obtenir la longueur souhaitée (600 bases), conduisant ainsi à une réduction de la taille moyenne des brins ainsi générés [2].

Un dernier point reste à discuter. Il s'agit de la présence de la zone d'épaisseur 3 nm. Compte tenu de la configuration complexe de ces brins du fait de la présence des chromophores, son interprétation est difficile. On peut tout de même constater que la valeur de 3 nm peut correspondre à l'épaisseur de 2 nm d'un double brin auquel vient s'ajouter 1 nm d'épaisseur due aux chromophores fixés sur les bases thymine de la cible. La zone de 3 nm d'épaisseur présente donc toutes les caractéristiques attendues pour être identifiée comme la zone d'hybridation (voir figure 5.10). Cependant il n'est pas à exclure que l'augmentation de l'épaisseur puisse correspondre à des repliements au sein de la molécule cible. Aussi, nous ne nous avancerons donc pas d'avantage sur cette interprétation.

b- Hybridation des brins non marqués

De manière à vérifier l'origine des structures grumelées observées sur les cibles multimarquées, une étude a été réalisée avec des oligonucléotides cibles non marqués. Ces brins sont élaborés suivant un protocole identique à celui des cibles multimarquées, à la différence près que les nucléotides thymine marqués sont ici remplacés par des nucléotides thymine standards. Dans ce cas, aucune étude par microscopie de fluorescence n'a pu être réalisée avant d'entamer l'étude par microscopie à force atomique.

La caractérisation AFM à l'échelle de $(2200 \times 2200) \text{ nm}^2$ (figure 5.11-A) révèle la présence de brins en surface de la puce. Cependant, leur distribution s'avère peu homogène, laissant apparaître l'absence de brins sur des zones étendues (voir la partie supérieure de l'image). La densité des brins présents sur la surface est de 2-3 brins/ μm^2 et donc bien inférieure à celle observée après hybridation de brins de même longueur mais multimarqués (environ 20 cibles/ μm^2). Par ailleurs, l'image de 1500 nm de côté (figure 5.11-B) montre que l'identification de brins s'avère plus délicate que dans le cas des brins multimarqués (image 5.8-B).

Les images à petite échelle, d'environ 250 nm de côté (figure 5.12), présentent des brins de configurations différentes. On distingue un brin A, allongé sur la surface dans une forme étirée, un brin B qui adopte une configuration courbée et le brin C qui se boucle sur lui-même. Si, on pousse plus loin l'analyse, on constate que, bien qu'apparemment plutôt différentes, ces structures

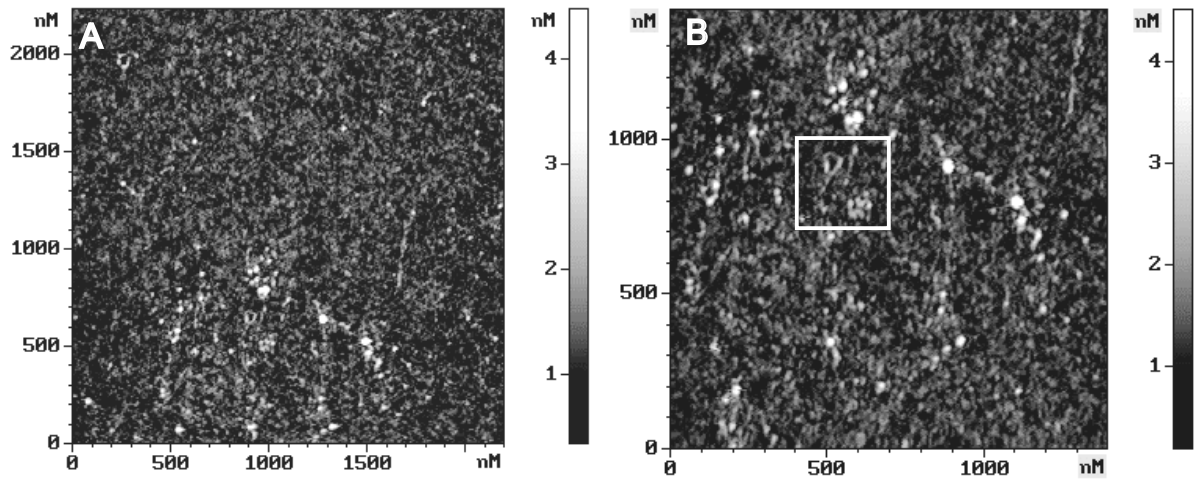


FIG.5.11 – Images AFM obtenues après hybridation des brins cibles de 600 bases sur leurs sondes complémentaires 36C, A- à échelle de $2000 \times 2000 \text{ nm}^2$, et B- à l'échelle $1500 \times 1500 \text{ nm}^2$.

possèdent quelques caractéristiques morphologiques communes. En effet, ces trois brins semblent se structurer en cinq parties. Les deux extrémités se présentent comme deux structures en îlots de hauteur 2 nm et de longueur 15-20 nm pour celle dont les coupes (figure 5.12) sont notées 4, et des longueurs plus variables pour l'autre partie (voir figure 5.13), allant de 20 nm pour le brin A, à 60 nm pour le brin B (coupe noté 1). La partie centrale du brin atteint globalement une épaisseur de 1 à 1,5 nm de haut sauf sur une zone située à environ 137 nm de l'extrémité 4 où le brin s'élève à 2 nm (coupes notés 2).

Ces résultats nous amènent dans un premier temps à nous interroger sur la différence de rendement de l'hybridation quand on passe de brins multimarqués à des brins non marqués. En effet, la densité en brins hybridés multimarqués a été évaluée autour de $20 \text{ cibles}/\mu\text{m}^2$, tandis qu'elle n'est que de 2-3 cibles/ μm^2 dans le cas des cibles non marquées. De nombreuses zones ont été analysées sur 5 hybridations différentes (avec les cibles non marquées) conduisant toutes à ce résultat. Quelle est donc l'origine de ces écarts de rendement des processus d'hybridation ?

Un contrôle par les protocoles biologiques de caractérisation par électrophorèse [17] a été effectué et nous affirme que la concentration en cibles des solutions d'hybridation est très voisine pour les deux catégories de cibles marquées et non marquées. L'origine de ces disparités réside donc a priori dans la phase d'hybridation. A ce niveau, deux scénarios peuvent être évoqués.

Un premier élément pouvant justifier ces différences de rendement réside dans la conformation de ces brins au moment de l'hybridation. Dans le cas où les brins possèdent des structures secondaires suffisamment stables, il a été montré par E. A. Oussatcheva *et al.* [18] qu'elles pouvaient

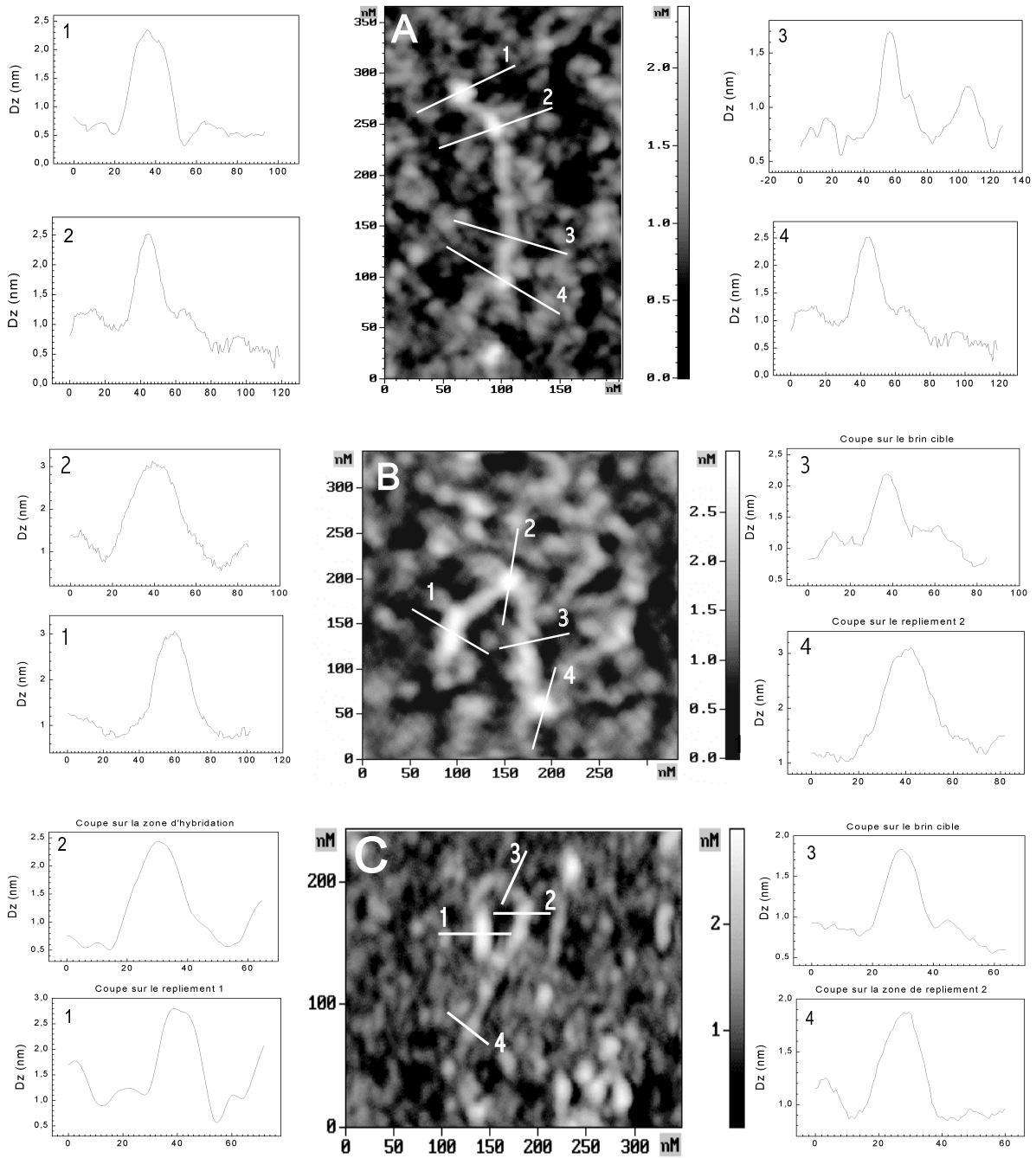


FIG.5.12 – Trois zooms sur des molécules cibles isolées. Elles sont présentées avec leurs coupes correspondantes notées : 1, 2, 3, et 4, pour chacune des figures.

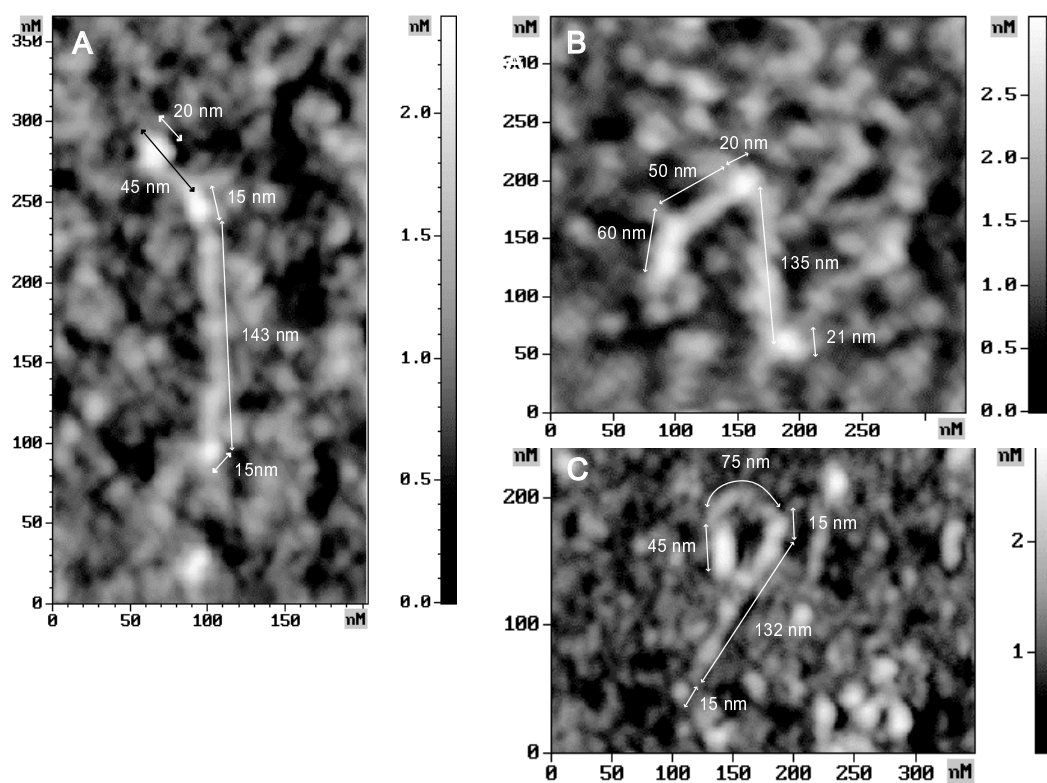


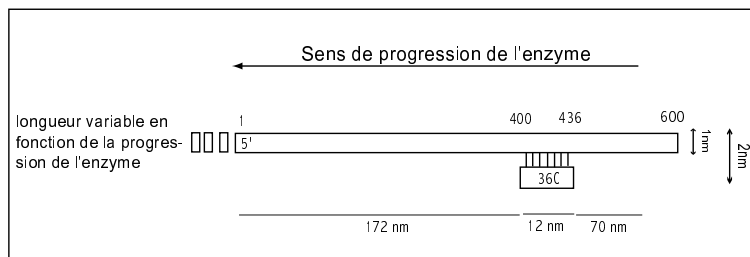
FIG.5.13 – Images de petite taille avec description des longueurs caractéristiques.

fortement perturber l'hybridation, jusqu'à l'inhiber complètement.

Le second élément relève des problèmes d'adéquation des conformations des molécules cibles et sondes. En effet, dans les puces le brin sonde est immobilisé sur un substrat, ce qui limite fortement sa mobilité. De ce fait, il est donc également possible que les deux brins cible et sonde, en fonction de leur conformation propre, aient du mal à s'hybrider. Cependant, cet argument va en sens inverse de notre situation. En effet, du fait de la présence de nombreux chromophores le long des cibles multimarquées, ces brins devraient présenter une mobilité plus faible que les brins non marqués, ce qui conduirait à une baisse du rendement à l'hybridation. Or, nous observons l'inverse. Ceci nous incite à penser que l'origine du faible rendement pour des cibles non marquées provient du fait qu'elles possèdent des structures secondaires stables. Au contraire, la présence des chromophores au sein de la cible multimarquée peut induire une gêne à la formation de ces structures secondaires, de part l'encombrement stérique de ces molécules fluorescentes et une rigidité plus importante de l'ensemble du brin. Ces éléments permettent d'obtenir une première justification de la différence de rendement à l'hybridation.

Les morphologies observées à petite échelle, figures 5.12 et 5.13, semblent quant à elles renvoyer à une conformation plutôt reproductible, structurée autour de la constitution de 5 zones. La figure 5.14 modélise la structure observée de manière reproductible sur ces images.

A- Conformation attendue après hybridation des cibles de 600 bases de long



B- Conformation observée sur les brins

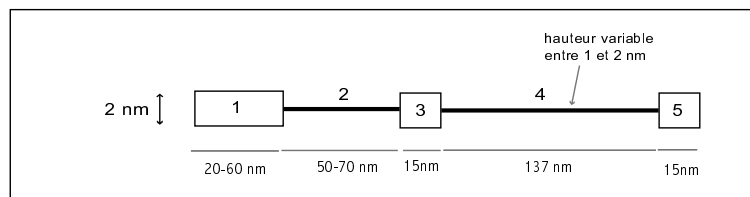


FIG.5.14 – A- Conformation attendue du brin. B- Schématisation de la conformation observée sur les trois brins. Les brins semblent constitués de 5 zones différentes, d'épaisseur et de longueur spécifiques.

La régularité avec laquelle nous observons ces cinq zones nous a rapidement amené à nous intéresser aux problèmes des repliements internes du brin sur lui-même. De manière à pousser plus loin notre discussion, nous allons analyser la possibilité de constituer des structures secondaires

dans nos conditions expérimentales ($T = T_m - 5^\circ\text{C}$, $[\text{Na}^+] = 0,3 \text{ M}$). Nous nous appuyerons sur le logiciel de calcul de structures appelé *mfold* et mis au point par le groupe Zucker [19–21]. Ces simulations sont fondées sur une minimisation de l'énergie dans la structure du monobrin étudié [20]. Le logiciel analyse les repliements possibles et les classe en fonction de leur stabilité d'un point de vue énergétique. Les brins sont considérés libres en solution saline (en présence de contre-ions Na^+ ou Mg^{2+}) de concentration choisie. Ces simulations ne décrivent donc pas parfaitement notre système. En effet, dans notre cas, les brins sont hybridés avec une sonde de la surface. Ils ne sont donc pas libres, mais fixés à la surface par la zone d'hybridation. Par ailleurs, l'ensemble de nos expériences AFM ont été conduites à l'air. On fera donc ici l'hypothèse que la cible "à sec" conserve la structure qu'elle possédait en solution après hybridation.

La longueur de la séquence étant définie par la progression de l'enzyme sur l'ARN de référence, la longueur du brin généré est variable et comprise entre 500 et 700 bases de long avec une extension plus ou moins importante de la terminaison 5'. En revanche, l'extrémité 3' est bien définie du fait du processus de reconnaissance de la séquence par l'enzyme.

On présente ici deux résultats de simulations obtenus de manière reproductible pour deux longueurs de brin : un brin cible de 633 bases (figure 5.15) et un brin de 763 bases (figure 5.16).

Les résultats pour les deux longueurs simulées sont cohérents et mettent en évidence les mêmes zones de repliements pour leurs parties communes. Ils indiquent que ce brin cible possède de nombreux repliements, de taille plus ou moins importante allant de petites "boucles" impliquant une dizaine de bases ou moins, à des assemblages de très grande taille pouvant regrouper jusqu'à 130 bases, comme c'est le cas pour le repliement 1 (fig. 5.15 et 5.16). La stabilité de ces repliements peut être estimée en terme de solidité en comptant le nombre de liaisons formées entre bases, mais également en comparant le nombre de liaisons C-G et le nombre de liaisons A-T. En effet, la liaison entre C-G étant plus robuste puisqu'elle implique 3 liaisons hydrogènes, elle sera donc dominante sur la liaison A-T. Ainsi, les régions comportant un nombre important de paires de bases C-G seront donc les régions les plus stables. Aussi, les deux repliements notés 1 et 2 seront assez stables car ils impliquent tous deux un nombre important de liaisons C-G successives. A titre d'exemple, le repliement 2 résulte de la formation de 21 liaisons dont 11 sont des liaisons C-G.

Sur le restant de la séquence, on n'observe que quelques petits regroupements susceptibles d'être robustes, on peut noter dans le cas de la séquence la plus longue de 763 bases, la formation de 4 "épingles" au début de la séquence en 5', impliquant respectivement 6 (C-G), 9, 10 et 6 (dont 5 G-C) liaisons successives qui confèrent également une bonne stabilité de ces structures. A l'autre extrémité des brins en 3', on trouve quelques structures impliquant 4-5 paires de bases, mais avec un nombre important de liaisons A-T. La formation de ces structures sera donc moins stable que celles observées à l'autre extrémité qui implique d'avantage de liaisons C-G.

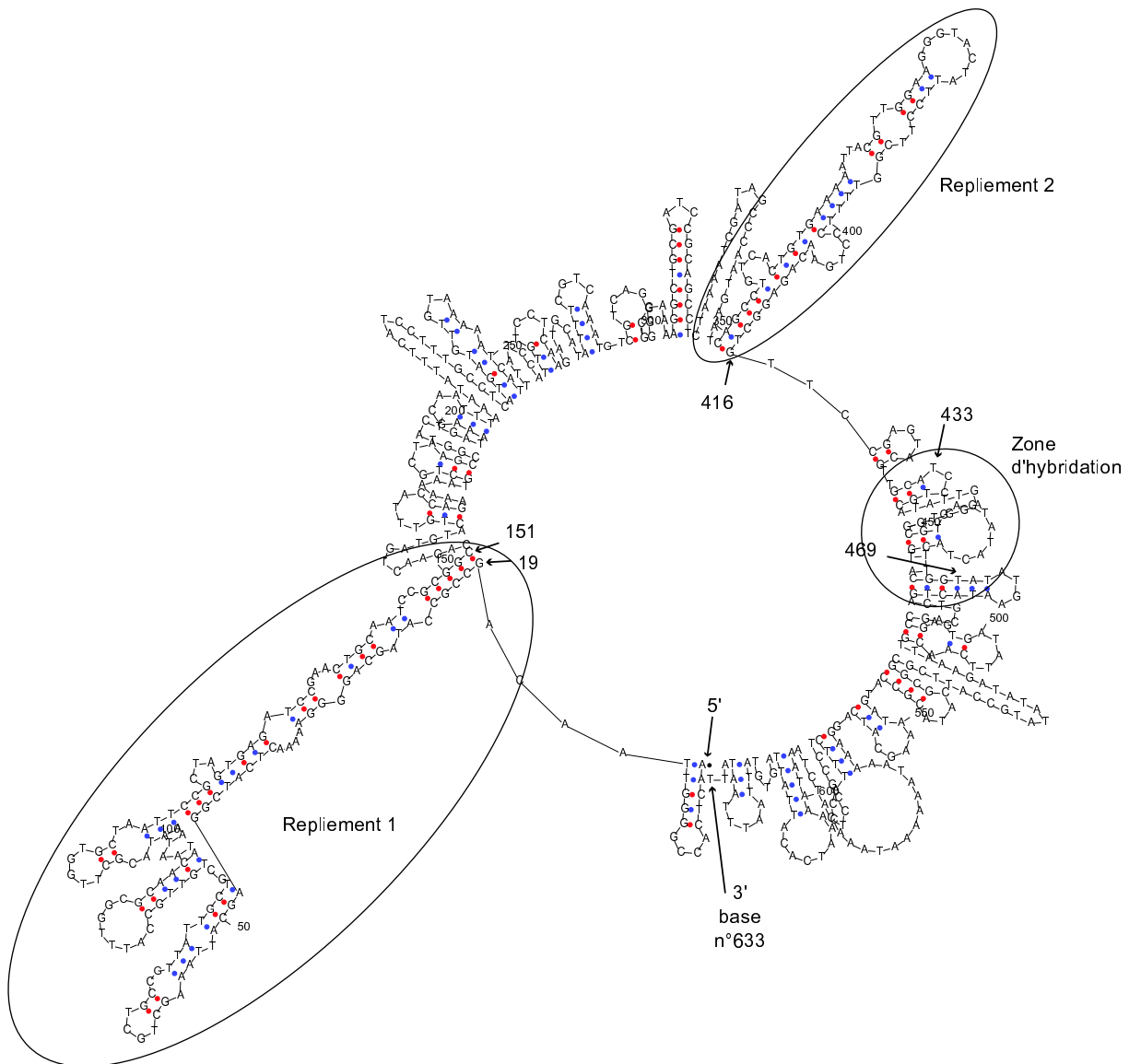


FIG.5.15 – Conformation secondaire stable du brin de 633 bases de long simulée à partir du logiciel "mfold". Les séquences sont présentées de 5' en 3'. Les "points rouges" représentent les liaisons entre guanine et cytosine, impliquant 3 liaisons hydrogènes et les points bleus les liaisons établies entre thymine et adénine, impliquant 2 liaisons hydrogènes. On remarque deux repliements majeurs le long de cette séquence de 633 bases : un repliement englobant les bases comprises entre la base n°19 et la base n°151, noté repliement 1 et un second englobant les bases comprises entre 349 et 416, noté repliement 2. La zone d'hybridation se situe entre les bases n° 433 et 469.

En ce qui concerne la zone d'hybridation, on remarque qu'elle comporte également deux petites structures secondaires, en épingle impliquant 3 paires de bases chacune. Ces structures bien que moins stables que celles mentionnées précédemment ont tout de même une bonne probabilité d'exister. Si l'on rapproche ce résultat du faible rendement d'hybridation discuté précédemment,

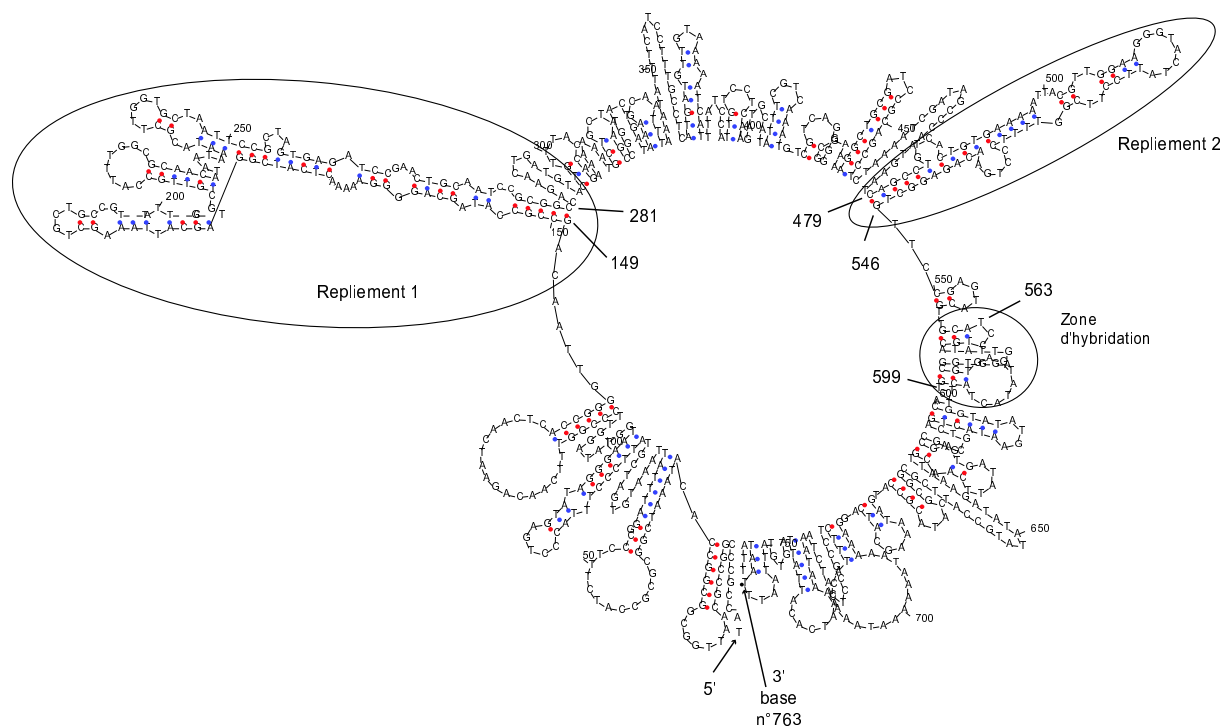


FIG.5.16 – Conformation secondaire stable du brin de 763 bases de long simulée à partir du logiciel "mfold". Les séquences sont présentées de 5' en 3'. Les "points rouges" représentent les liaisons entre guanine et cytosine, impliquant 3 liaisons hydrogènes et les points bleus les liaisons établies entre thymine et adénine, impliquant 2 liaisons hydrogènes. On remarque deux repliements majeurs le long de cette séquence de 763 bases : un repliement englobant les bases comprises entre la base n°149 et la base n°281, noté repliement 1 et un second englobant les bases comprises entre 479 et 546, noté 2. La zone d'hybridation se situe entre les bases n° 563 et 599.

on constate qu'ils sont cohérents et confirment que c'est probablement la présence de repliements de la séquence dans la zone d'hybridation qui limite le rendement du processus d'hybridation.

Si, on compare les résultats de ces simulations avec la structure en 5 parties décrite pour les brins observés en AFM (figure 5.14), on constate, que les variations de longueur de la zone notée 1 peuvent être associées à la présence d'une ou plusieurs épingles décrites par les simulations vers l'extrémité 5' de la séquence, en fonction de celle-ci. La zone 3 décrite sur la figure 5.14, peut alors être associée au repliement noté 1. En effet, cet assemblage de 130 bases sous forme de double brin (2 nm) représente une zone de 13 nm de l'épaisseur d'un double brin s'il est couché sur la surface. Il est attendu à environ 65 nm quand la séquence est longue de 763 bases, ce qui est en bon accord avec les observations AFM.

En revanche la confrontation des images AFM avec les simulations est plus délicate pour les parties 4 et 5 (définies figure 5.14), en particulier en ce qui concerne le positionnement relatif des repliements et de la zone d'hybridation. Dans la quatrième région, l'épaisseur du brin varie faisant

apparaître par endroits des zones légèrement plus contrastées. Ces zones ont des positionnements différents sur les trois images présentées, qui rend leur interprétation difficile. Enfin, l'extrémité 3' du brin présente un épaisseur de 2 nm qui traduit la présence probable d'un ou plusieurs repliements correspondant peut-être aux 2 épingle mises en évidence dans les simulations à l'extrémité 3', qui on le rappelle, est bien définie.

5.1.5 Hybridation de monobrins de 84 bases

Enfin, pour poursuivre l'étude en fonction de la longueur des brins cibles, une dernière taille de brins a été analysée. Des monobrins de 84 bases de long, ont été hybridés sur les puces. A l'issue de la phase d'hybridation, l'analyse par microscopie de fluorescence met en évidence la présence de brins hybridés sur la zone des sondes complémentaires 12C. Le signal détecté est faible, environ 0,425 u.a. pour un niveau de bruit avoisinant les 0,410 u.a. (voir figure 5.17). Le taux d'hybridation se situe, comme dans le cas des brins de 1500 bases, à la limite de détection de la microscopie de fluorescence, correspondant à 10^8 cibles/cm².

Les images obtenues après hybridation des monobrins de 84 bases sur les sondes de type 12C sont reportées sur les figures 5.18 et 5.19.

A grande et moyenne échelle (figure 5.18-A et -B), elles montrent un état de surface lisse et relativement homogène. En comparant l'image 5.18-B avec une image caractéristique obtenue sur les sondes 12C avant hybridation, figure 5.18-C, on constate que les deux surfaces possèdent des morphologies similaires. Cependant, la rugosité (RMS) est évaluée à 0,71 nm après hybridation, ce qui marque une légère augmentation par rapport à celle évaluée pour les sondes seules qui est de 0,47 nm.

A plus petite échelle, les images des figures 5.19-B et -D, mettent en évidence des structures en filaments enchevêtrés. Si on compare à nouveau ces images avec des images de taille identique, 700×700 nm² et 400×400 nm², obtenues sur les sondes 12C avant hybridation, on constate un net changement de morphologie entre ces deux étapes. Avant hybridation, les molécules sondes s'organisent en petits îlots circulaires de diamètre 11 nm environ, alors qu'après hybridation les structures filaires semblent recouvrir le tapis d'îlots encore visible par endroit en arrière plan. Cette différence morphologique peut donc être interprétée comme la mise en évidence des molécules cibles hybridées sur la surface. La densité de molécules cibles semble être relativement élevée dans cette zone.

Une image de très petite taille autour d'un élément isolé sur la surface est rapportée figure 5.20. Le brin se présente sous une forme allongée avec une longueur d'environ 40 nm de long et 15 nm de large. L'épaisseur du brin est, en moyenne, de l'ordre de 1 nm, à l'exception d'une zone d'épaisseur de 2 nm, de longueur environ 12 nm, située à 25 nm de l'extrémité marquée par le

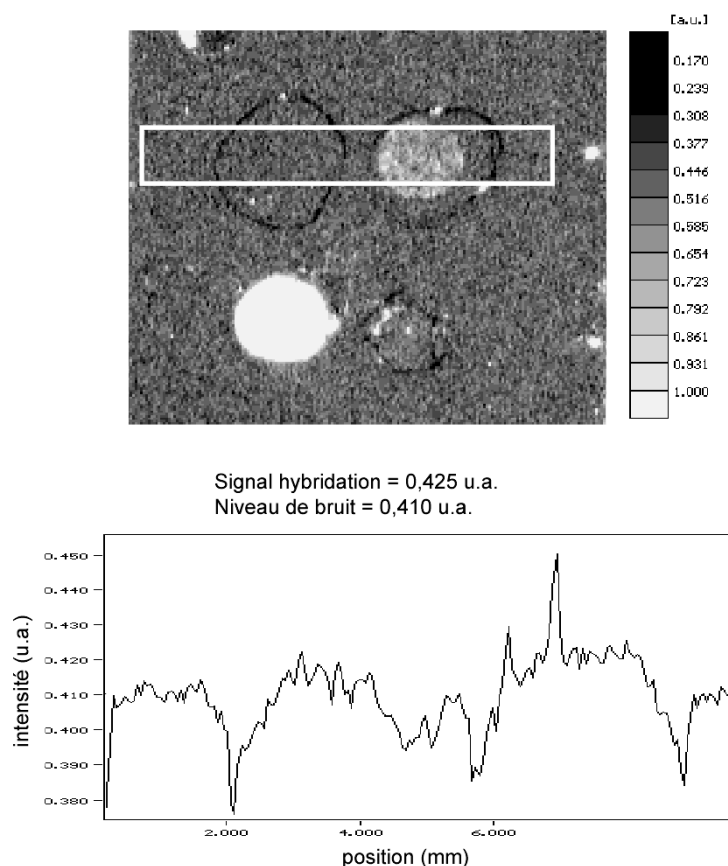


FIG.5.17 – Spectre de fluorescence obtenu après hybridation des molécules cibles de 84 bases de long. Le niveau de signal obtenu sur le plot hybridé est de 0,425 u.a. pour un niveau de bruit de 0,41 u.a. avec comme signal de référence celui obtenu sur les sondes marquées qui est de 1,2 u.a..

curseur.

Discussion

Le premier élément remarquable dans cette étude est une plus grande difficulté à détecter les brins hybridés, par rapport aux études précédentes. En effet, leur présence a principalement été caractérisée par différence morphologique entre l'état de surface des sondes seules et celui après hybridation. Plusieurs raisons peuvent être avancées pour justifier ce point. Les images de taille moyenne mettent en évidence les brins hybridés non pas de manière isolée, mais emmêlés, ce qui n'était pas le cas pour les deux autres systèmes étudiés.

Ceci traduit le fait que dans cette zone la densité en cibles hybridées est relativement élevée et probablement nettement supérieure aux densités mesurées sur les cibles de 1500 et 600 bases. Un second élément réside dans la taille des molécules cibles à détecter. En effet, la longueur attendue est relativement petite, environ 35 nm (voir figure 5.1) et se trouve très proche de la taille de nos

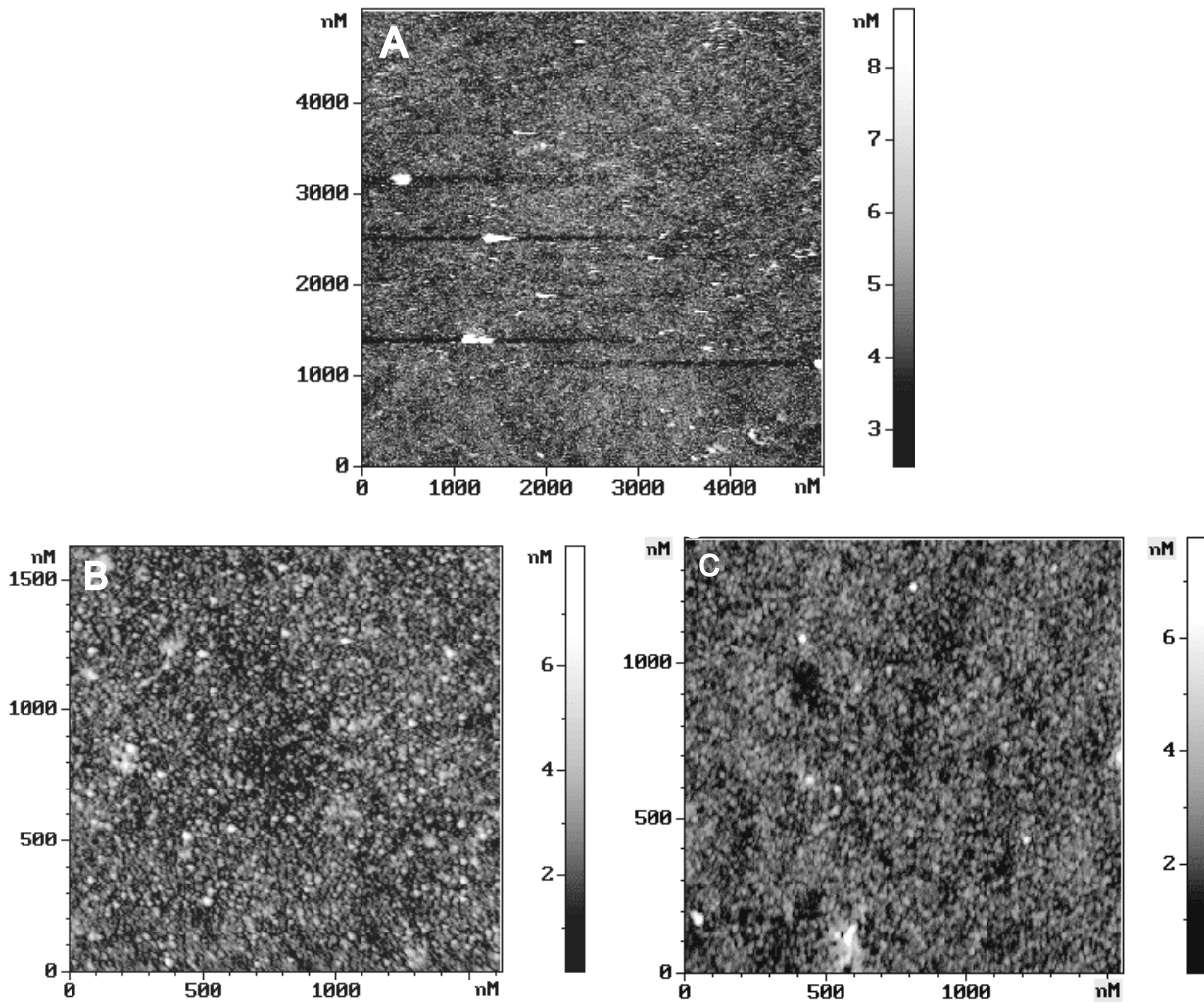


FIG.5.18 – Images AFM obtenues sur la zone 12C hybridée avec des monobrins de 84 bases de long. A- Image de grande taille : $5000 \times 5000 \mu\text{m}^2$, B- image de taille moyenne, $1500 \times 1500 \mu\text{m}^2$, en référence on rappelle l'image C- décrivant les sondes 12C avant hybridation.

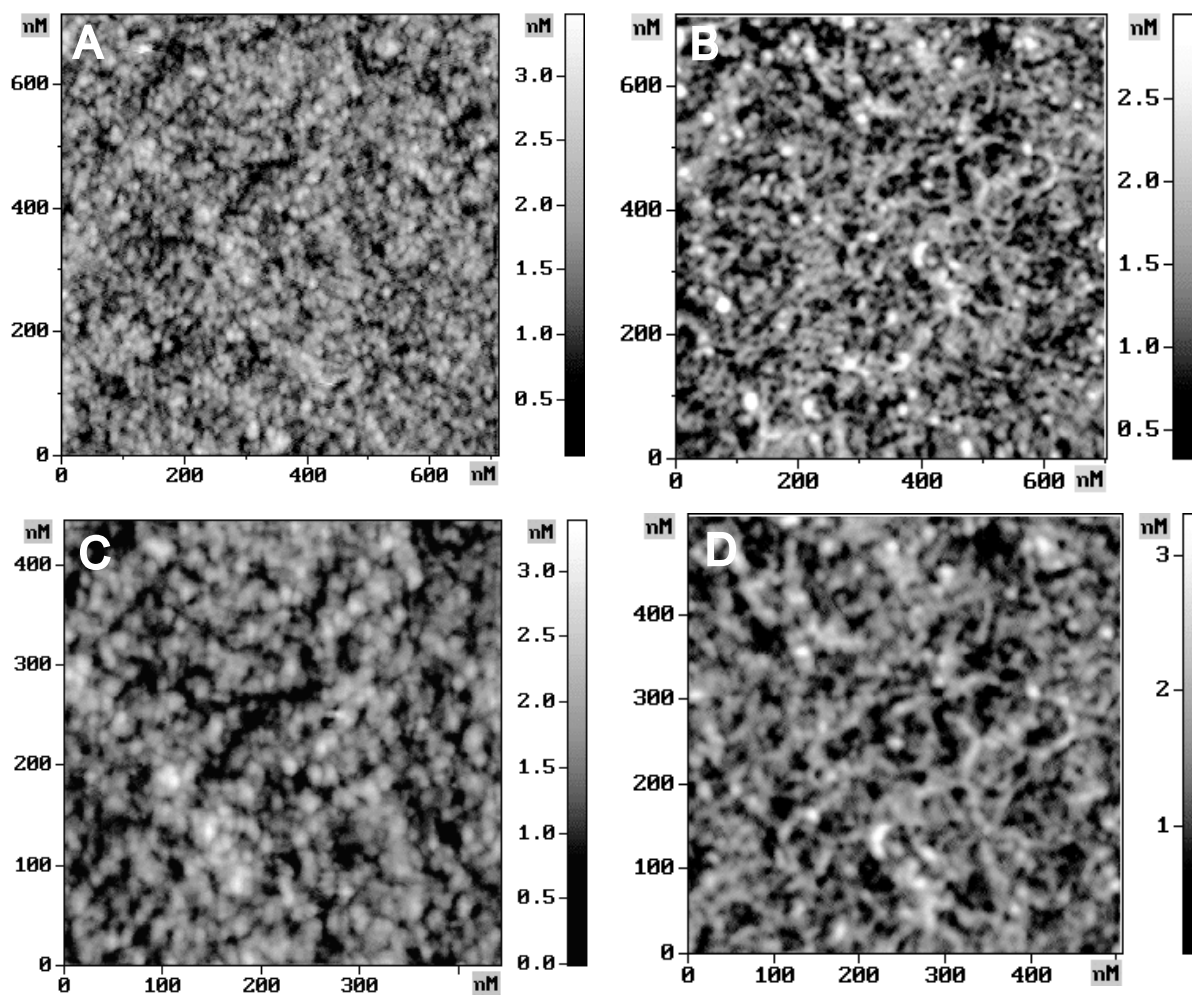


FIG.5.19 – Images AFM obtenues sur la zone 12C hybridée avec des monobrins de 84 bases de long, en les comparant à des images de taille identique obtenues sur les sondes 12C avant hybridation. A- Image de $700 \times 700 \mu\text{m}^2$ sur les sondes 12C, avant hybridation, B- image de $700 \times 700 \mu\text{m}^2$ sur les sondes 12C après hybridation avec les monobrins de 84 bases, C- image de $450 \times 450 \mu\text{m}^2$ sur les sondes 12C, avant hybridation et D- image de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ sur les sondes 12C après hybridation avec les monobrins de 84 bases.

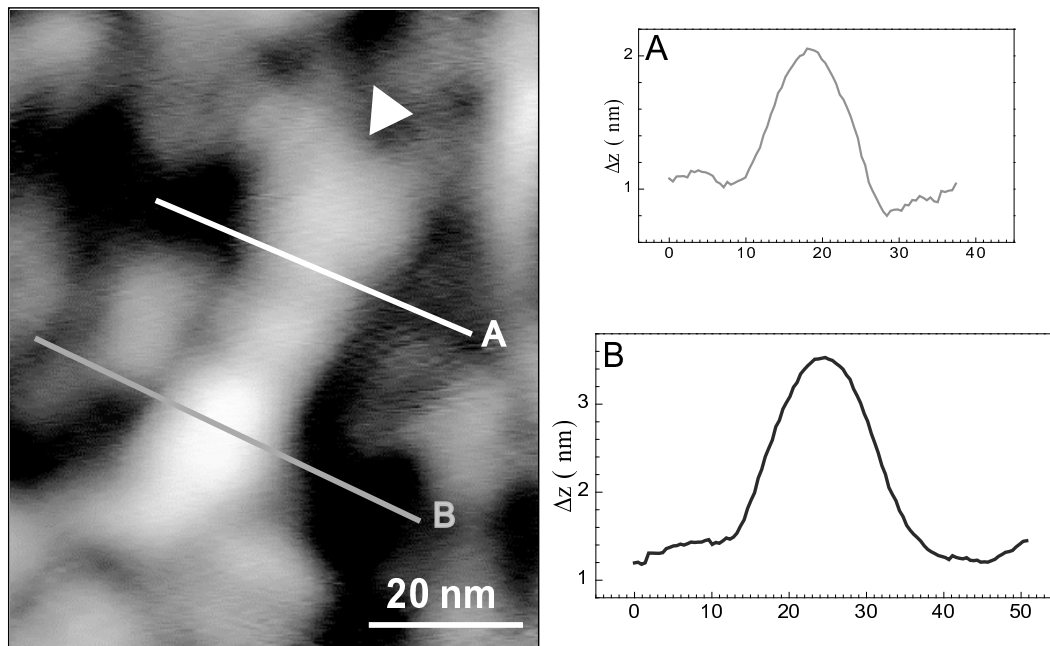


FIG.5.20 – Images d'un brin cible de 84 bases hybridé avec une sonde ^{12}C de taille $70 \times 70 \text{ nm}^2$, avec deux coupes notées 1 et 2 reportées à droite de l'image.

pointes (environ 10 nm). Ainsi, on peut penser que si les molécules sont nombreuses, elle sont donc très proches les unes des autres. La convolution de la pointe limitera alors fortement notre résolution et ne permettra pas de distinguer les molécules cibles de manière isolée.

Compte tenu de la convolution avec la pointe, la longueur mesurée est conforme avec la valeur attendue pour la cible de 84 bases. Les coupes présentées rendent compte d'une augmentation de l'épaisseur de la molécule passant de 1 à 2 nm. De plus, cette augmentation apparaît à 25 nm d'une des extrémités du brin. Il est donc probable que cette zone corresponde au lieu de l'hybridation. Cependant, parfois des molécules cibles hybridées ont pu être résolues, en travaillant à très haute résolution, comme sur l'image de la figure 5.20.

5.2 Premiers essais de manipulation

Jusqu'ici, nous nous sommes uniquement intéressés à l'étude **morphologique** des processus d'hybridation. Une autre voie d'étude de ces phénomènes a été entreprise par manipulation de pointe. L'objectif consistait à mettre en évidence la zone d'hybridation par poussée "mécanique" des brins. Les sondes étant greffées de manière covalente au substrat, on espère ainsi faire "pivoter" les brins cibles autour de leur point d'ancrage correspondant à la zone d'hybridation. Ce type d'études constitue un nouveau domaine d'applications des techniques de champ proche et est maintenant plus communément appelé : expériences de **nanomanipulation**. Pour connaître

quelques-uns des principaux travaux réalisés sur des matériaux biologiques, on pourra se référer à un article de D. Fotiadis *et al.*, publié en 2002 [22].

Dans toute cette partie les conditions expérimentales seront donc éminemment différentes de celles utilisées jusqu'à présent (voir description des conditions expérimentales chapitre 1). L'ensemble de ces expériences a été réalisé sur des puces hybridées avec de longs brins de 1500 bases de long **multimarqués**, présentées dans la section 5.1.3 de ce chapitre. Il s'agit ici de s'affranchir de tout souci de détection des brins, pour ne s'intéresser qu'aux problèmes de la manipulation de brins d'ADN. Pour ce faire, deux catégories d'essais ont été effectuées : des essais en mode *Contact* et des essais en mode *Contact Intermittent*.

5.2.1 Essai en mode contact

Des essais préliminaires ont été réalisés en mode contact. Les expériences ont été réalisées de la manière suivante : dans un premier temps, la surface est imagée en contact intermittent avec des leviers de fréquence propre 150 kHz, de raideur 4,5 N/m. Une fois les brins hybridés identifiés, l'AFM est basculé en mode contact pour opérer un premier passage sur la zone à analyser. Une fois le premier passage effectué, l'appareil est rebasculé en mode contact intermittent et on opère une image de plus grand format de manière à observer l'effet de ce premier passage en mode contact. Les essais ont été réalisés en limitant au maximum la force exercée par la pointe sur la surface. Un exemple des images obtenues est reporté sur la figure 5.21.

L'image de la figure 5.21-A met bien en évidence la présence de brins hybridés sur la surface. Après le premier passage en mode contact sur la zone marquée par le carré blanc, on remarque, sur les images B- et C-, l'apparition d'une zone dépourvue de relief et de brins, possédant une rugosité relativement faible de 0,33 nm. Par ailleurs, on observe en bord de zone, à droite, l'apparition d'amas de matière absents sur l'image obtenue avant passage en mode contact. En comparant la morphologie de la zone balayée en mode contact et celle en dehors, on constate (en particulier sur l'image C) qu'elle semble dans les deux cas s'organiser autour d'îlots de taille $20 \times 30 \text{ nm}^2$, bien qu'ils possèdent une hauteur de 1,5 nm à l'extérieur de la zone et 0,7 nm dans la zone balayée.

Ces résultats montrent qu'après un passage en mode contact la surface a été déformée de manière irréversible. Les morphologies observées hors et dans la zone imagée en mode contact semblent identiques, ce qui porte à croire que les sondes sont toujours bien présentes après le passage en mode contact, mais qu'elles sont tout simplement écrasées sur la surface du substrat. Ceci est en bon accord avec la réduction de rugosité de 0,78 nm avant, à 0,33 nm après passage en mode contact. En revanche, les brins hybridés observés initialement sur la zone ont complètement disparus. Ils semblent avoir été arrachés et poussés par la pointe en bord de zone, conduisant à la

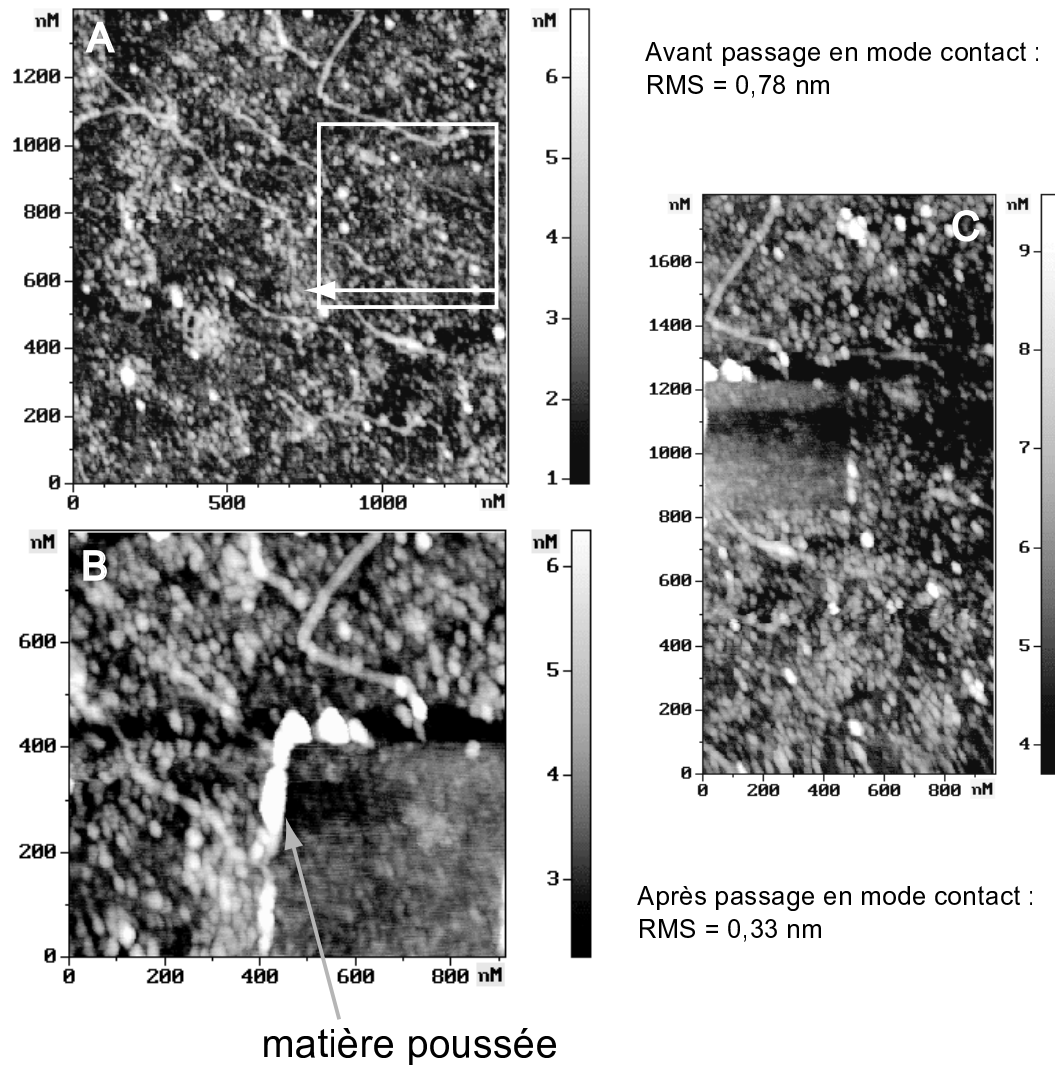


FIG.5.21 – Test de déplacement de brins en mode contact. A- Image obtenue en mode CI sur la zone avant passage en mode contact. Le carré blanc indique la zone qui va être balayée en mode contact. Les images B- et C- rendent compte de l'état de surface après un passage en mode contact.

formation d'un amas de matière en bord de scan.

Ainsi, les résultats obtenus par poussée en mode contact ne semblent pas très adaptés pour réaliser des poussées sélectives de brins. Une des origines de l'échec de ces manipulations en mode contact se situe probablement dans le choix de nos pointes. En effet, les pointes utilisées ici sont des pointes de raideur assez élevée, environ 4,5 N/m, destinées à l'imagerie en mode contact intermittent. Il est donc plus difficile de contrôler l'énergie cédée à la surface du fait d'un contrôle moins précis sur la consigne. Il serait donc préférable de travailler avec un levier de raideur plus faible, levier de raideur 0,01N/m (destiné au mode contact) pour mener à bien cette étude. On

remarquera que dans ce cas la résolution des images en mode CI devrait être nettement affectée du fait d'un facteur de qualité bien moindre.

5.2.2 Essais en mode Contact Intermittent appuyé

Une seconde série d'essais ont donc été effectués en travaillant en contact intermittent. Quelques travaux, récemment publiés, ont montré la possibilité de déplacer des objets en mode oscillant [23–25]. Pour ce faire, il suffit que la distance moyenne entre la position de la pointe et la surface de l'échantillon soit inférieure à la hauteur de l'objet à déplacer. Il va donc être nécessaire de diminuer drastiquement l'amplitude de travail pour se placer dans ces conditions.

Les expériences sont là encore effectuées en trois temps. Une première étape consiste à repérer la zone sur laquelle on va opérer la poussée. Dans cette phase, les conditions expérimentales sont celles qui ont été sélectionnées pour cette étude, soit $A^0=10$ nm et $A^{SP}/A^0=95\%$. Dans un deuxième temps, on abaisse l'amplitude de travail à une valeur proche de 0 puis on image la zone qui nous intéresse avec ces conditions. Dans un troisième temps, on se replace dans les conditions de la première phase et on réalise une image de plus grand format pour observer les effets du passage en Contact Intermittent "appuyé". Ces trois étapes sont opérées autant de fois qu'il est nécessaire, en abaissant progressivement la consigne, jusqu'à atteindre obtenir une modification de l'état de surface.

a- La dissection de brins d'ADN

Une première série de tests a conduit à des résultats du type de ceux présentés sur les images 5.22.

L'image 5.22-A présente l'état de surface avant de procéder aux différents passages avec réduction d'amplitude. L'image B- quant à elle montre le brin sélectionné par le rectangle blanc après 3 passages et une amplitude réduite à environ 3 nm. Sur cette image, on observe que la forme du brin est identique à sa forme initiale. Ainsi, à cette amplitude les passages n'ont pas eut une grande influence sur la morphologie du brin. Enfin, l'image C présente le résultat obtenu après six passages et une réduction de l'amplitude à moins de 1 nm. On constate que le brin a été sectionné et se compose désormais de deux parties : l'une est restée fixe et l'autre (illustrée par un cercle blanc) a été arrachée et se retrouve plus loin à gauche sur l'image.

Cette expérience montre qu'en diminuant l'amplitude, la pointe peut céder suffisamment d'énergie à l'échantillon pour découper le brin. Ces expériences sont à rapprocher des premières dissection de brin isolé réalisées en mode contact publiées en 1992 par le groupe d'Helen Hansma *et al.* [26, 27]. Dans ces expériences, ils ont montré qu'ils pouvaient sectionner de manière re-

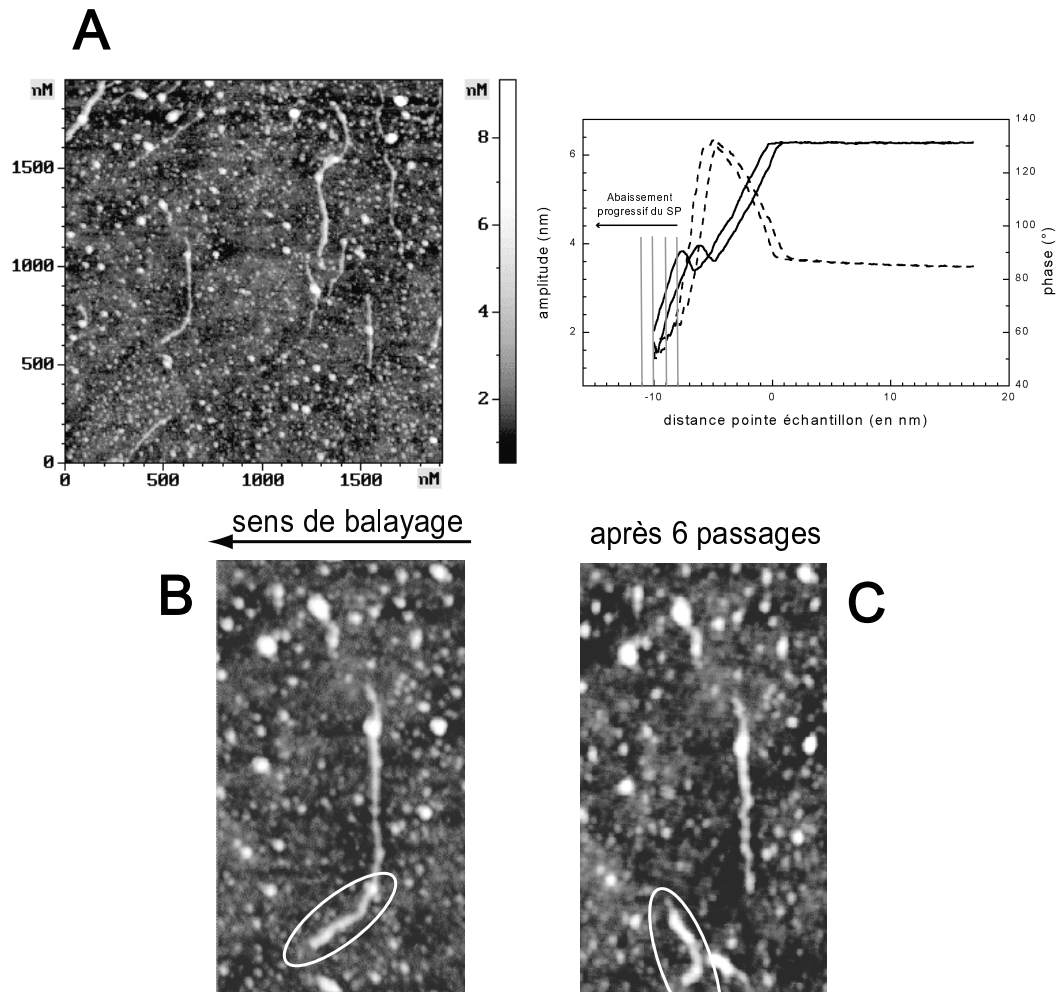


FIG.5.22 – Test de déplacement de brins en mode contact intermittent. A- image avant passage en réduction d'amplitude. B- image après 3 passages en réduction d'amplitude enfin l'image C- rend compte de l'état de surface après 6 passages et une réduction d'amplitude à moins de 0,5 nm. Le graphique représente les courbes approches-retrait en amplitude (trait continu) et en phase (trait en pointillé). Les différentes valeurs de SP choisies pour les passages successifs sont tracées qualitativement.

productible des brins d'ADN en appliquant des forces de l'ordre de 5nN. Dans notre cas, il est relativement difficile de contrôler avec précision l'énergie cédée par la pointe. Le contrôle de ce paramètre nécessite un étalonnage précis de nos leviers à chacune des étape du processus, ce qui n'a pas été effectué.

b- Le dézippage d'un triple brin

L'ensemble des expériences réalisées suivant la procédure de "poussée" en contact intermittent par réduction de l'amplitude ont généralement conduit à la cassure du brin à pousser. Cependant, un test a conduit à un résultat original où le brin a pu être effectivement poussé. C'est ce que nous nous proposons de voir maintenant.

La figure 5.23 rend compte de la série d'images obtenues expérimentalement. L'image 5.23-A montre le brin sur lequel vont être opérés les multiples passages. On remarque qu'il possède une épaisseur comprise entre 2 à 3,5 nm. Après un premier passage, on observe sur l'image 5.23-B que le brin a été effectivement déplacé dans la zone délimitée par les deux flèches. Il semble que la mobilité du brin ait été limitée par deux points d'ancrage (notés par les étoiles sur la figure 5.23-B) autour desquels le brin a été déplacé. Ils apparaissent sous la forme de deux points d'inflexion dont la courbure s'accroît après le premier passage (voir image -A). L'explication de ces points d'ancrage peut faire l'objet d'une discussion sur la nature des brins utilisés. On rappelle que les brins sont des brins multimarqués, or, il se trouve que les molécules de CY³ ont tendance à facilement s'adsorber pouvant donc constituer des points d'ancrages forts. La poursuite des expériences avec des brins monomarqués devrait permettre de conclure sur l'origine de ces points d'ancrage.

Après un second passage, on observe toujours la présence du brin poussé au passage précédent, mais on notera également l'apparition d'un troisième brin de contraste plus faible, correspondant à une hauteur de 1 nm à comparer à l'autre brin dont l'épaisseur est de deux nm (voir la coupe D). De plus, le second brin semble être beaucoup plus fin, de largeur proche de 15 nm tandis que la largeur du brin initial avoisine le 25 nm. Il apparaît donc que ce brin était probablement enroulé autour d'un brin réhybridé (en référence aux deux catégories identifiées 5.1.3).

Ces images mettent donc en évidence la possibilité de déplacer les brins des brins d'ADN en mode contact intermittent. De plus cette expérience a permis d'identifier la présence d'un triplex brin enroulé autour d'un double brin, par dézippage de celui-ci. Ces images constituent donc une preuve effective de l'existence de triple hélice [3].

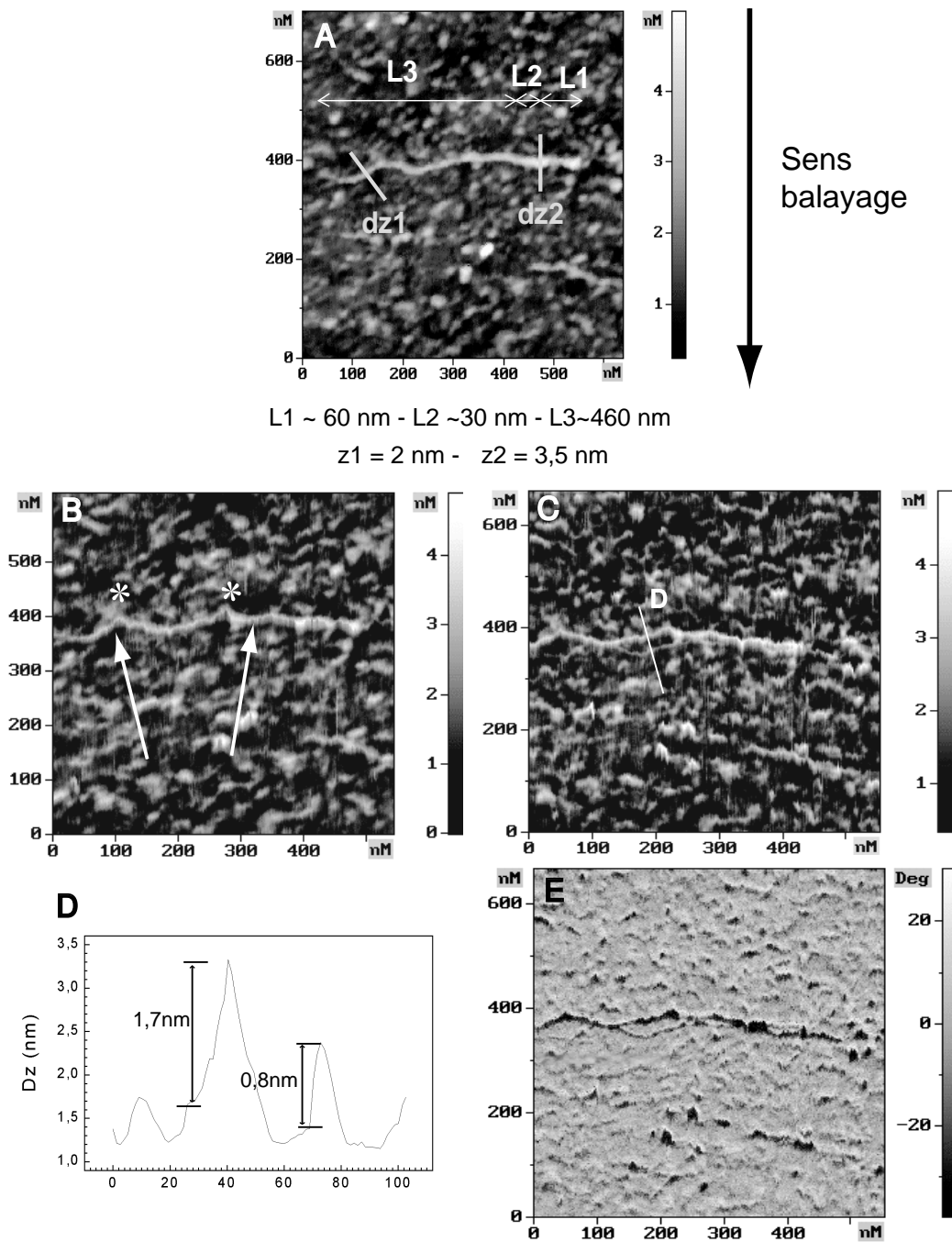


FIG.5.23 – Test de déplacement de brins en contact intermittent appuyé. L'image A- présente le brin sélectionné pour le test ainsi que le sens du balayage. L'images B- (topographie) montre le brin après un premier passage en contact intermittent appuyé avec une réduction d'amplitude autour de 1 nm et les images C-(topographie) et E-(phase) celles obtenues après un second passage, avec D- la coupe correspondante.

Conclusions

L'ensemble des études conduites sur les processus d'hybridation montre que l'AFM offre de grandes possibilités pour l'investigation des phénomènes biologiques à l'échelle moléculaire. Ainsi, une identification individuelle des brins a été obtenue pour l'ensemble de trois longueurs de cibles analysées : 1500, 600 et 84 bases, permettant une quantification du nombre de molécules hybridés, y compris pour des brins non-marqués, qui ne peuvent faire l'objet d'une caractérisation par microscopie de fluorescence.

En outre, des analyses morphologiques précises ont mis en évidence des conformations particulières. D'une part, les brins de 1500 bases apparaissent suivant deux configurations : des brins hybridés avec la sonde, mais également une configuration plus complexe où le brin hybridé avec sa sonde peut subir une recombinaison par son complémentaire. D'autre part, la comparaison entre les structures obtenues sur les brins de 600 bases multi- et non-marqués montre que les morphologies de brin obtenues pour une même séquence, avec (ou sans) molécules fluorescentes, s'avèrent foncièrement différentes. Ainsi, alors que les brins multimarqués présentent des structures en grumeaux de 2 nm d'épaisseur traduisant la présence des chromophores à la surface du brin, les brins non marqués possèdent une structure relativement complexe impliquant un grand nombre de repliements tout au long de la séquence.

Par ailleurs, les analyses des longueurs et des épaisseurs des brins de 1500 et 84 bases ont permis d'identifier le lieu de l'hybridation.

Enfin, des premiers essais de manipulations ont illustré la possibilité de déplacer des brins d'ADN en Contact Intermittant. Cependant, bien qu'assez prometteurs ces tests ont montré la nécessité de contrôler la réduction d'amplitude avec une grande précision de manière à atteindre les conditions de manipulations et non celles de dissections. Or, au vue des épaisseurs des objets à déplacer, qui sont de l'ordre de 1 à 2 nm, la fenêtre des conditions de manipulation est très restreinte. La recherche de conditions reproductibles devra faire l'objet d'une étude détaillée pour opérer des manipulations de brins d'ADN contrôlées et reproductibles.

Bibliographie

- [1] V. Dugas, G. Depret, Y. Chevalier, X. Nesme, E. Souteyrand, Immobilisation of single-strands DNA fragments to solid surface and their repeatable specific hybridization. Covalent binding or adsorption, *Sensors and Actuators B*, 101, p.112, 2004.
- [2] F. Calevro, H. Charles N. Reymond, V. Dugas, J. -P. Cloarec, J. Bernillon, Y. Rahbé, G. Febvay and J. -M. Fayard, Assessment of 35mer amino-modified oligonucleotide based microarray with bacterial samples, *Journal of Microbiological Methods*, 57, p.207, 2004.
- [3] S.J. Shi, A. Scheffer, E. Bjeldanes, M. A. Reynolds, and L. J. Arnold, DNA exhibits multi-stranded binding recognition on glass microarrays, *Nucl. Acids. Res.*, 29, p.4251, 2001.
- [4] V. A. Bloomfield, D. M. Crothers, I. Tinoco, Nucleic Acids : Structures, Properties, and Functions, *University Science Books : Herndon VA*, 2000.
- [5] B. Tinland, A. Pluen, J. Sturm, and G. Weill, Persistence Length of Single-Stranded DNA, *Macromolecules*, 30, p.5763, 1997.
- [6] D. Bensimon, A. J. Simon, V. Croquette, and A. Bensimon, Persistence Length of Single-Stranded DNA, *Phys. Rev. Lett.*, 74, p.4754, 1995.
- [7] J. D. Watson, and F. H. C. Crick, Genetic Implications of the Structure of Nucleic Acid. A structure of DNA, *Nature*, 171, p.964, 1953.
- [8] Y. L. Lyubchenko, P. I. Oden, D. Lampner, S. M. Lindsay, and K. A. Dunker, Atomic force microscopy of DNA and bacteriophage in air, water and propanol : the role of adhesion forces, *Nucleic Acids Res.*, 21, p.1117, 1993.
- [9] H. G. Hansma, R. Golan, W. Hsieh, C. P. Lollo, P. Mullen-Ley, and D. Kwoh, DNA condensation for gene therapy as monitored by atomic force microscopy, *Nucleic Acids Res.*, 26, p.2481, 1998.

- [10] B. Pignataro, L. Chi, S. Gao, B. Anczykowski, C. Niemeyer, M. Adler, H. Fuchs, Dynamic scanning force microscopy study of self-assembled DNA-protein nanostructures, *Applied Physics A*, 74, p.447, 2002.
- [11] T. Muir, E. Morales, J. Root, I. Kumar, B. Garcia, C. Vellandi, D. Jenigian, T. Marsh, E. Henderson, and J. Vesenka, The morphology of duplex and quadruplex DNA on mica, *J.Vac.Sci.Technol. A*, 16(3), p.1172, 1998.
- [12] X. Ji, J. Oh, A. K. Dunker and K. W. Hipps, Effects of relative humidity and applied force on atomic force microscopy images of the filamentous phage fd, *Ultramicroscopy*, 72, p.165, 1998.
- [13] F. Moreno-Herrero, J. Colchero and A. M. Barò, DNA height in scanning force microscopy, *Ultramicroscopy*, 96, p.167 (2003).
- [14] R. Garcìa and R. Pérez, Dynamic atomic force microscopy methods, *Surface Science Reports*, 47, p.197, 2002.
- [15] A. P. Quist, L. P. Bjorck, C. T. Reimann, S. O. Oscarsson and B. U. R. Sundqvist, A scanning force microscopy study of human serum albumin and porcine pancreas trypsin adsorption on mica surfaces, *Surface Science*, 325, p.L406, 1995.
- [16] C. Bustamante, J. Vesenka, C. L. Tang, W. Rees, M. Guthold and R. Keller, Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy, *Biochemistry*, 31, p. 22, 1992.
- [17] Northern Blot experiment.
- [18] E. A. Oussatcheva, L. S. Shlyakhtenko, R. Glass, R. R. Sinden, Y. L. Lyubchenko and V. N. Potaman, Structure of branched DNA molecules : gel retardation and atomic force microscopy studies, *J.Mol.Bio.*, 292, p.75, 1999.
- [19] M. Zuker, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Res.*, 31(13), p.3406, 2003.
- [20] J. Jr. SantaLucia, A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, p.1460, 1998.
- [21] <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna/>
- [22] D. Fotiadis, S. Scheuring, S. A. Müller, A. Engel and D. J. Müller, Imaging and manipulation of biological structures with the AFM, *Micron*, 33, p.385, 2002.

- [23] R. Resch,, C. Baur, A. Bugacov, B. E. Koel, A. Madhukar, A. A. G. Requicha and P. Will, Building and manipulating three-dimensional and linked two-dimensional structures of nanoparticles using scanning force microscopy, *Langmuir*, 14, p.6613, 1998.
- [24] R. Resch, D. Lewis, S. Meltzer, N. Montoya, B. E. Koel, A. Madhukar, A. A. G. Requicha and P. Will, Manipulation of gold nanoparticles in liquid environments using scanning force microscopy, *Ultramicroscopy*, 82, p.135, 2000.
- [25] S. Decossas, L. Patrone, A. M. Bonnot, F. Comin, M. Derivaz, A. Barski and J. Chevrier, Nanomanipulation by atomic force microscopy of carbon nanotubes on a nanostructured surface, *Surface Science*, 543, p.57, 2003.
- [26] H. G. Hansma, J. Vesenka, C. Siegerist, G. Kelderman, H. Morrett, R. L. Sinsheimer, V. Elings, C. Bustamante and P.K. Hansma, Reproducible imaging and dissection of plasmid DNA under liquid with the atomique force microscope, *Science*, 256, p.1180, 1992.
- [27] J. Vesenka, M. Guthold, C. L. Tang, D. Keller, E. Delaine and C. Bustamante, Substrate preparation for reliable imaging of DNA molecules with the scanning force microscope, *Ultramicroscopy*, 42-44, p.1243, 1992.

Conclusion Générale

Le sujet de ce travail concernait la caractérisation par microscopie à force atomique de puces à ADN de l'élaboration à l'hybridation. Nous rappelons que cette étude a été conduite suivant deux objectifs. Le premier objectif résidait dans la compréhension de mécanismes de greffage des oligonucléotides sondes sur la puce. Le second relevait d'une réflexion sur les conditions de fonctionnement de l'AFM dans le but d'optimiser la caractérisation de ces systèmes complexes constitués de plusieurs couches de matériaux "mous".

Dans une étude préliminaire, nous avons discuté le choix des conditions expérimentales. Nous avons ainsi montré la nécessité d'éviter autant que possible le contact entre la pointe et la surface des échantillons. Les conditions que nous avons sélectionnées correspondent à un choix objectif visant à accéder à une bonne caractérisation topographique de nos échantillons avec la meilleure résolution possible. Ainsi, nous avons réalisé la quasi-totalité de nos expériences (à l'exception des tests en poussée sur les brins hybridés) en non contact, suivant le mode de fonctionnement Amplitude-Modulation AFM, avec une très faible réduction d'amplitude $A^{SP}/A^{libre} \sim 95\%$ pour des amplitudes libres comprises entre 10 et 15 nm.

En vue d'étudier les processus impliqués dans la fabrication des puces, nous avons mis en place une procédure de caractérisation étape par étape, allant de la préparation des substrats, à l'immobilisation d'oligonucléotides sondes en passant par l'étape de silanisation pour former la couche d'accrochage.

Dans les études réalisées sur la couche d'accrochage, obtenue par silanisation d'un monochlorosilane, nous avons découvert de très grandes disparités dans la morphologie des couches en fonction des protocoles de préparation. Ainsi, deux protocoles de fonctionnalisation ont été analysés en détail. Pour le premier, appelé *en phase gaz*, qui procède à haute température ($T=150^\circ\text{C}$), nous observons qu'il conduit toujours à la formation d'îlots quel que soit le substrat. Pour le second opérant à basse température ($T=4^\circ\text{C}$), appelé *imprégnation*, nous constatons qu'il réalise sur le verre comme sur la silice une couche peu dense qui nappe parfaitement la surface. A partir d'une discussion sur la nature des substrats, la température de dépôt et l'absence d'une fine couche

d'eau en surface des substrats nous avons démontré que dans tous les cas ces dépôts ne peuvent conduire qu'à une couche désordonnée. A l'issue de cette phase, nous avons sélectionné la couche conduisant à la plus faible rugosité et aux plus faibles variations de hauteur, soit le dépôt obtenu par imprégnation sur silice.

Les analyses conduites sur l'immobilisation ont été réalisées suivant deux critères : la longueur des monobrins sondes ainsi que la nature de leur séquence. A l'issue de ces études, nous montrons que l'arrangement des sondes en surface de la puce est piloté par les interactions latérales qui s'établissent entre molécules au moment du dépôt. Nous constatons que l'on peut obtenir différentes organisations après immobilisation des sondes sur la puce en fonction de la séquence des monobrins sondes. Par ailleurs, à l'issue d'une analyse précise d'images à petite échelle, nous avons montré que chaque sonde était résolue individuellement, pour des longueurs supérieures ou égales à 25 bases ($l = 10\text{nm}$), donnant ainsi accès à la résolution moléculaire. Un comptage du nombre de sondes immobilisées, nous a permis d'évaluer une densité locale en sondes de 2×10^{11} sondes/cm², qui se trouve être en parfait accord avec la densité mesurée macroscopiquement par radioactivité. Ces résultats confortent notre mesure et démontrent également que les dépôts des sondes sont relativement homogènes sur l'ensemble de la surface des plots.

Enfin, nous avons réalisé la lecture de tests d'hybridation pour 3 longueurs de brins correspondant à 1500, 600, et 84 bases, présentant des caractéristiques différentes (monobrins, ou double brins ; non marqués ou multimarqués). Pour chacune de ces trois longueurs, les brins apparaissent isolés et possèdent une faible densité de surface. Par ailleurs, nous présentons la première mise en évidence de la zone d'hybridation pour des monobrins cibles hybridés de 1500 et 84 bases possédant une configuration simple du brin cible allongé sur la surface et hybridé avec une sonde. Cependant, nous observons que des conformations plus complexes comme la présence de nombreux repliements internes sur des cibles non marquées de 600 bases de long, ce qui rend impossible l'identification de la zone d'hybridation sur ces cibles pourtant de grande taille. Nous avons également identifié d'autres conformations telles que des recombinaisons sous forme de triplexe, dans le cas où les cibles ne sont disponibles que sous forme de double brin.

Ainsi, l'ensemble de ces études, réalisées à l'air, a montré la puissance de la caractérisation par AFM sur ces systèmes : résolution moléculaire et évaluation locale (échelle de la centaine de nanomètres) des propriétés caractérisant la structure des puces. Cependant, la compréhension de certaines morphologies observées sur ces puces doit encore faire l'objet d'études. A l'avenir des expériences in situ en milieu liquide devrait permettre de mieux comprendre la formation des arrangements entre sondes. En effet, la modification des interactions électrostatiques entre sondes peut être modifiée en faisant varier la concentration en sels des solutions. En ce qui concerne,

les études de conformations des brins hybridés, l'ajout de molécules de formamide au sein de la solution devrait permettre de limiter les phénomènes de repliements.

Résumé : Les puces à ADN constituent aujourd'hui un outil d'analyse incontournable dans le domaine des biotechnologies. Elaborées à partir d'un substrat dur sur lequel sont greffées des oligonucléotides-sondes de séquences connues, elles permettent d'identifier dans une solution les monobrans d'ADN possédant la séquence complémentaire. Dans un contexte de miniaturisation des puces, en vue d'augmenter le nombre de plots par puce, une étude morphologique à l'échelle submicronique a été engagée. L'AFM par sa capacité à imager des systèmes à l'échelle moléculaire, à l'air mais aussi en solution, apparaît comme une technique bien adaptée pour cette étude.

Cette thèse s'intéresse à la caractérisation par microscopie à force atomique de puces à ADN, de leur élaboration jusqu'à l'hybridation. Nous utiliserons le mode en modulation d'amplitude (AM-AFM) et nous montrerons que l'obtention d'informations topographiques précises sur ces systèmes impose de travailler en non-contact, avec une faible réduction d'amplitude, $A/A^{libre} = 95\%$, où A^{libre} est compris entre 10 et 15 nm.

Des puces modèles ont été réalisées pour discuter de l'influence de la longueur et de la nature des séquences des sondes sur les processus d'immobilisation. Ces études ont montré la possibilité d'atteindre la résolution moléculaire pour des sondes de longueur supérieure à 25 bases. Une évaluation de la densité locale des sondes de 25 bases de $2 \pm 0.25 \times 10^{11}$ brins/cm² a été évaluée par mesures statistiques sur les images AFM. Cette valeur locale, qui se trouve en parfait accord avec de mesures macroscopique effectuées par radioactivité, illustre la bonne homogénéité de ces couches. De plus, des arrangements spécifiques, observés pour des sondes de même longueur et de séquences différentes, montrent que les interactions entre sondes durant la phase d'immobilisation jouent un rôle fondamental sur la morphologie des couches.

Les investigations sur les processus d'hybridation ont été conduites sur trois longueurs de brins : 1500, 600 et 84 bases, en solution soit pur soit sous forme de double-brins dénaturés. Les brins, identifiés individuellement, apparaissent couchés et dispersés sur le plot complémentaire. La première identification d'une zone d'hybridation est présentée pour les cible de 1500 bases. De plus, différentes conformations de brins ont été identifiées comme la formation de triplexe à partir des solutions de cible double brin de 1500 bases et la présence de repliement sur cible de 600 bases.

Mots clé : Microscopie à Force Atomique - Modulation en amplitude - ADN - Puce à ADN - Simple brin - Silanisation - Immobilisation - Hybridation - Résolution Moléculaire - Interaction moléculaire.

Abstract : Recently, devices for array-based genetic diagnostics, called DNA chips, have become an important area in biotechnology. They rely on the specific interaction of immobilized single strand DNA (ssDNA), called probe and free ssDNA, called target, in solution. The desire to integrate even more active areas on chips has stimulated a great deal of interest in understanding its basic physicochemical constitution under micron scale. Atomic Force Microscopy (AFM), by its ability to characterize biological surfaces at the molecular scale, in air but also in solution, has emerged as one of the well adapted techniques.

In this work, we use Amplitude Modulation AFM (AM-AFM) to characterize DNA chips from elaboration to hybridization. We show that to obtain accurate topographic information the AFM has to work in non-contact mode, with a low amplitude reduction $A/A^{libre} = 95\%$, where A^{libre} is between 10 and 15 nm.

Model chips were realized to discuss the influence of the length and the nature of the probes on the immobilization process. These studies have demonstrated that molecular resolution can be achieved for probes length longer than 25 bases. A local density of $2 \pm 0.25 \times 10^{11}$ probes/cm² has been statistically measured on AFM images. This value, in agreement with macroscopic radioactivity measurements, illustrates the good homogeneity of the probes layer. Besides, specific arrangements obtained for different sequences show that interactions between probes during the immobilization process play a fundamental role on the layer morphology.

Hybridization processes corresponding to three target lengths (1500, 600 and 84 bases), in different solutions containing single or double strand DNA, were studied. All AFM investigations showed scarcely distributed target lying only on the complementary probes area. The first observation of the hybridized zone is presented for the 1500 bases targets. Besides, several conformations were identified such as the formation of triplexes for double strands targets and the evidence of some hairpins on the 600 bases sequences.

Keywords : Atomic Force Microscopy - Amplitude Modulation-AFM - DNA chip - DNA - Single strand DNA -Silanization - Immobilization - Hybridization - Molecular resolution - Molecular Interaction.