



HAL
open science

Transport électronique dans l'ADN

Thomas Heim

► **To cite this version:**

Thomas Heim. Transport électronique dans l'ADN. Biophysique [physics.bio-ph]. Université des Sciences et Technologie de Lille - Lille I, 2002. Français. NNT: . tel-00003954

HAL Id: tel-00003954

<https://theses.hal.science/tel-00003954>

Submitted on 10 Dec 2003

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

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

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE 1

THÈSE

présentée en vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

discipline : **Sciences des Matériaux**

par **Thomas HEIM**

Transport électronique dans l'ADN

Soutenue le lundi 09 décembre 2002 devant la commission d'examen

Présidente du jury : Ghislaine COULON

Rapporteurs : Hélène BOUCHIAT
Jean – Philippe BOURGOIN

Examineur : Jérôme CORNIL

Directeur de thèse : Dominique VUILLAUME

Remerciements

Cette thèse a été préparée au sein de l'équipe M.C.M.O. (Matériaux et Composants Moléculaires Organiques) de l'I.E.M.N. (Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologies) sous la direction de Dominique Vuillaume.

Je voudrais tout d'abord remercier Dominique Vuillaume qui m'a encadré pendant cette thèse et avec qui j'ai eu la chance de faire mes premiers pas dans le monde de la recherche scientifique. J'ai beaucoup apprécié l'aspect pluridisciplinaire de ce travail à l'interface de la biologie et de la physique.

Je suis très reconnaissant envers Ghislaine Coulon qui m'a fait l'honneur de présider la commission d'examen, ainsi qu'envers Hélène Bouchiat, Jean – Philippe Bourgoïn et Jérôme Cornil pour leur relecture détaillée de ce manuscrit et l'intérêt qu'ils ont marqué à ce travail.

Je remercie également tous les enseignants et/ou chercheurs de l'I.E.M.N., de l'I.B.L. (Institut de Biologie de Lille), de l'I.S.E.N. (Institut Supérieure d'Electronique du Nord), de l'E.N.S. (Ecole Normale Supérieure) de Paris et de Lyon et enfin de l'I.G.R. (Institut Gustave Roussy) qui, par leur sympathie et leur compétence ont contribué au bon déroulement de mes années de thèse, ainsi que tout le personnel administratif et technique à qui j'ai eu affaire et qui a très souvent su répondre rapidement et efficacement à toutes les difficultés que j'ai pu leur soumettre.

Merci enfin à tous mes amis, à ma famille pour leur soutien moral qu'ils m'auront fournis tout au long de la réalisation de ces travaux.

SOMMAIRE

| | |
|------------------------------|----------|
| Introduction générale | 1 |
|------------------------------|----------|

Chapitre I : Introduction

| | |
|--|----|
| I. Introduction | 4 |
| II. Description de la molécule d'ADN | 4 |
| II.1. Structure chimique | 4 |
| II.2. Structure spatiale | 6 |
| II.2.1. Forme A | 10 |
| II.2.2. Forme B | 10 |
| II.2.3. Forme Z | 10 |
| II.2.4. Triplex et quadruplex | 12 |
| II.3. Dénaturation de l'ADN | 12 |
| II.4. Etirement de l'ADN | 13 |
| III. ADN en solution | 14 |
| III.1. Condensation des contre-ions | 14 |
| III.2. Neutralisation de la charge | 14 |
| III.2.1. Paramètres pertinents du système | 14 |
| III.2.2. Solution à une composante | 15 |
| III.2.3. Solution à deux composantes | 18 |
| III.2.3.1. Effet de la valence des ions | 18 |
| III.2.3.2. Effets géométriques | 18 |
| III.2.4. Interaction spécifique des cations | 19 |
| III.3. Condensation de l'ADN | 20 |
| III.3.1. Présentation | 20 |
| III.3.2. Origine des structures ordonnées | 22 |
| III.3.3. Interaction entre molécules d'ADN | 23 |
| III.3.4. Conséquences | 24 |
| III.3.4.1. Pour le dépôt d'ADN | 24 |
| III.3.4.1.1 Structure avec beaucoup de brins | 25 |
| III.3.4.1.2. Structure intermédiaire | 27 |
| III.3.4.1.3. Structure avec peu de brins | 27 |
| III.3.4.2. Pour la conduction | 27 |
| IV. Méthodes de dépôt | 28 |
| IV.1. Introduction | 28 |
| IV.2. Traitement des surfaces | 29 |
| IV.3. Différentes techniques | 29 |
| IV.3.1. Greffage | 29 |
| IV.3.2. Peignage moléculaire | 29 |
| IV.3.3. Etirement par un flot | 32 |

Sommaire

| | |
|---|----|
| IV.3.4. Piège électrostatique | 33 |
| IV.4. Mesure des hauteurs à l'AFM | 33 |
| V. Mesures électriques | 36 |
| V.1. Introduction | 36 |
| V.2. Modèles de conduction | 36 |
| V.2.1. Transfert intramoléculaire | 36 |
| V.2.1.1. Vitesse de transfert | 39 |
| V.2.1.2. Super échange | 41 |
| V.2.1.3. Cas de l'ADN | 41 |
| V.2.1.4. Distance de saut variable | 42 |
| V.2.1.5. Saut de polaron | 43 |
| V.2.2. Transport à travers une molécule entre deux électrodes | 43 |
| V.2.2.1. Injection des charges | 43 |
| V.2.2.2. Approche de Bardeen | 44 |
| V.2.2.3. Approche de Landauer | 45 |
| V.3. Mesures électriques | 45 |
| V.3.1. ADN conducteur | 45 |
| V.3.2. ADN semi-conducteur | 47 |
| V.3.3. ADN isolant | 49 |
| V.3.4. Effet de la température | 49 |
| V.3.5. Effet de l'environnement | 50 |
| V.4. Conclusion des mesures électriques | 51 |
| VI. Conclusion Générale | 52 |

Chapitre II : Techniques expérimentales

| | |
|--|----|
| I. Introduction | 58 |
| II. Microscopie champ proche | 58 |
| II.1. Introduction | 58 |
| II.2. Microscope à effet tunnel | 58 |
| II.3. Microscopie à force atomique | 59 |
| II.3.1. Le mode contact | 59 |
| II.3.2. Le mode non contact | 60 |
| II.3.3. Le mode intermittent ou tapping | 60 |
| II.3.4. Microscopie optique champ proche | 60 |
| II.3.5. AFM et STM ? | 61 |
| II.3.6. Le renouveau du mode non contact | 61 |

| | |
|---|-----|
| II.4. Description de l'appareil | 61 |
| II.4.1. Les pointes | 63 |
| II.5. Description des différents modes | 64 |
| II.5.1. Description de l'interaction pointe surface | 64 |
| II.5.1.1. Courbe d'approche retrait | 64 |
| II.5.1.2. Mode contact | 65 |
| II.5.1.3. Modes oscillants | 65 |
| II.5.1.3.1. Oscillateur harmonique | 65 |
| II.5.1.3.2. Cas de l'oscillation verticale | 67 |
| II.5.1.4. Mode oscillation latérale | 73 |
| II.5.2. Application à l'imagerie | 74 |
| II.5.2.1. Principe | 74 |
| II.5.2.2. Mode contact | 74 |
| II.5.2.3. Tapping mode | 75 |
| II.5.2.4. Tapping mode deflection | 76 |
| II.5.2.5. Mode non-contact | 76 |
| II.5.2.6. Mode oscillation latérale | 78 |
| II.5.2.7. Interprétation des images AFM | 80 |
| II.5.2.7.1. Effet de la dissipation | 80 |
| II.5.2.7.2. Cas de contraste d'élasticité | 80 |
| II.5.2.7.3. Effet de la couche d'eau | 82 |
| II.5.2.7.4. Convolution | 82 |
| II.5.2.8. Conclusion : AFM en pratique | 83 |
| II.5.3. Mesures électriques | 86 |
| II.5.1.1. Lift mode | 86 |
| II.5.1.2. EFM | 86 |
| II.5.1.3. Conducting AFM | 89 |
| II.5.1.3.1. Présentation | 89 |
| II.5.1.3.2. Problèmes du contact électrique | 89 |
| II.5.1.3.3. Caractéristiques courant – tension | 91 |
| II.5.1.3.3.1. Protocole | 91 |
| II.5.1.3.4. Imagerie en courant | 92 |
| III. Mesures électriques sur des électrodes fixes | 94 |
| IV. Préparation des surfaces | 94 |
| IV.1. Dépôt de molécules | 94 |
| IV.1.1. Principe du greffage | 95 |
| IV.1.1. Nettoyage du substrat | 95 |
| IV.1.2. Greffage de la molécule | 96 |
| IV.1.3. Silane amine | 97 |
| IV.1. Dépôt de polymères | 99 |
| IV.1. SiH[111] | 101 |
| IV.1. Pentacène | 101 |
| V. Caractérisation des surfaces | 102 |
| V.1. Caractérisation avec les énergies de surface | 102 |
| V.1.1. Equation de Young – Dupré | 103 |

Sommaire

| | |
|--|-----|
| V.1.2. Equation d'Owens-Wendt | 103 |
| V.1.3. Mise en œuvre | 105 |
| V.2. Caractérisation à l'AFM | 106 |
| VI. Manipulation et observation de l'ADN | 108 |
| VI.1. Solutions d'ADN | 108 |
| VI.2. ADN fluorescent | 109 |
| VI.3. Observation au microscope | 109 |
| VII. Réalisation d'électrodes | 111 |
| VII.1. Lithographie électronique | 111 |
| VII.2. Lithographie optique | 113 |
| VIII. Conclusion | 115 |

Chapitre III : Dépôt d'ADN

| | |
|---|-----|
| I. Introduction | 118 |
| II. Surface à contraste chimique | 118 |
| II.1. Problématique | 118 |
| II.2. Objectif | 119 |
| II.3. Obtention de contraste chimique | 121 |
| II.3.1. Test de greffage pleine plaque | 121 |
| II.3.2. Surface à contraste chimique | 123 |
| II.3.2.1. Protocole | 123 |
| II.3.2.2. Masque utilisé | 125 |
| II.3.2.3. Résultats | 128 |
| II.3.2.4. Conclusion | 129 |
| III. Dépôt d'ADN | 130 |
| III.1. Présentation | 130 |
| III.2. Méthode de la goutte | 130 |
| III.2.1. Variante du peignage moléculaire | 130 |
| III.2.2. Caractérisation de l'ADN déposé | 131 |
| III.2.2.1. Orientation des brins d'ADN | 131 |
| III.2.2.2. ADN entremêlé | 131 |
| III.2.2.3. Densité en fonction du pH | 136 |
| III.2.2.3.1. Protocole | 136 |
| III.2.2.3.2. Résultats | 139 |
| III.2.2.3.3. Interprétation | 140 |
| III.2.2.4. Longueur de l'ADN | 141 |

| | |
|--|-----|
| III.2.2.4.1. Protocole | 141 |
| III.2.2.4.2. Résultats | 141 |
| III.2.2.5. Densité en fonction du temps d'incubation | 143 |
| III.2.2.5.1. Protocole | 143 |
| III.2.2.5.2. Résultats | 143 |
| III.2.2.5.3. Interprétation | 144 |
| III.2.3. Conclusion | 145 |
| III.3. Deuxième méthode : Séchage d'un goutte | 145 |
| III.3.1. Présentation | 145 |
| III.3.2. Conclusion | 145 |
| III.4. Discussion | 148 |
| III.4.1. Point de fixation de l'ADN sur la surface | 148 |
| III.4.2. Structure de l'ADN sur la surface | 150 |
| III.5. Mesure de la hauteur de l'ADN | 152 |
| III.5.1. Protocole | 152 |
| III.5.2. résultats | 152 |
| III.5.3. Interprétation | 154 |
| IV. Conclusion | 155 |

Chapitre IV : Mesures électriques

| | |
|--|-----|
| I. Introduction | 158 |
| II. Mesures sur des électrodes | 158 |
| III. AFM – Conducteur | 160 |
| III.1. Introduction | 160 |
| III.2. Problème de la métallisation | 161 |
| III.2.1. Configuration de la jonction électrode/ADN | 161 |
| III.2.2. ADN posé sur l'électrode | 161 |
| III.3. Mesure en imagerie de courant | 163 |
| III.3.1. Deux mesures directes avec du pentacène | 163 |
| III.2.3.1. Sur SiO ₂ | 163 |
| III.2.3.2. Sur une surface terminée amine | 164 |
| III.3.2. Conclusion | 168 |
| III.4. Caractéristique courant – tension | 168 |
| III.4.1. Introduction | 168 |
| III.4.2. Caractéristiques principales des mesures de courant | 169 |
| III.4.2.1. Asymétrie | 169 |
| III.4.2.2. Dépendance vis-à-vis du sens de variation de la tension | 169 |
| III.4.2.3. Reproductibilité des mesures | 170 |
| III.4.2.4. Mesure en fonction du temps | 170 |

Sommaire

| | |
|--|------------|
| III.4.3. Interprétation des résultats | 176 |
| III.5. Mesure en fonction de la distance et de la taille du système | 177 |
| III.5.1. Modèle tunnel | 177 |
| III.5.2. Modèle ohmique | 178 |
| III.5.3. Hopping | 178 |
| III.5.4. Conclusion sur les différents modèles | 179 |
| IV. EFM | 183 |
| V. Fibres d'ADN | 184 |
| VI. Conclusion | 187 |
| Conclusion générale | 189 |
| | |
| <i>Annexe A : AFM - aspect théorique</i> | 191 |
| <i>Annexe B : Corrélacion phase – hauteur sur quelques échantillons</i> | 215 |
| <i>Annexe C : Structure chimique des molécules utilisées pendant la thèse</i> | 225 |
| <i>Annexe D : Mise en évidence d'une nouvelle forme de l'ADN</i> | 227 |
| <i>Annexe E : Complément sur les méthodes de dépôt d'ADN en microscopie électronique</i> | 231 |
| | |
| Bibliographie | 235 |

Abréviations

A, C, G, T : adénine, cytosine, guanine, thymine

ADN : acide désoxyribonucléique

AFM : Atomic Force Microscopy, microscope à force atomique

AFM conducteur : Conducting AFM (en anglais)

APTMS : 3-aminopropyltriméthoxysilane ($\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{Si}(\text{O}-\text{CH}_3)_3$)

Arg ou R : arginine (acide aminé)

C-AFM : Conducting Atomic Force Microscopy

CCD : Charge-Coupled Device (caméras digitales)

COPO : copolymère de méthyl méthacrylate et de polyméthylméthacrylate (PMMA)

Eau DI : eau déionisée

EFM : Electrostatic Force Microscopy, microscope à force électrostatique

IPA : alcool isopropylique

k_B : constante de Boltzmann ($k_B = 1,3805 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)

LFM : Lateral Force Microscopy

Lys ou K : lysine (acide aminé)

MEB : Microscope Electronique à Balayage

MES : (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid)

MIBK : methylisobutylketone, méthylisobutylcétone

MFM : Magnetic Force Microscopy

ODN : Oligodéoxynucléotide (séquence courte d'ADN)

OTS : Octadécyltrichlorosilane ($\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{SiCl}_3$)

PBS : Phosphate Buffered Saline

PFM : Photonic Force Microscopy

PMMA : Polyméthylméthacrylate

SAM : Self-Assembled Monolayer, monocouche auto-assemblée

SNOM : Scanning Near-field Optical Microscopy

STM : Scanning Tunneling Microscopy, microscope à effet tunnel

TEM : Transmission Electron Microscopy, microscope électronique à transmission

Tris : Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane

Introduction générale

La miniaturisation des composants électroniques est un enjeu majeur depuis une cinquantaine d'années dans la fabrication des circuits intégrés. Cette miniaturisation est basée sur la diminution de la taille des composants électroniques de base des circuits intégrés. Une approche différente consiste à fabriquer à partir de molécules des circuits capables d'effectuer des opérations logiques. L'électronique moléculaire a pour objet d'étudier les propriétés électroniques de ces molécules. L'ADN est par sa capacité d'auto organisation un candidat idéal pour la construction d'assemblages moléculaires [Mirkin 2000] [Mirkin 1996] [Alivisatos 1996] [Umeno 1998] [Dekker 2001] [Simmel 2002]. De plus l'empilement des paires de base dans la double hélice favorise le recouvrement des orbitales des bases, et donc le transfert électronique [Dekker 2001]. Cette hypothèse a été proposée par Eley et Spivey [Eley 1962] peu de temps après la découverte de la double hélice par Crick et Watson en 1953 [Watson 1953].

Les expériences récentes de conduction dans l'ADN sont très controversées et ne permettent pas de conclure encore sur les véritables potentialités de cette molécule dans le développement de l'électronique moléculaire. C'est cette question qui a motivé le travail de cette thèse.

Le premier chapitre rappelle la structure de l'ADN, et quelques propriétés remarquables d'auto organisation de cette molécule. Nous présentons ensuite les différentes techniques rencontrées dans la littérature pour déposer l'ADN sur un substrat solide. On termine le chapitre par une présentation des mesures électriques réalisées récemment sur l'ADN ainsi que par quelques aspects théoriques du transfert de charge dans des molécules.

Le second chapitre détaille l'ensemble des techniques expérimentales utilisées au cours de la thèse. On insiste particulièrement sur la présentation de la microscopie champ proche. Le microscope à force atomique (AFM, EFM, C-AFM) est l'appareil que nous avons le plus utilisé tout au long de la thèse. L'aspect théorique de l'interaction pointe-surface est abordé et reprend des résultats récents dans ce domaine.

Nous présentons ensuite les méthodes de préparation de nos surfaces et leur caractérisation. Nous avons utilisé principalement comme substrat de départ des plaquettes de silicium oxydé. Ces surfaces sont traitées par greffage chimique ou par dépôt de polymère à la tournette. La caractérisation de nos surfaces n'est pas très poussée. On se contente principalement de calculer l'énergie de surface (caractère hydrophile, hydrophobe).

On présente la technique d'observation de l'ADN en microscopie à fluorescence. On peut observer des molécules d'ADN isolées. On termine ce chapitre par les méthodes de fabrication d'électrodes avec un espace inter électrode inférieur à 100nm.

Le chapitre III présente les résultats obtenus au cours de la thèse sur le dépôt d'ADN. On présente au début de ce chapitre une méthode de préparation de contraste chimique sur une surface. On devait se servir initialement de ces surfaces pour effectuer nos dépôts. Nous avons finalement utilisé deux autres techniques très simples (séchage d'une goutte de solution contenant de l'ADN, ou incubation de la goutte qu'on enlève du substrat après quelques minutes). Nous caractérisons ces deux techniques (densité de molécules sur la surface, aspect des molécules, longueur, ...) et nous proposons une explication pour expliquer les densités d'ADN observées sur nos différentes surfaces.

Introduction générale

On consacre une partie importante à la mesure de la hauteur de l'ADN à l'AFM. On déduit de nos mesures une estimation de la hauteur d'une seule molécule d'ADN pour différentes surfaces.

Le chapitre IV est consacré à nos mesures électriques sur l'ADN. On utilise pour déposer l'ADN les deux techniques décrites au chapitre III. Les mesures ont été effectuées sur des électrodes, et en AFM conducteur. Dans ce cas la pointe de l'AFM sert à imager l'échantillon et joue le rôle d'électrode pendant la mesure électrique.

On a obtenu deux types de résultats. Des mesures avec « beaucoup » de courant en AFM conducteur sur des cordes d'ADN sur lesquelles on a déposé du pentacène comme seconde électrode. L'utilisation d'autres conducteurs comme l'or ou le platine n'a rien donné. Nous avons très peu de mesures de ce type. En effet l'évaporation de l'électrode sur l'ADN est un traitement destructif. L'ADN semble mieux résister à l'évaporation du pentacène puisque c'est avec ce polymère conducteur que nous avons pu obtenir des résultats. Nos mesures ne permettent pas de distinguer entre une molécule conductrice qui ne serait pas bien connectées à l'électrode et une molécule isolante.

Le deuxième type de résultat a été obtenu en se servant du paquet d'ADN entre la corde d'ADN et l'électrode pour faire le contact électrique. Une série de mesures en fonction de la distance parcourue par le courant, et de la taille des cordes d'ADN, nous permet de tester différents modèles de conduction rencontrés dans la littérature.

On termine ce chapitre par quelques mesures obtenues en EFM (qui permet de sonder les propriétés électrostatiques des objets posés sur la surface), ainsi que quelques mesures obtenues sur des fibres d'ADN.

Chapitre I

Introduction

I. Introduction

La problématique de la conduction dans des molécules biologiques a 60 ans. En 1941 Szent-Gyorgyi [Szent 1962] propose que la conduction dans les protéines joue un rôle majeur dans les processus biologiques. Peu de temps après l'élucidation de la structure de l'ADN en 1953 [Watson 1953], Eley et Spivey [Eley 1962] proposent que l'ADN pourrait conduire le courant. L'empilement des paires de base pourrait être le support du transport électronique.

Nous présentons dans ce chapitre la structure chimique et spatiale de l'ADN. L'effet des contraintes mécaniques peut déformer la molécule. Ce dernier point est important puisque la conduction dans l'ADN va a priori dépendre de la structure de la molécule.

La partie suivante présentera les propriétés remarquables d'interaction de l'ADN avec son environnement avec lui-même ou d'autres molécules d'ADN.

Le dépôt d'ADN sur une surface est une problématique assez ancienne. L'étude au microscope électronique de cette molécule a nécessité la mise au point de techniques de dépôt parfois empiriques. D'autres techniques ont été mises au point depuis mais avec des objectifs différents. On peut diviser ces techniques en deux grandes catégories. La première dont font partie celles utilisées principalement par les microscopistes consiste à déposer l'ADN dans des conditions douces [Dubochet 1971] [Mayor 1968]. L'ADN est proche de sa configuration en solution. La deuxième catégorie est plus contraignante pour la molécule, puisqu'on impose à l'ADN une certaine conformation sur la surface, généralement étiré pour pouvoir se repérer facilement le long de la molécule d'ADN. Cette dernière technique a des applications dans le repérage de séquences sur le brin étiré [Allemand 1998].

Etant donné la complexité de la molécule d'ADN, on doit s'attendre à une forte dépendance des propriétés de conduction avec la technique de dépôt utilisée. C'est l'explication la plus probable de la grande variété de résultats rencontrés dans la littérature. Les mesures actuelles vont de l'isolant à la supraconductivité induite en passant par un comportement semi conducteur. Un article récent [Kasumov 2002] mets clairement en évidence pour la première fois cette dépendance entre la technique de dépôt et les propriétés électroniques de l'ADN. Ils ont les deux comportements : isolant et conducteur suivant la technique utilisée.

II. Description de la molécule d'ADN

II.1. Structure chimique

L'ADN est un macromolécules biologiques support de l'information génétique. La particularité de cette molécule est qu'elle a en première approximation toujours la même structure indépendamment de l'information qu'elle contient. On présente dans cette partie la constitution chimique de l'ADN.

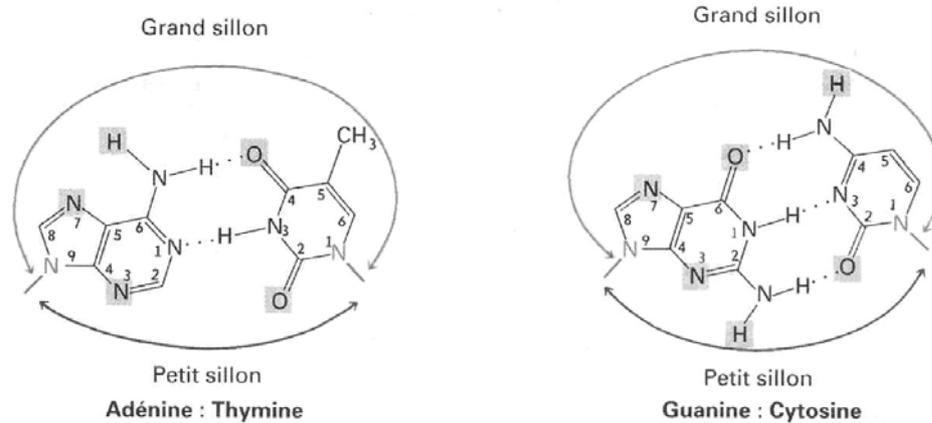
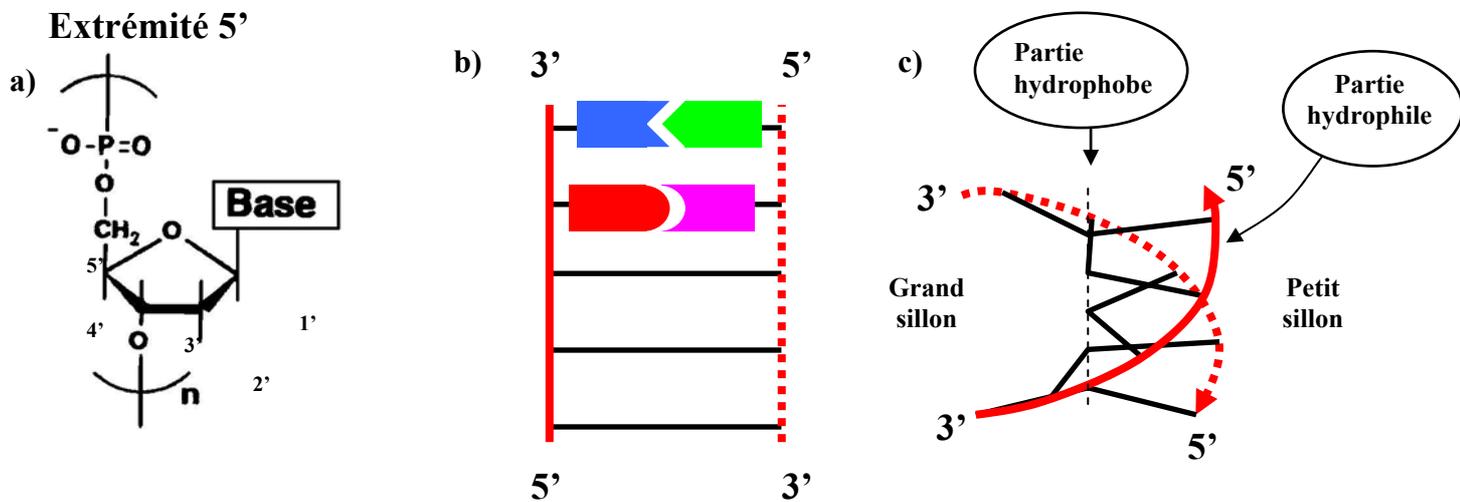


Figure 1.01 : Représentation des paires de base de l'ADN. A droite les paires de base G (guanine) et C (cytosine) interagissent par trois liaisons hydrogène. A gauche les paires de bases A (Adénine) et T (Thymine) qui interagissent par deux liaisons hydrogène.



Extrémité 3'

Figure 1.02 : a) Constitution chimique d'un brin d'ADN. Le monomère de base appelé nucléotide est composé d'un groupement phosphate, d'un sucre (pentose), auquel est attaché une des quatre paires de base. L'association de ces monomères donne un brin d'ADN. L'extrémité de la chaîne est composée d'une fonction alcool (non représenté). Les paires de base sont plutôt hydrophobes, tandis que le squelette phosphaté est chargé et solubilise l'ADN. b) Les paires de base s'associent par paire. L'ADN est constituée de deux brins antiparallèles. On peut schématiquement voir le groupement phosphate et sucre comme les montants d'une échelle et les paires de base comme les échelons. La structure spatiale de l'ADN est une double hélice droite (dans la majorité des cas). Comme les paires de base forment un angle entre elles, il apparaît un petit et un grand sillon.

L'ADN est un polymère. L'unité de base qui le compose est appelée nucléotide. Ce monomère peut se décomposer en trois sous structure (cf. figure I.02) :

Une base : Adénine, Guanine, Cytosine et Thymine

Le sucre : pentose

Un groupement phosphate : $-\text{PO}_3^-$

Les paires de base sont au nombre de quatre : Adénine (notée A), Guanine (G), Cytosine (C) et Thymine (T). On distingue les paires de base en deux catégories suivant qu'elles dérivent de la purine (A et G) ou de la pyrimidine (T et C). Ces bases peuvent s'apparier spécifiquement par des liaisons hydrogènes. A s'associe avec T, et G avec C. La figure I.01 montre cet appariement ainsi que la formule chimique des bases. La liaison A-T (deux liaisons hydrogène) est moins forte que la liaison G-C (trois liaisons hydrogène). On notera que les points de fixation des bases (cf. figure I.01) sont excentrés par rapport aux paires de base. Les paires de base forment ainsi un angle entes elles.

On peut assembler les nucléotides pour former un polymère. L'assemblage se fait par l'intermédiaire des ponts phosphates comme indiqué par la figure I.02. Le polymère est orienté. On distingue les extrémités de la chaîne en fonction des carbones du sucre (figure I.02). L'extrémité 3' correspond au coté qui se termine par le carbone C3' du sucre. L'autre extrémité sera alors notée 5'.

L'ADN est formé par l'assemblage de deux de ces chaînes poly nucléotidiques. Ces chaînes sont antiparallèles (c'est à dire que les deux brins sont orientés en sens opposés). La molécule ressemble schématiquement à une échelle dont les montants sont le squelette phosphate et les barreaux les paires de base.

La longueur de l'ADN peut varier de quelques paires de base (quelques nm), à plusieurs millions (de l'ordre du mm). Il n'y a pas de limite a priori à leur assemblage. Par exemple le chromosome de la mouche mesure plus d'un centimètre de long pour 2nm de diamètre.

La molécule d'ADN de part les interactions complexes de tous ces constituants va adopter une géométrie particulière.

II.2. Structure spatiale

Les paires de base de l'ADN sont plutôt hydrophobes par comparaison aux groupements phosphates. Ces derniers sont chargés et solubilisent la molécule dans son milieu aqueux.

La molécule sous l'effet des interactions hydrophobes entre les paires de base va avoir tendance à former une hélice pour avoir un meilleur empilement des paires de base (figure I.02). C'est la forme en double hélice droite (comme un tire-bouchon) proposé par Watson et Crick en 1953 [Watson 1953].

Comme on l'a fait remarquer précédemment, les points d'attache des bases au pentose ne sont pas symétriques par rapport à l'axe de la molécule. On a donc dans le plan des paires de base plus d'espace d'un coté que de l'autre (cf. figure I.01 et I.02). Cela donne respectivement le grand et le petit sillon de la molécule d'ADN.

Vu la complexité de cette molécule, on pourrait s'attendre à trouver toute sorte d'arrangements spatiaux. En fait il n'en n'est rien, l'ADN occupe quelques formes bien déterminées. Les écarts que l'on peut observer à ces formes idéales sont assez minimes [Allemand 1998]. Nous décrivons ci-après quelques formes les plus rencontrées. Pour une vue complète on reporte le lecteur à l'article de Leslie [Leslie 1980].

Les formes les plus rencontrées et les plus étudiées sont les formes : A, B et Z. Des études plus récentes ont mis en évidence les formes appelées H, P et S,...

On peut distinguer les formes A, B et Z par trois critères géométriques principaux :

- 1** : Le sucre peut adopter deux conformations. Un des atomes de carbone du cycle se trouve hors du plan formé par les autres atomes.
- 2** : Chacun des atomes de la chaîne comprenant le groupement phosphate impose un angle à la liaison avec les atomes voisins.
- 3** : L'hélice est soit droite (comme un tire bouchon), soit gauche.

L'arrangement spatial des atomes a été déterminé par diffraction X sur des fibres d'ADN. Ce sont les formes les mieux déterminées. On donne sur la figure I.03 la représentation de ces trois formes de l'ADN.

Les formes P et S, sont beaucoup moins bien déterminées. On donne une représentation de la forme P obtenue par simulation [Strick 1996]. Cette forme est très contrainte puisque les paires de base sont orientées vers l'extérieur (vers le solvant). De plus, les groupements phosphates des deux chaînes se retrouvent côte à côte et ont tendance à se repousser électrostatiquement (cf. figure I.03). Le pas de l'hélice et son allongement coïncide avec ceux obtenus par des expériences d'étirement de la molécule avec une torsion contrôlée de la molécule [Allemand 1998]. Ces données pourraient coïncider également avec des mesures de diffraction X obtenue récemment sur le génome de virus Pfl [Liu 1994]. La forme S a été observée au cours d'expérience d'étirement de l'ADN à la limite de la rupture mécanique [Strick 1996] [Clausen-Schaumann 2000].

La forme H est localisée sur certaines séquences de l'ADN. Elle correspond à l'ouverture locale de la double hélice. Un simple brin se retourne sur la région encore appariée pour former une triple hélice. L'autre simple brin restant désapparié. On reparlera plus loin de la formation de triple hélice et de structure avec quatre simples brins.

Les caractéristiques géométriques des différentes formes de l'ADN sont données dans le tableau I.01 et décrites ci-après. Les valeurs correspondent à des moyennes. Il est possible qu'il y ait quelques variations en fonction du contenu en paire de base de la molécule. Par exemple, le nombre de paire de base par tour peut varier de 10.0 à 10.7 en forme B. Ou bien une suite de paires de base A-T donne une double hélice plus rigide avec un petit sillon plus étroit dans la forme B.

Une propriété remarquable est que l'ADN adopte un nombre restreint de formes. En particulier Strick et al. [Strick 1996] ont montré que la réponse de la molécule à une contrainte extérieure (torsion et étirement,...) provoque la coexistence de différentes formes sur une même molécule plutôt que l'adoption d'une forme intermédiaire (cf. annexe D). Par exemple la forme Z (hélice gauche) peut relaxer une contrainte de torsion qui tendrait à dérouler une molécule initialement en forme B (hélice droite).

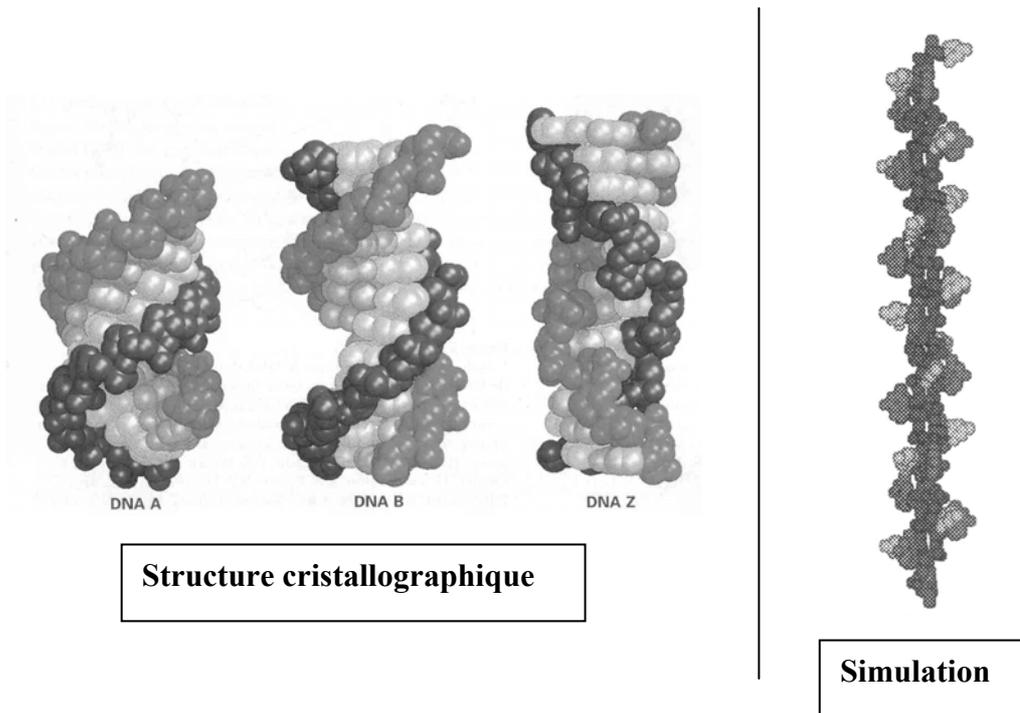


Figure I.03 : Forme A, B, Z déduite à partir de spectre aux rayons X de cristal d'ADN. La forme P est obtenue par calcul numérique [Strick et al. 1996]. La forme B est la plus courante. On distingue nettement sur cette forme le petit et le grand sillon de l'ADN. La forme A est plus compacte, le petit sillon est moins profond et le grand sillon plus étroit. La forme Z est composée d'une hélice gauche, elle plus longue que la forme B. Le grand sillon a disparu. Il ne reste plus qu'un sillon. La forme P correspond à un sur enroulement de l'ADN. Les paires de base sont orientées cette fois ci vers l'extérieur et les chaînes avec les groupements phosphates vers l'intérieur.

| | A | B | Z | P |
|--|--------|--------|--------|--------|
| Taille par paire de base | 0.23nm | 0.34nm | 0.38nm | 2.38nm |
| Diamètre de l'hélice | 2.55nm | 2.37nm | 1.84nm | |
| Sens | droite | droite | gauche | droite |
| Paires de base par tour d'hélice | 11 | 10.4 | 12 | 2.6 |
| Pas pour un tour d'hélice | 2.53nm | 3.54nm | 4.56nm | 6.19nm |
| Inclinaison des paires de base par rapport à l'axe de l'hélice | 19° | 1° | 9° | |

Tableau I.01 : Caractéristiques géométriques des différentes formes de l'ADN.

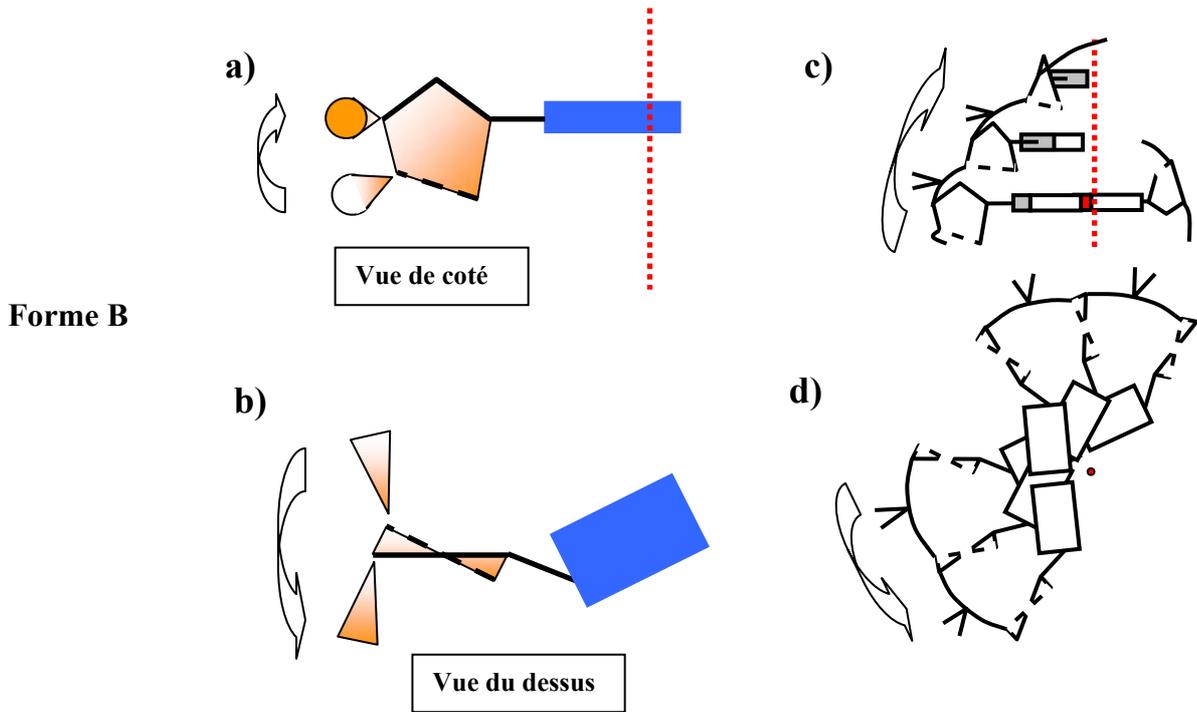


Figure I.04 : Représentation schématique de l'ADN forme B. Le carbone C2' est hors du plan composé par les quatre autres atomes du cycle du sucre. Le sucre est schématisé par un polygone déformé. Les flèches indiquent le sens 3' à 5'. En a) vue de coté du sucre, de la paire de base, ainsi que de la liaison dans la direction 5' et 3'. En b) vue du dessus. En c) et d) vue de coté et du dessus d'un assemblage de plusieurs paires de base. L'axe de la molécule est perpendiculaire aux paires de base. On notera que la chaîne polynucléotidique est bien régulière. Les groupements phosphates (représentés par une sorte de V) sont orientés vers l'extérieur de l'ADN. Cela contribue à la solvataion de la molécule dans un solvant aqueux. [Herbomel 1993]

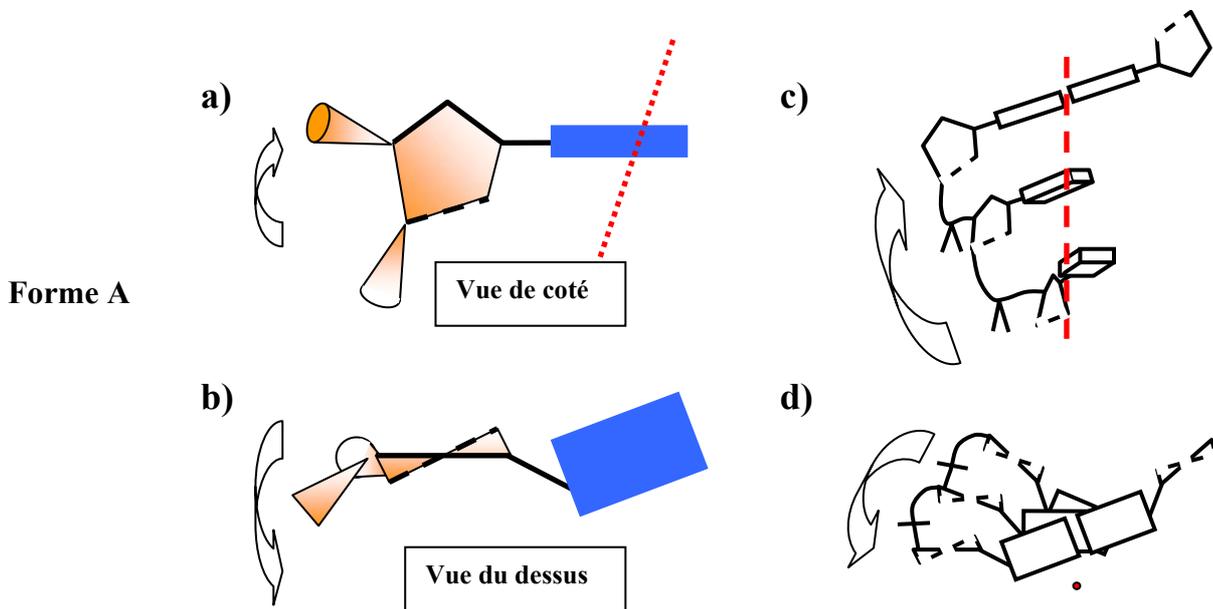


Figure I.05 : Représentation schématique de la forme A de l'ADN. L'hélice est droite. Le carbone C3' du sucre est hors du plan composé par les quatre autres atomes du cycle. Les flèches indiquent le sens 3' à 5'. Le sucre est schématisé par un polygone déformé. En a) vue de coté du sucre, de la paire de base, ainsi que de la liaison dans la direction 5' et 3'. En b) vue du dessus. En c) et d) vue de coté et du dessus d'un assemblage de plusieurs paires de base. L'axe de la molécule fait un angle de 19° avec les paires de base. Le squelette phosphaté n'est pas aussi régulier que dans la phase B. Les groupements phosphates (représentés par un trait sur le schéma) sont repoussés vers le grand sillon, et sont donc moins disponibles pour interagir avec le solvant aqueux. La forme A est favorisée lorsque l'humidité relative du milieu diminue. [Herbomel 1993]

II.2.1. Forme A

Cette forme est schématisée sur la figure I.05. L'hélice est droite. Le sucre adopte une configuration C3' endo (Le carbone C3' est hors du plan du cycle du sucre). Cette propriété géométrique déforme le cycle par rapport à la forme B. La forme A est compactée suivant la longueur de 30%. Les bases sont repoussées vers la périphérie de l'ADN augmentant ainsi son diamètre. Les phosphates sont orientés vers le grand sillon le rendant ainsi plus étroit. En revanche le petit sillon est plus large et moins profond. Les paires de base forme un angle de 19° avec l'axe de la molécule. Les phosphates étant moins disponibles pour les molécules d'eau, la forme A de l'ADN est favorisée quand l'humidité du milieu diminue. Par exemple la longueur d'une fibre d'ADN diminue de 30% lorsqu'on la sèche, correspondant au passage de la forme B à la forme A.

II.2.2. Forme B

Cette forme est schématisée sur la figure I.04. L'hélice est droite. Le sucre adopte une configuration C2' endo (Le carbone C2' est hors du plan du cycle du sucre). Cette propriété géométrique détermine la forme B. Les phosphates sont orientés vers l'extérieur. On notera la régularité de l'enchaînement des phosphates et des sucres. Les paires de base sont perpendiculaires à l'axe de l'ADN. Cette forme est favorisée en milieu aqueux puisque les phosphates sont très disponibles. En effet, ils sont orientés à l'opposé de la molécule d'ADN. Les molécules d'eau et les ions peuvent accéder facilement au groupement phosphate. On distingue très nettement le petit et le grand sillon (cf. figure I.03).

II.2.3. Forme Z

Cette forme est schématisée sur la figure I.06. L'hélice est gauche. Cette forme est favorisée par une alternance de paires de base G et C sur un même brin. La forme en zigzag du squelette phosphaté lui a valu son nom. Les groupements phosphates se répartissent alternativement dans le petit et le grand sillon. La répulsion électrostatique résultant déstabilise cette forme.

Il faut de grandes teneurs en sel pour écranter la charge des phosphates voisins. En forme Z, les paires de base ont tendance à être repoussées vers l'extérieur de l'ADN. Cet effet provoque la disparition du grand sillon (cf. figure). Cette structure n'a donc qu'un sillon (à la place du petit sillon). On voit clairement l'alternance des sucres en conformation C3'endo et C2'endo (cf. figure I.06). L'ADN Z est plus long que l'ADN-B. Son diamètre est plus petit. La contrainte sur les sucres entraîne un angle de 9° des bases par rapport à l'axe de la molécule.

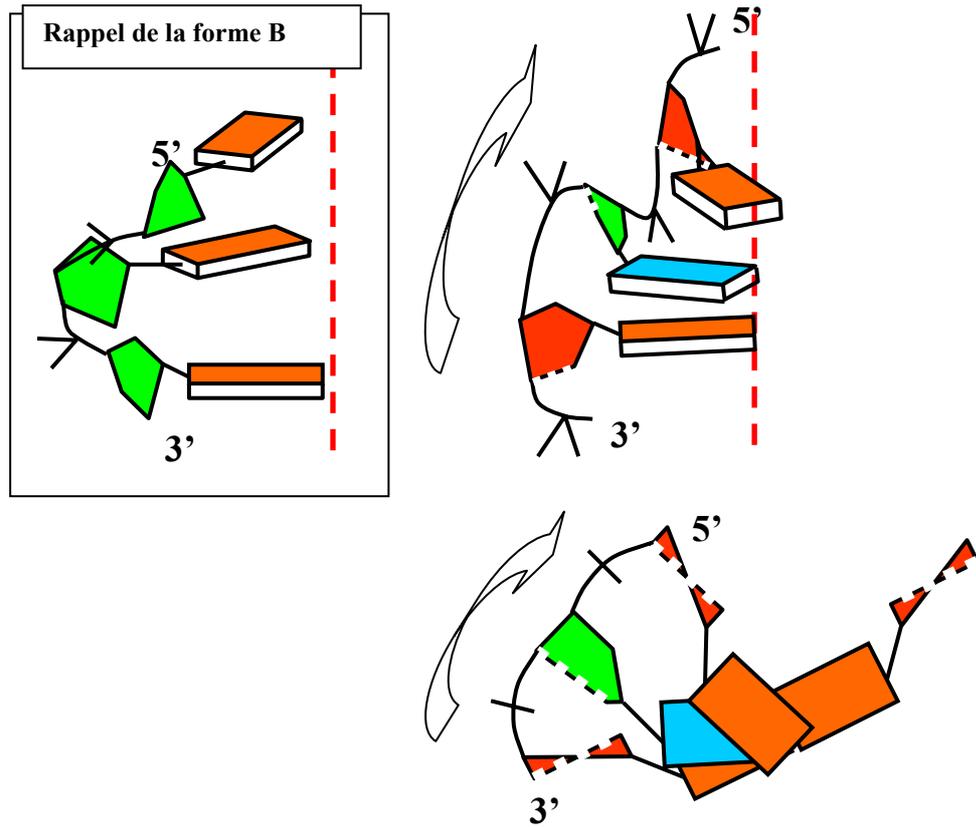


Figure I.06 : Représentation schématique de la forme Z de l'ADN. L'hélice dans ce cas est gauche (sens inverse du tire-bouchon). Cette forme est favorisée par l'alternance de paire de base G et C sur un même brin (couleur orange et bleu alternée sur les paires de base). La périodicité est doublée par rapport à l'ADN A ou B. Le sucre a successivement le carbone C3' (comme la forme A en rouge) puis C2' (comme la forme B en vert) hors du plan du cycle. On peut constater la forme en zigzag du squelette phosphaté qui a donné son nom à cette forme. Le groupement phosphate est orienté alternativement vers le petit sillon puis le grand sillon. Les paires de base forme un angle de 9° par rapport à l'axe de la molécule. [Herbomel 1993]

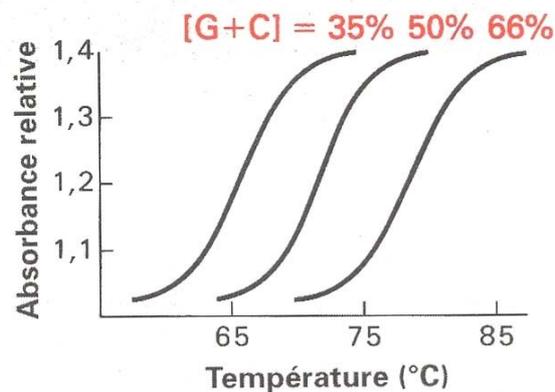


Figure I.07 : Courbe de dénaturation de l'ADN sous l'effet de la température. L'absorbance élevée correspond aux deux brins de l'ADN complètement séparés. La température de fusion correspond au point d'inflexion de la courbe. On constate que la transition est assez nette. Enfin, plus la proportion de paire de base G-C augmente, et plus la température de fusion augmente. [Herbomel 1993]

II.2.4. Triplex et quadruplex

L'ADN peut former un autre type d'appariement que celui de Watson et Crick entre les bases A-T et G-C. Une troisième base peut se rajouter. On parle alors d'appariement de Hoogsteen [Vasquez 1998]. Ainsi la double hélice peut accueillir une troisième chaîne poly nucléotidique. La structure formée est un triplex d'ADN. Sa stabilité dépend fortement des paires de base. Elle est favorisée par les molécules qui présentent une forte asymétrie entre les bases purines et pyrimidines entre les deux brins [Herbomel 1993].

La formation de structure à trois brins est importante dans les processus biologique, puisque l'interaction de l'ARN avec l'ADN est de ce type.

L'ADN peut également former des quadruplex. La formation de cette structure est très dépendante des paires de base. Par exemple deux simples brins dont la séquence est GGGCT₄GGGC peuvent former un quadruplex [Gilbert 1999]. Les quadruplex sont localisés sur un petit nombre de paires de base. Ce sont des petites structures.

Tera Muir [Muir 1998] utilisent ces structures comme références pour montrer à l'AFM et au STM que l'ADN est en général écrasé sur la surface et n'a pas la hauteur attendue de 2nm. On reparlera de ce problème de la hauteur de l'ADN plus loin.

II.3. Dénaturation de l'ADN

La séparation des deux brins de l'ADN se nomme fusion de l'ADN. On peut séparer les bases de l'ADN de différentes manières. La méthode la moins agressive est de chauffer la solution. On peut suivre cette réaction de fusion de l'ADN en mesurant l'absorbance pour une longueur d'onde donnée. La longueur d'onde utilisée est en général de 260nm. En effet l'ADN simple brin et la double hélice n'ont pas la même absorption à cette fréquence. L'agitation thermique est responsable du désappariement. Comme la liaison G-C est plus « forte » que la liaison A-T, il faut chauffer d'autant plus qu'il y a une forte teneur en paire de base G-C dans la molécule. Cela correspond sur la figure I.07 au décalage de la courbe de fusion vers les hautes températures.

La teneur en sel stabilise la double hélice en écrantant la répulsion électrostatique des groupements phosphates.

La dénaturation peut être provoquée en milieu très acide (pH<1) ou très basique (pH>11). Mais cette dénaturation n'est pas équivalente à la dénaturation thermique. Gani [Gani 1999] ont observé des différences de comportement des simples brins obtenues dans leurs expériences de dépôt. Dans ce cas, le milieu acide ou basique ionise les bases qui se repoussent électrostatiquement.

Les extrémités de l'ADN sont plus sensibles aux conditions dénaturantes. Ainsi les extrémités de la molécule peuvent interagir d'une manière que ne peut pas faire le reste de la molécule. Cela explique pourquoi ce sont d'abord les extrémités de l'ADN qui se fixe en premier sur la surface. Nous reverrons cela plus loin dans la partie sur le dépôt d'ADN.

II.4. Etirement de l'ADN

L'ADN lorsqu'il est déposé sur une surface va subir un certain nombre de contraintes qui dépendent de la technique de dépôt utilisée. La forme que la molécule va finalement adopter dépend de la rigidité de la molécule, de l'intensité de l'interaction avec la surface, et de l'interaction de la molécule avec elle-même. Cependant si les forces qui s'exercent sur l'ADN sont importantes, la situation est assez simple puisque l'interaction de la molécule avec elle-même ou sa rigidité deviennent négligeables. C'est le cas par exemple d'une technique comme le peignage (qui sera expliqué en détail plus loin) qui sur étire généralement l'ADN.

L'étude de l'étirement de l'ADN montre que pour une force d'environ 70pN dans le cas du λ -ADN on a une transition de phase sur la molécule d'ADN [Clausen-Schaumann 2000][Strick 1996]. La transition de phase dont on parle correspond au passage à force constante de l'ADN de la forme B à la forme S. La transition est très nette sur la figure I.08. Dans ce cas l'ADN peut être étiré de presque deux fois sa longueur. La force de 70pN peut être atteinte avec la technique de peignage. Ce point sera discuté plus loin. On peut constater sur la courbe de la figure I.08 qu'il y a une deuxième transition qui correspond à la fusion de l'ADN. En effet la courbe de retrait est similaire à celle d'une molécule simple brin. Les techniques de dépôt ne permettent pas généralement d'arriver à la force nécessaire (200 à 300pN) pour une telle transformation.

Toutes ces contraintes sur l'ADN ont pour conséquence de le dégrader. Nous verrons au chapitre IV que cela peut être une explication de l'absence de conductivité de l'ADN.

Toutes les techniques de dépôt ne sont pas aussi brutales. Si la force d'interaction avec le substrat n'est pas trop importante l'ADN peut adopter une configuration d'équilibre [Rivetti 1996]. Dans ce cas des structures propres à l'ADN peuvent apparaître. La description de structures particulières de l'ADN est l'objet de la partie suivante.

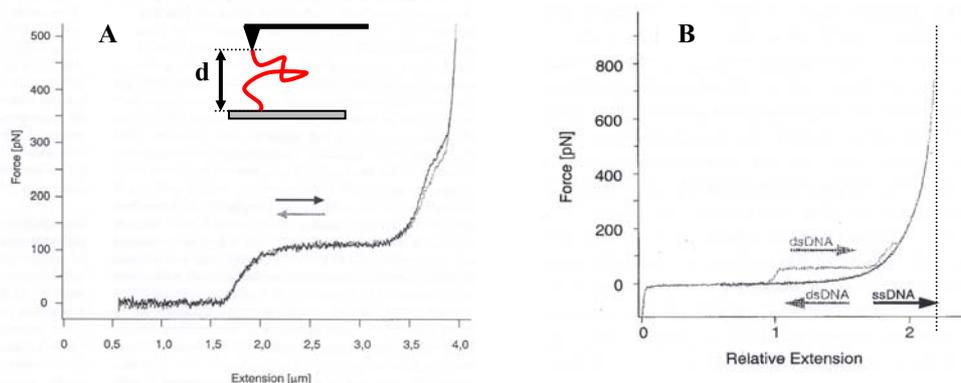


Figure I.08 : Courbe de force de l'ADN. Ces mesures d'étirement sont faites en milieu aqueux dans un buffer. Le dispositif expérimental est en insert de la figure A). L'ADN est positionné entre la surface et la pointe d'un AFM qui permet de modifier l'extension d et de mesurer la force. Il existe d'autres systèmes comme les pinces optique pour tirer sur l'ADN. A) On observe deux transitions. La première transition de la forme B à la forme S correspond au plateau vers 100pN. Cette transition démarre pour une extension correspondant à la longueur de l'ADN B. La seconde transition correspond à la fusion de l'ADN. Les deux brins se désappariaient. B) On observe dans certains cas une hystérésis lorsqu'on revient à une extension nulle. Dans ce cas, un seul des deux brins après s'être séparé reste accroché. En effet, dans ce cas la courbe de retour se superpose parfaitement à celle d'un simple brin. On notera que l'extension relative maximale de l'ADN vaut environ 2.2, en accord avec le squelette phosphate complètement étendu.

III. ADN en solution

III.1. Condensation des contre-ions

L'ADN en solution est neutralisé en partie par des contre-ions. Ce phénomène de condensation des cations à proximité de la surface se comprend aisément, vu les charges en présence. L'interaction électrostatique des cations du solvant avec les groupements phosphates est suffisamment forte pour que l'agitation thermique soit négligeable. L'objectif de cette partie est de présenter quelques résultats importants sur la neutralisation de la charge de l'ADN en solution. En particulier la compétition entre cations de valence, et de taille différentes. Les modèles présentés considèrent l'ADN principalement comme un tube semi rigide chargé uniformément. Dans cette hypothèse les cations peuvent se déplacer le long de l'ADN. On peut raffiner la théorie en tenant compte de la discrétisation de la charge. Dans ce cas les cations auront tendance à rester localisés à proximité des groupements phosphates. En général cet effet est mineur. L'effet majeur étant le phénomène de condensation des contre-ions. On tiendra compte du positionnement des phosphates dans les structures cristallines de l'ADN où tous les composantes du cristal sont plus localisés (molécules d'eau, contre ions,...). Nous présentons dans la dernière section l'interaction spécifique de certains cations avec l'ADN.

III.2. Neutralisation de la charge

III.2.1. Paramètres pertinents du système

Avant de rentrer dans le vif du sujet, nous définissons dans cette partie un certain nombre de paramètres. La plupart des théories les utilisent. De plus, leur signification physique clair permet d'alléger l'écriture des équations, et de mettre clairement en avant l'interprétation physique des phénomènes. La liste des paramètres ainsi que leur interprétation physique sont donnés ci-dessous.

On appelle longueur de Bjerrum [Barrat 1996] la distance pour laquelle l'interaction électrostatique entre deux charges unités vaut exactement l'agitation thermique. On a directement l'expression ci-dessous (e , k , T , ϵ sont respectivement la charge unité, la constante de Boltzmann, la température et la constante diélectrique du solvant). La signification physique de cette longueur représente la compétition entre l'énergie électrostatique et l'énergie thermique. Par exemple, deux charges de signe opposées en solution vont logiquement s'attirer (l_b grand), à moins que l'agitation thermique soit suffisante pour arriver à les éloigner (l_b petit).

$$l_b = \frac{e^2}{4\pi\epsilon kT} \quad (I.01)$$

La définition de la longueur de Bjerrum nous mène directement à définir la longueur de Debye. Lorsqu'on considère une charge test positive (pour fixer les idées) dans un solvant, les charges de signes opposées vont avoir tendance à se placer autour jusqu'à neutraliser. L'agitation thermique s'oppose à l'effondrement des charges négatives sur la charge positive. Le potentiel électrostatique dû au nuage formé par les charges négatives

décroit alors exponentiellement. La longueur typique de décroissance est appelée longueur de Debye. Elle varie inversement avec la longueur de Bjerrum. C'est cohérent si on pense qu'à température élevée (l_b petit) les ions vont avoir tendance à empêcher les charges négatives de s'approcher de la charge test, diminuant l'effet d'écran (l_D grand). Dans l'expression de la force ionique, c_i et z_i sont respectivement la concentration (ions/L dans la formule ci-dessous – on peut aussi l'exprimer en mole/L) et la charge des ions en solution. Plus il y a d'ions en solution, plus l'écrantage est efficace (l_D petit).

$$l_D^2 = \frac{1}{8\pi l_b} \quad \text{avec } I \text{ la force ionique } I = \frac{1}{2} \left(\sum_i c_i z_i^2 \right) \quad (I.02)$$

L'ADN est une molécule linéaire chargée. Sa charge effective dépend de l'écrantage par les ions de la solution. On sait que deux charges interagissent à condition d'être à une distance de l'ordre de l_b . Ainsi la charge accessible est de l'ordre de $l_b \cdot z_m / b$ (où z_m est la charge d'un monomère de l'ADN, et b la distance entre deux de ces charges sur l'ADN). On définit alors le paramètre ξ ci-dessous. Il représente une sorte de densité de charge. Ce paramètre ne fait pas intervenir la concentration en ions de la solution, il ne dépend que de l'ADN et du solvant. Il a été introduit par Manning [Manning 1978], pour décrire les polyélectrolytes.

$$\xi = \frac{l_b}{b} \quad \begin{cases} \xi = 4.2 \text{ pour l'ADN dans l'eau} \\ \xi = 3.2 \text{ dans un mélange eau / méthanol (50 / 50)} \end{cases} \quad (I.03)$$

Ces quelques paramètres sont les plus fréquemment rencontrés. D'autres paramètres correspondant à des modèles particuliers seront présentés par la suite.

III.2.2. Solution à une composante

L'ADN en solution est entouré de contre-ions qui neutralisent partiellement sa charge négative. Le fait marquant est que la concentration de cations condensés est très importante, de l'ordre de quelques mole/L indépendamment de la concentration de l'espèce en solution. Ce comportement n'est pas prédit si on considère une simple compétition entre l'attraction électrostatique et l'agitation thermique (Debye-Huckel). L'objectif de cette partie est de présenter ce comportement non trivial.

Nous allons voir également qu'à basse concentration en sel, la neutralisation de la charge n'est pas complète et sature à une valeur qui augmente avec la valence du cation. Elle est d'autant plus efficace que le cation a une valence élevée. La charge neutralisée est donnée par l'expression (I.04). Cette neutralisation incomplète est une conséquence directe de la géométrie cylindrique. Lorsque la teneur en sel et/ou la valence des cations augmente, nous allons voir que les longueurs caractéristiques du problème (l_D et λ_z définie aux équations (I.02) et (I.05)) diminuent de telle sorte que la courbure de l'ADN devient négligeable. On se retrouve alors dans une géométrie planaire. Dans cette géométrie, la charge est complètement neutralisée. La concentration correspondant à cette neutralisation totale est de l'ordre de 0.1 à 1M.

Une façon simple d'aborder ce problème est de considérer une couche d'une certaine épaisseur dans laquelle les ions sont fortement attirés vers la surface de l'ADN [Rouzina 1996-a]. Cela revient à négliger l'agitation thermique. Le problème ainsi posé est en général plus facile à résoudre. On n'a pas à montrer qu'il y a effectivement une zone où les cations sont condensés sur la surface, car c'est une hypothèse de travail. L'important étant de vérifier à posteriori la validité de l'hypothèse.

$$r = 1 - \frac{1}{\xi z} \quad \left\{ \begin{array}{l} r : \text{proportion de charge neutralisée} \\ \xi = 4.2 \text{ dans l'eau pour l'ADN} \\ z \text{ est la valence des cations en solution} \end{array} \right. \quad (\text{I.04})$$

Nous verrons plus loin, lors de l'étude de l'interaction de l'ADN avec son environnement, que l'on peut avec une méthode de ce type rendre compte d'une interaction attractive entre brins d'ADN alors qu'ils sont tous les deux chargés négativement !

Il y a trois paramètres pertinents pour décrire la condensation des contre ions : **1** le rayon de l'ADN r ; **2** la longueur d'écran de Debye, l_D ; **3** La longueur caractéristique sur laquelle le potentiel électrostatique varie de kT (Boltzmann) dans le champ uniforme créé par la surface de l'ADN. De cette définition on déduit directement son expression.

$$\lambda_z = \frac{\epsilon kT}{4\pi\sigma e z} \quad \left\{ \begin{array}{l} \epsilon : \text{permittivité du solvant} \\ \sigma : \text{charge surfacique de l'ADN} \\ e : \text{charge de l'électron} \\ z : \text{valence du cation en solution} \end{array} \right. \quad (\text{I.05})$$

Ce dernier paramètre mesure la compétition entre l'énergie électrostatique et thermique entre la surface et le cation, un peu comme le fait la longueur de Bjerrum pour deux charges.

La figure I.09 illustre le phénomène de condensation pour différentes concentrations du cation dans la solution. Pour l'ADN, λ_s vaut environ 0.1nm, 0.075 et 0.04nm pour des cations respectivement monovalent, divalent et trivalent. La longueur d'écran de Debye diminue lorsqu'on augmente la concentration en sels. On distingue deux transitions correspondant au passage $l_D=a$ (pour $C=0.1$ à $1M$ – a est le rayon de l'ADN) et $l_D=\lambda_z$ (pour des concentrations très importantes). Cela définit les trois zones de concentration présentées sur la figure I.09.

Régime linéaire et non linéaire : Tant que $l_D > \lambda_s$ (pour $I < 10M$), on est dans le régime non linéaire de condensation. La concentration en cations près de l'ADN est indépendante de la concentration du cation en volume. Au-delà ($I > 10M$), la teneur en sel est tellement importante que toutes les interactions électrostatiques sont écrantées. On retrouve le régime linéaire de condensation (Debye-Huckel). Dans ce cas on perd l'ordre dans la couche de cation au voisinage de la surface. Les cations deviennent plus mobiles.

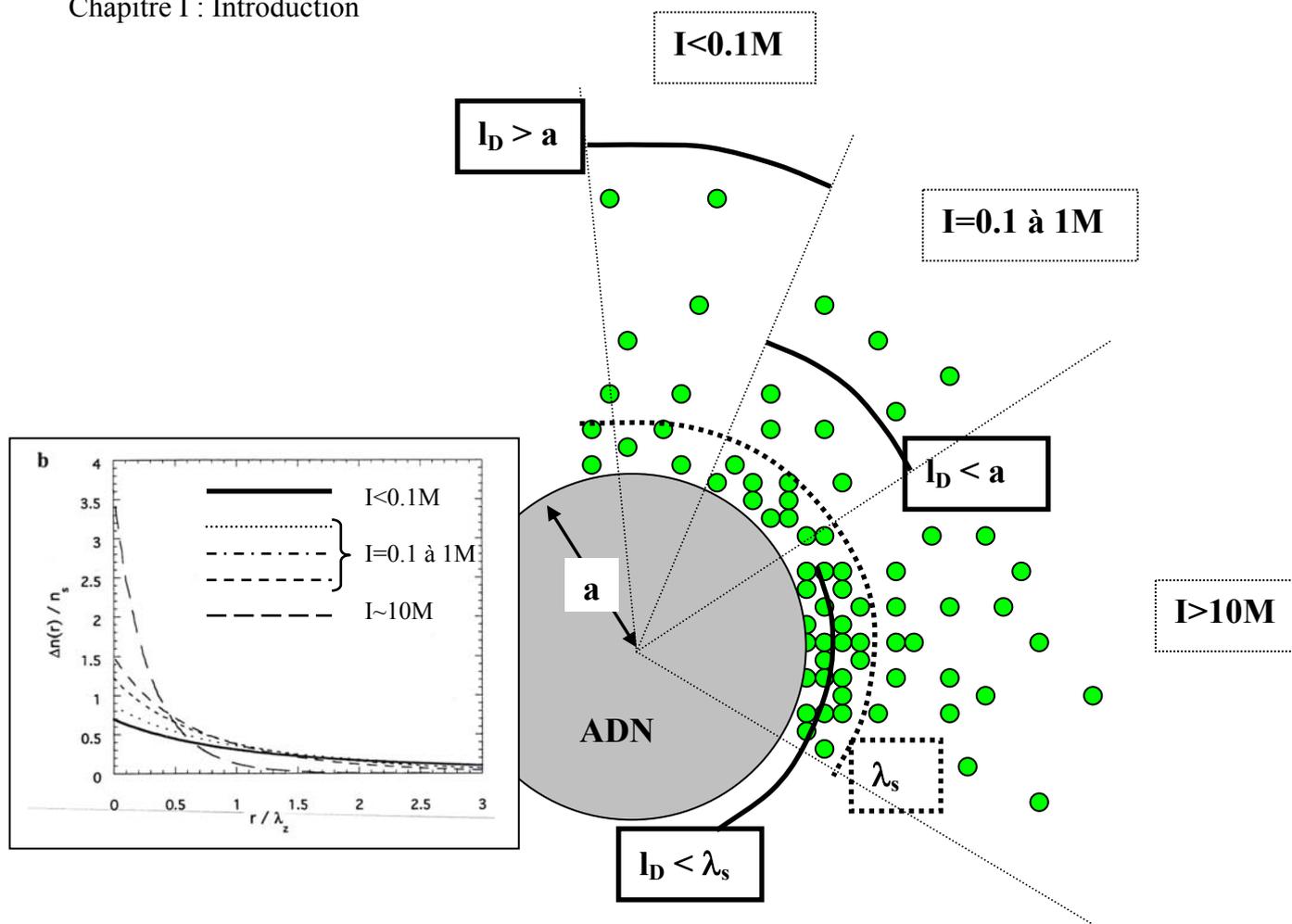


Figure I.09 : Profil de densité des cations autour de l'ADN d'après Bloomfield. Trois cas sont représentés correspondant à une force ionique faible ($l_D > a$ ou $I < 0.1M$), moyenne ($l_D < a$ et $I = 0.1$ à $1M$), et enfin le cas très concentré pour lequel l_D devient de l'ordre de grandeur de λ_s ($\sim 0.1nm$ pour un cation monovalent et $0.4nm$ pour un trivalent). On a schématisé le profil de densité. Les profils de densité correspondant à ces différents cas sont représentés en coordonnées normalisée par λ_s et n_s (~ 1 à $10M$). On peut constater que même pour de très faible concentration en volume, on a une concentration importante de cations condensés. D'après [Rouzina^a 1996].

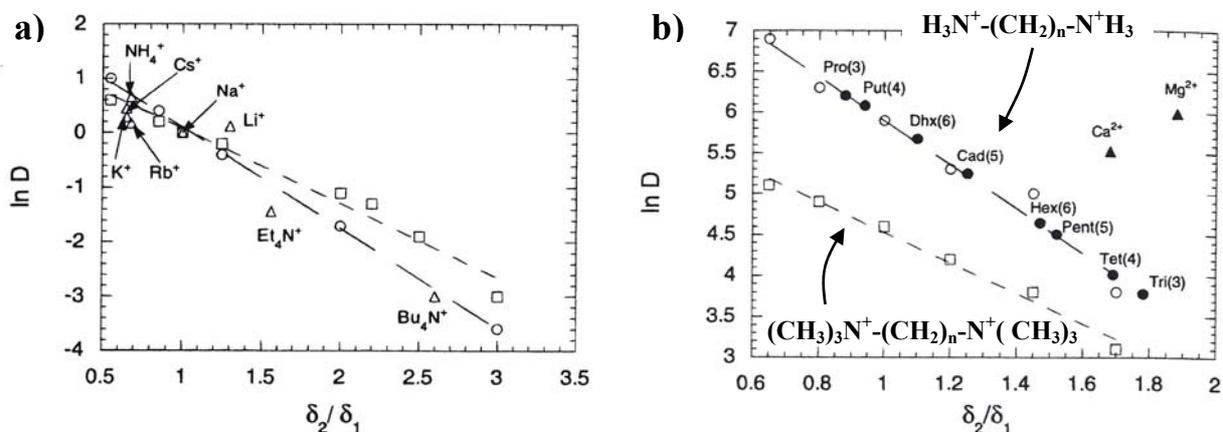


Figure I.10 : Dépendance du logarithme de l'affinité relative de condensation (cf. texte) en fonction de la taille relative des cations. En b), mesure expérimentale pour des polyamines de taille variable. La formule des polyamines est indiquée sur le graphe. La courbe du bas correspond à l'amine méthylée. On notera que les cations Ca^{2+} et Mg^{2+} ne rentre pas dans le modèle suggérant une interaction spécifique avec l'ADN.

Géométrie cylindrique/plane : Tant que $l_D > a$ (pour $I < 1M$), la géométrie du système est cylindrique. En dessous, on passe progressivement à une géométrie plane. La charge de l'ADN est complètement écrantée.

Nous verrons par la suite les implications de ces résultats pour la condensation de l'ADN. En effet, les molécules ne peuvent se rapprocher qu'à condition que les charges soient neutralisées. Cela implique le passage d'une géométrie cylindrique à plane (i.e. forte concentration en sel) ou bien une forte concentration d'ADN qui peut forcer la condensation.

III.2.3. Solution à deux composantes

III.2.3.1. Effet de la valence des ions

Dans le cas où il y a plusieurs espèces d'ions en solution, les cations dont la valence est la plus élevée ont tendance à chasser ceux de valence plus faible. Il y a en réalité un équilibre en faveur du cation de plus haute valence. Rouzina [Rouzina 1996-a] proposent un modèle qui rend compte de ce phénomène. Le résultat principal est que la proportion de chaque cation autour de l'ADN dépend exclusivement du rapport des concentrations des deux espèces dans la solution avec un certain exposant : $n_2/n_1^{z_2/z_1}$ (où n_i et z_i sont la concentration et la valence de l'ion i).

On présente dans la section suivante la dépendance de l'écrantage en fonction de la taille des cations.

III.2.3.2. Effets géométriques

Dans un mélange de cations l'effet de la taille est très important. La compétition est en faveur du plus petit cation. Comme ce dernier peut s'approcher plus près de la surface, le plus gros cation, « voit » un champ électrostatique déjà partiellement écranté par le plus petit. Il en résulte une attraction plus faible. λ_z dépend principalement du plus petit cation.

Rouzina [Rouzina 1996-b] utilise un modèle où l'interaction entre l'ADN et les cations est purement électrostatique sans tenir compte d'éventuelles interactions spécifiques. Leur modèle permet de calculer l'affinité des ions avec la molécule d'ADN que l'on note $D = p_2/p_1^{z_2/z_1}$ (p_i et z_i sont respectivement la quantité de cation i adsorbé sur l'ADN, et la valence du cation i). La figure I.10 donne la dépendance de D (en échelle logarithmique) pour des cations de différentes tailles par rapport au cation Na^+ (δ_2/δ_1 est le rapport des tailles des cations dans leur état hydraté. δ_1 correspond à la taille de Na^+).

On peut constater que le modèle (correspondant aux droites sur la figure I.10) est assez bien vérifié. L'accord est excellent pour les polyamines. De plus, le fait de méthyler l'amine (Et_4N^+) diminue d'un facteur deux l'affinité, et d'un facteur quatre si la chaîne carbone augmente (Bu_4N^+).

On notera que les cations Mg^{2+} et Ca^{2+} s'écarte du modèle suggérant une interaction spécifique de ces cations avec l'ADN.

III.2.4. Interaction spécifique des cations

Les cations Ca^{2+} et Mg^{2+} se fixent plus efficacement que d'autres cations de même charge et taille. L'interaction est encore plus spécifique avec Mn^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} . Rakitin [Rakitin 2001] a modifié des brins d'ADN pour des mesures électriques avec des ions Zn^{2+} qui interagissent directement avec les paires de base. Il est connu que les cations métalliques divalents stabilisent des structures non B de l'ADN particulières dans un ordre d'efficacité caractéristique. Ainsi dans l'ordre Cu^{2+} , $\text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ les métaux facilitent souvent la transition de la forme B à la forme Z [Guéron 2000][Herbomel 1993], et favorisent la courbure de l'ADN [Bloomfield 1996] (certainement en neutralisant la charge d'un côté de l'ADN). Cet ordre correspond à l'ordre d'affinité croissante pour les paires de base [Herbomel 1993]. L'ordre d'efficacité est inversé pour la promotion de la forme H. Il s'agit cette fois de l'ordre d'affinité croissante pour les groupements phosphates de l'ADN.

L'interaction des ions peut dépendre indirectement des paires de base par l'intermédiaire de la couche d'hydratation. Les paires de base A-T sont plus hydratées que G-C. Si le cation parvient à rentrer dans cette couche cela provoque un relargage des molécules d'eau dans la solution, déshydratant la molécule d'ADN. Ce phénomène peut être favorisé entropiquement, d'autant plus qu'il y a de molécules d'eau libérées dans la solution. La figure I.11 illustre le comportement du cation Mg^{2+} [Vitaly 1994]. Le cation arrive à se placer dans la couche d'hydratation au niveau des paires de base G-C mais reste en dehors dans le cas des paires de base A-T. On notera que l'eau s'organise également autour des cations. L'interaction du cation et de l'ADN peut se faire par couche d'hydratation interposée.

En accord avec les résultats de la partie précédente, les polyamines semblent rester en dehors de la couche d'hydratation de la molécule d'ADN. Cela expliquerait en partie pourquoi les détails de la structure de l'ADN interviennent peu et que l'interaction est principalement de nature électrostatique.

Cette couche d'hydratation est présente même dans les phases condensées puisque l'espace entre les molécules d'ADN est de l'ordre du nanomètre.

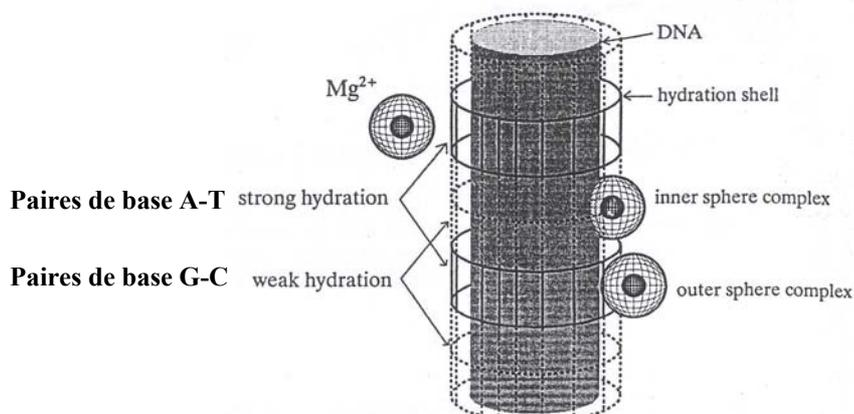


Figure I.11 : Interaction des cations Mg^{2+} avec l'ADN [Vitaly 1994] Ils montrent que la déshydratation provoquée par l'insertion du cation dans la couche d'hydratation de l'ADN dépend des paires de base. Les zones A-T sont fortement hydratées. Le cation forme un complexe en restant hors de la couche d'hydratation. En revanche les zones riches en paires de base G-C moins hydratées peuvent interagir plus intimement avec les ions. Ce phénomène provoque une déshydratation supplémentaire.

Lindsay [Lindsay 1989] reporte des images STM de petits ADN circulaires subissant un changement de conformation. En présence de Mg^{2+} , les brins donnent des cercles, alors qu'en présence de cations Zn^{2+} , on peut observer l'apparition des zones où les brins sont peu courbés séparés par des coudes. Les cations Zn^{2+} semble promouvoir la formation de telles courbures pour des séquences spécifiques. Ce comportement pourrait servir de mécanisme de reconnaissance pour d'autres molécules avec l'ADN dans les cellules [Herbomel 1993].

III.3. Condensation de l'ADN

III.3.1. Présentation

L'ADN dans certaines conditions peut occuper un volume très petit en comparaison de sa forme étendue. La condensation peut être intramoléculaire (la molécule se recroqueville sur elle-même), ou bien intermoléculaire (entre les molécules). Pour des concentrations en ADN très faible, la condensation intramoléculaire est favorisée.

Les conditions de condensation requièrent la présence de cations et/ou la dégradation du solvant. La valence du cation intervient de manière cruciale. En solution aqueuse, des cations de valence au moins trois (spermidine³⁺, cobalt hexamine $Co(NH_3)_6^{3+}$, spermine⁴⁺, ... des polypeptides cationiques tel la polylysine, ou des protéines comme les histones H1 et H5,...) sont requis pour provoquer la condensation. Les cations de valence deux (métaux, Mg^{2+} , Li^{2+} , ..., putrescine²⁺,...) sont à la limite de provoquer la condensation. Il suffit de dégrader légèrement la qualité du solvant (mélange eau/alcool) pour la provoquer. On sait que l'éthanol est couramment utilisé en laboratoire pour précipiter l'ADN. Les cations monovalents peuvent provoquer la condensation de solution concentrée d'ADN. Dans ce cas, c'est plus la dégradation de l'environnement de l'ADN que la présence du sel qui joue un rôle majeur. A ce titre, l'ajout d'un autre polymère tel le polyéthylène glycol : PEG en présence de sels provoque sa condensation [Laemmli 1975]. On parle alors de psi-DNA (acronyme de polymer and salt induced DNA). Ce mécanisme marche aussi avec des polymères anioniques tel le poly-aspartate ou le poly-glutamate. Là encore c'est la dégradation de l'environnement de l'ADN qui entraîne la formation d'une phase condensée [Bloomfield 1996].

La propriété de condensation est remarquable quand on pense que dans le noyau de la cellule du génome la condensation est un processus qui consomme énormément d'énergie (environ $\frac{1}{2}$ ATP hydrolysé par paire de base). Le fait de réaliser le même genre de processus en laboratoire en ajoutant uniquement une petite quantité d'ions dans la solution est assez surprenant.

La condensation joue certainement un rôle in vivo. De manière générale, le matériel génétique est fortement condensé dans le noyau des cellules. Le niveau de compaction de l'ADN dans certaines cellules peut être très important. C'est le cas par exemple des têtes de spermatozoïde, ou de certains virus. La distance entre les molécules d'ADN est de l'ordre du nanomètre, soit juste la place pour quelques couches d'hydratation [Schellmann 1984].

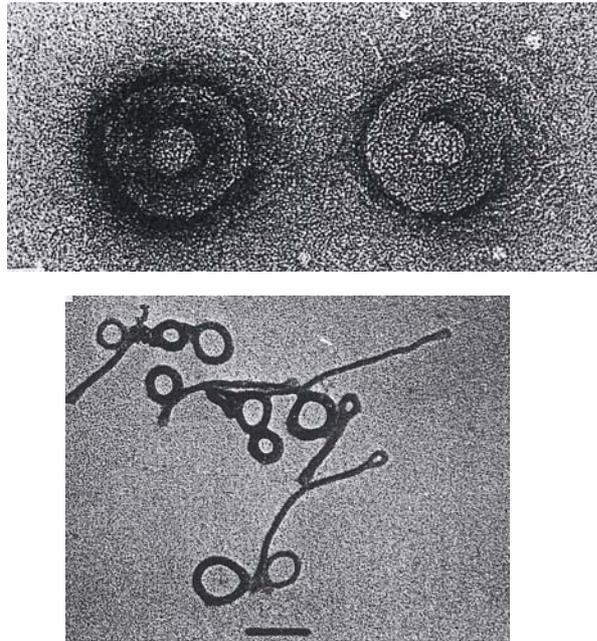


Figure I.12 : Condensation de molécules d'ADN en forme de tores observés au microscope électronique [Chattoraj 1978]. La dimension des tores est de l'ordre de 50 à 100nm. les molécules s'agrègent entre elles pour former toute sorte de structures.

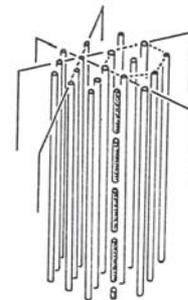
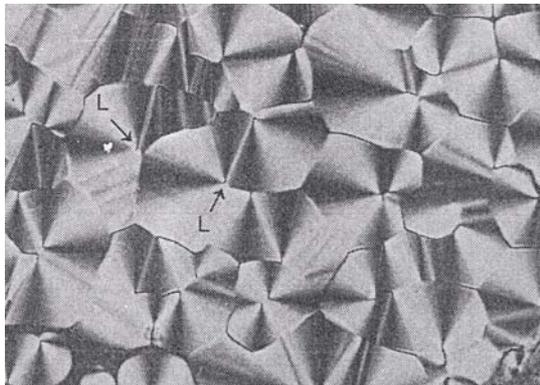


Figure I.13 : Phase cristal liquide observée au microscope optique sous lumière polarisée. L'ADN est dans une phase cristal liquide hexagonal colonnaire qui est très dense. Une phase cholestérique moins dense peut également être observée. La solution d'ADN concentrée contient 0.1M de NaCl et 0.25M d'acétate d'ammonium. La formation des germes de cristal liquide puis d'une phase homogène est suivie au microscope. Les domaines observés s'articulent autour de dislocation indiquée par un L. On indique une représentation schématique de cette phase cristalline. Les molécules s'empilent en colonne dans une direction. Ces colonnes forment un réseau hexagonal.

La condensation ne nécessite pas forcément l'ajout de sels dans la solution. L'ADN peut condenser à forte concentration. La présence de trop de sels peut au contraire la perturber par la formation de cristaux. Ainsi à partir de 35g/L l'ADN commence par former un gel [Fried 1984], puis une phase cristal liquide cholestérique pour 150g/L [Strzelecka 1987]. Une phase cristal liquide hexagonale colonnaire plus dense peut également se former [Livolant 1989] (cf. figure I.13). La formation d'une phase cristal liquide par des polymères semi – rigides à partir d'une certaine concentration a été d'abord décrit par Onsager [Onsager 1949] et développé par Flory [Flory 1956] et d'autres. Cette phase a été observée *in vivo* dans des bactéries [Reich 1994]. La formation de structure cristalline est obtenue pour des molécules d'ADN de toute taille.

La condensation intermoléculaire donne plutôt des phases cristallines. En revanche, la condensation intramoléculaire de l'ADN donne des formes d'une morphologie très particulière. La molécule ou un petit nombre condense (généralement) en forme de tore [Chattoraj 1978] (cf. figure I.12). D'autres formes ont été obtenues suivant les conditions expérimentales : fleur, bâtonnet, sphère, ... En dessous d'une certaine taille (estimé à 400 paires de base [Bloomfield 1996]) il n'y a pas d'agrégat ordonné. Savoir si ces différentes formes correspondent à des états intermédiaires d'un même processus ou de chemin de condensation bien distincts n'est pas clair. Il semblerait que ces formes soient bien distinctes. L'ADN est en général en forme B dans la phase condensée. Le niveau de condensation dans les tores est important (comme dans les phases cristallines : moins de 1 nm entre les molécules), en revanche l'organisation exacte de l'ADN dans le condensât n'est pas très bien connu.

III.3.2. Origine des structures ordonnées

Le moteur de l'organisation de l'ADN dans les phases condensées a principalement pour origine la forte anisotropie entre le diamètre de la molécule et sa longueur, ainsi que la longueur de persistance de l'ADN (20 à 100nm suivant la teneur en sel) [Grosberg 1986]. La longueur de persistance correspond à la longueur sur laquelle l'ADN peut être considéré comme rigide. Cette quantité dépend de la teneur en sel. Plus il y a de sels et plus la molécule est flexible (longueur de persistance faible). L'explication est très simple dans ce cas puisque la répulsion électrostatique entre les groupements phosphates d'une même molécule est écrantée par les ions de la solution [Baumann 2000] [Strick 1996] [Bouchiat 1999]. Elle a alors tendance à adopter une structure plus rigide.

La condensation inter moléculaire qui donne un gel ou bien une phase cristal liquide, est plus simple à appréhender. L'ordre dans la phase condensée peut être comparé à celui que l'on pourrait trouver dans des sels ioniques. Les contre ions se placent entre les molécules d'ADN neutralisant complètement la charge et stabilisant la structure. En d'autres termes, chaque ion a autour de lui majoritairement des ions de charges opposées.

III.3.3. Interaction entre molécules d'ADN

La condensation de l'ADN est un problème difficile. La question sous jacente de toutes les théories est l'origine de la force attractive qui entraîne la condensation.

Post et Zimm [Post 1979] ont proposé un calcul thermodynamique à partir d'un modèle où l'interaction de l'ADN avec son environnement est décrite par un seul paramètre. Ce paramètre mesure la différence d'énergie entre l'ADN en interaction avec le solvant et l'ADN en interaction avec un autre segment de la même molécule d'ADN ou d'une molécule différente. Ils prédisent l'apparition d'une phase condensée en faisant un développement du Viriel de l'énergie libre [Couture 1992]. Afin de rendre compte de cet état condensé ils poussent le développement à l'ordre trois.

Cette approche met uniquement en évidence l'apparition de la phase condensée. Un raffinement de la théorie prédit que la transition est d'autant plus nette que la molécule d'ADN est rigide.

La théorie ci-dessous a certes le mérite d'être simple, mais on ne voit pas clairement l'origine de la force qui permet à une molécule chargée sur toute sa longueur de former une structure compacte. Olvera de la Cruz [Olvera 1995] a proposé un modèle qui rend compte du comportement des poly électrolytes. Raspaud [Raspaud 1998] a appliqué ce raisonnement au cas de la condensation de l'ADN. Le principe est que des cations au moins divalents arrivent à inverser localement la charge de l'ADN. L'attraction électrostatique entre ces zones chargées positivement et le reste de la molécule provoque la condensation.

Ce modèle s'applique à d'autres polyélectrolytes que l'ADN (microtubules, polystyrène sulfonate : PSS,...). Il rend compte des résultats expérimentaux sans paramètres ajustables. Cependant comme pour le premier modèle thermodynamique, il prédit uniquement la formation d'une phase condensée sans expliquer comment est la molécule dans cet état.

Ils retrouvent également le fait que le condensât se redissout en présence d'un excès de sel multi valent (pour une concentration de l'ordre de 0.1M). Dans ce cas, c'est l'écrantage des interactions électrostatiques qui est à l'origine de ce phénomène.

Le modèle de Raspaud ne rend pas compte de l'ajout de sels monovalents. Wilson et Bloomfield ont étudié empiriquement ce cas [Wilson 1979]. Ils ont constaté que la condensation avait lieu lorsque 90% de la charge de l'ADN était neutralisée. Le problème est qu'il reste 10% de charges qui vont s'opposer à un niveau de condensation important. Dans ce cas un autre mécanisme prend le relais pour stabiliser la forme compactée.

Un certain nombre de développements théoriques tentent d'expliquer l'origine de la force attractive par la formation avec les contre-ions et les groupements phosphates d'un cristal de type ionique [Rouzina 1996-c]. Dans ce cas, ce sont les corrélations de position des ions sur les deux molécules qui est à l'origine d'une force attractive entre les brins. Ainsi chaque ion a autour de lui principalement des charges de signe opposées comme dans un cristal ionique.

Gronbech-Jensen [Gronbech 1997] a étudié d'un point de vue analytique et par des simulations la force attractive entre des cylindres rigides chargés. Leur interprétation de la force attractive est similaire à celle présentée ci-dessus (Rouzina et Bloomfield). L'originalité de ce travail est qu'il montre clairement que les corrélations de fluctuations des

contre ions à température ambiante est un « reste » des corrélations à température nulle. A température nulle on a l'équivalent d'un cristal entre les charges négatives de l'ADN et les cations qui se trouvent entre les deux molécules d'ADN (considérée comme un cylindre chargé uniformément dans les simulations). Ainsi les contre ions à température ambiante ont tout de même une certaine mobilité.

Il généralise un certain nombre de résultats précédents [Oosawa 1968]. De plus il met en évidence que la force attractive est d'autant plus forte que le cation est de petite taille et peut s'approcher de l'ADN.

Les forces électrostatiques jouent un rôle majeur dans le phénomène de condensation. Cependant il existe d'autres contributions. Dans les théories exposées ci-dessus les molécules d'eau sont considérées comme un milieu avec une certaine constante diélectrique. Il s'avère que les molécules d'eau s'organisent d'une certaine façon autour de la molécule d'ADN. L'interaction de deux brins d'ADN par molécule d'eau interposée donne une force que l'on désigne par force d'hydratation.

Ce concept de force d'hydratation a été introduit directement de la mesure de pression osmotique (elles ont été observées et mesurées dans de nombreux systèmes). Elles jouent un rôle majeur dans les processus biologiques. Cette force peut être répulsive ou attractive [Bloomfield 1996]. Elle est difficile à prévoir car elle dépend d'un grand nombre de particules interagissant faiblement entre elles.

Nous avons présenté un certain nombre de résultats sur l'ADN seul et en interaction avec d'autres molécules d'ADN. La section suivante présente certaines implications concernant le dépôt d'ADN et les propriétés de conduction.

III.3.4. Conséquences

III.3.4.1. Pour le dépôt d'ADN

On peut dire un certain nombre de choses sur le dépôt d'ADN avant de parler de la mise en œuvre des techniques de dépôt (objet de la partie IV de ce chapitre).

Les ingrédients principaux dont va dépendre le dépôt sont l'interaction de l'ADN avec le substrat, l'interaction de l'ADN avec lui-même et les autres molécules d'ADN si la concentration est importante. On a une compétition entre ces deux interactions. Enfin, les sels présents écrantent suivant la concentration les interactions électrostatiques (variation de la longueur de Debye).

A cela il faut ajouter des effets de confinement qui modifient les propriétés de l'ADN (par rapport à celles en solution) dû à la présence de la surface. Ces effets sont non triviaux. Par exemple, l'ADN dans un complexe lipidique est confiné dans un espace à deux dimensions (entre deux bicouches lipidiques). Dans ce cas, les ions divalents suffisent à provoquer la condensation des molécules alors qu'une valence d'au moins trois est requise en solution [Koltover 2000]. En revanche, l'ADN déposé sur une bicouche lipidique [Mou 1995] n'est pas confiné dans un espace à deux dimensions (il y a confinement dans un demi

espace). Dans ce cas les cations divalents ne condensent pas l'ADN sur la surface, au contraire, il provoque une diminution de la concentration de molécules observées sur la surface. On peut également avoir un effet de corrélation si des molécules sont adsorbées sur la surface mais peuvent encore se déplacer latéralement sur la surface. Fang a observé la condensation de molécules d'ADN en présence de silanes cationiques (monovalent à trivalent) adsorbés sur une surface [Fang 1998] [Fang 1999]. Toujours dans le même ordre d'idée une surface métallique chargée positivement n'attirera pas l'ADN de la même façon qu'une surface chargée positivement et dont les charges sont immobiles (surface silanisée avec un silane amine par exemple).

Enfin, l'étape de retrait de la solution est crucial dans le dépôt. Les sels contenus dans la solution de rinçage modifient la façon dont les molécules se répartissent sur la surface. Par exemple le rinçage du substrat par des sels de métaux lourds (sels d'uranium, de thorium, ...) ont la particularité de fixer l'ADN sur la surface (technique issue de la microscopie électronique). On notera qu'un excès de sel peut entraîner la déshydratation de la molécule d'ADN qui précipite et peut se poser sur la surface.

On présente quelques exemples de dépôts qui illustrent la compétition entre ces différentes interactions.

III.3.4.1.1 Structure avec beaucoup de brins

Dans le cas où la concentration d'ADN de la solution est importante, on peut arriver à déposer des structures comportant un grand nombre de brins d'ADN. On favorise les interactions entre molécules. On peut former par exemple des cordes d'ADN [Cai 2000]. Nous avons également observé de telles structures (cf. chapitre III). On peut également observer un réseau de molécules [Cai 2000] [Kanno 2000] comme indiqué par la figure I.14. L'obtention d'un réseau d'ADN dans les expériences de Cai nécessite une concentration d'au moins 50mg/l. En dessous de cette concentration on obtient des fibres. De plus l'ADN qu'utilise Cai est de type poly (dG).poly (dC) ou poly (dA).poly (dT). Il peut former des triplex. Ces structures doivent favoriser l'obtention d'un réseau. En effet dans ce cas les molécules d'ADN peuvent interagir spécifiquement avec les paires de base.

On montre sur la figure I.15 une image obtenue en STM [Keller 1989] où les molécules sont côte à côte. On a une structure cristalline. La méthode de dépôt utilise une solution concentrée d'ADN de thymus de veau (10mg/ml). Cette solution est fortement agitée et déposée directement sur un substrat conducteur.

Des structures où les brins sont côte à côte ont été également obtenues par Lee [Lee 1989] en présence de spermidine (un cation trivalent) qui favorise les interactions latérales de l'ADN (cf. partie sur la condensation au paragraphe III.3.).

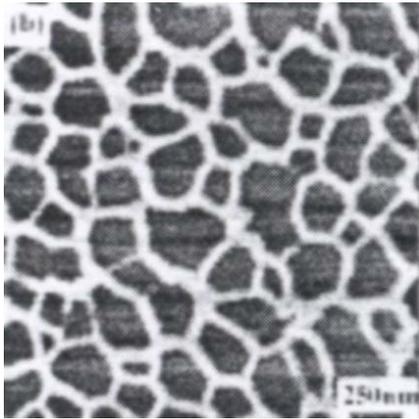


Figure I.14 : ADN poly(dG).poly(dC) déposé sur une surface de mica fraîchement clivée observé à l'AFM en mode tapping [Cai 2000]. La concentration de la solution d'ADN est importante (50ng/μl). On obtient des fibres séparées en-dessous de cette concentration. La barre représente 250nm.

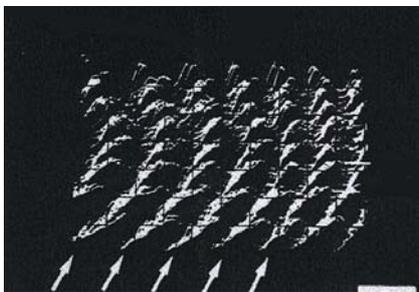


Figure I.15 : ADN déposé sur une surface de graphite observé en STM. Les molécules sont côte à côte [Keller 1989]. D'après Keller, l'ADN adopte une phase cristal liquide sur la surface. La barre représente 5.2 nm.

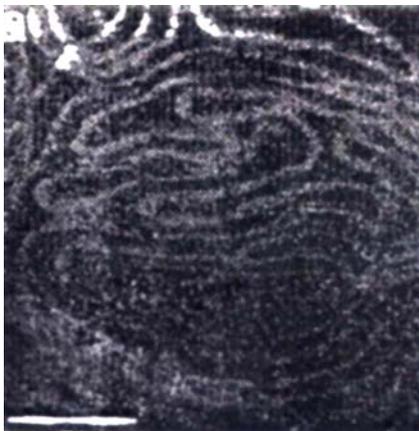


Figure I.16 : ADN déposé sur une bicouche lipidique observé à l'AFM en solution [Mou 1995]. Les molécules sont séparées d'une distance d'environ 5nm. La barre représente 40nm.

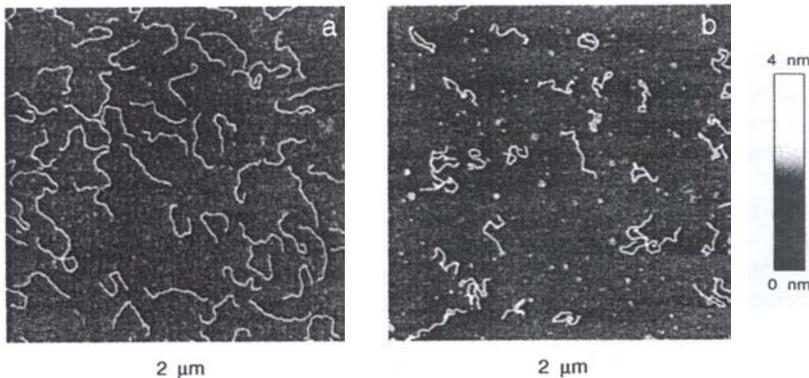


Figure I.17 : Image AFM en mode tapping d'un fragment d'ADN de 1528 paires de base déposé sur du mica pour deux traitements différents d'après Rivetti [Rivetti 1996]. En a), l'ADN est déposé sur une surface fraîchement clivée. Les brins sont peu courbés. En b) l'ADN déposé sur du mica ayant subi un traitement plasma Dans cette situation l'ADN est plus compacté.

III.3.4.1.2. Structure intermédiaire

On peut avoir une compétition équilibrée entre l'interaction entre molécules d'ADN et la surface.

Par exemple l'ADN déposé sur une bicouche lipidique forme une structure où les brins restent à une certaine distance d'environ 5nm les uns des autres comme le montre la figure I.16 [Mou 1995]. Il est connu que l'ADN forme des structures organisées avec des lipides cationiques [Tanaka 1996] [Radler 1997]. La distance entre les molécules d'ADN dans ces structures va de 2.4 à 5.7nm. Ces structures sont prometteuses en médecine pour le transport de molécules biologique dans les cellules des patients [Koltover 1998], ainsi que pour les expériences de transport électronique [Okahata 1998] (cf. partie V.2.).

Gani [Gani 1999] a mesuré la quantité d'ADN déposé sur différentes surfaces en fonction de la concentration de la solution. Ils observent trois régimes de dépôt. A basse concentration (inférieure à 1 à 2 mg/L) la quantité d'ADN déposée est proportionnelle à la concentration en volume. Les molécules sont indépendantes les unes des autres. L'interaction se fait entre la surface et l'ADN. Lorsqu'on augmente la concentration la quantité d'ADN sur la surface atteint un plateau. On ne dépose plus d'ADN même si on augmente la concentration de la solution. L'interaction entre les molécules d'ADN devient non négligeable. Lorsqu'on augmente encore la quantité d'ADN (supérieure à 50mg/L) dans la solution on finit par redéposer de l'ADN.

III.3.4.1.3. Structure avec peu de brins

A faible concentration l'interaction avec la surface est dominante. Dans ce cas si la surface est collante l'ADN va se fixer irréversiblement sur la surface et adopter une configuration qui correspond à une sorte de projection sur la surface de la molécule telle qu'elle était dans la solution. La molécule apparaît assez compactée. Si au contraire la molécule interagit moins fortement avec la surface, elle a le temps d'adopter une structure d'équilibre à deux dimensions avant de se fixer sur la surface [Rivetti 1996]. Ces deux configurations sont représentées sur la figure I.17.

III.3.4.2. Pour la conduction

La mobilité des ions dans les structures que l'on dépose sur la surface (molécule isolée et corde d'ADN) doit être relativement faible. En effet les cations qui neutralisent la charge ne sont pas complètement figés dans la structure. Cette mobilité décroît lorsque la température diminue. La conduction ionique dans ces structures doit être fortement dépendante de la température. De plus, si l'interaction des cations avec les paires de base est spécifique, on doit avoir une conduction ionique plus faible. Mais inversement l'insertion de ces cations dans la structure même de l'ADN peut à priori favoriser un autre type de conduction [Rakitin 2001] : la conduction électronique ou par saut de charges sur la molécule d'ADN (Les modèles de conduction sont présentés dans la section V.2.).

IV. Méthodes de dépôt

IV.1. Introduction

L'objectif de cette partie est de présenter certaines techniques de dépôt de l'ADN. Il en existe un très grand nombre. Nous parlerons exclusivement de celles qui ont un rapport avec la problématique de la conduction dans l'ADN. On présentera tout de même la technique de dépôt sur des substrats préalablement soumis à un plasma avec comme gaz de la pentylamine qui est utilisée en microscopie électronique. En effet cette technique d'après des résultats récents [Kasumov 2002] [Kasumov 2001] permet de déposer de l'ADN conducteur.

La technique de dépôt dépend bien évidemment de l'application envisagée. On peut tout de même distinguer deux stratégies. Celle qui consiste à préserver un maximum de caractéristiques (longueur, diamètre, interaction avec des protéines,...) de la molécule telle qu'elle était en solution avant le dépôt. A la limite, l'observation in situ de l'ADN est l'objectif ultime de cette première stratégie. La deuxième consiste principalement à manipuler l'ADN pour qu'il soit plus facile à observer. Généralement l'objectif de ces techniques est d'étirer l'ADN. Cette deuxième stratégie est intéressante pour les mesures électriques en déposant l'ADN entre des électrodes métalliques. Dans cette deuxième catégorie on inclut les techniques de capture électrostatique. Dans ce cas l'ADN est déposé entre les électrodes. Suivant l'excitation électrostatique et la taille des électrodes il est possible d'étirer l'ADN perpendiculairement aux électrodes.

L'étape critique du dépôt d'ADN est généralement le moment où on enlève le solvant. Cette étape peut être recherchée pour aligner l'ADN comme pour la technique de peignage moléculaire [Allemand 1997]. L'effet du retrait du solvant est double. Le mouvement du fluide ainsi que le ménisque peuvent étirer l'ADN [Cai 2001]. L'effet le plus important est celui du ménisque. Ainsi de l'ADN déjà déposé sur la surface peut encore bouger au moment où on enlève le solvant. Pour éviter cela de nombreuses techniques ont été mises au point. L'idée est de fixer l'ADN pour qu'il ne soit pas sensible au passage du ménisque en déshydratant le substrat [Kleinschmidt 1968] [Mayor 1968] ou en ajoutant une solution saline comme de l'uranyle acétate pour ancrer fortement l'ADN sur la surface [Dubochet 1971] [Kasas 1997] (cf. Annexe E).

Un autre problème est d'avoir des surfaces capables d'attirer l'ADN (pour que l'ADN ne bouge pas au moment où on retire le solvant) sans que l'interaction soit trop forte sous peine d'avoir l'ADN écrasé sur la surface.

On présente tout d'abord la préparation des surfaces pour le dépôt, puis les techniques de dépôt en elle-même. On termine ensuite cette partie par une revue des caractéristiques de l'ADN déposé sur ces surfaces, en particulier la hauteur des molécules (mesurée en microscopie champ proche).

IV.2. Traitement des surfaces

Le choix des surfaces est très vaste et dépend des applications. Parmi les surfaces fonctionnalisées par des molécules on peut distinguer les surfaces hydrophobes (terminées – CH₃, –CF₃, –CH=CH₂, ...), chargée (terminée –NH₃⁺, –N⁺-R₃,...), hydrophiles (terminée –COOH,...).

On peut obtenir des surfaces chargées en utilisant des lipides cationiques qui s'organisent en bicouche sur la surface [Mou 1995] [Schouten 1999]. Le dépôt de la bicouche peut se faire par la technique de Langmuir Blodgett.

On peut utiliser des surfaces recouvertes de polymère comme le polystyrène, ou des résines comme le PMMA (*polyméthylméthacrylate*) ou COPO (copolymère de PMMA et de *méthylméthacrylate*) (cf. chapitre II résines électroniques).

Les surfaces peuvent être traitées par des plasmas. Les gaz les plus utilisés sont l'air atmosphérique, la pentylamine, l'argon, ... Ce traitement s'accompagne d'un dépôt de matière sur la surface. Le plasma avec de l'air rend les surfaces hydrophiles, et avec la pentylamine plutôt hydrophobes.

On peut également traiter les surfaces par des solutions salines. Les ions peuvent se fixer sur la surface [Amrein 1989] ou remplacer d'autres ions comme c'est le cas pour le mica [Rivetti 1996].

On présente ci-dessous les techniques de dépôt qui utilisent les substrats décrits ci-dessus.

IV.3. Différentes techniques

IV.3.1. Greffage

Les techniques de greffage de l'ADN sont très variées. Le greffage peut être de nature chimique [Smith 2001] [Pirrung 2000] [Strother 2000] [Bambdad 1998] [Satjapipat 2001] [Melnyk 2002] ou par le biais d'interaction biologique du type biotine streptavidine [Strick 1998] ou par des molécules capables de s'insérer dans l'ADN comme le psoralen [Higashi 1999], ou de nature physique : interaction hydrophobe, électrostatique, ...

IV.3.2. Peignage moléculaire

Cette technique simple, permet d'étendre de manière reproductible de l'ADN sur une surface. Une des applications [Michalet 1997] est de pouvoir repérer sur le brin étendu des séquences ou des positions de gène,...

Le principe de la technique est de retirer un échantillon perpendiculairement à la surface du liquide comme indiqué par la figure I.18. Le passage du ménisque va étirer l'ADN. Le paramètre critique du dépôt est le pH [Allemand 1997]. En effet, si il est trop faible, l'ADN se dépose en pelote sur la surface et n'est pas affecté par le passage du ménisque. Si le pH est trop élevé, l'ADN ne se fixe pas. Il y a un pH intermédiaire pour lequel l'ADN se fixe par ses extrémités et peut être étiré par le ménisque. Le point important est que les extrémités de l'ADN se fixent préférentiellement sur la surface [Kang 2001]. Il y

a donc une fenêtre de pH d'environ 0.5 unité, pour laquelle les extrémités se fixent sur la surface alors que le reste de la molécule d'ADN reste en solution [Kang 2001]. Le ménisque va agir sur cette partie de l'ADN. Cette différence de comportement entre les extrémités et le reste de la molécule peut être mise en évidence par comparaison avec l'étirement de l'ADN circulaire (dépourvu d'extrémités). Il s'en dépose beaucoup moins sur la surface (10 fois moins) [Allemand 1997].

La valeur de pH optimal correspond au maximum des courbes représentées sur la figure I.18. Cette valeur peut varier d'une surface à une autre. Cela nécessite une préparation des surfaces la plus reproductible possible pour pouvoir trouver le pH optimal sur des lames tests (ce pH pouvant varier d'un lot à un autre) jusqu'à trouver la bonne valeur.

Le ménisque agit localement sur l'ADN. Ainsi, l'élongation est proportionnelle à la longueur du brin. Il n'y a pas de parties de la molécule qui sont plus étirées que d'autres. Il est ainsi possible d'étirer des brins d'ADN très long.

L'élongation de la molécule dépend de la surface. L'ADN est sur-étiré sur les surfaces hydrophobes (polystyrène, silane terminé vinyle, silane terminé $-CH_3$). En revanche il a quasiment la longueur cristallographique correspondant à la forme B sur les surfaces hydrophiles (SiO_2 , poly lysine,...). D'après les expériences d'étirement, la force exercée par le ménisque pour sur étirer l'ADN doit être de l'ordre de 100pN. La transition B-S est dans cette zone de force. Comme la transition B-S se fait à force constante on s'attend à avoir soit la longueur correspondant à la forme B (si la force exercée par le ménisque est inférieure à la force de transition B-S), soit la longueur de la forme S (si la force est supérieure à la force de transition). Des longueurs entre ces deux formes limites ont été mesurées par Bensimon [Bensimon 1994] et Allemand [Allemand 1997]. La différence entre les expériences d'étirement qui mettent en évidence la transition B-S et l'élongation par un ménisque est que dans le deuxième cas la molécule peut se dérouler puisque l'extrémité en solution est libre (on a alors un plus grand nombre de paires de base par tour d'hélice). Cela peut rendre la transition B-S moins abrupte. Dans ce cas il est normal que l'on puisse trouver des extensions intermédiaires entre la forme B et S.

Il est possible d'abaisser la tension superficielle à l'origine du sur-étirement de l'ADN en rajoutant des surfactants non ioniques comme le tween 20, le dodecanol, ... Ce composé se répartit à la surface du liquide réduisant l'angle de contact de l'eau avec le substrat à des valeurs correspondant à des surfaces hydrophiles. On arrive ainsi à étirer l'ADN sans le contraindre.

L'observation des molécules étirées en microscopie à fluorescence montre que les molécules ont quelques points d'attache sur le substrat. En effet, l'ADN intercalé par du YOYO-1 (molécule fluorescente) finit par être clivé photochimiquement. Les brins finissent par être coupés et se rétractent alors vers les points d'attaches. Sur une molécule d'ADN lambda de $16.2\mu m$ de long, il peut y avoir quelques points d'attache pour les surfaces hydrophobes et un très grand nombre pour des surfaces silanisées avec une terminaison amine.

Cette méthode nécessite d'employer un volume important de produits puisque la cuve fait quelques ml avec une concentration en ADN de quelques centaines de nM (concentration en phosphate). L'utilisation de « gros » volume permet de maintenir le pH constant au cours des expériences. Il est nécessaire de passiver la surface de la cuve pour éviter que l'ADN ne se dépose dessus. Cette opération peut se faire en laissant incuber de l'ADN (peu onéreux) de sperme de saumon qui va se déposer et prévenir tout dépôt supplémentaire.

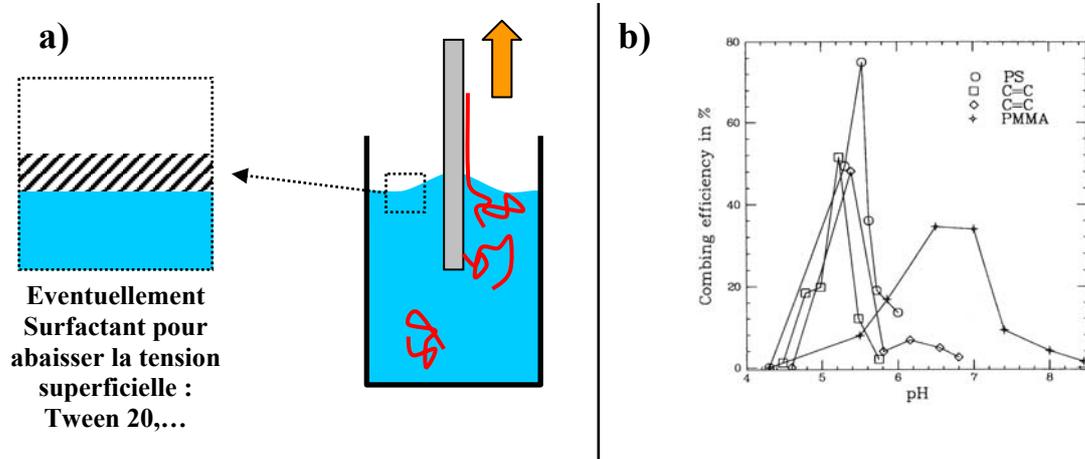


Figure 1.18 : Principe de l'étirement de l'ADN par un ménisque. A) Dispositif expérimental. L'échantillon est trempé dans la solution d'ADN un certain temps. Il est remonté doucement au bout de quelques minutes. On représente la possibilité de répandre un détergent sur la surface afin d'abaisser la tension superficielle. On évite ainsi de sur étirer l'ADN. En b) est représenté le pourcentage de brins étirés parmi tout ceux déposés sur la surface. On voit clairement qu'il y a un pH optimal, et qu'on s'écarte assez vite de la valeur qui permet d'avoir un bon dépôt avec les molécules bien étirées. [Allemand 1997]

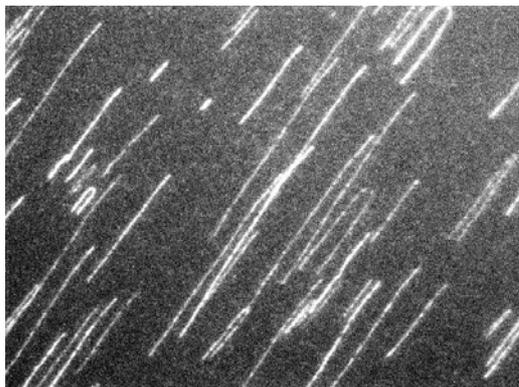


Figure 1.19 : ADN peigné sur une surface d'alkylesilane fluoré à l'aide de la technique d'étirement par un ménisque. Image obtenue en microscopie de fluorescence à l'IEMN. La dimension de l'image est de $64\mu\text{m} \times 45\mu\text{m}$.

IV.3.3.Étirement par un flot

On trouve dans la littérature toute sorte de méthodes de dépôt qui sont des variantes de ce qu'on a déjà présenté. Celle que nous présentons maintenant utilisent la capacité d'étirement d'un gradient de vitesse (flot) [Cai 2001]. La méthode la plus simple et la plus adaptée dans notre cas pour obtenir un gradient de vitesse est de déplacer le fluide le long de la surface (cf. figure I.20). La vitesse du fluide est nulle au niveau de la paroi [Landau 1989]. Elle a une certaine valeur en volume dépendant des conditions expérimentales. Il y a une épaisseur intermédiaire pour laquelle on a un gradient de vitesse important (cf. figure I.20). Une molécule d'ADN à proximité de la surface va être étirée du moment qu'elle reste suffisamment longtemps dans le gradient.

Un autre mécanisme d'étirement est possible si l'ADN est fixé à la surface. Dans ce cas c'est l'écoulement visqueux autour de l'ADN mais pas le gradient qui étire l'ADN. La vitesse n'a pas besoin d'être importante pour arriver à étirer complètement le brin (de l'ordre de 0.1mm/s [Kang 2001]).

On peut avoir une combinaison de ces deux phénomènes. Si la surface n'est pas capable de fixer un bout de l'ADN, il a très peu de chance de se retrouver étiré sur la surface.

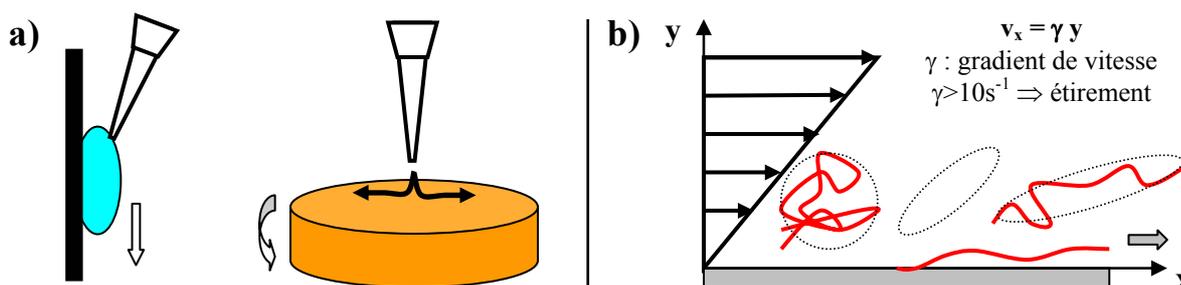


Figure I.20 : a) Illustration de quelques possibilités pour déposer l'ADN par un flot hydrodynamique. b) Mécanisme d'étirement de l'ADN par le gradient de vitesse. On a également représenté un brin d'ADN fixé à la surface étiré par le mouvement du fluide.

Il y a plusieurs façons d'obtenir ces conditions de dépôt. On peut placer l'échantillon sur une tournette [Cai 2001]. La solution d'ADN est ensuite déposée sur l'échantillon en rotation. On peut laisser couler la solution sur l'échantillon placé verticalement. Sur les surfaces hydrophobes, on peut simplement aspirer rapidement la solution avec une torchette. Le gradient de vitesse doit être au moins de $\gamma=10\text{s}^{-1}$ ($\gamma=dv/dy>10\text{s}^{-1}$ [Haber 2000]). En supposant que la vitesse du fluide varie sur une épaisseur d'environ 1mm, avec une vitesse du fluide d'environ 0.1m/s, on a un gradient de vitesse estimé à 100s^{-1} . Cela signifie qu'on est largement dans le domaine qui permet d'étirer l'ADN.

IV.3.4. Piège électrostatique

On peut déposer l'ADN par l'intermédiaire d'un champ électrique. En effet une molécule polarisable va être attirée par les zones de champ fort. Par conséquent elle sera naturellement attirée entre les électrodes. Cette méthode marche bien pour de petites molécules [Bezryadin 1997].

Tant que la molécule est de petite taille et rigide il suffit d'appliquer un champ électrique constant entre les électrodes [Porath 2000].

Dans le cas de molécules de grandes tailles et flexibles comme le λ -ADN (16 μ m de long), il faut appliquer un champ électrostatique variable. L'intensité du champ électrique doit être de l'ordre de 1V/ μ m, et la fréquence de l'ordre de 1MHz [Washizu 1990]. Il peut y avoir des instabilités. Néanmoins dès que les molécules sont étirées entre les électrodes elles restent stables.

IV.4. Mesure des hauteurs à l'AFM

Une des principales caractéristiques que l'on mesure en microscopie électronique est le diamètre de l'ADN. En microscopie champ proche, on a accès à la troisième dimension, la hauteur.

On donne figure I.21 un résumé des principaux résultats obtenus en microscopie champ proche sur la hauteur de l'ADN. Elle n'a pas été mesurée systématiquement dans les articles traitant du dépôt d'ADN. Il est vrai que les premières tentatives d'imagerie donnaient des inversions de contraste [Thundat 1992], mettant en doute la validité de ces mesures. Même avec l'amélioration des techniques d'imagerie la hauteur attendue de 2nm n'est jamais mesurée bien qu'un certain nombre d'auteurs s'en rapprochent [Bensimon 1998] [Mou 1995]. Dans ce cas l'explication principale de cette sous-évaluation de la hauteur est d'une part l'effet de convolution de la pointe, d'autre part la contrainte mécanique qu'impose la pointe de l'AFM sur l'ADN en mode contact [Vesenska 1992]. Bien entendu le déficit de hauteur peut s'expliquer en partie par ces artefacts de mesure de l'AFM mais cela n'explique pas tout.

Sur une surface recouverte d'une fonction amine l'ADN a une hauteur d'environ 0.5nm, soit 25% de la hauteur attendue [Muir 1998]. De plus des triplex d'ADN et des quadruplex ont une hauteur de respectivement 50% et environ 100% de leur hauteur cristallographique [Muir 1998]. Ce résultat est indépendant de la technique utilisée (AFM, LCSTM,...). La conclusion qui s'impose est que l'ADN a tendance à être écrasé sur la surface. L'effet du substrat est moins important pour les structures plus importantes (triplex et quadruplex d'ADN). Dans ce cas les interactions qui stabilisent la structure l'emportent. La figure I.22 propose un modèle de l'ADN déposé sur la surface amine.

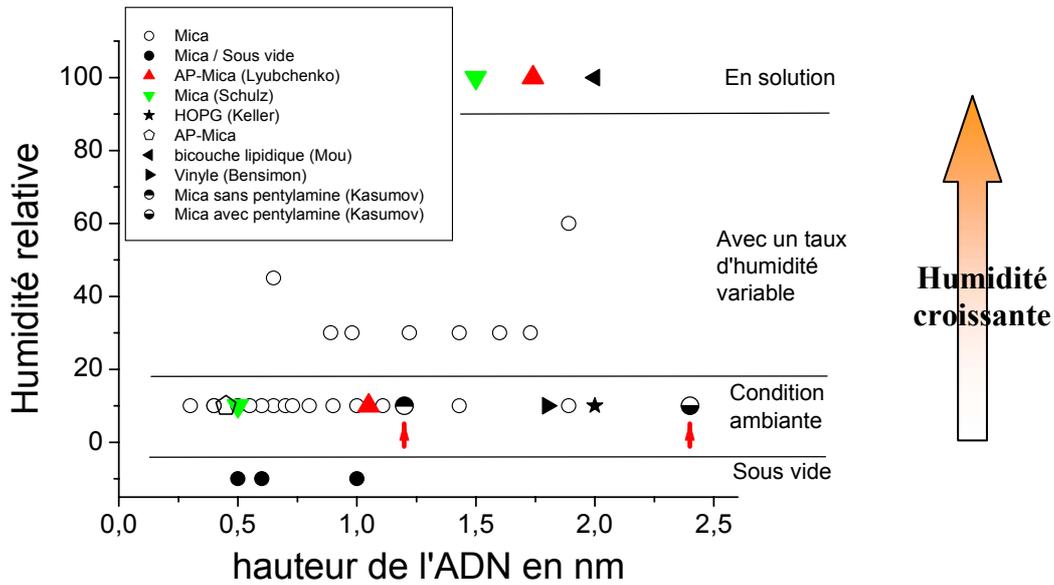


Figure I.21 : Mesure de la hauteur de l'ADN. La plupart des mesures sont en désaccords avec la valeur cristallographique attendue de 2nm. La hauteur mesurée est plus importante lorsque l'échantillon est hydraté [Schulz 1998] [Lyubchenko 1997] [Mou 1995]. Lyubchenko et Schulz ont fait des mesures en l'AFM à l'air et en solution. Kasumov [Kasumov 2002] obtient une hauteur qui dépend du traitement de surface. De plus, il obtient pour un des traitements une hauteur compatible avec le diamètre de la forme B de l'ADN. Les deux mesures de Kasumov sont indiquées par une flèche. Les données de la littérature sont dûes à [Muir 1998] [Keller 1989] [Vesenska 1992] [Cherny 1998] [Bustamante 1992] [Coury 1995] [Coury 1997] [Margeat 1998] [Hansma 1996] [Uchihashi 2000] [Maeda 1999] [Nony 2001] [Bensimon 1994]

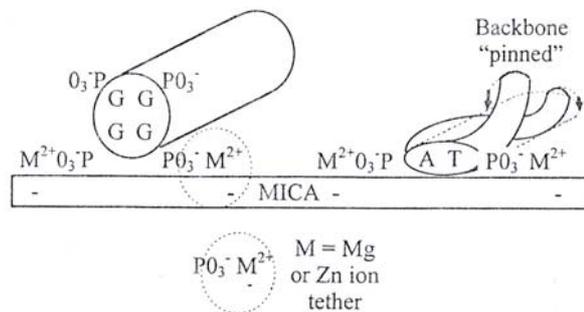


Figure I.22 : Modèle d'écrasement de l'ADN. Les cations divalents pontent l'ADN à la surface chargée négativement du mica. Cette force est à l'origine de l'écrasement de l'ADN. Le quadruplex d'ADN n'est pas perturbé par le substrat. [Muir 1998]

La figure I.21 reprend un certain nombre de mesures de la littérature. Les mesures sont majoritairement inférieures à 1 nm. Il y a tout de même une forte dispersion entre les différents auteurs et pour un même auteur [Bustamante 1992]. La surface pour laquelle il y a le plus de mesures est le mica. Les techniques utilisées pour faire ces mesures sont l'AFM (en mode contact et tapping) à l'air, sous atmosphère inerte et en solution, en non contact AFM sous vide, ainsi que du STM à l'air.

On peut constater que plus le taux d'humidité augmente, et plus la hauteur mesurée a tendance à augmenter. Les mesures faites en solution donnent toutes une hauteur de l'ordre de 1.5 à 2nm [Schulz 1998] [Lyubchenko 1997] [Mou 1995]. Lyubchenko et Schulz ont mesuré sur un même échantillon la hauteur à l'air et en solution. Ils observent une diminution de la hauteur mesurée lorsque la solution est enlevée.

Cette tendance paraît logique puisque l'ADN en solution (ou lorsque le taux d'humidité augmente) va s'entourer d'une couche d'hydratation plus importante. De plus, la présence de l'eau peut stabiliser une forme moins contrainte de la molécule.

Les mesures de Keller (au STM) et Mou (AFM en phase liquide) qui donnent une hauteur proche des 2nm sont particulières. Dans les deux cas, l'interaction entre les molécules d'ADN est importante et impose un certain ordre sur la surface [Keller 1989] [Mou 1995].

Dans le cas de Keller (une image est donnée figure I.15), les molécules d'ADN sont très proches les unes des autres et forment une structure cristalline. Il est étonnant que la molécule d'ADN soit imagée en STM et donne les bonnes caractéristiques géométriques. On peut suspecter que l'ADN soit plus conducteur dans ce cas par rapport à d'autres résultats où il apparaît en creux [Bottomley 1992]. Cette éventualité de molécules d'ADN parfois conductrices souvent isolantes a été envisagée vers les années 1990 face aux difficultés rencontrées pour imager l'ADN au STM [Dunlapp 1996] [Amrein 1989] [Keller 1989].

Dans le cas de Mou, les molécules d'ADN sont espacées d'environ 5nm. Cette proximité des molécules doit certainement stabiliser les molécules d'ADN. L'interaction entre les brins entre en compétition avec l'interaction avec la surface. A cela il faut rajouter les conditions d'imagerie favorables en solution.

Une mesure récente dû à Kasumov et al. [Kasumov 2002] est intéressante car ils obtiennent de manière reproductible une hauteur de respectivement $1.11 \pm 0.2 \text{ nm}$ et $2.4 \pm 0.5 \text{ nm}$ selon le traitement de surface. Les surfaces qu'ils utilisent sont le mica et le platine évaporé sur une partie de la surface.

Les échantillons qui donnent la hauteur de 2.4nm sont préalablement traités par un plasma avec comme gaz de la pentylamine. A part cela la technique qu'ils utilisent est très « classique ». L'ADN est déposé en présence de cations Mg^{2+} .

La conclusion de cette partie est que l'ADN est généralement contraint sur la surface sur laquelle on le dépose. Il est finalement heureux et étonnant qu'avec un traitement approprié il soit possible d'avoir un dépôt avec la bonne hauteur de la molécule.

V. Mesures électriques

V.1. Introduction

Depuis quelques années un certain nombre d'expériences tentent de mesurer la conductivité de l'ADN directement en le contactant entre deux électrodes (cf. tableau I.02) ou indirectement par EFM [Bockrath 2001] [Gomez 2002] ou par absorption micro onde [Tran 2000] [Warman 1996]. Les résultats sont très controversés. Les comportements vont de la supraconductivité induite [Kasumov 2001] à isolant [De Pablo 2000] [Storm 2001] en passant par un comportement semi-conducteur [Porath 2000] [Yoo 2001] [Lee 2002]. La figure I.23 montre la dispersion des résistances mesurées tant au niveau de la distance entre les électrodes qu'au niveau des courants mesurés. Pour une revue récente voir l'article de Dekker et Ratner [Dekker 2001].

Malgré le débat actuel sur la conduction de l'ADN, le sujet n'est pas récent. Eley et Spivey [Eley 1962] suggèrent dès 1962 que l'ADN peut conduire le courant. La conduction se ferait par le recouvrement des orbitales des bases empilées les unes sur les autres.

L'étude de la conduction s'est également faite du point de vue du transfert de charge en solution. Dans ce cas, la molécule d'ADN est modifiée et possède un groupement donneur et accepteur. Le groupement donneur peut être excité de différentes manières : chimiquement [Odom 2000], photochimiquement [Wan 1999],... Le transfert de charge se fait sur de courtes distances de l'ordre de quelques nm [Giese 2001] [Henderson 1999]. Les théories qui décrivent ce transfert de charge rendent bien compte des résultats expérimentaux [Jortner 1998].

Les expériences récentes tentent de mesurer directement la conductivité sur un petit nombre de molécules. La grande variété des comportements observés et le peu de mesures disponibles ne permettent pas de dégager une vue claire de la conductivité de l'ADN. De plus la connexion de l'ADN aux électrodes et l'influence de la surface jouent a priori un rôle crucial dans ses expériences. Cela pourrait expliquer en partie la grande variété de comportements observés [Kasumov 2002]. On présente ci-dessous un certain nombre de modèles théoriques.

V.2. Modèles de conduction

V.2.1. Transfert intramoléculaire

Deux mécanismes de conduction sont proposés pour le transfert de charge dans des molécules et en particulier dans l'ADN : le mécanisme super échange et le transport par saut.

Ces deux mécanismes s'appliquent au cas d'une molécule qui possède un groupement accepteur et donneur situés à deux endroits distincts de la molécule. Le super échange correspond au passage de la charge en une seule étape du donneur à l'accepteur. Pour le second mécanisme par saut, le transfert se fait d'états localisés de la molécule en états localisés.

Le mécanisme de saut peut s'accompagner d'une déformation de la molécule par la présence de la charge qui modifie a priori la géométrie de la molécule.

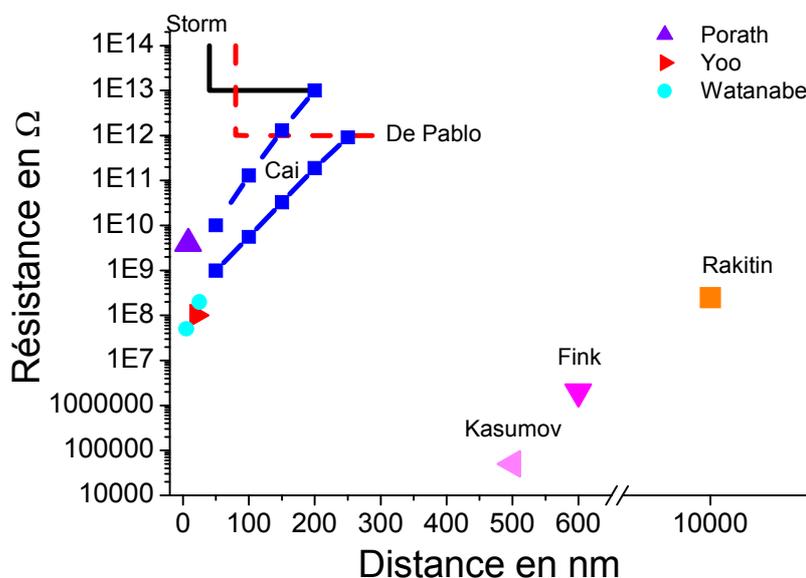


Figure I.23 : Résultats de la littérature sur la mesure de courant sur un petit nombre de molécules d'ADN (<2000 molécules). On peut constater le niveau de dispersion tant en longueur des structures qu'au niveau du courant. La résistance est calculée à partir des niveaux de courant mesurés pour quelques Volts. Dans le cas de Storm et De Pablo les mesures se situent au-dessus d'une certaine taille (40nm pour Storm et 50nm pour De Pablo), et il donnent une limite inférieure à leur mesures de courant correspondant à la sensibilité de leurs appareils. D'après [Storm 2001] [De Pablo 2000] [Cai 2000] [Kasumov 2001] [Fink 1999] [Rakitin 2001] [Porath 2000] [Yoo 2001] [Watanabe 2001]

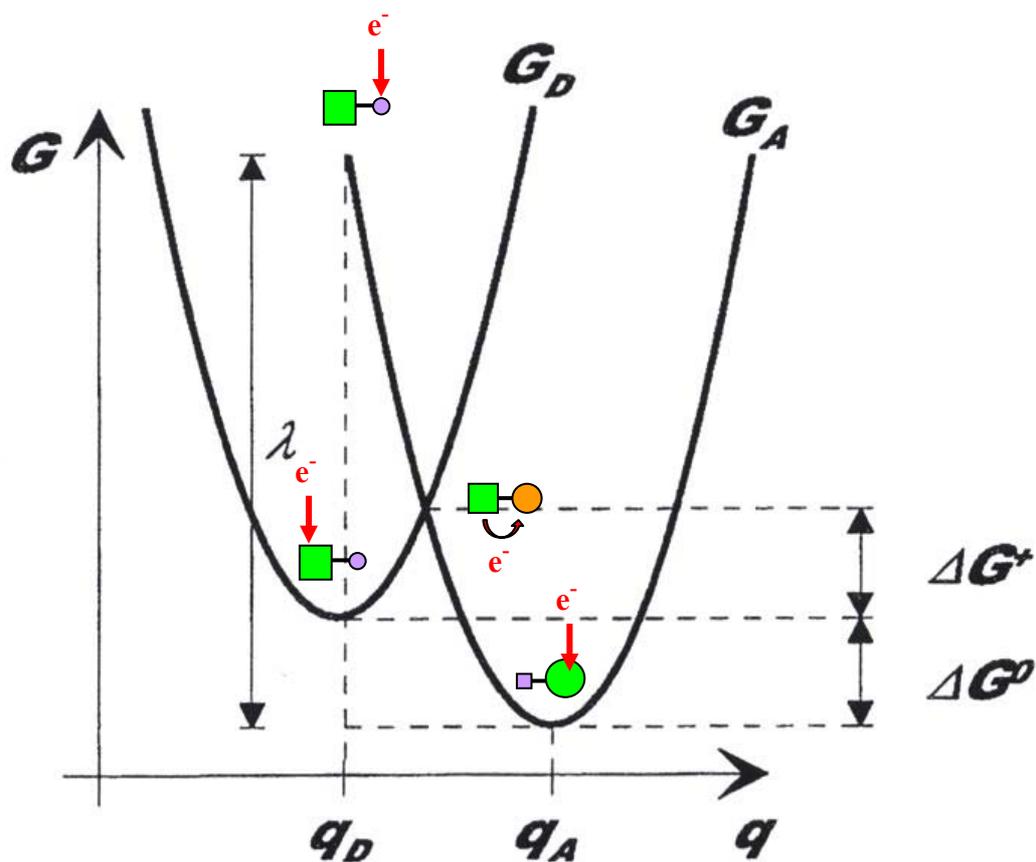


Figure I.24 : Transfert électronique entre deux états localisés. L'énergie libre est donnée en fonction de la coordonnée de réaction : q . ΔG^0 , ΔG^* et λ correspondent respectivement à l'énergie libre entre les deux états, à la barrière en énergie à franchir et à l'énergie de réorganisation. Le transfert électronique se fait au croisement des deux paraboles. On représente la variation en fonction de la coordonnée de réaction en modifiant la taille du carré et du cercle. [Jortner 1998] [Kergueris 1998]

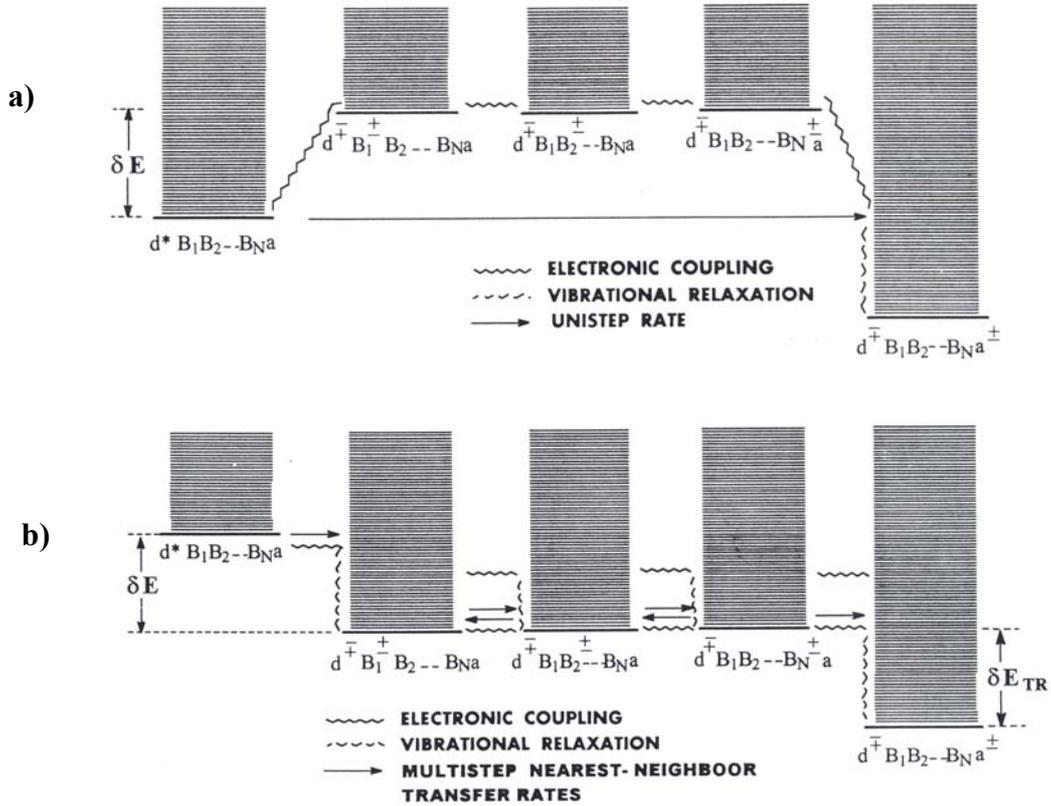


Figure 1.25 : Mécanisme de super échange en a) et de saut en b). Le super échange se fait en une seule étape à énergie constante. La structure électronique de tous les états de la molécule intervient dans la probabilité de transfert. L'état d'arrivée se désexcite thermiquement jusqu'à l'état final. [Jortner 1998]. Le mécanisme de saut nécessite d'injecter les charges dans les états intermédiaires et un état d'arrivée faible en énergie qui peut capturer la charge.

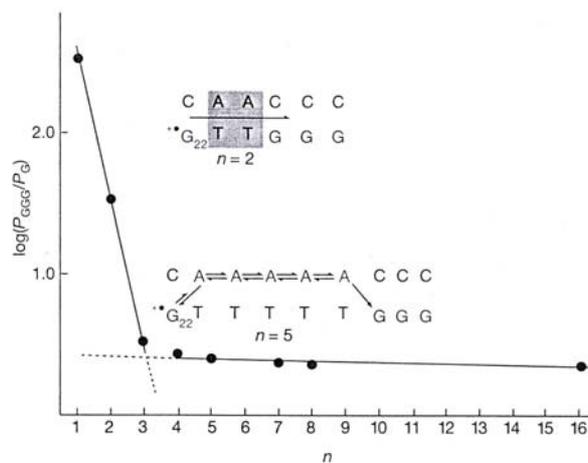


Figure 1.26 : Transfert à travers une série de paire de base A-T. A partir de 3 paires de base on passe d'un mécanisme de super échange fortement dépendant de la distance à un mécanisme de saut « indépendant » de la distance. [Giese 2001]

Le transfert de charge au sein d'une molécule peut se faire par saut des porteurs d'un site à un autre plutôt que par propagation cohérente. Les expériences pour lesquelles un état excité de la molécule est activé par fluorescence ou par réaction chimique sont assez bien décrites par ces théories ou la charge saute de site en site.

On considère deux cas extrêmes dans le mécanisme de transfert. Le premier cas correspond à un transfert adiabatique. Dans ce cas, la fonction d'onde est délocalisée sur toute la molécule. Le transfert de charge correspond à un transfert de probabilité de présence à deux endroits différents de la molécule pour chacun des états [Kergueris 1998] [Couture 1992]. Le passage entre les deux états dépend des mouvements des noyaux (de la forme de la molécule).

Le deuxième cas que l'on présente ci-dessous correspond au transfert non adiabatique. A la différence du cas précédent, les états donneur et accepteur sont localisés. Ils sont faiblement couplés. Il y a un transfert tunnel entre les deux états.

V.2.1.1. Vitesse de transfert

La vitesse du transfert dans le cas non adiabatique est donnée de manière générale par la formule ci-dessous (I.06). Comme les électrons se déplacent beaucoup plus vite que les noyaux des atomes, il est possible d'isoler les deux termes de la formule qui découplent les mouvements électroniques et nucléaires. En d'autres termes, les noyaux sont immobiles du point de vue des électrons. Le premier terme correspond à un transfert électronique entre les deux états quantiques du donneur et de l'accepteur à énergie constante. Le second terme rend compte du fait que le transfert implique une déformation de la molécule de telle sorte que les niveaux d'énergies du donneur et de l'accepteur soient les mêmes. Il donne donc la probabilité d'avoir cette coïncidence des énergies de l'état donneur et accepteur.

$$k = \frac{2\pi}{\hbar} |T_{DA}|^2 \cdot f_{FC} \quad (I.06)$$

Premier terme :
Couplage électronique
entre les états de départ
et d'arrivée

Terme de Franck Codon :
Il rend compte de la déformation préalable de
la molécule (déplacements de noyaux) avant
le transfert électronique.

Le couplage T_{DA} entre le donneur et l'accepteur décroît exponentiellement avec la distance. Il correspond au recouvrement des orbitales des deux états par l'intermédiaire de l'hamiltonien de couplage.

Il existe de nombreuses expressions donnant le terme de Franck Codon suivant les hypothèses effectuées [Kergueris 1998] [Moser 1992].

La première formulation du terme de Franck Codon est dû à Marcus [Marcus 1965]. Un état excité d'une molécule (état donneur) implique une réorganisation des atomes. Si on s'éloigne de cette configuration la plus stable, l'énergie augmente. On peut prendre comme modèle l'oscillateur harmonique avec une variation parabolique de l'énergie en fonction de la coordonnée de réaction (qui rend compte du déplacement des noyaux). On a donc deux paraboles pour l'état donneur et accepteur. Or le transfert électronique ne peut se faire que pour une configuration commune aux deux états. Par conséquent, il a lieu au croisement des deux paraboles. La figure I.24 donne une représentation de cet état intermédiaire. On utilise alors la règle d'or de Fermi pour le transfert à énergie constante entre les deux états. Cela nous donne le premier terme de la formule de Marcus (I.07). Le second terme correspond à la probabilité de se trouver dans la configuration commune (notée T sur la figure ci-dessus). Ce processus est activé thermiquement. ΔG^* est la barrière d'énergie à franchir pour réaliser le transfert. Un calcul simple mène à l'expression [Marcus 1965] de $\Delta G^* = (\lambda + \Delta G^0)^2 / 4\lambda$.

$$k = \frac{2\pi}{\hbar} \left| T_{DA} \right|^2 \cdot \frac{1}{\sqrt{4\pi\lambda kT}} \exp \left[- \frac{\overbrace{(\lambda + \Delta G^0)^2}^{\Delta G^*}}{4\lambda} - \frac{1}{kT} \right] \quad (I.07)$$

Premier Terme
Probabilité de transfert
entre l'état D et A

Deuxième terme de Franck Codon
formule de Marcus (cas classique)

λ , k , ΔG^0 , et T sont respectivement l'énergie de réorganisation, la constante de Boltzmann, l'énergie libre entre les deux états et la température. L'énergie de réorganisation est indiquée sur la figure I.24. Elle correspond à la différence d'énergie si on faisait le transfert électronique à configuration constante de la molécule. C'est également l'énergie qu'il faut fournir pour déformer la molécule de la configuration d'arrivée à celle de départ sans transfert électronique.

Cette théorie est le cadre de nombreux travaux théoriques. La plus grande partie du travail consiste à déterminer λ et ΔG^0 . La méconnaissance de ces deux paramètres et la variété des situations rencontrées dans la littérature ont été l'origine de résultats contradictoires.

La théorie présentée rend compte de l'interaction de la charge avec son environnement. En particulier les molécules d'eau et les ions présents dans la couche d'hydratation de l'ADN peuvent affecter le transfert de charge [Barnett 2001]. Les vibrations de la molécule peuvent faciliter le déplacement de la charge. On parle alors de transfert assisté par polaron [Bruinsma 2000]. Les temps caractéristiques de déplacement des groupements phosphates et des sucres de l'ADN sont de l'ordre de 30-300ps [Henderson 1999]. Les études actuelles tentent de comprendre ces mécanismes.

V.2.1.2. Super échange

La figure I.25 décrit le transfert à travers toute la molécule, de l'état de départ jusqu'à un état de même énergie parmi ceux disponibles. L'état d'arrivée se désexcite ensuite par couplage avec l'environnement (cf. figure I.25). Ce transfert fait intervenir tous les niveaux de la molécule par l'intermédiaire du terme de couplage T_{DA} . Ce terme décroît exponentiellement avec la distance. On perd typiquement un facteur 10 dans le couplage tous les 0.1 à 1nm [Krzeminski 2001].

$$T_{DA} \propto \exp(-\beta d) \quad \text{avec } \beta \approx 1 \text{ à } 10 \text{ nm}^{-1} \quad (\text{I.08})$$

V.2.1.3.Cas de l'ADN

On considère dans cette section le cas du transfert de charge dans l'ADN. Cette molécule est un bon candidat pour le transfert électronique grâce au recouvrement des orbitales des paires de base le long de la molécule. A cela il faut ajouter qu'une charge positive est plus stable localisée sur une paire de base G-C (ou un groupement de paire de base G-C), que sur une paire de base A-T. Le transfert se fait alors entre les paires de base G-C le long de l'ADN.

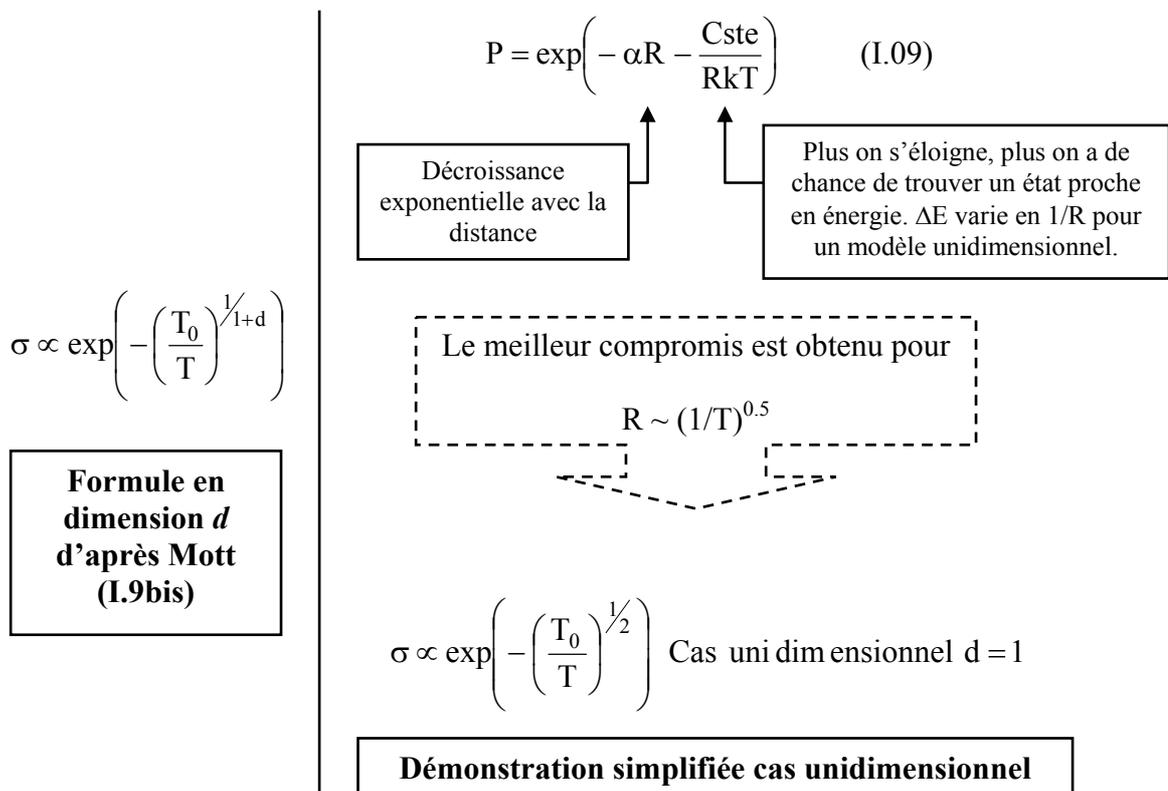
Le transfert entre ces sites dépend exponentiellement de la distance tant que la distance à parcourir est faible (mécanisme de super échange). Au-delà d'une distance critique (qui correspond à un saut d'environ 3 paires de base) on a une dépendance en fonction de la distance qui est algébrique (cf. figure I.26). Les charges sont transportées sur de longues distances même si les paires de base G-C sont relativement éloignées.

L'explication de ce phénomène est l'activation thermique d'un mécanisme de saut entre les paires de base A-T [Bixon 2001]. L'étape limitante est d'arriver à mettre la charge de la base G-C sur la première paire de base A-T. La charge peut alors se déplacer sur les paires de base voisines qui sont à des niveaux d'énergie voisins ou inférieurs.

Le transfert de charge peut être interrompu par une désexcitation de l'état excité par le solvant. On a donc une compétition entre le transport et la capture de la charge par le solvant [Bixon 2001].

V.2.1.4. Distance de saut variable

Dans le modèle que l'on propose dans cette section la distance de saut peut être variable. Mott [Mott 1971] a proposé ce mécanisme pour les solides désordonnés. La conduction peut se faire par saut entre des états localisés aléatoirement en énergie et dans l'espace. Les électrons pour se déplacer dans le solide doivent se placer sur un état inoccupé le plus proche en énergie et en distance (R). Or plus la charge va loin, plus elle a de chance de trouver un état proche en énergie. Inversement si la charge ne va pas loin la probabilité P de transfert est plus importante mais dans ce cas il y a peu de chance de trouver un état proche en énergie. Ce modèle est mis en équation ci-dessous (I.08). On arrive à une dépendance de la conductivité σ en température donnée par la formule ci-dessous (I.09bis). T_0 est un paramètre qui dépend de la densité et de la localisation des états au niveau de Fermi et d est la dimension du système.



Ce modèle de conduction a été utilisé par Yu [Yu 2001] pour expliquer la dépendance en température (80K à température ambiante) de la conductivité des expériences de Tran [Tran 2000] d'absorption micro-onde par l'ADN.

Yoo [Yoo 2001] a également étudié la dépendance de la conductivité de l'ADN sur une large gamme de température. Il mesure une dépendance de la conductivité qui ressemble

beaucoup à celle de Tran. Mais ils interprètent leurs résultats par un modèle de saut de polaron [Bottger 1985].

V.2.1.5. Saut de polaron

Comme nous l'avons vu précédemment, le transfert de charge s'accompagne en général d'une réorganisation de la molécule. Le polaron, est une déformation du réseau associée à la charge. C'est l'ensemble de la déformation et de la charge qui se déplace.

Yoo [Yoo 2001] a utilisé un modèle de saut de polaron pour expliquer ses résultats expérimentaux. On retrouve le mécanisme de saut, mais cette fois ci un champ électrique est appliqué (par comparaison aux expériences de transfert de charge effectuées en solution où il n'y a pas de champ électrique appliqué). Ce champ électrique abaisse la barrière d'énergie à franchir pour effectuer le saut d'un état à un autre. On a une dépendance exponentielle du courant vis-à-vis du champ électrique (cf. formule (I.10)). Le sinus hyperbolique correspond à la sommation du courant dans les deux sens.

$$I \propto \sinh\left(\frac{ea}{2kT} \frac{V}{d}\right) \exp\left(-\frac{E_a}{kT}\right) \quad \text{avec} \begin{cases} a : \text{distance de saut} \\ V/d : \text{champ électrostatique int erélectrode} \\ E_a : \text{Energie d'activation} \end{cases} \quad (\text{I.10})$$

V.2.2. Transport à travers une molécule entre deux électrodes

On présente dans cette partie un certain nombre de résultats sur le transport de charge dans des structures **Métal / Molécule / Métal**. Deux approches sont décrites ci-dessous. Ce qu'on apporte en plus de la partie précédente est l'ajout des électrodes. Il se pose alors le problème de l'injection des charges pour initier le transfert.

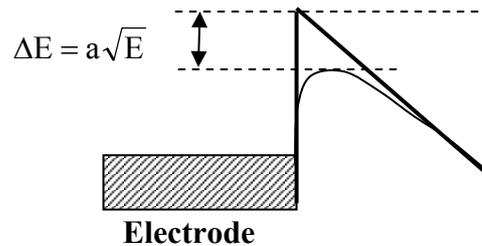
V.2.2.1. Injection des charges

Le contact électrique entre les électrodes et la molécule peut être traité globalement en résolvant l'hamiltonien du système et en calculant le coefficient de transfert entre les électrodes [Krzeminski 2001]. Cette approche fait l'objet des deux sections suivantes (Bardeen et de Landauer).

Dans cette section nous présentons brièvement les phénomènes qui peuvent se passer aux électrodes. Dans l'hypothèse d'un mauvais contact entre la molécule et les électrodes, les charges peuvent être injectée par effet tunnel. La charge émise est attirée par son image

électrostatique donnée par l'électrode. Cet effet, abaisse la barrière d'émission. On a alors une dépendance du courant donnée par la formule (I.11) où a est une constante qui dépend de la charge de l'électron et de la permittivité du vide, et E est le champ électrostatique au niveau de l'électrode [Aviram 1998 p.141]. En particulier, l'injection des charges peut dépendre de la géométrie des électrodes. Le champ électrostatique est plus important au niveau d'une pointe qu'au niveau d'une électrode plane.

$$I \propto e^{\left(\frac{a\sqrt{E}}{kT}\right)} \quad (\text{I.11})$$



Dans le cas de l'ADN on peut s'attendre à observer d'autres phénomènes comme une accumulation d'ions de la couche d'hydratation de la molécule au niveau des électrodes. L'effet d'une telle accumulation est d'écranter le potentiel électrostatique. On peut s'attendre alors à une forte diminution du courant.

De plus une fois que les charges sont injectées, la question est de savoir par quel mécanisme elles vont atteindre l'autre électrode. La question se pose de savoir par où passe le courant ? Par les ions de la couche d'hydratation ou par les paires de base, ou par le squelette.

Ainsi le mécanisme de transfert de charge à travers la jonction Métal / ADN / Métal n'est pas simple a priori.

V.2.2.2. Approche de Bardeen

Le formalisme de Bardeen [Bardeen 1961], décrit à l'origine le passage des électrons par effet tunnel entre deux électrodes séparées par un isolant. L'hypothèse utilisée par Bardeen est celle d'un faible couplage entre les deux électrodes. La molécule qui relie les deux électrodes est considérée comme une perturbation. Ce traitement permet de déduire une expression explicite du courant traversant la jonction.

Cette approche n'est pas forcément adaptée au problème de la conduction dans des molécules qui couplent a priori fortement les deux électrodes. L'approche de Landauer est mieux adaptée à ce genre de traitement.

V.2.2.3. Approche de Landauer

Landauer [Landauer 1957] traite la molécule qui relie les électrodes comme un centre diffuseur. Cette approche a l'avantage de ne pas se limiter au cas où la molécule est considérée comme une impureté perturbatrice.

Le diffuseur possède une certaine probabilité de laisser passer un électron (notée T). Ainsi l'intensité qui passe d'une électrode à l'autre dépend de l'occupation des niveaux sur chaque électrode et de cette probabilité. Si aucune tension n'est appliquée au système, il y a autant de courant dans un sens que dans l'autre. En revanche dès qu'une différence de tension est appliquée il y a un déséquilibre des porteurs proportionnel à la tension. A température nulle on a alors une expression de la conductance (I.12).

$$g = \frac{2e^2}{h} T \quad \left\{ \begin{array}{l} e : \text{charge de l'électron} \\ h : \text{constante de Planck} \\ T : \text{Coefficient de transmission} \end{array} \right. \quad (\text{I.12})$$

Lorsque $T = 1$. C'est le cas par exemple d'un conducteur dont les dimensions sont plus petites que le libre parcours moyen des électrons, on obtient une conductance de $77\mu\text{S}$ ($\sim 12\text{k}\Omega$) pour un canal de conduction.

Cette expression est intéressante puisque la résistance minimale pour un canal de conduction est fixée par les lois de la mécanique quantique à $12\text{k}\Omega$ environ.

Le calcul de T peut se faire pour une molécule quelconque en calculant les coefficients des fonctions d'onde transmises avec l'équation de Schrödinger [Krzeminski 2001] [Emberly 1998].

V.3. Mesures électriques

On reprend sur le tableau I.02 une grande partie des mesures de la littérature. On peut distinguer trois types de mesure. **Celles où l'ADN est conducteur** : Fink [Fink 1999], Kasumov [Kasumov 2001] [Kasumov 2002], groupe de Nakayama, Okahata et al. [Nakayama 2001], Rakitin [Rakitin 2001], Shana O'Kelley [Kelley 2001] [Kelley 1999] **celles où il est isolant** : Storm [Storm 2001], De Pablo [De Pablo 2000], et enfin toute une série de **mesures intermédiaires** où l'ADN se comporte plutôt comme un semi-conducteur : Porath [Porath 2000], Yoo [Yoo 2001], Tran [Tran 2000], Ha [Ha 2002], Gu [Gu 2002-a] [2002-b], Watanabe [Watanabe 2001], Cai [Cai 2000] [Cai 2001].

V.3.1. ADN conducteur

En 1998, Okahata [Okahata 1998-b] a mesuré la conductivité d'un film lipidique contenant de l'ADN. La méthode de fabrication du film est indiquée sur la figure I.27. Par étirement du film, ils arrivent à orienter les molécules d'ADN dans le sens de l'étirement. Il trouve une résistance de l'ordre de $20\text{k}\Omega$. Leur mesure n'est pas tant intéressante par le

niveau de courant qu'ils mesurent, mais par les expériences de contrôle qui montrent clairement que la conductivité passe par l'ADN. En effet lorsque les molécules d'ADN du film sont placées perpendiculairement aux électrodes, ils mesurent du courant, sinon ils ne mesurent quasiment rien. Les mesures sont stables dans le temps.

Récemment, un article de Nakayama, Okahata et al. [Nakayama 2001] sur le même système montre une dépendance en température qui met évidence une chute brutale de la conductivité (3 ordre de grandeur) lorsque la température augmente au-dessus de 75°. De plus, lorsqu'ils refroidissent l'échantillon ils retrouvent le courant initial. Ils interprètent ce résultat par la fusion réversible de l'ADN. Cela suggère que la conduction dépend de la structure de la molécule d'ADN dans le film qui est en forme B à température ambiante [Tanaka 1996]. Cela signifie également que l'ADN simple brin est isolant.

Enfin, si les molécules qui composent le film lipidique ne sont pas assez longues pour ponter les électrodes, ils ne mesurent pas de courant. En effet, à la mise sous tension le courant décroît très rapidement vers zéro (ils déduisent cependant une résistance assez faible par extrapolation d'un diagramme Cole – Cole comme le montre la figure I.28).

En 1999, Fink a mesuré sur quelques molécules d'ADN une résistance de l'ordre de 1M Ω sur une distance de 600nm [Fink 1999]. Cette expérience a été réalisée dans un microscope à transmission. Une pointe vient attraper une corde d'ADN suspendue dans un creux d'une grille de microscope. Une différence de potentiel est appliquée entre la pointe et la grille de microscope. Il obtient des caractéristiques courant-tension linéaires.

La mesure qui a donné le niveau de courant le plus important rapporté au nombre de molécules présentes dans le système a été obtenu par Kasumov et al. [Kasumov 2001]. Ils mesurent des résistances de l'ordre de 100k Ω pour moins d'une dizaine de molécules (on est très proche de la résistance minimale d'un canal de conduction 12k Ω). De plus ils obtiennent une supraconductivité induite par les électrodes en rhénium (qui est supraconducteur à 1K) en dessous de 1K. Leur expérience est à mettre à part des autres mesures électriques car ils sont les seuls à utiliser un traitement de la surface avec un dépôt de pentylamine en phase plasma. Cette technique est utilisée en microscopie électronique pour traiter les grilles de microscope recouverte de graphite. De plus lorsqu'ils mettent l'ADN en présence de DNase, le courant disparaît. Ces mesures peuvent laisser perplexe tant elles contrastent avec ce qui est mesuré généralement sur l'ADN [Dekker 2001].

Néanmoins, un résultat récent du même groupe de recherche [Kasumov 2002] met en évidence une relation directe entre la structure de la molécule et sa conductivité. En effet avec un prétraitement de l'échantillon avec de la pentylamine ils observent de l'ADN conducteur et de 2.4nm de haut. En revanche sans le traitement avec la pentylamine, ils trouvent un ADN isolant dont la hauteur est de 1nm. Leurs mesures sont faites en conducting AFM. Par conséquent, il n'y a pas d'ambiguïté : le courant passe bien par l'ADN.

Les expériences de Kasumov et Okahata suggèrent un lien simple entre la structure et la conductivité de l'ADN. Le bon empiement des paires de base semble être une condition pour le transport électronique. Ce résultat est en accord avec des mesures de courant à travers des films d'ADN [Kelley 2001] [Kelley 1999]. En effet ils montrent qu'un désappariement d'une seule paire de base dans la molécule d'ADN la rend isolante. De plus ils n'observent pas de dépendance du courant en fonction de la distance (sur quelques nm).

Les mesures de Rakitin [Rakitin 2001] sur des cordes d'ADN suspendue entre des électrodes séparées de 10 μ m mettent en évidence une conduction à longue distance sur des cordes d'ADN de 1000 molécules environ.

V.3.2. ADN semi-conducteur

Un certain nombre de mesures sur l'ADN donne des résultats qui ressemblent au comportement des semi conducteurs.

Porath [Porath 2000] a fait des mesures électriques sur de l'ADN de 8nm de long qui ne comporte que des bases G-C. (Poly(dG).Poly(dC)). Sur cet oligonucléotide, toutes les bases G sont sur le même brin. Il justifie son choix pour cette molécule par rapport aux résultats obtenus en solution où les bases G joueraient un rôle crucial dans le mécanisme de transfert de charge en stabilisant les trous (cf. paragraphe V.2).

Il a obtenu des caractéristiques courant tension avec une tension de seuil (cf. figure I.29). Le reste de la courbe est quasiment linéaire avec une résistance de l'ordre du G Ω . Le niveau de courant ne dépend pas des conditions de mesure (sous vide ou à l'air). En revanche, la tension de seuil dépend de la température. Elle augmente avec la température.

Cette expérience a été interprétée théoriquement par de nombreux auteurs [Hjort 2001] [Li 2001] [Cuniberti 2002]. Il est vrai que son système se prête assez bien à un traitement théorique puisque l'ADN ne contient qu'un type de paire de base et il est de petite taille. Porath a tenté d'expliquer ses résultats par le transfert électronique par les états de la molécule d'ADN. La tension de seuil étant du au grand gap entre les niveaux d'énergie qui sont au-dessus et en dessous du niveau de fermi des électrodes. Le courant commence à traverser l'ADN lorsque les niveaux de l'ADN sont en résonance avec le niveau de Fermi des électrodes.

L'augmentation de la tension de seuil avec la température est assez étonnante. On s'attend à l'effet inverse pour un conducteur avec une structure de bande. L'effet de la température tend à désorganiser le système. On a donc moins de courant.

Les mesures les plus convaincantes du caractère semi conducteur de l'ADN ont été obtenues par Yoo [Yoo 2001]. Ils utilisent du Poly(dA).Poly(dT) et Poly(dG).Poly(dC) pour faire leurs mesures.

L'ADN est déposé par électro trapping entre deux électrodes. Une troisième électrode (cf. tableau I.02) permet d'appliquer l'équivalent d'une tension de grille pour un transistor à l'ADN qui se situe entre les deux électrodes séparées de 40nm.

Leurs mesures mettent en évidence un comportement semi conducteur de type N pour le Poly(dA).Poly(dT) et P pour le Poly(dG).Poly(dC).

Watanabe [Watanabe 2001] a également fait de la modulation du courant traversant l'ADN à l'aide d'une troisième électrode. Son système de mesure consiste en trois nanotubes de carbone dont deux qui servent d'électrodes et qu'il peut manipuler avec une précision nanométrique. Il mesure plus de courant lorsqu'il applique une tension de grille importante (autour de 5V). Il déduit de ces mesures que le contact entre l'ADN et les nanotubes de carbone est probablement de type Schottky.

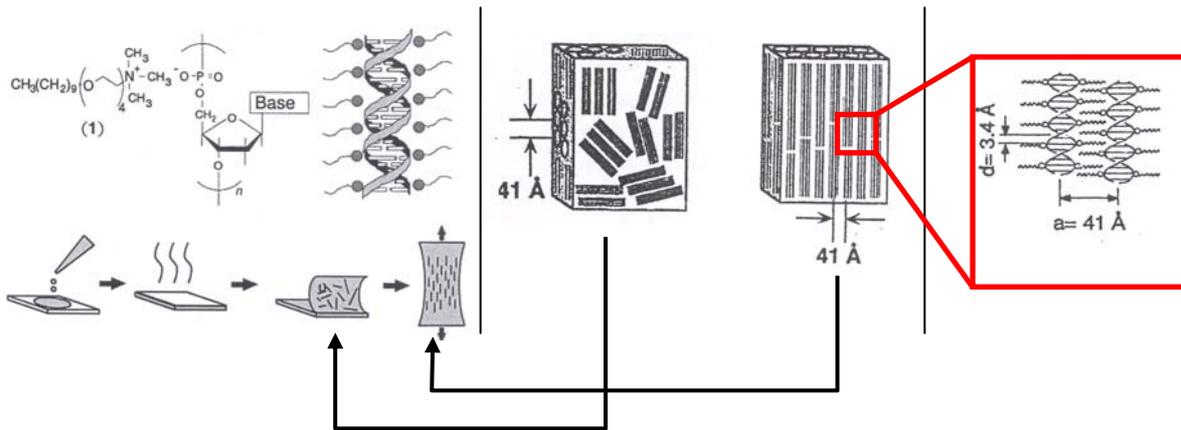


Figure I.27 : Représentation du protocole pour l'obtention d'un film lipidique qui contient des brins d'ADN orientés. Les lipides se placent autour de l'ADN. Le complexe précipite en solution aqueuse. Il est récupéré, séché et redissous dans un solvant organique. On obtient un gel stable en laissant évaporer doucement le solvant organique. Par action mécanique on oriente les cristaux qui forme le gel. Les distances entre les brins et l'espace inter électrodes restent inchangées pendant l'étirement. L'espace entre les bases correspond à la forme B de l'ADN. [Nakayama 2001]

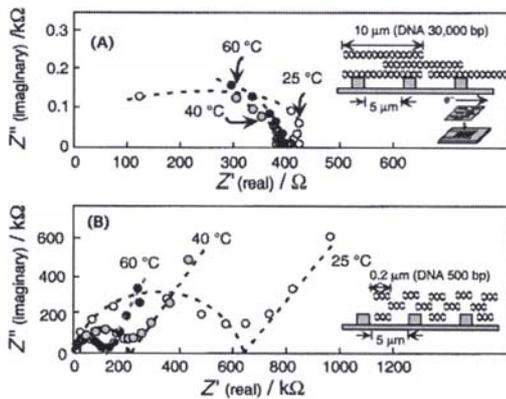


Figure I.28 : Diagramme Cole – Cole pour des films lipidiques contenant des molécules d'ADN de deux tailles différentes. En (A) la molécule ponte les électrodes. En (B) ce n'est pas le cas. Dans ce dernier cas on extrapole le diagramme pour en déduire une résistance sur l'axe des abscisses.

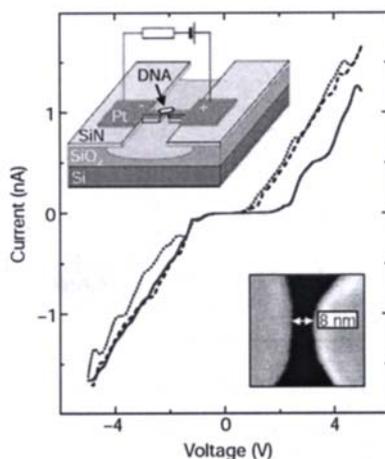


Figure I.29 : Caractéristique courant tension de molécules d'ADN poly(dG).poly(dC) de 8nm de long. Le dispositif expérimental et les électrodes sont représentés en insert. [Porath 2000]

Une série de mesures faites en conducting AFM [Cai 2001] [Cai 2001] [Gu 2002] donnent des caractéristiques courant – tension avec redressement. Il y a peu de courant à faible tension puis il devient beaucoup plus important lorsque la tension augmente. Leurs mesures donnent une dépendance exponentielle du niveau de courant avec la distance. De plus la distance caractéristique de décroissance est 2 ordres de grandeur au-dessus de ce qui a été observé avec les expériences faites en solution.

V.3.3. ADN isolant

Storm [Storm 2001], De Pablo [De Pablo 2000], Gomez-Navarro [Gomez – Navarro 2002], Bockrath [Bockrath 2001], ont tous observé un comportement très résistif de l'ADN par différentes techniques.

Storm a déposé l'ADN entre des électrodes espacées de plus de 40nm. Il n'a pas mesuré de courant au-dessus de 1pA. Il en a déduit une limite inférieure de $10^{12}\Omega$ à la résistance de ses systèmes.

De Pablo a effectué ses mesures à l'aide d'un conducting AFM. Ses résultats sont en désaccord avec ceux de Cai [Cai 2000] [Cai 2001]. Ce désaccord est d'autant plus étonnant que leurs systèmes sont très semblables. La différence peut être dans la méthode de métallisation qui dans les expériences de De Pablo détruit l'ADN. L'ADN est également différent entre les deux expériences.

Nos résultats (cf. chapitre IV) suggèrent une dégradation de l'ADN au cours du dépôt de l'électrode.

Des mesures sans électrodes ont également été effectuées en EFM. Dans ce cas, Gomez – Navarro et Bockrath, ont constaté une constante diélectrique de l'ADN incompatible avec celle d'un conducteur. Pour arriver à une telle conclusion ils comparent le signal obtenu en EFM sur l'ADN par rapport au signal obtenu sur des nanotubes de carbone.

V.3.4. Effet de la température

Les mesures en température donnent deux types de comportement (cf. tableau I.02). Soit la résistance varie peu même sur une très grande plage de température [Kasumov 2001] [Nakayama 2001] [Porath 2000], soit on a un comportement de type semi-conducteur : la résistance diminue lorsque la température augmente. Yoo [2001] et Tran [2000] ont observé ce dernier comportement sur une large gamme de température. Leurs résultats sont similaires. En revanche l'interprétation qu'ils en donnent n'est pas la même. Yoo utilise un modèle de saut de polaron pour rendre compte de cette dépendance. Les vibrations de la molécule déterminent la probabilité de saut. L'accord entre les résultats expérimentaux et théoriques est assez bon dans le cas de Yoo. Le seul point de désaccord concerne la

dépendance de la distance de saut avec la température alors qu'elle ne devrait pas en dépendre.

Les expériences d'adsorption de Tran ont été interprétés par Yu [Yu 2001] par un modèle de saut avec une distance variable. Finalement des résultats assez similaires du point de vue de la dépendance en température sont interprétés de deux manières différentes.

Il est possible que le modèle de Yoo [Yoo 2001] ne traite pas correctement le problème du contact avec les électrodes. La forme en S de ces caractéristiques courant – tension peut être dû au mauvais contact entre la molécule et l'électrode. En effet, les expériences de conduction de Ha [Ha 2002] (Yoo est un des coauteurs de l'article) sur des électrodes donne une forme en S pour les caractéristiques courant – tension avec deux pointes et une caractéristique linéaire pour les mesures 4 pointes. Par conséquent, le modèle de saut de polaron utilisé par Yoo [Yoo 2001] pour interpréter ses résultats ne marche pas pour les expériences de Ha qui sont pourtant très similaires. Il est vrai que les deux expériences ne sont pas faites exactement dans les mêmes conditions et on ne peut pas rigoureusement déduire d'une expérience des conclusions pour l'autre.

On notera que l'expérience de Yoo ressemble beaucoup à l'expérience de Porath [Porath 2001]. Dans les deux cas l'ADN est capturé électrostatiquement entre les électrodes. L'ADN qu'ils utilisent est le même (Poly dG - dC), cependant il y a plus de molécules dans le cas de Yoo. L'interprétation de l'expérience de Porath fait intervenir des théories de transport par bande [Hjort 2001] alors que Yoo [Yoo 2001] utilise un modèle de saut de polaron.

Nakayama [Nakayama 2001] observe également une activation thermique de la conduction lorsque les brins d'ADN sont trop petits pour ponter les électrodes (cf. tableau I.02). A ce titre leurs mesures sont intéressantes car ils observent des mécanismes de conduction différents avec la même expérience (cf. figure I.28).

V.3.5. Effet de l'environnement

Les résultats sont controversés puisque certaines des mesures dépendent fortement de l'humidité ambiante, alors que d'autres n'observent pas de différence notable sous vide ou à l'air (cf. tableau I.02). Les mesures qui ont donné le plus de courant (Kasumov, Rakitin, Okahata) ne sont pas affectées par les conditions ambiantes.

Pour les mesures qui présentent une dépendance vis-à-vis du taux d'humidité le mécanisme de conduction est certainement de type ionique. Ce n'est pas la seule explication possible puisque la forme de l'ADN est sensible à l'humidité ambiante. On pourrait attribuer le changement du niveau de conduction au passage progressif d'une forme de l'ADN à une autre. On peut noter (cf. tableau I.02) que dans les expériences de Gu [Gu 2002], la résistance varie sur 9 ordre de grandeur. De plus ils observent un changement brusque de conductivité lorsque l'humidité ambiante dépasse 70%. Les auteurs indiquent que le changement de conductivité s'accompagne d'un changement de la morphologie du film.

V.4. Conclusion des mesures électriques

Nous avons présenté dans cette section les résultats de la littérature sur la conduction dans l'ADN. Le tableau I.02 donne le montage expérimental ainsi que quelques caractéristiques de toutes ces mesures. Les comportements observés vont de la supraconductivité induite à isolant en passant par semi-conducteur.

Il y a une forte dispersion entre les différents résultats. Par exemple des expériences très similaires comme celles de Cai et De Pablo en conducting-AFM donnent des niveaux de conduction très différents (cf. figure I.23).

On a également désaccord entre toutes ces mesures au niveau de la dépendance en fonction du taux d'humidité et de la température. Les mesures qui ont donné le plus de courant ne dépendent ni de l'humidité ambiante ni de la température.

Les conditions qui permettent d'obtenir du courant ne sont pas connues à l'heure actuelle. On notera cependant une avancée significative d'après les résultats de Kasumov [Kasumov 2002]. Un dépôt préalable de pentylamine en phase plasma semble être la bonne technique pour déposer de l'ADN conducteur. Il s'agit maintenant de comprendre pourquoi ce traitement donne de bons résultats du point de vue de la conduction.

Un autre aspect de la conduction de l'ADN est la possibilité de modifier cette molécule pour modifier la conductivité. Ce travail a déjà été entrepris en partie avec des molécules intercalantes [Gu 2002] [Okahata 1998-b]. On peut envisager l'utilisation d'autres molécules comme le cis platine qui pontent les paires de base, ou bien l'intercalation dans les sillons de l'ADN [garoff 2002] de molécules conjuguées,...

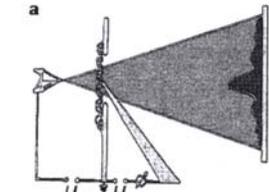
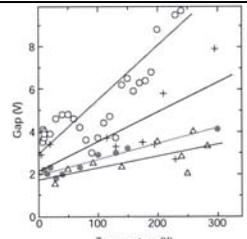
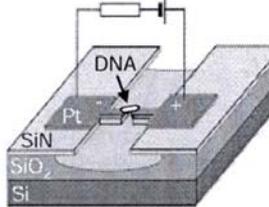
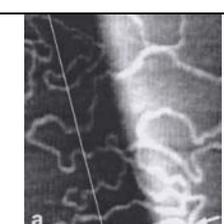
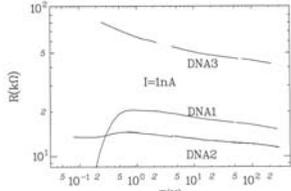
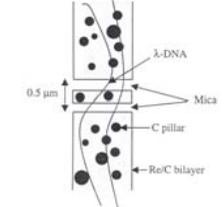
VI. Conclusion Générale

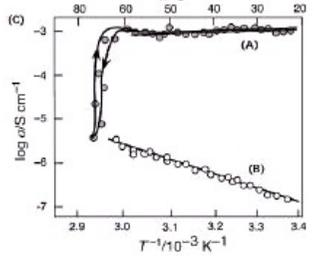
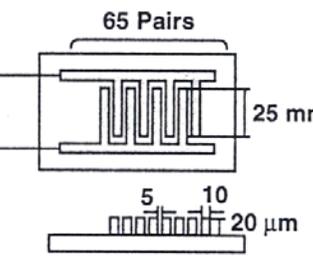
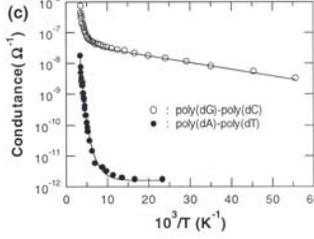
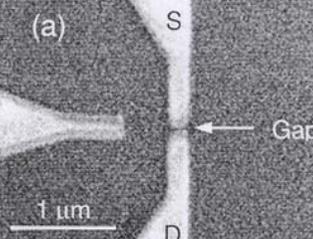
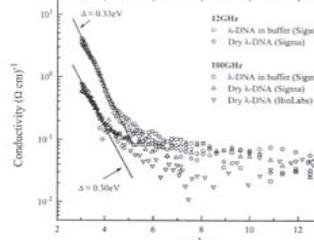
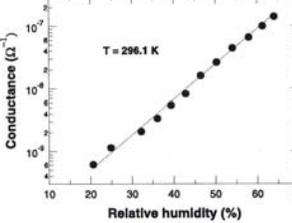
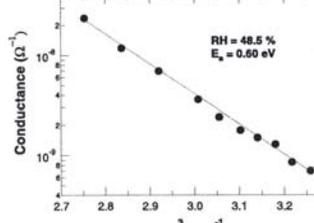
Ce chapitre présente la structure de la molécule d'ADN et ses principales caractéristiques (couche d'hydratation, contre ions, formation de phase condensée, ...).

Les techniques les plus courantes de dépôt d'ADN sur une surface sont ensuite présentées. Les étapes clés du dépôt d'ADN sont l'accrochage de la molécule sur le substrat, et le retrait du solvant. Suivant les techniques et le résultat recherché (ADN étiré ou au contraire non contraint sur le substrat) on cherche à minimiser ou à accentuer chacune des étapes. Du point de vue de la conduction l'objectif est d'assurer un bon empilement des paires de base.

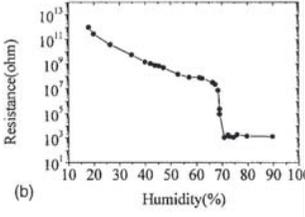
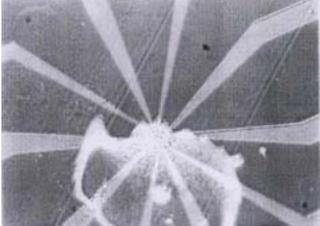
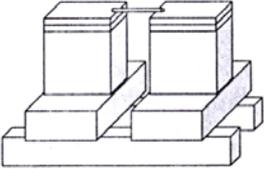
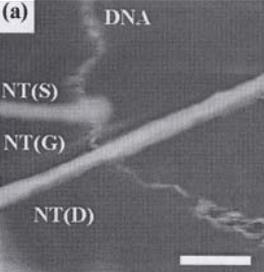
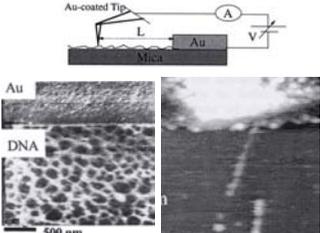
On termine ce chapitre par la présentation des mesures électriques effectuées sur l'ADN. Le consensus qui semble se dégager des mesures électriques est un comportement assez résistif de l'ADN.

Cependant les mesures de Kasumov [Kasumov 2001] [Kasumov 2002] et de Nakayama, Okahata et al. [Nakayama 2001] [Okahata 1998] donnent des résultats reproductibles. De plus, leurs résultats mettent en évidence une relation entre la structure de l'ADN et ses propriétés de conduction.

| | I(V) | Résistance | Type d'ADN | Dépendance par rapport à l'humidité relative | Dépendance par rapport à la température | Dispositif expérimental |
|--------------|--|---|--------------------|--|---|---|
| Fink | <u>ohmique</u> | ~1MΩ sur 600nm | ADN-λ | Mesure sous vide Dans un microscope à transmission | |  |
| Porath | Caractéristique <u>semi linéaire</u> avec une tension de seuil | ~1GΩ sur la partie linéaire de la courbe | Poly(dG). Poly(dC) | Sous vide et à l'air |  |  |
| Kasumov 2002 | | | ADN-λ | | |  |
| Kasumov 2001 | | 100kΩ pour un petit nombre de molécules (<10) sur 500nm | ADN-λ | |  |  |

| | | | | | | |
|---------------------|---|---|--|---|---|---|
| Okahata Nakayama | <u>ohmique</u> | De 400Ω à 20kΩ pour un grand nombre de molécules (~10 ⁹) sur 5μm | ADN sperme de saumon | Sous vide et à l'air |  |  |
| Yoo | <u>En S</u> Ils interpolent leur données par un sh(αV) | ~20MΩ pour le Poly(dG). Poly(dC) sur 40nm ~1GΩ pour le Poly(dA). Poly(dT) sur 40nm (~100 molécules) | Poly(dA). Poly(dT) Poly(dG). Poly(dC) | Sous vide et à l'air |  |  |
| Tran | $\sigma = 0.1 \text{ à } 10 (\Omega\text{cm})^{-1}$ | | ADN-λ | ADN en solution et ADN sec |  | Mesure d'absorption micro onde |
| Ha | <u>Ohmique</u> (4 points) <u>En S</u> (2 points) | ~20MΩ pour le Poly(dG). Poly(dC) en mesure 4 points sur 180nm 0.1 à 1GΩ en mesure 2 points sur 180nm sur Poly(dG).Poly(dC) | Poly(dA). Poly(dT) Poly(dG). Poly(dC) |  |  |  |

Chapitre I : Introduction

| | | | | | | |
|----------|--|---|--|---|--|--|
| Gu | <p><u>Ohmique</u> (RH>70%)</p> <p>En S (RH<70%)</p> | <p>De 1kΩ (RH>70%) à 100GΩ (RH<70%) Sur 10μm</p> | <p>Poly(dA). Poly(dT)</p> <p>Poly(dG). Poly(dC)</p> |  | |  |
| Rakitin | <p><u>Ohmique</u> avec et sans seuil</p> | <p>~1GΩ pour environ 1000 molécules sur 10μm</p> | <p>ADN-λ En présence ou non de cations Zn²⁺</p> | <p>Sous vide et à l'air</p> | |  |
| Watanabe | <p>Ils observent des <u>paliers</u> Avec une tension de seuil</p> | <p>~50MΩ pour une molécule sur 5nm</p> <p>~100MΩ pour une molécule sur 25nm</p> | <p>ADN sperme de saumon</p> | <p>A l'air</p> | |  |
| Cai | <p>Caractéristi-que <u>linéaire</u> et de <u>redressement</u> <u>Conducting</u> <u>AFM</u></p> | <p>~1GΩ pour 50nm à ~10TΩ pour 250nm</p> | <p>Poly(dA). Poly(dT)</p> <p>Poly(dG). Poly(dC)</p> | <p>A l'air</p> | |  |

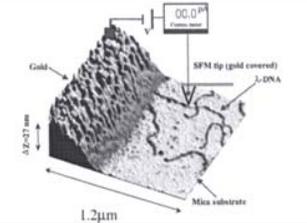
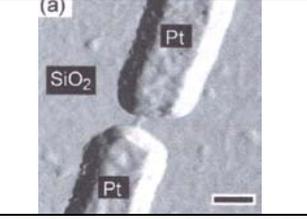
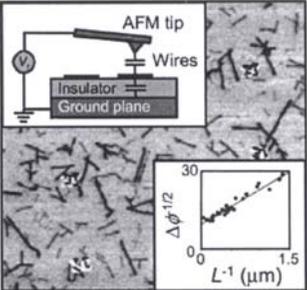
| | | | | | |
|----------|---|---|----------------------------|---------|---|
| De Pablo | Pas de courant mesuré ($I < 10^{-12} \text{A}$) | $R > 10 \text{T}\Omega$ | ADN- λ | A l'air |  |
| Storm | Pas de courant mesuré ($I < 10^{-12} \text{A}$) | $R > 1 \text{T}\Omega$ Pour une distance supérieure à 40nm | Poly(dG). Poly(dC) | |  |
| Bockrath | EFM ADN isolant | | ADN de différentes tailles | |  |

Tableau I.02 : Ce tableau regroupe les mesures électriques récentes effectuées sur l'ADN. Etude en fonction du taux d'humidité : Tran, Ha et Gu

Etude en fonction de la température : Yoo, Tran, Ha, Porath (la tension de seuil dépend de T mais pas le niveau de courant)

On notera la supraconductivité induite dans l'ADN pour les mesures de Kasumov.

D'après [Fink 1999] [Porath 2000] [Kasumov 2001] [Kasumov 2002] [Okahata 1998] [Nakayama 2001] [Yoo 2001] [Tran 2000] [Ha 2002] [Gu 2002] [Rakitin 2001] [Watanabe 2001] [Cai 2000] [Cai 2001] [De Pablo 2000] [Bockrath 2001] [Storm 2001]

Chapitre II

Techniques expérimentales

I. Introduction

Ce chapitre présente les techniques expérimentales que nous avons utilisées au cours de la thèse. On commence par présenter la microscopie champ proche et en particulier le microscope à force atomique (AFM). L'annexe A reprend en détail le fonctionnement de cet appareil.

On présente ensuite les méthodes de préparation de nos surfaces : fonctionnalisation chimique, dépôt de polymère, préparation de surface SiH, ... La caractérisation de ces surfaces a été faite par la détermination de leur énergie de surface. Nous avons également vérifié à l'AFM la hauteur des molécules greffées chimiquement sur la surface.

La préparation de l'ADN en solution ainsi que son observation au microscope à fluorescence sont décrites.

On terminera ce chapitre par les méthodes utilisées pour préparer des électrodes avec un espace inter électrode de l'ordre de 100nm sur une longueur de plusieurs microns.

II. Microscopie champ proche

II.1. Introduction

Dans les années 1980 est apparue une nouvelle génération de microscopes permettant d'obtenir des images d'une surface avec une résolution atomique. Le principe de ces techniques d'observation repose sur l'interaction entre une pointe de taille nanométrique et le substrat.

L'annonce de la résolution atomique sur des surfaces de silicium par Binnig et Rohrer [Binnig 1982] en microscopie à effet tunnel a plongé la communauté scientifique dans la perplexité. En effet, il était difficile de croire que l'interaction pointe surface soit si spécifique qu'elle permette une résolution de l'ordre de l'Angstrom. Néanmoins cette technique fut très vite adoptée et valut à ses inventeurs le prix Nobel en 1987. A peine vingt ans plus tard, la microscopie champ proche est largement utilisée dans le monde de la recherche et dans l'industrie. La technique a été développée en tirant parti de tous les types d'interaction (mécanique, électrique, magnétique, optique, ...) entre une pointe et une surface. A l'aide de cette méthode on peut non seulement observer la surface, mais aussi la modifier (manipulation d'atomes, de charges électriques, gravure, réaction chimique et électrochimique,...). Il y a potentiellement autant de microscopes réalisables qu'il y a d'interactions physiques.

II.2. Microscope à effet tunnel

Le premier microscope champ proche réalisé est le microscope à effet tunnel ou en anglais *Scanning Tunneling Microscopy (S.T.M.)*. Son principe repose sur l'effet tunnel connu depuis longtemps en mécanique quantique. Les électrons peuvent franchir la barrière isolante entre la pointe et la surface. En effet, les fonctions d'onde des électrons du substrat s'étendent au-delà de la surface et recouvrent partiellement les fonctions d'onde de la pointe métallique.

Les électrons ont par conséquent une probabilité non nulle de passer du substrat au métal et inversement. L'intensité du courant passant à travers cette jonction tunnel dépend exponentiellement de la distance entre la pointe et la surface. Typiquement le courant tunnel chute d'un facteur 10 lorsque la distance pointe-surface est augmentée d'1 Angström ($k \sim 1 \text{ \AA}^{-1}$).

$$I \propto I_0 \exp(-kd) \quad (\text{II.01})$$

Des céramiques piezo-électriques sont utilisées pour déplacer avec une précision d'une fraction d'Angström la pointe au-dessus de l'échantillon de telle sorte que le courant tunnel soit constant. L'image ainsi obtenue ne donne pas seulement la topographie de la surface, mais aussi une image de la densité électronique.

La dépendance très forte du courant tunnel en fonction de la distance à la surface a pour conséquence que seuls les quelques atomes à l'extrémité de la pointe contribuent de façon majeure au passage du courant, permettant ainsi d'atteindre la résolution atomique.

II.3. Microscopie à force atomique

La microscopie tunnel a ainsi ouvert une nouvelle voie dans le domaine de la science des surfaces qui n'a cessé de se développer depuis. En effet, à la vue des images résolvant la structure atomique du silicium, il était clair que la réalisation d'un microscope similaire pour des isolants était « à portée de main » [Quate 1994].

II.3.1. Le mode contact

Les premières tentatives utilisèrent la force répulsive entre la pointe (fixée à l'extrémité d'un levier souple) et la surface. On parle alors *d'AFM en mode contact*. L'observation de la périodicité atomique de cristaux ioniques (NaCl par exemple) a montré la faisabilité de cette technique [Quate 1994]. Ce résultat est remarquable sachant que la pointe a un diamètre de quelques dizaines de nm, c'est à dire environ cent fois plus grand que l'objet observé. Néanmoins, l'absence de défauts et de marche atomique sur de telles images montre qu'on n'a pas accès à la véritable résolution atomique. La pointe est sensible en quelque sorte l'arrangement cristallin.

Pour accéder à une véritable résolution atomique, il est nécessaire de réduire la taille de la pointe pour arriver à un petit groupe d'atomes. Pour que de telles pointes résistent, le levier doit être extrêmement souple, afin de réduire la force d'appui. Malheureusement, la présence de forces attractives à longue portée de type Van der Waals, ainsi que la pollution de la surface par une fine couche d'eau (toujours présente à moins de se placer sous ultra vide et de chauffer) qui attire la pointe par capillarité, provoque en général la détérioration de la pointe sur la surface rendant l'imagerie précise illusoire. Le moyen le plus simple qui s'est alors imposé est de plonger l'ensemble de la pointe et de l'échantillon dans l'eau (ou tout autre solvant). Les forces de Van der Waals sont alors fortement réduites. La résolution atomique sur une surface de calcite clivée a été obtenue dans ces conditions [Ohnesorge 1993]. On y voit clairement les défauts atomiques de la surface ainsi que des marches. On

notera qu'il est intéressant pour les biologistes de disposer d'un microscope capable d'imager dans des conditions physiologiques avec des leviers très souples qui n'endommagent pas l'échantillon [Henderson 1992].

II.3.2. Le mode non contact

Le mode contact présente un désavantage majeur : il est limitée aux surfaces inertes. En présence de surfaces réactives, des liaisons chimiques peuvent se former, de la friction peut apparaître¹, etc. L'idée a donc été de travailler loin de la surface sans la toucher et d'utiliser les forces attractives à longue portée. On parle alors ***d'AFM en mode non contact***. Ce mode est adapté pour les échantillons fragiles.

Pour détecter la surface sans la toucher, l'idée est d'utiliser les propriétés dynamiques d'un oscillateur (le levier et la pointe). La pointe est excitée mécaniquement pour vibrer à proximité de la surface. Les propriétés de l'oscillateur vont être modifiées par le gradient de la force d'interaction pointe / surface. On détectera ces modifications par un changement de l'amplitude, de la phase (entre celle de l'excitation et celle du levier) et/ou d'un décalage en fréquence. La résolution d'un tel mode est médiocre puisque la pointe oscille loin de la surface (10 à 100 nm) avec une amplitude d'environ 10nm. La détection de propriétés **électriques** ou **magnétiques** est en général inspirée de ce mode puisque ces interactions sont à longue portée et de forte intensité.

II.3.3. Le mode intermittent ou tapping

Entre le mode contact difficile à mettre en œuvre pour atteindre la résolution atomique, et le mode non contact de mauvaise résolution, un mode intermédiaire s'est imposé où la pointe vient taper la surface par intermittence. On parle de ***mode intermittent*** ou de ***mode Tapping***. La force moyenne exercée est environ 1000 fois plus faible qu'en mode contact (de l'ordre de 10pN). Ce mode est très intéressant car il est très simple à mettre en œuvre et permet de scanner des échantillons fragiles pour un résultat d'imagerie excellent. On atteint de manière routinière une résolution latérale de quelques nm. En revanche, atteindre la résolution atomique dans ce mode est impossible vu le traitement que subit la pointe. Un groupement de quelques atomes ne résisterait pas longtemps à des chocs répétés sur la surface.

II.3.4. Microscopie optique champ proche

Tous les modes présentés ci-dessus jouent sur le fait que la pointe se déplace de bas en haut par rapport à l'échantillon. En fait, il est également possible d'imager la topographie d'une surface sans la toucher en faisant osciller la pointe latéralement. Ce mode utilise les forces de cisaillement et de dissipation à l'approche de la surface. On notera qu'une bonne partie des forces a pour origine l'interaction avec la couche d'eau adsorbée. Néanmoins, si on enlève la couche d'eau adsorbée (sous ultra vide en chauffant), suivant le type de surface, on peut avoir de la dissipation et du cisaillement jusqu'à des distances d'environ 10nm ! [Courjon 2001] Si l'on se rapproche davantage, la pointe frotte directement sur la surface.

1. Cet effet peut être recherché pour différencier deux types de surface. On parle alors d'AFM en mode friction.

Ce *mode d'oscillation latérale* est utilisé en particulier en microscopie optique champ proche pour atteindre une résolution bien en dessous de la limite de diffraction. La pointe est composée dans ce cas d'une fibre optique. On rencontre ce mode sous le nom de SNOM (Scanning Near Optical Microscopy) dans la littérature.

II.3.5. AFM et STM ?

Le mode avec une oscillation latérale de la pointe est intéressant puisqu'on peut faire un microscope à la fois STM et AFM. La pointe oscille à hauteur constante. La hauteur de la pointe peut être ajustée soit par l'interaction entre la pointe et la surface, soit dans le cas où le substrat est conducteur par le courant tunnel. On notera que ce genre de mesures est impossible dans le cas du mode contact, non-contact et intermittent, puisque la pointe est soit trop proche, trop éloignée, ou les deux dans le cas du mode intermittent.

On peut craindre avec ce mode d'avoir à la fois un mauvais STM et AFM. En effet, l'oscillation latérale de la pointe limite évidemment la résolution latérale.

Cependant, comme dans le cas des autres modes la leçon que l'on peut tirer est que la résolution atomique peut être atteinte à condition que la partie qui interagit avec la surface soit composée de quelques atomes. La condition supplémentaire dans le cas d'une oscillation latérale est que l'amplitude d'oscillation de la pointe soit également de l'ordre de grandeur de la résolution que l'on veut atteindre. Une résolution excellente a été atteinte par Freitag [Freitag 2000] sur des nanotubes de carbone (l'oscillation latérale de la pointe sous l'effet d'un quartz taillé en forme de diapason est de quelques pm – figure II.12).

Détecter le mouvement d'une pointe qui oscille avec une amplitude inférieure au nanomètre est illusoire avec des méthodes optiques (les plus rencontrées en microscopie champ proche). En fait la détection directe du mouvement de la pointe n'est pas nécessaire [Courjon 2001]. Si l'oscillateur qui excite la pointe est suffisamment sensible, sa réponse fréquentielle va être modifiée. On détecte donc indirectement l'interaction entre la pointe et la surface.

II.3.6. Le renouveau du mode non contact

Récemment, la **résolution atomique** a été atteinte en **mode non contact** [Giessibl 1995] [Sugawara 1995], ce qui était a priori « impossible ». Les propriétés non linéaires de l'oscillateur en interaction avec la surface et les facteurs de qualité très importants atteints sous vide ($Q \sim 10^5$) rendent le système extrêmement sensible [Aimé 1999]. Mais là encore, il est nécessaire que l'extrémité de la pointe ne soit composée que de quelques atomes et que la pointe frôle la surface sans la toucher au cours de l'oscillation. Cela nécessite de se placer sous ultra vide pour ne pas être gêné par la couche d'eau adsorbée [Fukui 1999] [Maeda 1999].

II.4. Description de l'appareil

L'appareil est schématisé sur la figure II.01. Il est constitué d'un scanner, qui permet de faire bouger l'échantillon dans les 3 directions de l'espace à l'aide de céramiques piézo-électriques. L'amplitude de mouvement est de l'ordre de 1 à 100 μm suivant le type d'appareil.

Autres moyens de détection du mouvement de la pointe

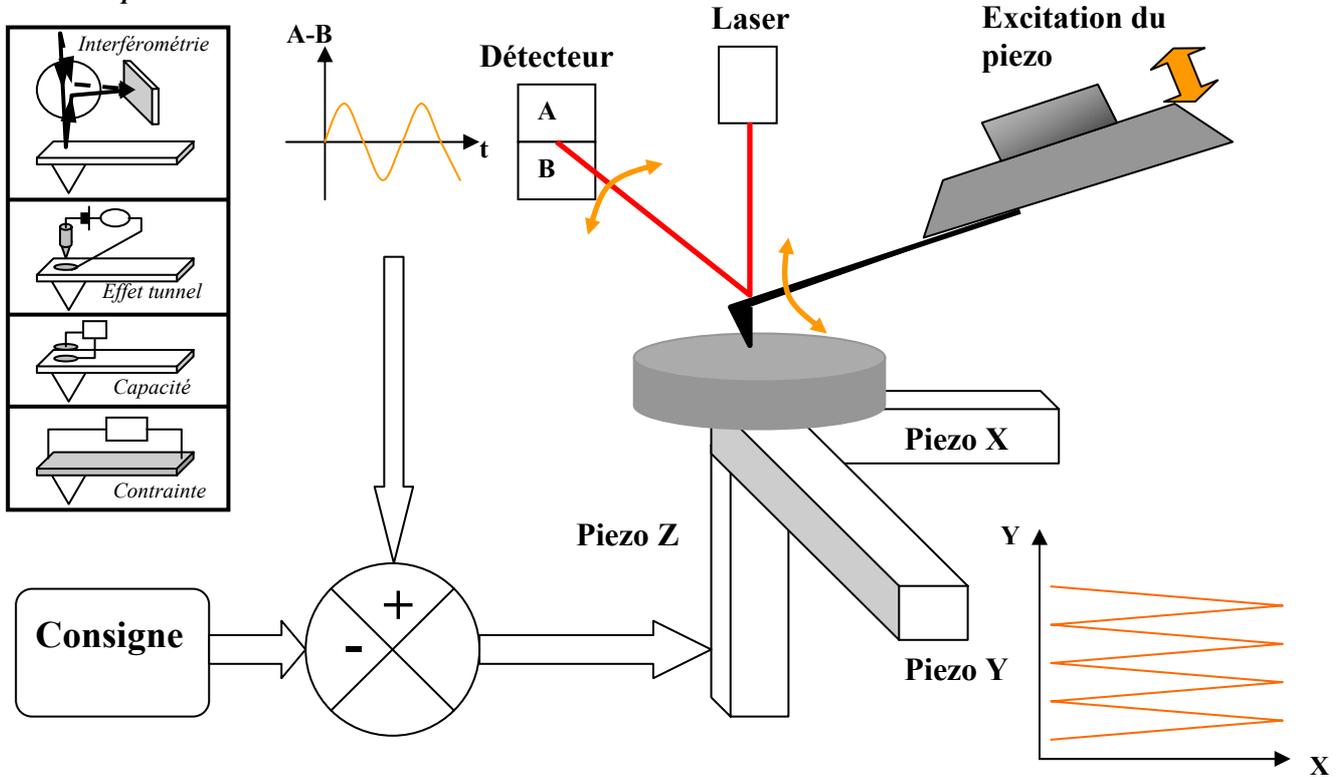


Figure II.01 : Principe de l'AFM. Des céramiques piezo-électriques servent à déplacer l'échantillon dans les 3 directions de l'espace. La surface de l'échantillon est scannée dans le plan Oxy en zig - zag. Le cantilever est composé d'un levier avec une pointe en son extrémité. Les déplacements du levier sont détectés par la réflexion d'un faisceau laser qui se réfléchit en son extrémité vers un détecteur. On représente dans les encadrés les différentes méthodes de détection du mouvement du levier. La technique la plus répandue est celle indiquée sur le schéma principal. Le signal ou une partie du signal reçu par le détecteur est comparé à un signal de consigne fixé par l'utilisateur. Le mouvement du piezo Z est ajusté de façon à minimiser la différence entre les deux signaux. L'appareil est représenté en mode oscillant. Le levier est excité à une pulsation proche de la résonance. Le signal recueilli par le détecteur est sinusoïdal. Dans le cas du mode contact, le cantilever n'oscille pas. Seule la flexion du levier est détectée.



La surface est scannée à l'aide d'une pointe très fine de quelques microns de haut et de rayon de courbure à l'extrémité (que l'on appelle l'apex de la pointe) de quelques dizaines de nm. Cette pointe est elle-même fixée à l'extrémité d'un levier (cf. figure II.02). L'ensemble constitue un cantilever. Sur l'appareil dont nous disposons (Nanoscope IIIa), la flexion du levier est détectée par un faisceau laser qui se réfléchit en son extrémité. Cette méthode de détection optique est la plus répandue.

Il existe d'autres moyens de détection du mouvement de la pointe : par effet tunnel, par méthode interférométrique, par méthode capacitive, par mesure de résistance dépendante de la contrainte... La détection interférométrique est très sensible mais plus complexe à mettre en œuvre. La détection par effet tunnel est de loin la plus sensible, mais elle nécessite une surface sur le cantilever en regard bien plane, sous peine d'imager des défauts de cette surface métallique. La méthode utilisée sur le Nanoscope IIIa (cf. figure II.01) est très précise et de loin la plus souple. Le gain en précision ne nécessite pas la perte de souplesse des autres méthodes. Là encore, il n'y a pas de limite aux méthodes de détection autre que l'imagination de l'expérimentateur.

L'excitation du levier se fait par l'intermédiaire d'une céramique piezo-électrique. La pointe est excitée à une fréquence proche de sa fréquence de résonance. Il existe d'autres modes d'excitation : par un champ magnétique (utile en phase liquide pour exciter sans perturbations parasites le levier, et récupérer une « belle » courbe de résonance) ou électrique oscillant, ...

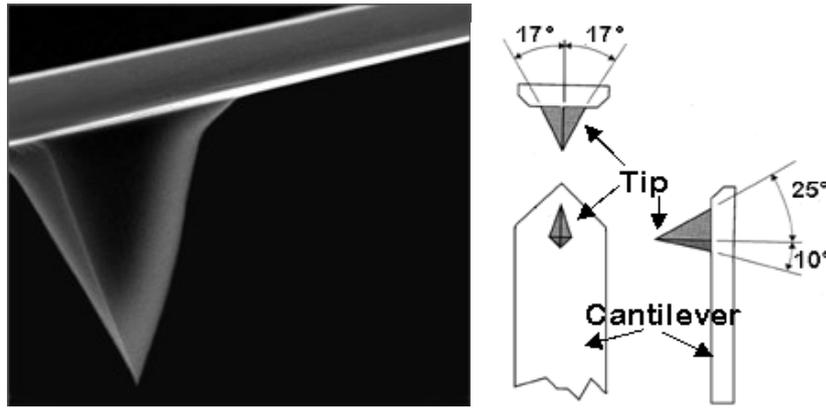
Le Nanoscope III permet d'imager à l'aide de plusieurs modes, expliqués en détail ci-dessous (mode contact, modes oscillants contact intermittent et non contact, mode lift, EFM...). On peut passer très facilement d'un mode à un autre.

II.4.1. Les pointes

Les cantilevers utilisés ont l'allure indiquée sur la figure II.02. Chaque pointe est prévue pour un mode distinct. Les paramètres pertinents (variant d'un type de pointe à un autre) sont la fréquence de résonance, la souplesse du levier, l'apex de la pointe, la résistivité électrique du matériau pour faire passer du courant (Conducting AFM) ou imposer un potentiel électrostatique (EFM).

La taille optimale de l'apex est de l'ordre de 5 à 10nm. En effet, en dessous de cette taille la pointe est très vite endommagée, au-dessus il y a une perte en résolution. Il y a également la possibilité d'utiliser des nanotubes de carbone dont la rigidité et la taille permettent d'obtenir une très bonne résolution [Dai 1996].

On peut trouver dans le commerce des pointes dont la raideur du levier peut varier de **0.01** à **100N/m**, avec une fréquence de résonance allant de **10kHz** à **600kHz**, suivant le type d'application. La figure II.02 donne des exemples de caractéristiques de cantilevers du commerce et leur usage. L'utilisation d'un cantilever pour une autre application que celle prévue n'est pas rédhibitoire. En effet, il est possible de modifier ou traiter des pointes pour les adapter à un usage particulier.



| Type de cantilever : application | AFM | EFM, Conducting-AFM |
|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Matériau | Silicium dopé n+ 0.01-0.025 Ωcm | Silicium dopé n+ Métallisé Pt/Ir |
| Raideur [N/m] | 20-100 | 1-5 |
| Fréquence de résonance [kHz] | 200-400 | 50-70 |
| Longueur [μm] | 120-130 | 250 |
| Rayon de l'apex [nm] | 5-10 | 5-20 |

Figure II.02 : Vue de l'extrémité du cantilever, et de ses dimensions caractéristiques. Le levier est fixé à un ensemble plus gros de quelques mm de côté qui permet de manipuler facilement la pointe et d'en changer par un minimum d'opération. Le tableau indique les dimensions caractéristiques des cantilevers les plus utilisés pour les applications courantes : AFM, EFM, Conducting-AFM.

II.5. Description des différents modes

Cette partie est consacrée à expliquer l'interaction entre la pointe et la surface, et comment on peut se servir de cette interaction pour former une image AFM. L'objectif principal est de comprendre l'origine d'éventuels artefacts dans l'imagerie (effet de la dissipation, présence d'une couche d'eau,...). On présente ensuite comment utiliser l'AFM pour sonder les propriétés électriques et électrostatiques d'objets posés sur la surface.

II.5.1. Description de l'interaction pointe surface

II.5.1.1. Courbe d'approche retrait

L'interaction pointe surface va être à l'origine de la diminution de l'amplitude d'oscillation lorsqu'on approche la pointe de la surface même lorsque la force est attractive ! Les courbes d'approche – retrait renseignent sur la nature de l'interaction avec la surface. A la limite elles donnent une cartographie de la force perpendiculairement à l'échantillon. C'est pour cette raison qu'on les présentera pour chaque type de mode.

Les courbes d'approche – retrait ne permettent pas forcément de déduire quantitativement l'interaction entre la pointe et la surface. En effet dans le cas où la pointe oscille perpendiculairement à l'échantillon, le champ de force « vu » par la pointe au cours de son oscillation est fortement inhomogène (figure II.06). La force est la plus importante lorsque la pointe se trouve à proximité de la surface. La conséquence est qu'on a alors un comportement fortement non linéaire avec une hystérésis de l'amplitude et de la phase entre l'approche et le retrait de la surface (figure II.07).

Dans le cas où l'oscillation de la pointe est latérale, la situation est beaucoup plus simple car la pointe reste à altitude constante. Les équations restent linéaires. Dans ce cas les courbes d'approche – retrait permettent de remonter à la force que subit la pointe. On peut réellement faire une cartographie en volume de la force. L'inconvénient est qu'on accède uniquement à la force latérale.

On peut tout de même observer un phénomène d'hystérésis dans le cas où l'échantillon se déforme ou bien si il y a une fine pellicule d'eau sur l'échantillon qui va attraper par capillarité la pointe. On peut rechercher à faire osciller la pointe dans la couche d'eau ou au contraire l'éviter suivant les applications.

II.5.1.2. Mode contact

Le principe du mode contact est d'utiliser la flexion de la poutre du cantilever pour balayer la surface. Lorsque le levier touche la surface il fléchit et dévie d'autant le faisceau laser.

La courbe d'approche – retrait représentée sur la figure II.03 renseigne sur les propriétés mécaniques de la surface. La pointe peut indenter la surface pour des échantillons « mous ». L'indentation peut être définitive ou réversible suivant le matériau. Dans les conditions usuelles, la surface est recouverte par une fine couche d'eau. Il peut y avoir d'autres solvants ou impuretés, mais en général il s'agit d'eau. Une fois la pointe en contact avec le liquide, la force de capillarité a tendance à attirer la pointe vers la surface.

Cette courbe permet de calibrer le déplacement en Z de la pointe avec le signal reçu par le détecteur. La raideur de la poutre permet alors de remonter à la force d'appui sur la surface.

On notera que la force d'adhésion dans le vide (donc sans couche d'eau adsorbée sur la surface) peut être importante au moment où la pointe touche la surface, surtout si les deux surfaces sont identiques (1000nN pour une pointe en silicium sur une surface de silicium). L'énergie de surface dans le vide peut être 10 fois supérieure à celle avec la présence d'une couche d'eau ($\gamma_{\text{vide pointe surface}} \sim 1 \text{Nm}^{-1}$). La pointe aura tendance à rester collée sur la surface.

II.5.1.3. Modes oscillants

L'objectif de cette partie est de comprendre comment l'interaction de la pointe avec la surface modifie l'oscillation de la pointe. Nous verrons dans la partie (II.4.2.) comment on peut appliquer ces résultats pour interpréter les images AFM.

L'annexe A reprend en détails les résultats de cette section.

II.5.1.3.1. Oscillateur harmonique

On rappelle rapidement dans cette section quelques résultats sur l'oscillateur harmonique. Un exemple typique d'oscillateur harmonique est une masse suspendue à un ressort. L'équation de l'oscillateur harmonique est rappelée ci-dessous (II.02). ω_0 est la fréquence de résonance, Q le facteur de qualité, et f l'amplitude de la force d'excitation. L'amplitude et la phase (par rapport à l'excitation) de l'oscillateur dépendent de la fréquence. Elles sont représentées sur la figure II.04.

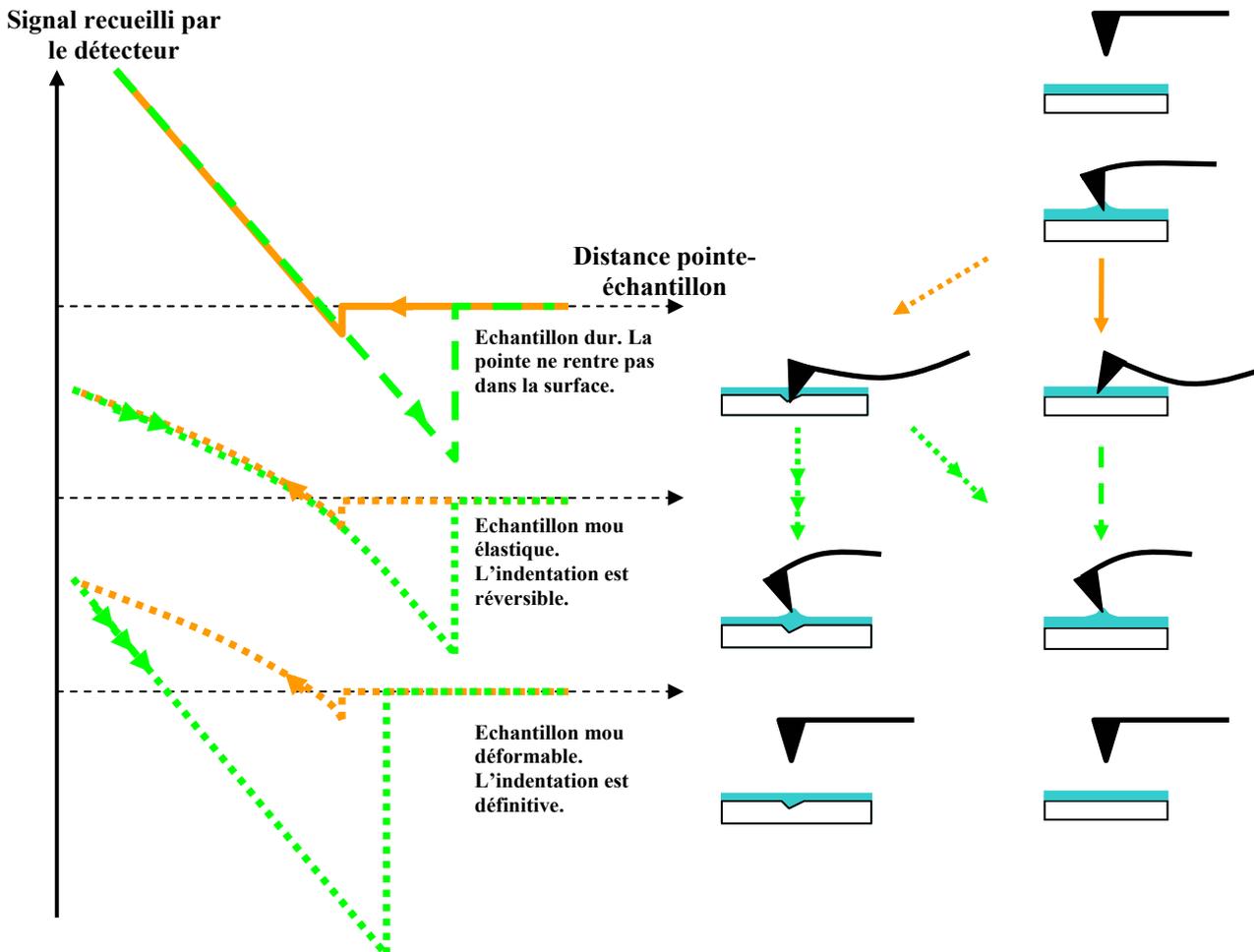


Figure II.03 : Courbe d'approche-retrait en mode contact. Ces courbes sont obtenues expérimentalement en rapprochant puis en retirant la pointe de la surface. La fine couche d'eau qui recouvre l'échantillon attire la pointe, cet effet étant plus marqué lors du retrait de la pointe qu'à l'approche. La pointe peut indenter des échantillons mous de manière réversible ou définitive. Un phénomène d'hystérésis est alors observé.

L'effet d'une force dissipative ou d'une force élastique sur la courbe de résonance est de provoquer respectivement un écrasement de la courbe de résonance et un décalage en fréquence.

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{\omega_0}{Q} \frac{dx}{dt} + \omega_0^2 x = \frac{f}{m} \cos(\omega t) - \alpha \frac{dx}{dt} - \beta x \quad (\text{II.02})$$

Force
dissipative

Force
élastique

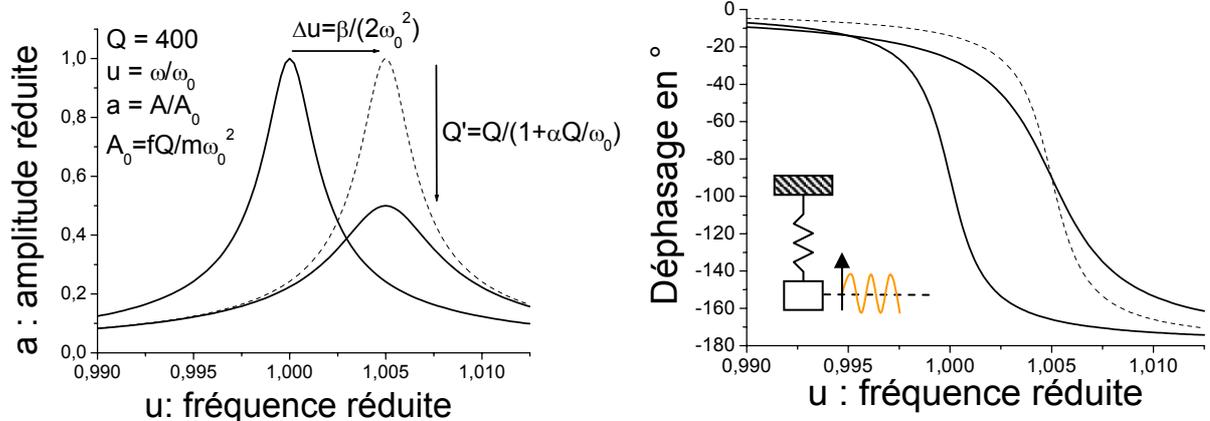


Figure II.04 : Courbe de résonance de l'oscillateur harmonique en amplitude et en phase (le facteur de qualité vaut 400). Les courbes sont tracées en amplitude et en fréquence réduite. L'expression du déphasage et du nouveau facteur de qualité sont données sur la figure.

II.5.1.3.2. Cas de l'oscillation verticale

Nous allons modéliser le système pointe levier par un oscillateur harmonique. On n'est pas en toute rigueur dans ce cas. On peut par exemple avoir deux pics de résonances proches, ou un anti-résonance à proximité de la résonance,... Nous traitons dans cette partie le cas idéal d'un oscillateur harmonique. Il est possible de se rapprocher expérimentalement de ce cas suivant le type d'oscillation (excitation magnétique > excitation par piezzo).

Le facteur de qualité des cantilevers du commerce est de l'ordre de 100 à 1000 dans l'air. Par conséquent la courbe de résonance est très piquée (comme sur la figure II.04). Le cantilever n'est sensible qu'au phénomène dont la fréquence est proche de la fréquence de résonance.

La force qui s'exerce entre la pointe et la surface a l'allure typique donnée par la figure II.05. La force est attractive puis répulsive quand on touche la surface. Les forces d'interaction sont de différentes natures. Il y a la force de Van der Waals qui est attractive et agit à longue distance. Cette force a une intensité typique de quelques nN. Lorsqu'on touche la surface, on a une force répulsive. Le modèle de Hertz [Burnham 1993] donne une dépendance en loi de puissance de l'indentation (équation II.04). Cette force répulsive

augmente très rapidement en fonction de l'indentation. Son intensité est de l'ordre de 100nN. Enfin, on a des forces d'adhésion dont on a déjà parlé pour le mode contact. Cette force est liée aux énergies de surface de la pointe et de la surface. Parmi les forces d'adhésion on peut rajouter la force capillaire entre la fine pellicule d'eau généralement adsorbée sur le substrat et la pointe. Cette force présente une hystérésis (cf. figure II.06) entre l'approche de la pointe et le retrait. Cette hystérésis est à l'origine d'une dissipation d'énergie. Au cours de l'oscillation de la pointe, l'énergie dissipée est de l'ordre de 100eV par période [Cleveland 1998].

Au cours de l'oscillation la pointe va donc subir une force variable. Elle est la plus importante lorsque la pointe touche la surface. La figure (II.05) donne l'allure de la force en fonction du temps.

Le levier n'est sensible qu'à la composante de Fourier de la force dont la pulsation est proche de sa fréquence de résonance. On peut ainsi négliger tous les autres harmoniques [Tamayo 1999]. On peut grâce à cette approximation calculer le décalage en fréquence et l'amortissement en fonction des composantes de Fourier d'ordre 1 de la force.

Les expressions du décalage en fréquence et de l'amortissement sont données ci-dessous (II.06) (II.07). $k=m\omega_0^2$ est la raideur du levier, F_1 et F'_1 sont les coefficients de Fourier d'ordre 1 de la force. On peut déduire de ces deux formules toutes les autres (II.08) (II.09) (II.10). Pour un développement plus complet de cette partie on réfère le lecteur à l'annexe A.

(II.03) $F_{\text{Van der Waals}} = -\frac{HR}{6D^2} \approx 0.05\text{nN}$ ($D = 3\text{nm}$)
 (Modèle sphère - plan)
 (avec $H = 20^{-20}\text{J}$)

(II.04) $F_{\text{contact}} = K\sqrt{RD}^{1.5} \approx 100\text{nN}$
 (avec $K \approx 100\text{GPa}$)

(II.05) $F_{\text{capillaire}} = -2\pi R\gamma \approx -1-10\text{ nN}$
 (avec $\gamma \approx 0.1\text{Nm}^{-1}$)

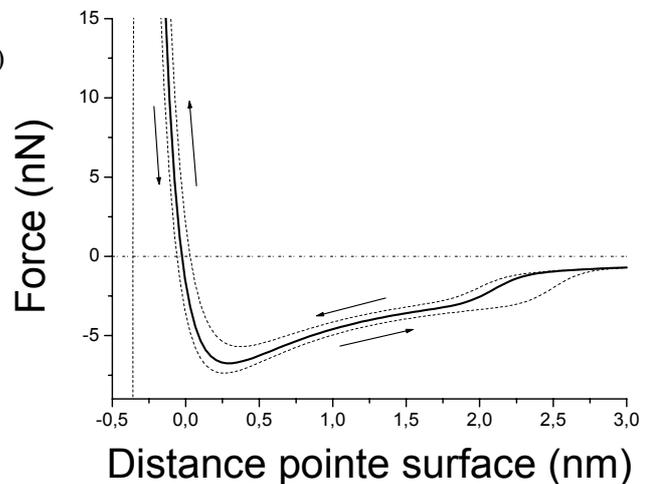


Figure II.05 : Allure de la force entre la pointe et la surface en trait plein. Les courbes en pointillées correspondent au cas dissipatif. L'aire entre la courbe à l'aller et au retour donne l'énergie dissipée (de l'ordre de 100eV). Les forces de frottements viscoélastiques ainsi que la déformation plastique du substrat sont à l'origine de la dissipation. L'interaction pointe surface est attractive à longue distance (force de Van der Waals) et répulsive lorsque l'on touche la surface. La présence d'une fine pellicule d'eau peut rajouter une force attractive supplémentaire lorsque la pointe est attirée vers la surface par capillarité, ainsi qu'une dissipation supplémentaire puisque il y a une forte hystérésis entre l'aller et le retour. La pointe reste capturée plus longtemps au retour.

L'ordre de grandeur des forces mises en jeu est indiqué. H est la constante de Hamaker, K est le module d'Young réduit de la surface et de la pointe. La force de contact est obtenue à partir du modèle de Hertz. R est le rayon de la pointe. γ est l'énergie de surface. La force de Van der Waals est plus faible en présence d'une fine couche d'eau (interaction électrostatique plus faible dues à la forte constante diélectrique de l'eau).

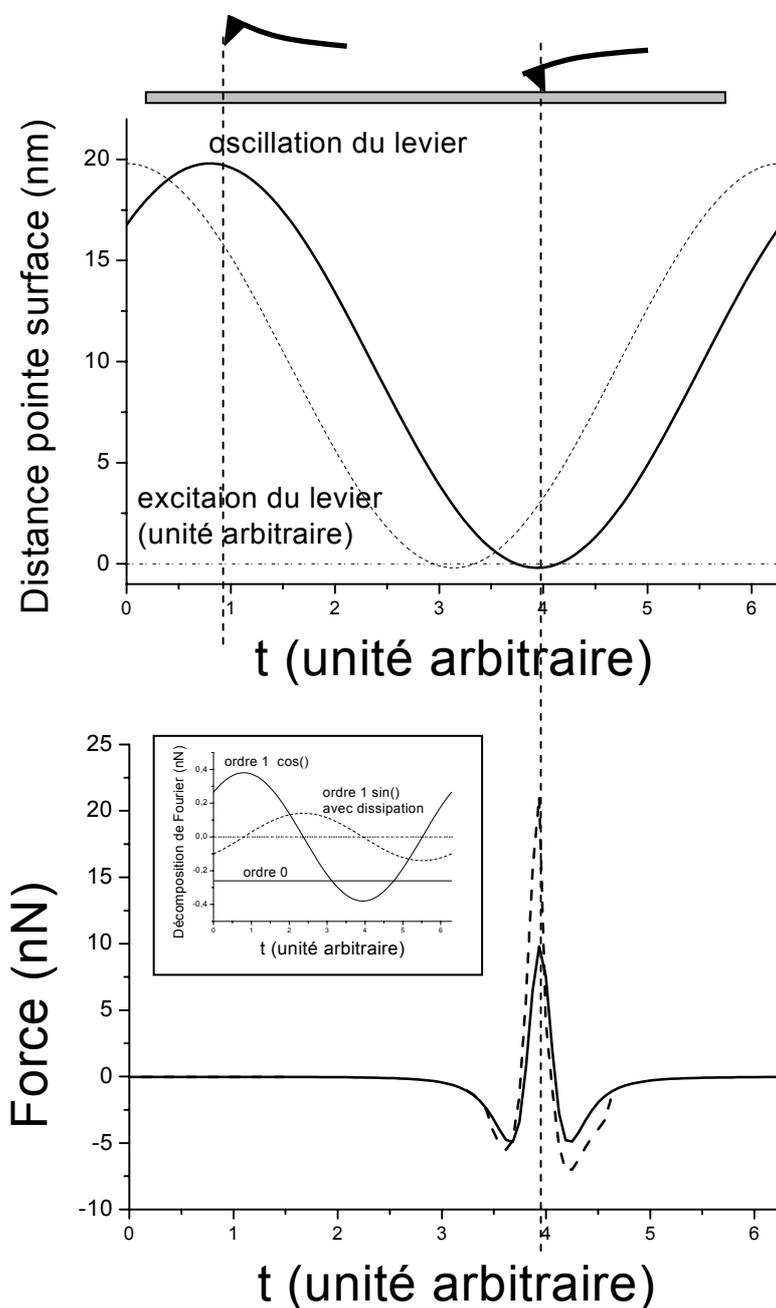


Figure II.06 : La figure du dessus donne l'oscillation du piezo qui excite le cantilever (en pointillé), ainsi que la position de la pointe (trait plein). On voit le déphasage entre les deux. La courbe du bas représente la force qui s'exerce sur la pointe avec (pointillé) et sans (trait plein) dissipation. La force ne s'exerce que pendant un temps très court. Elle est en phase avec l'oscillation du cantilever. On représente également en insert la première harmonique et le terme constant de la décomposition de Fourier de la force. L'harmonique d'ordre 1 en $\sin()$ est nul quand il n'y a pas de dissipation. On remarquera l'asymétrie entre l'approche et le retrait dans le cas de force dissipative. On remarquera que malgré la très forte non linéarité des forces de contact, la pointe a toujours un mouvement sinusoïdal. Le levier n'est pas sensible aux termes de la force d'ordre supérieur

La formule (II.08) correspond au décalage en fréquence dans le cas où l'amplitude d'oscillation est faible, ou bien si on est loin de la surface ou la force varie lentement en fonction de la distance. On se place dans ces conditions pour faire de l'EFM (Electrostatic Force Microscopy). Ce point sera développé plus loin dans la partie (II.4.1.2. EFM).

Les deux dernières formules (II.09) et (II.10) donnent une expression de la dissipation et du décalage en fréquence [Cleveland 1998] en fonction de l'amplitude et de la phase de l'oscillateur. φ est le décalage en phase.

$$\Delta u \approx -\frac{F_1}{2ka} \quad \text{avec} \quad \begin{cases} k = m\omega_0^2 \\ F_1 = \frac{2}{T} \int_0^T \cos(\omega t) F(d_{\text{point e/surface}}(t)) dt \end{cases} \quad (\text{II.06})$$

$$Q' \approx \frac{Q}{1 + \frac{F_1 Q}{ka}} \quad \text{avec} \quad F_1 = \frac{2}{T} \int_0^T \sin(\omega t) F(d_{\text{point e/surface}}(t)) dt \quad (\text{II.07})$$

Il faut bien comprendre que les formules du décalage en fréquence et de l'amortissement de l'oscillateur en présence de l'interaction avec la surface sont fortement non linéaires. L'amplitude et la phase en fonction de la fréquence ne donne plus les courbes caractéristiques de la figure II.04 (i.e. courbe en cloche pour l'amplitude). Sous l'effet de l'interaction avec le substrat les courbes d'amplitude et de phase sont fortement déformées. La déformation dépend de l'amplitude d'oscillation du levier (cf. figure II.07).

$$\Delta u = -\frac{1}{2k} \left(\frac{dF}{dx} \right) \quad \text{Loin de la surface ou pour une faible amplitude} \quad (\text{II.08})$$

| | |
|---|---|
| $\frac{E_d Q}{k\pi A_0^2 a} = -(\sin(\varphi) + au)$ | Energie dissipée en fonction de u et φ . (II.09) |
| $\Delta u = -\frac{1}{2} \left(u^2 + \frac{\cos(\varphi)}{Qa} - 1 \right)$ | Décalage en fréquence en fonction de u et φ . (II.10) |

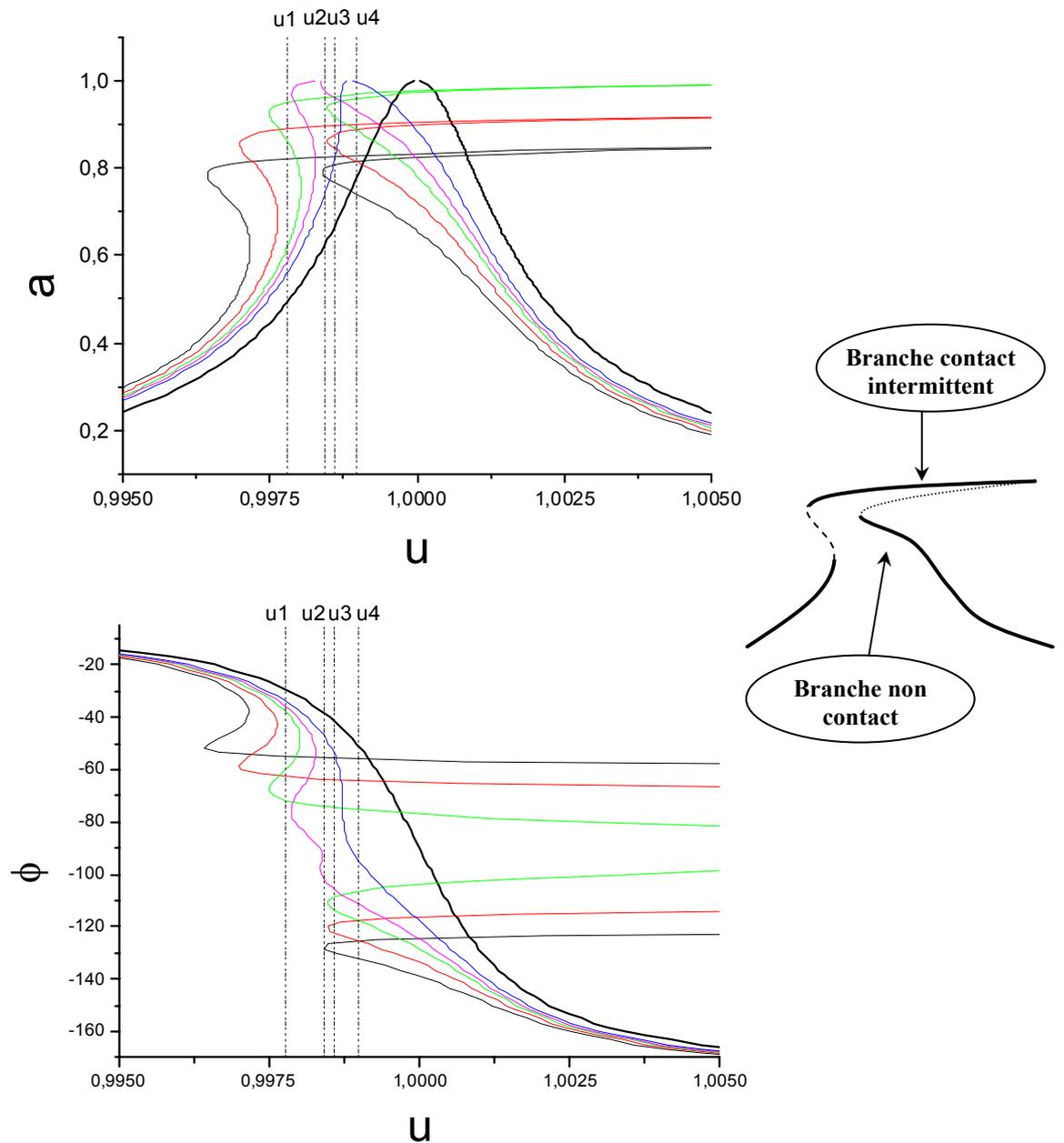


Figure II.07 : Déformation de la courbe de résonance et de phase dans le cas d'une force attractive loin de la surface et répulsive au contact de la surface. Le sommet de la courbe est décalé vers les hautes fréquences, et le reste de la courbe plus ou moins décalée vers les basses fréquences. Le décalage en fréquence dépend essentiellement de la distance minimale entre la pointe et la surface ainsi que de l'amplitude d'oscillation à la puissance $-3/2$ (cf. annexe A). Cela implique que plus l'amplitude est faible, plus le décalage augmente (i.e. A diminue). On indique à droite la branche où la pointe touche la surface et la branche non contact où la pointe interagit avec la surface sans la toucher (les branches instables sont en pointillé). Ces courbes ont été obtenues à partir d'un potentiel répulsif à courte distance et attractif à longue distance (cf. Annexe A).

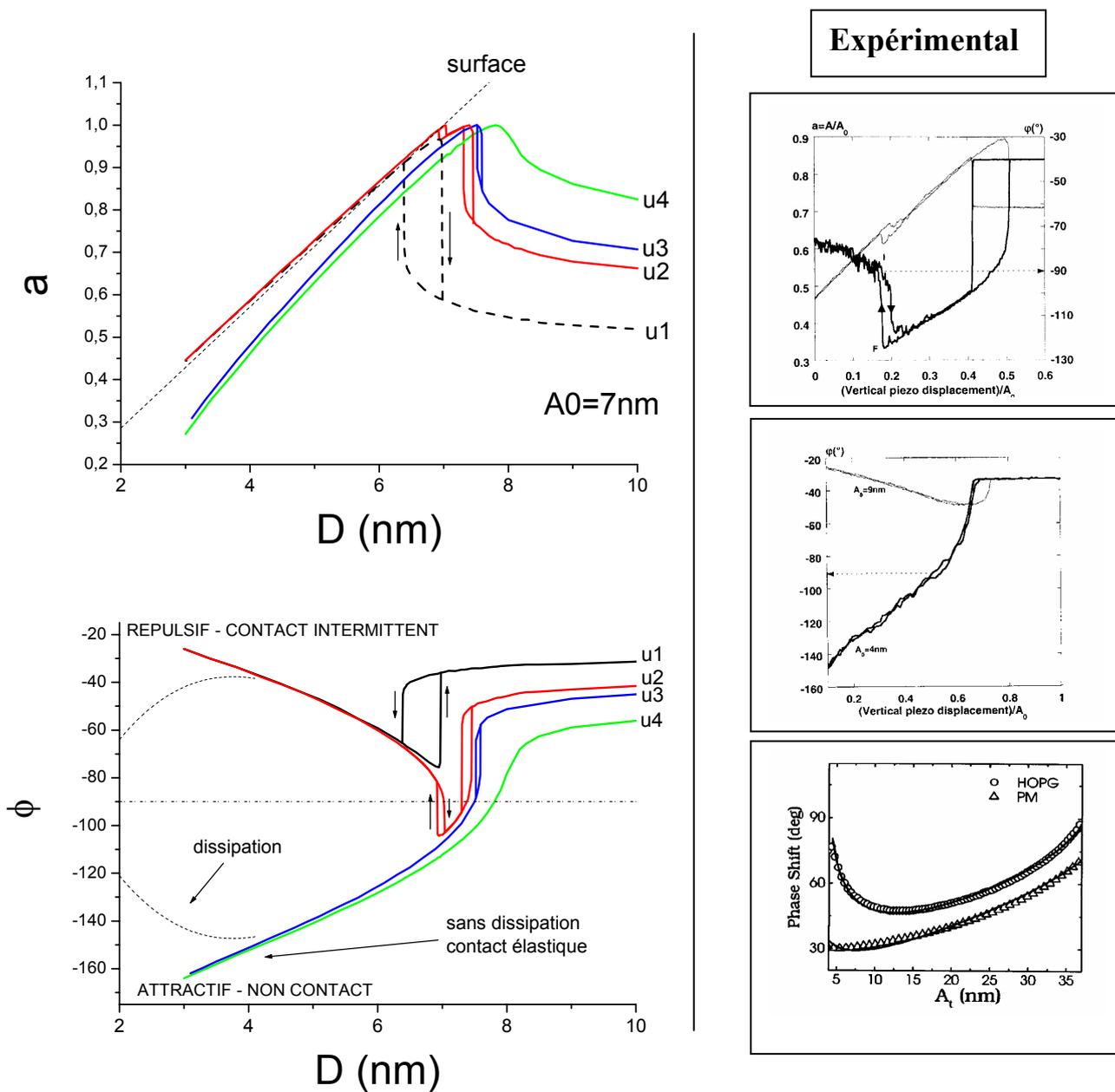


Figure II.08 : Courbes d'approche-retrait théoriques (à gauche) et expérimentales (à droite) pour différentes fréquences de travail. La courbe du dessus a été obtenue sur une surface de silicium, celle du dessous sur une surface de mica [Nony 1999] et la troisième sur du graphite (carré) et sur une membrane (triangle) [Tamayo 1998]. Les comportements observés sont très variés. On peut distinguer deux régimes : attractif et répulsif. Dans le cas d'une force attractive, la seule façon pour le levier de se rapprocher de la surface sans la toucher alors que la force est attractive est d'être en opposition de phase (i.e. $\phi < -90^\circ$). La surface est représentée en pointillée pour la courbe du haut $a=f(D)$. On peut ainsi distinguer clairement le cas où la pointe touche la surface (cas u_1) du cas non contact (u_3 et u_4).

On peut tirer un certain nombre d'observation des figures II.07 et II.08. :

- On peut constater sur la figure II.07 que le décalage en fréquence augmente lorsque l'amplitude d'oscillation diminue [Hölsher 1999]. Ce résultat est démontré en annexe A. On peut l'expliquer simplement par le fait que pour une amplitude faible, la pointe reste plus longtemps au voisinage de la surface lorsqu'elle est au bas de son oscillation. Par conséquent la force agit pendant un temps plus long. Le coefficient de Fourier F_1 est alors plus important. On a donc un décalage plus important.

- On déduit des courbes de résonance déformées de la figure II.07 les courbes d'approche – retrait de la figure II.08 pour différentes fréquences (cf. Annexe A) [Haugstad 1998]. Expérimentalement la fréquence est fixée pendant l'acquisition de ces courbes. On peut constater que nos courbes théoriques rendent compte de résultats expérimentaux de la littérature [Nony 1999] [Tamayo 1998].

- On observe un certain nombre de comportements sur ces courbes que l'on retrouve quand on fait de l'imagerie. Tout d'abord, l'amplitude d'oscillation peut diminuer sans que la pointe ne touche la surface ! Cela correspond aux courbes qui ne touchent pas la droite en pointillé sur la figure II.08. La seule façon d'expliquer ce comportement est que la pointe oscille en opposition de phase par rapport à l'excitation. On peut constater en effet que la phase est dans ces cas inférieure à -90° .

Dans le cas où la pointe touche la surface on peut constater que l'indentation est relativement faible [Nony 1999] et la phase est supérieure à 90° . L'excitation donne de l'énergie à la pointe.

- Un dernier comportement très courant est la variation de la phase sous l'effet de la dissipation (cf. figure II.08) alors que l'amplitude est à peine affectée. On peut constater dans de telles situations tout l'intérêt de la phase qui voit des choses que l'amplitude ne voit pas.

La dissipation tend à rapprocher la phase de -90° . Ce comportement peut s'expliquer de la façon suivante. La dissipation provoque un abaissement du facteur de qualité. Or comme le montre la figure II.08, la courbe de phase se rapproche alors de -90° [Behrend 1999].

On présente dans la partie suivante le cas de la pointe qui oscille latéralement. Dans ce cas le traitement théorique est beaucoup plus simple.

II.5.1.4. Mode oscillation latérale

Contrairement au cas de l'oscillation verticale de la pointe, l'oscillation horizontale donne un comportement linéaire. Les courbes de résonance de l'oscillateur sont décalées et amorties sans déformation supplémentaire comme le montre la figure II.09. Nous allons voir dans la section suivante (II.4.2.) comment obtenir des images en utilisant les propriétés de ces systèmes oscillants à proximité d'une surface.

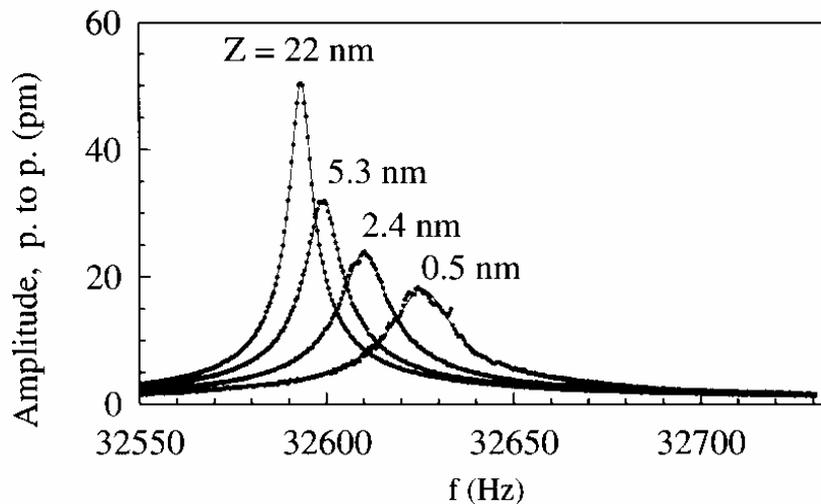


Figure II.09 : Déformation des courbes de résonance lorsque la pointe qui oscille latéralement se rapproche de la surface [Coutjon 2001]. On voit clairement le décalage en fréquence ainsi que l'amortissement des courbes. L'obtention de chacun des spectres peut se faire très rapidement. On peut ainsi séparer très précisément la composante dissipative (diminution du maximum) et élastique (décalage en fréquence) [James 2001].

II.5.2. Application à l'imagerie

II.5.2.1. Principe

Le principe pour obtenir une image d'une surface est comme dans le cas du STM de fixer une valeur de consigne et d'ajuster la hauteur de l'échantillon pour que la valeur mesurée coïncide avec la valeur de consigne. Dans le cas du STM, la valeur que l'on mesure et que l'on ajuste (en déplaçant l'échantillon verticalement) est le courant.

On présente pour chaque type de mode quelle est la valeur qui est maintenue constante.

II.5.2.2. Mode contact

L'image est obtenue en ajustant la hauteur de l'échantillon à tout moment pour conserver la déflexion du faisceau laser constante. Les 3 coordonnées X , Y et Z de l'échantillon sont enregistrées, et donnent une image tridimensionnelle de la surface.

Les gains en mode contact peuvent être fixés à une valeur importante de l'ordre de 1 à 5 pour le Nanoscope IIIa.

Généralement comme l'indique le nom de ce mode, on image la surface en la touchant. Néanmoins, il est possible de l'imager en mode attractif. Dans ce cas, l'image est instable puisque la pointe si elle est attirée par capillarité du ménisque de liquide peut décrocher de la surface. Avec les cantilevers que nous avons utilisé qui sont assez rigides, nous ne pouvons pas imaginer en mode attractif.

Dans le cas du mode contact les informations accessibles sont non seulement la hauteur de la pointe, mais on peut également avoir accès à la torsion de la poutre. On mesure ainsi la friction de la pointe sur la surface [Woon 1998].

II.5.2.3. Tapping mode

En mode dit tapping, la hauteur de l'échantillon est adapté à tout instant pour garder l'amplitude d'oscillation à une valeur choisie par l'opérateur. En d'autres termes la boucle de rétroaction va minimiser l'erreur entre l'amplitude mesurée et la consigne imposée par l'opérateur (cf .figure II.10).

Bien que l'on parle de mode tapping, rien n'empêche de travailler sur une branche de la courbe de résonance où la pointe ne touche pas la surface. Ainsi le mode dit tapping n'implique pas forcément un contact intermittent avec la surface. Cependant on évitera toujours de travailler sur la branche non contact, d'autant plus que plusieurs états sont possibles au dessus de la fréquence de résonance ($u > 1$). On travaille donc en dessous de la résonance. Bien entendu, si la composante attractive de la force est importante, on peut avoir des instabilités des deux cotés du pic (cf. figure II.08).

Expérimentalement nous avons constaté une dérive de la courbe de résonance au cours de certaines images. Ce n'est pas systématique. Ainsi même en ayant choisi au départ une fréquence de travail inférieure à la fréquence de résonance, on peut se retrouver avec le décalage du pic du coté droit du pic. Dans ce cas les images sont instables. Pour résoudre ce problème il y a deux stratégies. Dans ce cas le fait d'augmenter l'amplitude d'oscillation améliore la stabilité de l'image. Cependant la meilleure chose à faire est de se replacer du coté gauche du pic (mode « sweep » sur Nanoscope IIIa).

Il y a plusieurs explications à ce décalage en fréquence. Le contact entre le cantilever peut modifier légèrement la courbe de résonance. Deuxièmement, la courbe de résonance de la pointe faite loin de l'échantillon est décalée vers les hautes fréquences par rapport à celle faite très proche de la surface (de l'ordre de 100nm). Troisièmement, il peut y avoir des dérives thermiques. Dans ce cas l'appareil se stabilise au bout d'un certain temps de l'ordre de l'heure,...

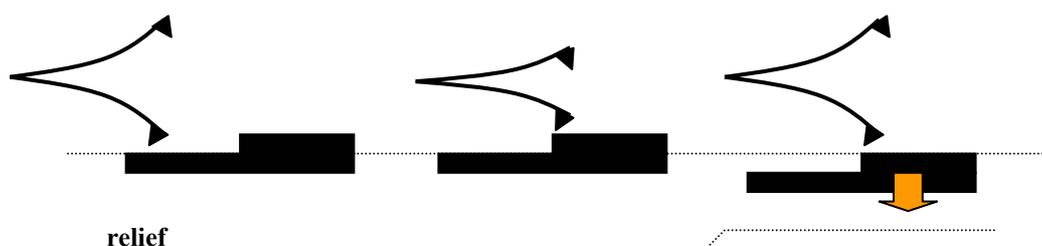


Figure II.10 : Principe de l'imagerie en tapping mode. La pointe oscille au-dessus de la surface. La hauteur de l'échantillon est ajustée afin de maintenir l'amplitude d'oscillation constante. On peut constater qu'au moment de rencontrer l'obstacle l'amplitude diminue pendant un court instant avant de revenir à la valeur de consigne. La boucle de rétroaction n'est pas parfaite.

La figure ci-dessus illustre la boucle de rétroaction. On voit que l'erreur entre la valeur de consigne et l'amplitude n'est pas strictement nulle. Sur Nanoscope IIIa, il est possible de modifier les gains de la boucle pour la rendre plus ou moins réactive. Si elle est trop sensible le risque est d'amplifier certaines composantes du bruit et d'obtenir des oscillations parasites. La vitesse à laquelle la pointe parcourt la surface ne doit pas être trop importante : de l'ordre du μm par seconde (en pratique nous n'avons pas dépassé $6\mu\text{m/s}$). Nous avons utilisé des

gains de la boucle de rétroaction assez faibles. Cette configuration nous a donné les images les plus propres.

II.5.2.4. Tapping mode deflection

Dans toute la présentation ci-dessus, on a négligé la déflexion moyenne du levier. Cet effet est faible puisque le déplacement moyen est de l'ordre de grandeur de l'amplitude d'oscillation divisé par le facteur de qualité (de 100 à 1000 fois plus faible pour un facteur de qualité $Q \sim 100$ à 1000). Le tapping mode deflection se situe entre le mode contact et tapping. La pointe oscille, mais on détecte la déflexion moyenne de l'échantillon. L'image est obtenue en maintenant la déflexion moyenne de la pointe constante. En particulier, si on annule l'oscillation du levier, on se retrouve dans une configuration de mode contact. On rappelle la formule de la déflexion moyenne x_0 en fonction de F_0 (*coefficient de Fourier de la force au premier ordre. C'est la moyenne de la force que subit la pointe au cours de son oscillation*) : $F_0 = k x_0$. F_0 est en général très faible par rapport à la force en mode contact (la force est divisée par un facteur de l'ordre de $Q \sim 100-1000$. Cf. Annexe A). En effet, les forces n'agissent que pendant une fraction de période réduisant d'autant sa valeur moyenne.

En mode tapping, on est sensible au décalage en fréquence et à l'amortissement de la courbe de résonance, alors qu'en tapping mode deflection, on est sensible à la moyenne de la force.

Nous avons utilisé ce mode pour faire nos mesures électriques en mode contact. Le logiciel de commande du Nanoscope IIIa permet de passer du mode tapping au mode deflection tout en continuant à imager. Cela nous a permis de poser la pointe sur la surface et de faire des mesures locales de courant. On reprend en détail le protocole dans la section (II.4.1.3.) sur le conducting AFM.

II.5.2.5. Mode non-contact

Ce qui différencie le mode tapping du mode contact est la boucle de rétroaction. (Il est faux de dire qu'en mode non contact on ne touche jamais la surface et qu'en mode tapping on touche la surface car ce qui définit ces modes est exclusivement la boucle de rétroaction). On travaille autant que possible avec une prédominance des forces attractives.

En général la résolution est moins bonne en mode non contact, puisque la pointe est assez loin de la surface. Néanmoins en se plaçant sous vide, il est possible d'atteindre la résolution atomique. En effet le facteur de qualité Q peut dans ces conditions atteindre une valeur de 10^5 . Bien que l'interaction soit à « longue portée », La sensibilité du levier est telle que l'on arrive à atteindre une résolution latérale atomique lorsque la pointe « effleure » la surface. Dans ce cas la déformation de la courbe de résonance devient très importante (cf. figure II.11 - on peut atteindre une résolution verticale de quelques pm). Il faut noter que sous vide, l'interaction de Van der Waals est plus importante, et la pointe peut approcher la surface sans subir l'action de l'eau en surface comme c'est le cas à l'air libre. Comme la pointe ne touche pas la surface, il est possible d'utiliser des pointes dont l'extrémité n'est composée que de quelques atomes. C'est la condition nécessaire pour avoir une résolution atomique.

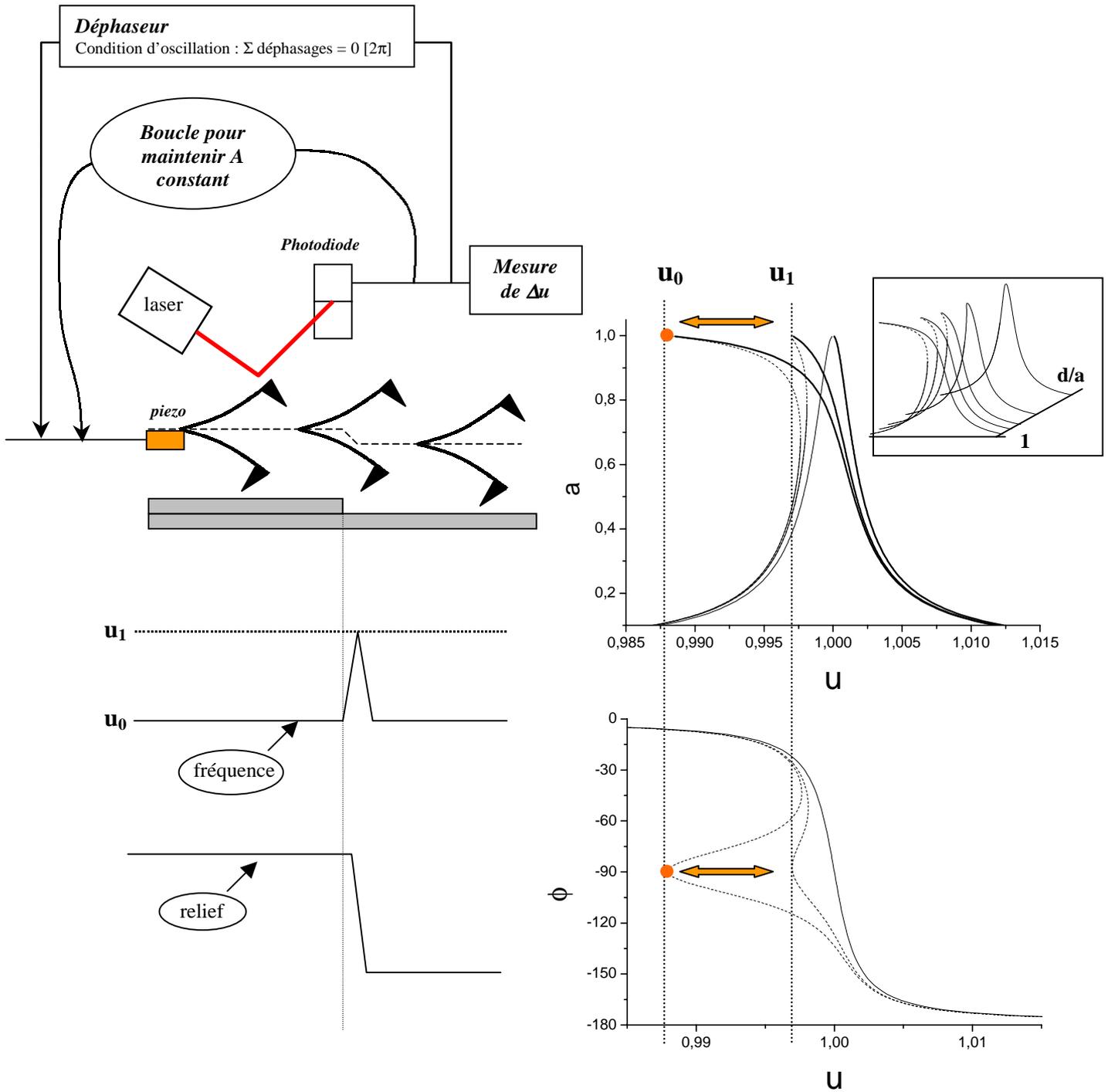


Figure II.11 : Principe du non contact AFM. On représente la courbe de résonance et de phase pour trois valeurs de d/a différentes. La sensibilité de la détection de la fréquence pour une phase donnée est la meilleure à la résonance (i.e. à -90°). Une première boucle de rétroaction sert à maintenir l'amplitude d'oscillation constante (on a représenté le laser, la photodiode ainsi que le piezo excitateur du levier). A l'aide d'un déphaseur le système va auto-osciller à la condition que la somme des déphasages soit nulle modulo 360° . On travaille ainsi tout le temps à la résonance. Il y a uniquement un décalage en fréquence lorsque l'échantillon s'éloigne ou se rapproche de la surface. La hauteur de l'échantillon est ajustée afin de garder la fréquence constante (u_0 sur le schéma). Sur un obstacle, la courbe de résonance va se déformer. La fréquence passe de u_0 à u_1 . L'échantillon se déplace verticalement pour revenir à la fréquence u_0 . On remarquera que le décalage en fréquence diverge lorsque la pointe touche presque la surface (cf. encadré pour $a/d \rightarrow 1$). C'est en travaillant dans ces conditions que l'on peut atteindre la résolution atomique. Pour imagier dans ces conditions on se place généralement sous vide. Si on reste assez loin de la surface, le décalage est beaucoup moins important et la résolution beaucoup moins bonne.

La boucle de rétroaction est définie de la manière suivante : l'amplitude et la phase sont fixées. La phase est maintenue à $-\pi/2$ (i.e. à la résonance). Lorsque la pointe se rapproche de l'échantillon on observe un décalage en fréquence. On s'arrête lorsqu'on atteint un certain décalage en fréquence. On peut alors imager l'échantillon en ajustant la hauteur pour maintenir le décalage en fréquence constant.

Du point de vue de l'instrumentation, l'oscillateur est maintenue à une amplitude d'oscillation constante par une boucle de rétroaction. Pour faire auto-osciller le levier on réinjecte avec un certain déphasage le signal en sortie de la photo diode sur l'excitation du levier. La condition d'oscillation est que la somme des déphasages sur toute la boucle soit nulle (modulo 2π). Comme on travaille à la résonance (où la sensibilité est la meilleure) on impose un déphasage de $-3\pi/2$. Le réglage fin pour être exactement à la résonance est obtenu lorsque l'excitation du piezo est la plus faible. Avec cette partie du dispositif on travaille au sommet de la courbe de résonance. On mesure donc un décalage en fréquence lorsque l'échantillon se rapproche ou s'éloigne de la surface (cf. figure II.11).

Pour obtenir une image en topographie de la surface on utilise une deuxième boucle de rétroaction qui ajuste la hauteur de l'échantillon afin de maintenir un décalage en fréquence constant.

Ce mode est intéressant dans la mesure où l'amplitude d'oscillation est toujours constante et à la résonance. On n'a plus de problèmes d'hystérésis comme c'était le cas en mode tapping avec une boucle de rétroaction uniquement sur l'amplitude. On peut avec ce mode travailler également avec une prédominance des forces répulsives (en choisissant un décalage en fréquence positif). Dans ce cas la pointe entre en contact avec la surface.

II.5.2.6. Mode oscillation latérale

Dans le cas d'une oscillation latérale, la boucle de rétroaction peut se faire par le décalage en fréquence ou l'amplitude ou par la phase, ou par le courant tunnel dans le cas d'un échantillon et d'une pointe conductrice.

On donne sur la figure ci-dessous (II.12) les résultats obtenus sous vide sur une surface de graphite [Courjon 2001] ainsi qu'une image obtenue par Freitag [Freitag 2000] pour des nanotubes déposés sur une surface isolante et connectés à une électrode. On peut constater que la résolution en courant est excellente. On donne également sur la figure un dispositif permettant d'exciter et de détecter en retour le mouvement de la pointe. Un diapason est taillé dans un cristal de quartz. Une pointe est alors fixée sur une des branches du diapason. Des systèmes de ce type sont maintenant commercialisés.

On peut constater que la sensibilité en courant est beaucoup plus importante (cf. figure II.12) qu'en décalage en fréquence. On a une décade de variation pour un déplacement inférieure au nanomètre pour le courant et de l'ordre de 10nm pour le décalage en fréquence. On notera également que l'interaction entre le graphite (HOPG) et la pointe l'interaction a lieu de manière significative jusqu'à 10 nm de la surface alors que la pointe oscille latéralement.

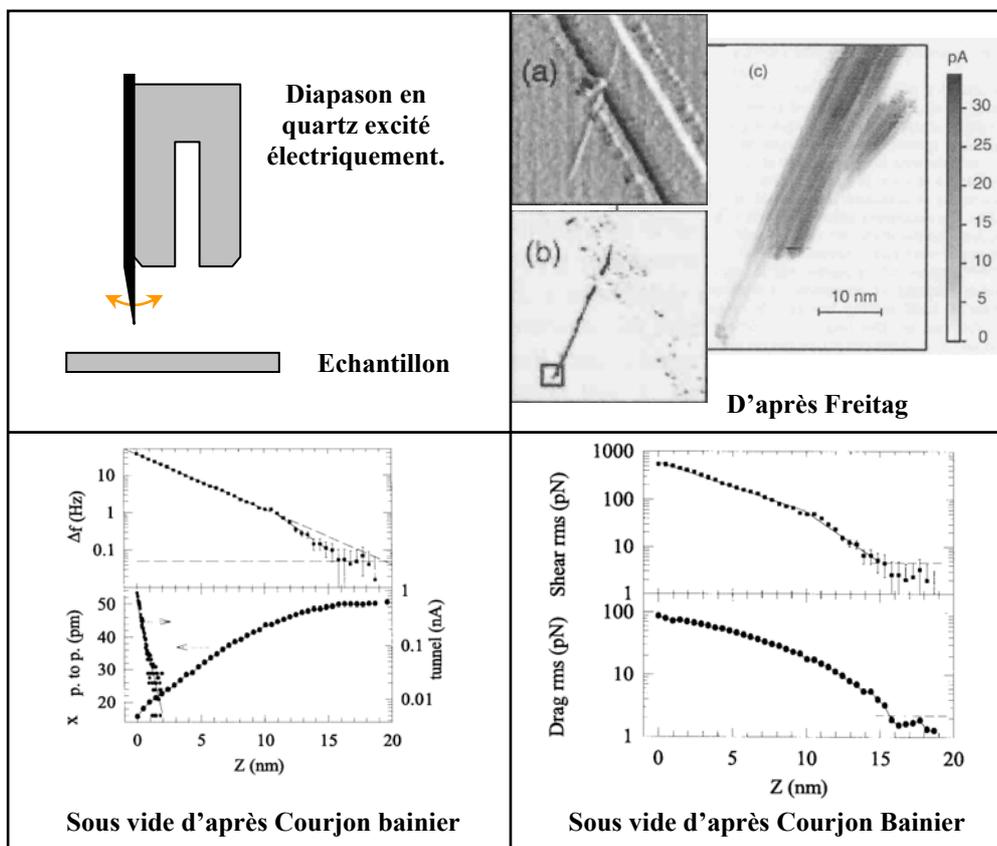


Figure II.12 : Description d'un dispositif d'excitation d'une pointe métallisée pour mesure de courant par effet tunnel d'après Freitag [Freitag 2000] et Courjon Bainier [Courjon 2001]. Un diapason en quartz permet de faire vibrer avec une amplitude très faible une pointe métallisée.

- Courjon, Bainier : le courant tunnel, le décalage en fréquence, ainsi que l'amplitude d'oscillation sont représentés en fonction de la hauteur par rapport à l'échantillon (bas gauche). Les mesures sont faites sous vide avec une pointe en or et une surface de graphite pyrolithique (HOPG). On peut en déduire l'amplitude de la force élastique et de friction en fonction de la hauteur avec une précision de l'ordre du pN ! On remarquera que les forces visqueuses et élastiques commencent à opérer même loin de la surface alors que l'on est sous vide. L'origine de cette force aussi loin de la surface n'est pas claire. La dépendance de ces deux forces est environ exponentielle avec la distance. On peut constater (bas gauche) que le courant tunnel est bien plus sensible que le décalage en fréquence pour déterminer la position de la surface. Dans les deux cas la dépendance est exponentielle.
- Freitag : Leur dispositif est identique à celui représenté (haut droit). Il mesure les propriétés électroniques de nanotubes de carbone connectés à des électrodes en or. On peut constater que la résolution en courant tunnel (haut droit b) et c)) est excellente. L'image c) est un zoom du carré sur l'image b). On atteint presque la résolution atomique par comparaison au mode oscillant (haut droit a)).

Ce mode présente également la possibilité de scanner en volume l'interaction pointe surface. Ce mode consiste à enregistrer en chaque point de l'image des courbes d'approche retrait. En effet, dans l'hypothèse où le film d'eau a été enlevé (sous vide en chauffant) afin de ne pas être gêné par la formation d'un ménisque au niveau de la pointe, on a pas de problème d'hystérésis dans les courbes d'approche retrait puisque le système est toujours décrit par des équations linéaires.

II.5.2.7. Interprétation des images AFM

Cette partie va surtout présenter les problèmes d'interprétation des images en mode tapping puisque à peu près toutes nos images ont été obtenues avec ce mode.

A partir de la connaissance de l'interaction entre la pointe et la surface et la boucle de rétroaction utilisée, on peut en toute rigueur interpréter les images AFM. Malheureusement, ce n'est pas aussi simple car le problème principal est qu'on ne connaît pas l'interaction entre la pointe et la surface. Cette interaction est généralement attractive à longue distance et répulsive à courte distance. On peut effectuer des courbes d'approche – retrait pour tenter d'évaluer ces deux composantes. Malheureusement il faudrait en toute rigueur effectuer ces courbes sur tout l'échantillon. De plus, la pollution de la pointe peut modifier l'interaction au cours de l'image [Neves 1999].

On peut tout de même présenter un certain nombre de situations que l'on peut interpréter à l'aide de tous ce qu'on a présenté. En particulier l'effet de la dissipation, de contraste de dureté et en présence d'une couche d'eau.

Toutes les courbes présentées dans les quelques exemples qui vont suivre ne sont qu'un support pour illustrer le propos. Ces courbes ne correspondent ni à des mesures ni à un modèle particulier. Les cas ci-dessous correspondent à l'imagerie en mode réplusif.

II.5.2.7.1. Effet de la dissipation

On montre par soucis de clarté l'effet de la dissipation pure sur la topographie. On ne représente ci-dessous (figure II.13) que le cas du mode tapping. La dissipation en mode non contact est beaucoup moins importante. Le mode non contact est présenté plus loin. La partie la plus dissipative apparaît plus haute en topographie. Cet effet reste faible. En revanche la variation de phase peut être très importante. On peut comprendre la formation d'une bosse alors que l'échantillon est parfaitement plat. Pour simplifier, la dissipation diminue l'amplitude d'oscillation du levier. La surface doit donc s'abaisser pour retrouver l'amplitude de consigne.

II.5.2.7.2. Cas de contraste d'élasticité

Dans cette partie nous présentons l'imagerie sur une surface présentant des parties plus ou moins dures.

Bien que la surface soit parfaitement plane (cf. figure II.14), on observe un effet de topographie. Il n'y a aucune variation de phase sans dissipation. La partie la plus molle est en général la plus dissipative. Dans ce cas, la phase diminue, et la diminution d'amplitude due à l'énergie perdue entraîne un déplacement de l'échantillon vers le haut moins important. Lorsqu'on abaisse l'amplitude de consigne, l'indentation sur la partie molle devient plus importante.

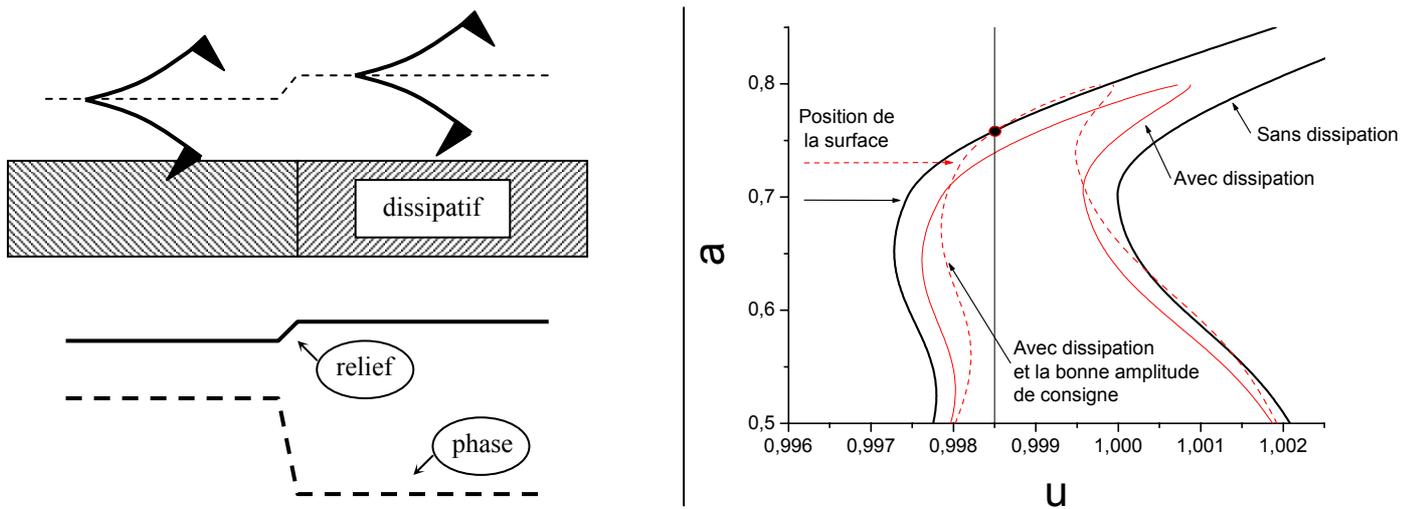


Figure II.13 : Effet topographique de l'effet dissipatif. L'explication est donnée sur les courbes de résonance. La dissipation amortit la courbe de résonance. L'amplitude diminue alors. La surface doit donc s'abaisser (i. e. une bosse en topographie) pour que l'amplitude revienne à la valeur de consigne indiquée par un point. La nouvelle courbe après le déplacement de l'échantillon est donnée en pointillés, ainsi que la position correspondante de la surface. La pointe rentre moins profondément dans la surface.

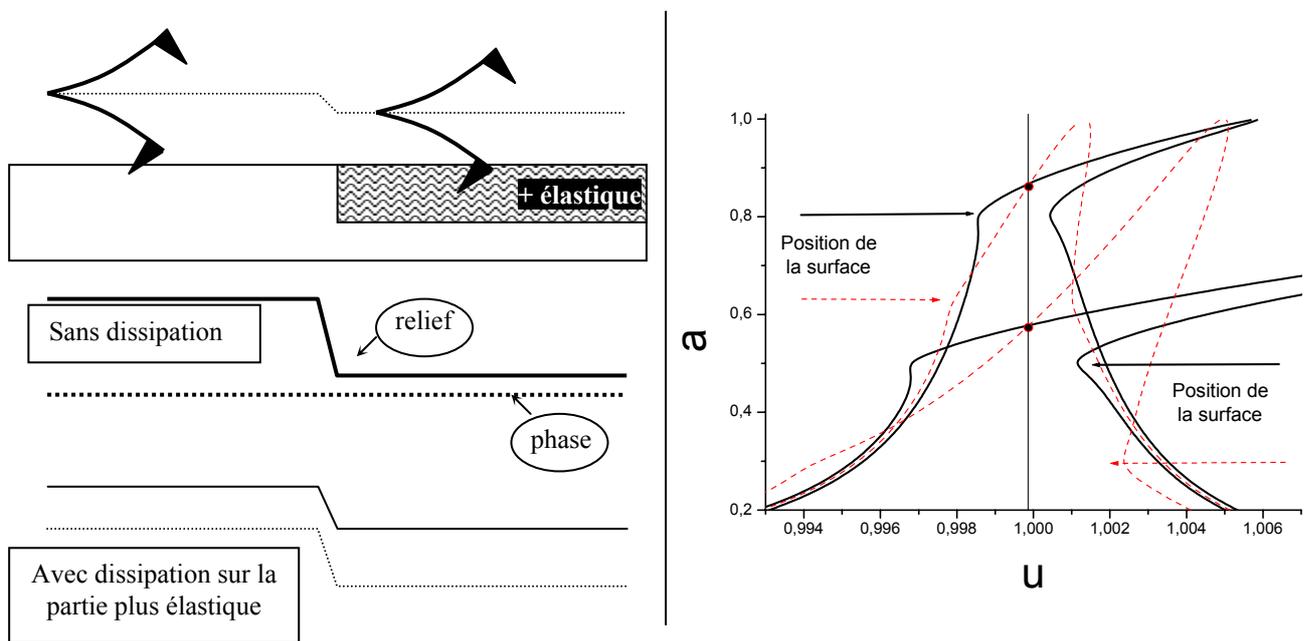


Figure II.14 : Observation d'un effet topographique entre deux matériaux de dureté différente. La pointe indente plus profondément la partie molle de la surface comme indiqué. Afin de maintenir l'amplitude d'oscillation constante, il est nécessaire de rapprocher l'échantillon (par commodité on a tracé le déplacement du levier). On a représenté les courbes de résonance correspondant à deux amplitudes de consigne différentes (respectivement $a=0.62$ et 0.9), pour les deux parties de la surface : élastique (en pointillés) et dure (trait plein). Les flèches indiquent la position de la surface. Plus la consigne est faible, et plus la pointe indente l'échantillon mou. On représente également l'effet de la dissipation. On voit que celle-ci fait diminuer la phase et que l'augmentation du relief est moins importante.

II.5.2.7.3. Effet de la couche d'eau

De la même manière que précédemment, on traite le cas d'une surface présentant deux régions différentes. Ce qui les distingue est la présence d'une couche d'eau sur une zone. On obtient ce genre de comportement sur des surfaces présentant par exemple des zones hydrophiles et hydrophobes.

L'effet de la couche d'eau est assez complexe. L'eau en faible épaisseur a une structure plus organisée qu'en volume [Han 1998]. Par conséquent, elle se comporte en partie comme un solide qui va repousser la pointe. Cependant, si la pointe à chaque oscillation est capturée par le film de liquide par la formation d'un ménisque, cela va rajouter une composante attractive et dissipative. La contribution majoritaire vient des forces dissipatives. On se ramène donc au cas présenté précédemment au II.4.2.6.1.

On a donc une surestimation de la hauteur mesurée. L'annexe B décrit une mesure que nous avons faite où l'on interprète la surestimation de la hauteur de l'ADN par la présence d'une couche d'eau autour de l'ADN. En effet, la dissipation va tendre à diminuer l'amplitude d'oscillation de la pointe qui doit s'éloigner de la surface pour retrouver l'amplitude de consigne.

II.5.2.7.4. Convolution

Le défaut le plus classique est l'apparition de pointe double ou triple. On parle alors de convolution de la pointe (parler de convolution est un abus de langage. Ça ne correspond pas rigoureusement à l'opération mathématique). La résolution dépend du rayon de courbure à l'extrémité de la pointe. En effet on ne peut accéder à une bonne résolution que si l'interaction pointe surface est localisée. L'effet de convolution est illustré ci-dessous. On observe ce genre de phénomène lorsque l'objet que l'on veut observer est plus petit que la pointe. En d'autres termes, la surface image la pointe. Cet effet se remarque très facilement puisque l'on retrouve sur toute la surface le même motif.

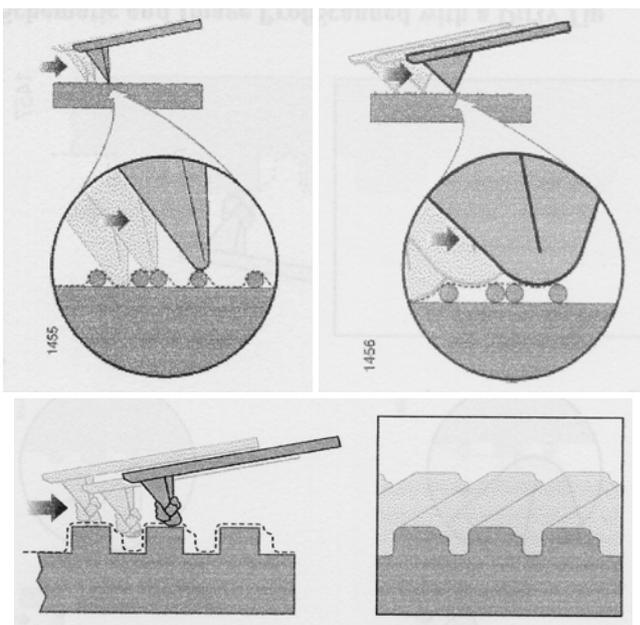


Figure II.15 : Artefact de topographie. La taille de l'extrémité de la pointe donne la résolution que l'on peut atteindre. Le schéma ci-dessus illustre l'effet en mode contact. Il en est de même en mode oscillant. La figure du dessous montre que des pollutions qui habillent la pointe peuvent altérer la topographie. La surface donne en quelque sorte une image de la pointe.

II.5.2.8. Conclusion : AFM en pratique

La meilleure façon d'avoir de « bonnes » images AFM, et de bien régler l'appareil pendant la mesure. Le bon réglage dépend de ce qu'on veut observer.

Pour observer un *contraste* entre deux matériaux différents on essayera de se placer dans des conditions où la phase peut varier de manière importante : *faible amplitude et fort amortissement*. En effet à faible amplitude la pointe possède peu d'énergie cinétique (cf. équation II.09). Par conséquent elle sera plus sensible aux forces dissipatives. Enfin on peut voir sur les courbes d'approche – retraits (cf. figure II.09) que la différence de phase entre la courbe avec et sans dissipation est la plus importante à fort amortissement.

Dans le cas de deux matériaux différents il est difficile de se fier à la variation de hauteur puisqu'on ne peut pas savoir si c'est un artefact de mesure ou si on a réellement une variation de topographie. On se fiera donc plutôt à la phase.

On notera qu'on ne peut pas diminuer l'amplitude d'oscillation autant qu'on veut. Plus on diminue l'amplitude d'oscillation plus le bruit va perturber la mesure. De plus les pieds des courbes de résonance des cantilevers ne correspondent plus à un oscillateur harmonique. On a souvent d'autres pics de résonance ou d'anti - résonance, ...

Pour avoir la *topographie* de la surface on se placera plutôt dans des conditions où la phase varie peu : *amplitude d'oscillation importante*. En effet dans ce cas, la différence entre la hauteur réelle d'un objet et celle qu'on mesure va dépendre uniquement de la profondeur d'indentation de la pointe. Or cette profondeur d'indentation est faible (de quelques Angström en général).

C'est sur les images avec de forte variation de phase qu'on a eu le plus de problème. La figure II.16 donne l'exemple de molécules d'ADN déposées sur une surface méthyle et imagées en mode tapping. On a une variation en phase de l'ordre de -20° sur les molécules. La hauteur de l'ADN sur ces images est supérieure à 3nm alors qu'on attend plutôt 1nm (cf. chapitre III).

Nous avons observé un phénomène similaire de surévaluation de hauteur sur un échantillon avec de l'ADN et du pentacène. On observe dans ce cas une corrélation entre la hauteur mesurée et la phase (cf. Annexe B).

On peut proposer des modèles pour expliquer ces mesures, mais ces modèles se basent sur la connaissance des conditions d'imagerie : savoir si on est en mode répulsif (sur la branche du mode intermittent cf. figure II.09), ou attractif, ou si on passe de l'un à l'autre en cours d'image. La figure II.17 donne un exemple où l'on voit sans ambiguïté le passage du mode attractif au mode répulsif sur la molécule. On observe des changements brusques de hauteur. Cela donne des creux sur la figure II.17. Mais savoir si on est en mode attractif ou répulsif n'est pas toujours aussi évident. On peut se baser sur la valeur de la phase et la comparer à celle de l'oscillateur libre (i.e. à quelques dizaines de nm au-dessus de la surface). On peut ainsi savoir de quel côté de la courbe de résonance on travaille (cf. figure II.07).

Dans le cas de la surélévation de hauteur de l'ADN observée sur quelques unes de nos images, nous proposons dans l'annexe B un modèle où l'ADN est entouré d'une couche d'hydratation importante. Ce modèle semble cohérent, mais comme nous l'avons souligné, on ne peut véritablement interpréter les images AFM que si on a noté les conditions expérimentales d'imagerie (position sur la courbe de résonance, amortissement, gain, vitesse de balayage, ...). On ne peut pas vérifier a posteriori ces informations (cf. figure II.16).

Les résultats les plus fiables que l'on peut obtenir à l'AFM sont ceux où on a sur une même image ce que l'on veut mesurer et une référence. Pour la hauteur de l'ADN par exemple Muir [Muir 1998] s'est servi de triplex et quadruplex d'ADN comme référence.

Dans le même genre d'idée, les résultats que l'on présente en Annexe B sur la corrélation entre la phase et la hauteur mesurée de l'ADN ont tous été déduits d'une même image. On n'aurait pas pu établir cette corrélation entre des images faites sur des échantillons différents et/ou avec une pointe différente.

On notera que la théorie que nous avons présentée sur l'interaction pointe - surface correspond au régime permanent. En réalité la pointe est soumise à des forces qui changent en permanence. Le temps qu'il faut pour que l'oscillateur atteigne une nouvelle configuration d'équilibre est de $QT \sim 1$ à 5 ms (où Q est le facteur de qualité et T la période d'oscillation). Avec une vitesse de la pointe de quelques $\mu\text{m/s}$, la pointe parcourt une distance de l'ordre de 10nm avant d'atteindre sa nouvelle configuration d'équilibre. En réalité le temps indiqué est sur estimé car la boucle de rétroaction sert justement à faire osciller la pointe toujours avec la même amplitude. Néanmoins on retiendra que l'on peut avoir une variation de topographie amplifiée ou uniquement due au mauvais réglage de la boucle de rétroaction (vitesse trop importante, gain trop faible, ...).

En pratique, pour savoir si les réglages de l'appareil sont corrects, on peut commencer par comparer la topographie que donne la pointe sur une ligne à l'aller et au retour. Les deux traces doivent se superposer. On peut également faire plusieurs images à un même endroit en changeant les réglages (gain, vitesse de balayage, amortissement, amplitude d'oscillation de la pointe...) [Ferreiro 2000]. Dans le cas particulier de mesure de hauteur, on a ainsi une idée de l'erreur que l'on commet entre la plus petite et la plus grande valeur mesurée. On peut également pour enregistrer un maximum d'information sur la topographie de la surface effectuer une image en force - volume. Dans ce cas, on enregistre des courbes d'approche - retraits à chaque point de l'image.

Enfin, on terminera cette section en insistant sur le fait qu'il est important de ne pas changer les réglages au cours de l'acquisition d'une image. Cela implique que l'appareil soit stabilisé en température, d'autant plus si le temps d'acquisition est long (jusqu'à 45 minutes). Nous avons également constaté qu'en balayant plusieurs fois la même zone, l'image a tendance à s'améliorer.

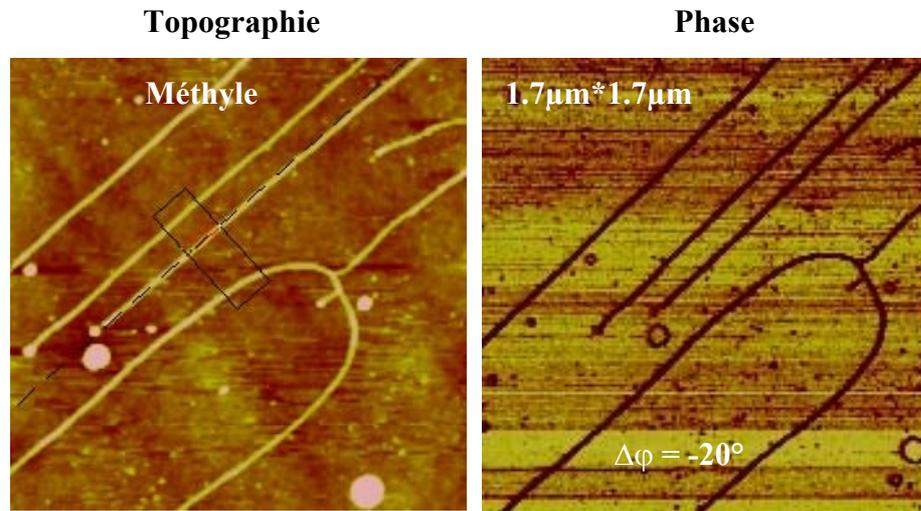


Figure II.16 : Image en mode tapping de brins d'ADN. La variation de phase est de -20° sur le brin d'ADN. La hauteur mesurée sur ces brins d'ADN est supérieure à 3nm alors qu'on trouve généralement des hauteurs de l'ordre de 1nm On interprète cette variation de la phase par une dissipation plus importante au niveau des molécules. La variation de la phase est cohérente avec le mode répulsif. La pointe touche la surface.

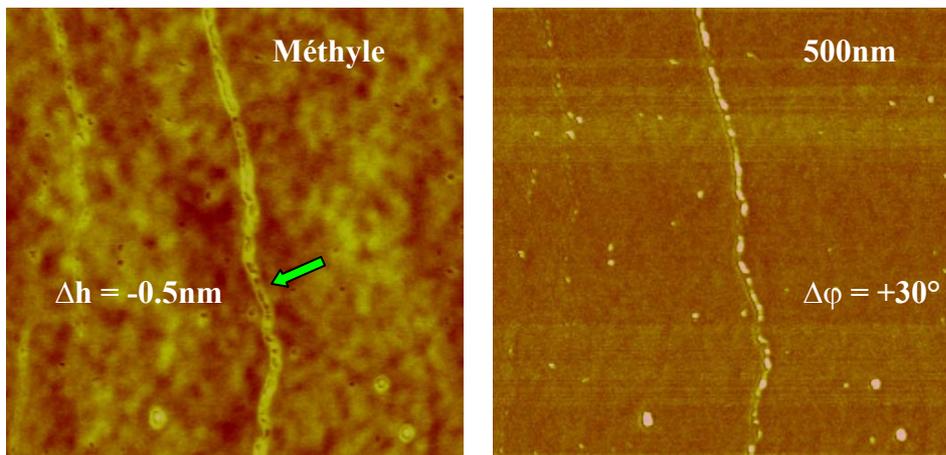


Figure II.17 : Image en mode tapping de brins d'ADN. La variation de phase est de $+30^\circ$ sur le brin d'ADN. On interprète la brusque variation de hauteur (la flèche indique une zone où il y a un creux) au passage du mode attractif au mode répulsif. L'augmentation de la phase s'accompagne de la formation de creux d'environ 0.5nm.

II.5.3. Mesures électriques

Nous avons utilisé l'AFM pour faire une partie de nos mesures électriques. On présente dans cette partie comment on met en œuvre cette technique et ce qu'on peut en attendre.

II.5.1.1. Lift mode

La version Nanoscope IIIa permet de travailler en LiftMode. Ce mode consiste à faire deux passages sur une même ligne. Les réglages ainsi que les paramètres de la boucle de rétroaction peuvent être ajustés indépendamment. Le véritable intérêt de ce mode est de pouvoir au second passage utiliser la topographie enregistrée au premier passage. La pointe peut se déplacer à altitude constante ou suivre la topographie de l'échantillon (précédemment enregistrée au premier passage). En d'autres termes, on arrive à découpler la topographie d'autres propriétés de l'échantillon.

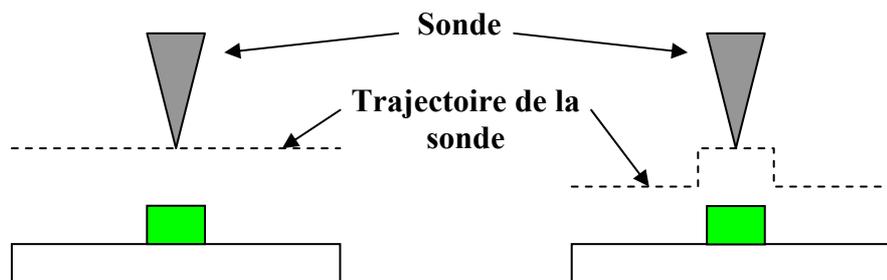


Figure II.18 : Mode Lift. Un premier passage permet de déterminer la topographie de la surface (non représenté). Un second passage (représenté) permet de se déplacer par rapport à la surface à hauteur constante ou à distance constante. Ce mode est utilisé par exemple pour la détection de propriétés électriques (EFM) ou magnétique (MFM),...

On présente ci-dessous différentes possibilités. Il est en général difficile de scanner en même temps deux propriétés de la surface. Par exemple, si on polarise l'échantillon face arrière pour détecter des propriétés électriques, la pointe dans ce cas s'éloigne tellement de l'échantillon (plusieurs dizaines de nm), que l'on perd la résolution en topographie. Il est impératif dans ce cas de travailler en mode Lift. C'est l'apanage des systèmes linéaires de pouvoir en envoyant plusieurs fréquences dans le système résonant, récupérer une information distincte pour chaque fréquence sans couplage parasite (cf. mode oscillation latérale).

II.5.1.2. EFM

Le principe de l'EFM est d'utiliser la pointe pour détecter les propriétés électrostatiques du substrat que l'on étudie. On utilise le mode Lift pour mettre en œuvre cette technique. En effet, il est nécessaire pour sonder les propriétés électrostatiques de l'échantillon d'appliquer une tension entre la surface et la pointe. Or il n'est pas possible

d'imager la surface et d'appliquer une tension simultanément. La résolution devient médiocre. Le mode Lift permet de connaître la topographie au premier passage et de mesurer l'effet des forces électrostatiques au second passage.

Au second passage la pointe subit une force électrostatique sous l'effet de la tension appliquée. La courbe de résonance va donc être décalée sous l'effet de cette force supplémentaire. La quantité qu'on mesure est soit le décalage en phase à fréquence constante ou bien le décalage en fréquence à phase constante. Comme en EFM on fait osciller la pointe assez loin de la surface, le décalage en fréquence va dépendre du gradient de la force au niveau de la pointe. On a alors la formule ci-dessous du décalage en fréquence (II.11).

$$\Delta u = -\frac{1}{4k} \frac{d^2 C}{dz^2} V^2 \quad (\text{II.11})$$

Notre objectif est d'étudier les propriétés électriques d'une molécule d'ADN. A priori cette technique ne doit pas être capable de distinguer un objet à forte constante diélectrique et un objet conducteur. Dans les deux cas, le potentiel ne varie pas ou très peu à l'intérieur de l'objet. En revanche, si la molécule est isolante, le signal que l'on va détecter va être faible par comparaison à celui d'une molécule conductrice. Bockrath [Bockrath 2001] et Gomez – Navarro [Gomez 2002] ont étudié de cette façon la conductivité de l'ADN par comparaison à celle de nanotube de carbone. L'ADN ne donne aucun signal contrairement aux nanotubes de carbone. Bockrath a également mis en évidence une dépendance du décalage en phase en fonction de la longueur des nanotubes conducteurs. Les points expérimentaux ainsi que les équations du modèle sont données ci-dessous. Les notations sont celles de l'article de Bockrath. Le modèle qu'il utilise considère une capacité par unité de longueur entre le substrat et la molécule. Il modélise la pointe, le nanotube de carbone et le substrat comme deux capacités en série. L'équation (II.12) ci-dessous découle immédiatement de ce modèle et de la formule du décalage en fréquence (II.11) donnée plus haut.

$$\Delta\varphi^{-1/2} = a + bL^{-1} \quad \text{avec} \quad \left\{ \begin{array}{l} a = \left(\frac{Q}{2k} \frac{d^2 C_{tt}}{dz^2} \right)^{-1/2} V^{-1} \\ b = a \frac{C_{tt}}{C_0} \end{array} \right. \quad (\text{II.12})$$

C_{tt} : Capacité entre la pointe et la molécule
 C_0 : Capacité par unité de longueur de la molécule
 V : Tension entre la pointe et le substrat
 L : Longueur de la molécule

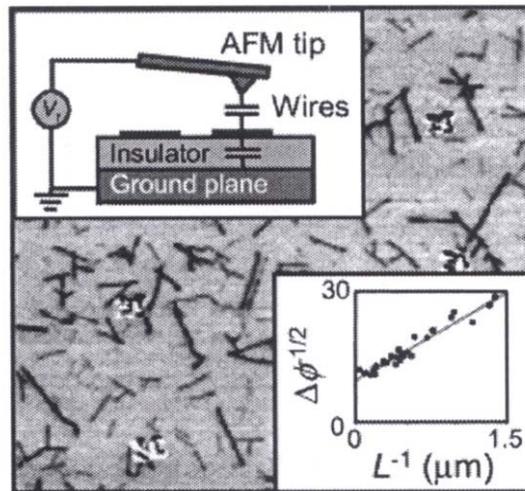


Figure II.19 : Décalage en phase observé sur des nanotubes de carbone et de l'ADN. L'ADN ne donne aucun signal. Le signal donné par les nanotubes dépend de leur taille. [Bockrath 2001]

Nous avons simulé le potentiel dans une configuration proche de celle de nos expériences d'EFM sur de l'ADN en supposant que l'ADN est conducteur (cf. chapitre IV). La figure (II.20) montre le résultat d'une simulation. On a calculé la force et la charge sur la pointe pour différentes hauteurs. Avec $k=1\text{N/m}$, et $\omega_0=2\pi \times 50\text{kHz}$, on trouve un décalage en fréquence de 3Hz pour 1V. Cette valeur donne un ordre de grandeur de ce qu'on attend comme décalage en fréquence (cf. chapitre IV pour nos résultats expérimentaux).

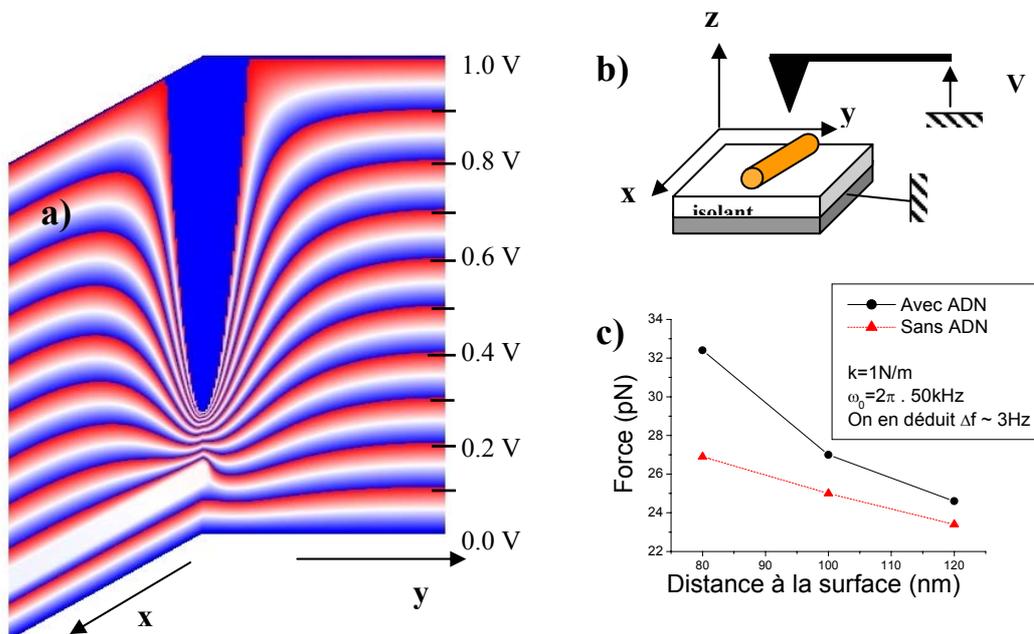


Figure II.20 : Simulation du potentiel électrostatique entre une pointe de forme parabolique et la surface avec au milieu un objet conducteur (en a)). On représente le potentiel dans le plan Oxz et Oyz . L'ADN se trouve à 50nm de la surface. Le dispositif que l'on a simulé correspond à la situation b). On a pris un indice de 1 pour l'isolant afin de limiter le temps de calcul. La force en fonction de la distance de la pointe à la surface conductrice est tracée en c). On en déduit un décalage en fréquence de 10Hz pour un cantilever EFM dont les caractéristiques sont données sur la figure c).

II.5.1.3. Conducting AFM

II.5.1.3.1. Présentation

En mode contact, il est possible de se servir du cantilever comme d'une électrode. La figure ci-après (II.21) présente le montage expérimental. La pointe est au potentiel nul. La tension est appliquée sur l'électrode. On utilise de la laque à l'argent pour contacter l'électrode au support de l'échantillon. Par conséquent la face arrière de nos échantillons est également polarisée.

La mesure est enregistrée sur un Semiconductor Parameter Analyser 4145B (Helwett - Packard). La tension est un créneau ascendant ou descendant. L'amplificateur courant tension est placé dans la tête du microscope afin de limiter le bruit des appareils. En ajoutant en plus un amplificateur de tension en sortie de l'amplificateur courant – tension (Stanford Research System SR560), on peut obtenir une résolution de l'ordre du fA ($10^{-15} A$). On ne peut pas dans cette configuration mesurer des courants supérieurs au nA ($10^{-9} A$). Dans ce cas, on peut brancher directement la pointe sur un amplificateur de courant – tension, extérieur (Stanford Research System SR590).

On utilise le dispositif de deux manières différentes (cf. figure II.22). Soit on fait une image en topographie en mode contact avec une force d'appui de l'ordre de $10nN$, soit on dépose la pointe à un endroit donné de la surface, et on fait une mesure du courant en fonction de la tension appliquée. L'avantage du balayage qui donne une image en courant de la surface, est qu'on peut distinguer nettement le contraste entre un objet conducteur, et isolant. Malheureusement, le balayage se fait à tension constante. On ne peut pas faire de courbe courant – tension. Pour cela la pointe doit être immobile.

II.5.1.3.2. Problèmes du contact électrique

Un des problèmes que nous avons rencontré lors de nos mesures électriques est de réussir à obtenir un bon contact électrique au niveau de la pointe.

Dans le cas de surface conductrice comme l'or, le platine ou le pentacène, il faut appuyer assez fort sur la surface ($\sim 10 - 100 nN$) pour commencer à mesurer du courant [Cai 2001]. La figure II.23 donne l'exemple de courbe d'approche retrait avec mesure du courant sur une surface d'or. La tension appliquée est de $0.1V$. Il y a moins de courant à l'aller qu'au retour. La force qu'il faut appliquer pour commencer à avoir du courant n'est pas reproductible d'une courbe sur l'autre au même endroit.

En appliquant une tension assez élevée on arrive également à faire passer du courant. Nous n'avons pas vérifié systématiquement ce dernier point car le courant augmente brutalement, et peut endommager l'amplificateur courant – tension.

Finalement nous avons constaté que l'on mesure plus de courant si il y a un matériau mou (comme l'ADN) sous le métal. On interprète ce résultat par la déformation de la surface par la pointe. La surface de contact est alors plus importante. On peut logiquement s'attendre à mesurer plus de courant.

Dans le cas des mesures sur l'ADN nous avons eu beaucoup moins de problèmes de contact dans le sens où le courant n'augmente pas brutalement de plusieurs ordres de grandeur. Il n'y a pas de variation brusque du courant au cours des mesures.

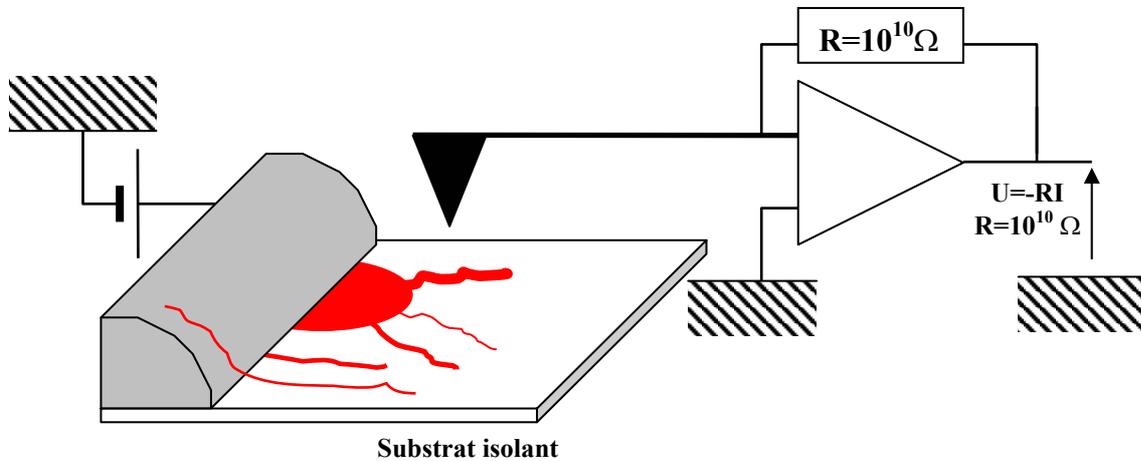


Figure II.21 : Présentation de l'AFM en mode conducting. A gauche est représenté l'électrode. La pointe sert de deuxième électrode. Pour un bon contact électrique, il est nécessaire que la pointe touche la surface. Un amplificateur courant – tension est placé dans la tête du microscope afin de limiter au maximum le bruit dans les composants. La sensibilité du dispositif est de l'ordre du fA (10^{-15} A). Dans le cas de courant important au-dessus du nA (10^{-9} A), on peut brancher directement la pointe sur un ampli de courant. On a représenté schématiquement comment peut se placer l'objet (ici de l'ADN déposé en paquet, en corde ou en brin unique) à étudier par rapport à l'électrode : au-dessus ou en dessous.

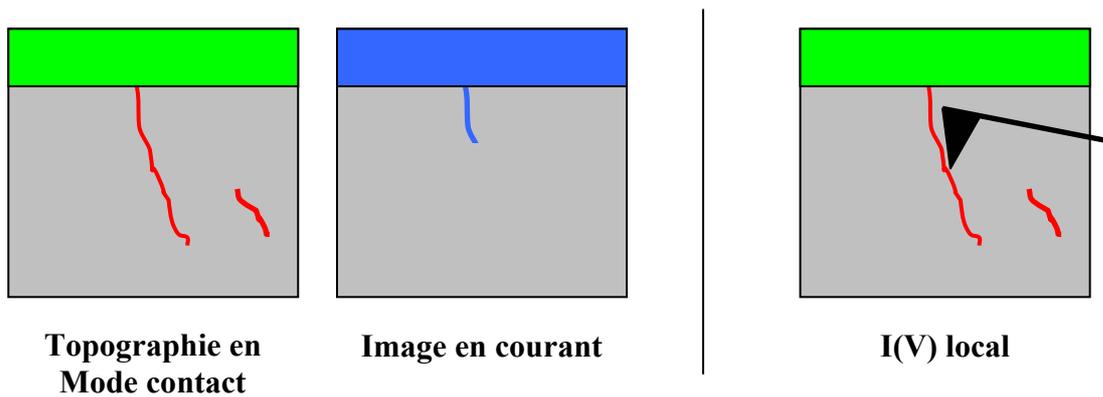


Figure II.22 : Les mesures électriques sont faites de deux façons. A gauche, le mode imagerie de courant. La pointe balaye la surface en mode contact avec une force d'appui de l'ordre de 10nN et à tension constante. Le courant est enregistré pour chaque point et forme une image. A droite, la pointe est maintenue immobile en contact avec la surface. On mesure alors le courant en fonction de la tension.

Les tensions qu'on applique pour les mesures sur l'ADN vont jusqu'à 10V. Les niveaux de courant sont faibles (inférieure à 10nA). De plus l'échantillon est polarisé face arrière.

L'ADN est entouré d'une certaine quantité d'eau (nos mesures sont faites à l'air dans des conditions ambiantes). Il y a un certain taux d'humidité dans l'air. De plus la présence d'ions plus ou moins mobiles autour de l'ADN favorise un écrantage important du potentiel électrostatique. En d'autres termes la chute de potentiel a lieu principalement à proximité de la pointe.

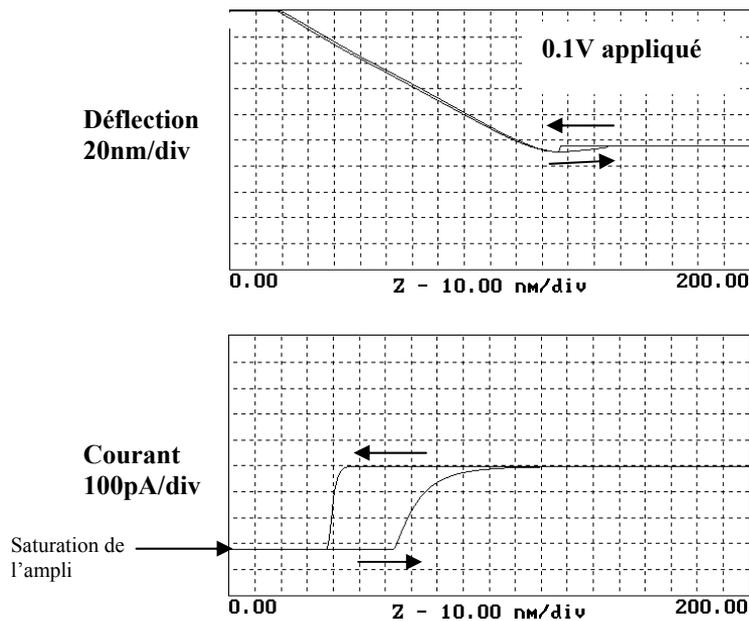


Figure II.23 : Mesure du courant et de la déflexion du levier au cours d'une approche et d'un retrait en mode contact (la pointe n'oscille pas) sur une surface d'or avec une tension de 0.1V appliquée entre la pointe et la surface. La raideur du levier est de 1N/m. On a une forte hystérésis du courant. Il faut appuyer assez fort (80nN) pour avoir du courant. Le courant persiste plus longtemps au retour. Ces courbes d'approche – retrait sur des conducteurs sont peu reproductibles. La force seuil change d'une courbe à une autre.

II.5.1.3.3. Caractéristiques courant – tension

II.5.1.3.3.1. Protocole

Les caractéristiques courant tension sont obtenues en posant la pointe sur la surface. On applique une force de l'ordre de 10 à 30nN. Comme le piezo X et Y ont une certaine dérive, il est difficile de rester longtemps au point de mesure. L'ordre de grandeur du temps dont on dispose pour faire les mesures est de 1 minute. On observe la topographie de la zone de mesure après avoir enregistré la caractéristique courant – tension.

On fait toujours deux mesures consécutives voire plus (si la dérive du piézo est faible), afin de vérifier le niveau de reproductibilité de nos caractéristiques. Le problème est qu'on ne sait pas pendant la mesure si la pointe a bougé. Dans le cas où l'ADN est dégradé on ne peut pas savoir à quel moment a eu lieu la dégradation. On peut raisonnablement supposer que cela correspond au moment où on ne mesure plus de courant.

Le protocole de mesure est le suivant. On se sert du tapping mode deflection pour immobiliser la pointe sur la surface avec une certaine force d'appui.

1. On image la surface. On repère l'objet à analyser. On zoome dessus en plaçant le point de mesure au centre de l'image.
2. On zoom sur 0-2nm.
3. On stoppe la vibration du piezo. La pointe doit alors se rétracter.
4. On passe en Tapping mode déflexion. On doit en général augmenter les gains pour que la boucle de rétroaction ne soit pas trop lente. Il faut vérifier que la consigne soit ajustée de manière à ce que la pointe ne puisse rentrer en contact avec la surface. On la met à $-9V$. La pointe est ainsi toujours rétractée
5. On règle la consigne de la déflexion du levier jusqu'à obtenir le contact.
6. **On fait la mesure $I(V)$.**
7. On remet la consigne à $-9V$ La pointe doit alors se rétracter.
8. On baisse les gains. On remet l'oscillation du piezo.
9. On passe en mode tapping. En agrandissant le balayage à 100-500nm, on peut voir le point de mesure (La mesure modifie en général localement la surface : accumulation de matière, déformation du substrat,...). On peut vérifier qu'il n'y a pas eu de dérive. Le point de mesure doit être au centre de l'image.

L'ADN est en général modifié par la mesure. On observe dans la majorité des cas une légère accumulation de matière au point de mesure (cf. figure II.27). On a également observé la destruction ou la coupure de la molécule.

Cette détérioration dépend de la force appliquée sur la molécule par la pointe, de la surface sous jacente, de la tension appliquée, ... Pour les surfaces méthyle et polystyrène l'ADN n'est pas bien fixé sur la surface. Par conséquent la molécule peut être déplacée (cf. figure II.25), coupée avec rétraction vers le point d'attache le plus proche (cf. figure II.26), ...

Nous avons également observé la destruction de cordes d'ADN (cf. figure II.24). Dans ce dernier cas on ne sait pas exactement à quel moment a lieu la détérioration de l'échantillon. On a observé plusieurs fois ce phénomène lorsqu'une mesure à tension positive importante ($>5V$) puis à tension négative sont faites simultanément. La mesure à tension négative donne du courant qui varie linéairement avec la tension, puis il devient nul. Si on répète la mesure on n'observe plus de courant.

II.5.1.3.4. Imagerie en courant

L'imagerie en courant se fait à tension constante. On veille à ce que la pointe se déplace à une vitesse de l'ordre de $1\mu m/s$.

Nous avons constaté que le contact électrique est meilleur quand on balaye la surface. La figure II.28 donne un exemple où on distingue nettement un grain de pentacène.

Figure II.24 : Image en mode tapping avant et après une mesure de courant ponctuelle. La corde d'ADN est déposée sur une surface amine. La taille de l'image est de $500\text{nm} \times 500\text{nm}$.

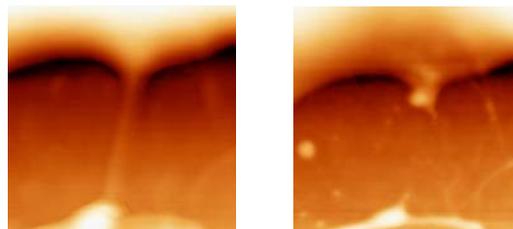


Figure II.25 : Image en mode tapping après une mesure de courant ponctuelle. La corde d'ADN est déposée sur une surface de polystyrène. La taille de l'image est de $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$.



Figure II.26 : Image en mode tapping après une mesure de courant ponctuelle. La corde d'ADN est déposée sur une surface méthyle. On voit l'électrode en or. Le brin a été coupé et s'est replié sur la zone indiquée par une flèche. La taille de l'image est de $3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$.

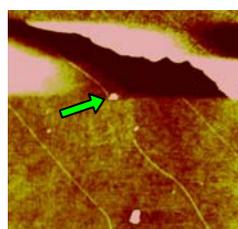
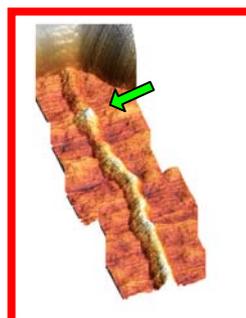


Figure II.27 : Image en mode tapping après une mesure de courant ponctuelle. On voit un léger épaississement indiqué par la flèche. La majorité de nos mesures sont de ce type. La corde d'ADN est déposée sur une surface amine. La longueur de la corde représentée est de 500nm .



Majorité des cas

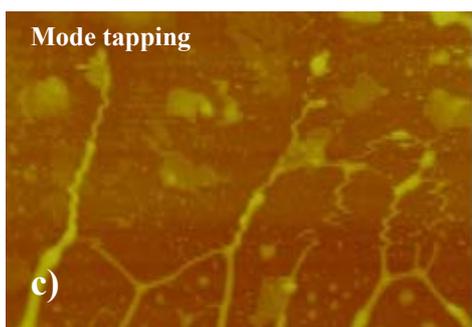
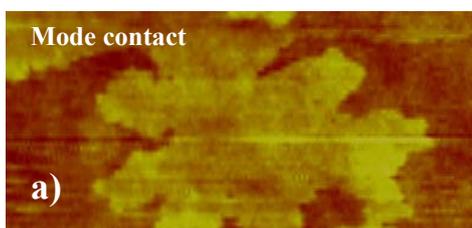


Figure II.28 : Imagerie en courant. En a) et b) image en topographie et en courant obtenue sur un grain de pentacène déposé sur une surface de SiO_2 . Les dimensions de l'image sont $3\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$. La tension appliquée est de 5V , la vitesse de la pointe est de $0.5\mu\text{m/s}$. En c) image en mode tapping de cordes d'ADN déposée sur une surface de polystyrène après une mesure électrique. On voit clairement que les brins sont abîmés par le passage de la pointe. La dimension de l'image est de $3\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$.

Le balayage de la pointe est en général destructif comme le montre la figure II.28. L'ADN est coupé lors du passage de la pointe. Pour limiter ce problème, il faut augmenter les gains de la boucle de rétroaction du mode contact de l'AFM. En effet si les gains sont trop faibles, l'AFM n'a pas le temps de réagir pour « éviter » de percuter le brin ou la corde d'ADN.

Le chapitre IV donne quelques résultats intéressants obtenus avec cette technique.

III. Mesures électriques sur des électrodes fixes

Pour effectuer nos mesures électriques sur des électrodes, nous avons utilisé un banc de mesure relié à un ampèremètre (Helwett-Packard 4140B). On peut effectuer les mesures sous vide (1mTorr) ou à l'air. La mesure est pilotée par ordinateur.

Toutes nos mesures sur des électrodes se sont soldées par des échecs. Il n'y a que sur des fibres d'ADN que nous avons pu effectuer des mesures à l'air et sous vide.

Toutes nos mesures sont effectuées à tension constante ou avec des rampes de tension qui varie lentement. L'acquisition d'une courbe est de l'ordre de la minute.

IV. Préparation des surfaces

Nous avons utilisé un grand nombre de surfaces différentes au cours de la thèse. On présente dans cette section leur protocole d'élaboration. On prépare généralement nos surfaces sur des plaquettes de silicium complètes. On clive ensuite ces plaquettes en morceau d'environ 1cm de côté. Ces échantillons sont stockés sous flux d'azote pour les protéger de la pollution atmosphérique et des poussières.

IV.1. Dépôt de molécules

On présente le greffage covalent de molécules, sur des plaquettes de silicium ainsi que sur des lames et lamelles de verre. Les molécules forment une sorte de tapis de molécules.

Les molécules que l'on greffe possèdent un groupement silane ($-\text{Si}-(\text{O}-\text{CH}_3)_3$ ou $\text{Si}-(\text{Cl})_3$) qui peut former des liaisons covalentes avec les liaisons $-\text{Si}-\text{OH}$ de la surface et avec les groupements silane des autres molécules.

Pour que le greffage soit de bonne qualité il est nécessaire de faire un nettoyage de la surface pour deux raisons principales. La surface doit être hydrophile et le nettoyage active les groupements silanol ($-\text{Si}-\text{OH}$) de la surface afin que les molécules puissent s'y greffer.

Notre objectif n'est pas d'obtenir des surfaces parfaites du point de vue structurel. Si les molécules ne sont pas parfaitement ordonnées (cf. partie sur la caractérisation des surfaces) cela n'affecte pas en général nos dépôts d'ADN.

IV.1.1. Principe du greffage

Suivant le type de molécules que l'on greffe on peut avoir une couche dense et ordonnée de molécules. On parle d'auto assemblage des molécules sur le substrat [Brzoska 1992]. C'est le cas de toutes nos molécules sauf pour les silanes amine qu'on présente à part (cf. partie IV.1.3.).

Les molécules que l'on utilise possèdent des chaînes carbonées plus ou moins longues (de 3 à 18 carbones), une extrémité hydrophile (du côté du silane qui se greffe sur la surface) et l'autre plutôt hydrophobe (terminaison vinyle, méthyle, fluor et amine). Ces molécules sont représentées en annexe C.

On utilise des solvants organiques (hexadecane, hexane, tetrachlorure de carbone) et les réactions chimiques sont faites dans une boîte à gants sous atmosphère sèche d'azote.

Comme la molécule ne possède qu'une tête hydrophile (du côté du groupement silane), c'est cette partie de la molécule qui va s'orienter vers le substrat lui-même rendu hydrophile par le nettoyage du substrat (cf. partie suivante). A ce titre, il est nécessaire même si on travaille sous atmosphère sèche d'azote, qu'il y ait tout de même une fine pellicule d'eau sur le substrat [Silberzan 1991]. Le rôle de cette couche d'eau est de capturer la partie hydrophile de la molécule ainsi que de permettre à la molécule de se déplacer latéralement sur cette couche d'eau.

Grâce à cette mobilité latérale, les chaînes latérales des molécules vont se rapprocher sous l'effet des forces de Van der Waals. Plus la chaîne carbonée est longue et plus les interactions de van der Waals vont être importantes. C'est ce mécanisme qui est à l'origine de l'organisation dans ces films de molécules auto – assemblés [Breuil 2000] [Lenfant 2001]. Les molécules peuvent former des liaisons siloxane entre elles et avec le substrat comme le montre la figure II.31.

Pour obtenir une couche dense et ordonnée avec des molécules de petite taille il faut abaisser la température du bain en dessous d'une température critique [Brzoska 1992]. Pour une chaîne de 18 carbones on peut travailler à température ambiante. Pour 8 carbones, il faut travailler en dessous de -3°C.

Le nombre de points d'ancrage de cette monocouche sur le substrat dépend du nettoyage de la surface. Si il y a beaucoup de groupements silanols disponibles on aura une bonne fixation de la monocouche. Cependant, il n'est pas nécessaire qu'il y ait beaucoup de ces liaisons pour avoir une couche de bonne qualité. Par exemple il est possible de déposer sur une surface hydrophile d'or une monocouche de silane alors qu'il n'y a pas de réaction possible avec ce substrat. Le simple fait qu'il y ait une pellicule d'eau sur le substrat suffit pour que la monocouche s'organise [Finklea 1986].

IV.1.1. Nettoyage du substrat

Le premier nettoyage consiste à enlever les graisses et poussières déposées sur la surface. On a utilisé principalement du chloroforme. L'échantillon est soumis à des ultrasons pendant 5 minutes. On peut également utiliser le nettoyage par trois solvants différents dans l'ordre indiqué avec 5 minutes d'ultrason à chaque fois : acétone, alcool isopropylique, eau désionisée (18M Ω).

La deuxième étape de nettoyage est la plus importante. C'est cette étape qui va rendre la surface réactive. Nous avons adopté deux méthodes qui ont donné des résultats équivalents pour le dépôt d'ADN.

Première méthode : mélange piranha : La solution de nettoyage est composée d'un mélange de 2/3 d'acide sulfurique concentré (96%) et de 1/3 d'eau oxygénée. Le mélange est très exothermique. L'échantillon est laissé 15 minutes dans la solution. Si on veut que le nettoyage soit vraiment efficace, il faut chauffer. L'échantillon est ensuite récupéré et abondamment rincé avec de l'eau désionisée.

Un critère nécessaire d'un bon nettoyage est que la surface soit complètement mouillante. Si le film de liquide ne recouvre pas complètement la surface, il faut recommencer le nettoyage.

Attention, ce mélange piranha est extrêmement corrosif et peut réagir violemment avec des composés organiques. Il doit donc être manipulé avec précaution et en prenant les protections qui s'imposent (hotte, gant, blouse, lunette).

Deuxième méthode : plasma O₂ : Nous avons nettoyé une partie de nos échantillons avec un plasma. Le gaz utilisé est de l'oxygène. Les conditions du plasma sont (**P** = 0.1mTorr, **Débit** = 20sccm, **Puissance** = 100W, **temps** = ~1 minute). Nous avons utilisé un bâti plasmalab80plus (Oxford Instruments).

Eventuellement : UV-Ozone : On peut après avoir nettoyé le substrat rajouter une étape de nettoyage photochimique. L'échantillon est placé pendant 45 minutes dans une enceinte sous flux d'oxygène, à quelques centimètres d'une source de rayonnement ultra violet (185nm et 254nm). Ce rayonnement crée par photodissociation, respectivement de l'ozone O₃ (pour la raie à 185nm) et des radicaux O* (pour la raie à 254nm). Ces gaz viennent attaquer les contaminants organiques résiduels présents sur la surface. Nous avons constaté que cette étape n'est pas indispensable pour obtenir une monocouche de qualité suffisante à nos besoins (dépôt d'ADN).

IV.1.2. Greffage de la molécule

Le substrat nettoyé est plongé dans le bain de silanisation. Le tableau reprend les solvants, concentration en silane, temps de silanisation et précaution particulière pour chaque molécule. Les molécules que l'on a utilisées sont (ces molécules sont représentées en Annexe C) :

Silane terminé méthyle : OTS (Octadécyltrichlorosilane) : $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{SiCl}_3$

Silane terminé Fluor : 1H,1H,2H,2H-perfluorodécyltrichlorosilane : $(\text{F}_3\text{C}-(\text{CF}_2)_7-(\text{CH}_2)_2-\text{SiCl}_3)$

Silane terminé vinyle : 7-octényltrichlorosilane : $(\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_6-\text{SiCl}_3)$

L'hexadécane ou l'hexane sert à solubiliser les chaînes carbonées des molécules. Le tétraclorure de carbone sert à solubiliser le groupement -SiCl₃. La silanisation avec un silane amine est particulière. On donne dans le tableau plusieurs protocoles pour ce silane. La concentration en silane n'est pas donnée précisément. Ce n'est pas un paramètre critique. On

présente plus en détail les particularités de la silanisation amine dans la section suivante (IV.1.3.).

Le bain de silanisation est placé dans une boîte à gant afin de limiter la présence d'eau. En effet, si il y a trop d'eau dans la solution les molécules peuvent réticuler entre elles avant de se fixer au substrat. Dans ce cas on ne peut espérer obtenir une monocouche dense et ordonnée. L'obligation de travailler dans des conditions contrôlées n'est pas aussi importante pour tous les silanes. L'OTS (octadecyltrichlorosilane) donne les meilleurs résultats. Le silane qui demande le plus de précaution est le silane avec une fonction fluor. Dans ce cas, la verrerie ainsi que les solvants doivent être anhydre. En pratique nous avons étuvé la verrerie (170° - 1heure) avant de la placer dans la boîte à gant. Le silane Fluor est très réactif. La silanisation se fait très rapidement. On évitera de laisser l'échantillon trop longtemps dans le bain de silanisation afin d'éviter la formation de multicouche.

Dans le cas où la chaîne de carbone est courte (silane vinyle et Fluor) il faut travailler à basse température : -3°C. La boîte à gant dont on dispose est équipée d'une plaque qui permet de thermaliser le bain de silanisation. Le problème principal dans ce cas est de thermaliser l'échantillon. Dans ce cas, nous préparons deux solutions l'une avec le silane et l'autre de faible volume sans le silane. L'échantillon est trempé quelques instants dans le bain sans silane afin d'être thermalisé. On verse ensuite la solution avec le silane dans le bécher qui contient l'échantillon. On pourrait utiliser qu'un seul bécher et injecter le silane après la thermalisation de l'échantillon. Le problème dans ce cas, est que la concentration en silane n'est pas homogène. La conséquence est une non uniformité du greffage sur la surface.

Les silanes OTS et perfluoré (cf. Annexe C) que l'on utilise sont distillés avant usage et placés dans des ampoules scellées sous vide. En revanche on a utilisé en l'état les solutions du commerce (ABCR) pour le silane vinyle. Les solutions sont conservées sous atmosphère sèche d'azote. Malgré tout, on ne peut pas les garder très longtemps (quelques mois). Les traces d'humidité finissent par provoquer la réticulation des molécules entre elles.

| Molécule terminaison | Solvant 1 | Solvant 2 | Nombre de Carbone | T | temps | C _{silane} | rincage | remarque |
|----------------------|-----------------|-------------------------|-------------------|----------|-------|---------------------|---------|--------------|
| Méthyle | HD 60% | CCl ₄ 40% | 18 | Ambiante | 2h | 1-5mM | Chloro | Boite à gant |
| Fluor | Hexane 60% | CCl ₄ 40% | 10 | -3°C | 30mn | 1-5mM | Chloro | Boite à gant |
| Vinyle | Hexane 60% | CCl ₄ 40% | 8 | -3°C | 2h | 1-5mM | Chloro | Boite à gant |
| Amine | Toluène | | 3 | Ambiante | 30mn | 1-5mM | Chloro | Boite à gant |
| Amine | Méthanol 95% | Eau 5% | 3 | Ambiante | 30mn | 0.1mM | Chloro | |
| Amine | | | 3 | Ambiante | 2h | | | Phase vapeur |

HD : Hexadécane

Chloro : Chloroforme

Tableau II.01 : Protocole de silanisation des différentes molécules que nous avons utilisé.

IV.1.3. Silane amine

Le silane amine que l'on a utilisé est le 3-aminopropyltriméthoxysilane (NH₂-(CH₂)₃-Si-(O-CH₃)₃) (de chez ABCR). Cette molécule est représentée dans l'annexe C. Il existe de nombreux protocoles de silanisation pour cette molécule (cf. tableau II.01).

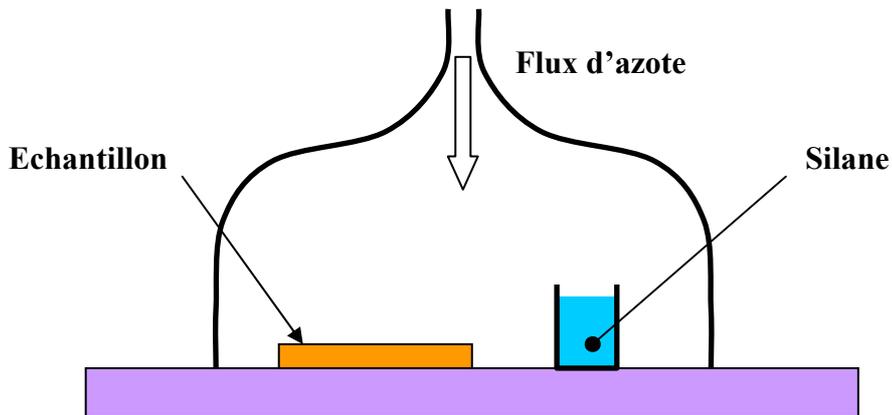


Figure II.29 : Dispositif expérimental pour déposer le silane amine en phase vapeur.

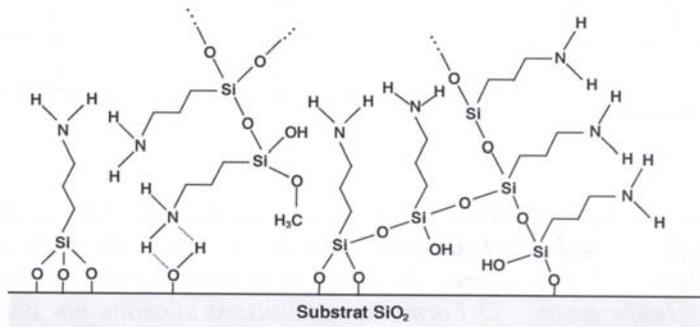


Figure II.30 : Représentation de la polymérisation du silane amine à la surface du substrat SiO₂. [Martel 2000] [Vandenberg 1991]

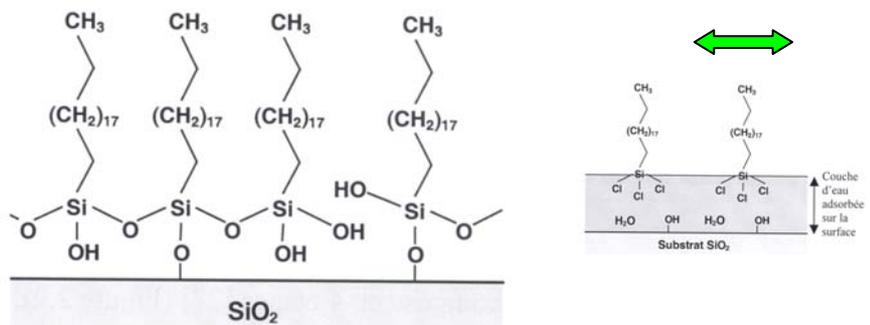


Figure II.31 : Représentation en a) de la monocouche dans le cas du silane méthyle. On représente en b) la première étape du greffage. La tête greffante des molécules se place à la surface du film d'eau présent sur l'échantillon. Les molécules peuvent se déplacer latéralement sur ce film.

Nous avons utilisé le protocole de silanisation en phase gazeuse et celui avec du toluène [Vrancken 1992] [Vrancken 1995] comme solvant. Le protocole avec une proportion importante d'eau est également présenté pour information.

Dans le cas du silane amine le groupement qui se greffe est beaucoup moins réactif que le SiCl_3 des molécules présentées précédemment. La présence d'eau permet d'hydrolyser la tête greffante de la molécule pour obtenir un groupement $\text{Si}-(\text{OH})_3$. Il y a une compétition entre le greffage sur la surface et la réticulation des molécules en solution. Les différents protocoles jouent sur les paramètres expérimentaux pour optimiser la réaction (température, temps de réaction, ultrason, ...). [Martel 2000].

L'échantillon après l'étape de greffage peut être mis à étuver pendant 15 minutes à 110°C pour favoriser la réaction des groupements silane qui n'ont pas encore réagi. On peut également mettre l'échantillon sous vide afin d'évaporer toutes les molécules qui ne sont pas fixées de manière covalente. Nous n'avons pas effectuée ces étapes sur nos échantillons. Nous les avons stockés à l'air pendant plusieurs semaines afin que la réaction de réticulation des silanes soit complète.

Le film de molécules n'est pas organisé comme l'illustre la figure II.30. La molécule que l'on utilise a deux extrémités plutôt hydrophiles. Le groupement $-\text{NH}_2$ peut s'orienter vers la surface. De plus, comme la chaîne carbonée est très courte, cela ne va pas favoriser l'ordre dans le film moléculaire. On a constaté que l'épaisseur de silane déposé croît continûment en fonction du temps suggérant une réticulation anarchique dans le film.

La silanisation en phase vapeur a l'avantage de limiter le nombre de manipulation sur l'échantillon. Il est laissé pendant 2 heures environ sous une cloche avec un flacon ouvert contenant le silane amine. On fait passer un flux d'azote très léger pour chasser l'air ambiant et garder une atmosphère sèche. Cette condition est importante pour éviter la polymérisation du silane. La quantité de molécules que l'on dépose croît avec le temps. L'échantillon est ensuite retiré et stocké en l'état. Nous avons constaté que les propriétés de mouillage changent avec le temps passé à l'air libre [Petri 1999]. En quelques semaines l'échantillon devient plus hydrophobe certainement dû à la réticulation progressive de toutes les molécules de silanes entre elles.

IV.1. Dépôt de polymères

Cette partie présente le dépôt de polymère à la tournette. C'est avec cette méthode que nous avons déposé les résines optique et électronique pour la réalisation d'électrodes (cf. partie VI.). Les polymères que l'on a utilisés sont : le polystyrène 280000MW 10% (aimablement fourni par V.Croquette), les résines optiques (S1818, ...), et les résines électroniques (PMMA et COPO).

Le principe du dépôt à la tournette est d'étaler par un mouvement de rotation un polymère sur une surface. Cette technique est adaptée pour des échantillons ronds (plaquette de silicium). En particulier, le résinage de lame de microscope pose problème. En effet, l'épaisseur n'est pas homogène sur toute la surface. De plus, on a des bourrelets de résine au bord de l'échantillon qui peuvent être très gênants pour des étapes ultérieures de masquage (cf. partie VI.).

La mesure de l'épaisseur de polymère déposé se fait en mesurant la profondeur d'une entaille faite dans le polymère avec un profilomètre (Tencor).

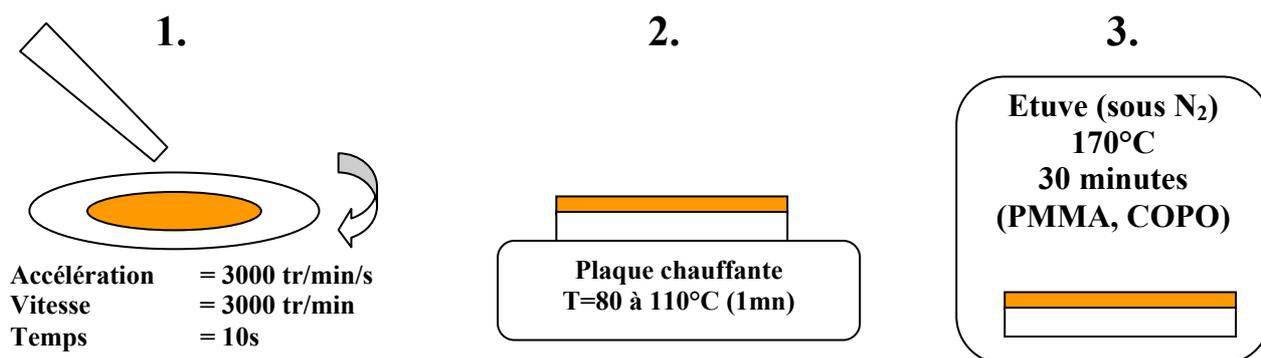


Figure II.32 : Méthode de dépôt à la tournette. Les paramètres de vitesse, d'accélération et de temps pour les échantillons dont on se sert pour faire du dépôt d'ADN sont indiqués sur la figure. Pour la fabrication d'électrodes, les paramètres sont donnés dans la partie VI. L'échantillon est placé sur une plaque chauffante pour l'évaporation du solvant dans lequel était le polymère. Les résines électroniques (PMMA, COPO) subissent un recuit supplémentaire dans une étuve sous azote à 170°C pendant 30 minutes

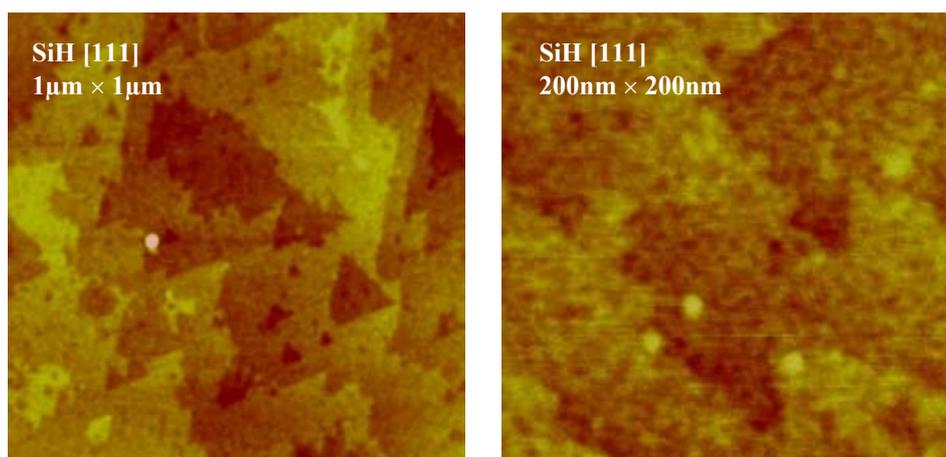


Figure II.33 : Surface de silicium [111] passivée hydrogène. On voit les terrasses atomiques. Les triangles que l'on voit sont une signature de L'orientation [111] de notre substrat. On peut voir sur l'image de droite que la surface est rugueuse même au niveau d'une terrasse. Image obtenue en AFM mode tapping.

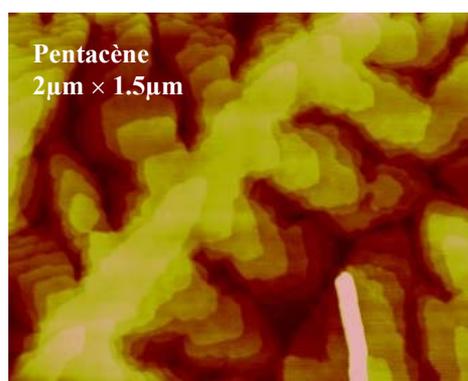


Figure II.34 : Dépôt de pentacène sur une surface amine. On voit clairement les terrasses moléculaires. La vitesse du dépôt est inférieure à 0.1Angström/seconde. Image obtenue en AFM mode tapping.

Les paramètres pertinents du dépôt sont l'accélération, la vitesse, et le temps de rotation. Plus le polymère est visqueux, plus le dépôt sera épais. L'épaisseur diminue si on augmente la vitesse, l'accélération et le temps de rotation. Une fois le polymère déposé on place l'échantillon sur une plaque chauffante pour faire évaporer les solvants. Les résines électroniques (PMMA et COPO) subissent un recuit supplémentaire d'une demi heure à 170°C dans une étuve sous atmosphère d'azote. On peut déposer plusieurs épaisseurs de polymère.

Les échantillons que nous avons préparés avec cette technique nous ont servi à deux choses. Ceux dont on se sert pour faire des dépôts d'ADN. Dans ce cas, les paramètres typiques d'accélération de vitesse et de temps sont indiqués sur la figure II.32. Les échantillons utilisés pour fabriquer des électrodes nécessitent des paramètres de dépôt particuliers à chaque résine. Ces paramètres sont indiqués dans la partie VI.

IV.1. SiH[111]

Les surfaces SiH[111] sont préparés à partir de plaquette de silicium [111] recouverte d'un oxyde natif (1 à 2nm). Le substrat est d'abord nettoyé avec un mélange piranha (2/3 acide sulfurique : 1/3 eau oxygénée). On utilise du NH₄F (40%) pour enlever l'oxyde et passiver hydrogène la surface. Pour information on utilise du HF pour enlever l'oxyde sur les plaquettes orientées [100].

Les triangles que l'on voit sur la figure II.33 proviennent de la structure cristallographique de la surface. On peut constater que les terrasses ne sont pas très étendues. De plus, on a observé quelques fois une forte rugosité sur les terrasses.

Afin de limiter ce phénomène, il faut chasser l'oxygène de la solution de NH₄F. En effet l'oxygène présent va réoxyder les marches (les faces [100] sont plus réactives que les faces [111]), et le NH₄F va enlever l'oxyde former et ainsi de suite. Cela explique en particulier la formation des triangles que l'on voit sur la figure II.33. Pour enlever l'oxygène on fait buller de l'azote une demi heure dans la solution. De plus, l'utilisation de substrat dépolis sur une face donne de meilleurs résultats. Dans ce cas, la face dépolie joue le rôle de piège à oxygène. L'échantillon est rincé avec de l'eau désionisée [Linford 1993] [Linford 1995] [Allongue 2000].

On peut observer la structure cristalline du substrat à l'AFM même après quelques jours. Ce comportement est différent des surfaces SiH[100] qui se réoxydent en quelques heures.

IV.1. Pentacène

Nous avons utilisé le pentacène à l'origine pour contacter électriquement l'ADN (cf. chapitre IV.). Nous avons constaté que l'on pouvait obtenir des terrasses de taille assez importante surtout à faible épaisseur (cf. figure II.34). Le pentacène est déposé sous vide (10⁻⁶ Torr) par évaporation. La vitesse de dépôt est inférieure à 0.1Angström/seconde.

V. Caractérisation des surfaces

Les surfaces que nous avons préparées sont destinées principalement au dépôt d'ADN. Nous n'avons pas cherché à les caractériser très précisément. Le critère principal étant la réussite du dépôt d'ADN.

La seule caractérisation que nous avons faite pour tous nos échantillons est la mesure d'angle de mouillage de différents liquides déposés sur la surface. On a ainsi accès à l'énergie de surface. Dans le cas de substrats modifiés par greffage de molécules, cette méthode nous permet de savoir rapidement si on a réussi le greffage.

On a également mesuré à l'AFM la hauteur des films moléculaires. Cette étude est intéressante dans le cas du silane amine pour savoir quelle est l'épaisseur de la couche de molécules.

V.1. Caractérisation avec les énergies de surface

Lorsqu'on dépose une goutte sur une surface, chacun peut constater qu'elle peut selon les cas s'étaler ou au contraire ne pas mouiller la surface. On peut quantifier ce phénomène en mesurant l'angle de mouillage de la goutte sur la surface (cf. figure II.36). Pour des mesures reproductibles, la surface doit être la plus plane possible. La rugosité de la surface modifie les propriétés de mouillage. Par exemple une surface très rugueuse peut devenir complètement hydrophobe [Barthlott 1997]. Dans le cas de l'eau, si l'angle est supérieur à 90° on parle de surface hydrophobe et hydrophile sinon. La mesure avec d'autres liquides permet de remonter à l'énergie de surface.

Nous allons rappeler ci-après une relation thermodynamique (II.13) définissant un angle à l'équilibre que doit former la goutte avec le substrat (cf. figure II.35).

En réalité, il n'existe pas un angle de contact unique. Si on tente de déplacer la goutte (en penchant le substrat), l'angle de contact sur le front de la goutte ou à l'arrière ne sont pas rigoureusement les mêmes. On note $\theta_{\text{avancée}}$ et θ_{recul} ces deux angles. La valeur $\theta_{\text{équilibre}}$ se situant entre ces deux valeurs. La mesure de l'angle de contact peut varier suivant les conditions expérimentales (volume de la goutte, ...). L'origine de cette hystérésis est l'état de surface, la présence de contaminant, ... Nous avons constaté que l'indétermination (de quelques degrés) augmentait pour les liquides les plus mouillants (angle de contact $< 50^\circ$). En revanche, l'indétermination est très faible ($\sim 1^\circ$) lorsque l'angle mesuré est grand (angle de contact de l'ordre de 90°). Afin d'évaluer la reproductibilité des mesures, plusieurs sont répétées au même endroit et à plusieurs endroits de la surface puis moyennées. De plus, le dépôt de la goutte se fait toujours de la même façon, avec la même quantité de liquide. L'incertitude sur nos mesures étant tout à fait acceptable, nous n'avons pas jugé utile d'aller plus avant dans la détermination des angles de contact. L'utilisation de surfaces très planes telles que des wafers de silicium (rugosité de l'ordre de 0.1nm) dans un environnement contrôlé (salle blanche), limite la pollution et les effets géométriques à l'origine du phénomène d'hystérésis.

V.1.1. Equation de Young – Dupré

On peut voir les phénomènes d'interface d'un point de vue des forces. En effet, on peut considérer la surface comme un film capable d'exercer une force sur la ligne d'ancrage. Par exemple, la pression dans une bulle de savon est supérieure à la pression atmosphérique, d'autant plus que la bulle est petite. La courbure du film liquide exerce une force qui comprime le gaz emprisonné.

$$\gamma_l \cos(\theta) = \gamma_{sg} - \gamma_{sl} \quad (\text{II.13})$$

Dans le cas d'une goutte déposée sur un substrat la ligne d'ancrage est soumise à trois forces correspondant aux trois interfaces : *solide - liquide (sl)*, *liquide - gaz (lg)* et *solide - gaz (gs)* (cf. figure). Le bilan des forces dans le plan de la surface donne la relation ci-dessus (II.13). La tension superficielle du liquide et du gaz vaut en fait celle du liquide. On la note $\gamma_l = \gamma_{lg}$.

V.1.2. Equation d'Owens-Wendt

En toute rigueur, on ne peut parler que de la tension superficielle d'une interface, qui dépend des deux composés de part et d'autre. Néanmoins, empiriquement, on constate qu'il est tout de même possible de séparer la contribution de chaque matériau. Tout d'abord, dans l'hypothèse où un *matériau A* serait en contact avec une surface inerte ne présentant pas ou très peu d'interaction (l'air par exemple, ou le vide), alors il se crée un déséquilibre à la frontière de ce *matériau*. Le comportement à l'interface n'est plus le même qu'en son cœur, il peut par exemple apparaître des charges dans le cas de solution ionique avec plusieurs espèces (double couche). De plus, deux particules qui interagissent avec un certain potentiel dans le matériau massif auront une interaction différente à proximité de la surface. Les contraintes qui apparaissent sont relaxées sur une zone très fine proche de l'interface. On peut caractériser d'un point de vue macroscopique ce réarrangement par une énergie de surface que l'on note γ_A .

Si on met le *matériau A* en contact avec un *matériau B*, le déséquilibre peut être accentué ou au contraire relaxé. La présence de *B* induit une réponse dans *A* et réciproquement. On peut donner une relation empirique de la tension de surface de l'interface γ_{AB} en fonction de γ_A et γ_B [Ulman 1991].

$$\gamma_{AB} = \gamma_A + \gamma_B - 2\sqrt{\gamma_A \gamma_B} \quad (\text{II.14})$$

On notera que dans la limite où les deux matériaux sont identiques, on a bien une tension de surface nulle. Dans la limite où il n'y a qu'un seul composé (i.e. $\gamma_B = 0$), on retrouve la valeur du composé *A*. L'interaction est une moyenne géométrique des deux tensions de surface.

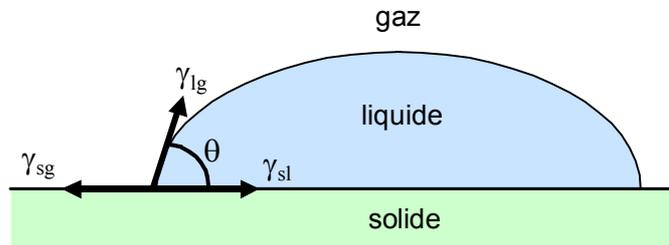


Figure II.35 : Forces qui s'appliquent au niveau de la ligne triple. La somme des forces projetée sur le plan du substrat donne la relation $\cos \theta = \frac{\gamma_{sg} - \gamma_{sl}}{\gamma_{lg}}$.

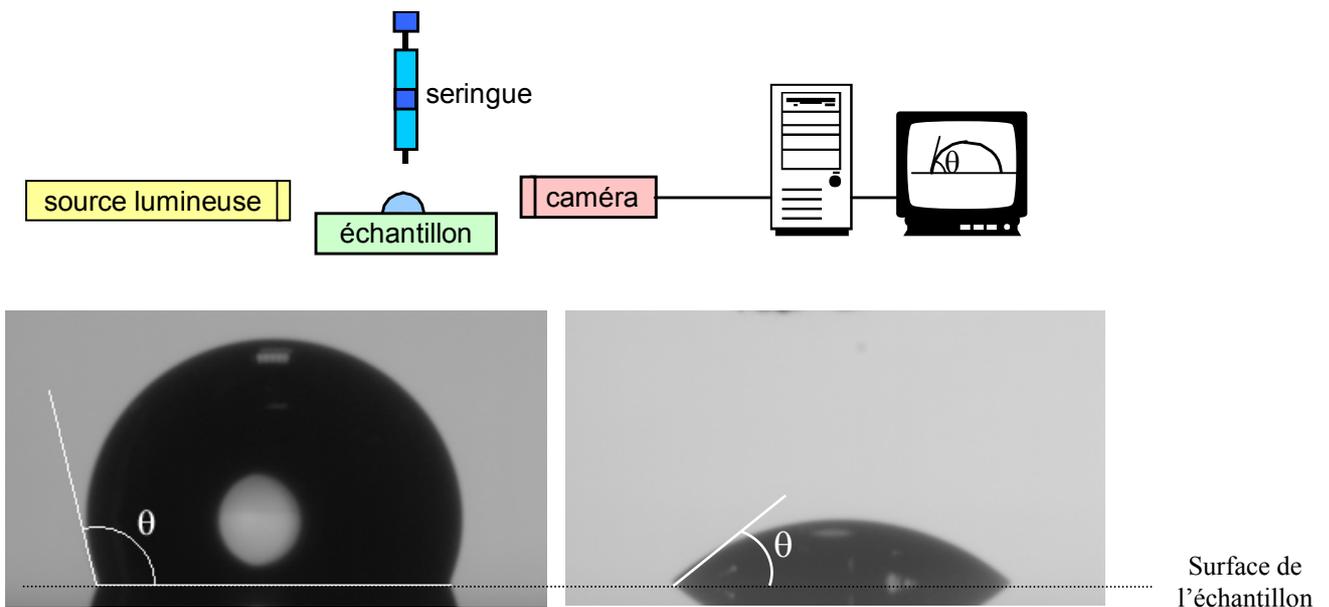


Figure II.36 : Digidrop de la société GBX. Cette appareil permet de déposer et de mesurer l'angle de contact d'une goutte posée sur une surface. On éclaire la goutte sur le côté. Une caméra CCD permet de saisir l'image de la goutte. Un logiciel de traitement d'image permet de remonter à l'angle de contact. Si le liquide est de l'eau $\theta_{\text{aigu}} < 90^\circ$ à une surface hydrophile, sinon la surface est hydrophobe. On représente l'angle que forme une goutte d'eau (photo de gauche) et une goutte d'hexadécane (photo de droite) sur une surface d'octadecyltrichlorosilane (OTS). On mesure $\theta_{\text{H}_2\text{O}} = 109^\circ$ et $\theta_{\text{HD}} = 42^\circ$.

Pour pouvoir aller plus loin, il faut distinguer entre les différents types d'interaction. On peut distinguer la composante polaire et dispersive correspondant respectivement à l'interaction entre dipôle comme dans l'eau, et à l'interaction de Van der Waals. Ces deux contributions n'interagissent pas entre elles ou très peu. On a alors la formule plus complète [Ulman 1991].

$$\gamma_{AB} = \gamma_A + \gamma_B - 2\sqrt{\gamma_A^d \gamma_B^d} - 2\sqrt{\gamma_A^p \gamma_B^p} \quad (\text{II.15})$$

V.1.3. Mise en œuvre

L'appareil que l'on utilise est un goniomètre *Digidrop* de la société *GBX*. La goutte (quelques dizaine de μl) est déposée sur le substrat à l'aide d'une seringue, est éclairée sur le côté par un faisceau de lumière blanche. Une caméra enregistre la forme de la goutte, et un logiciel de traitement d'image permet d'extraire l'angle à partir de l'image (cf. figure II.36).

A partir des équations (II.14) et (II.15) on peut déduire les équations (II.16) et (II.17). Cette équation exprime la composante polaire et dispersive de la surface en fonction de celle de différents liquides. Les liquides ayant une composante polaire non négligeables sont : eau, diéthylène glycol, diiodométhane, alcool benzylique. Les liquides dont on peut négliger la composante polaire sont tous les alcanes. On dispose de : hexadecane, undecane, decane et octane.

Si on trace le premier membre de l'équation (II.17) en fonction de $\sqrt{(\gamma^p/\gamma^d)}$ on doit obtenir une droite dont la pente est la valeur à l'origine donne les deux composantes dispersive et polaire de l'énergie de surface (cf. tableau II.02).

Pour les surfaces ayant une faible composante polaire, on utilisera plutôt des alcanes comme liquide. Dans ce cas la formule (II.17) se simplifie. On obtient la relation (II.18). On trace alors $\cos(\theta)$ en fonction de la composante dispersive de l'énergie de surface des différents alcane.

$$\gamma_1(1 + \cos(\theta)) = 2\sqrt{\gamma_1^d \gamma_s^d} + 2\sqrt{\gamma_1^p \gamma_s^p} \quad (\text{II.16})$$

En conclusion, on notera que chaque liquide est sensible à un certain type d'interaction. Par exemple, dans le cas d'une surface méthyle « ratée », on peut trouver un angle de contact avec l'eau de 109° , alors qu'on va mesurer presque 0° avec l'hexadecane alors que la valeur attendue est de 42° . Ce désaccord peut être interprété par le fait qu'on a dans ce cas une couche désordonnée. Les molécules d'hexadecane s'insèrent dans la monocouche. Cela explique l'étalement de la goutte [Bain 1989]. Cet exemple illustre le fait que l'eau n'est pas sensible à l'ordre d'une surface méthyle contrairement aux alcanes. On notera également qu'on peut vérifier très rapidement si on a greffé une couche dense et ordonnée. Cette remarque est valable pour les surfaces vinyle et fluor.

Inversement, pour la surface amine on se fiera plutôt à l'angle obtenu avec l'eau. Les surfaces fraîchement préparées ont un angle avec l'eau de 40 à 50° . Après quelques semaines l'angle augmente jusqu'à 70° [Petri 1999].

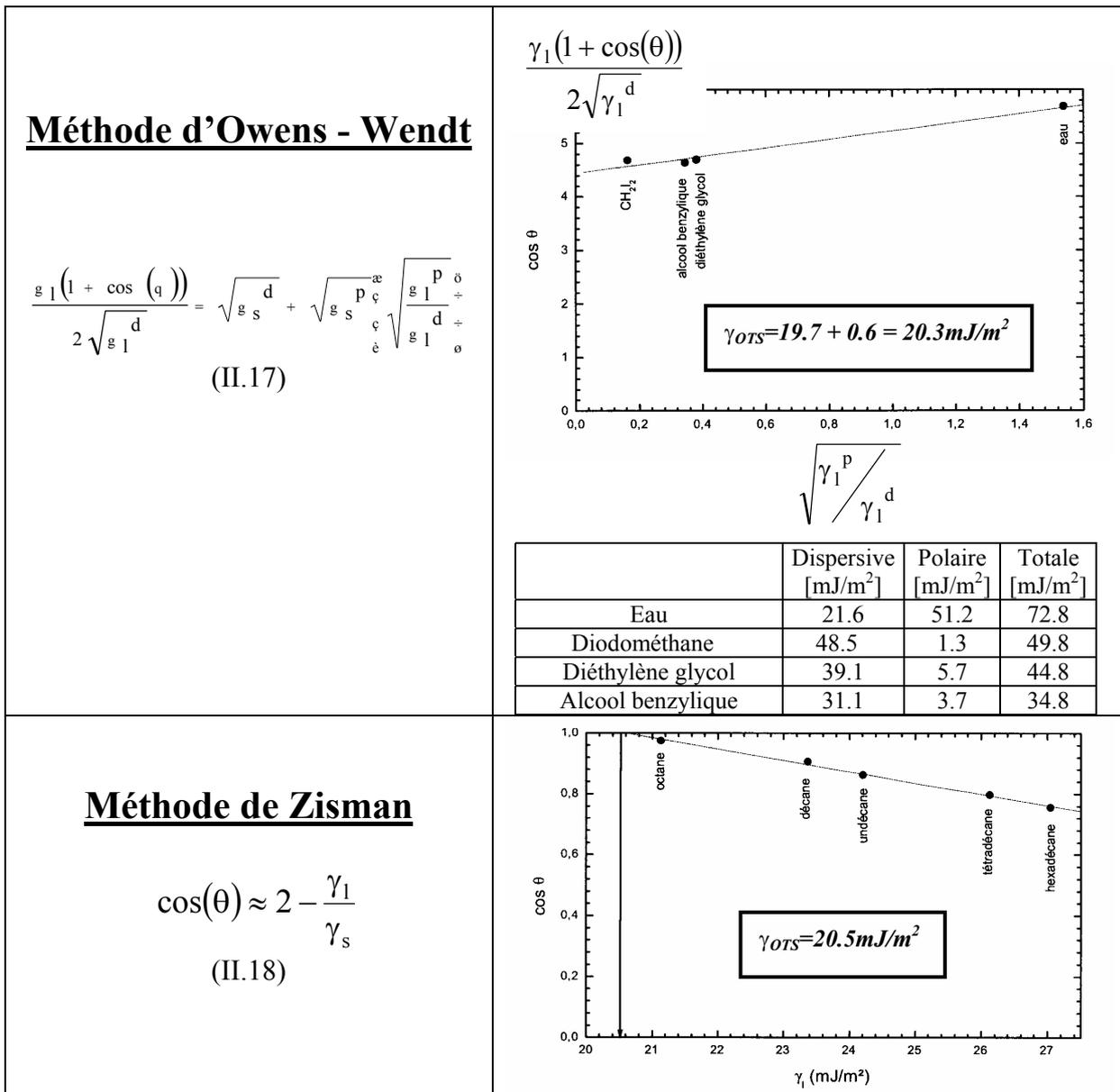


Tableau II.02 : Mesure de la composante dispersive et polaire d'une surface méthyle (OTS) par la méthode de Zisman et d'Owens – Wendt. On donne la composante polaire et dispersive des différents liquides. On trouve pour chaque méthode les valeurs de 20.3mJ/m² et 20.5mJ/m². La composante polaire mesurée par la méthode Owens – Wendt est de 0.6mJ/m². Elle est très faible comme on pouvait s'y attendre pour une surface méthyle.

V.2. Caractérisation à l'AFM

Nos surfaces pour le dépôt d'ADN doivent être planes. C'est généralement le cas. Nous avons eu le plus de problème avec les surfaces vinyle et fluor qui ont tendance à se polluer rapidement. De plus, les surfaces fluor peuvent être très rugueuse par la formation de multicouche. C'est pour cette raison que nous avons peu d'images à l'AFM de molécules d'ADN déposées sur ces surfaces.

| Volume de toluène | Volume de silane | Temps de silanisation | Hauteur mesurée |
|-------------------|------------------|-----------------------|-----------------|
| 40ml | 10 μ l | 6mn | 2.2nm |
| 40ml | 10 μ l | 6mn | 2.656nm |
| 40ml | 10 μ l | 20mn | 1.865nm |
| 40ml | 5 μ l | 30mn | 1.69nm |
| 30ml | 20 μ l | 30mn | 3.893nm |
| 30ml | 20 μ l | 1h | 8.707nm |
| 30ml | 20 μ l | 2h | 1.565nm |
| 30ml | 50 μ l | 2h | 1.715nm |
| 30ml | 100 μ l | 2h | 12.14nm |



Tableau II.03 : hauteur mesurée du silane amine greffé sur SiO₂. On a une forte dispersion des valeurs. La hauteur d'une monocouche de molécule est de **0.86nm**

Figure II.37 : Allure de la zone de mesure de l'épaisseur des films moléculaires. Cette image a été faite en mode tapping. Les dimensions sont 2 μ m \times 1.53 μ m.

Nous avons également vérifié à l'AFM l'épaisseur des films moléculaires que l'on greffe (cf tableau II.03 et figure II.37). Pour cela nous avons fait des ouvertures dans une résine électronique. Nous avons avant chaque silanisation fait un plasma O₂ de l'échantillon pendant 1minute pour nettoyer les ouvertures et préparer la surface pour le greffage des molécules. On enlève la résine une fois qu'on a fini le greffage et on mesure la hauteur du film moléculaire par AFM.

Dans le cas du silane amine (greffage en solution), nous avons pu constater que l'épaisseur du film augmente continûment avec le temps (cf. tableau II.03). De plus, l'épaisseur mesurée n'est pas reproductible d'une silanisation à l'autre et d'un endroit à l'autre de l'échantillon. Le film moléculaire n'est pas organisé (cf. figure II.30).

Cette méthode nous a permis de constater que les silanes amine se greffe effectivement avec notre protocole en solution, que l'ADN polymérise continûment sur la surface et enfin qu'il est difficile d'obtenir une hauteur reproductible [Choi 2000].

Finalement le protocole que nous avons choisi pour la silanisation amine est celui en phase gazeuse par la simplicité de mise en œuvre et par le fait que les surfaces préparées par cette méthode sont très propres et homogènes à l'AFM. Nous n'avons pas vérifié avec ce protocole en phase gazeuse la hauteur du film en fonction du temps.

Dans le cas du silane OTS, on doit trouver une hauteur de 23Angström [Breuil 2000]. Nous avons trouvé un peu moins que la hauteur attendue car la couche formée n'est pas dense (cf. figure II.38). On distingue des îlots sur la zone silanisée.

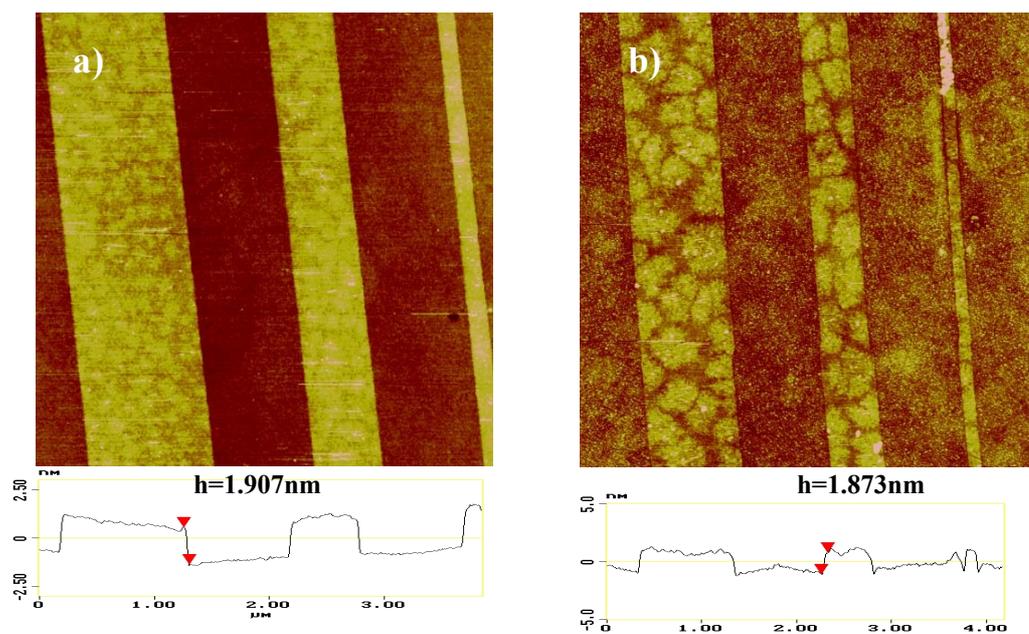


Figure II.38 : Greffage sélectif du silane OTS. On peut constater en b) que la couche n'est pas complète [Breuil 2000]. En a) la monocouche est plus homogène. On attend une hauteur de 2.3nm. On mesure une hauteur inférieure car la couche que l'on greffe n'est pas complète

VI. Manipulation et observation de l'ADN

VI.1. Solutions d'ADN

L'ADN que l'on utilise est le λ -ADN (Roche Biomedicals) et du poly (dG).poly(dC) et poly(dA).poly(dT) (Amersham Pharmacia Biotechnology Inc.). L'ADN que l'on reçoit est décongelé une première fois pour être aliquoté en portion de $5\mu\text{l}$ puis recongelé.

Les tampons que l'on utilise sont le Tris et le MES de chez Aldrich (cf. Annexe C). Ces molécules sont représentées dans l'Annexe C. On utilise ce tampon généralement à 10mM. Afin de limiter l'action d'éventuelles enzymes sur l'ADN, on rajoute de l'EDTA à 1mM. On a également préparé des tampons avec du MgCl_2 . Dans ce cas on ne met pas d'EDTA.

Nous avons préparé 1L de solution à 10mM de la forme basique et acide du tris ainsi qu'une solution de MES. Nous avons également préparée le même jeu de solution avec 1mM d'EDTA en plus. Nous avons donc 6 solutions mères de 1L stockée dans des bouteilles en verre à l'abri de la lumière. Les bouteilles en verre ont été nettoyées avec un piranha et abondamment rincée à l'eau désionisée (une dizaine de fois).

Pour préparer nos tampons de Tris, nous mélangeons les solutions de la forme basique et acide du tampon sachant que le Tris est un acide faible de $\text{pK}_a = 8.1$. Nous prélevons un échantillon de cette solution et nous en mesurons le pH. Il est possible surtout s'il y a de l'EDTA (qui a 4 acidités) que le pH de la solution préparée soit loin de celui qu'on attendait. Dans ce cas on recommence jusqu'à arriver au bon pH.

Chapitre II : Techniques expérimentales

Pour préparer les tampons de MES, on rajoute de la soude ou bien de l'acide chlorhydrique pour ajuster le pH.

Nos solutions sont préparées et stockées dans des flacons de 100ml en plastique. Elles se gardent au moins six mois. Nous avons toujours manipulé ces solutions avec précaution pour éviter toute contamination.

Pour préparer une solution contenant de l'ADN, on verse dans un petit flacon en plastique le tampon on y rajoute 5 μ l de la solution mère d'ADN. Avec une dilution de 1000 fois on arrive à une concentration d'ADN de 10pM environ. Cette solution est conservée à 4°C. Elles se gardent environ 1 mois. Au delà nous avons constaté une perte de reproductibilité de nos expériences de dépôt.

VI.2. ADN fluorescent

Pour observer l'ADN au microscope, il faut préalablement insérer dans la double hélice des molécules fluorescentes. Nous avons utilisé du YOYO-1 (cf. Annexe C). *Attention : cette molécule s'intercale dans l'ADN. La notice toxicologique précise que cet agent peut être mutagène.* Cette molécule est représentée dans l'annexe C.

Cette molécule peut s'intercaler entre les paires de bases de l'ADN. Elle n'est fluorescente qu'une fois intercalée [Matsumoto 1981]. On s'arrange pour avoir une molécule fluorescente tous les 20 paires de base environ. Nous avons constaté que c'était suffisant pour bien distinguer les molécules d'ADN. Lorsqu'on met plus de YOYO-1, on a observé plus de fluorescence parasite. De plus l'intercalation fragilise l'ADN. Sous l'effet du rayonnement lors de l'observation au microscope la molécule d'ADN finit par être coupée.

On a procédé de la manière suivante pour préparer notre solution d'ADN. On dilue la solution mère d'ADN ainsi que la solution mère de YOYO-1 100 fois. On mélange les deux solutions et on laisse incuber quelques heures à 4°C. Une fois cette étape terminée on finit alors de diluer la solution jusqu'à obtenir la concentration de travail.

Nous avons constaté que si on mélange directement l'ADN et le YOYO-1, on forme une sorte de précipité. Inversement, si on utilise des solutions trop diluées, on a constaté qu'il faut laisser incuber la solution plus longtemps pour que tout le YOYO-1 réagisse avec l'ADN. Enfin, lors du mélange des deux solutions il faut agiter pour qu'elle se mélange rapidement. En effet dans le cas contraire, on a observé que les brins d'ADN n'ont pas tous le même niveau de fluorescence. L'explication viendrait du fait que sans agitation, on a une inhomogénéité de concentration de YOYO-1. Par conséquent on peut s'attendre à ce que les molécules n'aient pas la même quantité de molécules fluorescentes intercalées.

VI.3. Observation au microscope

Nous utilisons un microscope (Leica DMLS) pour observer l'ADN dans lequel on a inséré les molécules de YOYO-1 (oxazole homodimer). L'excitation se fait à une longueur d'onde de 491nm (bleu). On récupère le signal à une longueur d'onde de 509nm (vert). La sélection de la fréquence de travail et le filtre de coupure constitue sont placés respectivement sur le trajet aller et d'observation de la lumière (cf figure II.39).

En présence d'une solution d'ADN qui contient beaucoup de sels ($>0.1M$), on observe une fluorescence parasite importante. On a certainement un relargage du YOYO-1 dans la solution.

Lorsqu'on observe l'ADN continûment on constate que le signal de fluorescence diminue. On parle de photoblanchiment. On peut utiliser du mercaptoéthanol que l'on rajoute à 4% dans la solution d'ADN. Cela limite l'effet de photoblanchiment. De plus, la molécule finit par être abîmée au cours de l'observation. Elle est en général coupée [Kang 2001]. En effet la désexcitation de la molécule fluorescente peut se faire par voie chimique au lieu de se faire par émission de photons. En particulier, le squelette phosphate peut être coupé. La coupure des deux brins rompt définitivement la molécule. On peut observer ce phénomène au microscope.

On utilise un objectif Leica DML/HCX-PL Fluotar ($\times 100$) à immersion dans l'huile. L'ouverture numérique de l'objectif est de 1.3. Cela signifie qu'on récupère quasiment toute la lumière émise. L'éclairage pour l'observation en fluorescence doit être de bonne qualité. Il faut éclairer l'échantillon avec une intensité suffisante pour pouvoir observer de faible niveau de fluorescence. La lampe qu'on utilise est une lampe au mercure à haute pression. L'émission de la lumière se fait sur une zone d'environ 1 mm de diamètre. Les ampoules qu'on utilise ont une durée de vie de 100 heures. Au-delà, il y a un risque d'explosion de l'ampoule.

Le microscope est muni d'une caméra noir et blanc (Coolsnap – photometrics). Le détecteur est refroidi par effet peltier. Cette caméra est d'une sensibilité légèrement supérieure à l'œil.

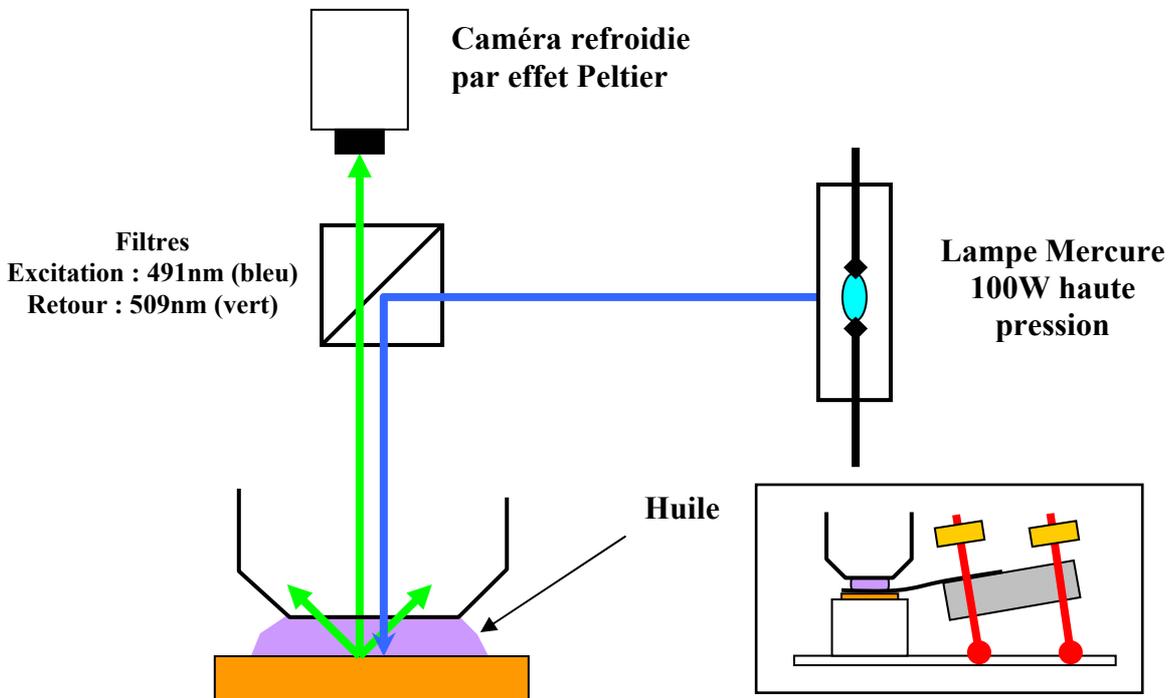


Figure II.39 : Schéma d'un microscope à fluorescence. L'objectif est à immersion à grande ouverture numérique. L'éclairage provient d'une lampe à mercure haute pression. Un jeu de filtre permet de sélectionner la longueur d'onde d'excitation du YOYO – 1 (509nm). Un deuxième filtre sélectionne la longueur d'onde d'émission (491nm). Une caméra refroidie par effet Peltier est reliée au microscope pour l'acquisition des images. Pour les échantillons de petite taille, on utilise une lamelle qui plaque l'échantillon contre le support (Le dispositif est représenté en insert).

Enfin, comme les échantillons qu'on utilise sont très petits (moins de 1cm de diamètre), nous avons adapté la plateforme du microscope pour maintenir l'échantillon à l'aide d'une lamelle en verre. De plus comme l'échantillon n'est pas en contact avec l'huile, on peut ensuite l'observer à l'AFM (cf. figure II.39).

VII. Réalisation d'électrodes

On présente dans cette partie les techniques de lithographies. Le principe consiste à faire des ouvertures dans une résine et métalliser l'échantillon. Lorsqu'on enlève la résine il ne reste que le métal déposé directement sur la surface (Lift – off).

Suivant la résolution que l'on veut atteindre on choisira la lithographie électronique pour des dimensions inférieures à 1 μ m et la lithographie optique sinon [Williams 1984].

VII.1. Lithographie électronique

L'échantillon pour cette technique doit être conducteur pour pouvoir évacuer les charges que l'on envoie sur le substrat. Cette technique est adaptée aux plaquettes de silicium même si elles comportent un oxyde épais (300nm d'oxyde dans notre cas).

Les résines que l'on utilise sont le PMMA (polyméthylméthacrylate) et COPO (copolymère de PMMA et de MMA (méthylméthacrylate)). Ce qui différencie les différentes résines sont la masse molaire du polymère et sa concentration. On dépose généralement la résine en bicouche pour faire des profils casquette. Cela permet de créer une coupure dans le film de métal qu'on dépose sur l'échantillon (cf. figure II.40). Ainsi lorsqu'on enlève la résine lors de la dernière étape (cf. figure II.40) on n'a pas de problème de pont de métal qui reste entre les électrodes, ... Ces problèmes deviennent non négligeables lorsque la taille des motifs diminue.

On arrive à obtenir un profil casquette car la première couche de résine est plus sensible que la deuxième. Ainsi, même si les deux résines reçoivent la même dose de bombardement électronique, la résine la plus sensible va donner une ouverture plus importante. On obtient ainsi le profil casquette (cf. figure II.40).

Pour la réalisation d'électrodes, il faut déterminer la dose optimale (l'intensité du faisceau d'électron). Pour cela on fait une variation de dose. Cela consiste à répéter le même motif pour différentes doses. On métallise, on enlève la résine (avec de l'acétone), puis on observe le résultat au microscope électronique. La meilleure dose correspond aux électrodes non court – circuitées avec les ouvertures complètement dégagées. Il ne doit pas rester de résine au fond.

Il est tout à fait possible de trouver pour la dose optimale un espace inter électrode plus petit que ce qu'on a dessiné (cf. figure II.41). Cela est dû à des effets de proximité. En effet, le faisceau d'électron passe de part et d'autre de l'espace inter électrode (pour écrire les électrodes). De ce fait, la résine à cet endroit reçoit des électrons diffusés ou retrodiffusés [Williams 1984] [Cahn 1996]. Dans le cas de plaquettes de silicium ce problème n'est pas très gênant. Ces effets de proximité dépendent de la géométrie des électrodes. On peut tirer parti de cet effet pour diminuer l'espace inter électrode. On peut arriver ainsi à des distances de 20nm. Pour information, la résolution du masqueur LEICA a été améliorée récemment (~7nm). Actuellement la réalisation d'électrodes séparées de quelques dizaine de nm ne devrait poser « aucun » problème particulier.

Le dépôt de métal se fait par évaporation sous vide. On dépose une couche d'accroche en titane avant de déposer l'or ou le platine. Il vaut mieux utiliser du platine comme métal. Avec des électrodes en or, nous avons eu des problèmes de déformation des électrodes (cf. chapitre 4) qui finissaient par être court-circuitées puis détruites.

| | |
|---|--|
| Dépôt de la résine à la tournette | Résine : COPO 4% (MMA 8.5) a = 5000 ; v = 3000 ; t = 20s ; e = 40 à 50nm |
| Recuit sur plaque chauffante | T = 80°C ; t = 1mn |
| Recuit dans l'étuve sous atmosphère d'azote | T = 170°C t = 30mn |
| Dépôt de la deuxième résine | Résine : PMMA 3% 495K a = 5000 ; v = 3000 ; t = 20s ; e = 40 à 50nm |
| Recuit sur plaque chauffante | T = 80°C ; t = 1mn |
| Recuit dans l'étuve sous atmosphère d'azote | T = 170°C t = 30mn |
| Exposition | Dose = $\sim 180\mu\text{C}/\text{cm}^2$ (dépend du motif et du substrat) |
| Révélation | Révéléateur : Mélange IPA/MIBK (2 : 1) t = $\sim 60\text{s}$ (à optimiser avec la dose) |
| Rincage | IPA |

Tableau II.04 : Protocole de lithographie électronique pour les motifs de **taille nanométrique**

| | |
|---|--|
| Dépôt de la résine à la tournette | Résine : COPO 11% (MMA 8.5) a = 1000 ; v = 2000 ; t = 12s ; e = 700nm |
| Recuit sur plaque chauffante | T = 80°C ; t = 1mn |
| Recuit dans l'étuve sous atmosphère d'azote | T = 170°C t = 30mn |
| Dépôt de la deuxième résine | Résine : PMMA 5% 50K a = 5000 ; v = 2000 ; t = 12s ; e = 800nm |
| Recuit sur plaque chauffante | T = 80°C ; t = 1mn |
| Recuit dans l'étuve sous atmosphère d'azote | T = 170°C t = 30mn |
| Exposition | Dose = $\sim 180\mu\text{C}/\text{cm}^2$ (dépend du motif et du substrat) |
| Révélation | Révéléateur : Mélange IPA/MIBK (2 : 1) t = $\sim 60\text{s}$ (à optimiser avec la dose) |
| Rincage | IPA |

Tableau II.05 : Protocole de lithographie électronique pour les motifs de **taille micrométrique**.

a : accélération de la tournette. v : vitesse de la tournette. t : temps de rotation de la tournette

e : épaisseur de la résine déposée

COPO x% (MMA y) : copolymère issu d'un mélange de x% en masse de PMMA et de y % de MMA (méthyl méthacrylate) dans un solvant d'éthyl lactate.

PMMA x% yK : x% en masse de PMMA (polyméthylméthacrylate) de poids moléculaire $y \times 1000$ dans un solvant d'anisole.

MIBK : méthylisobutylketone.

IPA : alcool isopropylique.

VII.2. Lithographie optique

Les résines que l'on a principalement utilisé en lithographie optique sont : AZ1505, et S1818. L'échantillon sur lequel on a déposé la résine est insolé par des ultra violets à travers un masque que l'on dépose sur l'échantillon. La résolution va dépendre de la qualité du contact entre le masque et la surface.

On peut si nécessaire obtenir des profils casquette. Dans ce cas on peut durcir la surface de la résine. Par conséquent au moment de la révélation la surface sera moins gravée par le révélateur que le dessous de la résine.

Dans le cas où on dépose de faibles épaisseurs de métal le profil casquette n'est pas indispensable. Nous avons travaillé dans cette configuration.

Nous avons utilisé la résine S1818 pour la préparation de lames de microscope en vue d'obtenir des contrastes chimiques (cf. chapitre III).

Le dépôt métallique se fait de la même façon que pour la résine électronique.

La lithographie optique est plus facile et rapide à mettre en œuvre. Le temps d'écriture d'une plaquette en lithographie électronique peut prendre plusieurs heures alors qu'il prend quelques secondes en optique. De plus dans le cas du masqueur électronique il faut rajouter au temps d'écriture le temps de pompage pour faire le vide.

Les protocoles de lithographie sont donnés pour les deux résines dans le tableau II.06.

| | Résine S1818 | | Résine : AZ1505 |
|---|---|--|---|
| Promoteur d'adhérence de la résine (facultatif) | HMDS a = 4000 ; v = 2500 ; t = 12s | | HMDS a = 1000 ; v = 3000 ; t = 12s |
| Dépôt de la résine à la tournette | a = 2500 ; v = 2500 ; t = 12s | a = 3000 ; v = 3000 ; t = 15s | a = 5000 ; v = 2600 ; t = 10s |
| Recuit sur plaque chauffante | T = 110°C ; t = 1mn | T = 120°C ; t = 3mn | T = 100°C ; t = 1mn |
| Exposition | A puissance = 9mW/cm ² t = 6s | A puissance = 17.5mW/cm ² t = 4s | A puissance = 9mW/cm ² t = 1.5s |
| Révélation | Révélateur : MF319 t = 25-30s | Révélateur : MF319 t = 20s | Révélateur : MIF 726 t = 15s |
| Rincage | Eau désionisée | Eau désionisée | Eau désionisée |
| Recuit sur plaque chauffante | T = 120°C ; t = 2mn | | T = 110°C ; t = 3mn |

Tableau II.06 : Protocole de lithographie optique.

a : accélération de la tournette.

v : vitesse de la tournette.

t : temps de rotation de la tournette

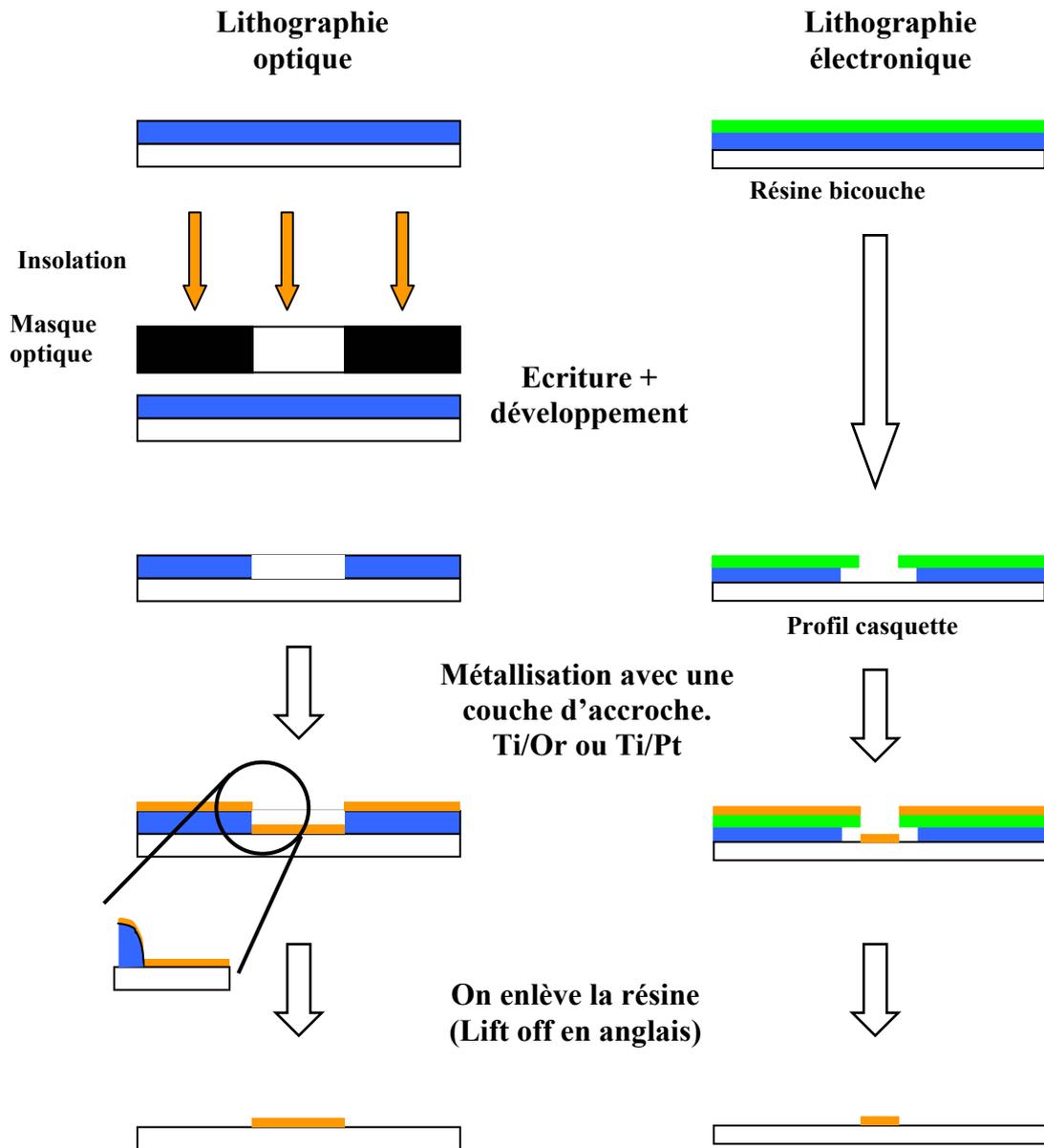


Figure II.40 : Protocole de lithographie électronique et optique. Nous n'avons pas utilisé de profil casquette pour la lithographie optique. En revanche le profil casquette est nécessaire en lithographie électronique pour des motifs de petite taille (~100nm).

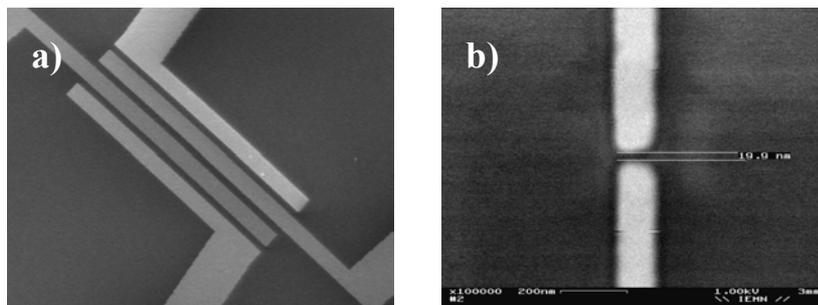


Figure II.41 : Electrodes réalisées en lithographie électronique. En a) les dimensions de l'espace inter électrode sont $15\mu\text{m} \times 500\text{nm}$ (métal Ti/or). En b) les dimensions de l'électrode sont $20\text{nm} \times 100\text{nm}$ (métal Ti/Pt).

VIII. Conclusion

Ce chapitre a présenté l'ensemble des techniques expérimentales que nous avons utilisées au cours de la thèse.

Une partie importante de ce chapitre est consacré à la microscopie champ proche. L'AFM est l'appareil que nous avons le plus utilisé pour faire des images et des mesures électriques. Nous avons vu qu'il existe de nombreuses variantes de l'AFM en particulier le mode d'oscillation latérale.

Nous avons présenté l'aspect théorique de l'interaction pointe surface afin de donner des bases pour interpréter les images. La mesure des hauteurs dépend des conditions d'imagerie mais reste de manière générale fiable. A ce titre une partie du chapitre III est consacré à la mesure de hauteur de l'ADN déposé sur différentes surfaces.

Les mesures en conducting AFM ne sont pas évidentes à réaliser car le contact électrique entre la pointe et l'objet dont on veut mesurer les propriétés de conduction n'est pas tout à fait reproductible.

Nous présentons rapidement le matériel utilisé pour les mesures électriques avec des électrodes. Nous avons obtenu très peu de résultats sur les électrodes (cf. chapitre IV).

La suite du chapitre nous a permis de présenter la manière dont on a préparé tous nos substrats (traitement et fonctionnalisation de surface) et leur caractérisation. Cette caractérisation par la mesure de l'angle de mouillage de différents liquides est assez simple. En pratique cette méthode s'est avérée suffisante. Nous n'avons pas essayé de caractériser davantage nos surfaces.

La manipulation de l'ADN est décrite ensuite. L'ADN que nous avons utilisé est dispersé dans différents tampons avec ou sans sels divalents. L'observation de l'ADN au microscope optique se fait par fluorescence. On utilise pour cela un intercalant fluorescent : YOYO-1. Toutes nos expériences de dépôt d'ADN en fonction du pH, du tampon, des sels présents,... ont été faite en microscopie optique. Cette technique est adaptée pour regarder un grand nombre d'échantillons rapidement.

On termine finalement ce chapitre avec les méthodes de lithographie qui nous ont permis de réaliser nos électrodes.

Chapitre III

Dépôt d'ADN

I. Introduction

On présente dans ce chapitre les résultats concernant le dépôt d'ADN sur une surface. L'objectif de nos dépôts d'ADN est de pouvoir faire par la suite des mesures électriques sur les molécules.

En première partie, on décrit une méthode pour obtenir des surfaces avec contraste chimique. Notre objectif était de greffer une extrémité de l'ADN sur une partie de l'échantillon et de déposer le reste par étirement hydrodynamique sur une partie voisine traitée différemment (cf. figure III.01).

Avec ce contraste chimique on peut espérer greffer une grande quantité de molécules sur une zone bien délimitée du substrat, en particulier à proximité d'une électrode en vue d'effectuer des mesures électriques. De plus on peut tester différents traitements de surface au niveau des électrodes, puisque le greffage des molécules d'ADN se fait sur une autre zone de l'échantillon.

Cette méthode malgré tous les avantages qu'elle présente est assez lourde à mettre en œuvre. Nous avons finalement utilisé deux autres méthodes de dépôt plus simples. Ainsi même si nous n'avons pas opté au final pour la méthode avec contraste chimique, le travail présenté ici a servi à V.Haguet pour la préparation de ces substrats pour la détection de processus biologique [Haguet 2002].

Les deux méthodes que nous avons utilisées pour le dépôt d'ADN sont le déplacement d'une goutte contenant de l'ADN sur l'échantillon et la méthode où on se contente de la faire sécher sur place. Ces techniques sont très simples à mettre en œuvre et présentent un bon niveau de reproductibilité. Les caractéristiques du dépôt sont données pour les deux techniques (forme, orientation, taille, hauteur, ...)

II. Surface à contraste chimique

II.1. Problématique

Nous avons vu au chapitre I que la technique du peignage moléculaire permet d'étirer l'ADN à condition qu'au moins une de ses extrémités soit fixée à la surface alors que les segments sont encore libres en solution. Le paramètre clef pour y arriver est le pH. A haut pH, l'ADN ne se fixe pas, alors qu'à bas pH il se fixe complètement (extrémités et segments) [Kang 2001]. L'ADN dans ce cas se met en pelote sur la surface. Il y a un pH intermédiaire pour lequel l'extrémité de l'ADN s'adsorbe sur la surface sans que les segments ne se fixent. Par conséquent quand on retire l'échantillon de la solution, le passage du ménisque éventuellement conjugué avec le flot hydrodynamique permet d'étirer la molécule sur la surface.

Le problème de cette méthode d'étirement est que la fenêtre de pH pour laquelle on arrive à étirer l'ADN est peu étendue (d'environ 0.5 unité pH). De plus le pH optimal peut varier légèrement d'une surface à une autre avec le même traitement de surface. Etant donné que notre objectif est d'avoir une densité suffisante de molécule pour être sûr d'en avoir sur

nos électrodes, notre objectif était de réduire cette incertitude : donc de faire un dépôt peu dépendant du pH.

Notre objectif était donc de greffer l'ADN sur le substrat pour contrôler la densité. De plus pour éviter qu'il y ait trop de molécules sur le substrat nous avons choisi de limiter à certaines zones à proximité des électrodes, les sites d'accrochage (figure III.01).

II.2. Objectif

Nous avons choisi de greffer l'ADN par la réaction entre une fonction α -oxo aldéhyde et le semi carbazide déposé sur la surface. Par conséquent, l'ADN doit être modifiée pour être muni de cette fonction. La stratégie que l'on comptait employer était de préparer des oligomères de 12 paires de base complémentaire d'une des extrémités de l'ADN λ , avec cette fonction α -oxo aldéhyde. Par hybridation et par l'action d'une enzyme qui referme le squelette phosphate, on obtient notre molécule d'ADN λ fonctionnalisé COCHO. La fonction α -oxo aldéhyde est également appelé COCHO qui correspond à la composition chimique de la fonction (cf. figure III.02).

La fonction semi carbazide est obtenue par transformation d'une fonction amine comme le montre la figure III.02. Ce protocole [Melnyk 2002] est détaillé dans la thèse de V.Haguet [Haguet 2002]. Cette transformation chimique est faite à l'Institut de Biologie de Lille (IBL).

On recherche à fixer l'ADN sur le semi carbazide mais pas sur les molécules B (cf. figure III.01).

Avant d'effectuer les tests avec l'ADN nous avons voulu vérifier que l'on arrive bien à obtenir des contrastes chimiques. Nous avons testé un certain nombre de molécules B. Les silanes que l'on a utilisés ont des terminaisons : méthyle¹, fluor² et vinyle³ (cf. annexe C).

Pour effectuer les tests nous avons utilisé une molécule fluorescente : un dipeptide fonctionnalisé avec la terminaison α -oxo aldéhyde : le Rhodamine-Lys-Arg-NH-(CH₂)₃-NH-CO-CHO. La lysine (Lys) et l'arginine (Arg) sont des acides aminés.

Bien entendu, cette sonde fluorescente ne réagit pas a priori comme l'ADN, surtout pour l'adsorption non spécifique. L'utilisation d'une molécule fluorescente ne nous a servi qu'à tester notre protocole pour obtenir des contrastes chimiques. La chimie du greffage de la molécule fluorescente est indiquée sommairement sur la figure III.02.

On a essayé un certain nombre de silanes différents (méthyle¹, fluor², vinyle³) pour pouvoir effectuer des tests de dépôt avec l'ADN et choisir la surface qui convient le « mieux » du point de vue des mesures électriques.

On part du principe que le greffage covalent est plus efficace que l'adsorption non spécifique. On espère donc que l'ADN se fixera en plus petite quantité sur le silane B (méthyle, fluor, vinyle) que sur la fonction semi carbazide. Ce n'est pas évident a priori. Nous ne sommes pas arrivé jusque là. Ce projet s'est arrêté en cours de route. Nous avons juste effectué les tests pour vérifier le protocole d'obtention de surfaces avec contraste chimique. Ce travail a été repris par V.Haguet pour la préparation de ces substrats pour la détection de processus biologiques [Haguet 2002].

1 : OTS (Octadecyltrichlorosilane) : H₃C-(CH₂)₁₇-SiCl₃

2 : 1H,1H,2H,2H-perfluorodécyl trichlorosilane (F₃C-(CF₂)₇-(CH₂)₂-SiCl₃)

3 : 7-octényltrichlorosilane (H₂C=CH-(CH₂)₆-SiCl₃)

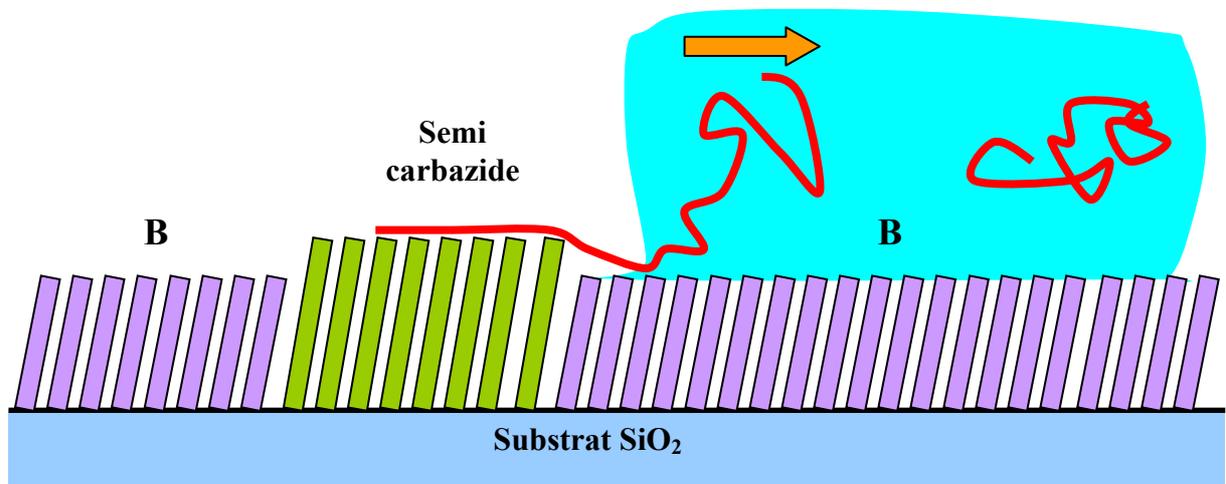


Figure III.01 : Présentation de la technique de greffage covalent de l'ADN modifié COCHO sur une surface fonctionnalisée semi carbazide. Le passage du ménisque permet d'étirer la molécule sur la partie de la surface modifiée avec une molécule B.

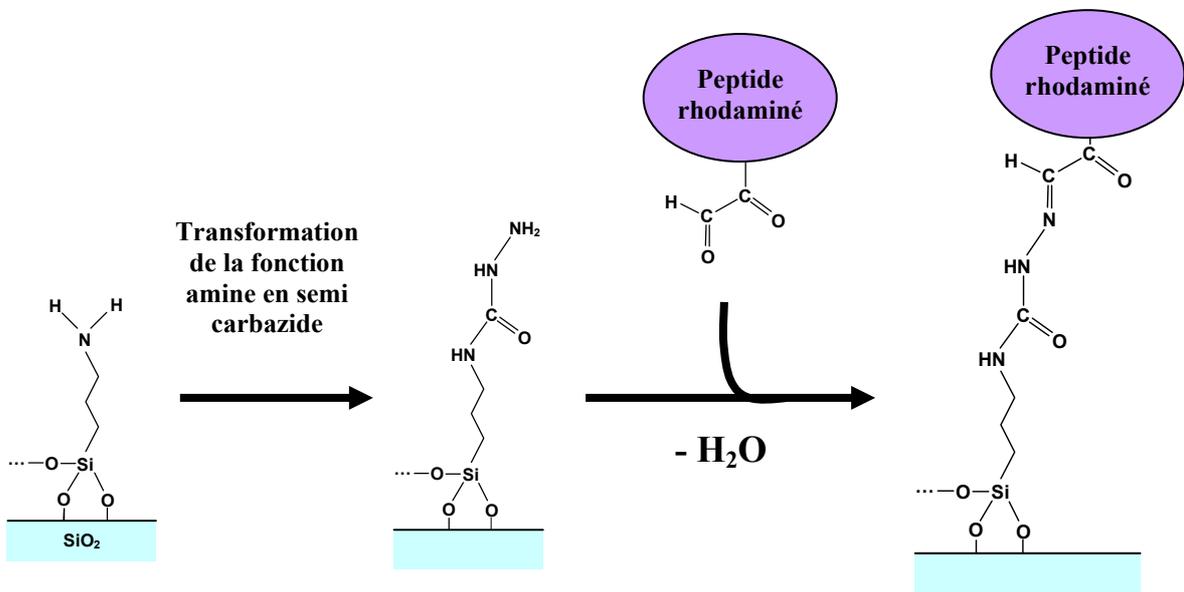


Figure III.02 : Transformation de la fonction amine en fonction α -oxo aldéhyde, puis greffage covalent du dipeptide rhodaminé sur la fonction α -oxo aldéhyde. La rhodamine est une molécule fluorescente qui permet de tester le rendement de l'ensemble des réactions qui mène du substrat nu à la sonde rhodaminée.

II.3. Obtention de contraste chimique

II.3.1. Test de greffage pleine plaque

Nous avons effectué le protocole de transformation de la fonction amine en semi carbazide puis le greffage du peptide rhodaminé pour chacun des silanes dont on dispose (amine, méthyle, fluor et vinyle). Tous nos tests sont effectués sur des lames de microscope.

Dans le cas du silane terminé amine (APTMS – cf. annexe C), nous avons deux protocoles de silanisation. Les lames préparées à l'IEMN sont silanisées en phase liquide avec du toluène comme solvant (cf. chapitre 1). Les lames préparées à l'IBL sont silanisées avec un mélange d'alcool et d'eau (cf. chapitre 1).

Le protocole qui mène de la fonction amine à la fonction semi carbazide puis le greffage du peptide rhodaminé a été réalisé à l'Institut de Biologie de Lille (IBL). Il n'y a que sur le silane terminé amine que l'on s'attend à avoir un greffage covalent de la sonde fluorescente. Eventuellement on peut avoir une réaction parasite avec le silane terminé vinyle. Les silanes terminés fluor et méthyle sont neutres chimiquement.

Des contrôles avec une sonde rhodaminé sans la fonction α -oxo aldéhyde sont effectuées. Ce test permet de savoir quelle est la proportion de greffage chimique et d'adsorption non spécifique.

Les lames sont caractérisées au scanner à fluorescence Affymetrix 418 Array. Afin de pouvoir comparer les lames entre elles, les images sont toutes enregistrées avec le même niveau d'excitation et la même sensibilité d'acquisition (puissance du laser = L35, tube photomultiplicateur = PMT50). L'ordre des couleurs est, en niveaux croissants de fluorescence : noir, bleu, vert, jaune, rouge, blanc. On notera que les produits utilisés à l'IBL ainsi que la chimie qui mène de la fonction amine jusqu'au greffage de la rhodamine COCHO sont régulièrement testés.

Les résultats sont présentés sur la figure III.03. Les lames silanisés amine que l'on a préparé à l'IEMN donne un signal relativement homogène au milieu de l'échelle de fluorescence (vert pomme). Les lames de l'IBL donne un signal beaucoup plus important (au niveau du blanc sur l'échelle de couleur – non représentée sur la figure III.03).

Les lames fluor et vinyle donne un signal de fluorescence important. Dans le cas du fluor, l'adsorption est non spécifique. Dans le cas du vinyle, c'est beaucoup moins évident. Le signal sur les lames méthyle est très faible. On remarquera que la gamme de couleur est très sensible au niveau du rouge et du blanc, pouvant donner l'impression que les lames Fluor et vinyle sont plus inhomogènes que la lame méthyle. Un examen attentif montre qu'on a autant de dispersion pour toutes les lames. Le choix de l'échelle des couleurs donne une meilleure sensibilité pour les niveaux les plus élevés. Seul les lames amine ont un niveau de fluorescence bien homogène.

On donne également le cas d'une lame silanisée amine mais pour laquelle le bain de silanisation a été pollué par de la résine optique. En effet parmi les lames qui se trouvaient dans le bain de silanisation, l'une d'entre elle était recouverte partiellement de résine optique.

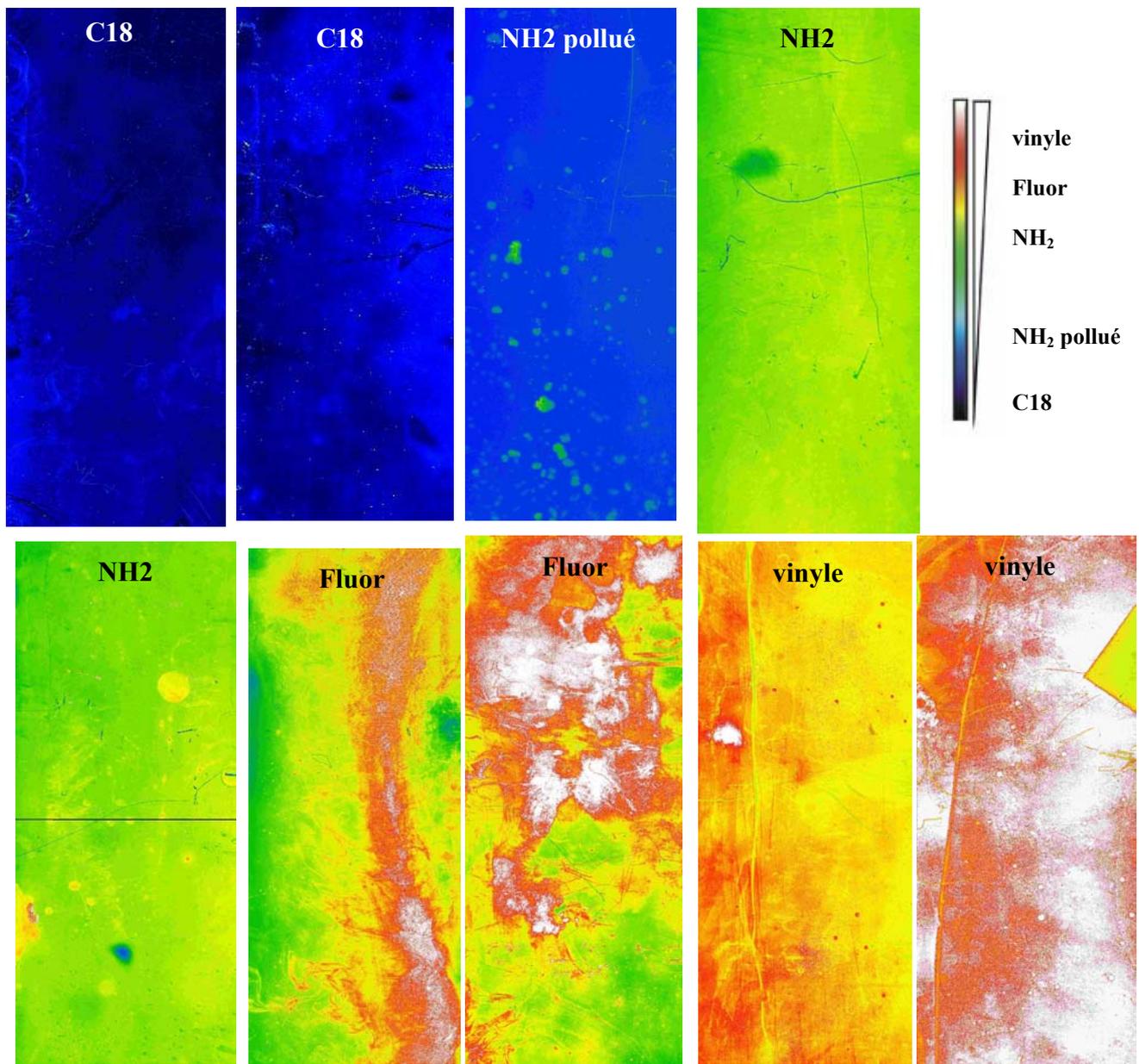


Figure III.03 : Greffage de rhodamine COCHO sur différentes surfaces. Le greffage est covalent sur les surfaces amine. En revanche, on a beaucoup de dépôt non spécifique (physisorbé) sur les surfaces Fluor et vinyle. La surface hydrophobe recouverte de silane à 18 carbones n'adsorbe quasiment pas de rhodamine. NH₂ pollué réfère à des surfaces pour lesquelles le bain de silanisation a été pollué par de la résine optique.

La non réactivité dans le cas des lames méthyle se comprend aisément puisque les groupements $-CH_3$ sont neutres chimiquement et ne sont pas chargés. Ils interagissent peu avec la rhodamine ou bien avec les acides aminés lysine et arginine qui sont chargés positivement au pH de travail (entre 7.0 et 8.0).

En revanche dans le cas des silanes terminés vinyle et fluor, ces groupements sont plus riches en électrons et peuvent interagir électrostatiquement avec les acides aminés de la sonde fluorescente qui sont chargés positivement. De plus, la rhodamine comporte des groupements aromatiques (liaison π) qui peuvent certainement interagir spécifiquement avec les liaisons π terminales de la surface terminée vinyle.

Néanmoins il n'est pas exclu que le groupement vinyle réagisse partiellement au protocole de transformation de la fonction amine en semi carbazide. Dans ce cas on aurait un greffage covalent partiel de la sonde fluorescente.

Connaissant les niveaux de fluorescence dans le cas où le greffage du silane est pleine plaque, on s'attend à retrouver ces mêmes niveaux de fluorescence pour chacun des silanes dans le cas où on a un contraste chimique.

II.3.2. Surface à contraste chimique

II.3.2.1. Protocole

Le principe de l'obtention de contraste chimique est de faire des ouvertures dans le premier film de molécules greffées, puis de déposer la seconde molécule dans les ouvertures. Le protocole est décrit sur la figure III.04.

On utilise une couche d'accroche en polystyrène dans le cas des lames méthyle. En effet ces surfaces sont tellement hydrophobes que la résine optique ne tient pas. Elle s'en va complètement lorsqu'on essaye de la déposer à la tournette. On arrive en revanche à étaler du polystyrène. Il doit être suffisamment visqueux pour tenir sur la surface sous peine d'avoir des zones non couvertes. Inversement il ne doit pas être trop visqueux pour limiter l'épaisseur du film (entre 0.5 et $1\mu\text{m}$). On dispose pour cela de polystyrène dans le toluène à différentes concentrations. Il faut s'y prendre souvent à plusieurs fois pour réussir le dépôt de ce premier polymère.

Une fois le dépôt de polystyrène effectué, la suite des opérations est la même pour toutes les lames. On utilise la résine optique S1818 (de la marque Shipley) pour faire les ouvertures avec le protocole classique de lithographie optique (cf. chapitre II).

Les lames de microscope ne sont pas adaptées aux tournettes de microélectronique. Tout d'abord la forme de l'échantillon ne permet pas un bon étalement. On a des bourrelets importants de résine qui peuvent se former sur les bords. De plus les lames de microscope sont assez lourdes et tiennent assez mal sur le support de la tournette. Par conséquent il faut absolument bien centrer la lame avant de faire le dépôt et ne pas dépasser une certaine vitesse de rotation. En pratique on ne dépasse pas 3000tr/min.

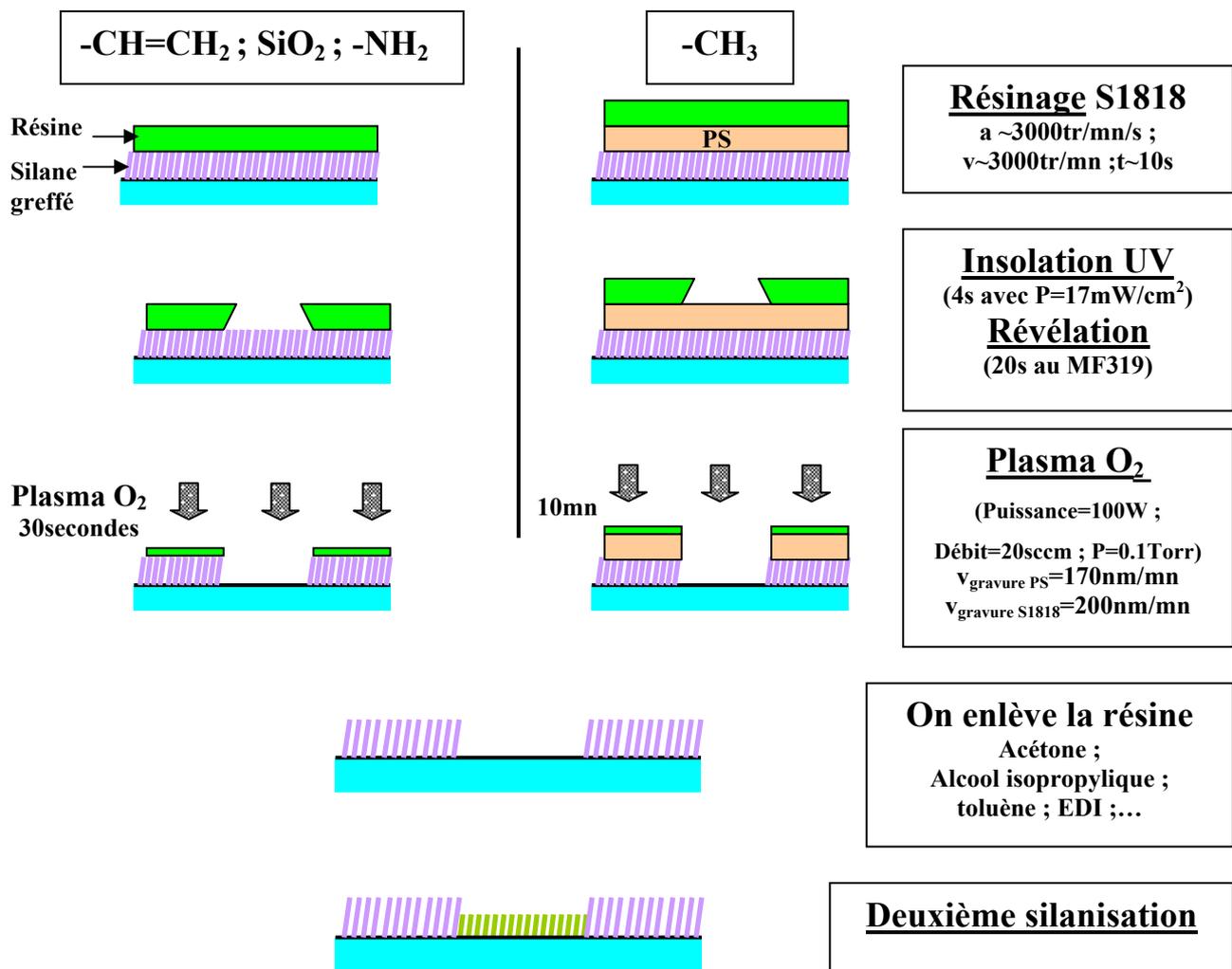


Figure III.04 : Protocole pour la préparation des surfaces avec contraste chimique. On utilise une couche d'accroche en Polystyrène (PS) pour que la résine optique puisse tenir sur la surface méthyle.

Une fois qu'on a fait les ouvertures dans la résine optique, on peut passer à l'étape de greffage du deuxième silane. Afin d'enlever les premières molécules greffées dans les ouvertures définies par la résine optique, on utilise un plasma O_2 (cf. figure III.04). Dans le cas du silane OTS (terminaison méthyle), on doit d'abord graver toute la couche de polystyrène avant d'attaquer la monocouche de molécules. Sachant que la gravure des résines et du polystyrène est de l'ordre de 200nm/mn, on a un temps typique de plasma de 10minutes. Le temps de gravure ne doit pas être trop long car le polystyrène sous l'effet des espèces réactives finit par durcir, et il n'est alors plus possible de l'enlever. De plus, la gravure sur la lame n'est pas homogène. Par conséquent il faut surestimer le temps de plasma pour être sûr qu'il atteigne la couche organique.

Dans le cas où la résine optique a été déposée directement sur les molécules greffées sans couche d'accrochage en polystyrène (cas des silanes terminés amine et vinyle) le temps de gravure est beaucoup plus court de l'ordre de 1 minute puisqu'il n'y a que la couche de molécule à graver. En toute rigueur quelques secondes suffiraient largement, mais afin d'enlever des restes de résine au fond des ouvertures on surévalue le temps de gravure.

On a également fait le protocole avec une lame sans traitement. On fait juste du greffage dans des ouvertures. Nous avons utilisé cette technique avec de la résine électronique pour mesurer la hauteur de nos couches organique (cf. chapitre II). Dans ce cas on fait la même chose mais avec de la résine optique.

Une fois que la première couche organique a été gravée, il reste à effectuer la deuxième silanisation. Avant toute chose, il faut enlever les polymères (résine optique et éventuellement polystyrène) déposés sur la surface sans polluer les zones de la lame découverte et nettoyée par le plasma. Cela peut se faire mécaniquement. Un jet de gaz à haut débit peut être suffisant pour arracher le polystyrène qui ne tient pas très bien sur la surface terminée méthyle. Il ne faut pas insister trop longtemps avec cette méthode puisque le gaz n'est pas parfaitement pur et on finit par polluer la surface. On peut également utiliser différents solvants. On enlève le gros de la résine en projetant l'acétone sur la lame. Il y a un double intérêt à agir de la sorte. Premièrement, on limite les risques de redéposition. De plus, la vitesse du solvant agit mécaniquement pour enlever la résine. Une fois que toute la résine est enlevée (inspection visuelle) on peut effectuer un nettoyage par ultrason avec comme solvant de l'acétone, de l'alcool isopropylique, du toluène, ou de l'eau désionisée (EDI). On peut même faire un ultrason avec le bain de silanisation (toluène + silane). Dans ce cas, le toluène permet d'enlever la résine et de faire la silanisation en même temps. Cette dernière méthode est intéressante puisque on profite bien de la surface fraîchement préparée par le plasma.

II.3.2.2. Masque utilisé

Le masque que l'on a utilisé est représenté sur la figure III.05. On a des carrés de 100 μ m de côté. On a une densité variable de petite carrés à l'intérieur de ces carrés de 100 μ m. La résolution du scanner ne permet pas de distinguer les détails dans les ouvertures. On ne voit que des motifs de 100 μ m. On s'attend à avoir un niveau de fluorescence qui dépend du taux de couverture. En particulier on a 30% de couverture pour le deuxième et le troisième motif (cf. figure III.05) mais avec une répartition différente. Cela nous permet de vérifier l'influence de la géométrie des motifs sur le greffage. Le taux de couverture du dernier motif est 12%.

Enfin, on peut facilement observer les zones de gravure à l'AFM (cf. figure III.06). En effet on n'a pas à chercher longtemps les plus petits motifs. De plus, on sait sans ambiguïté si on est bien sur une zone correspondant au masque. En effet le scanner de l'AFM a une amplitude de $15\mu\text{m}$ dans le plan xOy . On peut donc observer le motif en entier. On ne mesure pas d'artefact.

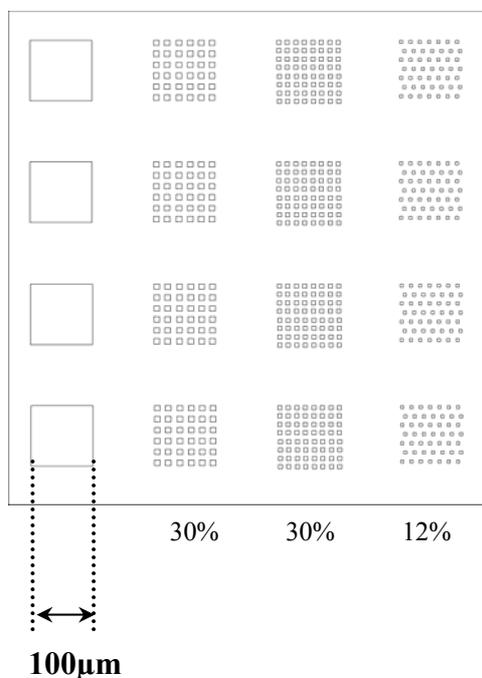


Figure III.05 : Le masque optique utilisé pour les tests de mise au point de la méthode de greffage avec contraste chimique. On a quatre motifs répétés quatre fois. Ce sont des carrés de $100\mu\text{m}$ de côté composés de carrés de plus petite taille. La couverture dans chaque carré par rapport au plus grand est de 30%, 30% et 12%..

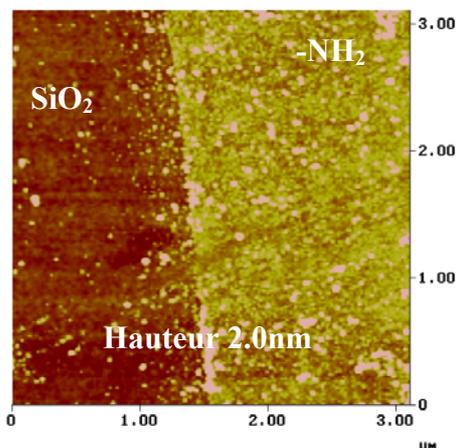


Figure III.06 : Etat de la surface après une ouverture dans la première molécule. Dans ce cas l'ouverture a été faite dans une couche silanisée amine. On trouve le double de la hauteur attendue. Il est difficile d'obtenir une couche dense et ordonnée avec les silanes terminés $-\text{NH}_2$. L'image est obtenue en mode tapping AFM.

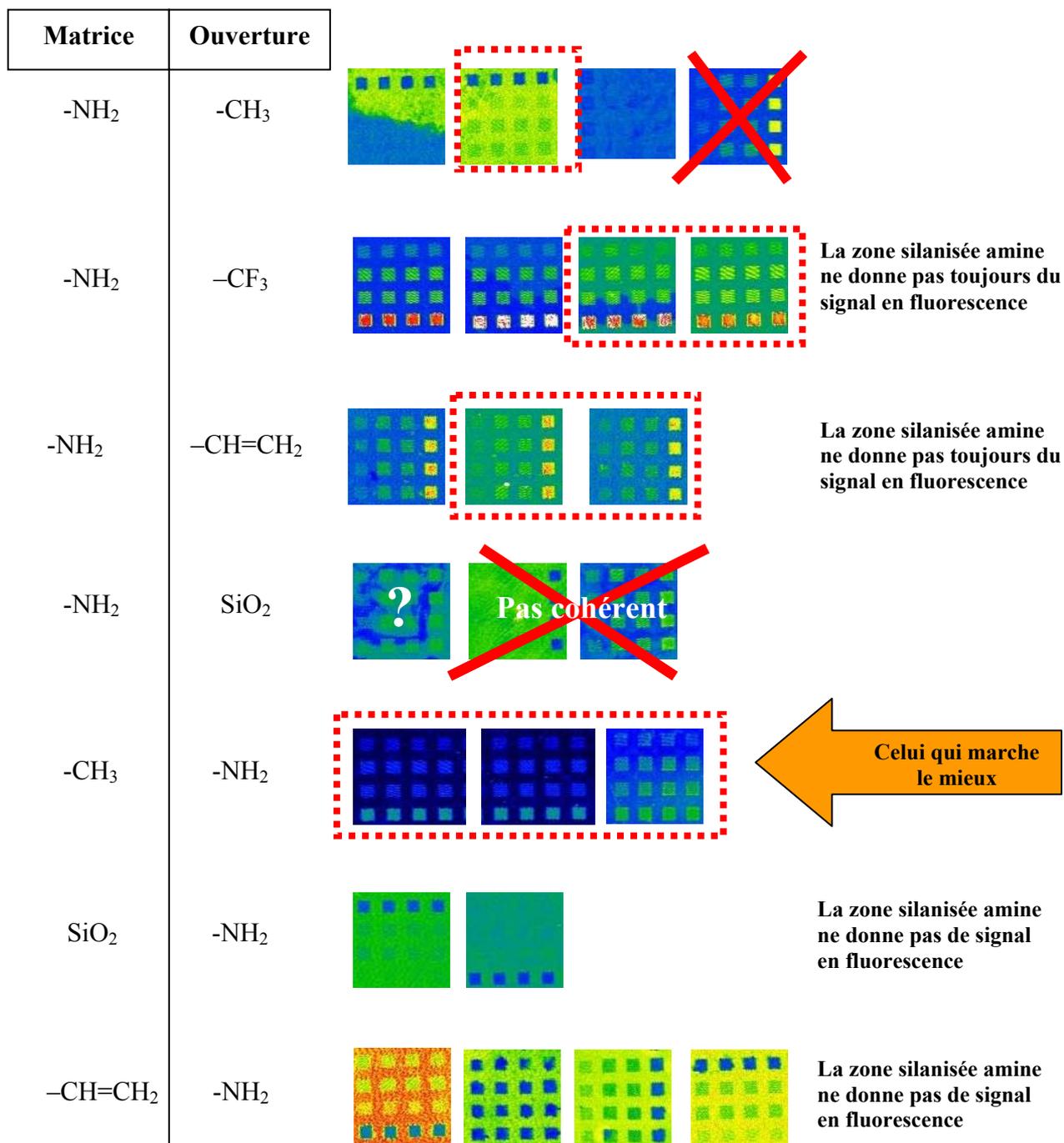


Figure III.07 : Résultats représentatifs de tous les essais de greffage avec contraste chimique. La combinaison la plus reproductible est la silanisation méthyle puis amine dans les ouvertures. Pour toutes les autres combinaisons soit le silane amine ne s'est pas greffés, soit on a carrément l'inverse de la combinaison attendu (image barrée d'une croix). Les images encadrées en pointillé correspondent à ce qu'on attendait. L'échelle des couleurs est la même que celle de la figure III.03.

II.3.2.3. Résultats

L'ensemble des résultats est résumé sur la figure III.07. La combinaison la plus reproductible est la silanisation pleine plaque du silane terminé méthyle, puis le greffage de l'amine dans les ouvertures.

Le désaccord principal que l'on observe sur certaines lames est que les zones silanisées amine ne donnent aucun signal en fluorescence, ou bien le signal n'est pas homogène sur la surface. En revanche les autres molécules donnent le signal attendu (correspondant au niveau de fluorescence du silane pleine plaque cf. II.3.1.). Il y a une exception pour le silane terminé méthyle qui a donné pour une lame un signal important alors qu'on attendait un niveau de fluorescence faible (i.e. une couleur sombre). Ces désaccords peuvent avoir comme origine la pollution de la surface. Elle provient en partie de la résine optique utilisée bien que ce ne soit pas la seule cause. Plusieurs observations vont dans ce sens. En effet, la solution contenant la rhodamine COCHO de l'IBL a cessé d'être active lorsqu'on y a trempé des lames sur lesquelles il restait de la résine optique. De plus, les lames traitées dans les bains de silanisation qui contenait d'autres lames avec de la résine optique n'ont pas donné de signal, suggérant un mauvais greffage de l'amine ou la consommation de la fonction amine par la résine optique. *Par conséquent, avant chaque étape chimique, il faut prendre soin d'enlever toute trace de résine.* Il est néanmoins difficile avec le peu d'expériences effectuées d'affirmer quelle est l'origine exact des désaccords dans les niveaux de fluorescence observés.

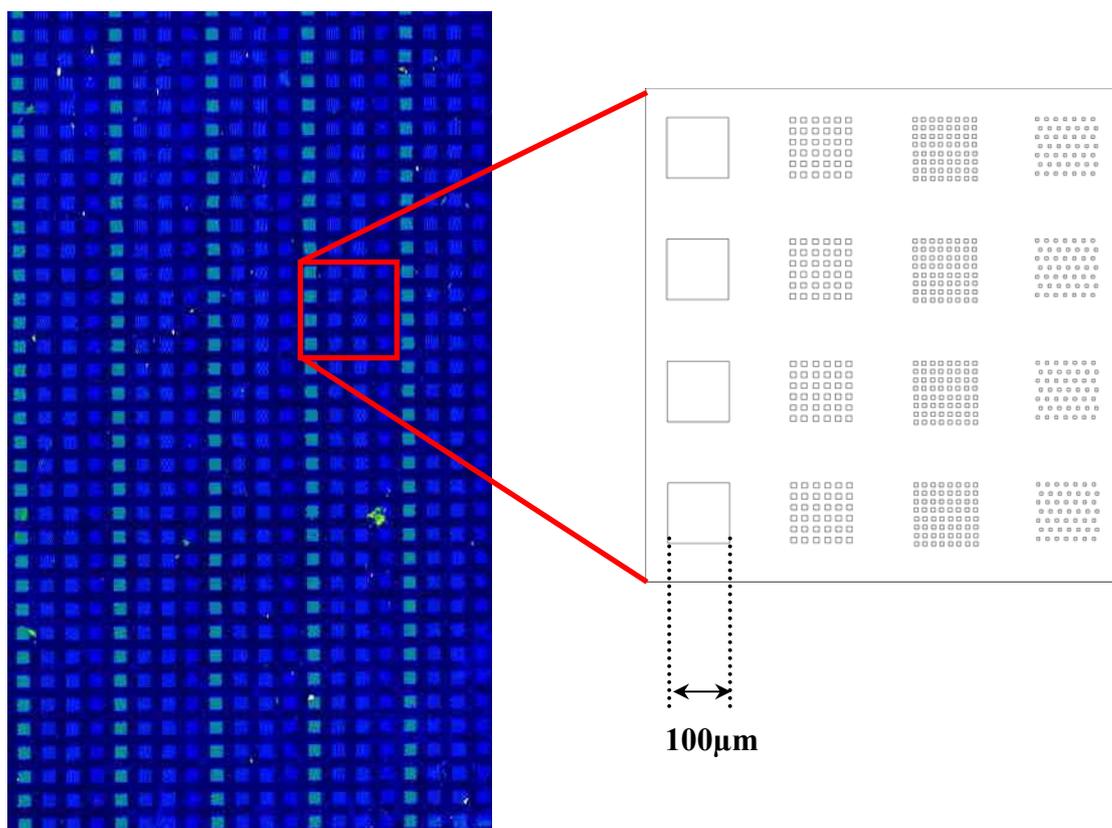


Figure III.08 : *Contraste chimique obtenu sur une lame de microscope. La matrice est un silane OTS (terminaison méthyle). On a greffé un silane amine dans les ouvertures. Le niveau de fluorescence de chaque zone est en accord avec le niveau que l'on peut attendre pour un greffage pleine plaque. On notera l'homogénéité du résultat. L'image est en fausse couleur. L'échelle des couleurs est la même que pour la figure III.03. Les dimensions de l'image sont 3mm × 6mm.*

On donne sur la figure III.08 le résultat obtenu avec une matrice de silane OTS (terminaison méthyle) avec un silane terminé amine dans les ouvertures. On peut noter l'homogénéité du résultat. On trouve à peu près pour chaque zone le niveau de fluorescence mesurée dans le cas où la silanisation est pleine plaque. Le fait que cette combinaison marche le mieux provient certainement du fait qu'on a utilisé une couche d'accroche en polystyrène qui protège la surface de la pollution dû à la résine optique.

La figure III.06 représente l'état de la surface après l'étape de gravure du premier silane et après avoir enlevé la résine. On peut constater qu'il y a des débris sur la surface. La zone gravée est très bien définie. On passe en quelques nm du silane terminé amine à la surface de SiO₂. La hauteur du film moléculaire est de 2nm. Cela correspond à deux fois la hauteur de la molécule utilisée. Ce n'est pas étonnant de trouver une hauteur plus importante pour le silane terminé amine puisqu'il a tendance à polymériser sur la surface [cf. chapitre II] [Martel 2000].

On notera qu'on a moins de problèmes de pollution avec les résines électroniques : PMMA et Copolymère. En effet les tests de greffage de différents silanes donne une hauteur de la molécule en accord avec la hauteur attendue. Tous ces résultats sont donnés au chapitre II. En revanche, l'inconvénient de l'utilisation de ces résines est le temps d'écriture au masqueur électronique (plusieurs heures d'écriture avec la nécessité de travailler sous vide). C'est pour cette raison que nous avons choisi les résines optiques.

II.3.2.4. Conclusion

Parmi toutes les combinaisons essayées, c'est la combinaison avec une matrice de silane OTS (terminé méthyle) et le silane terminé amine dans les ouvertures qui a donné les meilleurs résultats. On interprète ce résultat par le fait que le polystyrène que l'on a employé comme couche d'accroche de la résine optique protège en fait la surface de la pollution du à la résine optique.

Par conséquent la stratégie pour obtenir des contrastes chimiques est d'utiliser une couche de polymère (le polystyrène par exemple) avant de déposer la résine optique. Les résines électroniques sont moins problématiques du point de vue de la pollution apportée, mais dans ce cas, le temps d'écriture au masqueur électronique est rédhibitoire (cf. chapitre II).

On peut envisager d'autres moyens de graver la première couche organique. Par exemple avec un masque mécanique. Dans ce cas, on limite les problèmes de pollution ainsi que les étapes technologiques.

Faute de temps, nous n'avons pas utilisé cette stratégie pour déposer l'ADN sur nos surfaces. Le travail qui restait à faire (principalement à l'IBL) était la préparation de l'oligonucléotide complémentaire des 12 paires de base pendantes du λ -ADN, muni d'une fonction α -oxo aldéhyde. L'hybridation et la ligation de l'oligo sur l'ADN permet alors le greffage de l'ADN sur les zones initialement terminées amine.

Ce travail a été repris par Vincent Haguët pour la réalisation de puces à détection électrique de processus biologique [Haguët 2002].

III. Dépôt d'ADN

III.1. Présentation

Cette section présente les résultats obtenus avec les deux méthodes que nous avons finalement adoptées pour réaliser nos dépôts d'ADN sur des surfaces.

La première méthode consiste à laisser incuber quelques minutes une goutte contenant de l'ADN (250ng/ml). La goutte est ensuite retirée en penchant l'échantillon ou en aspirant la goutte avec une torchette, ...

La deuxième méthode consiste à laisser sécher une goutte sur le substrat. Dans le premier cas on arrive à avoir des brins isolés, et dans le deuxième on a des cordes d'ADN de taille (hauteur et largeur) très variée. La figure III.09 présente les deux techniques. Un grand nombre de surfaces avec des traitements chimiques différents ont été utilisées. Leur préparation est décrite dans le chapitre II. La figure III.11 résume comment nous avons procédé en pratique pour déposer l'ADN en fonction du type de surface.

Les deux techniques que l'on présente permettent d'obtenir de manière reproductible une bonne densité de molécules sur la surface. En particulier on arrive ainsi à déposer les molécules d'ADN sur des électrodes de taille micrométriques.

III.2. Méthode de la goutte

III.2.1. Variante du peignage moléculaire

L'étirement de l'ADN à l'aide de la technique du peignage moléculaire décrite au chapitre I [Allemand 1998] nécessite de travailler à un pH optimal (cf. paragraphe I.3.2. du chapitre I). La méthode que nous avons adoptée est une variante de cette technique.

Ce qui change par rapport au peignage est que **(1)** la quantité de liquide est beaucoup moins importante (quelques μl contre plusieurs ml), **(2)** La solution d'ADN est uniquement en contact avec le substrat et l'air, et enfin **(3)** le mouvement du fluide est beaucoup plus rapide que pour le peignage.

Le point **(1)** présente l'intérêt de consommer très peu de produits, mais l'inconvénient est que le pH de la solution varie rapidement par dissolution de gaz atmosphériques (principalement du CO_2) dans le liquide [Gray 1985]. Le point **(2)** est intéressant puisqu'on a plus de problème d'adsorption de l'ADN sur les parois du récipient qui contient l'ADN. Il est vrai que ce problème peut être résolu en traitant les parois (par exemple en les saturant avec une autre molécule d'ADN). Mais nous avons choisi la méthode la plus pratique à mettre en œuvre. L'utilisation d'une goutte est un moyen simple et efficace d'éviter tous ces problèmes. Le point **(3)** est certainement le plus important puisque c'est grâce au mouvement rapide du fluide qu'on arrive à étendre l'ADN. En effet, là où le ménisque n'arrive pas à étendre l'ADN déjà fixé sur la surface, le gradient de vitesse conjugué avec l'étirement par le ménisque arrive à l'étendre complètement. La goutte s'en va d'autant plus rapidement que la surface est hydrophobe. On peut estimer la vitesse de la goutte à quelques cm/s. Lorsqu'on retire l'échantillon de la solution avec la technique de peignage on a plutôt des vitesses de l'ordre de $100\mu\text{m/s}$. Nous verrons que cet étirement peut être excessif ($2 \times$ la longueur de l'ADN).

L'importance du gradient de vitesse est révélateur dans le cas des surfaces terminées amine. En effet on arrive à étirer l'ADN uniquement en faisant couler la solution le long du substrat (cf. figure III.11 en (d)). En revanche si on laisse la solution incuber il se retrouve déposé en pelote et cela quelque soit le pH entre 5 et 9 (cf. figure III.11 en (c)).

III.2.2. Caractérisation de l'ADN déposé

III.2.2.1. Orientation des brins d'ADN

La technique décrite est reproductible. Les brins d'ADN sont orientés différemment suivant la zone de la goutte. Les brins suivent le mouvement du liquide lorsqu'il s'écoule hors du substrat. On obtient alors l'orientation donnée par la figure III.10. On remarquera que le dépôt est relativement uniforme et qu'on a une légère déplétion au niveau du bord de la goutte (image complètement à droite de la figure III.10). On a observé cette légère déplétion sur les surfaces avec des groupements vinyle, fluor, et méthyle ainsi que sur le polystyrène. Néanmoins, on finit par observer une accumulation lorsqu'on laisse incuber la goutte longtemps. L'explication de ce phénomène est liée à l'hydrophobicité de la surface. En effet pendant le temps d'incubation la goutte s'évapore légèrement. Ce changement de volume provoque le déplacement du ménisque. Comme la surface est hydrophobe, on a peu d'hystérésis (cf. chapitre II) sur l'angle de reculée et d'avancée. Dans ce cas le ménisque s'ajuste tout de suite (ce n'est pas le cas des surfaces hydrophiles). Il n'y a que si on laisse la goutte très longtemps qu'un dépôt de sels peut se faire au niveau du ménisque. Dans ce cas même sur les surfaces hydrophobes on peut observer une accumulation d'ADN.

Le fait qu'on ait une densité uniforme est intéressant pour l'observation à l'AFM car on n'a pas à chercher de zones plus ou moins denses. Si à l'AFM on n'observe pas d'ADN sur la surface à un endroit, on peut se baser sur cette observation pour en déduire qu'il n'y en aura pas ou très peu sur le reste de la surface.

Dans le cas des surfaces terminées amine, l'ADN se pose en boule sur la surface. Il n'y a que lorsqu'on fait couler la solution le long de l'échantillon qu'on obtient des brins étirés sur la surface. Dans ce cas l'orientation des molécules se fait suivant la direction de déplacement de la solution. On peut observer une direction majoritaire, mais l'orientation n'est pas parfaite (cf. figure III.11 en d)).

III.2.2.2. ADN entremêlé

Un problème que nous avons le plus rencontré (5 à 10% des échantillons) avec ce type de dépôt est que les brins s'entremêlent au lieu d'être bien étirés (figure III.12 et III.13).

Il n'y a pas de conditions particulières qui mènent à ce genre de problème d'étirement. On l'a tout de même observé plus souvent lorsque le pH est plutôt faible. Deux échantillons sur lesquels on fait le dépôt en même temps avec la même solution d'ADN et le même temps d'incubation peuvent pour l'un donner des brins d'ADN entremêlés, mais pas sur l'autre.

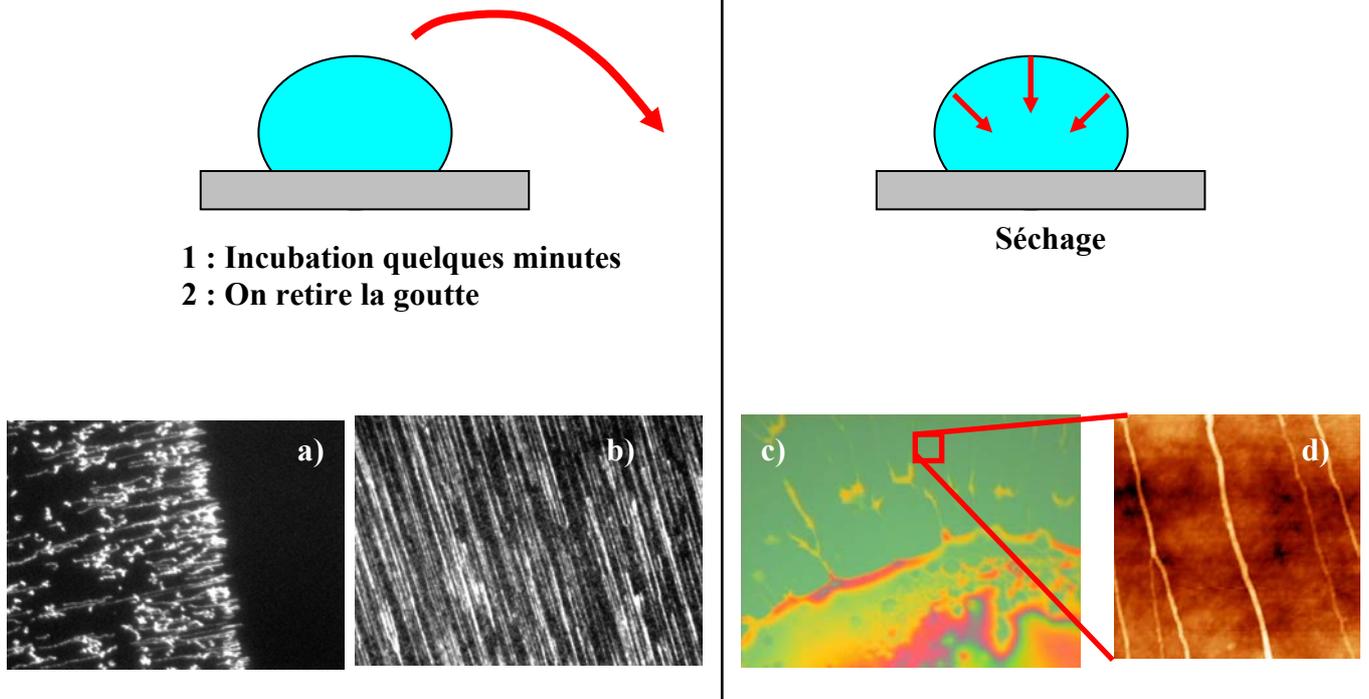


Figure III.09 : Deux méthodes de dépôt de l'ADN. Incubation d'une goutte quelques minutes ou séchage de la goutte. Les images a) et b) sont obtenues en microscopie à fluorescence ($64\mu\text{m} \times 45\mu\text{m}$). L'image c) est obtenue en microscopie optique classique ($200\mu\text{m}$ de côté). L'image d) est obtenue en AFM mode tapping ($2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$).

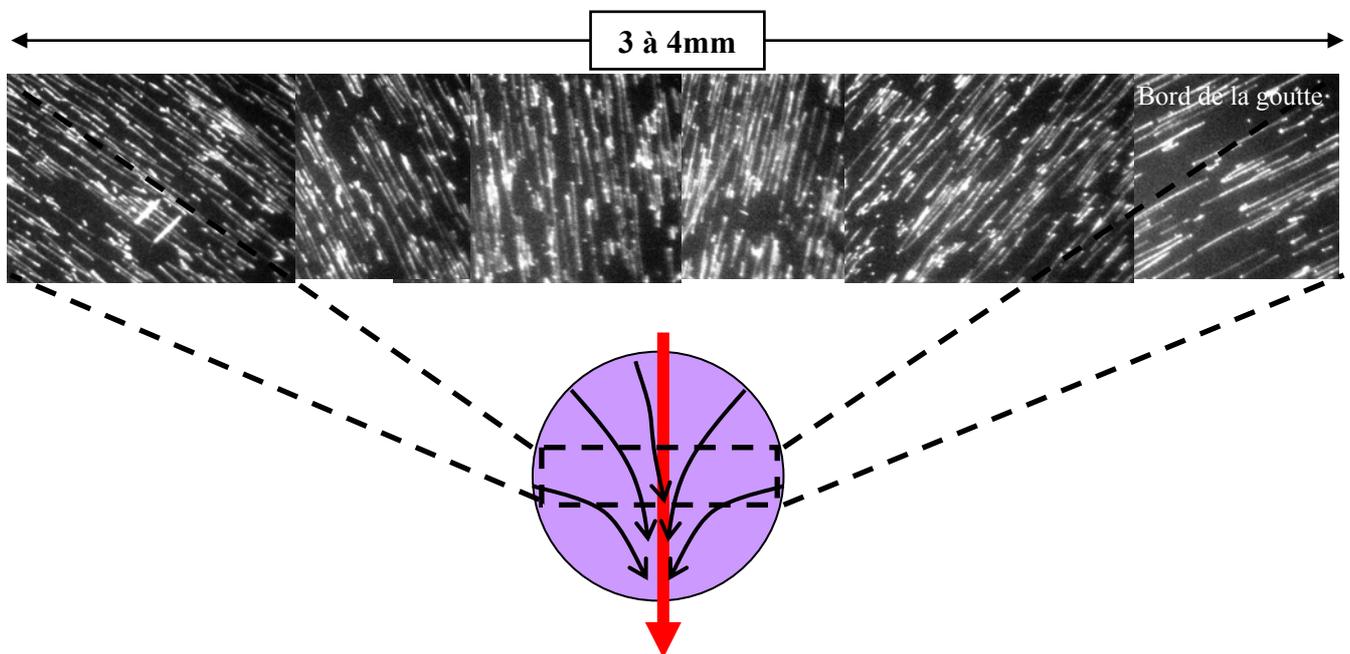


Figure III.10 : Orientation des brins d'ADN. La goutte occupait un surface approximativement sphérique. On l'enlève dans la direction indiquée par la flèche (en trait gras rouge). On remarquera la grande homogénéité du dépôt. Ces images correspondent à une surface méthyle. Elles sont obtenues en microscopie à fluorescence. La dimension des images est de $64\mu\text{m} \times 45\mu\text{m}$. Les images sont collées les unes aux autres. On notera que la densité est légèrement plus faible sur le bord de la goutte.

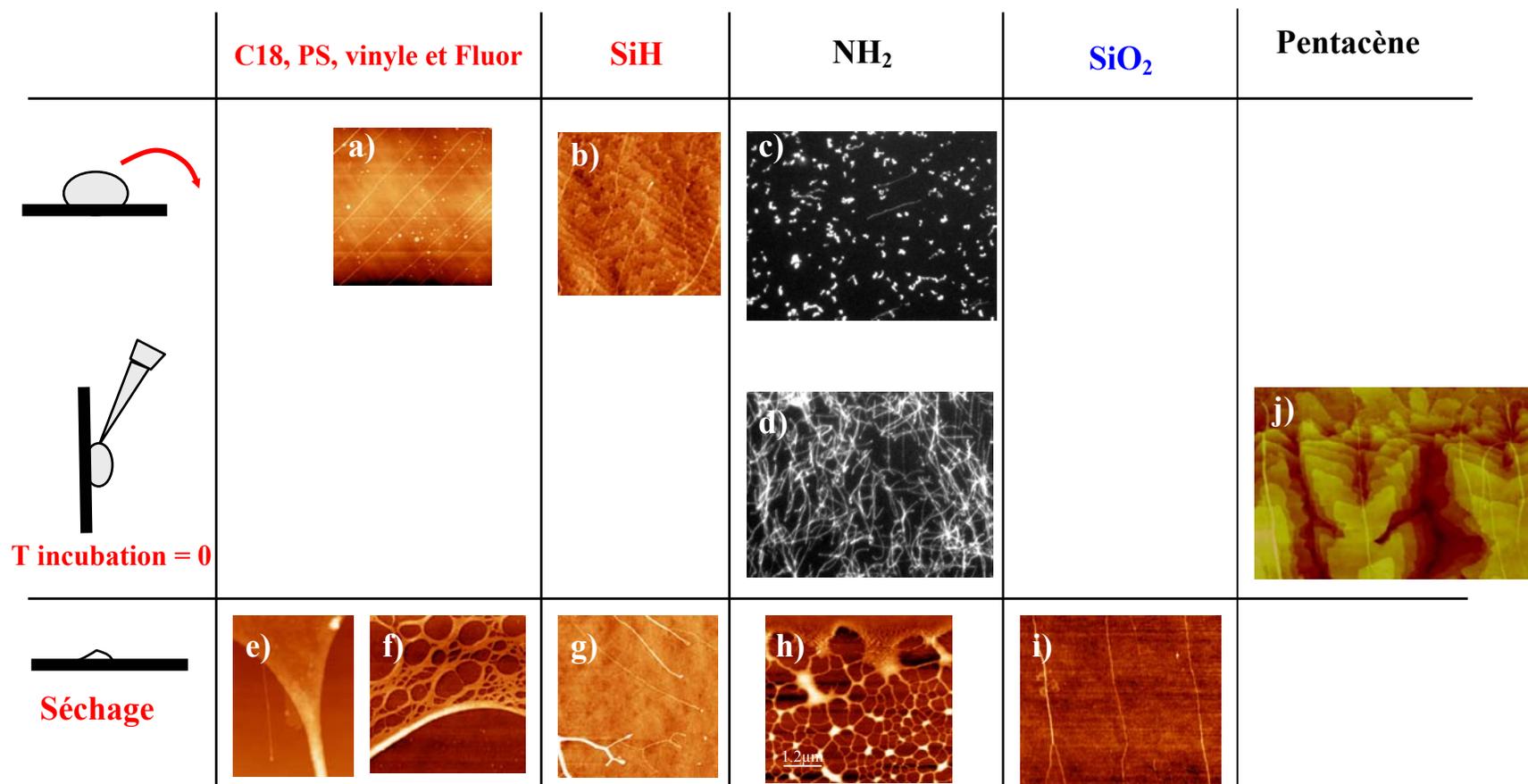


Figure III.11 : Méthode de dépôt de l'ADN en pratique pour différentes surfaces. Le séchage d'une goutte donne des cordes d'ADN, alors que la méthode pour laquelle on laisse incuber la goutte quelques instants donne des brins isolés. Toutes les images sont faites en AFM mode tapping sauf les images c) et d) qui sont obtenues en microscopie à fluorescence. Les dimensions des différentes images sont :

- | | | | |
|--------------|------------------|------------------|----------------|
| a) 3µm × 3µm | b) 0.6µm × 0.6µm | c) 64µm × 45µm | d) 64µm × 45µm |
| e) 3µm × 6µm | f) 4µm × 4µm | g) 2.5µm × 2.5µm | h) 10µm × 10µm |
| i) 2µm × 2µm | j) 2.4µm × 1.5µm | | |

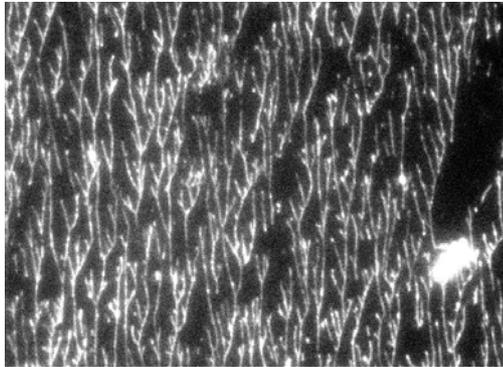


Figure III.12 : ADN entremêlé. Les brins peuvent former ce genre de structure lorsque la densité est importante. Image obtenue en microscopie à fluorescence : $64\mu\text{m} \times 45\mu\text{m}$

Figure III.13 : Les brins n'ont pas été étirés par le flot hydrodynamique et par le passage du ménisque. Image obtenue en microscopie à fluorescence : $64\mu\text{m} \times 45\mu\text{m}$

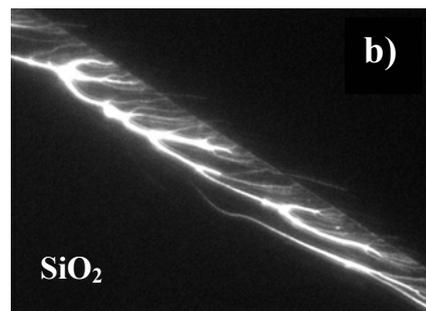
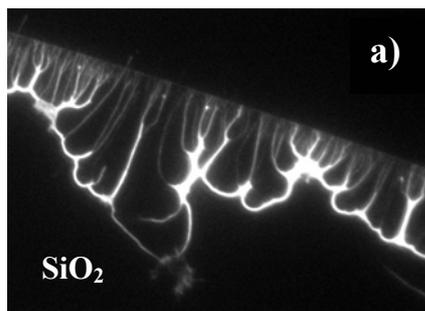
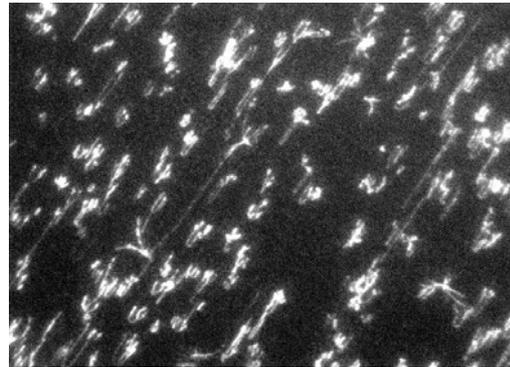


Figure III.14 : L'ADN se fixe au niveau du ménisque. Lorsqu'on retire la goutte il y a formation de cordes d'ADN. Images obtenues en microscopie à fluorescence : $64\mu\text{m} \times 45\mu\text{m}$

Dans le cas des surfaces SiO₂ et NH₂ qui sont plutôt hydrophiles on constate une accumulation de l'ADN sur le bord de la goutte. Dans le cas des surfaces fonctionnalisées avec le silane amine, l'ADN se met en boule et s'accumule ainsi au niveau du ménisque. Dans le cas de la surface SiO₂ l'ADN semble s'accrocher à l'endroit du ménisque. Lorsqu'on retire la solution, tous ces brins sont étirés, se rejoignent, et forment des cordes. La figure III.14 illustre le phénomène.

III.2.2.3. Densité en fonction du pH

On donne la variation de la densité d'ADN déposé en fonction du pH pour différentes solutions avec et sans tampon pour stabiliser le pH (les formules chimiques des tampons MES et Tris sont données en annexe C) et différentes surfaces :

MES (10mM)
Tris (10mM)
MES(10mM) / EDTA(1mM)
Tris(10mM) / EDTA(1mM)
MES(10mM) / MgCl₂(10mM)
Tris(10mM) / MgCl₂(10mM)
eau désionisée (notée **EDI**)
MgCl₂ (10mM) (notée **EDI/MgCl₂**)

III.2.2.3.1. Protocole

Pour chaque solution, chaque pH et chaque surface nous avons préparé deux échantillons. Ces échantillons sont observés en microscopie à fluorescence. Nous avons travaillé aux pH : **5.0** - 7.0 - 7.4 - 7.8 - 8.2 - **9.3** pour les solutions qui contiennent du Tris, et aux pH : **4.3** - 5 - 5.4 - 5.8 - 6.2 - 6.6 - 7.0 pour les solutions avec du MES. On indique en gras les valeurs du pH où on est hors de la zone pour laquelle le tampon est efficace pour stabiliser le pH. Les tampons que l'on utilise : Tris et MES stabilisent le pH respectivement entre [7 et 9] et [5 et 7]. En dehors de ces intervalles on a une indétermination plus importante sur la valeur du pH qui peut varier au cours du temps.

La densité de molécules est déterminée en comptant pour chaque image le nombre de brins d'ADN que l'on voit. Dans le cas où la densité est très forte, ou si les brins ne sont pas bien étirés, on a une incertitude sur la mesure. Les densités mesurées entre les deux échantillons sont en général en bon accord. En cas de désaccord, un troisième échantillon est préparé.

Le temps d'incubation est de 4 minutes. L'échantillon est recouvert pendant le temps d'incubation pour limiter l'évaporation. La concentration d'ADN est de 10pM (250ng/ml).

Les surfaces sont préparées suivant les protocoles donnés au chapitre II. La surface SiO₂ n'est pas fraîchement préparée. Nous avons fait ce choix pour que cette surface ne soit pas complètement hydrophile (le SiO₂ après un nettoyage au piranha ou un plasma est complètement hydrophile). Il est ainsi plus facile de retirer les gouttes déposées. De plus, étant donné le nombre d'échantillons, et le fait que les surfaces de SiO₂ fraîchement préparées ne se gardent pas très longtemps, nous avons opté pour des échantillons de SiO₂ qui ont séjourné un certain temps dans une boîte à gants sous azote. Leurs propriétés de surface sont alors stables.

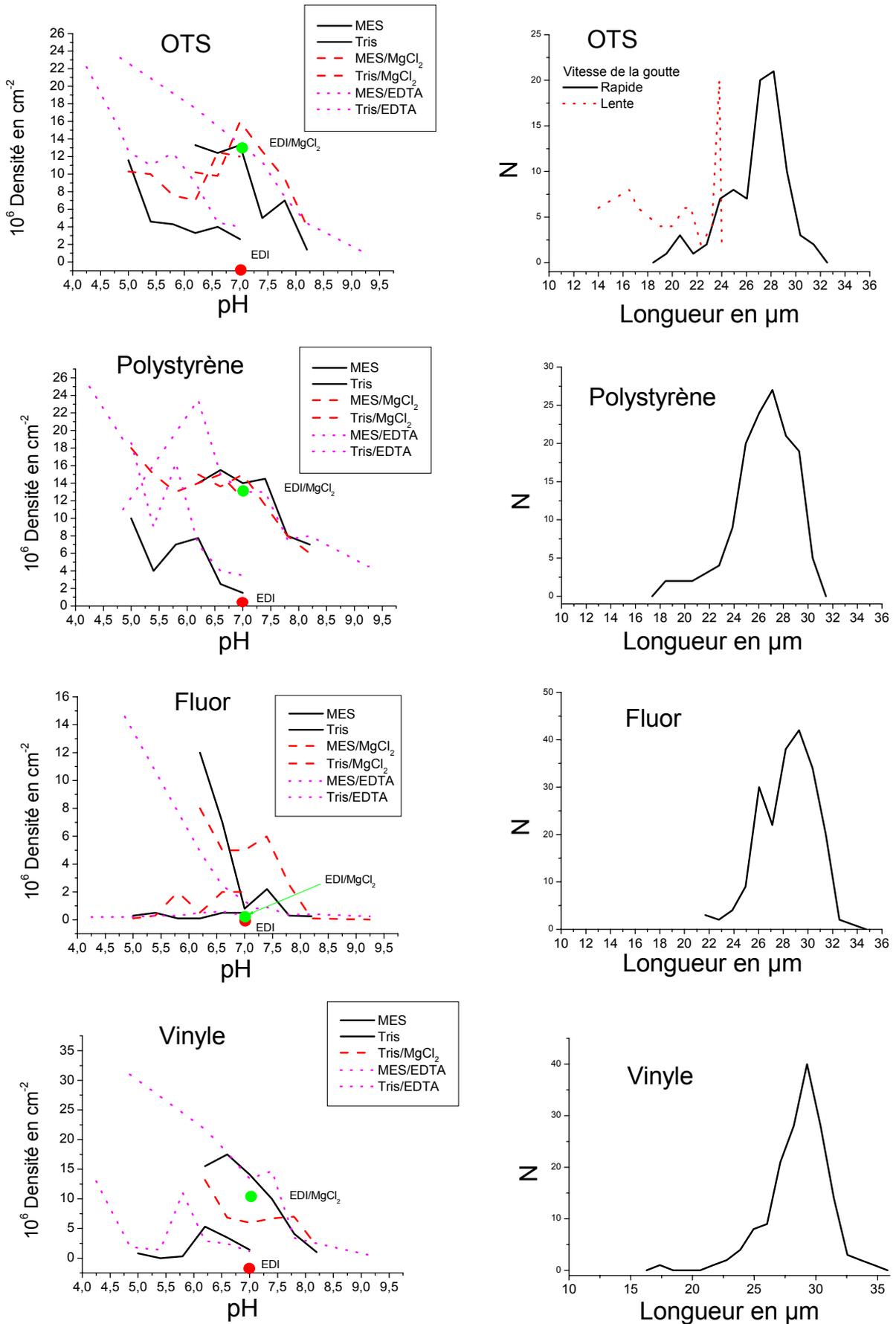


Figure III.15 : Densité surfacique d'ADN en fonction du pH pour différentes surfaces hydrophobes : Méthyle (silane OTS), Fluor, vinyle, Polystyrène (PS). On représente également l'histogramme des longueurs mesurées des brins. On rappelle que le λ -ADN fait $16.2\mu\text{m}$ de long. L'ADN est donc fortement surétiré.

Chapitre III : Dépôt d'ADN

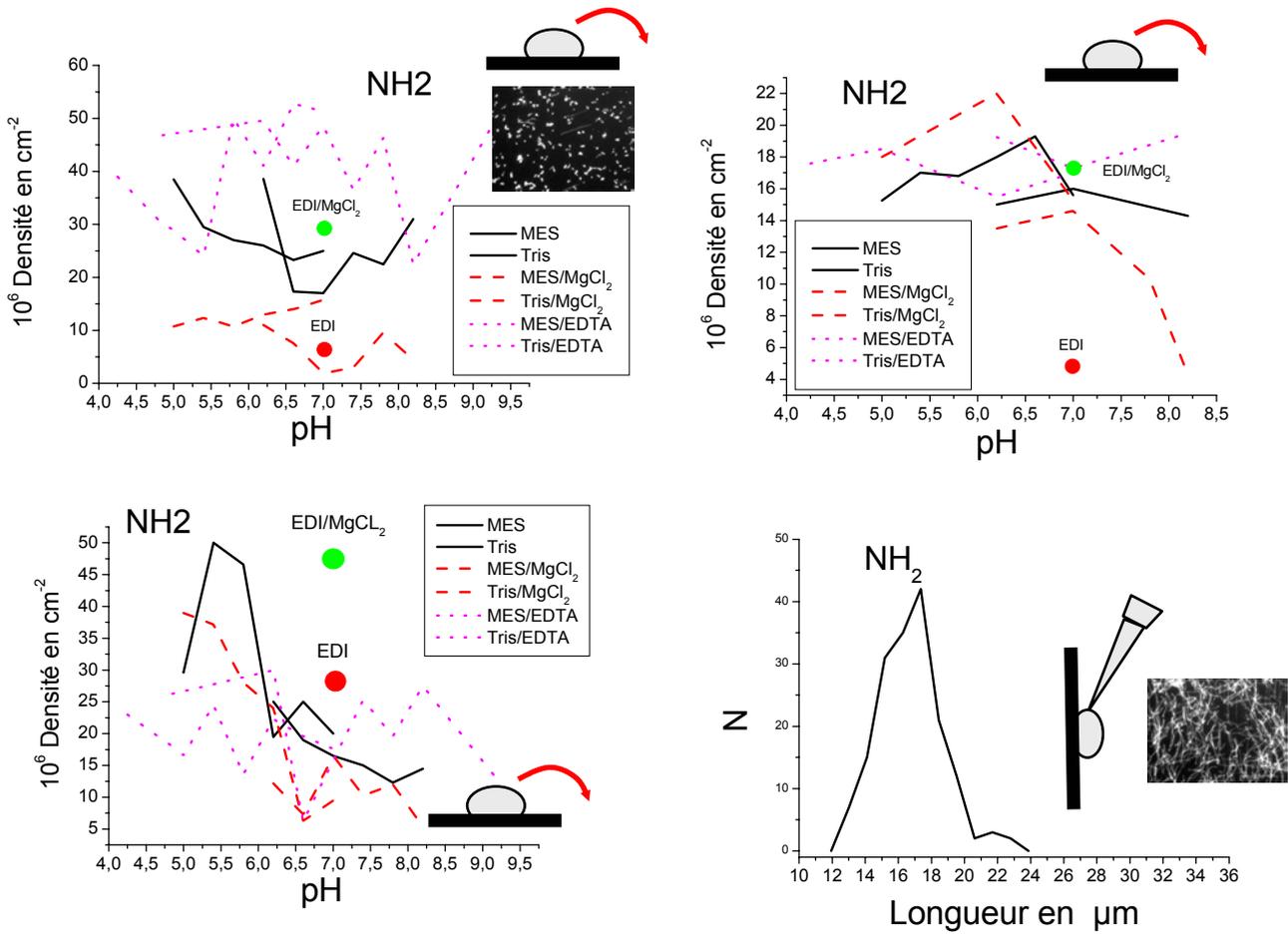


Figure III.16 : Densité surfacique en fonction du pH pour trois lots de surface NH₂ différentes. La mesure de densité est faite sur les échantillons pour laquelle la goutte a incubé 4 minutes et a été enlevée. On obtient alors l'ADN en pelote sur la surface. La mesure de longueur de l'ADN a été faite pour les préparations où l'échantillon est incliné et la solution s'écoule sur la surface. Des images des deux méthodes de dépôt sont indiquées en insert.

PMMA :
Densité inhomogène et très faible. De l'ordre de quelques centaines de brins par cm².

SiO₂ :
Densité très faible. De l'ordre de quelques milliers de brins par cm².
On a accumulation d'ADN sur le Bord de la goutte.

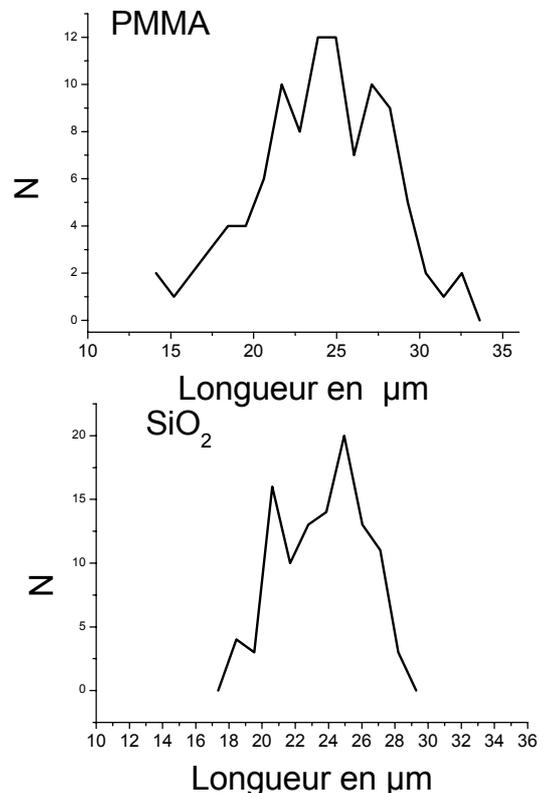


Figure III.17 : Longueur de l'ADN observé sur les surfaces PMMA et SiO₂. La densité observée sur ces deux surfaces est très faible.

III.2.2.3.2. Résultats

La figure III.15 et III.16 donnent les résultats de la densité d'ADN en fonction du pH. Sur les surfaces PMMA et SiO₂ la densité étant très faible, nous n'avons pas pu la mesurer avec une précision suffisante. On a estimé la densité à environ 1000 brins/cm².

Le niveau de reproductibilité des expériences peut être déduit de la figure III.16. Nous avons fait le dépôt sur trois lots de surface terminées amine. On a des variations du simple au double sur les densités mesurées entre des surfaces terminées amine appartenant à des lots différents. De plus les surfaces de chaque lot ne se comportent pas exactement de la même façon vis-à-vis des différents tampons utilisés. C'est avec la solution Tris/EDTA qu'on a le plus de reproductibilité (cf. figure III.16).

On ne pourra raisonnablement déduire de nos résultats que des tendances. En particulier, pour toutes les surfaces (sauf celle avec une fonction amine), la densité diminue en fonction du pH.

On peut diviser nos surfaces en 3 groupes. On met à part les surfaces SiO₂ et PMMA vu la faible densité observée :

- (I) Surfaces : terminée Méthyle (OTS) et Polystyrène
- (II) Surfaces : Fluorée et terminée Vinyle
- (III) Surfaces terminées NH₂

Pour les trois groupes les densités observées sont de l'ordre de 10⁷ molécules par cm² (cf. figure III.15 et III.16).

Pour les surfaces du groupe (I) (méthyle et polystyrène), les solutions d'ADN avec du Tris donnent une densité plus importante par rapport aux solutions contenant du MES. La présence de MgCl₂ dans le tampon MES augmente la densité d'ADN déposé. En revanche cela ne change rien dans le cas où le tampon est du Tris.

Pour les surfaces du groupe (II) (fluor et vinyle), les solutions qui contiennent du MES ne permettent pas de déposer d'ADN. Les densités mesurées sont faibles. Avec comme tampon le Tris, la densité diminue en fonction du pH de manière comparable aux surfaces du groupe (I). C'est sur ces surfaces du groupe (II) qu'on a eu le plus de problème de fluorescence parasite. Elle est parfois très importante à tel point qu'on distingue mal l'ADN. En revanche on a pas eu ce problème avec les surfaces du groupe (I) et (III).

La solution EDI (préparée par simple dilution de la solution commerciale d'ADN-λ de chez Aldrich 250μg/ml jusqu'à avoir une concentration de 10pM) donne de mauvais résultats du point de vue de la densité de molécules déposées. Si on rajoute un sel divalent Mg²⁺ (par l'ajout de MgCl₂), on observe une densité beaucoup plus importante (cf. figure III.15).

On distingue les surfaces des groupes (I) et (II) par rapport à la surface terminée amine (groupe (III)) vis-à-vis du comportement par rapport au cation divalent Mg²⁺. En effet avec la solution EDI/MgCl₂, on a une densité proche de celle observée pour les solutions Tris/EDTA, Tris, Tris/MgCl₂ pour les surfaces des groupes (I) et (II). En revanche, ce n'est pas le cas pour la surface terminée amine. On gagne pour cette surface un facteur allant de 2 à 6 sur la densité mesurée lorsqu'on rajoute du sel divalent alors qu'on gagne un facteur de presque 100 pour les surfaces du groupe (I) et (II).

On notera que les courbes de densité (pour les surfaces hydrophobes) des solutions qui contiennent du MES ont l'air décalées par rapport au solution qui contiennent du Tris. On le voit bien sur la figure III.15 dans le cas de l'OTS. Cette observation est moins évidente sur les autres surfaces.

III.2.2.3.3. Interprétation

La dépendance de la densité en fonction du pH correspond à ce qu'ont observé d'autres auteurs [Allemand 1998] [Kang 2001].

La charge des surfaces terminées méthyle, vinyle et fluor, est peu affectées par le pH de la solution. Il n'y a que la surface terminée amine qui est sensible au pH. En effet il y a une fonction acide dont le pKa est de 9.0. Par conséquent au pH où on travaille, cette surface est toujours chargée positivement.

Toutes nos observations sont cohérentes avec cette forte attraction entre l'ADN et la surface terminée amine. En effet, lorsqu'on fait couler la solution le long de l'échantillon, l'ADN est étiré par le gradient de vitesse et dès que la molécule touche la surface elle se fixe immédiatement. En revanche lorsqu'on laisse incuber la goutte, l'ADN se dépose en pelote. Dans ce cas le mécanisme de fixation de l'ADN ressemble plus à une sorte de « projection » sur la surface de la molécule. L'observation à l'AFM de nos échantillons confirme cette hypothèse [Rivetti 1996]. Enfin, nous verrons au III.2.2.5. que la dépendance en fonction du temps de la densité d'ADN est en accord avec une forte attraction de l'ADN sur la surface qui une fois fixé ne bouge plus [Rivetti 1996].

On peut considérer les charges par leur effet d'écran (cas linéaire de Huckel Debye. Cf. Chapitre I). Dans ce cas, on peut expliquer les courbes de densité qu'on observe pour les surfaces hydrophobes par un écrantage des interactions électrostatiques.

Tout d'abord on peut expliquer pourquoi on dépose très peu de molécules lorsque la solution d'ADN contient très peu de sels. En effet, les interactions électrostatiques sont peu écrantées. Or, l'ADN lorsqu'il s'approche de la surface va être repoussé par sa charge image [Allemand 1998] [Jackson]. En présence de sels qu'il soit divalent ou monovalent, les interactions sont écrantées. Dans ce cas, l'ADN peut s'approcher de la surface et s'y fixer. Cela permet d'expliquer pourquoi on retrouve le même niveau de densité avec la solution EDI/MgCl₂, qu'avec les solutions Tris, Tris/EDTA, et Tris/MgCl₂.

On peut expliquer également pourquoi les courbes du MES sont décalées par rapport aux courbes du Tris. En effet, la quantité d'ions dans la solution dépend du pH, puisqu'on a des acides faibles (le Tris et le MES) dans la solution. Lorsque le pH diminue, on obtient la forme acide du Tris (respect. MES) en dessous de $\text{pH} = \text{pK}_{\text{aTris}} = 8.1$ (respect. $\text{pH} = \text{pK}_{\text{aMes}} = 6.1$).

Dans le cas du Tris la forme acide est chargée positivement alors que pour le MES elle est neutre (la forme basique est chargée négativement). De ce fait pour le Tris, la charge positive dans la solution va augmenter en dessous de $\text{pH} = 8.1$. En revanche, pour le MES ça ne change pas grand-chose puisque cette molécule n'est pas chargée positivement et ne peut pas écranter les charges positives. On peut expliquer ainsi pourquoi le MES est un tampon beaucoup moins intéressant pour déposer l'ADN que le Tris.

Bien que l'approche de l'ADN près de la surface dépend de l'écrantage des interactions électrostatiques, une fois que l'ADN touche la surface il se fixe par des

interactions hydrophobes. En effet, vu le nombre de point d'attache de la molécule sur la surface, il est peu probable que l'interaction soit de type électrostatique.

En conclusion de cette section on a pu constater que c'est la solution de Tris/EDTA qui donne les résultats les plus reproductibles.

Les expériences que nous avons effectuées sur les surfaces SiO₂ ne sont pas concluantes. Il aurait certainement mieux valu utiliser des surfaces fraîchement préparées. On peut espérer de meilleurs résultats. Ce travail est en cours.

III.2.2.4. Longueur de l'ADN

III.2.2.4.1. Protocole

Nous avons mesuré la longueur des molécules d'ADN à partir de nos images. Nous avons calibré la caméra du microscope à fluorescence à l'aide d'un motif dont on connaît la taille. Les dimensions de nos images obtenues avec le microscope à fluorescence sont 64µm × 45µm.

Nous avons considéré uniquement les molécules où on peut distinguer sans ambiguïté les deux extrémités. La mesure est faite à la règle sur nos images. Par une règle de trois on remonte à la taille de nos molécules.

On ne compte pas les brins d'ADN en dessous d'une certaine taille (14µm). Dans ce cas il est probable qu'on ait uniquement des bouts de la molécule d'ADN. Il est peu probable que les brins soient associés l'un derrière l'autre ($2 \times 16\mu\text{m} = 32\mu\text{m}$). Dans ce cas on aurait deux pics dans l'histogramme des longueurs.

L'histogramme des longueurs pour une surface est établi à partir des images à tous les pH et pour toutes les solutions. Nous n'avons pas constaté de dépendance en fonction de ces deux paramètres. En procédant ainsi, on arrive à obtenir suffisamment de mesures pour établir un histogramme représentatif.

III.2.2.4.2. Résultats

La longueur des brins d'ADN est donnée pour chaque surface sur les figures III.15, III.16 et III.17. L'ADN est systématiquement surétiré. Il n'y a que sur les surfaces terminées amine que la longueur que l'on mesure est en accord avec la longueur de 16.3µm de la forme B de l'ADN-λ. Cela ne signifie pas que sur ces surfaces l'ADN soit en forme B.

Sur les surfaces hydrophobes l'étirement est très important. Il correspond à l'ADN presque en totalité en forme S (cf. chapitre I). La longueur maximale (cf. figure III.15) atteinte est de 32µm. Si on étire un peu plus l'ADN on provoquerait la rupture de la molécule. Le résumé des longueurs mesurées est donné au tableau III.01.

L'étirement dépend de la vitesse du fluide. En effet, nous avons vérifié dans le cas d'une surface terminée méthyle que l'étirement de l'ADN dépend de la vitesse à laquelle on enlève la goutte. Dans le cas où la goutte est déplacée lentement sur l'échantillon, on mesure une longueur de 24 μm au lieu de 28 μm (valeur la plus probable sur la figure III.15, cas de l'OTS).

On ne distingue pas ni à l'AFM ni au microscope optique de zones différentes sur un même brin d'ADN suggérant que l'ADN est étiré de la même façon sur toute sa longueur.

Pour la surface PMMA, les longueurs s'étalent entre 15 et 32 μm avec un maximum d'occurrence peu prononcé (cf. figure III.17).

Pour la surface SiO₂ on peut constater que l'ADN est également surétiré. Ce résultat ne correspond pas à ce qu'on peut trouver dans la littérature de la littérature [Bensimon 1997]. L'explication vient du fait que nos surfaces de SiO₂ ne sont pas fraîchement préparées. Nos surfaces ne sont pas complètement hydrophiles. Par conséquent l'effet du ménisque lorsqu'il passe sur l'ADN peut étirer l'ADN.

En guise de conclusion on peut constater que notre méthode de dépôt avec une goutte d'ADN qu'on laisse incubé puis qu'on enlève ne donne pas des résultats aussi intéressants qu'on l'espérait. En effet, nous n'avons pu détecter aucun courant (<10⁻¹⁵A) sur les échantillons préparés avec cette méthode (cf. chapitre IV). L'explication la plus simple et la plus convaincante est que le surétirement très excessif contraint la molécule qui devient isolante dans l'hypothèse où elle aurait été conductrice dans une forme non contrainte.

L'ADN est certainement en forme S d'après ce qu'on a présenté au chapitre I [Clausen 2000]. On pourrait supposer également un déroulement de la molécule qui se retrouverait comme une échelle dont les montants seraient les deux chaînes phosphates et les paires de base les échelons. Cette forme paraît peu probable. Il faudrait que la molécule ait le temps de se dérouler sur toute sa longueur.

| Surface | Min*** (μm) | Maximum d'occurrence (μm) | Max*** (μm) |
|-------------------------|--------------------------|--|--------------------------|
| Méthyle vitesse lente** | 23 | 24 | 25 |
| Méthyle vitesse rapide* | 23 | 28 | 32 |
| Polystyrène* | 23 | 27 [27 μm^+] | 31 |
| Fluor* | 24 | 29 | 32 |
| Vinyle* | 23 | 29 | 33 |
| SiO ₂ * | 17 | 25 [18 μm^+] | 30 |
| PMMA* | 15 | 25 | 32 |
| NH ₂ * | 13 | 17 [20 μm^+] | 20 |

Tableau III.01 : Mesure de longueur de l'ADN λ pour différents types de surface avec la méthode de la goutte.

* La goutte est enlevée rapidement.

** La goutte est déplacée lentement sur l'échantillon.

*** Le min et le max correspondent à l'intervalle qui inclue environ 90% des brins.

+ Mesure obtenue par Bensimon [Bensimon 1997]. Leur surface SiO₂ est fraîchement préparée, contrairement à nos surfaces. Nos surfaces SiO₂ sont plus hydrophobes.

III.2.2.5. Densité en fonction du temps d'incubation

III.2.2.5.1. Protocole

Pour mesurer la densité en fonction du temps d'incubation, l'échantillon avec la goutte est recouvert par un récipient de petit volume (10cm^3) afin de limiter l'évaporation et d'avoir un équilibre avec la pression de vapeur saturante. On limite ainsi la variation de pH de la solution. Les mesures sont faites à $\text{pH}=7.0$ dans un tampon Tris(10mm)/EDTA(1mM). L'incertitude sur nos mesures est importante (de l'ordre de 10 à 20%).

III.2.2.5.2. Résultats

Les courbes expérimentales sont données sur la figure III.18. Les points sont à peu près alignés suggérant une densité en fonction du temps variant en t^α . La valeur de l'exposant est la plus importante pour la surface Fluorée 0.84. Elle est de 0.51 pour la surface terminée amine, et de 0.24, 0.27, 0.34 pour les surfaces terminées méthyle, vinyle et polystyrène respectivement. On ne déduit pas d'exposant des mesures sur la surface PMMA puisqu'on ne dispose que de deux points.

Néanmoins les résultats sont cohérents. Il n'y a que la surface fluorée qui pose problème. La densité d'ADN augmente très rapidement. On pouvait s'attendre à un comportement similaire aux autres surfaces hydrophobes.

La densité la plus importante est obtenue sur la surface terminée amine. L'interaction électrostatique entre la surface chargée positivement et l'ADN chargée négativement est à l'origine de cette forte concentration.

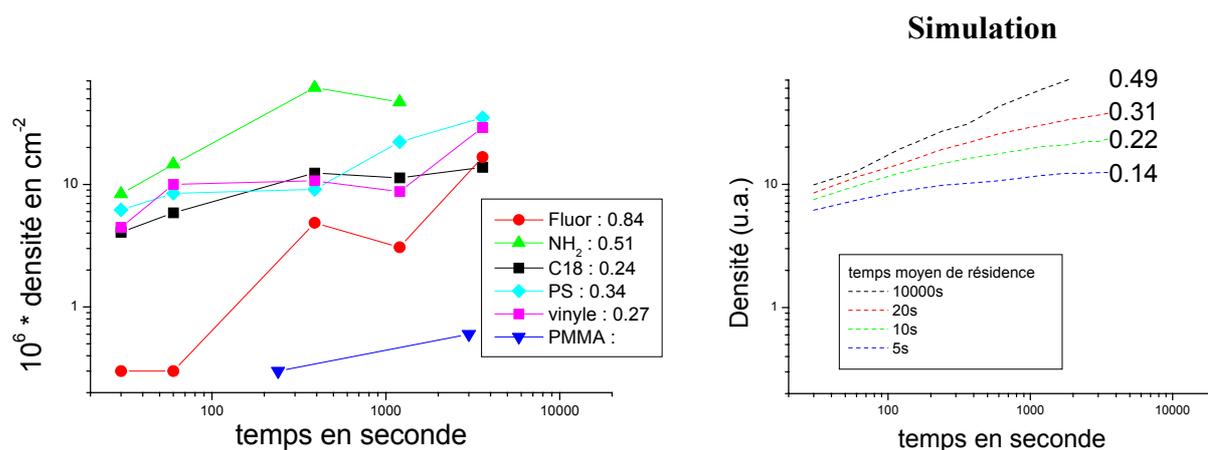


Figure III.18 : Densité d'ADN déposée en fonction du temps en échelle log-log. La pente de la droite qui approche le mieux les points expérimentaux est indiquée pour chaque surface. A droite résultats de la simulation, et valeurs de l'exposant déduites des courbes simulées.

III.2.2.5.3. Interprétation

On propose un petit modèle pour rendre compte de la variation observée expérimentalement.

Le modèle considère l'ADN comme un point qui se déplace au hasard dans l'espace. Les molécules d'ADN sont indépendantes. Cette hypothèse est vraisemblable car on est largement en dessous de la concentration pour laquelle on ne peut plus négliger l'interaction entre les molécules d'ADN [Gani 1999]. Lorsque l'ADN rencontre la surface, il y reste un temps caractéristique puis repart en solution. On considère que lorsqu'il a touché la surface, la probabilité par unité de temps qu'il reparte en solution est de $1/\tau$ (où τ est le temps caractéristique). On a simulé cette marche au hasard pour différentes valeurs de τ : [5s – 10s – 20s – 10000s].

On retrouve avec ce modèle pour une valeur de τ importante ($\tau = 10000s$) la variation en $t^{0.5}$ caractéristique d'un processus de diffusion, et observée expérimentalement pour différentes techniques de dépôt d'ADN [Rivetti 1996].

En particulier la valeur de 0.84 trouvée pour la surface fluorée est aberrante. Une explication satisfaisante serait que le pH diminue au cours du temps par dissolution du CO_2 atmosphérique. Or nous avons vu que pour la surface fluorée (cf. figure III.15) que la densité augmente brutalement lorsqu'on diminue le pH de 7.0 à 6.6.

Lorsque τ prend une valeur plus faible, la densité tend vers une valeur d'équilibre. En échelle $\log - \log$, on peut calculer la pente et comparer avec nos résultats. On n'a pas rigoureusement dans nos simulations une variation en t^α . Néanmoins on comparera tout de même les pentes expérimentales et simulées en échelle $\log - \log$.

Les surfaces polystyrène, vinyle et méthyle (C18 sur la figure) donnent une évolution similaire. La pente est de l'ordre de 0.3. D'après nos simulations, cela correspond à un temps de résidence de 20 secondes sur le substrat. Cette valeur est assez importante par comparaison aux données de la littérature. Kang [Kang 2001] mesure un temps de résidence caractéristique de l'ordre d'une fraction de seconde. On est largement au dessus de cette valeur.

Pour expliquer ce désaccord on peut dire que notre modèle est très simpliste. En effet on rend compte avec un seul paramètre de l'interaction entre la surface et la molécule d'ADN. Le temps que nous avons calculé avec nos simulations ne correspond pas à une mesure directe du temps de résidence de l'ADN sur la surface. En effet notre modèle ne fait pas la différence entre le cas où on a une déplétion d'ADN à proximité de la surface et un temps de résidence très long, et la situation où on a une accumulation d'ADN près de la surface et un temps de résidence court. On déduit uniquement de notre modèle un temps de résidence effectif qui rend compte de l'ensemble de l'interaction de l'ADN avec la surface. Néanmoins ce modèle permet de trouver l'allure de la densité en fonction du temps pour les différentes surfaces.

Dans nos simulations, on ne compte que les molécules qui se trouvent à un instant donné sur la surface. Cependant, les brins d'ADN qui sont à proximité de la surface au moment où on enlève la goutte peuvent se fixer (ce sont par exemple les molécules fixées en dehors de la zone d'incubation de la goutte). On devrait donc compter toutes les molécules se trouvant à une certaine distance de la surface. En affinant ainsi le modèle on pourrait remonter au véritable temps de résidence des molécules sur la surface. Cependant nous ne disposons pas assez de données pour un modèle plus détaillé.

III.2.3. Conclusion

La technique de dépôt où on laisse incuber une goutte d'ADN puis on l'enlève est une technique qui marche bien, mais qui présente le désavantage de surétirer l'ADN sauf sur les surfaces terminées amine.

Ce surétirement systématique de l'ADN est certainement la raison pour laquelle on n'a pas réussi de mesures électriques sur ces échantillons (cf. chapitre IV).

La solution qui donne les résultats les plus reproductibles du point de vue du dépôt est le Tris(10mM)/EDTA(1mM).

Toutes ces études en fonction du temps du pH, des sels présents dans les solutions demandent à être complétée afin de pouvoir remonter plus en détail au mécanisme du dépôt de l'ADN. Il semblerait d'après nos résultats que la concentration en sel joue un rôle important au niveau de l'écrantage de la répulsion électrostatique donnée par la charge image de l'ADN sur la surface.

III.3. Deuxième méthode : Séchage d'une goutte

III.3.1. Présentation

En laissant sécher une goutte on obtient des cordes d'ADN. Plus la solution que l'on laisse sécher contient de sel et plus les cordes que l'on obtient sont de petite taille (en hauteur et en largeur) comme le montre la figure III.19. L'ADN se fixe beaucoup moins lorsqu'on diminue la concentration en sel. Ce résultat est cohérent avec les densités que l'on a mesurées en fonction des différentes solutions et du pH (cf. section III.2.). Les ions écrantent les interactions électrostatiques, en particulier la répulsion par l'image électrostatique de la molécule donnée par la surface.

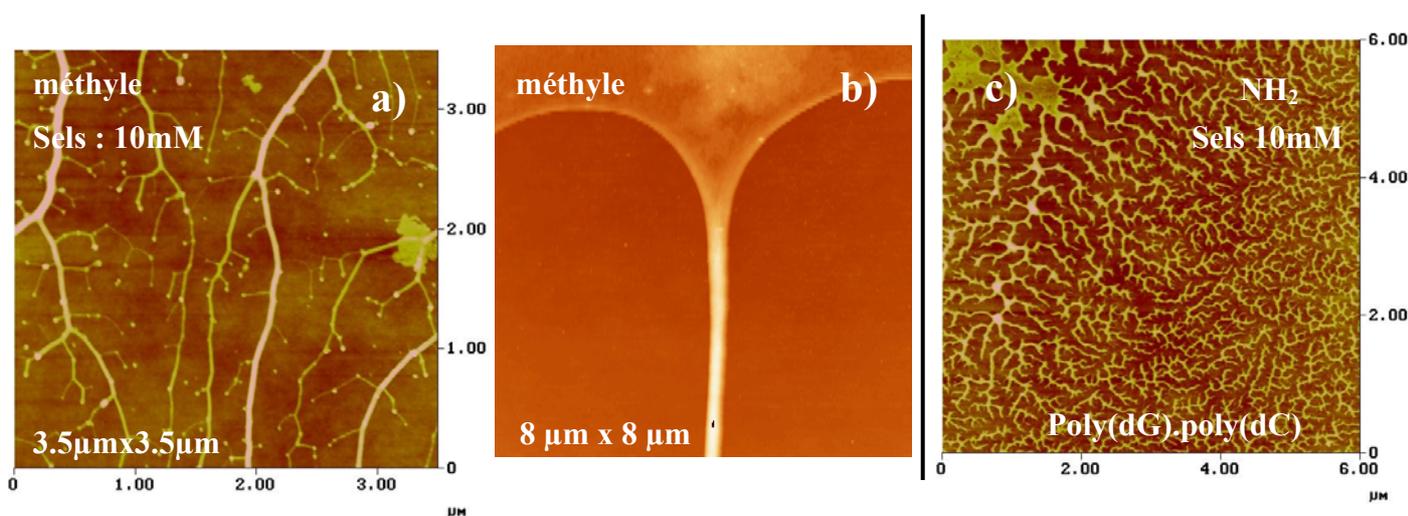


Figure III.19 : Corde d'ADN obtenue par séchage d'une goutte d'ADN. En a) la teneur en sel est plus importante qu'en b). Le dépôt d'ADN avec une molécule d'ADN plus courte donne une structure arborescente de plus petite taille. Toutes les images ont été obtenues en mode tapping AFM.

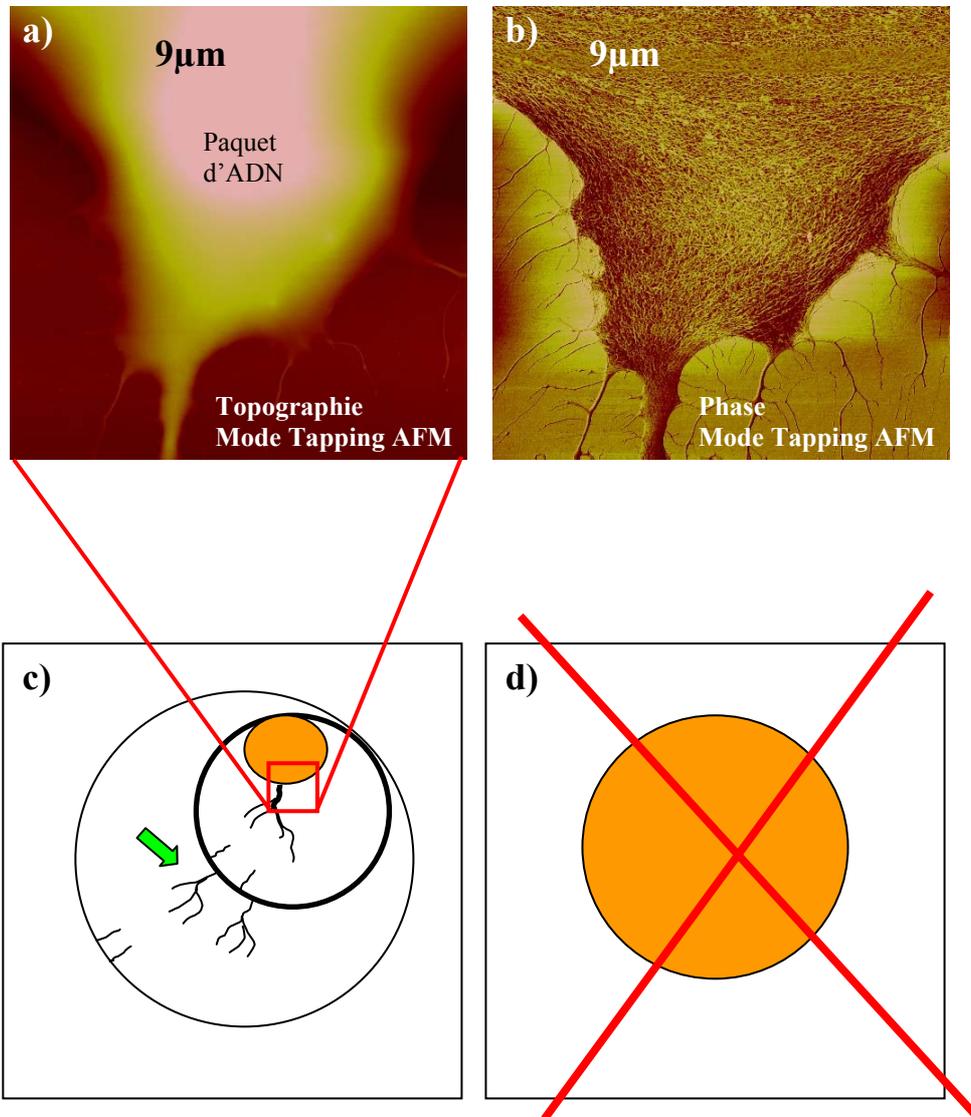


Figure III.20 : Séchage d'une goutte de solution contenant de l'ADN. On a deux types d'échantillon. En c), la goutte lorsqu'elle sèche marque des temps d'arrêt. Cela correspond aux auréoles. L'ADN forme des cordes qui s'échappent de ces structures. La goutte finit par former une zone avec beaucoup de sel et d'ADN (en orange sur la figure). Plus on s'approche de cette structure plus les cordes d'ADN sont importantes (en hauteur et en largeur). En d) la goutte sèche sur place. Le ménisque ne se déplace quasiment pas. On a donc un amas de sel et d'ADN sur toute la surface où on a posé la goutte. On ne peut rien faire avec ces échantillons. En a) et b) image AFM en topographie et en phase d'une zone proche du paquet d'ADN. On peut distinguer en phase la structure désordonnée du paquet d'ADN et les cordes qui s'échappent de cette structure. La surface correspondant aux images a) et b) est du SiO_2 . Le tampon qu'on a utilisé est du $\text{Tris}(10\text{mM})/\text{EDTA}(1\text{mM})$, avec 100pM d'ADN. Pour les mesures électriques on se placera plutôt dans une zone indiquée par la flèche. Dans ce cas, on est sûr d'avoir de l'ADN, et on est également sûr qu'il n'y a pas encore de trop de sels sur la surface par rapport à la zone où la goutte s'arrête (zone en orange).

La taille (hauteur et largeur) des cordes d'ADN augmente au fur et à mesure qu'on s'approche de la zone où tout le sel a précipité (cf. figure III.20). On a une arborescence. Les cordes se rejoignent et forment des structures plus importantes. En pratique pour observer de l'ADN à l'AFM il suffit de se placer à proximité des paquets visibles à l'œil nu.

L'arborescence semble être liée à l'ADN utilisé. Le séchage d'une goutte de poly(dG).poly(dC) donne une arborescence avec une dimension caractéristique plus petite (cf. figure III.19 en (c)). La taille de l'ADN λ est de $16\mu\text{m}$, alors que le poly(dG).poly(dC) a une taille beaucoup plus petite d'environ 100nm . De plus, ces molécules peuvent former entre elles des triplex et quadruplex. Cela peut également expliquer l'allure différente du dépôt. D'après Kanno [Kanno 2000] le poly(dG).poly(dC) forme une structure en réseau sur une surface de mica (cf. figure I.14 au chapitre I). Kanno réalise ses dépôts en laissant incubé pendant 1 minute une solution d'ADN concentrée (0.25mg/ml). Nos dépôts ne ressemblent pas à ceux de Kanno.

Chen [Chen 2002] a obtenu des dépôts très similaires à ce qu'on a observé sur la surface amine (cf. figure III.19 en (c)). Pourtant la technique qu'il utilise est très différente de la notre. Dans son cas, il dépose l'ADN sur une monocouche de lipide cationique formée à la surface de l'eau. Il récupère ensuite sur un substrat la couche lipidique et il l'observe à l'AFM. Le point similaire entre nos deux techniques est l'utilisation de surfaces chargées positivement.

Le mécanisme de formation des cordes est lié à la concentration d'ADN. En effet lorsque la goutte sèche, la concentration en sel et en ADN augmente. Ces conditions favorisent la formation de structures ordonnées. En effet, à partir d'environ 1mg/ml ($4\times$ plus concentré que la solution mère d'ADN : solution commerciale d'ADN λ de chez Aldrich) l'ADN commence à former une phase cristal liquide (cf. chapitre I) [Strzelecka 1987] [Wissenburg 1995]. En effet, nous avons constaté que si on prend une goutte de solution mère d'ADN (0.250mg/ml), qu'on la dépose sur le substrat et qu'on la déplace sur ce substrat doucement (comme pour la technique de la goutte objet de la section III.2.), on arrive à former des cordes d'ADN sur la surface. Les plus grosses cordes sont visibles à l'œil nu (avec un éclairage rasant) et font environ $1\mu\text{m}$ de diamètre. La formation de cordes sur la surface ressemble beaucoup à la formation de fibre d'ADN à la différence qu'elle se forme directement sur la surface. On peut donc raisonnablement supposer que les cordes d'ADN sont composées d'un arrangement compact et relativement ordonné de molécules d'ADN.

III.3.2. Conclusion

La méthode de séchage d'une goutte malgré sa très grande simplicité donne des résultats assez intéressants. On notera que c'est avec un dépôt de ce type sur une surface de graphite (HOPG) que Beebe a réussi à observer au STM la double hélice de l'ADN [Beebe 1989]. Il a observé une certaine dispersion sur la mesure du pas de l'hélice et sur la hauteur de la molécule, mais il trouve des valeurs proches de respectivement 36Å pour le pas et 20Å pour la hauteur !

Un problème lié à cette méthode est que on peut laisser beaucoup de sel sur la surface, surtout si elle est hydrophile. On peut résoudre ce problème en utilisant des sels volatils comme l'ammonium acétate (Nous n'avons pas fait l'expérience). De manière générale nous

avons travaillé avec le moins de sel possible et en évitant de faire nos mesures sur la zone où la goutte forme les plus gros paquets (cf. figure III.20).

L'intérêt d'utiliser les échantillons préparés avec cette technique est qu'on dispose de cordes d'ADN de toutes les tailles. De plus ces cordes sont connectées à des paquets d'ADN plus gros qui peuvent résister à une métallisation (cf. chapitre IV).

III.4. Discussion

III.4.1. Point de fixation de l'ADN sur la surface

L'objectif de cette partie est de mettre en évidence que l'ADN se fixe à la surface au niveau de quelques points seulement. Un des points de fixation de l'ADN est en général l'extrémité de la molécule [Kang 2001]. Mais les molécules peuvent également se fixer au niveau de la molécule.

On peut observer cela facilement au microscope optique à fluorescence. En effet, dans ce cas, il suffit d'observer suffisamment longtemps une molécule d'ADN pour qu'elle finisse par être clivée photo chimiquement [Kang 2001]. Dans ce cas, la molécule se rétracte jusqu'à son point d'ancrage le plus proche. C'est sur la surface polystyrène que l'on a observé le plus fréquemment ce phénomène. L'ADN est très peu fixé sur la surface.

On peut également observer les points de fixation en soumettant l'ADN déposé sur la surface à un étirement dans la direction perpendiculaire. On obtient un résultat indiqué sur la figure III.21. La molécule reste fixée à ses points d'attaches. Lorsqu'on la soumet à une contrainte perpendiculaire, les parties qui ne sont pas fixées sont emmenées par le fluide. On obtient alors des boucles entre deux points d'attache. On peut constater que la molécule est fixée en un petit nombre de points.

Toutes nos surfaces ont données ce genre de résultats sauf la surface terminées amine. Dans ce cas l'ADN déposé est insensible aux traitements ultérieurs avec nos solutions. L'ADN est fixé par interaction électrostatique tout le long de la molécule.

Cette différence de comportement entre le point de fixation de l'ADN et le reste de la molécule est assez étonnante. On peut l'expliquer par une différence de structure. On propose sur la figure deux modèles de fixation de l'ADN sur les surfaces hydrophobes par l'intermédiaire des paires de base. La molécule s'ouvre localement pour exposer les paires de base vers la surface. Dans le cas des surfaces chargées (comme la surface terminée amine), l'interaction se fait plutôt avec les groupements phosphates [Nony 2001].

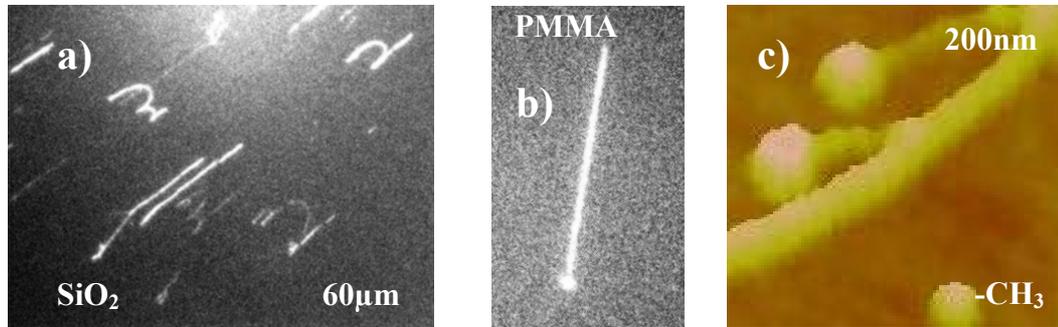


Figure III.21 : Fixation de l'ADN par des segments et aux extrémités. On observe fréquemment une accumulation de matière plus ou moins importante au point de fixation de l'ADN. Ce n'est pas systématique. Les images a) et b) sont obtenues en microscopie à fluorescence. L'image c) est obtenue à l'AFM en mode tapping. L'ADN sur l'image c) à une longueur d'environ 20µm.

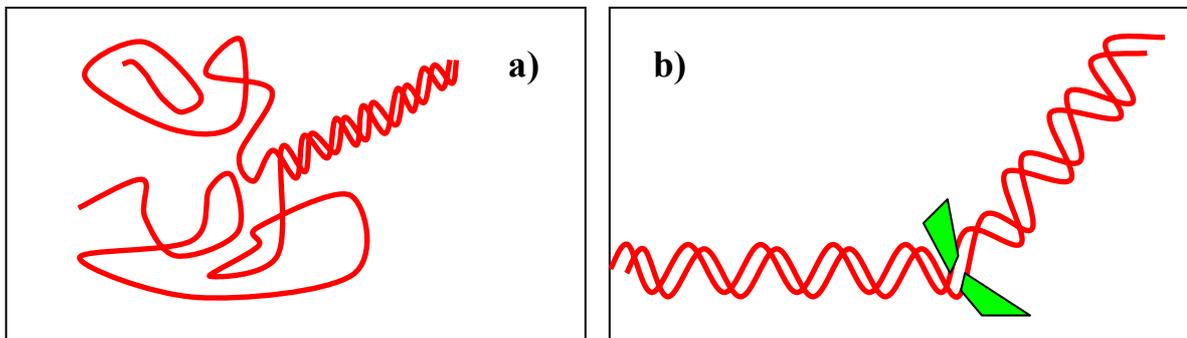


Figure III.22 : Modèle pour l'accrochage de l'ADN sur la surface. En a) accrochage aux extrémités. En b) accrochage d'un segment par ouverture de la double hélice. Les bases peuvent interagir directement avec la surface. Ce modèle est surtout valable pour les surfaces hydrophobes. En effet les surfaces chargées interagissent principalement électrostatiquement avec le groupement phosphate de la molécule.

III.4.2. Structure de l'ADN sur la surface

Nous avons étudié jusqu'à présent la densité et la longueur de l'ADN déposé. Cette partie est consacrée à tenter d'explicitier la structure de l'ADN, en particulier savoir si deux molécules peuvent former des plectonèmes sur la surface (cf. chapitre I). Les images que nous présentons ont principalement été obtenues en AFM. Ce microscope est intéressant pour l'observation de l'ADN puisqu'il n'est pas nécessaire de traiter la molécule pour pouvoir l'observer comme c'est le cas pour la microscopie à fluorescence (intercalant fluorescent entre les paires de base) ou la microscopie électronique (traitement avec des protéines, ou des sels d'uranium, ou bien métallisation en biais pour augmenter le contraste).

Les brins d'ADN que nous observons à l'AFM et au microscope sont rarement seuls. Ils forment des cordes composées de quelques unités à plusieurs milliers. Dans le cas d'un petit nombre d'ADN, l'AFM permet dans certaines situations (substrat très plat, bonne pointe,...) de distinguer la formation de plectonème. Il est vrai que l'observation de telles structures est à la limite de résolution de l'appareil, mais il est fort probable que sur l'image obtenue sur SiH (cf. figure III.23) on ait effectivement un plectonème. De plus nous avons observé de telles structures sur d'autres surfaces (-NH₂, méthyle). La périodicité de l'enroulement va de 30nm à 50nm. Thundat a observé des plectonèmes en mode contact [Thundat 1992] sur des molécules d'ADN circulaires.

Sur la figure III.23 le brin d'ADN est fixé en trois endroits de la surface SiH. Le sens du peignage est indiqué par la flèche. Lorsque deux brins se croisent il y a deux possibilités. Soient ils restent l'un à côté de l'autre. Soit ils s'enroulent l'un sur l'autre et forme un plectonème.

Les deux hypothèses sont représentées sur la figure III.23. La mesure de la hauteur des brins est en accord avec la formation d'un plectonème. En effet, si les brins étaient côte à côte, on ne verrait pas de changement de hauteur (cf. point *a*, *b* et *c* sur la figure III.23). Inversement, il est possible que cette image nous donne un artefact puisque l'ADN donne également des ondulations à des endroits où il n'y a qu'une seule molécule d'ADN. On peut également avoir un mixage des deux configurations. C'est certainement le cas de notre molécule puisque l'ondulation et la hauteur sont plus faibles sur la fourche (cf. zoom sur la figure III.23).

De toute manière on ne peut espérer voir de plectonème que sur des molécules d'ADN soumise à une contrainte de torsion [Bednar 1994] [Sottas 1999]. Si le brin se fixe en plusieurs endroits, le nombre de tour d'hélice est fixé entre les deux points d'attache. C'est au moment du peignage que la contrainte peut se retrouver localisée à un endroit et provoquer la formation d'un plectonème.

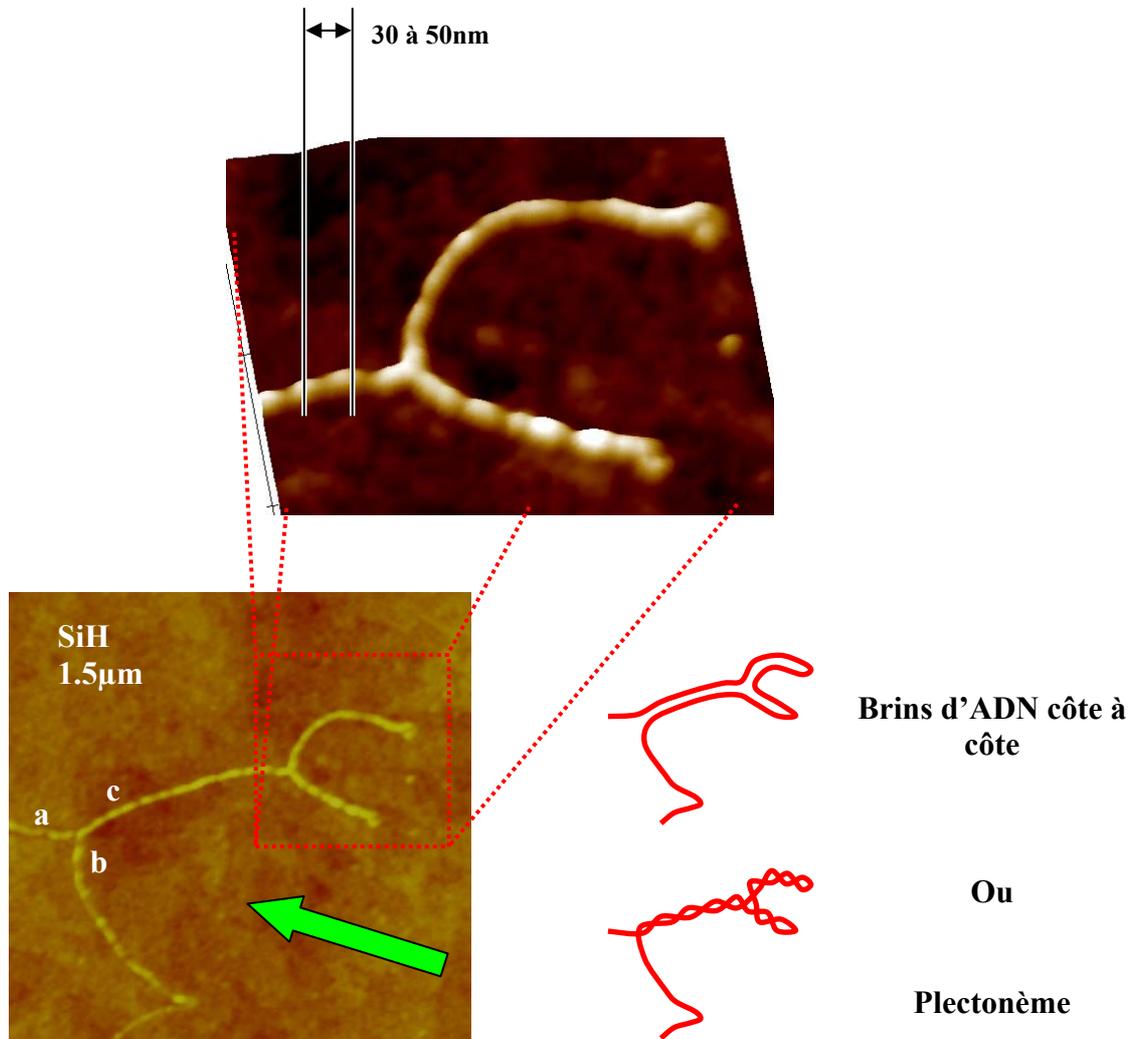


Figure III.23 : Structure de l'ADN déposé sur une surface de SiH. On a certainement un plectonème sur une partie au moins de la zone où il y a deux brins d'ADN. La flèche indique le sens du peignage. La hauteur au point c est double de celle au point a et b. Les images sont obtenues en mode tapping AFM.

III.5. Mesure de la hauteur de l'ADN

III.5.1. Protocole

On rassemble dans cette partie toutes les mesures de hauteur que l'on a effectué sur l'ADN à l'AFM. On ne considère cependant que les cordes d'ADN les plus petites qui ne comporte que quelques molécules d'ADN. Pour une surface donnée, on prend toutes nos images sur cette surface indépendamment de la méthode de dépôt.

La question qui motive cette étude est d'une part de savoir si l'ADN est contraint sur la surface. D'autre part, un résultat récent [Kasumov 2002] met en évidence l'importance de la hauteur de l'ADN sur les propriétés de conduction de l'ADN.

Dans le cas de la surface terminée méthyle, nous avons rencontré des problèmes pour mesurer la hauteur de l'ADN. En effet, pour quelques images, on a obtenu une variation de phase importante sur l'ADN et une hauteur de l'ADN toujours supérieure à 3nm. Les mesures de hauteur de ces surfaces n'ont pas été prises en compte pour tracer l'histogramme des hauteurs de la surface méthyle. On discute dans l'annexe B de ce problème de hauteur.

Dans Le cas des surfaces terminées vinyle et fluor on n'a pas suffisamment de mesures pour obtenir des histogrammes. Les quelques hauteurs qu'on a mesurées dans ce cas sont de l'ordre de 1nm.

Les histogrammes de hauteur sont représentés pour chaque surface sur la figure III.24.

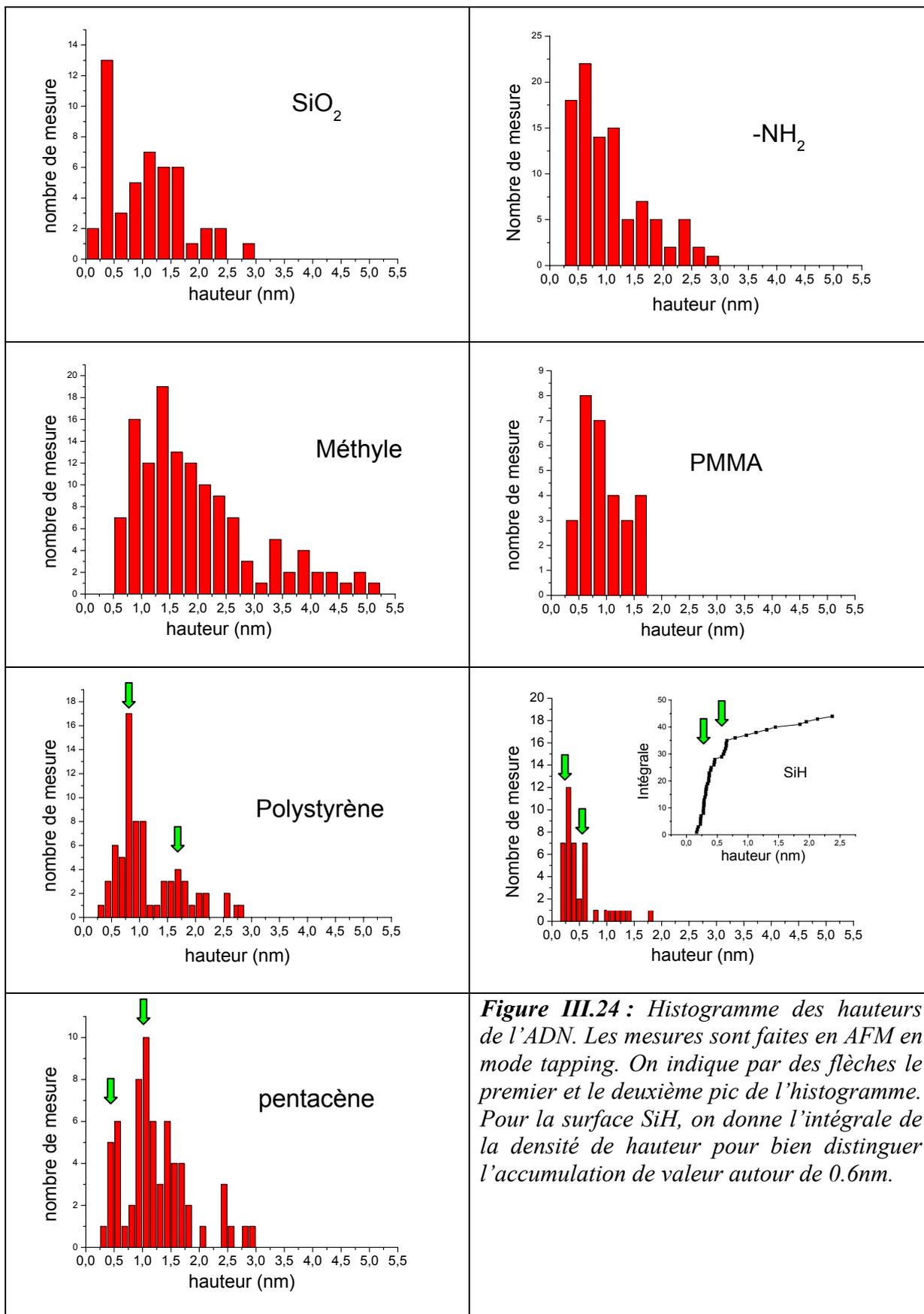
III.5.2. résultats

On peut constater que quasiment toutes nos mesures sont inférieures à 2nm (le diamètre cristallographique de la forme B de l'ADN).

Les histogrammes des surfaces polystyrène, pentacène, et SiH présentent deux pics distincts. Le deuxième pic est beaucoup plus élargi et situé à une hauteur double du premier. On a certainement des pics bien définis pour ces trois surfaces en partie parce qu'elles ont une bonne planéité, condition nécessaire pour bien distinguer des hauteurs de l'ordre du nm. Dans le cas de la surface SiH les deux pics sont beaucoup moins nets que pour le pentacène et le polystyrène. On a représenté l'intégrale de la répartition de taille obtenue à partir des données brutes pour cette surface. On distingue mieux sur l'intégrale les points d'accumulation en taille pour le premier et le deuxième pic.

Pour la surfaces SiO₂ on peut distinguer un pic principal puis un deuxième beaucoup plus élargi.

Pour les autres surfaces : amine, PMMA, et méthyle, on ne distingue qu'un seul pic très élargi, avec une taille minimale de la hauteur de l'ADN.



III.5.3. Interprétation

Le fait qu'on puisse distinguer deux pics dont l'un correspond à une hauteur double du premier, peut être interprété comme la hauteur d'une molécule pour le premier pic et la hauteur de deux molécules pour le deuxième.

Si on mesure la hauteur d'une molécule cela ne signifie pas qu'on a une molécule dans la corde d'ADN. En effet deux molécules peuvent être côte à côte. Dans ce cas, on ne va mesurer que la hauteur d'un seul brin. La résolution latérale de l'AFM ne permet pas a priori de distinguer entre deux molécules l'une à côté de l'autre et une seule molécule.

De même on peut supposer que la hauteur double observée correspond aux molécules réparties sur deux niveaux. Là encore on ne peut pas a priori à l'AFM dire combien il y a de molécules côte à côte.

Dans le cas où deux molécules forme des plectonèmes, on peut s'attendre à un doublement de la hauteur.

Le fait que l'on ait très peu de valeurs de hauteurs entre les deux pics (pour les surfaces polystyrène, SiH et pentacène) est peut être la signature d'une structure ordonnée de l'ADN sur la surface.

L'ADN est certainement contraint sur la surface. Par conséquent on peut donner une autre explication des différentes hauteurs observées. En effet, il est possible que deux molécules d'ADN l'une à côté de l'autre se stabilise mutuellement [Mou 1995] [Keller 1989] et adopte une configuration où la hauteur de chaque molécule est plus importante.

Cette explication permettrait d'expliquer les histogrammes obtenus sur les autres surfaces. En effet, si l'ADN peut adopter différentes configurations on peut s'attendre à un élargissement des pics de l'histogramme.

Tous les histogrammes présentent une valeur minimale de la hauteur mesurée qui est inférieure de moitié environ au pic principal. Ces mesures doivent certainement correspondre à des molécules d'ADN fortement contraintes, ou bien à des mesures sur des zones plus rugueuses. Dans ce cas, la molécule suit la topographie de la surface et il est difficile de remonter à sa véritable hauteur.

On peut déduire de toutes ces mesures la hauteur moyenne d'une molécule d'ADN sur chaque surface :

| | | | | | |
|--------------------|--------|---------------|--------|-----------|--------|
| SiO ₂ : | ~0.5nm | Amine : | ~0.5nm | Méthyle : | ~1nm |
| PMMA : | ~0.6nm | Polystyrène : | ~0.9nm | SiH : | ~0.3nm |
| Pentacène : | ~0.5nm | | | | |

Dans le cas de la surface terminée méthyle nous avons eu pour certaines images une surévaluation de la hauteur de l'ADN (cf. Annexe B). Le problème dans ce cas vient du contraste entre l'ADN qui est hydrophile et la surface qui est hydrophobe. Pour éviter ce problème nous avons métallisé l'échantillon avec une fine couche de platine. Dans ce cas, on mesure une hauteur d'environ 1nm pour les molécules. Cette valeur est cohérente avec les valeurs de hauteur de l'histogramme.

Dans le cas d'un prétraitement avec de la pentylamine (en phase plasma) [Kasumov 2002], l'ADN a une hauteur de 2.4nm. De plus, ce traitement rend la surface de mica relativement hydrophobe ($\theta_{H_2O} \sim 90^\circ$).

Il est étonnant que l'on mesure sur nos surfaces terminées amine une hauteur de 0.5nm pour une molécule d'ADN alors que la composition chimique de nos surfaces terminées amine ressemble à celles de Kasumov.

On notera enfin, que c'est sur nos surfaces hydrophobes que l'on mesure la hauteur la plus importante pour une molécule d'ADN (sauf pour SiH et le pentacène). Le caractère hydrophobe de la surface joue certainement un rôle pour obtenir un dépôt d'ADN avec la bonne hauteur (~ 2 nm). Dans notre cas, on peut attribuer la faible hauteur mesurée sur nos surfaces hydrophobes au sur étirement excessif de la molécule qui doit s'accompagner d'une diminution du diamètre de la molécule.

Il serait intéressant de vérifier quelle hauteur aurait l'ADN sur une surface avec une monocouche mixte de deux silanes terminés amine et méthyle...

Dans le cas des surfaces SiH et pentacène qui sont relativement hydrophobes il est étonnant de trouver des hauteurs aussi faibles (0.3nm et 0.5nm respectivement). Dans ce cas, l'ADN interagit certainement de manière spécifique avec ces surfaces, par comparaison aux surfaces terminées méthyle ou polystyrène. Dans le cas de la surface SiH on peut également expliquer le déficit en hauteur par le fait qu'on a une réoxydation partielle qui diminue le caractère hydrophobe de la surface.

IV. Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre nos résultats sur le traitement de nos surfaces et le dépôt d'ADN.

Pour la préparation des surfaces à contraste chimique, nous avons obtenu les meilleurs résultats avec une matrice méthyle et une silanisation amine dans les ouvertures. C'est certainement par l'utilisation d'une couche d'accroche en polystyrène qui protège la surface de la pollution apportée par la résine optique qui explique ce bon résultat. Nous avons préparé ces surfaces en vue de greffer chimiquement et sélectivement l'ADN sur certaines zones.

La technique de dépôt d'ADN avec une goutte que l'on laisse incuber sur la surface quelques minutes puis qu'on enlève est très simple à mettre en œuvre mais sur étire excessivement l'ADN. Il n'y a que sur la surface terminée amine que l'ADN a la longueur attendue de 16 μ m.

En revanche, lorsqu'on laisse sécher une goutte de solution contenant de l'ADN, on obtient des cordes d'ADN de toutes les tailles allant de quelques molécules à plusieurs milliers de brins jusqu'à des paquets d'ADN visibles à l'oeil nu. Ces échantillons nous ont permis d'étudier la conductivité de corde d'ADN en fonction de la taille (nombre de molécules dans la corde) du système.

Nous avons déduit de l'histogramme de hauteur de l'ADN sur nos différentes surfaces une hauteur par molécule d'ADN inférieure à 1nm. Les surfaces hydrophobes donnent la hauteur la plus importante à l'exception des surfaces SiH et pentacène.

Chapitre III : Dépôt d'ADN

On peut espérer en utilisant des surfaces hydrophobes chargées positivement obtenir des molécules d'ADN qui ne soit pas sur étirées. Dans ce cas, on peut s'attendre à trouver une hauteur plus importante que sur nos surfaces hydrophobes, où les molécules d'ADN sont complètement surétirées.

Chapitre IV

Mesures électriques

I. Introduction

Nous présentons dans ce chapitre nos mesures électriques sur des molécules d'ADN. Une bonne partie des mesures n'ont rien donné (pas de courant). C'est particulièrement vrai pour l'ADN déposé sur des électrodes. Dans ce cas, nous n'avons jamais mesuré de courant.

En revanche l'utilisation du Conducting – AFM a donné des résultats. L'intérêt est de pouvoir facilement étudier la conduction en fonction de la distance à l'électrode. Nos résultats sont peu dépendants de la surface sur laquelle repose l'ADN.

Les mesures effectuées sur des échantillons où l'électrode en métal (or ou platine) est évaporée sur l'ADN n'ont pas donné de signal en Conducting – AFM. L'ADN est certainement endommagé au cours de l'évaporation. Cela nous a poussé à utiliser un conducteur organique qui permet de contacter électriquement l'ADN dans des conditions plus douces. Mais là encore, les résultats se sont avérés décevants. Nous n'avons réussi qu'un petit nombre de mesures sur l'ensemble de la thèse avec des niveaux de courant d'environ 1nA (10^{-9} A) pour 1V sur des distances d'au moins 100nm. Toutes les autres mesures se sont soldées par l'absence totale de courant.

Afin d'améliorer le contact électrique, nous avons utilisé une interface qui consiste en un amas d'ADN sur lequel on dépose le métal de l'électrode. La mesure électrique en AFM conducteur se fait sur des cordes qui dépassent de cet amas. Dans ce cas, nous avons quasiment à chaque fois mesuré du courant à un niveau de l'ordre du pA (10^{-12} A). Le défaut d'un tel système est sa complexité. Néanmoins nous avons pu mesurer des caractéristiques courant – tension, et d'étudier le courant qui passe dans la structure en fonction de la distance et surtout du nombre de brins d'ADN dans la corde (jusqu'à 10000 molécules).

Les mesures en EFM permettent de travailler dans des conditions mieux contrôlées puisqu'on n'a pas le problème du contact avec les électrodes. Nous comparons nos résultats avec des simulations afin d'estimer les propriétés diélectriques de l'ADN.

Nos mesures les plus récentes ont été effectuées sur des fibres d'ADN de quelques dizaines de microns de long. Les niveaux de courant sont assez importants (de l'ordre du nA 10^{-9} A). Dans de telles structures la conduction est très sensible aux conditions d'humidité ambiante.

II. Mesures sur des électrodes

Nous avons préparé deux séries d'électrodes selon la technologie décrite au chapitre II. La première série en or présente des espaces inter électrode de 100, 300 et 500nm sur 15 μ m de long.

Ces électrodes n'ont pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants. Nous avons constaté une augmentation du courant avec le temps indépendamment de la présence d'ADN déposé sur les électrodes. Les électrodes finissent par être court - circuitées. L'observation au microscope électronique montre la formation de doigts d'or qui finissent par ponter les électrodes (cf. figure IV.01). De plus, lorsque le contact se fait entre les électrodes le courant augmente brutalement et peut s'accompagner de la destruction locale de l'électrode (cf. figure IV.01).

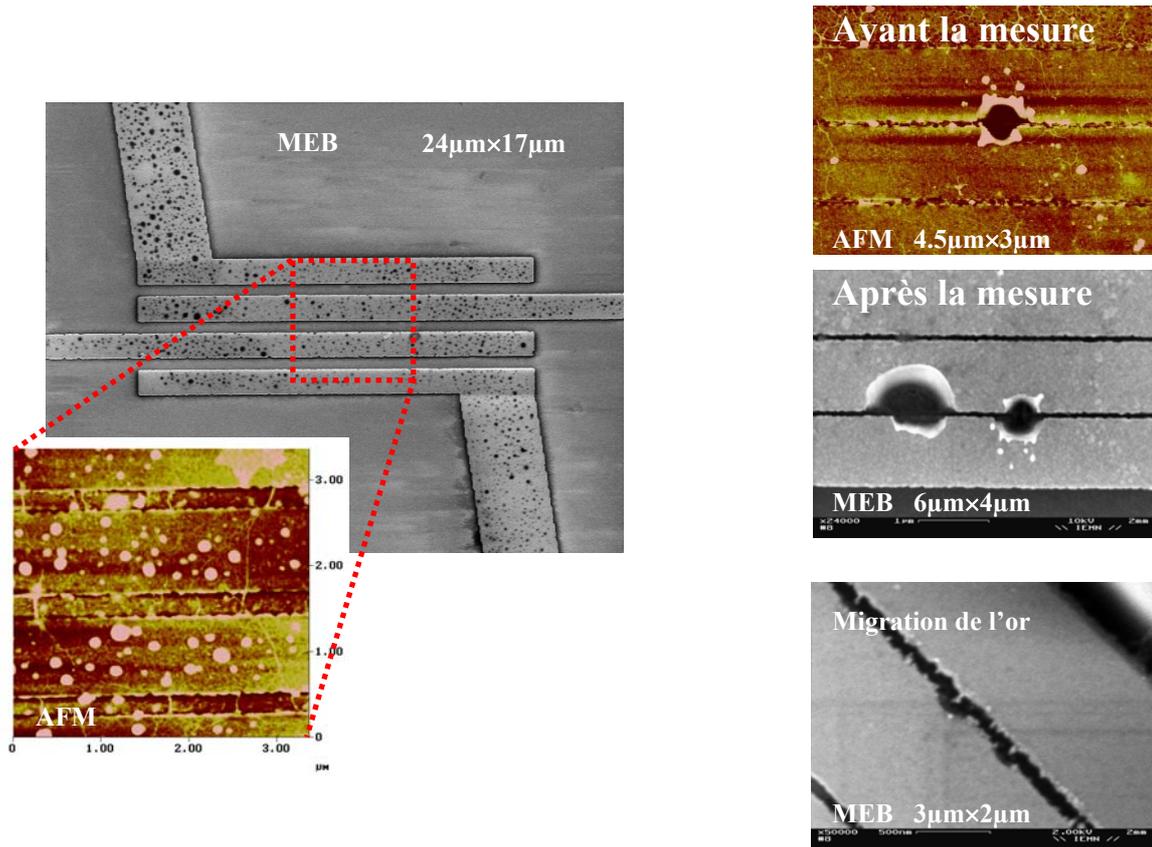


Figure IV.01 : Première série d'électrodes en or. Les mesures n'étaient pas reproductibles. Les images à droite montre la conséquence d'un court circuit sur l'électrode. Des doigts d'or finissent par ponter les électrodes. Le contact électrique s'accompagne en général d'un endommagement de l'électrode (2 figures du haut avant et après une mesure électrique). On voit sur le zoom de l'électrode à gauche de l'ADN qui relie les électrodes.

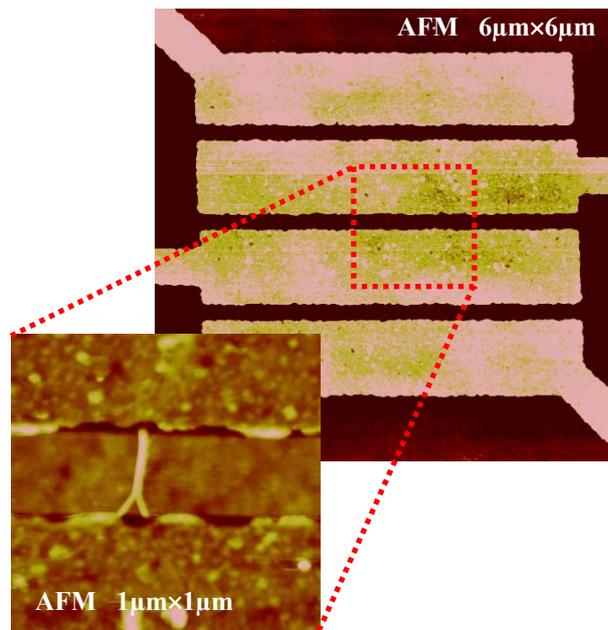


Figure IV.02 : Deuxième série d'électrodes en platine. Nous n'avons mesuré aucun courant sur ces électrodes. On voit dans le zoom de l'ADN qui ponte les électrodes.

La deuxième série d'électrodes en platine a donné des résultats reproductibles. L'espace inter électrode est de 100, 200 et 300nm sur 5 μ m de long (cf. figure IV.02). Le courant à vide est de l'ordre du bruit des appareils 10⁻¹⁵A (Helwett-Packerd 4140B).

Différents traitements de surface ont été essayés entre les électrodes : OTS, APTMS, et alkyle silane fluoré.

L'ADN est déposé avec la technique de la goutte présentée au chapitre III. Dans le cas des surfaces hydrophobes (terminée méthyle et fluorée) on laisse incuber la solution (10mM Tris / 1mM EDTA) contenant 10pM d'ADN quelques minutes puis on l'enlève du substrat. Dans le cas de la surface terminée amine, on fait couler la solution perpendiculairement aux électrodes. On a environ 10 à 100 molécules d'ADN qui connectent les électrodes. Dans tous les cas, nous n'avons pas mesuré de courant.

Finalement, les mesures sur des électrodes n'ont pas donné de résultats encourageants. Nos mesures sont en accord avec celle de Storm [Storm 2001] qui trouve un ADN isolant lorsqu'il est déposé entre deux électrodes séparées de plus de 40nm.

III. AFM – Conducteur

III.1. Introduction

L'intérêt de l'AFM conducteur est de pouvoir se rapprocher plus près de l'électrode, et de descendre facilement en dessous de 100nm. De plus, on peut observer la variation du courant en fonction de la distance. Le principe de l'AFM conducteur est décrit dans le chapitre 2 : techniques expérimentales.

Un désavantage de ce système est la dissymétrie entre les deux contacts électriques. D'un côté, on a une électrode classique déposée sur l'ADN, et de l'autre la pointe métallisée de l'AFM. Elle est posée sur l'ADN avec une certaine force d'appui de l'ordre de 10nN.

La tension varie très doucement pendant nos mesures. On peut considérer qu'on est en régime statique. L'enregistrement d'une courbe d'intensité du courant en fonction de la tension appliquée se fait dans un temps de l'ordre de la minute.

Afin de vérifier le niveau de reproductibilité de nos mesures, nous avons essayé autant que possible de les faire plusieurs fois de suite, ainsi qu'en fonction du temps pour repérer une éventuelle extinction de courant. Ce n'est pas toujours possible de réaliser ces contrôles car la dérive du piezo fait bouger la pointe. Par conséquent on n'est pas rigoureusement dans des conditions identiques tout au long de la ou des mesures. De plus, il arrive que le brin soit endommagé au cours de la mesure. Dans ce cas, on ne peut pas effectuer de seconde mesure pour vérifier la reproductibilité des caractéristiques courant – tension.

Les mesures sont faites à partir de différents points de polarisation et dans des sens différents : tension basse vers tension haute, ou l'inverse. On essaye tant que c'est possible de commencer les mesures à différentes tensions et dans des sens de balayage différents. On a fait principalement des mesures de : [-V₀ à V₀ puis V₀ à -V₀], [V₀ à -V₀ puis -V₀ à V₀], [0 à V₀ puis V₀ à 0], et [0 à -V₀ puis -V₀ à 0]. Le résultat peut dépendre fortement du sens de balayage de la tension appliquée. Néanmoins, même si l'allure des courbes I(V) dépend de l'historique des mesures subies par l'échantillon, le niveau de courant mesuré est reproductible.

III.2. Problème de la métallisation

Nous avons utilisé deux types de dépôt d'ADN décrit dans le chapitre 3. Le premier type de dépôt donne des brins d'ADN isolés ou des cordes d'ADN constituées d'un très petit nombre de molécules. La seconde méthode où on laisse sécher la solution d'ADN sur le substrat donne des cordes de tailles très variables : de quelques unités à plusieurs dizaine de milliers de brins. Ces cordes forment une structure arborescente.

Les premiers échantillons n'ont jamais donné de courant ($I < 10^{-15} \text{A}$). On peut certainement mettre en cause la technique de dépôt qui surétire systématiquement l'ADN. Tous nos résultats ont été obtenus sur les échantillons du deuxième type sur lequel on a des cordes de taille variable.

On discute dans cette section du contact entre l'ADN et l'électrode. On montre que la métallisation endommage la molécule. De plus nos tentatives de déposer l'ADN sur l'électrode ne donne pas plus de résultats. Dans ce cas, le contact électrique est certainement médiocre. Enfin, l'évaporation d'un polymère organique (le pentacène dans notre cas) permet d'avoir un contact intime entre l'électrode et l'ADN dans des conditions d'évaporation douce. En effet le polymère est déposé sous vide. Il est chauffé à une température d'environ 300°C.

III.2.1. Configuration de la jonction électrode/ADN

Toutes nos mesures avec une électrode en métal déposée directement sur l'ADN n'ont pas donné de résultats. Le métal est évaporé sous vide. L'échantillon est maintenu à température ambiante. On utilise un masque mécanique pour ne métalliser qu'une portion de l'échantillon. On fait la mesure sur les cordes d'ADN qui sont reliées au métal comme le montre la figure IV.03 et IV.04. En revanche, si le métal est déposé sur le paquet d'ADN, on arrive à faire des mesures de courant. Le métal est véritablement en cause dans l'absence de courant vu les brins qui donne un signal électrique. En effet, toute corde d'ADN recouverte de métal ne donne pas de courant même si elle est reliée au paquet d'ADN. La conclusion qui s'impose est que le dépôt de métal endommage l'ADN.

III.2.2. ADN posé sur l'électrode

Etant donné que le dépôt de métal détruit les brins ou cordes d'ADN, on a essayé le dépôt de l'ADN par-dessus l'électrode. Là encore, nos tentatives se sont soldées par des échecs. Il n'est pas facile de déposer l'ADN correctement étiré sur la surface et sur le métal. En revanche il est plus facile d'y arriver avec le pentacène (qui est plutôt hydrophobe) comme le montre la figure IV.05. De plus lorsqu'on fait sécher l'ADN sur l'or ou pentacène le paquet d'ADN se dépose sur l'or. De ce fait les cordes d'ADN qui s'échappent de ce polymère d'ADN sont assez éloignées de l'électrode. Dans le cas du pentacène, la goutte d'ADN va sécher sur la surface en évitant le pentacène. Dans ce cas on ne peut pas faire de mesures. Puisque le paquet est en contact direct avec le polymère conducteur, il n'y a pas de cordes isolées sur lesquelles on pourrait faire des mesures.

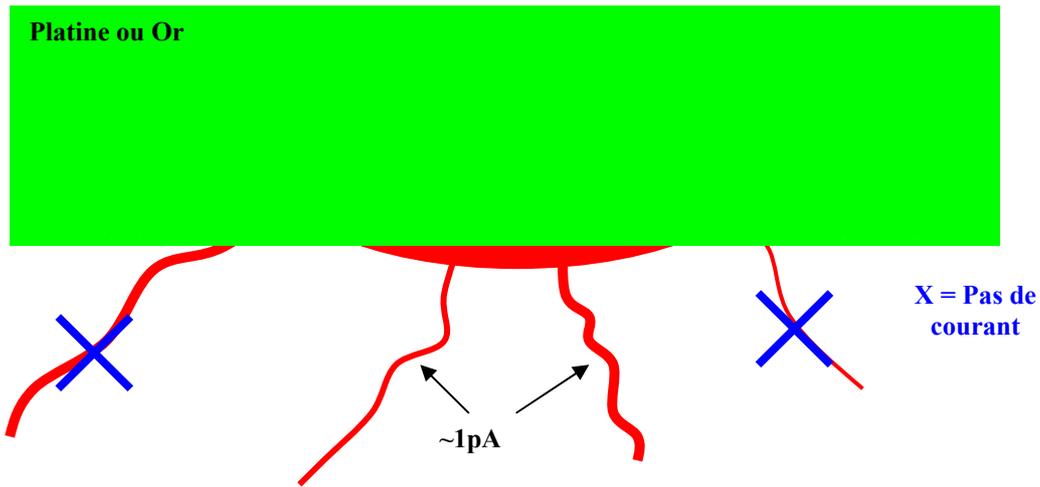


Figure IV.03 : Zone où l'ADN est conducteur. Les brins ou les cordes d'ADN directement en contact avec le métal ne donne pas de signal même si elles sont reliées directement au paquet d'ADN. La croix signifie qu'on a rien mesuré en conducting AFM.

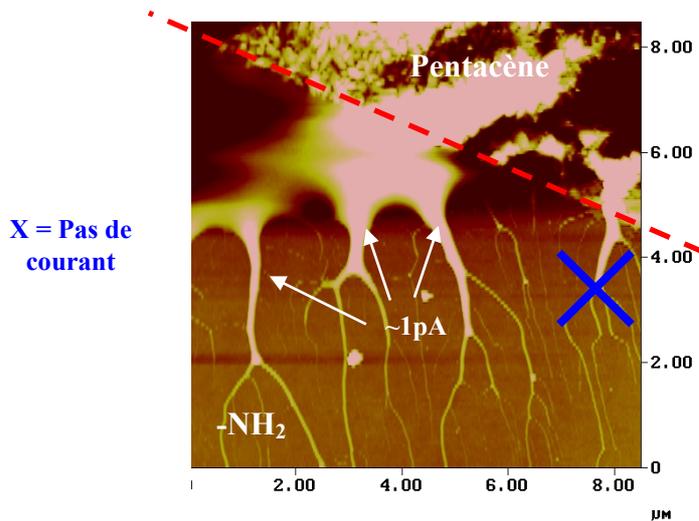


Figure IV.04 : Paquet d'ADN sur une surface terminée amine. Du pentacène est utilisé pour contacter l'ADN. Il est évaporé sur l'ADN. Les cordes qui s'échappent du paquet d'ADN et qui sont partiellement recouverte de pentacène ne donnent pas de courant (indiqué par la croix). En revanche on mesure un courant de l'ordre de 1pA sur les cordes qui s'échappent du paquet d'ADN.

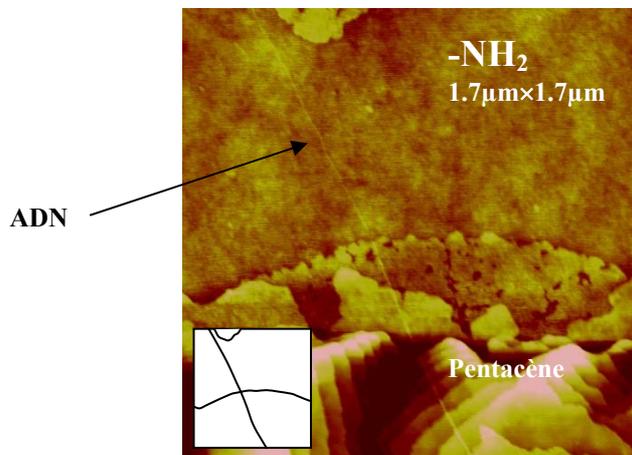


Figure IV.05 : ADN déposé sur l'électrode. En insert est indiqué la position du brin d'ADN. Toutes nos tentatives de mesurer du courant sur ce type d'échantillon ont échouée. L'image a été obtenue en AFM en mode tapping.

Le pentacène forme des marches de 1.5nm de haut. Comme l'ADN a une certaine rigidité (l'ADN peut être considéré comme rigide sur une distance d'environ 30nm dans les solutions que l'on utilise), il est peu probable que la molécule soit déformée par cette marche au point de bloquer la conduction électrique à ce niveau.

D'après ces expériences qui ne donne aucun courant, quelle est la conclusion qui s'impose ? L'ADN est-il un mauvais conducteur et/ou le contact est-il de mauvaise qualité. La section qui suit présente deux mesures particulières pour lesquelles on a eu du courant.

III.3. Mesure en imagerie de courant

III.3.1. Deux mesures directes avec du pentacène

Nous avons insisté précédemment sur le fait que les brins ou cordes d'ADN recouverts de métal ne donnent pas de courant. Nous présentons dans cette section deux mesures qui ont donné un courant de l'ordre du nA (10^{-9} A). Dans ces expériences on a déposé du pentacène directement sur les cordes d'ADN. La plupart des structures que l'on a étudiées se sont avérées isolantes à l'exception de quelques mesures. Cela signifie que l'utilisation d'un conducteur organique est moins agressive pour l'ADN que le dépôt de métal.

III.2.3.1. Sur SiO₂

L'ADN est déposé en laissant sécher une goutte d'ADN (10mM TE, 10pM ADN) sur une surface de SiO₂. L'échantillon de SiO₂ a été nettoyé à l'aide d'un mélange piranha : 2/3 acide sulfurique concentré/ 1/3 eau oxygénée (cf. chapitre II). Il est laissé quelques jours à l'air pour le rendre moins hydrophile. Dans ce cas, lorsqu'on laisse sécher une goutte de solution contenant de l'ADN, elle ne sèche pas sur place. Le ménisque se déplace au fur et à mesure que la goutte s'évapore. L'allure de l'échantillon est schématisée sur la figure III.20 au chapitre III. On évite ainsi de laisser trop de sel sur la surface.

On dépose du pentacène sur une partie de l'échantillon. Au premier passage de la pointe sur la zone de mesure indiquée sur la figure IV.06, nous avons observé un courant en parfaite corrélation avec l'image topographique. Afin d'améliorer la résolution de l'image l'acquisition a été reprise par le bas de l'image. Malheureusement le premier passage de la pointe a endommagé le brin. Il a même été coupé à l'endroit indiqué par la flèche 1 sur la figure IV.06. Cela explique l'absence de courant à l'extrémité du brin et peu de courant ensuite jusqu'à retrouver un niveau plus important sur la zone du brin qui n'avait pas été imagée. La tension appliquée a été modifiée lors du balayage comme indiqué par la figure IV.06.

En conclusion on a observé le passage du courant dans une corde d'ADN constituées d'environ 300 molécules (On a estimé le nombre de molécules à partir de l'image topographique en considérant une aire de 3nm^2 par molécule d'ADN dans la corde). Le niveau de courant atteint est de l'ordre de 1nA pour 1V sur une distance de l'ordre de $1\mu\text{m}$. On déduit une résistance de contact de l'ordre de $1\text{G}\Omega$, et une résistance de la corde d'ADN inférieure à $0.2\text{G}\Omega$ soit $\sigma > 0.03(\Omega\text{cm})^{-1}$. La résistance de contact est déduite du courant obtenu sur l'ADN très proche du pentacène. L'estimation de la résistance de la corde d'ADN

est indiquée sur la figure IV.06. On considère la plus grande pente qui englobe nos valeurs de courant en fonction de la distance. On en déduit connaissant la résistance de contact une valeur de résistance de la portion de corde entre la pointe de l'AFM et le pentacène.

Nous avons obtenu d'autres mesures similaires sur cet échantillon (cf. figure IV.07). Cependant nous n'avons pas retrouvé de zone donnant des résultats aussi nets. De plus toutes les autres cordes (non représentées) qui ont données un signal électrique sont très proches du pentacène (<200nm). On peut alors suspecter le polymère organique d'avoir migré le long de la corde d'ADN pendant le dépôt créant un chemin pour la conduction.

III.2.3.2. Sur une surface terminée amine

Nous avons obtenu sur une surface terminée amine une mesure de courant sur deux molécules d'ADN.

L'échantillon a été préparé en laissant sécher une solution d'ADN de 10pM dans un tampon Tris(10mM)/EDTA(1mM). Du pentacène est évaporé sur l'ADN.

Nous avons observé du courant sur cet échantillon sur une zone où se trouvent deux brins d'ADN. Les cordes d'ADN plus importantes à proximité n'ont donné aucun courant (cf. figure IV.08). On peut constater sur la figure IV.08 en b) et c) que le courant sature (à 0.25nA) au niveau de l'ADN. L'amplificateur met un certain temps à revenir à zéro. Cela explique que la largeur du signal sur l'image en courant soit plus importante que la largeur de l'ADN en topographie. En revanche, il est étonnant d'observer une zone (indiquée sur la figure IV.08) sur l'ADN où il n'y a pas de courant. Il est possible que l'ADN soit endommagé par le passage du courant, ou bien il n'y a pas eu un bon contact de la pointe sur l'ADN à cet endroit. Il est peu probable que du pentacène se soit déposé autour de l'ADN car, on aurait observé des terrasses moléculaires typiques du pentacène autour de l'ADN.

Sur une surface terminée amine en AFM conducteur nous n'avons obtenu qu'une seule image avec du courant sur l'ADN. Un courant d'environ 0.25nA pour 5V (la tension positive est appliquée sur l'électrode en pentacène) sur une distance de 100nm a été observé sur cet échantillon. On peut estimer une résistance de la portion d'ADN entre le pentacène et la pointe de l'AFM de l'ordre de $20\text{G}\Omega$ soit $\sigma \sim 0.02(\Omega\text{cm})^{-1}$.

L'ADN en topographie a une hauteur de 0.5nm en désaccord avec les résultats de Kasumov [Kasumov 2002] où il trouve une hauteur de 2.4nm pour l'ADN conducteur.

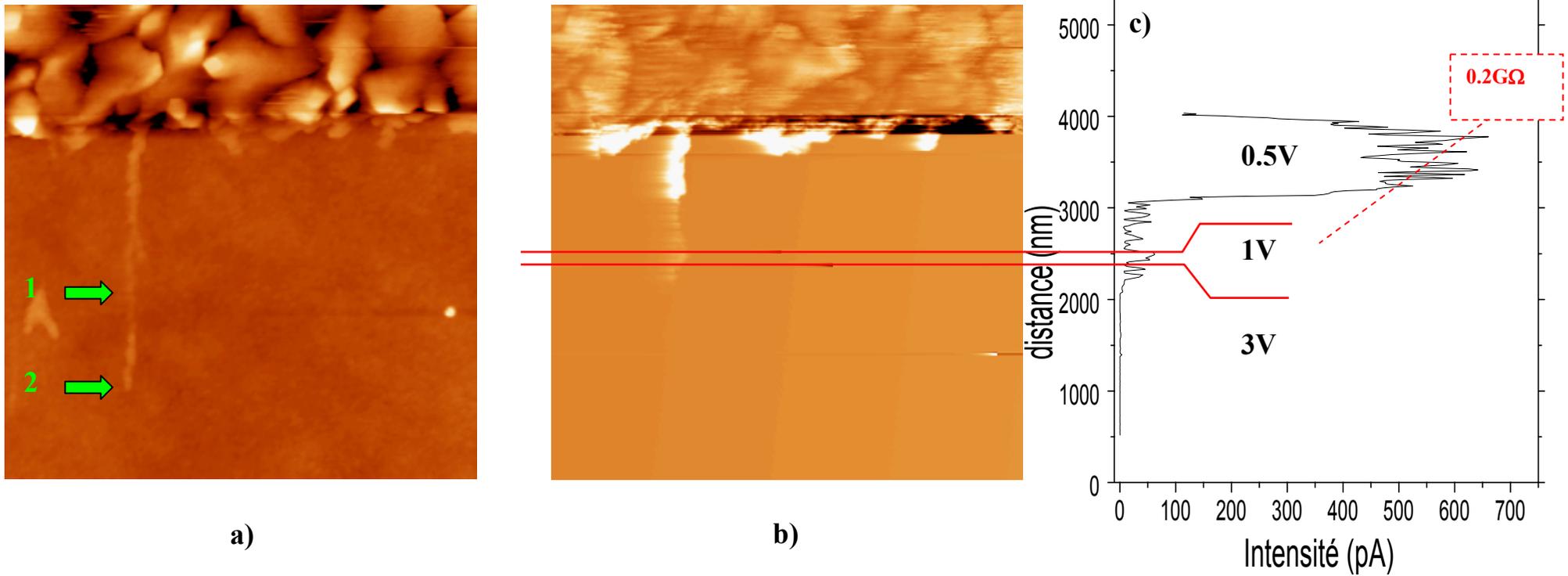


Figure IV.06 : Mesure de courant en AFM conducteur. En a) image en topographie. En b) image correspondante en courant. Un profil du courant déduit de l'image b) est tracé en c). Le balayage de l'image se fait de bas en haut. La vitesse de la pointe est de $1\mu\text{m/s}$. La tension appliquée est de 3V en début d'image puis 1V et 0.5V . Les limites sont indiquées sur la figure. L'échantillon est préparé en laissant sécher une goutte de solution d'ADN (10mM Tris / 1mM EDTA / 10pM ADN) sur une surface de SiO_2 . On évapore du pentacène sur l'ADN. On peut estimer une résistance de la corde d'ADN (300 brins d'ADN) à partir de la chute de courant en fonction de la distance. Sur la zone où le courant est de l'ordre de 0.5nA on indique la plus grande pente qui englobe nos valeurs expérimentales. La résistance correspondante est de $0.2\text{G}\Omega$. La pointe a imagé deux fois cet endroit. Les images représentées en a) et b) correspondent au deuxième passage. Le premier passage de la pointe a sectionné la corde au niveau de la flèche 1. La flèche 2 indique l'extrémité de la corde d'ADN où l'on a observé du courant lors de la toute première image (non sauvegardée).

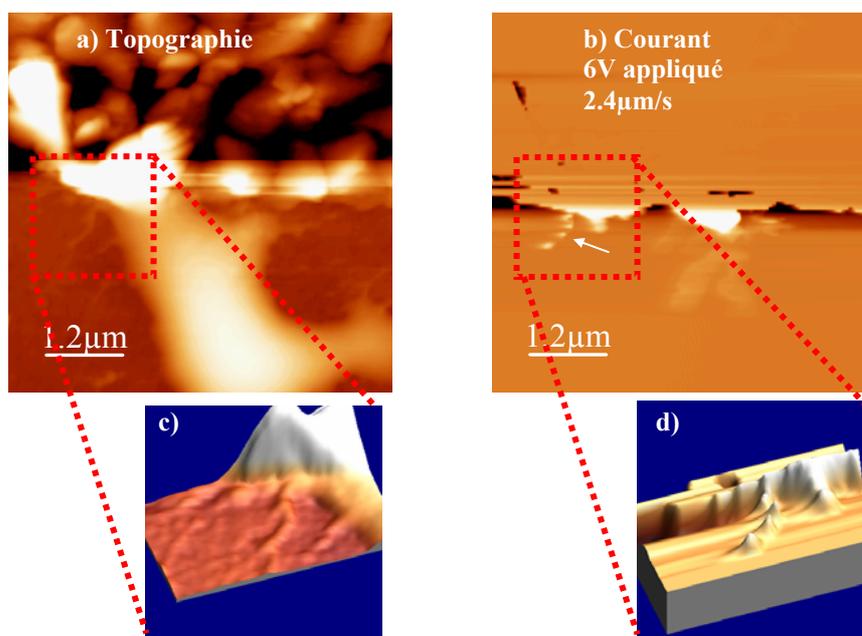


Figure IV.07 : Mesure de courant en AFM conducteur sur le même échantillon que sur la figure IV.07. En a) et c) topographie. En b) et d) images en courant correspondants aux images en topographie. L'échantillon est préparé en laissant sécher une goutte de solution d'ADN (10mM Tris / 1mM EDTA / 10pM ADN) sur une surface de SiO₂. On évapore du pentacène sur l'ADN. L'image est composée de 64 lignes. Chaque bosse de courant (cf. flèche) obtenue sur l'ADN en b) et d) correspond à une ligne de l'image. Le maximum du courant mesuré est de l'ordre de 200pA. Le courant varie peu en fonction de la distance.

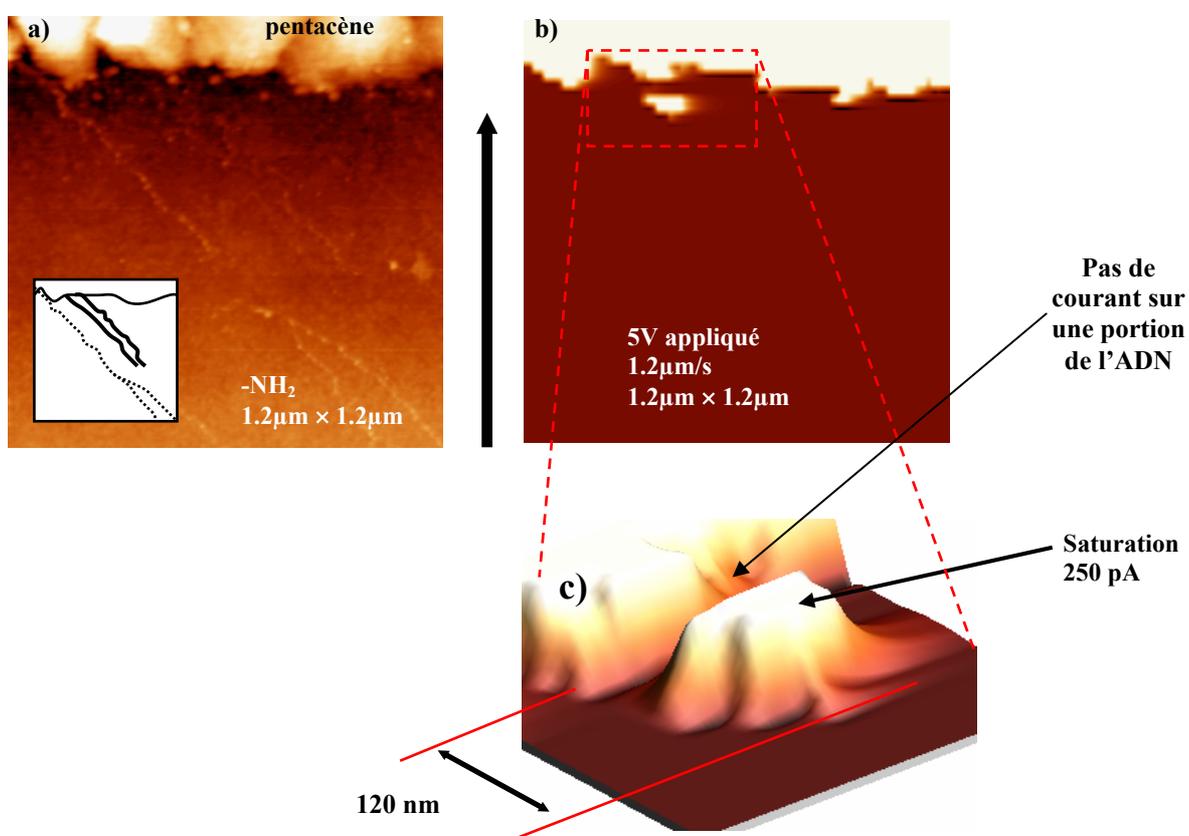


Figure IV.08 : Mesure de courant en AFM conducteur sur deux molécules d'ADN. Ces molécules sont indiquées par les traits pleins en insert de a). L'échantillon est préparé en laissant sécher une goutte de solution d'ADN (10mM Tris / 1mM EDTA / 10pM ADN) sur une surface terminée amine. On évapore du pentacène sur l'ADN. On peut constater qu'on observe un signal électrique que sur une portion des molécules d'ADN.

III.3.2. Conclusion

Cette section a présenté quelques mesures obtenues sur de l'ADN dans le cas où du pentacène est utilisé comme électrode. Les niveaux de courant obtenus sont de l'ordre d'une fraction de nA (10^{-9} A).

On peut estimer la résistance des cordes d'ADN dans ces expériences d'imagerie en courant à partir de la décroissance du courant en fonction de la distance. On trouve des résistances qui vont de $0.2\text{G}\Omega$ (pour 300 brins d'ADN) à $20\text{G}\Omega$ (pour 2 brins d'ADN). Cela correspond à une conductivité σ d'environ **$0.03 (\Omega\text{cm})^{-1}$** . Ces valeurs sont quatre ordres de grandeur en dessous de celles obtenues par Fink [Fink 1999] et cinq ordres de grandeur en dessous de celles de Kasumov [Kasumov 2001].

Le problème de ces expériences d'imagerie en courant est leur manque de reproductibilité. Sur les échantillons que l'on a préparé, nous n'avons pas pu effectuer de mesures courant – tension. En effet, on n'a aucun moyen de savoir en observant l'ADN à l'AFM (en mode tapping) quel brin d'ADN va donner un signal électrique. Partir à la recherche de molécules conductrices en les testant une à une peut être très long vu le peu de mesures que l'on a effectuée en imagerie de courant.

Il était donc impératif d'améliorer la reproductibilité des mesures. Pour cela nous avons utilisé le paquet d'ADN comme interface entre l'électrode évaporée et la corde d'ADN dont on veut mesurer les propriétés de conduction.

III.4. Caractéristique courant – tension

III.4.1. Introduction

Afin de pouvoir faire un nombre significatif de mesures électriques nous avons utilisé le paquet d'ADN comme intermédiaire entre l'électrode évaporée et la corde d'ADN sur laquelle on fait la mesure électrique (cf. figure IV.09). Dans ce cas, on mesure sur quasiment tous les échantillons du courant. Mais le prix à payer est une perte d'un facteur 1000 de l'intensité mesurée. On détecte du pA (10^{-12} A) au lieu du nA (10^{-9} A) des expériences présentées plus haut.

Ces mesures sont intéressantes du point de vue de la variation de l'intensité en fonction de la distance. On peut espérer remonter à une résistance linéique le long de l'ADN. L'électrode et le paquet d'ADN peuvent être vu comme une résistance de contact (cf. figure IV.09). Malgré tout un tel système est complexe, et ne facilite pas l'interprétation des résultats. Cependant, c'est la seule méthode que nous avons pour arriver à mesurer du courant avec un minimum de reproductibilité. Un autre inconvénient est l'asymétrie du système. On a la suite d'interface : **Electrode /paquet d'ADN / Corde d'ADN / pointe de l'AFM**. La présence du paquet d'ADN renforce l'asymétrie par rapport aux expériences décrites précédemment où on a un contact direct entre la corde d'ADN et l'électrode.

Le paquet d'ADN peut séparer la corde d'ADN sur laquelle on fait la mesure de l'électrode d'une distance de l'ordre de 1 à $50\mu\text{m}$. Par conséquent, il est fort probable que les brins ne soient pas reliés directement à l'électrode. On doit avoir un transport inter

moléculaire dans le paquet d'ADN. Or ce transport est peu efficace [Nakayama 2001]. C'est ce que nous avons constaté vu les niveaux de courant obtenus.

Etant donné qu'on ne mesure pas beaucoup de courant, nous n'avons pas observé de différence fondamentale entre une électrode évaporée de pentacène, d'or ou de platine (i.e. c'est la résistance du paquet d'ADN qui limite le courant).

Enfin, on vérifie systématiquement le courant à côté du brin d'ADN. La pointe est posée sur la surface. Le courant que l'on détecte est inférieur ou de l'ordre de 10^{-15} A. Il n'y a donc pas de courant de fuite sur la surface.

La tension est appliquée sur l'électrode. La pointe est toujours au potentiel nul (cf. figure IV.09). La force d'appui sur l'ADN pendant la mesure électrique est de l'ordre de 10 à 30 nN. En dessous de cette force, on a un mauvais contact et on ne mesure pas de courant, au dessus, on finit par endommager l'ADN.

Le nombre de molécules dans les cordes d'ADN est déduit des images topographiques. On divise l'aire de la corde d'ADN par l'aire d'une seule molécule. Avec un diamètre de 2 nm on a une aire par molécule d'environ 3 nm^2 .

III.4.2. Caractéristiques principales des mesures de courant

III.4.2.1. Asymétrie

Nous avons toujours mesuré plus de courant pour les tensions positives que négatives. Cette différence de comportement est la conséquence de l'asymétrie de notre système. On peut constater cette asymétrie sur toutes les courbes présentées dans la suite.

III.4.2.2. Dépendance vis-à-vis du sens de variation de la tension

On a une hystérésis dans les caractéristiques courant – tension. On a plus de courant lorsque la tension est décroissante que lorsqu'elle est croissante (cf. figure IV.11, IV.12 et IV.14).

On observe une tension de seuil lorsque la tension est croissante (cf. figures IV.10, IV.11 et IV.14). La tension de seuil dépend de la taille du système. Plus la corde d'ADN est importante, plus cette tension est faible. Nous avons constaté que des mesures avec une tension croissante que l'on répète plusieurs fois donne des tensions de seuil variables. Il n'y a pas de variation privilégiée de la tension de seuil dans un sens ou dans l'autre. La figure IV.16 donne l'exemple obtenu sur une corde d'environ 10000 molécules déposées sur une surface terminée méthyle. On peut expliquer la tendance observée par un effet d'élargissement des niveaux d'énergie dans le paquet d'ADN qui réduit le gap (cf. figure IV.13). Cependant la variation de la tension de seuil qu'on observe est trop importante en comparaison des prédictions théoriques où elle est plutôt de l'ordre d'une fraction de volt. [Cornil 2001].

Avec un balayage croissant, au-delà de la tension de seuil le courant augmente très rapidement et atteint le niveau correspondant au balayage décroissant (cf. figure IV.14).

Nous avons également constaté que le contact entre la pointe et la corde d'ADN est amélioré aux tensions les plus élevées. On peut constater sur la figure IV.10 (surface amine) qu'on obtient plus de courant avec une tension décroissante à condition d'avoir au préalable soumis l'échantillon à une forte polarisation (entre 5 et 10V) avant de faire la mesure en négatif. Malheureusement ce traitement endommage l'ADN sur la surface amine. Il est difficile de savoir à quel instant l'ADN est endommagé. Cela correspond certainement au moment où on ne mesure plus de courant (cf. figure IV.10 mesure numéro 3). On peut constater sur la figure IV.10 qu'il reste une couronne sur la surface. On n'a pas du tout ce genre de comportement sur la surface polystyrène. L'ADN est véritablement collé à la pointe à tel point qu'on ne peut la retirer qu'en arrêtant d'imager pour dégager complètement la pointe. Lorsqu'on image à nouveau la zone, on constate que la corde d'ADN a bougé. Elle résiste plus ou moins bien à ce traitement.

III.4.2.3. Reproductibilité des mesures

Lorsqu'on fait la mesure deux fois au même endroit on a en général un peu plus de courant et l'allure des courbes varie (la tension de seuil varie,...). Cependant nous avons fait un certain nombre de caractéristiques courant –tension reproductibles (cf. figure IV.11, IV.14 et IV.16).

La reproductibilité du courant obtenu sur le paquet d'ADN (cf. figure IV.11) est assez étonnante puisqu'on retrouve les mêmes caractéristiques pour des mesures à des endroits différents du paquet d'ADN, mais avec un niveau de courant variable.

De plus, on retrouve sur un grand nombre de nos mesures des bosses ou des pics autour de -2 à -4V pour les mesures avec une tension décroissante (cf. figure IV.10, IV.11, IV.12 et IV. 14). Cette caractéristique se retrouve moins souvent et de manière moins marquée pour les tensions positives (cf. figure IV.14).

III.4.2.4. Mesure en fonction du temps

La mesure d'un courant en fonction du temps sur nos structures n'est pas aisée puisque la dérive du piezo ne permet pas de rester sur la corde d'ADN très longtemps. On représente sur la figure IV.15 deux mesures effectuées sur une corde d'ADN déposée sur une surface terminée amine. Le courant est stable pour la première mesure. En revanche pour la deuxième, on a une augmentation du courant puis une diminution lente. Cette diminution peut être attribuée à la pointe qui quitte la corde d'ADN, ou bien à une saturation des charges au niveau des électrodes. A titre de comparaison, la décroissance du courant est beaucoup plus rapide sur des fibres d'ADN non conductrices.

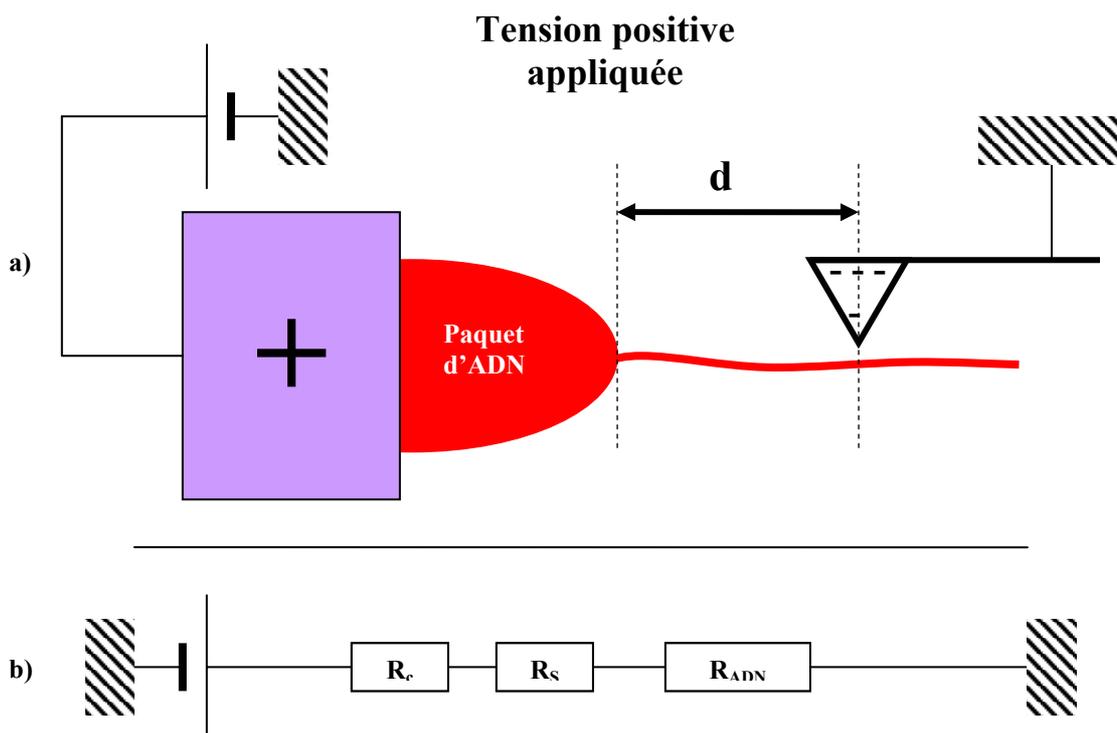


Figure IV.09 : En a) représentation du dispositif expérimental pour une tension positive appliquée. La pointe est au potentiel nul (masse virtuelle). Elle est chargée négativement. En b) modélisation par une résistance de contact et une résistance série du paquet d'ADN. La distance d correspond à la longueur de la corde d'ADN.

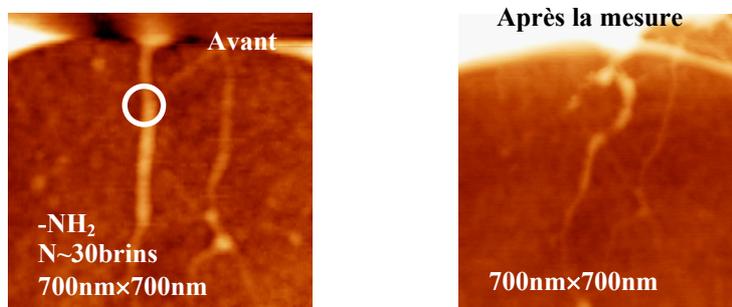
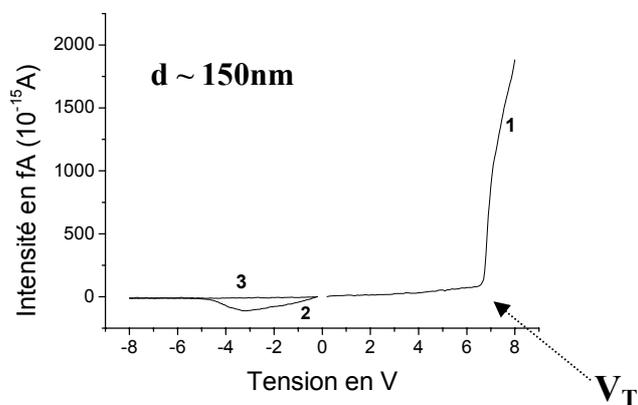


Figure IV.10 : Mesure électrique dépendante de l'histoire de l'échantillon. On a effectuée trois mesures sur cet échantillon. L'ordre des mesures est numéroté sur le graphe. Il faut appliquer une forte polarisation positive pour voir apparaître du courant en négatif. Cependant ce traitement s'est accompagné de la destruction de la corde d'ADN.

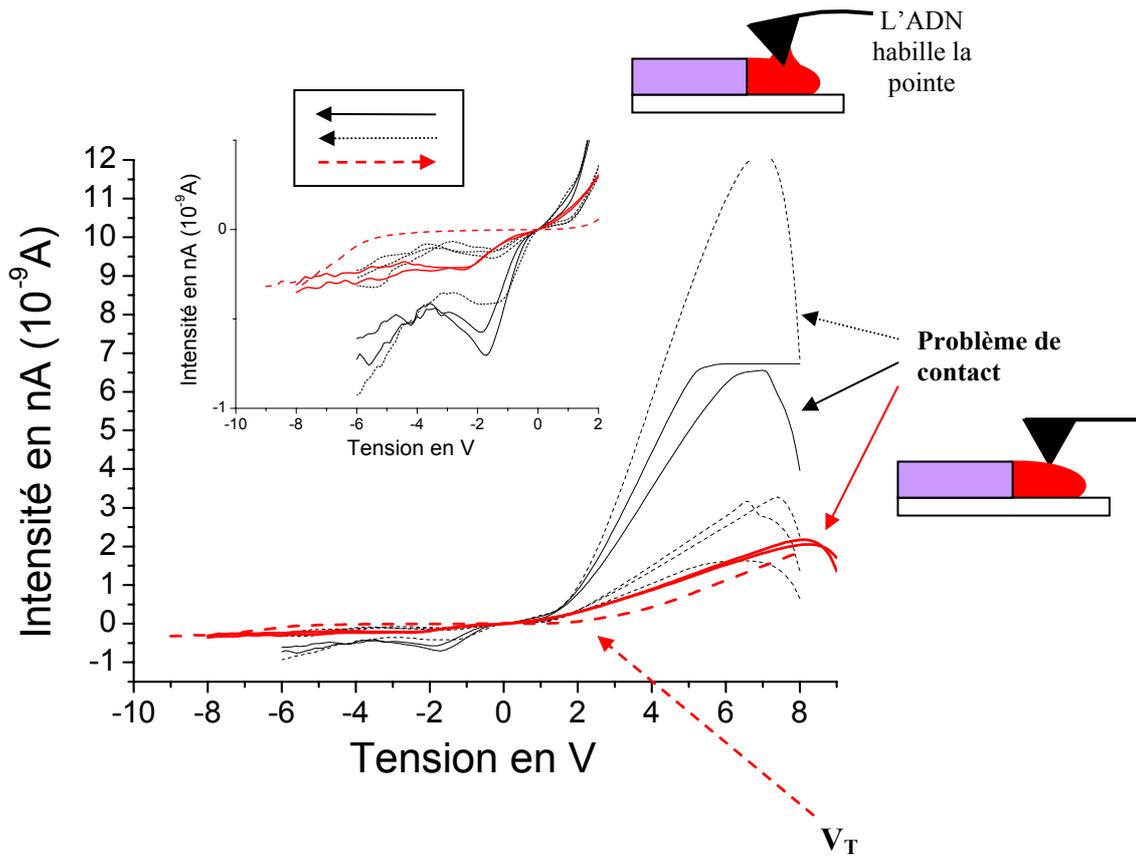


Figure IV.11 : Mesure sur le paquet d'ADN. Toutes ces mesures sont faites avec une tension décroissante sauf la mesure indiquée en gros pointillée. C'est la mesure qui donne le moins de courant. Les mesures faites à la suite ont le même type de trait (trait plein, pointillé,...). Le niveau de courant change mais l'allure des courbes reste identique. Un agrandissement de la courbe aux tensions négatives est donné en insert. Le faible niveau de courant au début de la mesure est dû à un problème de contact (cf. paragraphe III.4.3.). On retrouve un pic autour de -2V.

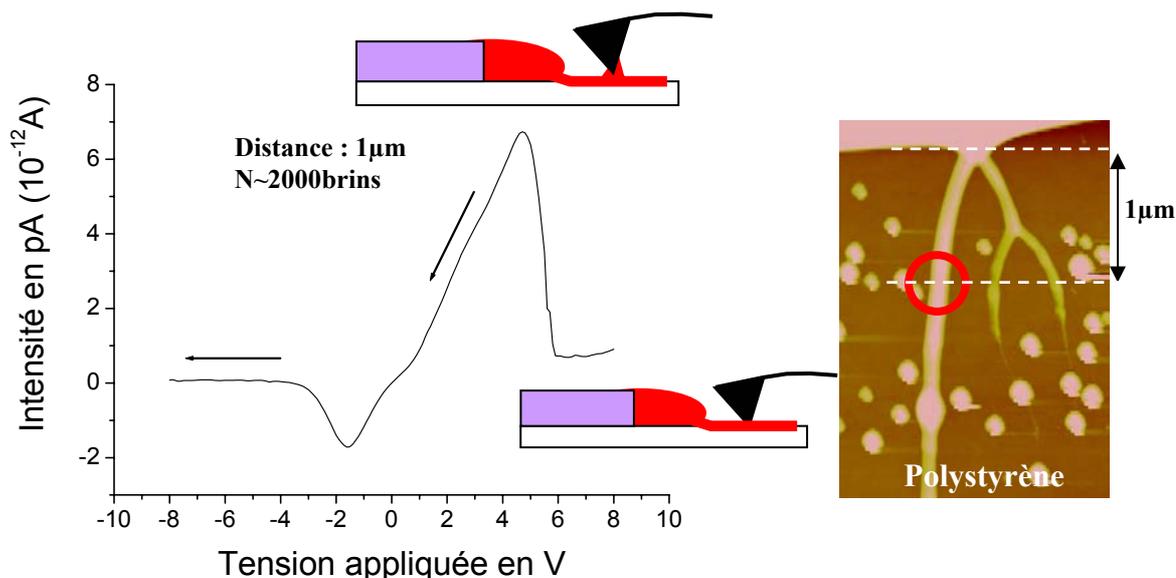


Figure IV.12 : Mesure typique avec une tension décroissante. On interprète, l'absence de courant au début de la mesure par un problème de contact. Le pic au tension négative apparaît dans beaucoup de nos mesures principalement entre -2 et -4V. La zone de mesure est indiquée à droite. La surface utilisée est du polystyrène. La distance de mesure est d'environ 1µm, et le nombre de brins qui composent la corde environ 2000.

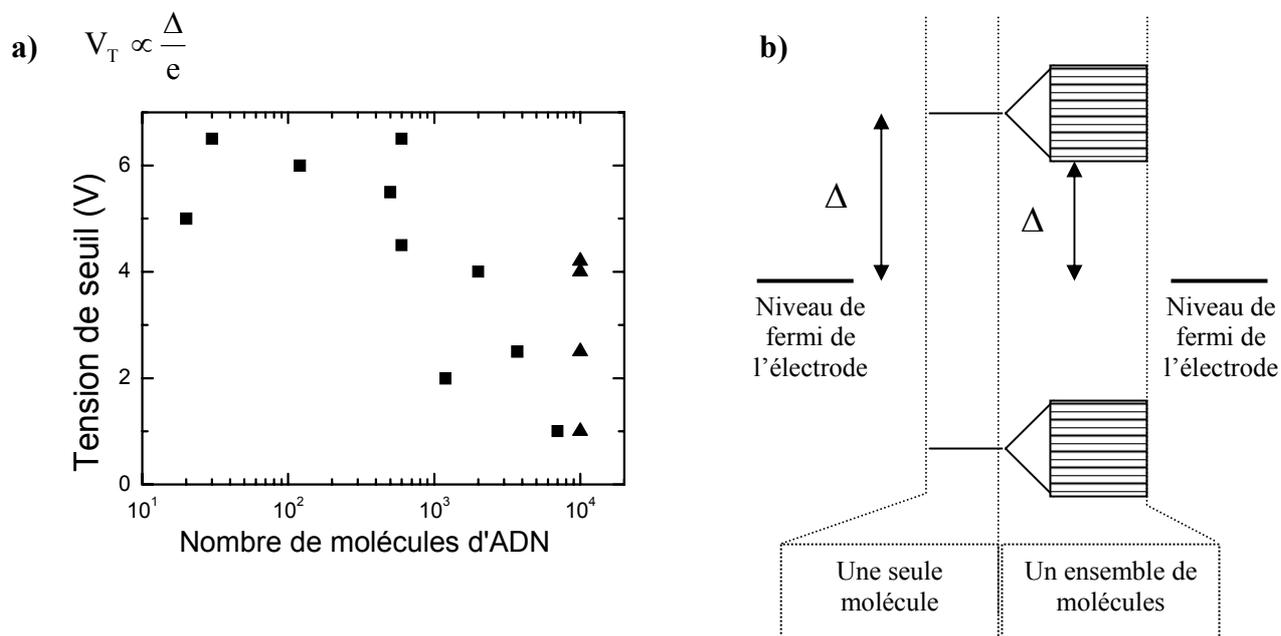


Figure IV.13 : Tension de seuil en fonction du nombre de molécules dans la corde d'ADN (en (a)). Ces valeurs sont déduites des caractéristiques courant – tension obtenues avec un balayage de tension croissant. On propose une explication de cette dépendance par un élargissement des niveaux lorsque il y a un grand nombre de molécules couplées entre elles (en (b)). La conséquence est un abaissement de la valeur du gap (2Δ). La valeur de la tension de seuil dépend d'après ce modèle de la valeur de Δ . En effet, le courant passe à travers la structure lorsque le niveau de fermi de l'électrode est en résonance avec les niveaux de la molécule et permet le passage du courant. Ce n'est pas la seule explication possible. Les triangles sur la figure correspondent à la mesure à un même endroit d'une corde d'ADN composée de 10000 molécules. Ces points correspondent aux courbes de la figure IV.16. On peut constater que la dispersion est assez importante.

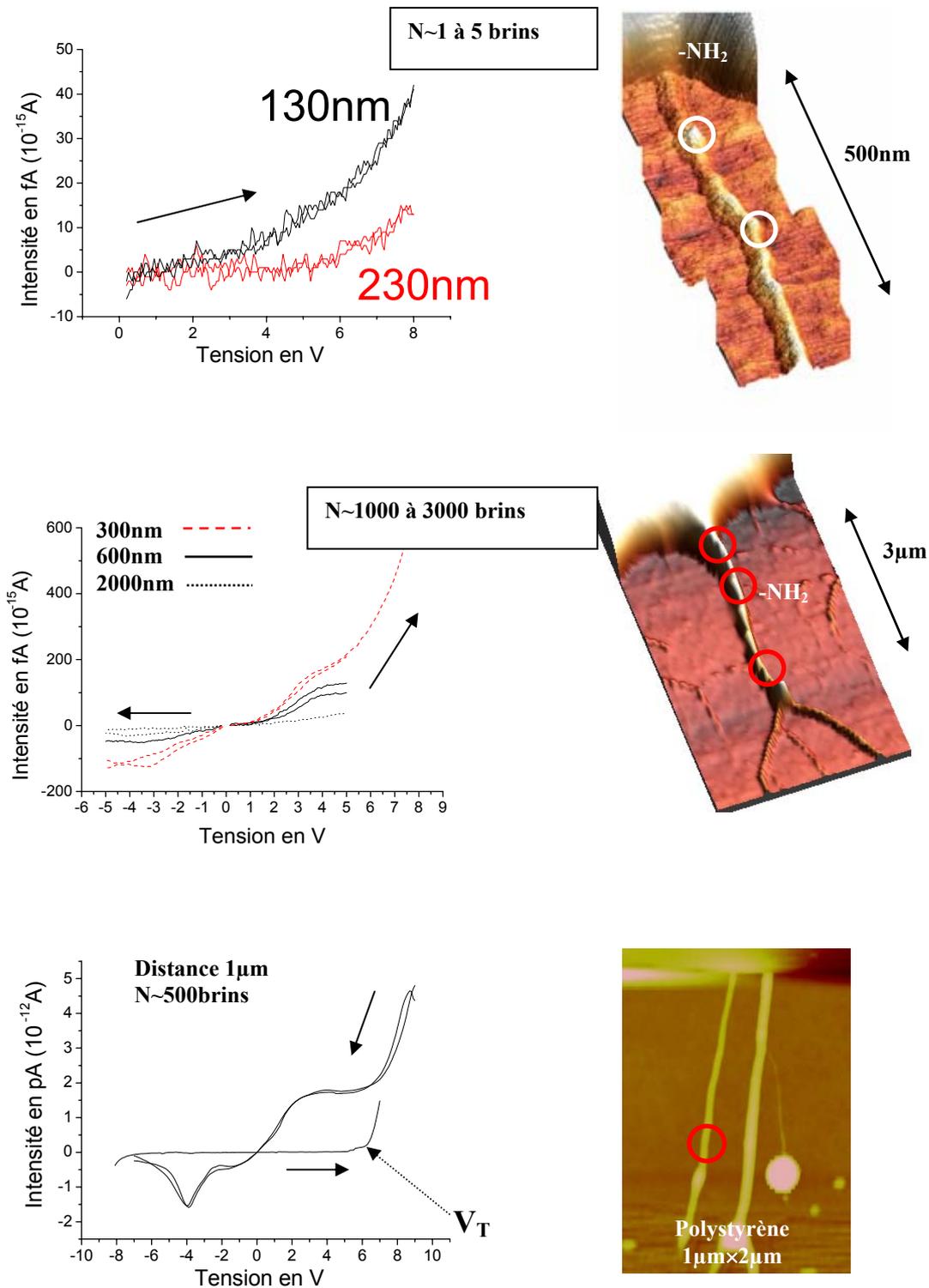


Figure IV.14 : Mesures reproductibles obtenues sur différents échantillons et pour des cordes d'ADN de taille différentes. Le lieu de la mesure est représenté à droite de chaque mesure. Les flèches indiquent dans quel sens ont été faites les mesures.

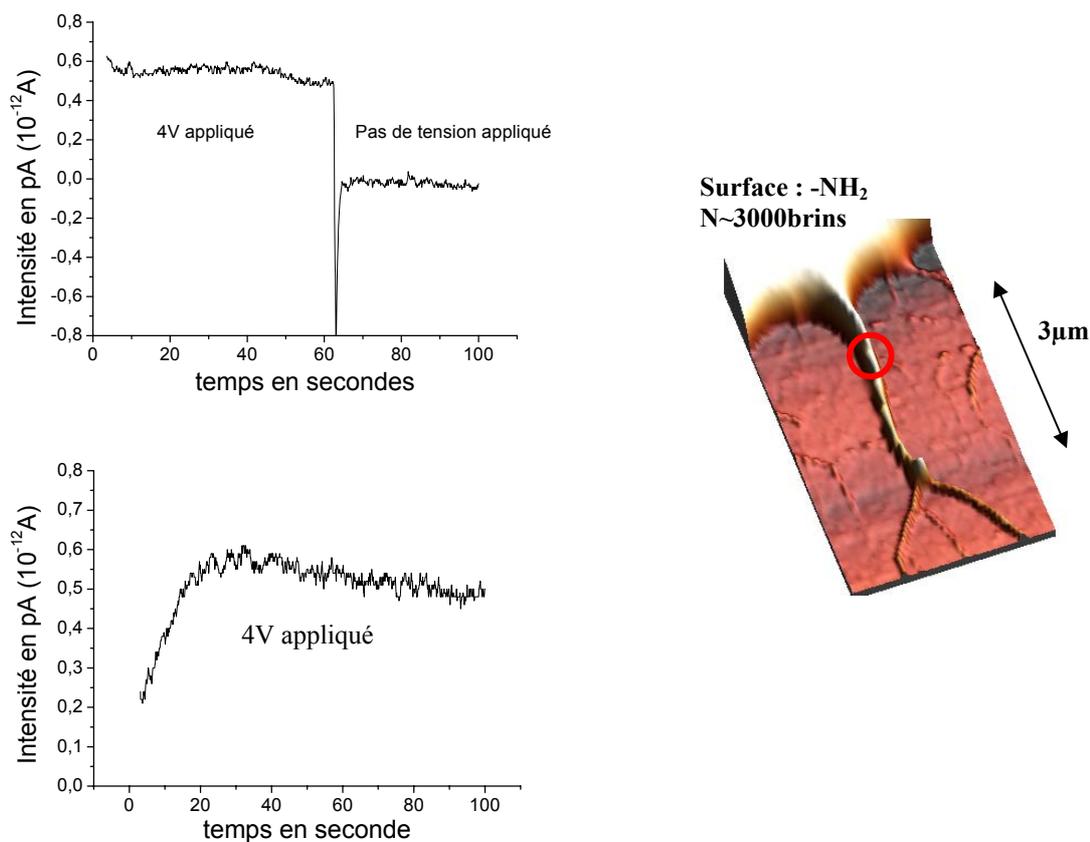


Figure IV.15 : Mesure de courant en fonction du temps pour une tension appliquée de 4V. La zone de mesure est indiquée sur l'image de droite (la distance entre le point de mesure et le paquet d'ADN est d'environ 1µm). La diminution du courant est plus sensible sur la deuxième mesure. On est limité dans le temps de mesure par la dérive du piezo.

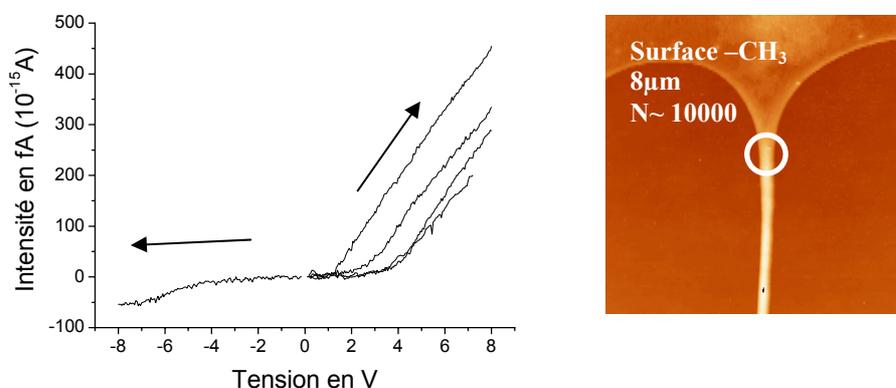


Figure IV.16 : Mesure obtenue sur une corde d'ADN déposée sur une surface méthyle. La tension de seuil varie à chaque mesure entre 1 et 4V. Les flèches indiquent le sens de variation de la tension pendant la mesure. On part toujours de la tension nulle dans ces mesures.

III.4.3. Interprétation des résultats

On peut interpréter par des effets électrostatiques le fait qu'on ait plus de courant pour une tension positive que négative. En effet, le temps d'acquisition de nos caractéristiques courant – tension est d'environ 1 minute. De plus des mesures répétées sur la même zone sont relativement reproductibles. Cela signifie que les charges ne s'accumulent pas au niveau des électrodes mais sont injectées ou captées par le métal. En effet, le nombre de charges que l'on peut espérer trouver sur la pointe est au plus de 1000 à 10000. Nos simulations du potentiel électrostatique entre la pointe de l'AFM et la surface, présentées au chapitre II prédisent une centaine de charge sur la pointe. Or un courant de l'ordre du pA (10^{-12} A) pendant environ une minute correspond à 10^9 charges. Une partie de ces charges sont transférées entre la corde d'ADN et la pointe de l'AFM. On a le même phénomène sur l'autre électrode. Cependant, l'injection d'électrons doit être facilitée par la géométrie de la pointe par rapport à celle de l'électrode (effet de pointe). Cela peut expliquer en partie pourquoi on a plus de courant pour les tensions positives. Néanmoins le mécanisme du transfert de charge n'est pas clair. On peut avoir une réaction de type électrochimique entre la pointe et l'ADN ou bien un transfert directement vers l'ADN. Nos résultats ne permettent pas de trancher.

Le fait qu'on ait plus de courant dans le sens de balayage négatif que dans le sens positif peut s'expliquer par un problème de contact entre la corde d'ADN et la pointe AFM. Dans le cas de mesure sur le paquet d'ADN quand on commence par appliquer une tension positive sur l'électrode on constate que la pointe est attirée par le paquet d'ADN en suivant le signal renvoyé par la photodiode. La capture de la pointe par le paquet d'ADN correspond à l'augmentation de courant (cf. figure IV.11). La boucle de rétroaction bloque le piezo Z à sa valeur minimum pour tenter de dégager la pointe qui est collée au magma d'ADN. Dès qu'on cesse la mesure, le piezo revient à la valeur de consigne. Par contre il est étonnant qu'on n'ait pas un effet semblable lorsqu'on commence par appliquer une tension négative.

La présence de bosses autour de -2 à -4V est difficile à interpréter. De plus on a souvent très peu de courant après la bosse (pour $V < -4V$).

Pour les mesures sur le paquet d'ADN, la bosse autour de -2V semble s'ajouter à une caractéristique plus lisse passant par l'origine (cf. figure IV.11). Il est possible que le transfert de charge par la pointe pour une tension négative soit fortement limité. La pointe doit injecter des trous ou capter des électrons. Le mécanisme de transfert est certainement de type électrochimique avec le solvant ou l'ADN.

Nous avons effectué quelques mesures sous azote afin de diminuer le taux d'humidité ambiant de 50% (dans la pièce de l'AFM) à moins de 20% sous flux d'azote sec. Dans ce cas on ne mesure plus de courant en accord avec les expériences de Gu [Gu 2002-b]. D'après Gu la perte de conductivité est d'environ un facteur 1000 lorsque le taux relatif d'humidité passe de 50% à 20% (cf. chapitre I tableau I.02). On peut expliquer ce phénomène de deux manières. Tout d'abord, dans l'hypothèse d'une conduction de type ionique, il est normal de trouver une telle dépendance en fonction du taux d'humidité. L'autre explication considère l'hypothèse où c'est effectivement l'ADN qui conduit le courant. Dans ce cas la perte de conductivité peut s'expliquer par un changement structural de la molécule d'ADN. On a alors certainement un passage de la forme B à A (cf. chapitre I). L'hypothèse implicite dans cette explication est que la forme B est conductrice et la forme A est isolante.

III.5. Mesure en fonction de la distance et de la taille du système

Nous présentons dans cette partie la variation du niveau de courant en fonction de la taille de notre système et de la longueur de la corde d'ADN. Nos mesures sont ensuite discutées suivant trois modèles : tunnel, hopping (conduction par saut) et ohmique.

Pour calculer la résistance de nos structures, on se base sur le niveau de courant à tension positive élevée (supérieure à la tension de seuil pour les mesures avec un balayage croissant – cf. paragraphe III.4.2.2.).

La figure IV.17 reprend les mesures effectuées sur des surfaces de polystyrène, et terminée amine. La résistance est donnée en fonction de la distance en échelle log – log. Sur la surface de polystyrène les cordes d'ADN sont composées d'environ 1000 brins, l'électrode évaporée est du pentacène. Dans le cas de la surface amine, la taille des cordes va de quelques molécules à 1000 environ. Deux séries d'échantillons ont été préparées avec du pentacène et de l'or comme électrode.

III.5.1. Modèle tunnel

Dans le cas du modèle tunnel (cf. chapitre I) le courant décroît exponentiellement avec la distance : $I \propto I_0 e^{-\beta d}$. La figure IV.18 donne la dépendance en fonction de la distance du courant pour la surface polystyrène (même données que pour la figure IV.17 mais en échelle linéaire - log). Dans ce cas, on peut distinguer deux régimes tunnel. Pour les distances inférieures à 250nm on peut mesurer un premier coefficient β et un second plus faible pour les points de mesures pour $d > 250\text{nm}$. Ces coefficients sont repris sur la figure IV.19.

C'est sur la surface polystyrène qu'on distingue le mieux le changement de régime. Pour les surfaces terminées amine et méthyle, on ne distingue pas les deux régimes. L'explication tient au fait que le niveau de courant sur le paquet d'ADN dans le cas de l'échantillon avec du polystyrène est important. On peut le voir sur la figure IV.20 en c).

La valeur du coefficient d'atténuation β obtenu par Cai [Cai 2001] est en accord avec ce que nous avons mesuré pour de petites structures ($N < 100$) et si on considère la décroissance du courant pour de petites distances (β calculé pour $d < 250\text{nm}$ sur la surface de polystyrène – cf. figure IV.19).

Cependant, nos valeurs du coefficient d'atténuation sont deux ordres de grandeur en dessous de ce qui est obtenu par les expériences de transfert de charge en solution (de l'ordre de 1 à 10nm^{-1}).

La dépendance du courant en fonction de la distance est trop lente pour pouvoir être décrite raisonnablement par un modèle de conduction de type tunnel.

III.5.2. Modèle ohmique

Si on regarde les résultats en échelle linéaire (cf. figure IV.20), on a une dépendance presque linéaire du courant en fonction de la distance. De plus, la figure IV.21 donne une dépendance de la résistance linéique de la corde d'ADN inversement proportionnelle au nombre de brins d'ADN dans la corde (cf. équation IV.01). Cela suggère une résistance linéique par brin d'ADN de $10000 \text{ G}\Omega/\text{nm}$. Cela correspond à une conductivité volumique de $3.10^{-7}(\Omega\text{cm})^{-1}$.

$$R_{\text{corde d'ADN}} = \frac{r_L}{N} \cdot d \quad \text{où} \left\{ \begin{array}{l} \bullet d \text{ est la distance entre le paquet} \\ \text{d'ADN et le point de mesure} \\ \bullet N \text{ est le nombre de molécules} \\ \text{d'ADN dans la corde} \end{array} \right. \quad (\text{IV.01})$$

Le fait d'avoir un comportement ohmique pour la dépendance en fonction de la distance et des caractéristiques fortement non linéaires n'est pas cohérent, à moins d'expliquer les non linéarités des caractéristiques courant – tension par des problèmes de contact électrique entre les électrodes et l'ADN.

III.5.3. Hopping

Le modèle que l'on présente dans cette partie a été utilisé par Yoo et al. [Yoo 2001] pour expliquer leurs résultats (cf. chapitre 1). Ce modèle rend compte du transfert de charge par saut sous l'effet du champ électrostatique entre la pointe de l'AFM et l'électrode. La formule qu'utilise Yoo et al. [Yoo 2001] s'applique à de l'ADN déposé entre deux électrodes. La formule est donnée ci-dessous où a est la distance de saut, e la charge de l'électron, V le potentiel appliqué, k la constante de Boltzmann, T la température et d la distance entre le polymère d'ADN et la pointe.

$$R \propto \frac{1}{\sinh(eaV/2kTd)} \quad \text{avec} \left\{ \begin{array}{l} a : \text{distance de saut} \\ V/d : \text{champ électrostatique} \end{array} \right.$$

L'ajustement entre les courbes théoriques et nos points expérimentaux marche assez bien (cf. figure IV.22) si on ne prend pas en compte les points de mesure les plus proches du paquet d'ADN où le courant décroît très rapidement (cf. figure IV.20 en c)). Le résultat

intéressant est que la distance de hopping dépend peu de la taille du système. La distance de hopping d'environ 3nm est en accord avec la valeur trouvée par Yoo et al [Yoo 2001]. Cela correspond à une distance de 10 paires de base sur l'ADN. Cette distance de saut est très importante. Néanmoins un transfert de charge sur de telles distances a été observé en solution [Giese 2001] (cf. chapitre I). Mais dans ce cas le transfert de charge entre les bases G (Guanine) se fait par des sauts intermédiaires par les bases A (Adénine). Par conséquent le modèle que l'on a utilisé doit être raffiné pour déduire une valeur de saut plus réaliste dans l'hypothèse où on a bien un mécanisme de conduction par saut.

III.5.4. Conclusion sur les différents modèles

Parmi les modèles présentés ci-dessus, le modèle tunnel semble s'appliquer lorsque la distance au paquet d'ADN est inférieure à 250nm environ, bien qu'il ne soit pas physiquement acceptable vu la faible dépendance du courant avec la distance.

Pour les distances plus importantes, on peut rendre compte plus ou moins bien des résultats à l'aide d'un modèle de conduction par saut, et à l'aide d'un modèle de conduction de type ohmique. Le premier modèle de conduction donne une distance de saut indépendante de la taille du système.

Le modèle de type ohmique donne une conductivité volumique de l'ADN de $3 \cdot 10^{-7} (\Omega \text{cm})^{-1}$. Les mesures sont faites à l'air et à température ambiante. Les mesures préliminaires montre que le courant diminue sous une atmosphère d'azote sec. On peut interpréter cette diminution par une déshydratation de la corde d'ADN et du paquet d'ADN, suggérant un mécanisme de conduction de type ionique. La conductivité mesurée est en accord avec celle qu'on pourrait mesurer dans des solutions salines. On peut également interpréter cette diminution par un changement de forme de l'ADN sous l'effet de la déshydratation qui passerait de conducteur (ce serait la forme B) à isolant (ce serait la forme A).

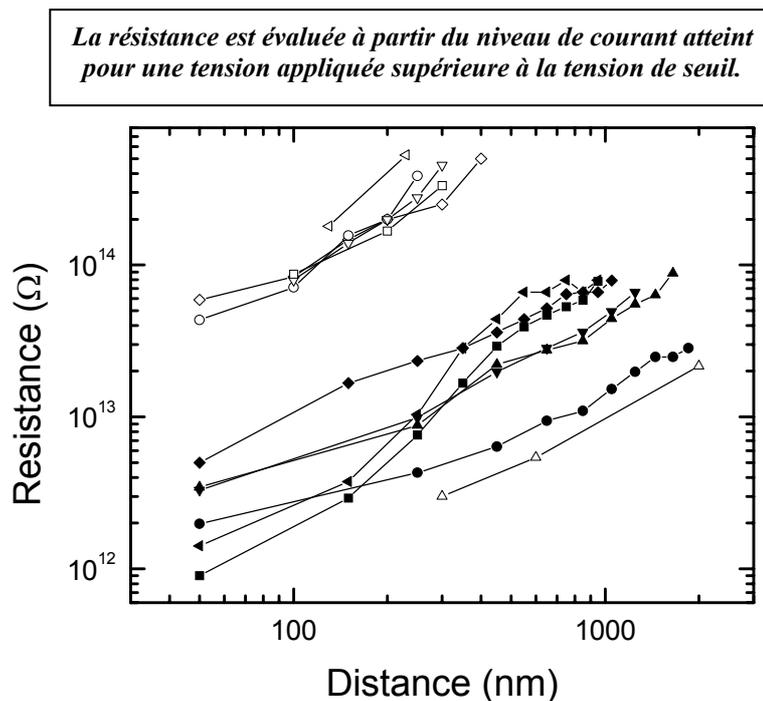


Figure IV.17 : Résistance en fonction de la distance pour des mesures effectuées sur trois type d'échantillons différents : les symboles pleins correspondent à une surface de polystyrène et une électrode en pentacène. La taille des cordes est d'environ 1000 brins. Les symboles creux correspondent à une surface terminée amine avec une électrode en or ($\circ, \nabla, \square, \diamond$) et en pentacène (\triangleleft, \triangle). La taille des cordes va de quelques brins à 1000 environ.

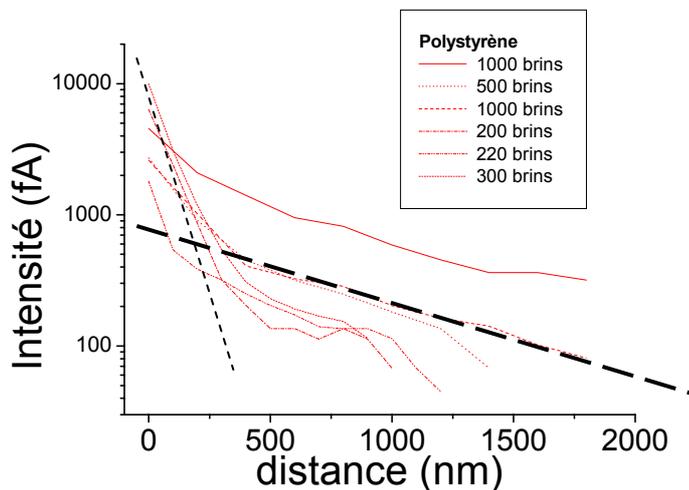


Figure IV.18 : Mesure de courant en fonction de la distance. Les mesures sont effectuées sur une surface de polystyrène. On distingue deux régimes de décroissance exponentielle (traits en pointillés fin et gras). Les valeurs du coefficient d'atténuation sont données pour toutes nos mesures sur la figure IV.19.

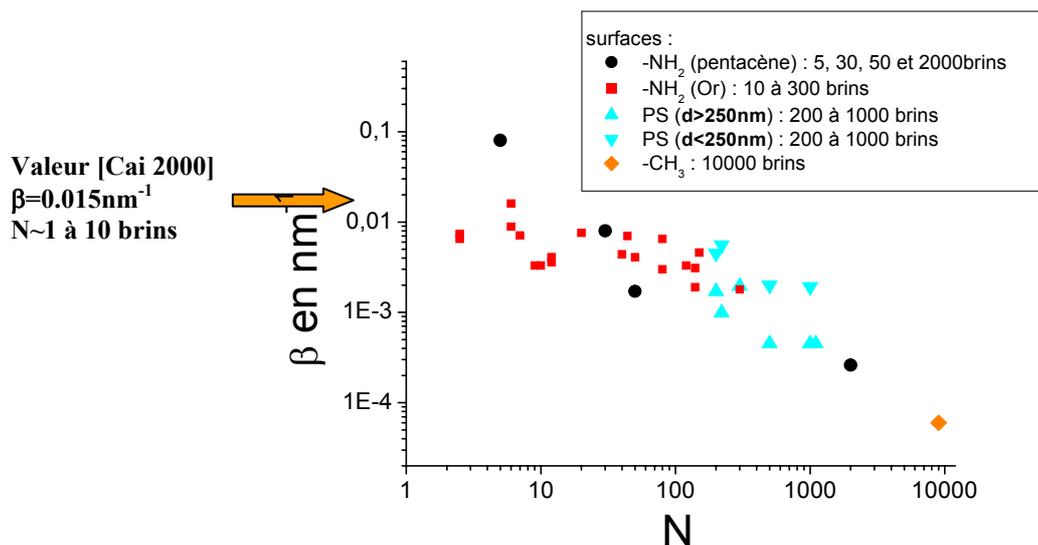


Figure IV.19 : Dépendance du coefficient d'atténuation β en fonction de la taille du nombre de brins dans la corde d'ADN. Le type de surface et la nature du contact électrique sont indiqués sur la figure. La valeur de Cai et al. [Cai 2000] est en accord avec nos mesures pour $N < 1000$ brins et si on ne prend en compte que les valeurs pour une distance au paquet d'ADN inférieure à 250nm (cas des mesures sur la surface polystyrène). Cependant la valeur de β est au moins deux ordres de grandeur en dessous des valeurs de β obtenu par les expériences de transfert de charge en solution.

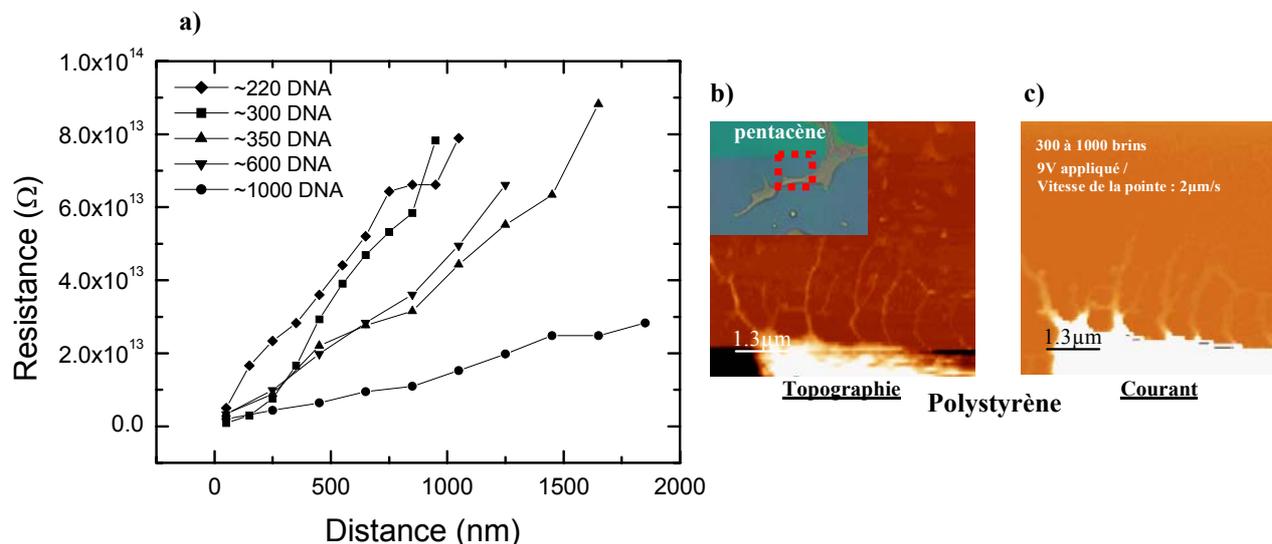


Figure IV.20 : Dépendance de la résistance en fonction de la distance. On a une relation de type ohmique : $R \propto d$. Les mesures représentées en a) sont faites sur une surface de polystyrène avec des cordes dont la taille va de 220 à 1000 molécules d'ADN. La zone de mesure est représentée en microscopie optique et en AFM conducteur (en b) et c)).

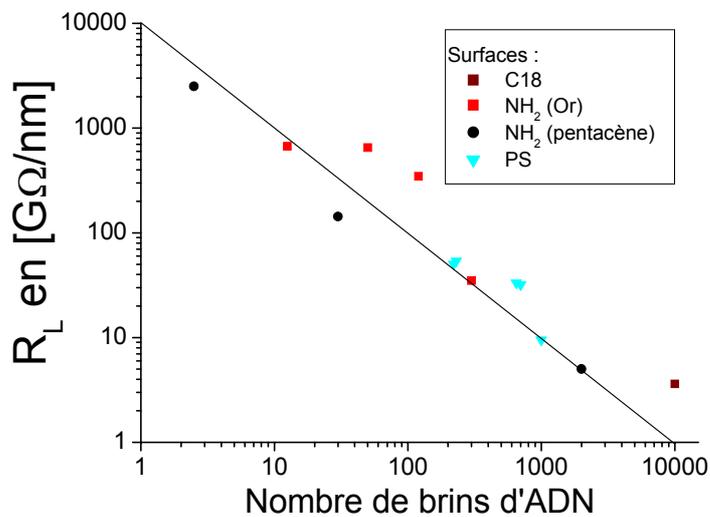


Figure IV.21 : Résistance linéique des cordes d'ADN en fonction du nombre de molécules d'ADN dans la corde pour différentes surfaces.

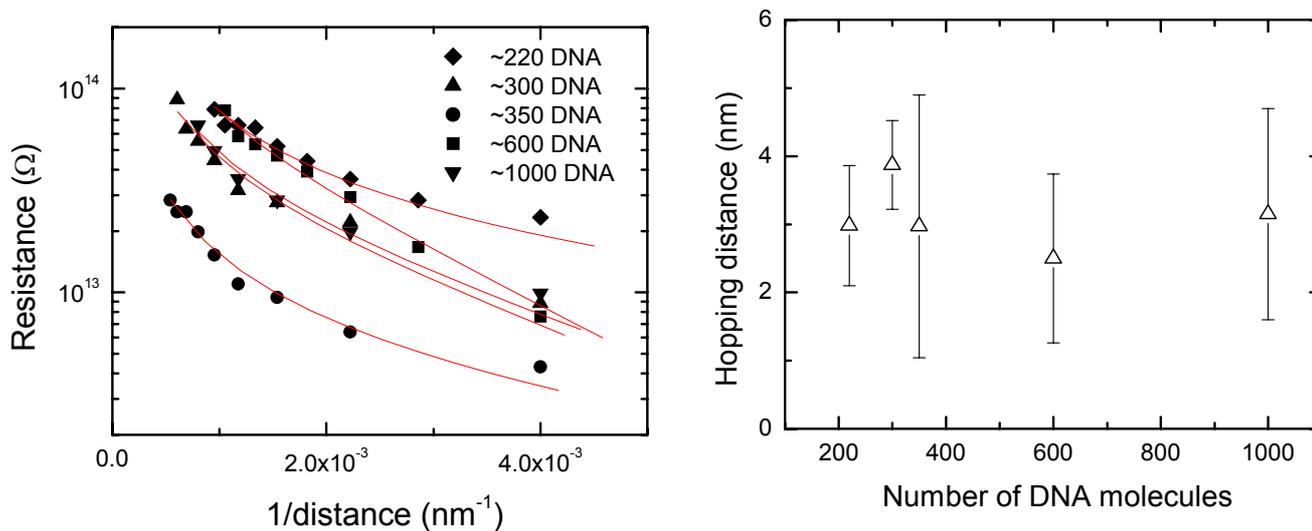


Figure IV.22 : Ajustement de nos résultats expérimentaux avec le modèle de conduction par saut. La valeur du paramètre de conduction par saut ainsi que la barre d'erreur sont déduites de l'algorithme d'ajustement. Les symboles correspondent à ceux des figures IV.20 et IV.17.

IV. EFM

Les mesures par EFM permettent de sonder les propriétés électrostatiques d'un objet posé sur la surface. On détecte le décalage en fréquence à phase constante induit par le gradient de force du champ électrostatique (cf. chapitre II). En particulier, un objet isolant donnera très peu de signal en EFM. En revanche on ne peut pas affirmer qu'un objet est conducteur. Cette mesure ne fait pas la différence entre un objet ayant une forte constante diélectrique et un conducteur.

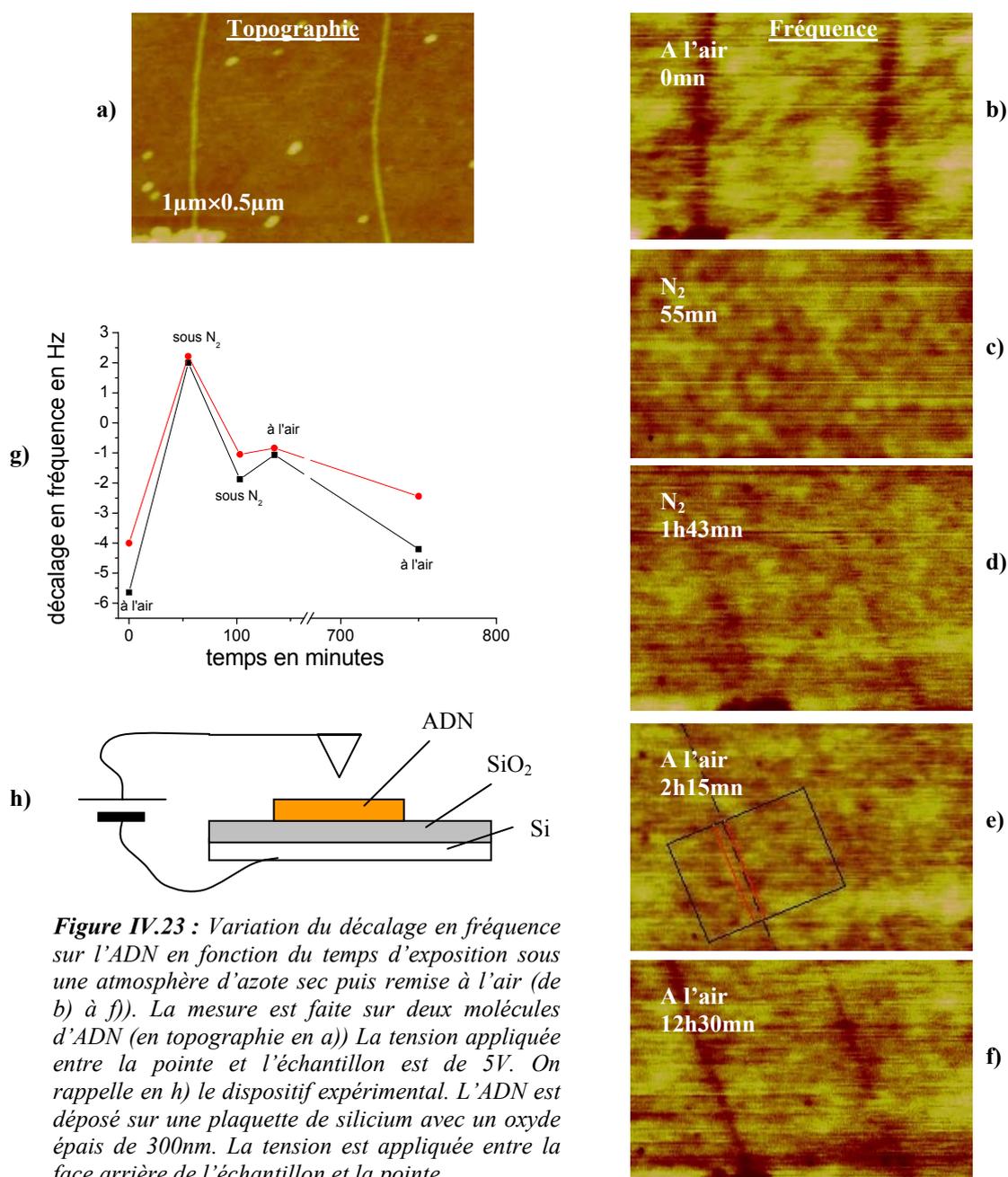


Figure IV.23 : Variation du décalage en fréquence sur l'ADN en fonction du temps d'exposition sous une atmosphère d'azote sec puis remise à l'air (de b) à f)). La mesure est faite sur deux molécules d'ADN (en topographie en a)) La tension appliquée entre la pointe et l'échantillon est de 5V. On rappelle en h) le dispositif expérimental. L'ADN est déposé sur une plaquette de silicium avec un oxyde épais de 300nm. La tension est appliquée entre la face arrière de l'échantillon et la pointe.

Les mesures successives effectuées sous azote et à l'air sont données sur la figure IV.20 de b) à f). L'ADN est déposé sur une surface terminée méthyle. On constate la disparition du signal EFM sous l'atmosphère d'azote sec. La hauteur des deux cordes est de 3nm en topographie. Cette hauteur ne varie pas que l'on image à l'air ou sous azote. On doit avoir moins de 10 molécules d'ADN dans chacune des cordes sachant que sur une surface terminée méthyle la hauteur de l'ADN est de 1nm (cf. chapitre III).

La perte du signal sous une atmosphère sèche d'azote peut s'expliquer de deux manières. Premièrement, l'ADN contient une certaine quantité d'eau qui s'en va en partie lorsque l'échantillon est exposé à l'atmosphère d'azote sec. Comme l'eau a une forte constante diélectrique, on peut s'attendre à une forte diminution du décalage en fréquence. L'autre explication est un changement structurel de l'ADN qui passerait de conducteur à isolant. Il est connu que l'ADN déshydraté adopte préférentiellement la forme A (dans l'hypothèse où la forme B est conductrice et la forme A moins hydratée est isolante). La deuxième hypothèse est peu probable car nous avons estimé d'après des simulations (cf. chapitre II) qu'un objet conducteur doit donner un décalage en fréquence de 3Hz pour 1V appliqué avec une pointe distante d'environ 100nm du substrat. Pour nos expériences, la tension appliquée est de 5V. Comme la force entre la pointe et le substrat varie en V^2 , on doit donc diviser par 25 ($=5 \times 5$) le décalage en fréquence mesuré pour pouvoir le comparer à la simulation à 1V.

On mesure un décalage en fréquence de 8Hz au maximum (cf. figure IV.23). On a donc en divisant par 25, un décalage de 0.3Hz. On est loin de 3Hz attendu pour un objet conducteur. Même si la simulation ne correspond pas exactement à notre expérience, on ne pourrait pas expliquer le facteur 10 (entre 0.3Hz et 3Hz) entre les mesures et les simulations.

Par conséquent, l'explication de la perte de signal en EFM de l'ADN est une déshydratation de la molécule.

V. Fibres d'ADN

Nous avons effectuées quelques mesures préliminaires sur des fibres d'ADN déposées sur des électrodes ou suspendues entre deux pointes. On atteint de manière reproductible des courants de l'ordre de 0.1nA pour 1V. Le courant disparaît lorsqu'on met la fibre sous vide, suggérant une conduction par le solvant qui entoure l'ADN.

Les fibres se préparent en laissant sécher une goutte de solution d'ADN concentré (0.25g/ml). Lorsque la consistance de la goutte ressemble à un gel, on peut fabriquer une fibre en trempant un objet (par exemple une pointe de micro manipulateur) dans la solution et en l'enlevant doucement. Une fibre se forme ainsi entre la goutte d'ADN et la pointe. Cette fibre peut être posée entre des électrodes (cf. figure IV.24). On peut également former une fibre suspendue directement entre deux pointes conductrices (pour les mesures électriques) en les trempant dans la solution d'ADN. On piège alors une micro goutte entre les deux pointes. Il suffit alors de les éloigner pour former une fibre suspendue. Les fibres suspendues sont plus irrégulières que celles qu'on obtient par traction d'une pointe à partir d'une goutte d'ADN

concentré (cf. figure IV.24). Néanmoins les caractéristiques courant tension sont plus linéaires pour les fibres suspendues (cf. figure IV.25).

Les mesures de courant sur des fibres déposées sur une surface donne une forte hystérésis. Le courant est le plus important lorsque la tension augmente ou diminue à partir de zéro. On peut observer une bosse en positif et en négatif. En revanche l'intensité après la bosse reste faible. On peut attribuer ce comportement à une saturation de la surface des électrodes par des contre ions qui écrantent le champ électrostatique et bloque la conduction. Comme l'espace entre les électrodes est plus grand que la taille des molécules, la conduction par l'ADN est défavorisée.

On notera que les mesures faites après quelques heures sont plus reproductibles et donnent plus de courant que celles faites immédiatement après le dépôt de la fibre (cf. figure IV.24). L'explication de ce comportement est certainement une relaxation des contraintes imposées à la fibre juste après le dépôt. La conductivité que l'on peut déduire de ces mesures est de l'ordre de $10^{-5} (\Omega\text{cm})^{-1}$.

Pour les fibres suspendues on a un comportement ohmique sur une zone réduite de tension : entre -1V et 1V. La figure IV.24 donne les résultats obtenues sur une fibre d'environ 50 μm de long. Il est difficile d'estimer le diamètre de la fibre (environ 1 μm).

On peut déduire de la partie linéaire de la caractéristique une conductivité volumique de l'ordre de $10^{-5} (\Omega\text{cm})^{-1}$. Cette valeur de conductivité est 30 fois supérieure aux mesures présentées précédemment sur des cordes d'ADN en AFM conducteur (cf. paragraphe III.5.2.). Elle est en accord avec la valeur de conductivité volumique observé par Nakayama [Nakayama 2001] (cf. chapitre I) lorsque les molécules d'ADN sont trop petites pour ponter les électrodes.

Dans les deux types d'expérience ADN posé sur une surface et ADN suspendu, le courant disparaît si on déshydrate la fibre (humidité relative faible ou avec un flux d'azote sec).

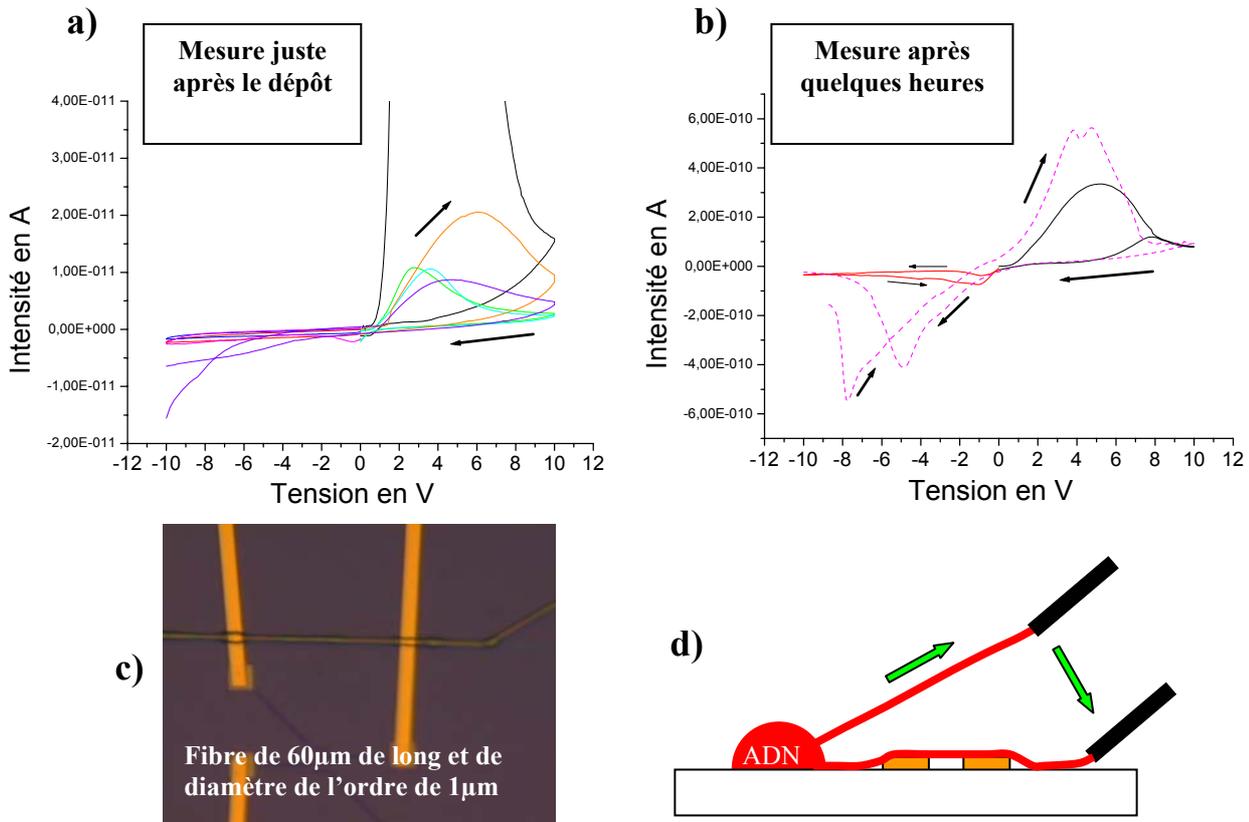


Figure IV.24 : Mesure sur une fibre d'ADN déposée entre deux électrodes en platine. La mesure est répétée plusieurs fois. On a fait deux séries de mesures juste après le dépôt et le lendemain. Les mesures sont plus reproductibles pour la deuxième série. En c) une vue au microscope optique de la fibre et des électrodes. La méthode de fabrication de la fibre et le dépôt sur l'électrode est schématisée en d).

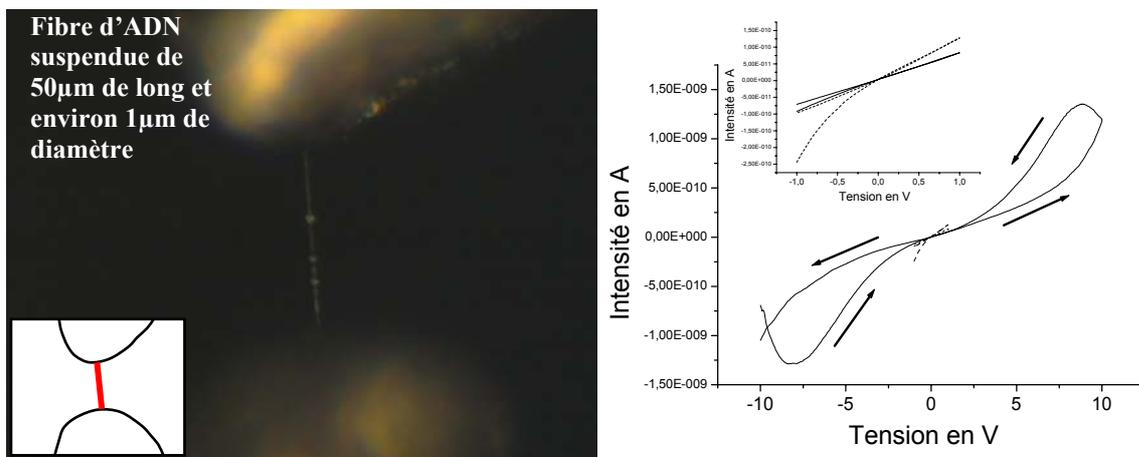


Figure IV.25 : Mesure sur une fibre d'ADN suspendue. La caractéristique est linéaire sur une zone de tension réduite [-1 à 1V]. Image de la fibre a été obtenue au microscope optique.

VI. Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre un certain nombre de tentatives de mesures électriques sur des molécules d'ADN.

Les mesures sur des électrodes n'ont pas donné de résultats. Nous n'avons pas mesuré de courant.

En revanche les mesures en AFM conducteur ont donné des résultats plus intéressants. En particulier, nous avons observé des courants relativement importants ($\sim nA$) à travers l'ADN sur lequel on a évaporé directement du pentacène. On trouve des conductivités volumiques au moins égales à **$0.03 (\Omega cm)^{-1}$** .

L'utilisation de métal comme l'or ou le platine évaporé directement sur les molécules n'a pas permis d'effectuer de mesures de courant. L'ADN est certainement endommagé dans ce cas.

L'utilisation d'un paquet d'ADN qui relie l'électrode et la corde d'ADN nous a permis de faire des mesures électriques plus systématiques. L'étude de la conductivité en fonction du nombre de molécules dans la corde d'ADN et de la distance nous a permis de tester différents modèles.

Le modèle tunnel donne une dépendance trop lente en fonction de la distance. Le coefficient d'atténuation a une valeur qui n'est pas physiquement acceptable.

Le modèle de conduction par saut (ou hopping), rend assez bien compte de la dépendance du courant en fonction de la distance et donne une distance de saut indépendante du nombre de molécules dans la corde d'ADN. Cette distance est de 3nm environ en accord avec celles déduites des expériences de Yoo [Yoo 2001]. Cette distance de saut correspond à environ 10 paires de bases. Une valeur plus réaliste du paramètre de saut pourrait être déduite en utilisant un modèle plus réaliste qui tiendrait compte des différents mécanismes de transfert de charge dans l'ADN (transfert par le biais des bases Adénine).

Le modèle de conduction ohmique est le plus simple et rend à peu près compte des résultats expérimentaux au niveau de la dépendance en fonction de la distance et du nombre de molécules dans la corde d'ADN. On a pu déduire une conductivité volumique de l'ordre de **$3.10^{-7} (\Omega cm)^{-1}$** . Néanmoins, les caractéristiques courant – tension sont fortement non linéaires en désaccord avec la loi d'Ohm. On peut expliquer ce désaccord par des problèmes de contact entre l'ADN et l'électrode ou la pointe de l'AFM.

Toutes nos mesures ont été effectuées à l'air et à température ambiante. Les quelques mesures sous atmosphère d'azote sec n'ont pas donné de courant. Deux interprétations peuvent rendre compte de cette observation. **1** : La conduction est de type ionique. Les conductivités mesurées sont compatibles avec celles de solutions salines **2** : l'ADN sous l'effet de la déshydratation peut passer de la forme B à A. Cette transformation peut entraîner a priori un changement des propriétés de conduction de l'ADN.

Les mesures en EFM sur de l'ADN déposé sur une surface méthyle ont mis en évidence la déshydratation de l'ADN sous flux d'azote. Le signal EFM que l'on mesure n'est pas compatible avec une molécule conductrice.

Les mesures sur des fibres d'ADN donne une conductivité volumique de l'ordre de $10^5 \text{ } (\Omega\text{cm})^{-1}$. Les fibres suspendues donnent les meilleurs résultats. On a des caractéristiques courant – tension quasi – linéaires sur une faible gamme de tension (entre -1V et 1V).

La conductivité chute brutalement lorsqu'on fait la mesure sous vide ou sous une atmosphère d'azote sec suggérant une conduction de type ionique dans la fibre. On trouve une conductivité environ 30 fois supérieure à celle obtenue sur les cordes d'ADN déposées sur une surface.

Nos résultats sur les fibres demandent à être complétés. En effet il est étonnant que les fibres suspendues donnent des résultats différents des fibres déposées sur une surface surtout dans l'hypothèse d'une conduction de type ionique.

Enfin, les mesures sur les surfaces terminées amine n'ont pas donné de résultats aussi intéressants que ceux obtenus par Kasumov [Kasumov 2002] avec de la pentylamine. Pourtant la structure chimique de cette molécule est assez semblable à celle du silane que l'on a utilisé. L'interprétation donnée par Kasumov repose sur le caractère hydrophobe de la surface qui limite les interactions avec l'ADN. Si cette interprétation est la bonne, cela devrait aussi être le cas pour nos surfaces hydrophobes. Malheureusement nous n'avons pas réussi de mesures sur ces surfaces car l'ADN est systématiquement surétiré pendant le dépôt.

Conclusion générale

Dépôt d'ADN :

Nous avons caractérisé le dépôt d'ADN avec la technique de la goutte qu'on laisse incubé un certain temps sur l'échantillon et qu'on enlève du substrat au bout de quelques minutes. Cette méthode permet d'avoir des cordes d'ADN comportant très peu de molécules étirées sur la surface. Cette technique surétire systématiquement l'ADN sauf sur la surface terminée amine. L'étude de la densité d'ADN déposé en fonction du pH nous permet de proposer un modèle simple de la dynamique du dépôt. On distingue la surface terminée amine des surfaces hydrophobes. Pour les surfaces terminées amine, l'interaction est d'origine électrostatique entre l'ADN chargé négativement et la surface chargée positivement. Pour les surfaces hydrophobes la répulsion électrostatique entre l'ADN et sa charge image limite le dépôt d'ADN. En revanche, la fixation de l'ADN sur la surface se fait certainement par des interactions de type hydrophobe. L'ADN sur ces surfaces se fixe en quelques points. On peut s'attendre à une déformation importante de la molécule en ces points (ouverture locale de la double hélice, ...). Les images AFM ne permettent pas de distinguer ce genre de structures. Nous n'avons réussi aucune mesure électrique sur l'ADN déposé avec cette méthode.

La méthode de dépôt où on se contente de laisser sécher une goutte de solution d'ADN sur le substrat permet de déposer des cordes d'ADN de toutes les tailles sur la surface. La taille des structures dépend également de la teneur en sels dans la solution. Plus il y a de sels, et plus les cordes d'ADN sont de petites tailles (peu de molécules dans la corde). Nos mesures électriques ont été réalisées sur les échantillons préparés avec cette technique de dépôt.

Nous avons à partir de toutes nos images AFM mesuré la hauteur des molécules. Nous avons pu estimer la hauteur d'une seule molécule d'ADN sur différentes surfaces. On est systématiquement en dessous des 2nm attendus. Néanmoins, nous avons constaté que c'est sur la surface terminée méthyle (hydrophobe et peu réactive) que la hauteur est la plus importante. Malheureusement, l'ADN sur cette surface est étiré jusqu'à deux fois sa longueur (30 μ m au lieu de 16 μ m). Cela peut expliquer cette faible hauteur. De plus, il est étonnant de ne mesurer que 0.5nm de hauteur pour l'ADN déposé sur une surface terminée amine. En effet récemment une hauteur de 2.4nm a été mesurée sur l'ADN lorsque l'échantillon (surface de mica) est traité au préalable avec de la pentylamine en phase plasma [Kasumov 2002]. Or cette molécule est assez proche chimiquement du silane amine utilisé pour traiter nos surfaces. Les surfaces traitées avec de la pentylamine sont plus hydrophobes que nos surfaces terminées amine. L'hydrophobicité de la surface semble un paramètre important du dépôt d'ADN.

Mesures électriques :

Nous avons obtenu dans ce travail des conductivités de l'ADN sur plusieurs ordres de grandeur. Nos mesures avec le plus de courant donne une conductivité quatre ordres de grandeur en dessous de celles de Fink [Fink 1999] et cinq ordres de grandeur en dessous de celle de Kasumov [Kasumov 2001]. Malheureusement ces mesures sont très peu reproductibles. Nous avons effectuées très peu au cours de la thèse. Le dépôt de l'électrode sur l'ADN endommage généralement les molécules qui deviennent isolantes.

Nous avons amélioré le contact électrique en utilisant comme intermédiaire entre l'ADN et l'électrode évaporée un paquet d'ADN. Ce genre de structures sont obtenues facilement lorsqu'on laisse sécher une goutte de solution d'ADN sur le substrat. Toute une

Conclusion générale

série de mesures sur des cordes d'ADN en fonction de la distance au paquet d'ADN et du nombre de molécules d'ADN dans la corde ont été réalisées. Les résultats sont indépendants du traitement de surface.

On a testé différents modèles de la littérature. Le modèle de conduction tunnel est assez bien vérifié pour les faibles distances au paquet d'ADN ($d < 250\text{nm}$). Cependant le coefficient d'atténuation que l'on trouve n'est pas physiquement acceptable. Il est au moins deux ordres de grandeur en-dessous de ceux déduits des expériences de transfert de charge en solution. De plus ce facteur d'atténuation diminue avec la taille de la corde d'ADN. Cette dépendance n'est pas cohérente avec un modèle de conduction de type tunnel. Le modèle de conduction par saut utilisé par Yoo [Yoo 2001] donne un assez bon accord avec nos résultats expérimentaux. Le modèle ohmique est également assez bien vérifié. De plus on vérifie expérimentalement la dépendance linéaire en fonction de la taille de la corde (i.e. en fonction du nombre de brins d'ADN dans la molécule), ainsi qu'une dépendance inversement proportionnelle en fonction de la distance. On déduit une conductivité volumique très faible de l'ordre de $10^{-7}(\Omega\text{cm})^{-1}$.

Les mesures faites sous atmosphère d'azote sec ne donne pas de courant. Deux mécanismes sont possibles pour expliquer ce résultat. Soit on a de la conduction de type ionique. Dans ce cas la conductivité mesurée est compatible avec ce qu'on peut observer dans des solution salines. Soit la déshydratation provoque un changement structural de l'ADN d'une forme « conductrice » à isolante.

Parmi nos mesures, celles faites sur le paquet d'ADN sont les plus reproductibles. En effet on retrouve sur toutes les courbes les mêmes caractéristiques. Ces courbes sont assez complexes et il est difficile de les interpréter.

Les mesures de courant sur les fibres d'ADN donne des conductivités volumiques de l'ordre de $10^{-5}(\Omega\text{cm})^{-1}$ en accord avec les valeurs mesurées par Nakayama [Nakayama 2001] dans le cas où les molécules d'ADN ne pontent pas les électrodes.

Perspectives :

Il nous faut réaliser les mêmes expériences en faisant varier la température. En effet ces mesures vont nous permettre de valider ou de rejeter différents modèles de conduction.

Le problème de la hauteur de l'ADN mesuré à l'AFM mérite attention. Nous allons réaliser des dépôts d'ADN avec un traitement préalable avec de la pentylamine et vérifier si la hauteur mesurée est en accord avec les mesures de Kasumov [Kasumov 2002]. Ce travail a déjà débuté.

Dans un deuxième temps on pourra mesurer les propriétés de conduction de ces molécules.

Nous pouvons également envisager d'autres traitements de surface comme l'implantation d'espèces chargées dans le substrat. Cette technique est utilisée en microélectronique pour doper localement les substrats.

Il serait également très intéressant de pouvoir faire des mesures de courant en microscopie champ proche mais avec un dispositif où la pointe oscille latéralement. En effet dans ce cas on contrôle mieux la distance de la pointe à la surface.

Enfin, on peut espérer que par l'utilisation de cations multivalents (spermine, spermidine,...) on pourra former des structures plus organisées et plus stables sur la surface qu'avec des cations monovalents. On peut s'attendre à de meilleures propriétés de conduction sur ces molécules.

On peut également envisager de réaliser des mesures sur des cordes d'ADN suspendues entre des électrodes de tailles micrométriques.

Annexe A : AFM – aspect théorique

Cette annexe reprend en détail la théorie sur l'interaction entre une pointe et une surface. Elle complète la présentation du chapitre II sur l'AFM.

On présente tout d'abord quelques résultats sur les oscillateurs harmoniques. On généralise au cas d'une pointe oscillant dans un champ de force. On présente le cas purement attractif, puis répulsif, puis on présente le cas général déjà présenté dans le chapitre II. On développe plus en détail certain calcul comme l'équation qui donne l'énergie dissipée par période en fonction de la phase et de l'amplitude.

I. Oscillateur harmonique amorti

I.1. Régime sinusoïdal forcé

On étudie un oscillateur harmonique amorti de fréquence propre ω_0 et de facteur de qualité $Q > 100$ soumis à une force extérieure sinusoïdale. Les équations sont indiquées ci-après. Elles sont normalisées par rapport à ω_0 et A_0 (cf. 2 dernières équations). Dans le cas d'un oscillateur parfait, l'amplitude à la résonance tend vers l'infini. Ce sont les forces dissipatives qui limitent l'amplitude à une valeur bornée à la résonance. Cette valeur dépend directement de Q ($1/Q$ représente la proportion d'énergie perdue par période).

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{\omega_0}{Q} \frac{dx}{dt} + \omega_0^2 x = \frac{f}{m} \cos(\omega t) \quad (\text{A.01})$$

$$\underline{x} = \frac{A_0}{Q(1-u^2) + ju} \exp(j\omega t) \quad (\text{A.02})$$

$$a = \frac{1}{\sqrt{Q^2(1-u^2)^2 + u^2}} \quad (\text{A.03})$$

$$\varphi = \arctan\left(\frac{u}{Q(u^2-1)}\right) \quad (\text{A.04})$$

| |
|---|
| $\left\{ \begin{array}{l} a = \frac{A(\omega)}{A_0} : \text{Amplitude réduite} \\ A_0 = \frac{fQ}{m\omega_0^2} : \text{Maximum de l'amplitude} \\ k = m\omega_0^2 : \text{Raideur du levier} \\ u = \frac{\omega}{\omega_0} : \text{Fréquence réduite} \end{array} \right.$ <p style="text-align: center;">à la résonance</p> |
|---|

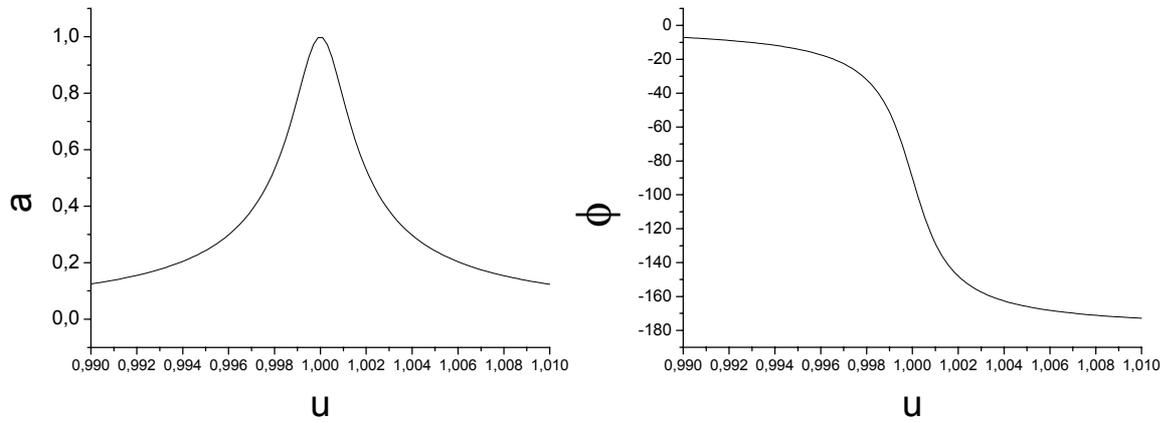


Figure A.01 : L'amplitude d'oscillation normalisée à 1 et la phase sont représentées en fonction de la fréquence réduite. Le facteur de qualité $Q=400$.

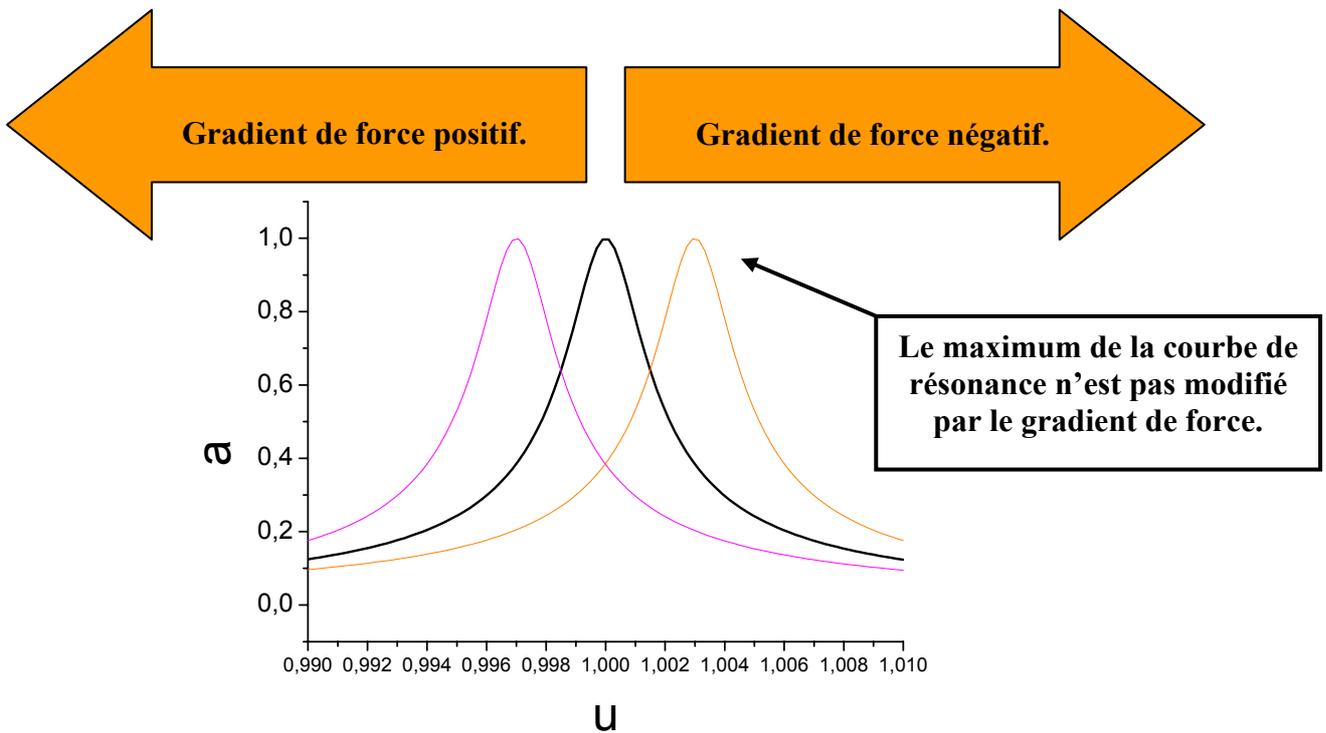


Figure A.02 : Le gradient de force a pour unique effet de décaler l'ensemble de la courbe de résonance et de phase sans les modifier : vers les basses (hautes) fréquences pour un gradient positif (négatif). Le maximum de l'amplitude n'est pas modifié. Cette propriété est remarquable.

I.2. Effet d'un gradient de force

Le gradient de force a pour effet de provoquer un décalage en fréquence de la résonance. Cet effet se voit immédiatement sur les équations. La modification de la fréquence de résonance correspond à assouplir ou raidir davantage le ressort.

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{\omega_0}{Q} \frac{dx}{dt} + \omega_0^2 x = \frac{f}{m} \cos(\omega t) + \frac{1}{m} \left[F_0 + \frac{\partial F}{\partial x} x + \dots \right] \quad (\text{A.05})$$

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{\omega_0}{Q} \frac{dx}{dt} + \left[\omega_0^2 - \frac{1}{m} \frac{\partial F}{\partial x} \right] x = \frac{f}{m} \cos(\omega t) + \left[\frac{F_0}{m} + \dots \right] \quad (\text{A.06})$$

$$\boxed{\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{\omega_1}{Q'} \frac{dx}{dt} + \omega_1^2 x \cong \frac{f}{m} \cos(\omega t) + \frac{F_0}{m}} \quad (\text{A.07})$$

On obtient en modifiant légèrement les équations un nouveau facteur de qualité Q' quasiment égal à Q , et une nouvelle fréquence propre ω_1 . La constante F_0 a uniquement pour effet de décaler la position centrale de x . Comme la valeur du facteur de qualité est peu modifiée, l'effet du gradient de force se ramène à un décalage en fréquence de l'ensemble de la courbe de résonance (cf. figure).

I.3. Effet de forces dissipatives

On présente ici les conséquences d'une force dissipative supplémentaire de type visqueux (dernier terme de l'équation ci-dessous) proportionnelle à la vitesse. Ce nouveau terme entraîne une diminution du facteur de qualité.

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{\omega_0}{Q} \frac{dx}{dt} + \omega_0^2 x = \frac{f}{m} \cos(\omega t) - \alpha \frac{dx}{dt} \quad (\text{A.08})$$

$$\boxed{\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{\omega_0}{Q'} \frac{dx}{dt} + \omega_0^2 x = \frac{f}{m} \cos(\omega t)} \quad (\text{A.09})$$

$$\boxed{Q' = \frac{Q}{1 + \frac{\alpha Q}{\omega_0}}} \quad (\text{A.10})$$

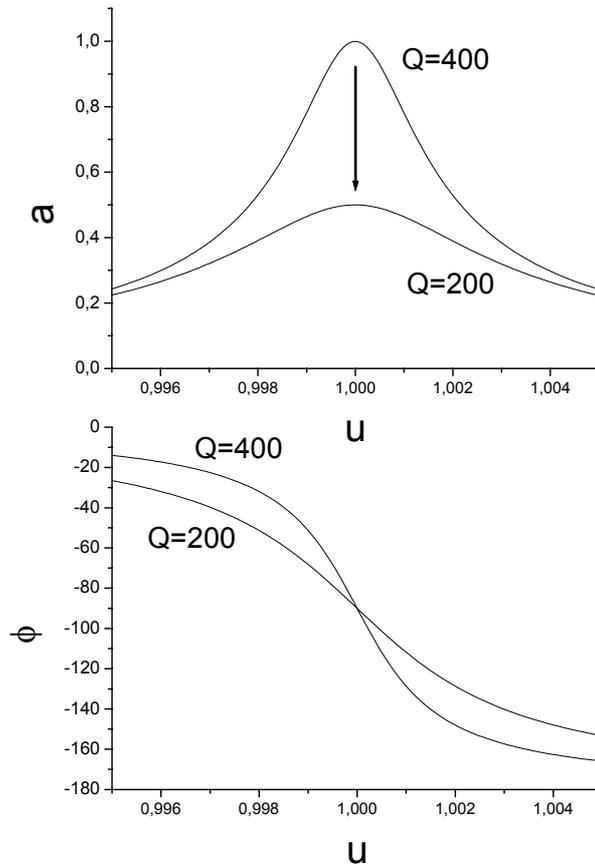


Figure A.03 : Déformation de la courbe de résonance sous l'action d'une force dissipative. Cela se traduit par une diminution du facteur de qualité.

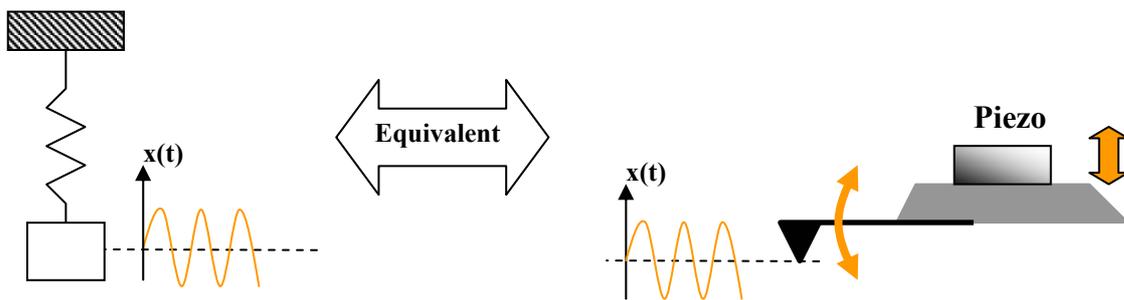


Figure A.04 : Equivalence entre l'oscillateur harmonique amorti et l'ensemble cantilever et piezo d'excitation.

II. Application au cas d'un levier

II.1. Equivalence avec un oscillateur harmonique

Le cantilever soumis à une excitation sinusoïdale peut être modélisé par un oscillateur harmonique amorti en régime sinusoïdal forcé, de pulsation propre ω_0 et de facteur de qualité Q de l'ordre de 100 à 1000 (cf. figure A.04).

Les forces dissipatives visqueuses représentent majoritairement le frottement de l'air sur le levier. En effet, sous vide, lorsque l'énergie est dissipée dans le matériau du levier, le facteur de qualité augmente considérablement : $Q \approx 10000$. Comme le facteur de qualité Q est très élevé, la réponse de la pointe est celle d'un filtre passe-bande très sélectif autour de ω_0 . La pointe n'est donc sensible qu'aux excitations de pulsations proches de ω_0 , et quelque soit la force excitatrice, la réponse de la pointe est une oscillation sinusoïdale proche de ω_0 .

II.2. Effet d'un champ de force

Nous allons étudier les déformations de la courbe de résonance dans le cas d'un cantilever excité par une force sinusoïdale de pulsation proche de ω_0 et au contact d'une surface. Nous allons montrer que l'on peut toujours se ramener aux deux cas présentés ci-dessus : décalage en fréquence et/ou diminution du facteur de qualité.

II.2.1. Interaction pointe surface

La figure A.05 représente la force de contact en fonction de la distance à la surface. On observe un phénomène d'hystérésis de la force lorsqu'on approche et on retire la pointe (cf. figure A.05). L'asymétrie est la conséquence soit de forces d'adhésion, soit de forces de type visqueux. La force d'adhésion est due à des effets surfaciques. En effet, on peut associer à toute surface une énergie (cf. partie sur les angles de contact). Le fait de mettre en contact deux surfaces se caractérise par une diminution d'énergie, d'autant plus que les deux matériaux sont identiques.

La force d'adhésion sous vide d'une pointe en silicium sur une surface de silicium est de l'ordre de 1000nN ($\gamma_{vide\ pointe\ surface} \sim 1Nm^{-1}$). En présence d'eau, il y a deux interfaces (air/pointe et eau/pointe). Le liquide va se déplacer afin de minimiser l'énergie. Cet effet se caractérise de manière générale par une capture de la pointe par le liquide. La résultante de la force tend alors à rapprocher le cantilever vers la surface. Les forces visqueuses ont pour origine la déformation non élastique de la surface. En fait, la déformation de la surface s'oppose au mouvement de la pointe. Tout phénomène d'hystérésis se traduit par une perte d'énergie qui correspond ici à l'aire entre la courbe d'approche et de retrait. Elle est de l'ordre d'une centaine d'eV par période. Il y a un lien direct entre le phénomène d'hystérésis et celui de dissipation (i.e. diminution de Q).

Nous allons voir que l'effet de toutes ces forces sur la pointe au cours de son oscillation est en quelque sorte filtré par l'oscillateur. Les forces se ramènent de manière équivalente à une force élastique (assouplissement ou raidissement de la raideur du levier) et à une force visqueuse proportionnelle à la vitesse.

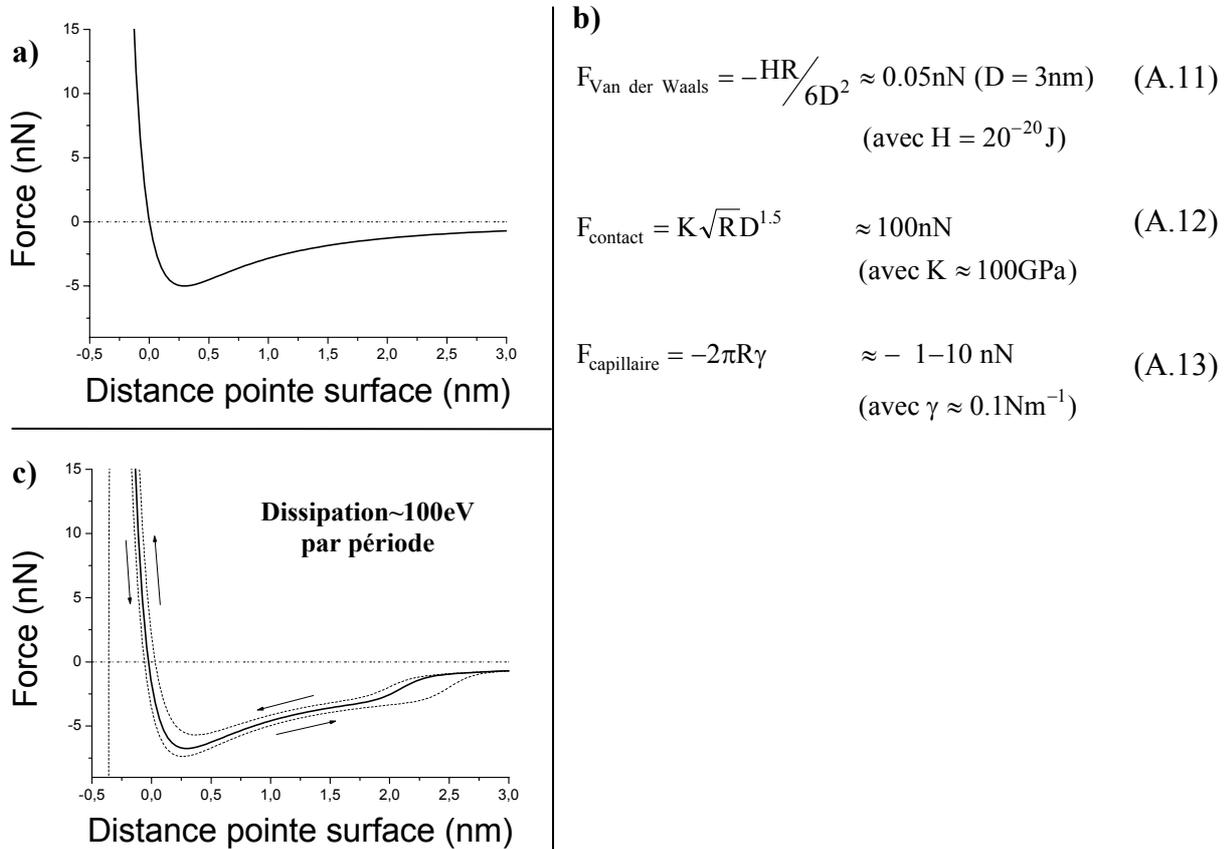


Figure A.05 : Allure typique en a) de la force entre la pointe et la surface. L'interaction pointe surface est attractive à longue distance (force de Van der Waals) et répulsive lorsque l'on touche la surface. L'ordre de grandeur des forces mises en jeu est indiqué en b). H est la constante de Hamaker, K est le module d'Young réduit de la surface et de la pointe. La force de contact est obtenue à partir du modèle de Hertz. R est le rayon de la pointe. En présence d'une fine pellicule d'eau (quelques nm d'épaisseur), le ménisque peut capturer la pointe en c). Cet effet rajoute une force capillaire près de la surface. γ est l'énergie de surface. La force de Van der Waals est plus faible en présence d'une fine couche d'eau. Les courbes en pointillés représente l'effet d'hystérésis entre l'approche et le retrait de la pointe (cf. c)). Cette hystérésis a pour origine les forces de frottements viscoélastiques ainsi que la déformation plastique du substrat. L'énergie dissipée par période représente l'aire entre la courbe d'approche et de retrait. Elle est de l'ordre de 100eV par période.

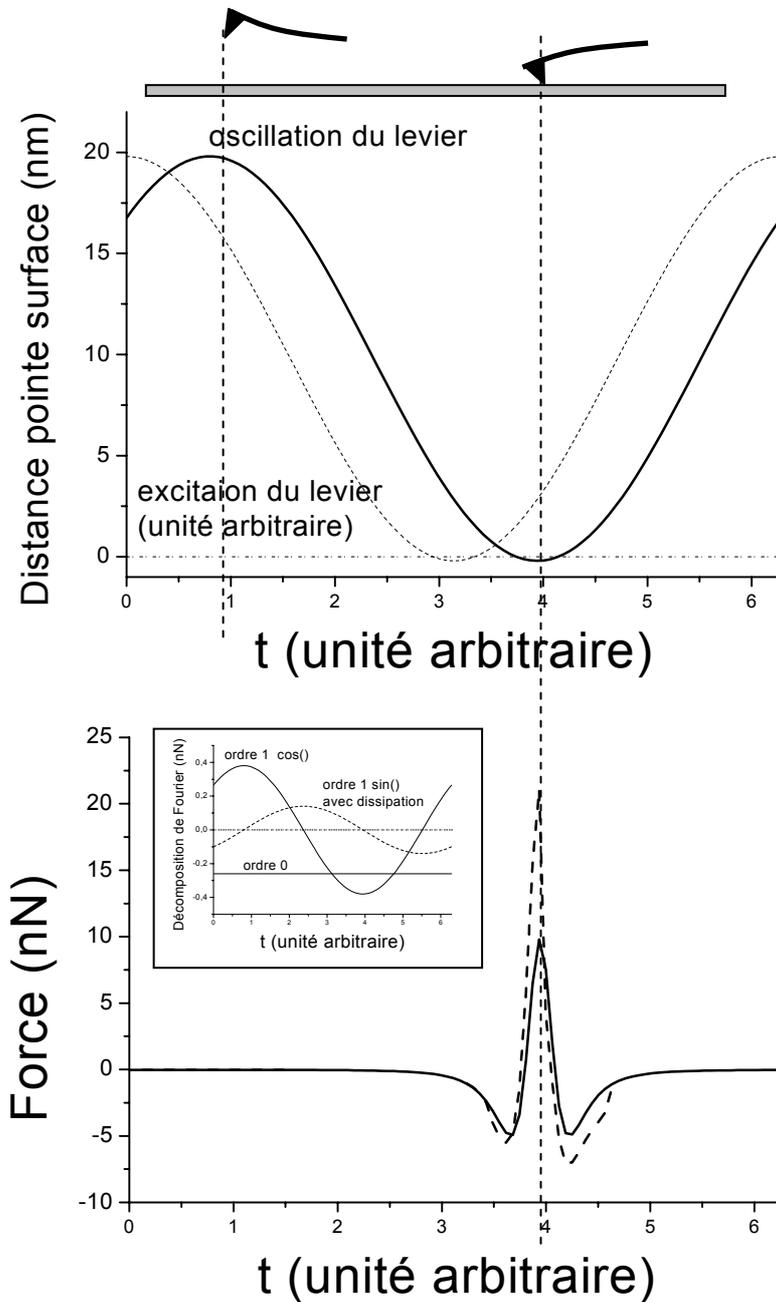


Figure A.06 : La figure du dessus donne l'oscillation du piezo du cantilever (en pointillé), ainsi que la position de la pointe (trait plein). On voit le déphasage entre les deux. La courbe du bas représente la force qui s'exerce sur la pointe avec (pointillé) et sans (trait plein) dissipation. La force ne s'exerce que pendant un temps très court. Elle est en phase avec l'oscillation du cantilever. On représente également la première harmonique et le terme constant de la décomposition de Fourier de la force. L'harmonique d'ordre 1 en $\sin()$ est nul quand il n'y a pas de dissipation. On remarquera l'asymétrie entre l'approche et le retrait dans le cas de force dissipative. On remarquera que malgré la très forte non linéarité des forces de contact, la pointe a toujours un mouvement sinusoïdal. Le levier n'est pas sensible aux termes de la force d'ordre supérieur

II.2.2. Expression du décalage en fréquence et de l'amortissement

Pour calculer le décalage en fréquence et le nouveau facteur de qualité, on part des deux équations (A.14) et (A.15). La première est celle de l'oscillateur harmonique. L'expression de la force de contact pointe - surface est décomposée en série de Fourier.

On se base ensuite sur le fait que la pointe n'est sensible qu'aux forces ayant une fréquence proche de la fréquence de résonance (facteur de qualité très élevé). Dans l'expression de la force de contact, la pointe ne sera donc sensible qu'aux termes du premier ordre, seuls termes proches de la fréquence de résonance.

Comme la force est en phase avec l'oscillation de la pointe, on a la phase dans le cosinus et le sinus. En d'autres termes, on décale l'origine des temps pour être centré sur le moment où la pointe touche la surface. On peut distinguer le cas dissipatif ($F'_1 > 0$) du cas non dissipatif ($F'_1 = 0$).

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{\omega_0}{Q} \frac{dx}{dt} + \omega_0^2 x = \frac{f}{m} \cos(\omega t) + \frac{1}{m} F_{\text{pointe surface}}(t) \quad (\text{A.14})$$

$$F_{\text{pointe surface}}(t) = \underbrace{F_0}_{\text{ordre 0}} + \underbrace{F_1 \cos(\omega t + \varphi) + F'_1 \sin(\omega t + \varphi)}_{\text{ordre 1}} + F_2 \cos(2\omega t + 2\varphi) + F'_2 \sin(2\omega t + 2\varphi) + \dots$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{SANS dissipation} \\ \text{AVEC dissipation} \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} F'_1 = 0 \\ F_1 \approx F_0 \\ F_0 \approx F_1 \\ F'_1 > 0 \end{array} \right. \quad (\text{A.15})$$

On peut développer $x(t)$ en série de Fourier et ne garder que le terme d'ordre 0 et 1 (A.16) et (A.17). En effet, les termes d'ordre supérieur sont négligeables puisqu'ils ont une fréquence en dehors de la bande passante. Le mouvement de la pointe est sinusoïdal. Cela permet de réécrire la force en fonction de x et de sa dérivée.

$$\left\{ \begin{array}{l} x(t) = \underbrace{x_0}_{\text{ordre 0}} + \underbrace{x_1 \cos(\omega t + \varphi)}_{\text{ordre 1}} + x_2 \cos(2\omega t + 2\varphi) + \dots \\ x_2, x_3, \dots \ll x_1 \quad (\text{car } Q \sim 100) \end{array} \right. \quad (\text{A.16})$$

$$F_{\text{pointe surface}}(t) \approx F_0 + F_1 \left(\frac{x - x_0}{x_1} \right) + F'_1 \left(\frac{-1}{\omega x_1} \frac{dx}{dt} \right) + \text{termes d'ordres supérieurs} \quad (\text{A.17})$$

Annexe A

En identifiant les termes constants et les termes d'ordre 1 dans l'équation de l'oscillateur on arrive au résultat principal. On retrouve l'équation d'un oscillateur harmonique mais avec une nouvelle fréquence propre et un nouveau facteur de qualité (A.18). Le décalage en fréquence dépend uniquement du coefficient F_1 , et l'amortissement (i.e. diminution de Q) dépend uniquement de F'_1 (A.19). Par conséquent, dans le cas non dissipatif, on a uniquement un décalage en fréquence. L'amplitude maximale (cf. étude de l'oscillateur harmonique) qui dépend de f , Q , m et $\omega_1 \cong \omega_0$ reste inchangée. La forme de la courbe est également conservée. En revanche dans le cas dissipatif, on a à la fois un décalage en fréquence et un tassement de la courbe, puisque Q diminue.

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{\omega_0}{Q} \frac{dx}{dt} + \omega_0^2 x = \frac{f}{m} \cos(\omega t) + \frac{F_0}{m} + \frac{F_1}{m} \left(\frac{x - x_0}{x_1} \right) + \frac{F'_1}{m} \left(\frac{-1}{\omega x_1} \frac{dx}{dt} \right) \quad (\text{A.18})$$

$$(x - x_0)'' + \underbrace{\left(\frac{\omega_0}{Q} + \frac{F'_1}{m\omega x_1} \right)}_{\text{Nouveau facteur de qualité}} (x - x_0)' + \underbrace{\left(\omega_0^2 - \frac{F_1}{m x_1} \right)}_{\text{Nouvelle pulsation}} (x - x_0) = \frac{f}{m} \cos(\omega t) + \frac{F_0}{m} - \omega_0^2 x_0 \quad (\text{A.19})$$

| | |
|---|---|
| $\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{\omega_1}{Q'} \frac{dx}{dt} + \omega_1^2 x = \frac{f}{m} \cos(\omega t) \quad (\text{A.20})$ | $\left\{ \begin{aligned} \omega_1 &= \omega_0 - \frac{F_1}{2m\omega_0 x_1} ; \Delta u = \frac{\omega_1 - \omega_0}{\omega_0} = -\frac{F_1}{2kx_1} \\ Q' &= \frac{Q \omega_1 / \omega_0}{1 + \frac{F'_1 Q}{m\omega\omega_0 x_1}} \approx \frac{Q}{1 + \frac{F'_1 Q}{m\omega\omega_0 x_1}} \end{aligned} \right. \quad (\text{A.21})$ |
|---|---|

Lorsqu'on identifie le terme constant dans l'équation de l'oscillateur, on trouve l'expression ci-dessous. On en déduit une estimation de x_0 (flexion moyenne de la pointe) et F_0 (force moyenne exercée sur la pointe).

$$F_0 = m\omega_0^2 x_0 \quad (\text{A.23})$$

| | |
|---|-----------------|
| $\Rightarrow \left\{ \begin{aligned} x_0 &\approx \frac{x_1}{Q} \quad (\text{puisque } F_1 \approx F_0 \text{ et } \Delta u \approx \frac{1}{Q}) \\ F_0 &\approx \frac{k}{Q} x \ll kx_1 \end{aligned} \right.$ | (A.24) |
| <div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: small;"> <div style="text-align: center;"> $\frac{k}{Q} x$ <small>mode tapping (~10pN)</small> </div> <div style="text-align: center;"> kx_1 <small>mode contact (~10nN)</small> </div> </div> | (A.25) |

On peut constater que x_0 et F_0 dans les équations (A.24) et (A.25) sont divisés par le facteur de qualité par rapport au mode contact. Le mode tapping est donc moins « agressif » pour la surface. La force moyenne exercée sur la surface est plutôt de l'ordre de la dizaine de pN au lieu de quelques nN en mode contact.

II.2.3. Dépendance en amplitude du décalage en fréquence

Dans le cas où la pointe frôle la surface, la force est concentrée pendant un instant très court. Dans cette limite, on peut estimer le coefficient F_1 . Dans l'intégrale ci-dessous (A.26), c'est la force $F(\dots)$ qui varie le plus rapidement.

$$\begin{aligned}
 F_1 &= \frac{2}{T} \int_0^T \cos(\omega t) F(A \cos(\omega t) + D) dt \\
 &\approx \frac{2}{T\omega} \int_{-1-\varepsilon}^{-1+\varepsilon} (-1 + O(u^2)) F\left(A\left(-1 + \frac{u^2}{2}\right) + D\right) du \quad \text{avec } \begin{cases} u = \omega t \\ \cos(\omega t) \approx -1 + u^2/2 \end{cases} \\
 &\quad \text{La fonction } f() \text{ varie plus rapidement que } \cos(\omega t) \\
 &\approx -\frac{1}{\pi\sqrt{A/2}} \int F(D - A + v^2) dv \quad \text{avec } v = \left(\sqrt{A/2}\right)u \\
 &\quad \text{Cette fonction n'a de valeur appréciable qu'autour de } v=0 \\
 F_1 &\approx -\frac{1}{\pi\sqrt{A/2}} G(D - A)
 \end{aligned} \tag{A.26}$$

Finalement on a l'expression du décalage relatif en fréquence dans le cas où la pointe est proche de la surface (A.27). Cette formule est très différente du cas où l'amplitude d'oscillation est très faible et/ou loin de la surface (A.28). On constate que l'expression du décalage dépend peu de l'expression exacte des différentes forces. Les résultats qualitatifs sont conservés. Seul compte l'allure des courbes de force (cas attractif – répulsif, ordre de grandeur des forces, position du minimum,...).

| | | |
|--------|---|---|
| (A.27) | $\Delta u \approx \frac{1}{k\pi A^{3/2} \sqrt{2}} G(D - A)$ | $\begin{cases} \text{Près de la surface } (< 10\text{nm}) \\ D - A : \text{altitude minimale de la pointe} \end{cases}$ |
| (A.28) | $\Delta u \approx -\frac{1}{2k} \left(\frac{dF}{dx}\right)_{x=D}$ | Loin de la surface ou amplitude faible |

II.3. Cas répulsif

Avant de traiter le cas plus général de l'interaction présentant une composante attractive à longue distance et une composante répulsive à courte distance, nous allons étudier le cas de la répulsion pure. L'allure de la force pointe surface en fonction de la distance est donnée sur la figure A.07. Nous traiterons également l'influence des phénomènes de dissipation. Nous étudierons la stabilité des différents états de l'oscillateur.

II.3.1. Construction des courbes de résonance

Dans le cas d'une force purement répulsive, on peut construire point par point comme indiqué ci-dessus la nouvelle courbe de résonance.

Pour construire la courbe de résonance en présence de la force répulsive, on se fixe une amplitude d'oscillation. On peut calculer avec les formules () et () le décalage en fréquence et le nouveau facteur de qualité. On peut donc tracer la courbe de résonance décalée et amortie. Comme on travaille à amplitude constante on en déduit immédiatement (cf. figure A.08) la nouvelle fréquence et la nouvelle phase.

Dans la cas dissipatif (en pointillé sur la figure A.08), on peut constater un changement important de phase.

II.3.2. Stabilité des différents états de l'oscillateur

La courbe de résonance est fortement déformée dans le cas répulsif (cf. figure A.09). On constate à droite de la résonance ($u > 1$) que plusieurs états de l'oscillateur sont possibles pour une même fréquence de travail. Parmi les 3 états possibles, celui du milieu (cf. figure) est instable. On évitera au maximum de travailler à ces valeurs de la fréquence. En effet la possibilité de plusieurs états est à l'origine d'instabilité dans l'image qui se caractérise par un saut de phase et d'amplitude.

Pour montrer l'instabilité de l'état intermédiaire (cf. figure A.09), on peut diminuer ou augmenter l'amplitude d'oscillation. La figure A.09 illustre le raisonnement dans le cas où l'amplitude diminue. Dans ce cas, le décalage en fréquence est moins important. Cela implique une diminution supplémentaire de l'amplitude et ainsi de suite jusqu'à atteindre l'état du bas. Le raisonnement lorsque l'amplitude augmente.

II.3.3. Courbe d'approche – retrait

On peut déduire des courbes de résonance les courbes d'approche-retrait en mode tapping (cf. figure A.10). La courbe est obtenue à fréquence constante. Les cas dissipatif et non dissipatif donnent à peu près la même courbe en amplitude. En revanche la valeur de la phase diminue fortement en présence de dissipation. On notera que la phase est toujours supérieure à -90° . En d'autres termes, la pointe est en phase plus ou moins quelques degrés avec l'excitation du piezo. Le fait que la phase soit au-dessus de -90° est une signature de force répulsive entre la pointe et la surface. Lorsque la dissipation devient très importante, la phase tend vers 90° . Ce phénomène peut s'observer sur l'évolution de la phase en fonction de u . La courbe se rapproche de -90° lorsque la dissipation augmente. En choisissant une fréquence de travail au dessus de la fréquence de résonance ($u > 1$), on pourrait mettre en évidence une hystérésis entre l'approche et le retrait de la pointe. Cet effet n'est pas présenté car on ne se place « jamais » dans ces conditions pour imager.

Afin de clore cette section, on notera que les courbes d'approche retrait en ne tenant compte que des forces répulsives fournissent déjà un certain nombre d'informations. sur l'importance de la dissipation et sur le caractère répulsif dominant ($\varphi > -90^\circ$) ou attractif ($\varphi < -90^\circ$, cf. section suivante).

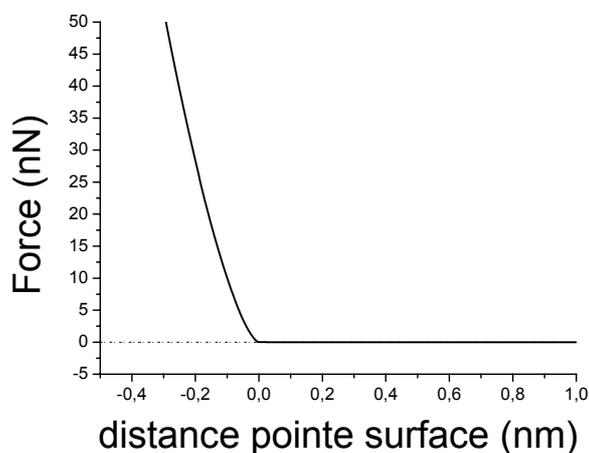
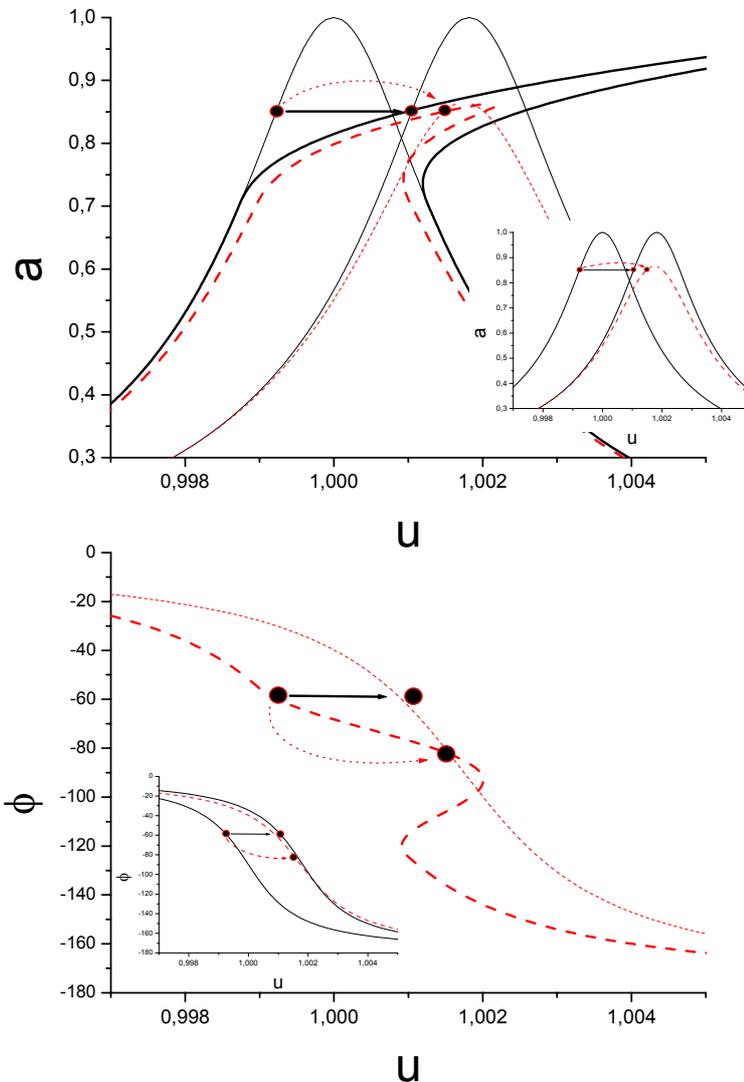


Figure A.07 : Allure typique de la force répulsive pure. On modélise la force par le modèle de Hertz. La force d'interaction est de l'ordre de la dizaine de nN pour un déplacement d'une fraction de nm. $F_1 < 0$ entraînant un décalage de la courbe de résonance vers les hautes fréquences. Lors du contact se rajoute des forces viscoélastiques qui s'opposent au mouvement de la pointe.



Construction de la nouvelle courbe de résonance point par point.

1. Choisir une amplitude.
2. Calculer les coefficients F_1 et F'_1 à partir de l'expression de la force.
3. Calculer Δu et Q' et tracer la courbe de résonance décalée et amortie (cf. insert).
4. Comme on s'est fixée l'amplitude, on en déduit la nouvelle fréquence.
5. Connaissant u , on en déduit la phase.

Figure A.08 : Déformation de la courbe de résonance dans le cas répulsif. Pour simplifier, le contact intermittent avec la surface borne l'amplitude d'oscillation (la surface est indiquée en pointillée). Le levier réagit à cette force par un décalage en fréquence de la courbe de résonance et de la courbe de phase. La force de contact augmente avec le décalage en fréquence. Le cas dissipatif est indiqué en trait gras pointillé. La dissipation a pour effet de réduire la courbe de résonance. On peut constater qu'un changement d'allure assez mineur pour l'amplitude provoque des variations de phase importante. Le côté droit de la résonance peut être sujet à des instabilités puisque plusieurs états de l'oscillateur sont possibles pour une même fréquence.

On illustre également comment construire la nouvelle courbe de résonance point par point. Pour chaque amplitude, il y a un décalage en fréquence et un amortissement différent. Cela explique cette déformation particulière de la courbe de résonance. Pour tracer la nouvelle courbe de résonance, on se fixe une amplitude, on calcule le décalage en fréquence et l'amortissement. On trace alors (cf. insert ou en trait fin sur la figure) les deux nouvelles courbes de résonance et de phase. Comme on s'est fixé l'amplitude, on en déduit les nouveaux points de la courbe en amplitude et en phase. Pour obtenir la courbe complète, il faut répéter l'opération pour toutes les amplitudes.

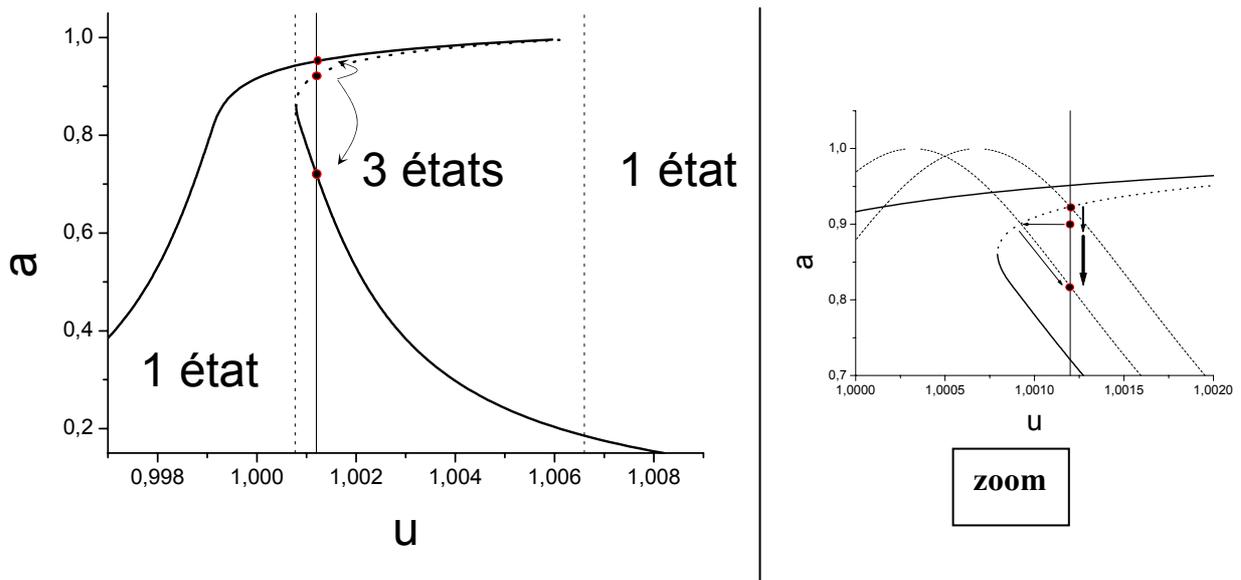
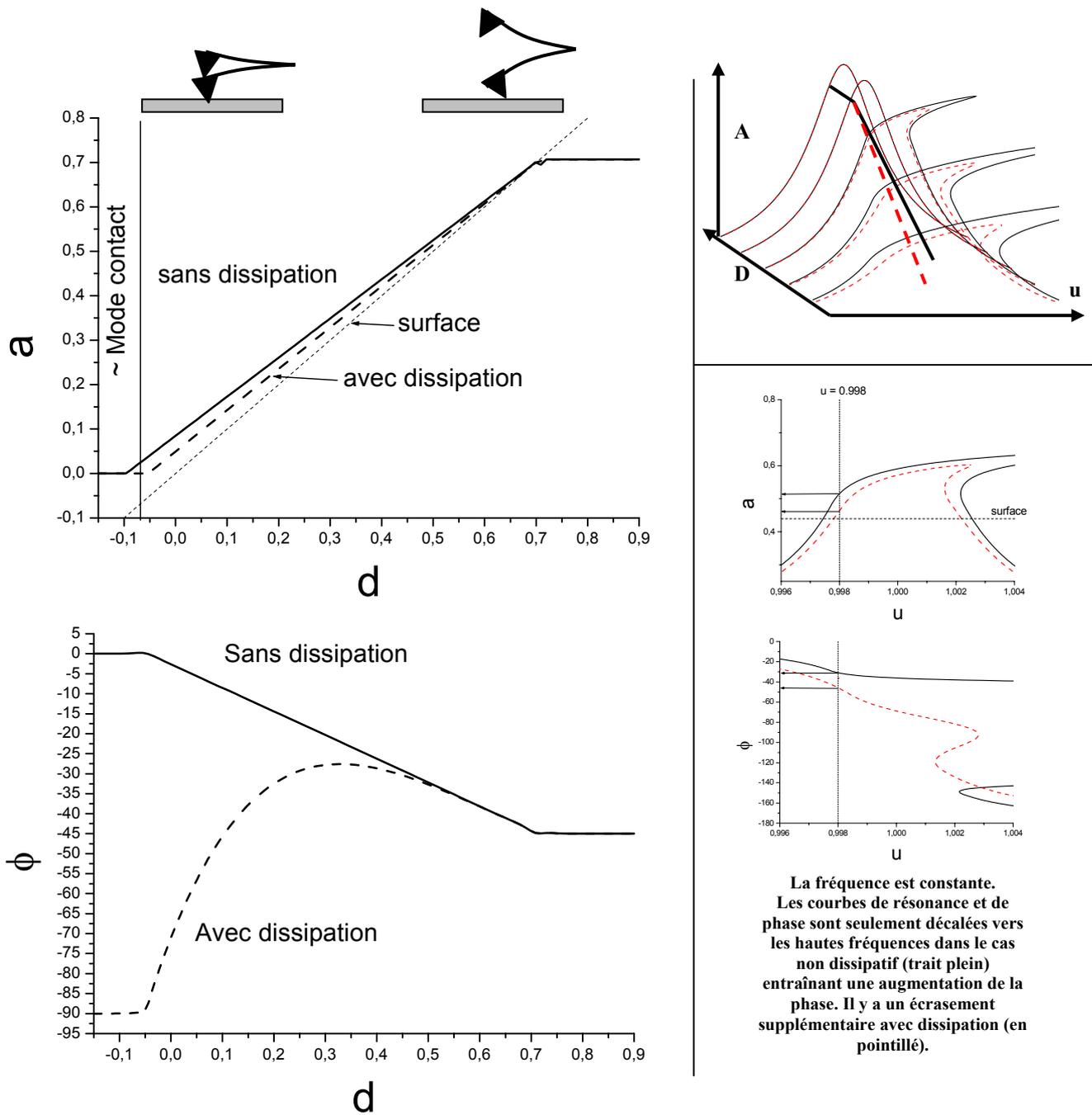


Figure A.09 : Détermination des branches stables et instables de la courbe de résonance. Pour tester la stabilité on peut (cf. zoom à droite) diminuer (augmenter) l'amplitude d'une petite quantité. Le point de fonctionnement est à u constant. Le décalage en fréquence correspondant décale la courbe de résonance (en pointillé) vers les basses (hautes) fréquences, entraînant une nouvelle baisse (augmentation) de l'amplitude. Le point du milieu est donc instable. Les deux autres points sont stables. La branche instable est indiquée en pointillé.



La fréquence est constante.
 Les courbes de résonance et de phase sont seulement décalées vers les hautes fréquences dans le cas non dissipatif (trait plein) entraînant une augmentation de la phase. Il y a un écrasement supplémentaire avec dissipation (en pointillé).

Figure A.10 : *Forme* typique d'une courbe approche retrait dans l'hypothèse d'une force répulsive pour une fréquence donnée. L'amplitude et la distance à la surface sont représentées sous forme réduite par rapport à l'amplitude maximale de la courbe de résonance A_0 . On notera la grande différence entre le cas dissipatif (en pointillé) et non dissipatif (trait plein) pour la phase alors que l'amplitude change à peine. La courbe de résonance à droite explique l'augmentation du déphasage sans dissipation. Lorsque l'amplitude diminue, les courbes de résonance et de phase sont décalées vers les hautes fréquences sans déformation. On peut en déduire l'augmentation du déphasage. La pointe n'indente quasiment pas la surface. La courbe en pointillée sur le graphe $a=f(d)$ indique le niveau de la surface. L'amplitude finit par s'annuler. Lorsqu'on rapproche encore l'échantillon, le levier fléchit comme en mode contact. Lorsque la dissipation devient très importante on se rapproche de -90° .

II.4. Cas attractif

Dans certaines conditions, l'interaction entre la pointe et la surface peut être attractive (figure A.11). La force attractive entre la pointe et la surface peut avoir plusieurs origines : électrostatique (force capacitive, charge - charge, dipôle - charge, Van der Waals, ...), capillarité,...

Nous allons présenter dans cette section un résultat non intuitif : en présence d'une force purement attractive, la pointe ne touche jamais la surface. Même lorsque la surface se rapproche, l'amplitude d'oscillation peut tendre vers zéro sans qu'il n'y ait jamais contact. L'effet de ces forces est à peu près le même que pour les forces répulsives, sauf que le décalage est vers les basses fréquences. Néanmoins, le fait que ces forces soient à longue portée et puissent diverger lorsqu'on approche la surface, (le cas de la force de Van Der Waals), entraîne une déformation de la courbe de résonance, qui « penche » vers la gauche.

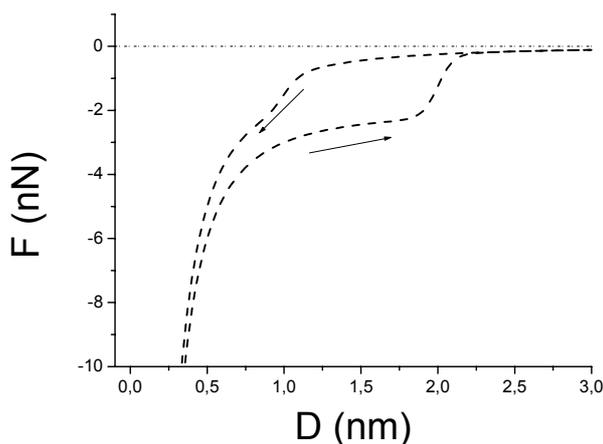


Figure A.11 : Allure typique d'une force d'interaction attractive. L'ordre de grandeur de la force est d'environ 1nN pour 1nm. Néanmoins elle peut être beaucoup plus importante selon les matériaux en présence, selon la présence ou non de charge, de dipôles électrostatiques,... En général la courbe de force en approche est au-dessus de la courbe de retrait. On représente en tiret l'effet d'une fine couche d'eau qui « capture » la pointe.

La formule (A.27) donne une dépendance du décalage en fréquence en $f(D-A)/A^{3/2}$. Dans le cas d'une force attractive la fonction f diverge lorsque $(D-A)$ tend vers 0 (équation A.29). Cette dépendance du décalage en fréquence qui diminue lorsque l'amplitude d'oscillation augmente a pour conséquence d'observer ou non un phénomène d'hystérésis dans les courbes d'approche retrait (cf. figure A.13).

Le décalage en fréquence est d'autant plus important que la raideur et/ou l'amplitude d'oscillation sont faibles. De même plus la force attractive est importante, plus le décalage sera important. La figure A.12 montre la déformation de la courbe de résonance avec et sans dissipation. On constate (encadré dans la figure A.12) que l'amplitude d'oscillation varie peu contrairement à la phase qui va augmenter avec la dissipation. Le film d'eau sur l'échantillon peut être à l'origine de la dissipation. C'est pour cela que les conditions d'imagerie en mode attractif se font dans des conditions contrôlées : sous vide, sous flux d'azote,...

$$\Delta u \approx \frac{f(D - A)}{kA^{3/2}} \quad \left\{ \begin{array}{l} D : \text{Distance entre la position moyenne} \\ \text{de la pointe et la surface.} \\ A : \text{Amplitude d'oscillation de la pointe} \\ f(D - A) \text{ diverge pour } A \rightarrow D \\ k = m\omega_0^2 : \text{raideur du levier} \end{array} \right. \quad (\text{A.29})$$

La figure A.12 représente les courbes de résonance déformées en amplitude et en phase pour des distances cantilever surface différente. On peut constater que dès que la pointe s'approche de la surface l'oscillation du levier est en opposition de phase avec l'excitation. Dit autrement, l'excitation s'oppose au mouvement de la pointe réduisant l'amplitude d'oscillation sans toucher la surface.

Selon le choix de la fréquence de travail on peut observer ou non une hystérésis. Il existe une fréquence limite ($u_c < 1$ sur la figure page suivante) telle qu'on ait une hystérésis en dessous ($u < u_c$) de cette fréquence mais pas au dessus ($u > u_c$). Par conséquent, on peut éviter ce phénomène d'hystérésis en rapprochant la fréquence de travail de la fréquence de résonance (u proche de 1, mais inférieur à 1). Enfin, est également illustré le fait que l'hystérésis disparaît (i.e. u_c diminue) lorsque l'amplitude et/ou la raideur du levier (de manière équivalente la pulsation propre de l'oscillateur) diminue et lorsque la force attractive est proportionnellement plus importante.

Enfin, La figure A.13 illustre un phénomène non intuitif. Lorsque le décalage en fréquence est petit, c'est à dire lorsque la force attractive est faible, on peut observer un phénomène d'hystérésis. La limite où l'interaction attractive tend vers zéro ne correspond pas au cas où elle est effectivement nulle (pas de force attractive).

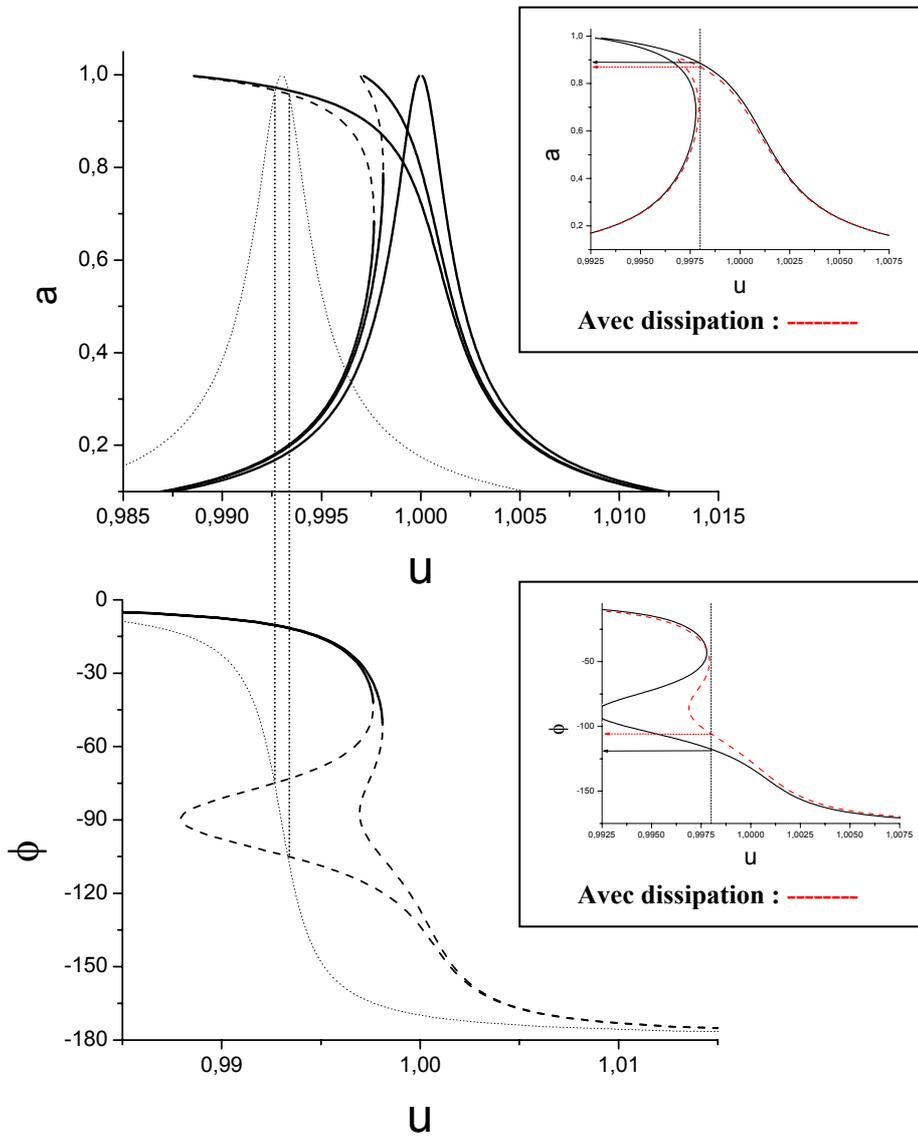


Figure A.12 : Courbes de résonance et de phase en fonction de la pulsation réduite pour différentes distances cantilever surface. Plus la surface est proche, plus la courbe de résonance est « penchée vers la gauche ». L'oscillateur peut occuper plusieurs états pour une même pulsation. Le décalage diverge lorsque la pointe finit par frôler la surface. On rappelle comment construire la nouvelle courbe de résonance à partir de celle de l'oscillateur harmonique (en pointillé) avec un décalage en fréquence (et un écrasement en présence de dissipation). Dans les encadrés est présenté l'effet de la dissipation. On voit que l'allure générale des courbes est conservée. Le maximum de l'amplitude est plus faible. La phase augmente avec la dissipation et se rapproche de -90° . Les branches instables sont indiquées en pointillées.

Annexe A

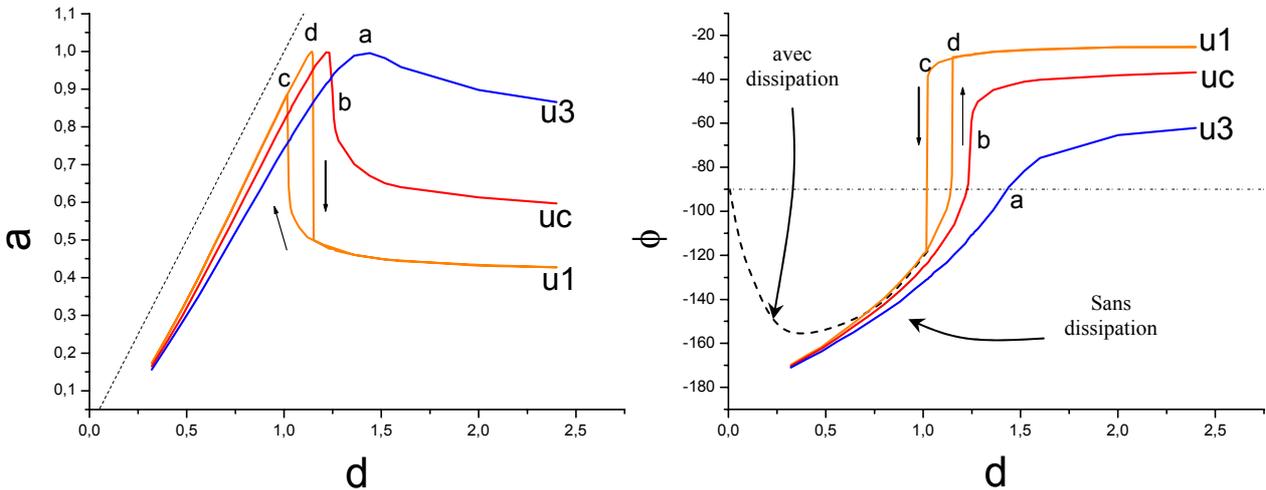
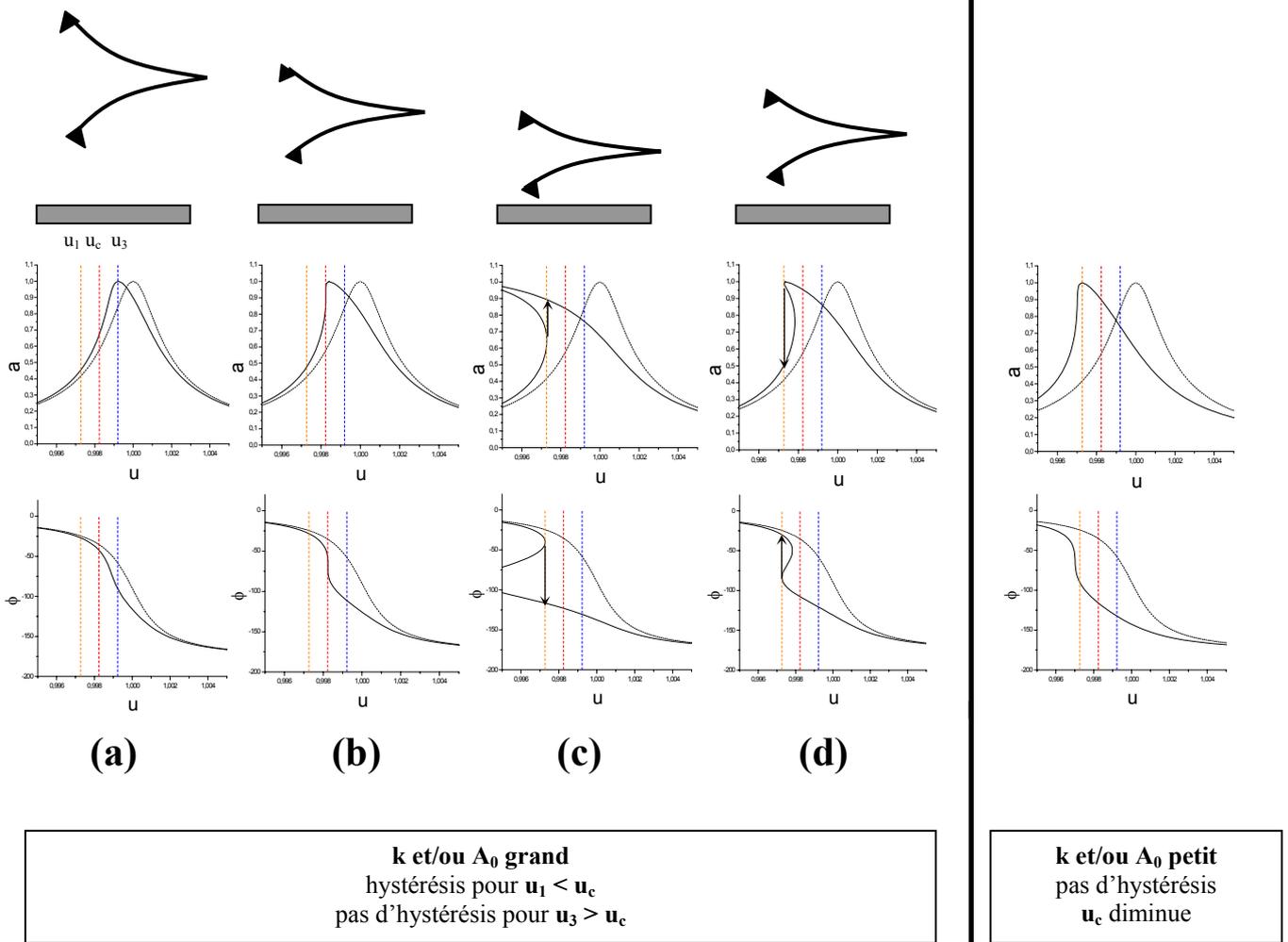


Figure A.13 : Courbes d'approche – retrait dans le cas d'une force attractive pour trois fréquences de travail u_1 , u_c et u_3 (en bas). On représente pour certaines distances (en a, b, c et d, au-dessus) les courbes correspondantes de résonance et de phase. On observe une hystérésis pour une pulsation en dessous d'une pulsation critique (u_c). On remarquera que l'amplitude diminue alors que la force est attractive et que la pointe ne touche jamais la surface (Les courbes $a=f(d)$ sont toutes en dessous de la courbe en pointillé qui représente la surface). Ce phénomène s'explique par le fait que la phase est inférieure à -90° . L'oscillation du levier est ralenti par l'excitation qui est quasiment en opposition de phase. Les courbes de résonance et de phase pour « A_0 et/ou k petit » montre qu'il n'y a pas d'hystérésis dans ce cas. En effet la pulsation critique en dessous de laquelle on n'observe une hystérésis diminue lorsque ces paramètres diminuent. En présence de dissipation les courbes d'approche-retrait en amplitude sont très peu modifiées. En revanche, la phase augmente jusqu'à atteindre -90° .

II.5. Cas répulsif – attractif

Les deux cas présentés ci-dessus sont des cas extrêmes puisque l'on n'est jamais réellement en force répulsive pure ou attractive pure. On peut néanmoins imaginer en mode attractif en se plaçant dans des conditions très particulières : sous vide, où le facteur de qualité Q peut atteindre des valeurs de l'ordre 10^5 .

La force d'interaction a l'allure indiquée par la figure A.14. Loin la force est attractive et devient répulsive lorsque l'on touche la surface.

On représente sur la figure A.15 la déformation des courbes de résonance. Par raison de clarté on ne représente pas l'effet des forces dissipatives. On retiendra que comme dans les deux cas précédents (attractif et répulsif pure), la dissipation entraîne un léger tassement de la courbe dont le maximum diminue, mais qui garde toujours la même allure. L'effet est le plus important sur la phase qui se rapproche de 90° . On se contente de donner sur les courbes d'approche-retrait (figure A.16) les branches correspondant au cas dissipatif et non dissipatif.

Loin de la surface, c'est les forces attractives qui prédominent, et donc la courbe de résonance est décalée vers les basses fréquences. Lorsque la pointe touche la surface, le décalage se fait vers les hautes fréquences puisque c'est la force répulsive qui prédomine alors.

On peut déduire de la déformation des courbes de résonance les courbes d'approche retrait de la même manière que sur la figure A.13. Les fréquences notées u_1 , u_2 , u_3 et u_4 correspondent sur les figures A.15 et A.16. Suivant la fréquence de travail, l'oscillateur va se retrouver en mode répulsif ou non-contact, voire les deux (cas u_2 sur la figure A.16). On distingue nettement sur les courbes de phase les deux branches : non contact (phase $< -90^\circ$) du cas intermittent (phase $> -90^\circ$). On constate que pour les fréquences proches de la résonance (u proche de 1. Cas u_3 et u_4), on ne touche pas la surface. Inversement, lorsqu'on est suffisamment en dessous de la résonance, on est en mode répulsif (cas u_1). Pour les fréquences intermédiaires (cas u_2), on passe du cas répulsif à non contact pour un même courbe d'approche retrait. On notera que l'on observe une hystérésis pour la plupart des courbes.

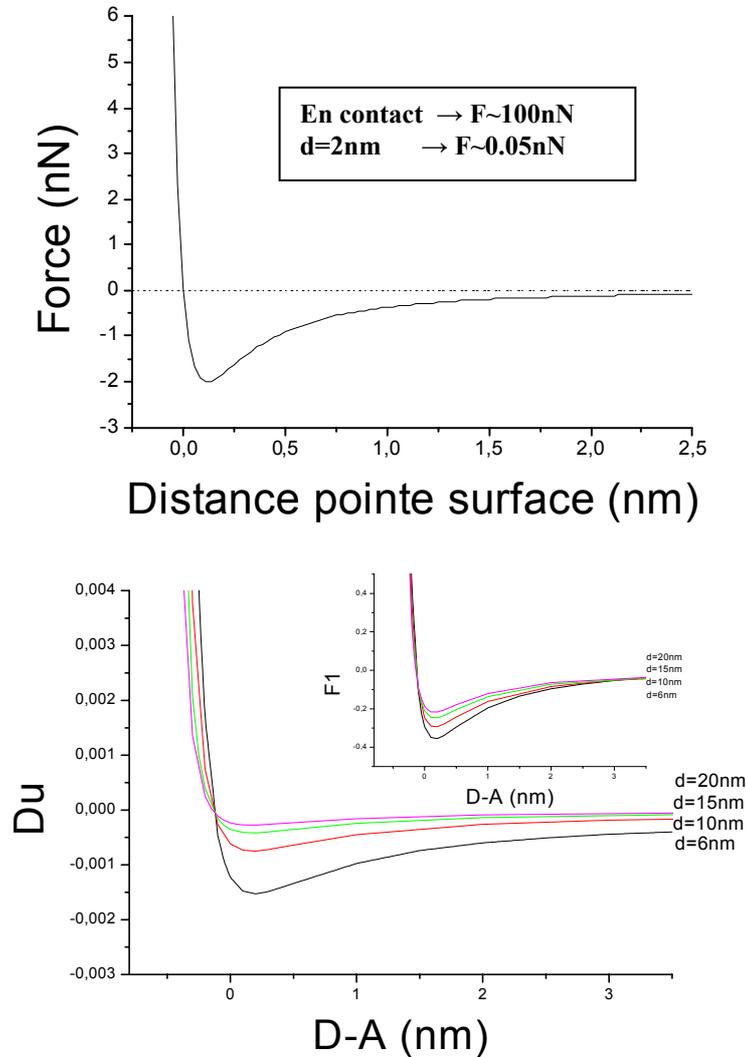


Figure A.14 : Représentation typique de la force d'interaction de la pointe avec la surface en fonction de la distance. Elle comporte une partie attractive et répulsive. La force attractive est de l'ordre de la fraction de nN à quelques nm de la surface, et de quelques dizaines de nN pour la force répulsive. Pour définir la surface on peut prendre l'endroit où la force s'annule. La courbe du dessous donne le décalage en fréquence en fonction de D-A pour différentes valeurs de D (6, 10, 15, 20nm). On notera la dépendance de Δu en $f(D-A)/A^{3/2} \cong f(D-A)/D^{3/2}$ pour D-A proche de zéro (i.e. A~D). On a inséré la dépendance en fonction de D-A de F_1 , la composante de Fourier du premier ordre de la force.

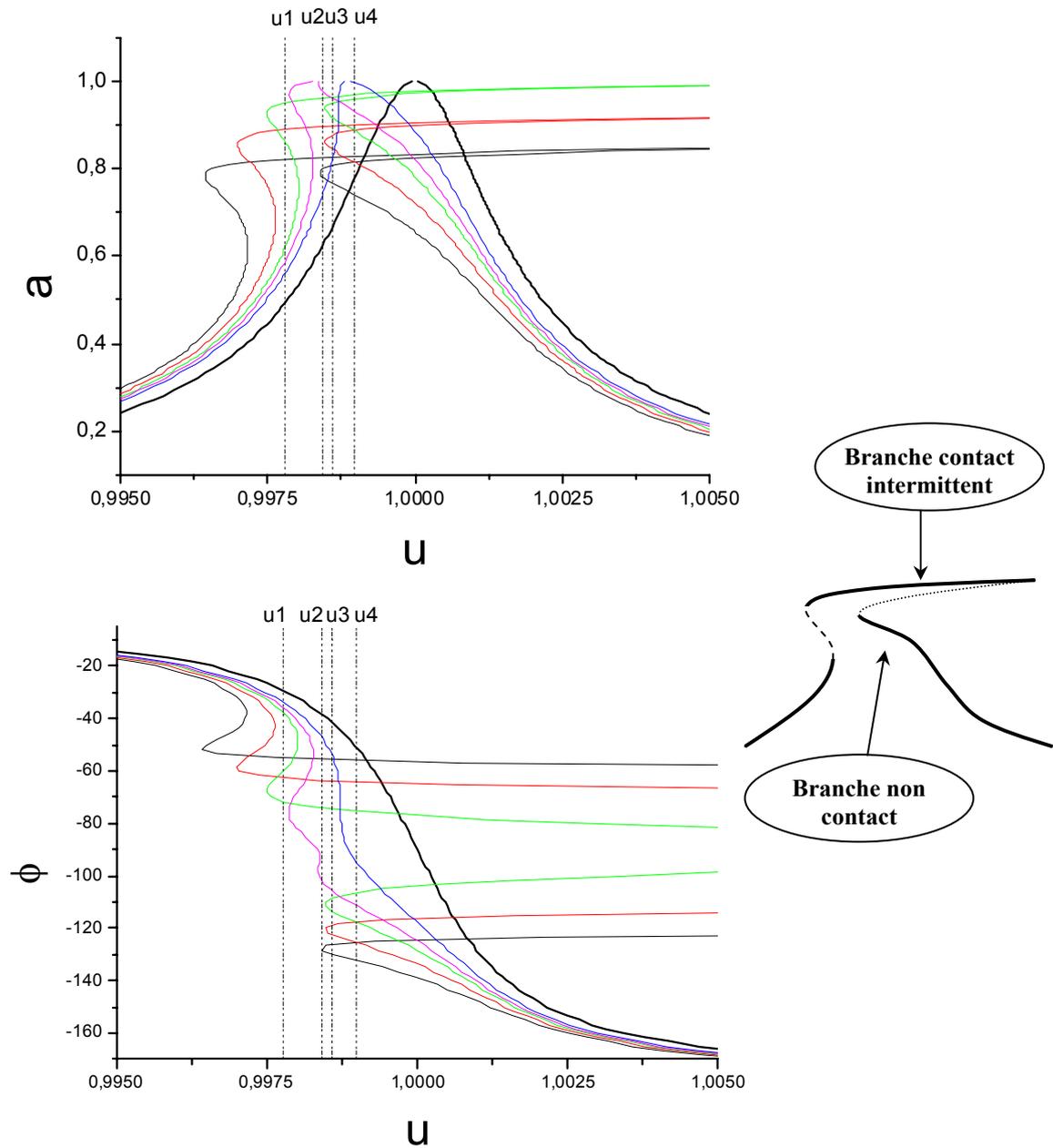


Figure A.15 : Déformation de la courbe de résonance et de phase dans le cas d'une force attractive et répulsive. Le sommet de la courbe est décalé vers les hautes fréquences, et le reste de la courbe plus ou moins décalée vers les basses fréquences. Le décalage en fréquence dépend essentiellement de la distance minimale entre la pointe et la surface ainsi que de l'amplitude d'oscillation à la puissance $-3/2$. Cela implique que plus la courbe est « écrasée », plus le décalage augmente (i.e. A diminue). On indique à droite la branche où la pointe touche la surface et la branche non contact où la pointe interagit avec la surface sans la touche (les branches instables sont en pointillé).

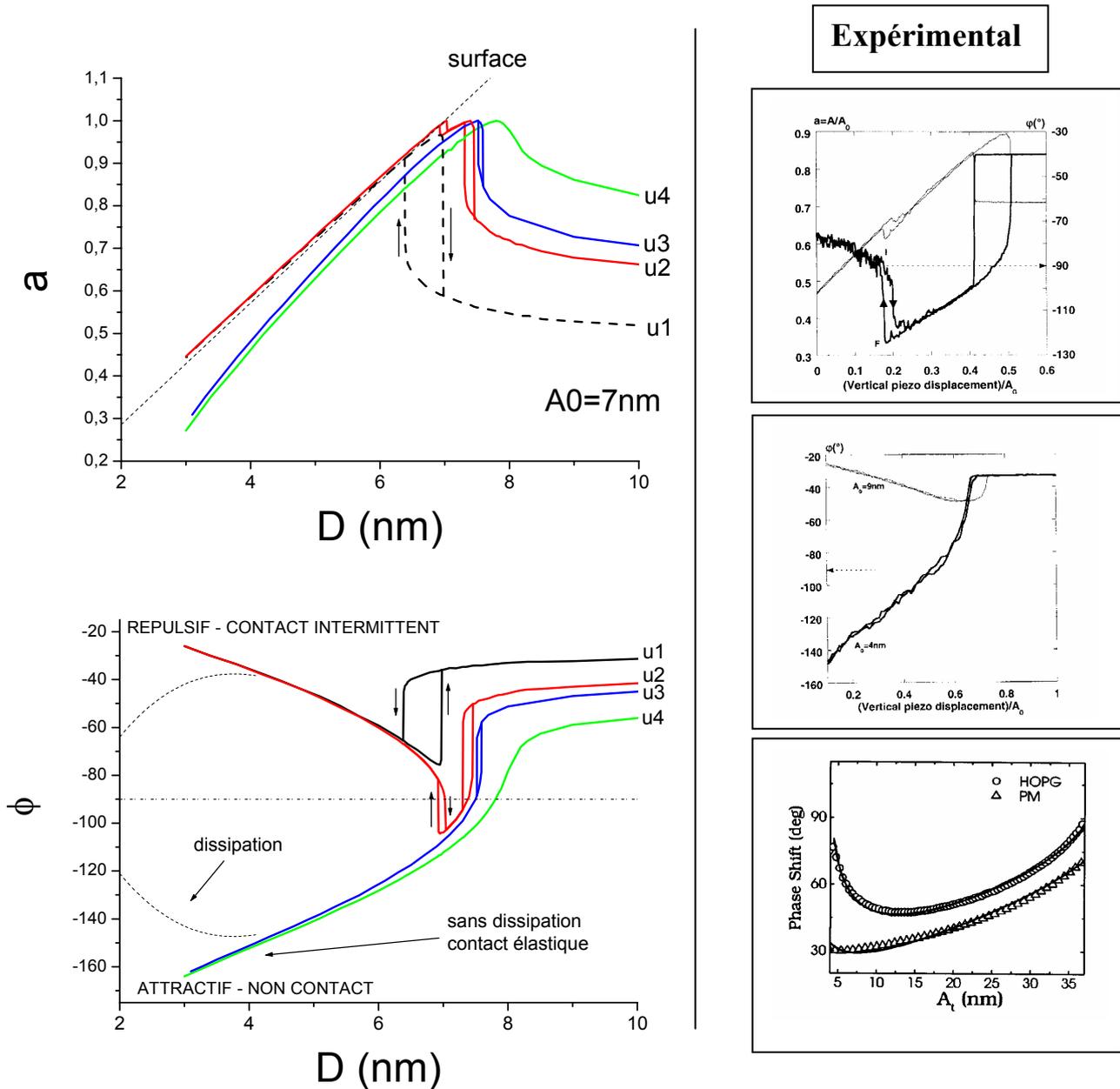


Figure A16 : Courbes d'approche – retrait théoriques (à gauche) et expérimentales (à droite) pour différentes fréquences de travail. La courbe du dessus a été obtenue sur une surface de silicium, celle du dessous sur une surface de mica d'après [Nony 1999] et la troisième sur du graphite (carré) et sur une membrane (triangle) d'après [Tomayo 1998]. Les comportements observés sont très variés. On peut distinguer deux régimes : attractif et répulsif. Dans le cas d'une force attractive, la seule façon pour le levier de se rapprocher de la surface sans la toucher alors que la force est attractive est d'être en opposition de phase (i.e. $\phi < -90^\circ$). La surface est représentée en pointillée pour la courbe du haut $a=f(D)$. On peut ainsi distinguer clairement le cas où la pointe touche la surface (cas u_1) du cas non contact (u_3 et u_4).

II.6. Calcul de l'énergie dissipée

En tapping mode il est possible de séparer la partie dissipation de la force de la partie élastique connaissant la phase et l'amplitude. On a constaté précédemment (de manière qualitative) qu'en présence de dissipation la phase se rapproche de -90° . Mais on peut calculer de façon exacte l'énergie dissipée et la force élastique en fonction de l'amplitude et de la phase mesurée pour une fréquence donnée. En effet, à partir de l'équation de la courbe de résonance et de phase (équations A.30), on a un système à deux équations deux inconnues : Q' et u' , connaissant a , Q et φ . On peut alors remonter à l'énergie dissipée et à la composante élastique de la force. $u' - u$ représente le décalage en fréquence de la courbe de résonance, et Q' le nouveau facteur de qualité dû à l'interaction pointe surface.

$$\left\{ \begin{array}{l} a = \frac{Q'/Q \frac{\omega_0^2}{\omega_1^2}}{\sqrt{Q'^2 (u'^2 - 1)^2 + u'^2}} \quad \text{avec } u' = \frac{\omega}{\omega_1} = u \frac{\omega_0}{\omega_1} \\ \tan(\varphi) = \frac{u'}{Q'(u'^2 - 1)} \end{array} \right. \quad (\text{A.30})$$

On peut facilement exprimer u' en fonction de la phase et de l'amplitude réduite. On arrive ensuite à l'équation A.31 qui donne l'énergie de dissipation directement en fonction des paramètres connus : a (*amplitude réduite*), A_0 (*maximum de la courbe de résonance*), Q (*facteur de qualité*), u (*fréquence de travail réduite*). Pour arriver à ce résultat, on se sert de l'expression A.22 qui donne Q' en fonction de Q et $F'_1 = \pi a A_0 E_d$ (*coefficient d'ordre 1 en sinus du développement de Fourier de la force*) qui est directement relié à l'énergie dissipée par période. On donne également la variation de la raideur du levier (équation A.32) en fonction des mêmes paramètres : $\Delta k = F_1/A$ (F_1 est le coefficient d'ordre 1 en cosinus du développement de Fourier de la force).

$$\frac{E_d Q}{k \pi A_0^2 a} = -(\sin(\varphi) + au) \quad (\text{A.31})$$

$$\Delta k = -k \left(u^2 + \frac{\cos(\varphi)}{Qa} - 1 \right) \quad (\text{A.32})$$

L'effet de la dissipation sur les courbes d'approche-retrait en phase est indiqué sur la figure A.16. En mode intermittent ou en mode non contact, la phase se rapproche de -90° lorsque l'amplitude tend vers zéro. Dans le cas non dissipatif on retrouve les deux branches qui tendent respectivement vers 0° en tapping et -180° en non contact.

Il y a une limitation à ces formules. En général le spectre d'un cantilever n'est pas aussi parfait que ceux présentés jusqu'à présent. Il peut y avoir plusieurs pics de résonance, des pulsations où l'amplitude est nulle (antirésonance). Dans ce cas, on travaille au niveau du pic le plus important. Les comportements qualitatifs sont conservés, en revanche, plus on va s'éloigner de la fréquence de résonance ou être dans le cas de fort amortissement, plus les formules ci-dessus seront prises en défaut.

Annexe B

Corrélation phase – hauteur sur quelques échantillons

I. Introduction

Cette annexe présente quelques images AFM en mode tapping où les hauteurs que l'on mesure posent problème et semblent corrélées à l'image de phase.

On met en évidence cette corrélation dans le cas de l'échantillon où on a déposé du pentacène sur l'ADN. En effet d'une ligne à l'autre de l'image, le comportement de la pointe sur l'ADN n'a pas donné le même résultat. C'est en comparant la phase et la topographie entre ces différents lignes qu'on arrive à dégager une corrélation entre ces deux données.

II. Cas du silane OTS

II.1. Image de phase

Sur une série d'échantillons terminé méthyle, nous avons mesuré une hauteur de l'ADN toujours supérieure à 3nm. De plus on n'arrive pas à distinguer sur ces images le nombre de brins qu'il y a dans les cordes (cf. figure B.01). Cette hauteur de 3nm pour l'ADN n'est pas en accord avec celle qu'on a mesuré sur les autres échantillons silanisés OTS.

De plus la phase sur l'ADN est inférieure de 20° par rapport à la surface environnante.

II.2. Hauteur en fonction du temps

Sur ces échantillons nous avons mesuré l'évolution de la hauteur de l'ADN en fonction du temps. On constate (cf. figure B.01) que la hauteur de l'ADN diminue avec le temps. On passe d'une hauteur de 4nm à 3nm en 1 heure.

III. Cas du pentacène

III.1. Dépôt de pentacène sur l'ADN

Nous avons observé un effet similaire à l'échantillon précédent (partie II.) sur un autre échantillon où la phase diminue fortement sur l'ADN.

L'échantillon en question est une surface terminée amine sur laquelle on a déposé de l'ADN. Nous avons ensuite évaporé une fine couche de pentacène.

Il est fort probable que le pentacène se place de part et d'autre de l'ADN. En effet la hauteur des cordes d'ADN (qui ne donne pas de creux en phase) au niveau des îlots de pentacène est plus petite d'environ 1.5nm (la hauteur d'un plan moléculaire du cristal de pentacène) par rapport à l'ADN sur la surface amine sans pentacène (cf. figure B.05). De plus, on peut constater sur la figure B.02 que les grains de pentacène sont délimités partiellement par les molécules d'ADN. L'ADN forme un obstacle pour le pentacène qui se place d'un côté ou de l'autre de la molécule.

On peut constater que la phase diminue sur l'ADN uniquement au niveau des grains de pentacène (cf. figure B.02). Cet effet est le plus net sur la corde la plus importante de l'image.

Si on trace la phase mesurée sur l'ADN en fonction de sa hauteur on observe une corrélation entre ces deux valeurs.

III.2. Corrélation phase - hauteur

III.2.1. Sur la surface terminée amine

Les profils de topographie et de phase sont indiqués sur la figure B.02 dans le cas de l'ADN directement posé sur la surface terminée amine. Pour chaque ligne de l'image, on repère le minimum de la phase, la hauteur de la corde de l'ADN et la phase correspondante au maximum en topographie de l'ADN (cf. figure B.02).

On trace sur les figures B.03 et B.04 les deux valeurs de la phase obtenues pour chaque ligne de l'image, en fonction de la hauteur de l'ADN.

On peut constater une dispersion d'environ 0.5nm sur la hauteur de la corde d'ADN. En revanche le minimum de phase et la phase correspondant au maximum en topographie sont indépendants de la hauteur.

III.2.2. Sur le pentacène

On fait la même chose que pour l'ADN mais cette fois – ci sur les grains de pentacène. Dans ce cas, on voit clairement une dépendance entre la phase et la hauteur mesurée (cf. figures B.03 et B.04). On observe le même niveau de dispersion pour les hauteurs que dans le cas de l'ADN sur la surface terminée amine.

Cette dépendance est la plus nette entre le minimum de la phase et la hauteur de la corde d'ADN (cf. figure B.03 en b) et B.04 en b)).

IV. Interprétation

Dans le cas de la surface terminée méthyle on peut interpréter la diminution de la hauteur de la molécule par une déshydratation progressive de la molécule. On peut donc supposer raisonnablement que l'ADN est entouré d'une couche d'eau. Nous n'avons pas enregistré la phase pour toutes les images en fonction du temps (cf. figure B.01). Néanmoins sur les deux images où nous l'avons enregistrée, le creux en phase sur l'ADN ne varie pas.

Nous avons également observé sur deux type d'échantillon (surface terminée méthyle et pentacène) une forte diminution de phase sur l'ADN.

Nous avons pu mettre en évidence une corrélation entre la phase et la hauteur de la corde d'ADN.

L'origine de ce phénomène est certainement lié au contraste entre l'ADN qui est hydrophile et le pentacène ou la surface terminée méthyle qui sont hydrophobes.

Le modèle que l'on peut proposer dans le cas de l'échantillon avec du pentacène sur l'ADN est que le pentacène ne se dépose pas sur l'ADN mais à coté. On a discuté ce point au III.2.1.

Ainsi, la variation de phase sur l'ADN peut s'expliquer par la **présence d'une couche d'eau plus ou moins importante au niveau de l'ADN (Notre Hypothèse)**. Par conséquent le creux en phase que l'on observe peut être interprété par de la dissipation dans la couche d'eau qui se trouve sur l'ADN.

Cas 1 : Dans le cas où la phase ne varie pas sur l'ADN, cela signifie d'après **notre hypothèse** qu'il n'y a pas d'eau sur l'ADN, et la topographie qu'on mesure correspond à la surface de l'ADN (cf. figure B.06).

Cas 2 : Dans le cas où la phase donne un creux sur l'ADN, on doit avoir d'après **notre hypothèse** une couche d'hydratation importante dont la hauteur peut aller jusqu'à 2 à 3nm (cf. figure B.06). Cette valeur de 2 à 3nm correspond à la différence entre la hauteur de l'ADN sans variation de phase (cas 1) et avec variation de phase (cas 2) (cf. figures B.03 et B.04).

V. Conclusion

On propose dans cette annexe une explication de la hauteur très importante de l'ADN mesurée sur certaines surfaces hydrophobes.

On interprète la hauteur mesurée par la présence autour de l'ADN d'une couche d'hydratation importante (de l'ordre de 2nm).

Nous ne présentons dans cette annexe que quelques images où on a observé ce phénomène. Il nous faudra pour confirmer notre hypothèse effectuer des mesures sur d'autres surfaces hydrophobes (Fluorée, terminée vinyle, ...).

De plus, si notre la présence d'eau joue un rôle, on devrait observer une variation de hauteur si on déseche l'échantillon (par un séjour sous vide, sous atmosphère d'azote, ...).

Enfin, pour étudier à l'AFM ces variations de phase il faut trouver les conditions d'imagerie les plus favorables. En particulier les images qu'on a présentées sont faites avec une vitesse un peu trop grande puisque les profils de phase qu'on observe sur la figure B.02 sont typiques de régime transitoire. La situation la plus défavorable serait d'avoir une dépendance vis-à-vis du traitement de surface de la pointe. Dans ce cas il faut compter sur la chance pour avoir une bonne pointe car on ne maîtrise pas la pollution de la pointe au cours de l'imagerie.

On remarquer que dans le cas de la surface terminée méthyle, la hauteur de l'ADN est de 3nm alors qu'on attend 1nm (cf. chapitre III). Si on considère une couche d'hydratation de 2nm et qu'on les retire au 3nm, on arrive à la valeur attendue de 1nm. Cette observation va dans le sens de notre hypothèse.

Enfin on terminera par le fait que l'ADN déposé sur du pentacène ne donne pas de variation de phase. On peut supposer dans ce cas qu'il y a une différence de structure de l'ADN. Peut être l'ADN sur le pentacène est dans une forme déshydratée. Dans ce cas, on n'aura pas de dissipation par l'eau et donc pas de signal en phase,...

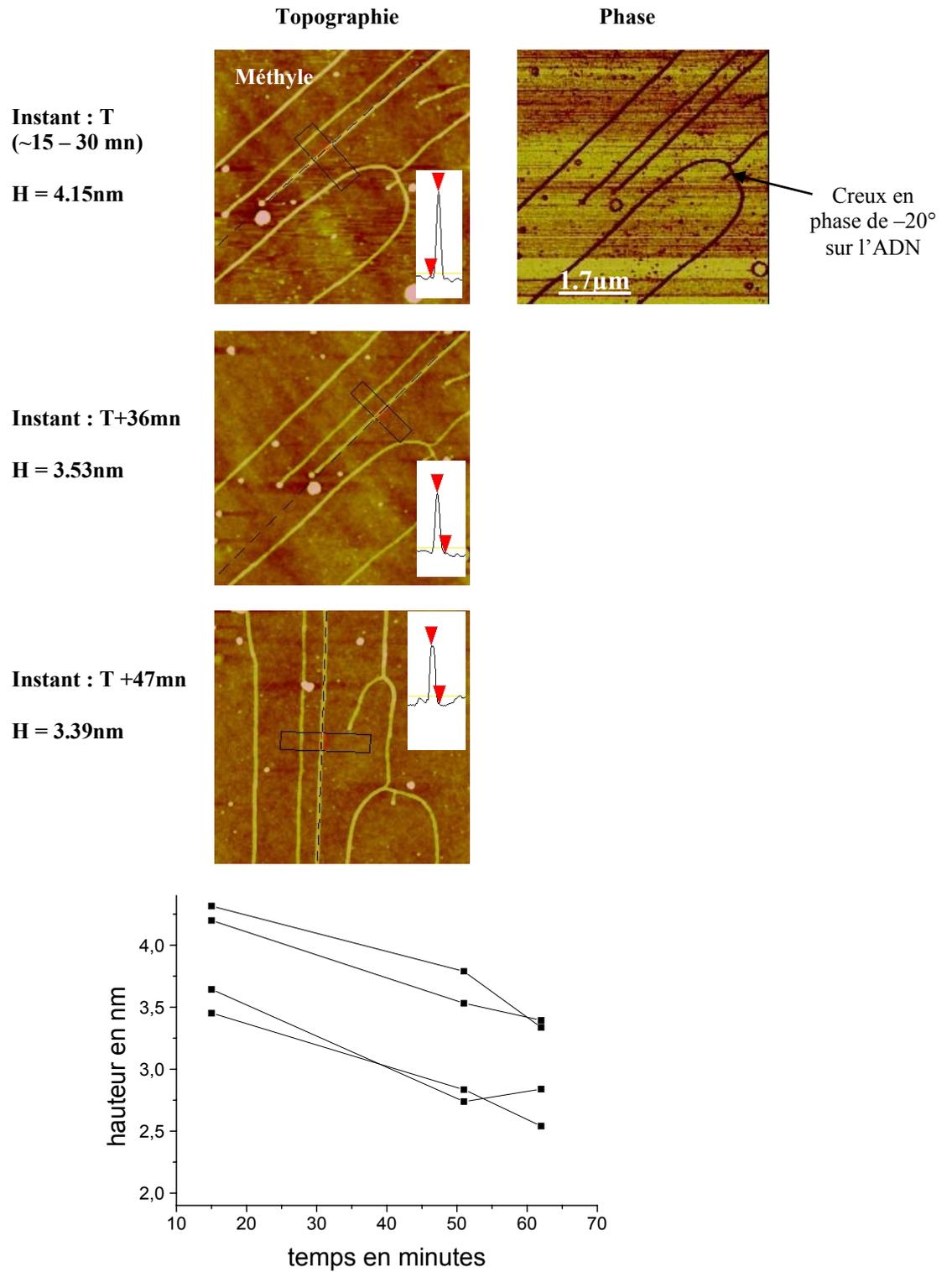
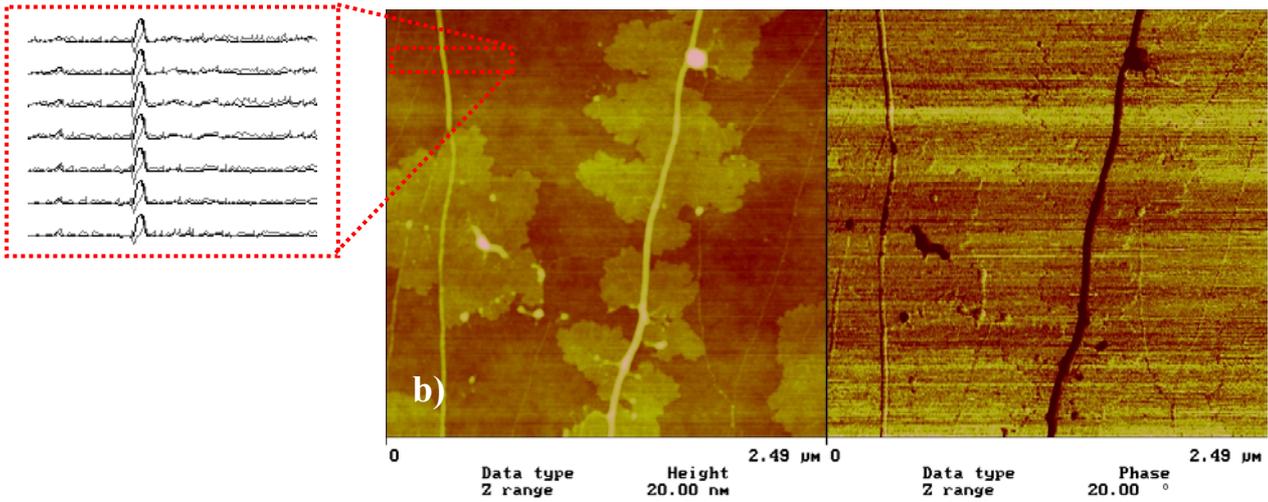


Figure B.01 : variation de la hauteur de l'ADN fraîchement déposé sur une surface méthyle en fonction du temps.

a)



c)

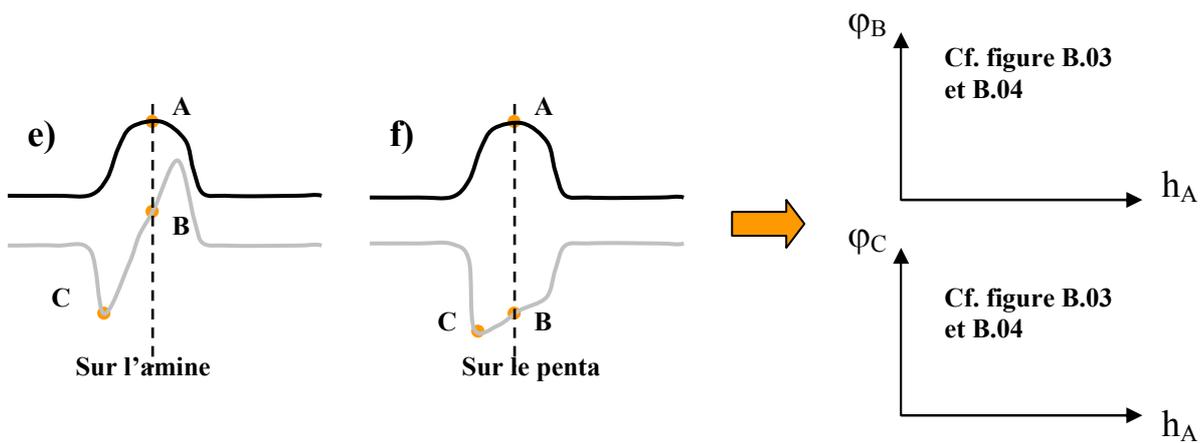
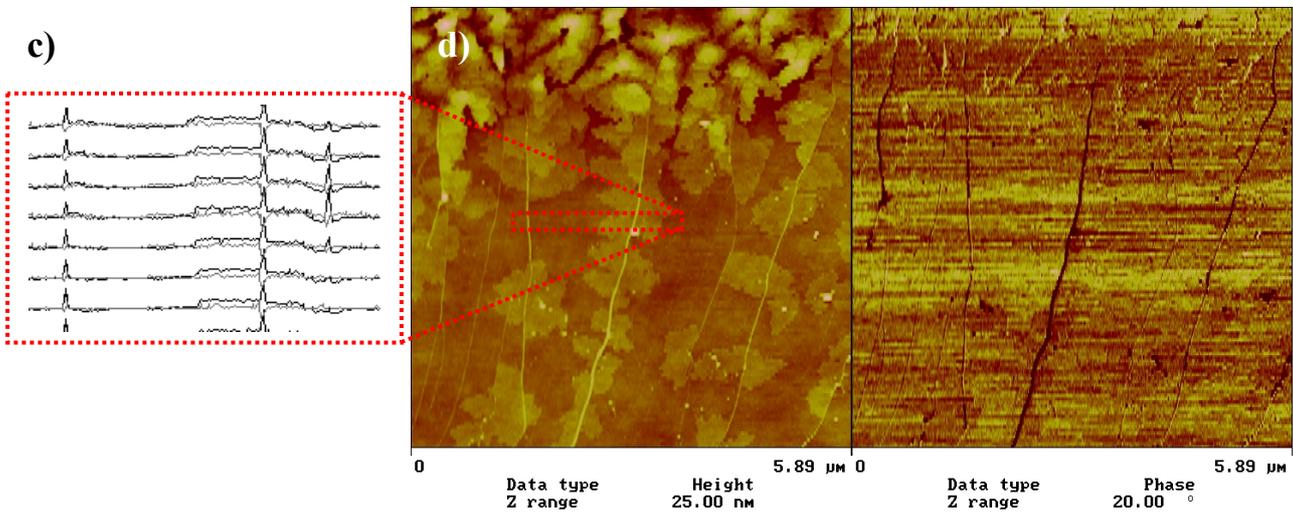


Figure B.02 : ADN déposé sur une surface amine et recouvert partiellement avec du pentacène. Nous avons obtenu deux images (en b) et d)). On donne quelques profils en topographie et en phase pour chaque image pour l'ADN sur la surface terminée amine en a) et sur l'îlot de pentacène en c). Le trait en gris correspond à la phase, et en noir à la topographie. Les profils sur l'ADN donne un creux en phase (en f)), alors que sur la surface terminée amine on a une variation du type donnée en e). On déduit à partir de la phase en B et C, et de la hauteur en A les figures B.03 et B.04.

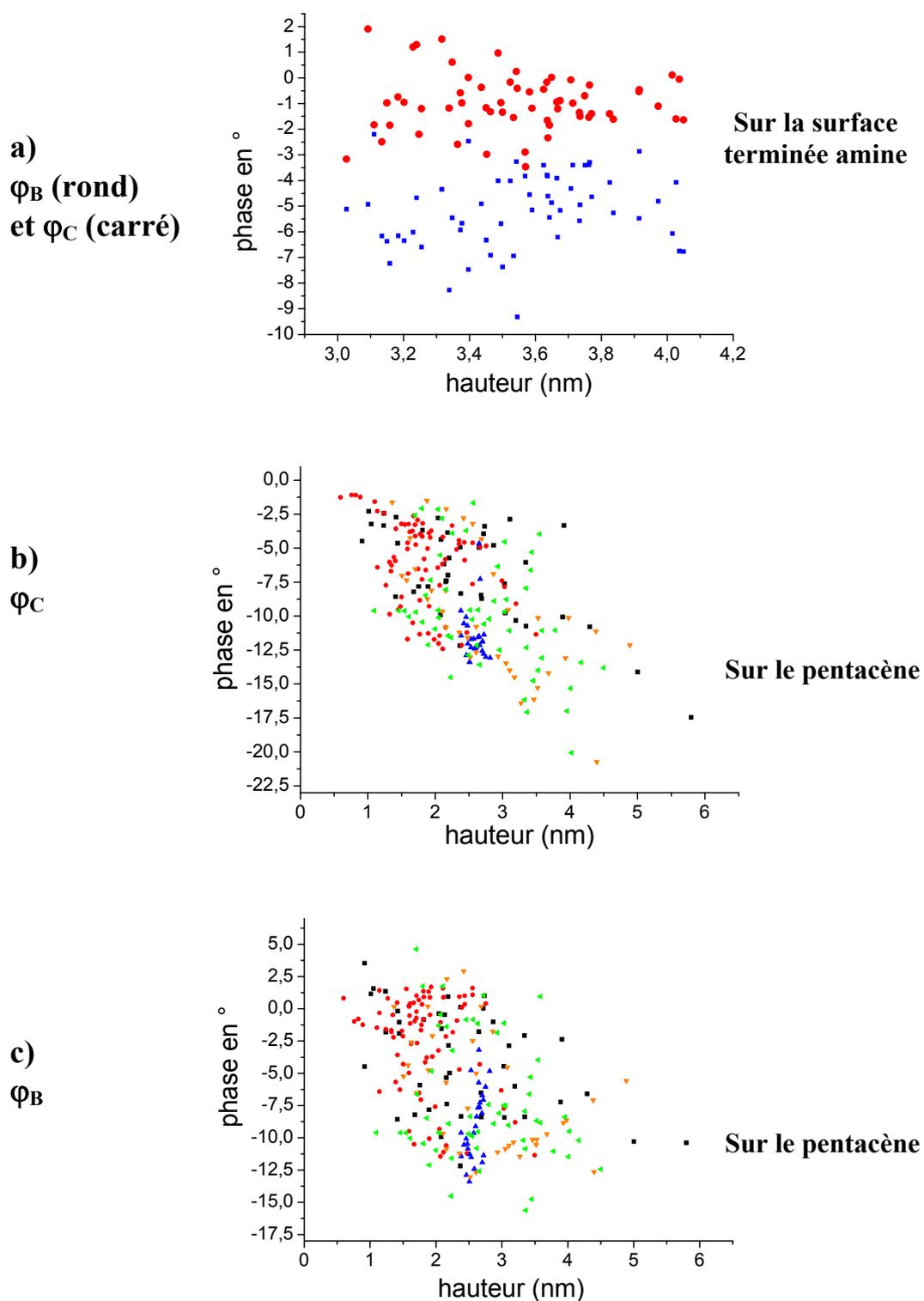


Figure B.03 : Phase en fonction de la hauteur de l'ADN. Chaque point correspond à la mesure sur une ligne de l'image en d) de la figure B.02. Chaque symbole correspond à un îlot de pentacène différent de l'image. En a), φ_B (rond) et φ_C (carré) en fonction de h_A sur la surface terminée amine (les notations sont celles de la figure B.02). En b) φ_C en fonction de h_A sur le pentacène. En c) φ_B en fonction de h_A sur le pentacène.

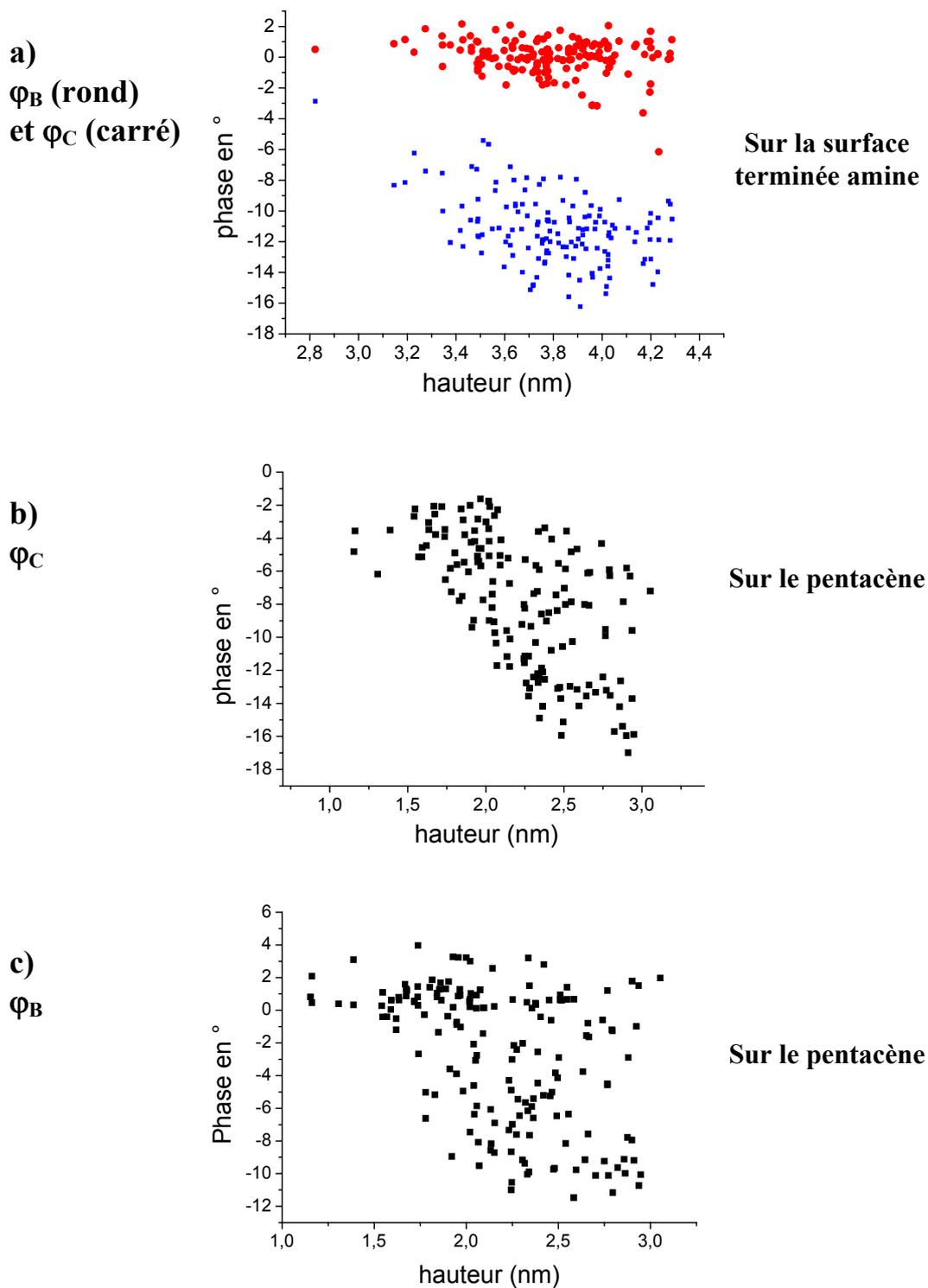


Figure B.04 : Phase en fonction de la hauteur de l'ADN. Chaque point correspond à la mesure sur une ligne de l'image en b) de la figure B.02. En a), φ_B (rond) et φ_C (carré) en fonction de h_A sur la surface terminée amine (les notations sont celles de la figure B.02). En b) φ_C en fonction de h_A sur le pentacène. En c) φ_B en fonction de h_A sur le pentacène.

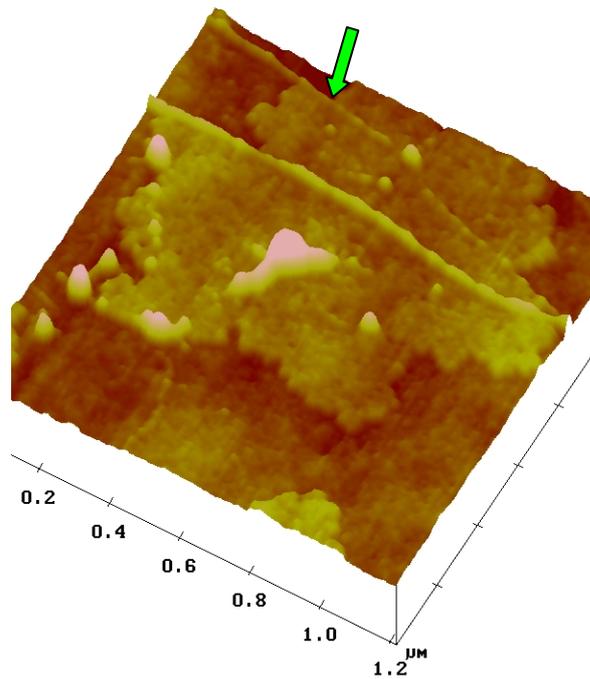


Figure B.05 : Cordes d'ADN recouverte partiellement de pentacène. La corde indiquée par la flèche est entourée de pentacène. Le pentacène ne se dépose pas sur l'ADN mais à côté. On ne peut observer cet effet que sur les cordes d'ADN qui ne donne pas de variation de signal en phase comme c'est le cas pour la corde d'ADN indiquée par la flèche.

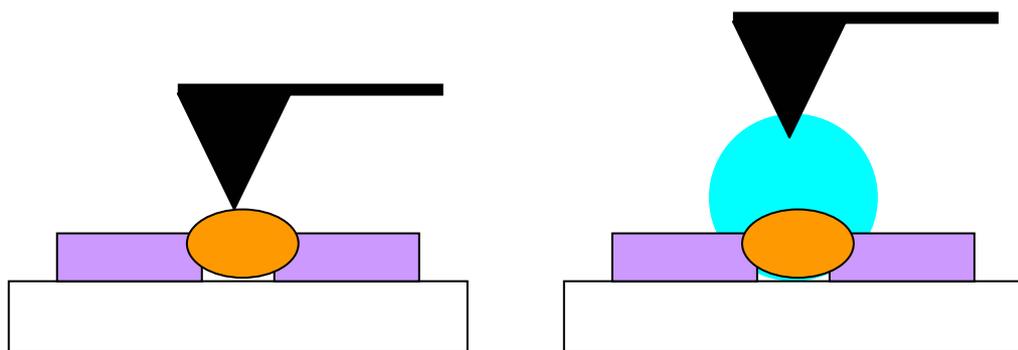
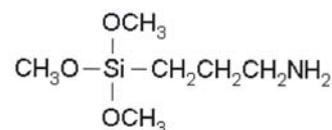


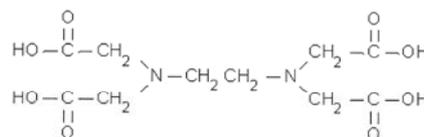
Figure B.06 : Modèle du cas 1 et du cas 2 présenté dans le texte. Dans le cas 1 la molécule est peu hydratée et la pointe de l'AFM image le brin d'ADN. Dans le cas 2, l'ADN est recouvert d'une couche d'eau. La pointe dissipe de l'énergie dans la couche d'eau. La hauteur que l'on mesure est environ celle de la couche d'hydratation. La couche d'hydratation est certainement indentée par la pointe.

Annexe C

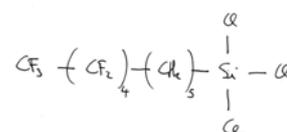
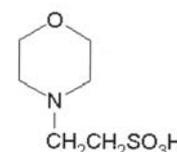
3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) [13822-56-5]



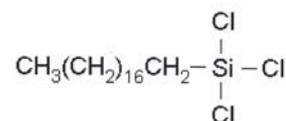
EDTA [60-00-4]



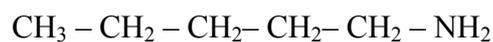
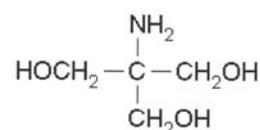
1H,1H,2H,2H,perfluorodecyltrichlorosilane [78560-44-8]

MES : (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid) (forme acide)
[145224-94-8] pKa = 6.1

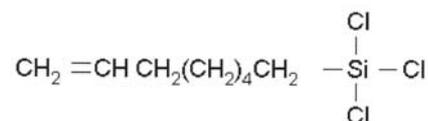
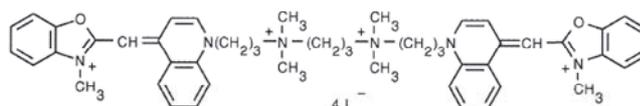
Octadecyltrichlorosilane (OTS) [112-04-9]



Pentylamine (1-aminopentane) [110-58-7]

Tris : Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane (forme basique)
[77-86-1] pKa = 8.1

(7-octenyltrichlorosilane) [52217-52-4]

YOYO-1 (C₄₉H₅₈L₄N₆O₂)
[143413-85-8]

ANNEXE D : Mise en évidence d'une nouvelle forme de l'ADN

On présente dans cet annexe une expérience d'étirement de l'ADN sur une molécule unique à l'aide d'une bille magnétique. La particularité de cette expérience est de pouvoir maîtriser le niveau de torsion de la molécule. On peut ainsi mettre en évidence différentes phases sur une seule molécule d'ADN (une partie en forme B et l'autre en forme P, ...)

L'étude des courbes de force avec des pinces optiques ou une pointe AFM ne permet pas de travailler en dessous du pN (10^{-12} N). De plus, le niveau d'enroulement de la molécule n'est pas contrôlé. Le dispositif décrit ci-dessous permet d'atteindre ces deux objectifs [Strick 1996]. Un brin d'ADN est attaché à la surface ainsi que sur une bille magnétique. On exerce une force sur la bille par l'intermédiaire d'un aimant. Le moment magnétique de la bille est orienté par le champ magnétique. On peut donc contrôler le niveau d'enroulement d'une molécule en faisant tourner l'aimant. La bille de taille micrométrique subit l'agitation thermique du liquide environnant. Le mouvement de la bille est suivi au microscope optique. La hauteur de la bille est déduite de la figure de diffraction de la bille. Le positionnement dans l'espace de la bille est enregistré. On peut déduire à partir du mouvement brownien la force exercée comme indiqué par la figure. Cette méthode est très sensible puisqu'on a une sensibilité de l'ordre de la dizaine de fN (10^{-14} N).

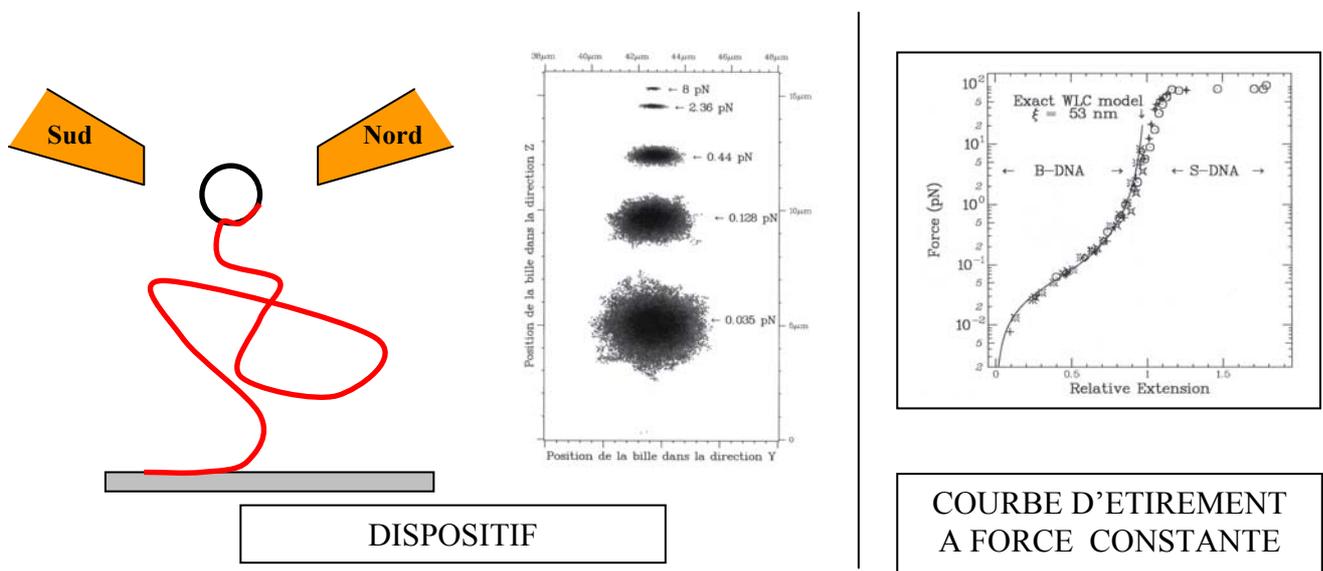


Figure D.01 : *Jokari moléculaire. Ce dispositif permet de mesurer des forces de l'ordre de la dizaine de fN. L'intérêt est de pouvoir contrôler le niveau de sur ou sous enroulement de la molécule. Le principe de la mesure consiste à fixer l'ADN à une bille magnétique. Cette bille a un mouvement brownien au sein du fluide. Un aimant placé à proximité permet d'exercer une force sur la bille. L'ADN va s'opposer à cette force. Le mouvement de la bille représenté ci-dessus est suivi au microscope (la position en x, y et z est déterminée par la figure de diffraction de la bille) et permet de remonter à la force que la bille exerce sur l'ADN. Par exemple, lorsque la force est très faible, la bille se déplace presque sans contrainte et on a un halo sphérique. Inversement, lorsque la force est importante la bille est contrainte dans une petite zone. Enfin, la bille est toujours orientée dans le sens du champ magnétique. Pour enlever ou ajouter un tour à la molécule fixée, il suffit de tourner l'aimant. On représente l'allure d'une courbe de force avec le plateau correspondant à la transition B-S. On déduit la longueur de persistance à 53nm à partir du modèle WLC (Worm Like Chain).*

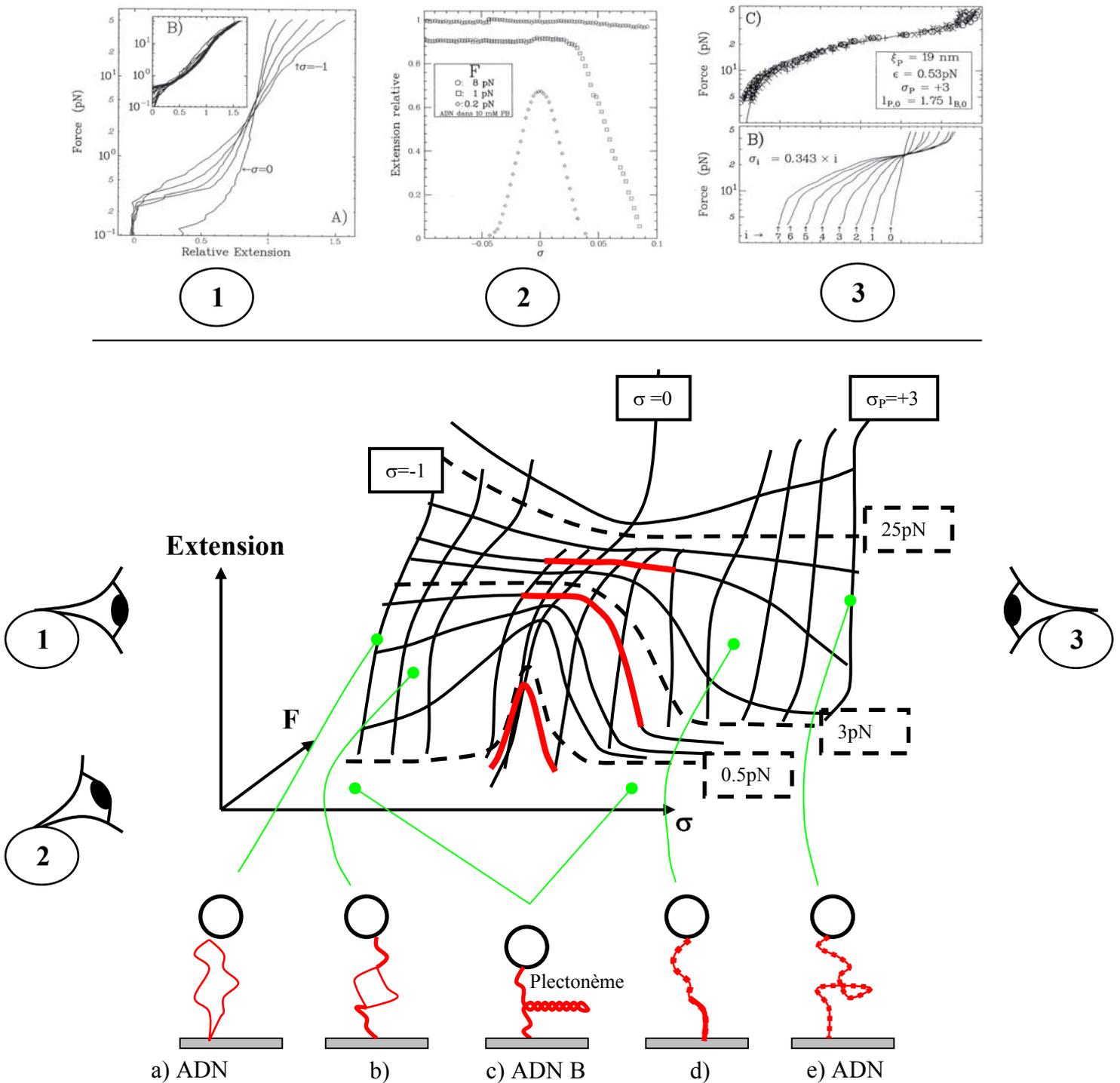


Figure D.02 : Représentation schématique du diagramme de phase de l'ADN, d'après Croquette. L'échelle sur l'axe σ est dilatée autour de $\sigma=0$, pour améliorer la lisibilité du schéma. Croquette et al. mettent en évidence la coexistence de plusieurs phases sur un même brin. Les différents états sont représentés de a) à e). L'ADN simple brin est représenté en trait fin, et les paires de base de l'ADN P sont représentées orientées vers l'extérieur par une sorte de collier de perle. La coexistence des deux phases est illustrée en b) et c). Cette méthode a permis de déterminer les caractéristiques structurales de l'ADN P (cf. explication dans le texte). Il est 1.75 fois plus long que l'ADN B. Il y a 2.6 paire de base par tour. L'ADN B relaxe la contrainte de torsion (négative ou positive) en formant des plectonèmes (comme les fils de téléphone). En revanche quand on commence à tirer sur le brin, il y a une force critique au delà de laquelle il devient plus intéressant de relaxer la contrainte par un changement de forme sur une portion. L'extension augmente brutalement pour cette force. Cette augmentation s'explique par la disparition des plectonèmes. Il y a une force critique pour l'apparition de la forme P (en d) à environ 3pN. On peut déduire de ces mesures que l'ADN B ne supporte pas plus d'environ 1% de torsion. On a représenté en trait gras rouge comment se place les trois courbes de la figure 2 dans le diagramme. La figure 1 et 3 correspondent au deux vue de côté.

La limitation de cette méthode est que la mesure de faible force nécessite l'enregistrement du mouvement de la bille pendant un temps qui peut être très long (de l'ordre de l'heure). On n'a que la valeur moyenne de la force sur la durée de la mesure.

Cette méthode permet d'étudier l'interaction de certaines protéines avec l'ADN en fonction du niveau d'enroulement de la molécule. On peut également accéder aux forces mises en jeu. Lorsque la protéine interagit avec l'ADN, la molécule est soit allongée ou compactée. On peut également suivre le niveau d'enroulement de la molécule.

On donne sur la figure D.01, l'allure d'une courbe de force. Elle est similaire à celle présentée précédemment. On retrouve le plateau correspondant à la transition B-S de l'ADN. Les courbes de force sont modifiées lorsqu'on exerce une torsion sur la molécule. En effet, l'ADN B doit relaxer la contrainte de torsion imposée par la bille. Tant que l'enroulement supplémentaire est faible, l'ADN qui possède une certaine élasticité peut répartir la contrainte sur toute la molécule. En revanche l'ADN B devient très vite instable, dès que la torsion est de l'ordre de 1% ($0.99 < \sigma < 1.01$). La contrainte peut être relaxée en formant des plectonèmes (ce comportement est similaire à celui des fils de téléphone). A force constante, l'apparition des plectonèmes s'accompagne d'une diminution de la longueur de l'ADN (cf. figure D.02). L'extension de la molécule en fonction de la torsion σ est symétrique par rapport à la forme B relaxé ($\sigma=0$. Cf. 2) figure 000).

Lorsqu'on tire sur l'ADN super enroulé, les plectonèmes vont devenir de plus en plus instables. Il y a une force pour laquelle, il est plus favorable de relaxer la contrainte par l'apparition sur une portion de l'ADN d'une nouvelle phase capable de relaxer toute la contrainte de torsion. Au delà de cette force, les plectonèmes disparaissent au profit de la nouvelle phase et la longueur de l'ADN augmente brusquement. Le sous enroulement est relaxé par la dénaturation local de l'ADN. Il y a formation d'une bulle de dénaturation. Cette transformation se fait pour une force de l'ordre de 0.5pN. Le sur enroulement fait apparaître une nouvelle forme de l'ADN notée P (cf. début pour la description de cette forme). La force critique est dans ce cas de l'ordre de 3pN. On peut noter que comme les paires de bases sont orientées vers l'extérieur, elles peuvent interagir entre elles pour former des ponts entre différents segment de l'ADN. Ce phénomène est certainement à l'origine de la force d'au moins 25pN qu'il faut exercer pour étendre significativement la molécule. Les courbes d'extension de la molécule en fonction de la torsion σ ne sont plus symétriques (cf. figure D.02).

Ainsi, deux formes coexistent sur le brin. Une zone en forme B et une zone en forme P ou dénaturé. L'allure des courbes de force évolue continûment en fonction de la torsion. On constate que ces courbes de force sont une combinaison linéaire de celle de l'ADN forme P ou dénaturé et de l'ADN forme B. On a la relation $L_p(F) = (\sigma/\sigma_{\text{forme } i})L_{(\sigma \text{ forme } i)} + (1-\sigma/\sigma_{\text{forme } i})L_{(\sigma=0)}$, où i correspond à l'ADN dénaturé ou en forme P ($\sigma_{\text{dénaturé}}=-1$ et $\sigma_P=3$). On en déduit ainsi certaines caractéristiques structurales de l'ADN P : 2.6 paire de base par tour d'hélice, 2.38nm entre les paires de base (L'ADN P est 1.75 fois plus long que l'ADN B). La forme P avec les bases orientées vers l'extérieur fait penser à la forme proposé par Pauling (1953). Cette forme pourrait correspondre à celle observée dans le virus Pfl par Liu et al.

Il faut noter que les protéines peuvent exercer des forces de l'ordre de 1-10pN sur l'ADN, forces suffisantes pour faire apparaître cette nouvelle phase. La forme P pourrait donc être impliquée dans les processus cellulaires.

Cette expérience de manipulation de molécule unique d'ADN est un outil performant pour étudier l'action de certaines protéines en particulier celles qui ont une action sur la topologie de l'ADN (Topo isomérase, ...).

ANNEXE E :

Complément sur les méthodes de dépôt d'ADN en microscopie électronique

1. Introduction

On présente dans cette annexe une technique de dépôt d'ADN qui consiste à répandre au préalable à l'interface liquide – air des molécules avant de les transférer sur un substrat solide. Cette technique a beaucoup été utilisée en microscopie électronique. L'intérêt de cette annexe est de présenter ces méthodes simples et astucieuses mises au point à l'origine pour visualiser des molécules d'intérêt biologique.

On peut également procéder de manière inverse et transférer des objets déposés sur une surface vers l'interface liquide – air. C'est le cas par exemple du graphite qui se décolle facilement d'une surface de mica et peut être transféré vers un autre substrat. Cette méthode est également présentée dans cette annexe car les dépôts d'ADN en microscopie électronique se font généralement sur des grilles recouvertes de graphite.

2. Formation du complexe ADN - surfactant

Kleinschmidt et Zahn [Kleinschmidt 1959] furent les premiers à proposer une méthode de transfert de molécules d'ADN préalablement organisées à l'interface eau – air vers un substrat solide. Ils utilisent une solution contenant de l'ADN, de l'ammonium acétate (~0.2M), du formaldéhyde (~0.07M) et une protéine le cytochrome c (~1.3µg/ml). Cette protéine forme spontanément une couche à l'interface liquide – air comme indiqué par les figures E.01 et E.02. L'ammonium acétate sert à promouvoir la fixation de la protéine sur l'ADN qui va ensuite se déposer lui aussi à l'interface par diffusion. Le formaldéhyde favorise le dépôt de la protéine à l'interface. Une façon de se passer de formaldéhyde est de toucher avec la protéine déshydratée la surface de la solution contenant l'ADN et l'ammonium acétate. Cette opération suffit à répandre un film de protéine à l'interface liquide – air.

Le défaut lié à l'utilisation de cytochrome c est que les protéines décorent la molécule d'ADN. Cette méthode a donc été améliorée avec des surfactants plus petits que le cytochrome c. Vollenweider [Vollenweider 1975], propose d'utiliser du benzyldiméthylalkylammonium (BAC) qui est une petite molécule en comparaison de la protéine. L'utilisation de formamide pour préparer la solution de BAC permet de rendre la technique très reproductible en évitant la formation de micelles. Récemment, Bratosin-Guttman [Bratosin 1992] propose d'utiliser un surfactant, le tri-L-(diméthylaminométhyl) phénol (DMP30) comme agent pour disperser l'ADN à la surface de la solution.

Les techniques précédentes sont assez empiriques. L'utilisation de film de Langmuir Blodgett peut être mise à profit pour effectuer des dépôts reproductibles. Dans ce cas, on peut superposer les couches de dépôt jusqu'à obtenir un film du complexe lipide – ADN [Okahata 1996]. Des lipides cationiques avec des groupements ammonium quaternaires sont utilisés. L'ADN vient se fixer de manière électrostatique sur le film de Langmuir Blodgett (cf. figure E.01).

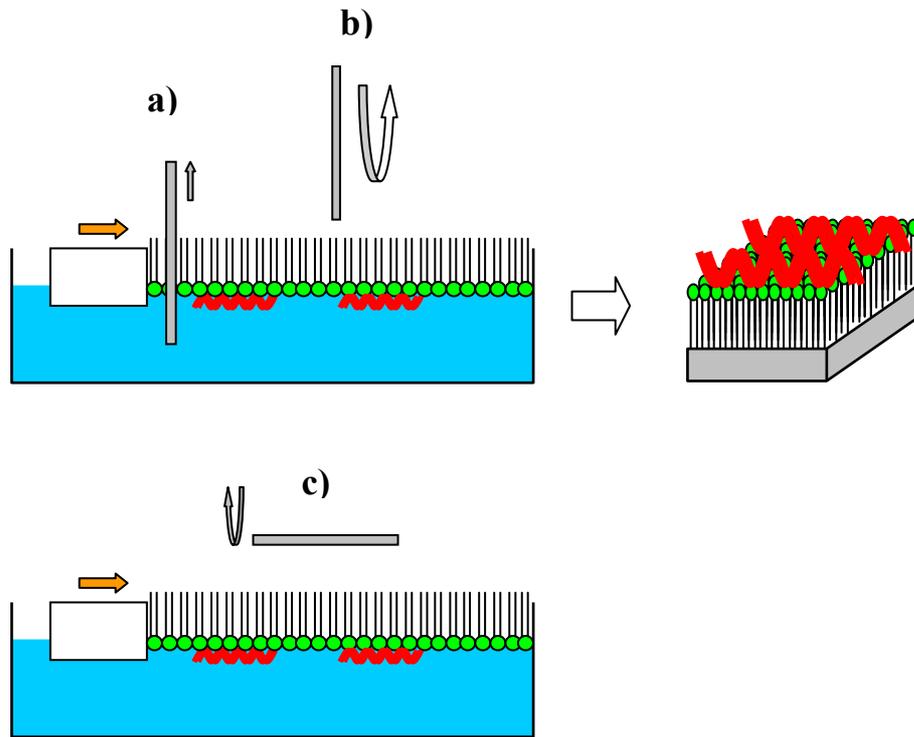


Figure E.01 : Formation d'un film de Langmuir-Blodgett avec des lipides cationiques. Le film est compressé jusqu'à obtenir une couche dense. L'ADN se fixe électrostatiquement sur le film. Le transfert peut se faire de différentes manières. En a), l'échantillon est retiré de la solution. Dans ce cas la partie hydrophile se retrouve en contact avec la surface. En b), c'est la partie hydrophobe qui est en contact avec la surface. En ressortant l'échantillon on aura deux couches de lipides avec de l'ADN au milieu. En c), l'échantillon peut être mis directement en contact avec la surface comme pour la technique de micro diffusion. Dans ce cas, il faut ensuite déshydrater l'échantillon. Le fait de tirer l'échantillon peut orienter partiellement les brins comme schématisé à droite.

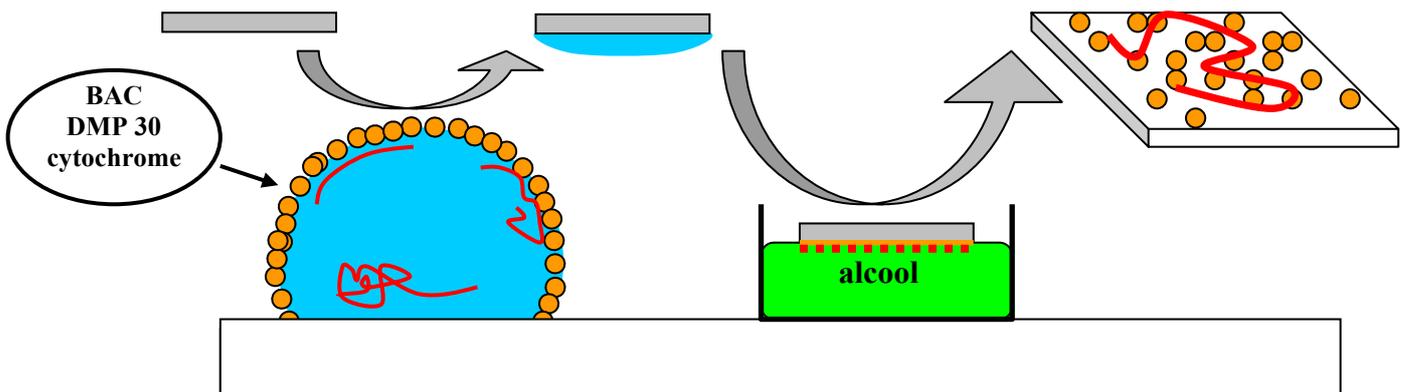


Figure E.02 : Dépôt d'ADN par diffusion. On représente les étapes essentielles. Différents composés peuvent être utilisés pour la formation du film à la surface de la goutte. L'utilisation d'une goutte permet d'économiser la quantité de produit utilisé. On parle alors de technique de micro diffusion. Le composé peut réagir avec l'ADN en solution (non représenté). Pour transférer le complexe ADN – composé sur l'échantillon, ce dernier est mis en contact quelques instants avec la goutte. Sans attendre que le liquide sèche, le substrat est mis en contact avec une solution de rinçage comme de l'eau par exemple (non représenté). Pour enlever la solution aqueuse, l'échantillon est déposé à la surface d'une solution d'alcool absolu. Cette étape déshydrate et stabilise l'échantillon qui peut être ensuite séché sans précaution particulière (non représenté). Le résultat final est schématisé. L'ADN est en général entouré du composé qui a servi à la formation du film.

3. Transfert vers un substrat solide

3.1. Mise en contact direct

Le substrat peut être mis directement en contact avec la surface comme indiqué par la figure E.02. Dans ce cas, il reste du liquide sur l'échantillon contrairement à la technique de transfert de Langmuir Blodgett où l'échantillon reste vertical.

Pour sécher l'échantillon, il est mis en contact avec une solution d'alcool absolu. Cette étape provoque la déshydratation de l'échantillon. L'ADN se retrouve fixé à la surface car il n'est pas soluble dans ce type de solvant. On peut alors désécher l'échantillon sans précaution particulières en le mettant en contact avec une torchette qui va absorber le liquide. On peut également utiliser un jet d'azote. Il est possible ensuite d'enlever l'éthanol et de le remplacer par un autre sel volatil [Thundat 1994].

Entre l'étape de transfert, et de déshydratation, il est possible de rincer l'échantillon avec de l'eau en général pour enlever les molécules qui ne sont pas bien fixées. On peut au contraire rajouter des sels pour augmenter l'adhésion de l'ADN sur le substrat (par exemple de l'uranyl acétate couramment utilisé en microscopie électronique). L'ajout d'un excès de sel peut provoquer une déshydratation de l'ADN qui peut rester fixé sur la surface.

3.2. Ascenseur

Le lipide cationique se place spontanément à l'interface liquide – air, avec la chaîne carbonée hors de l'eau et la partie chargée en contact avec le liquide. Ce film peut être compressé jusqu'à obtenir une couche dense.

La technique de transfert est représentée sur la figure E.01. Elle consiste à déplacer de bas en haut l'échantillon en maintenant la pression sur le film de Langmuir Blodgett constante. Il est possible de répéter l'opération à volonté et de déposer des multicouches. Suivant le sens du premier dépôt on aura la partie hydrophile ou hydrophobe en contact avec le substrat.

Les films ainsi fabriqués sont ordonnés. En effet, l'ADN est en sandwich entre des lamelles de bicouches lipidiques. Les molécules peuvent être orientées par la technique de transfert par ascenseur. En revanche il n'y a pas d'orientation pour le transfert direct par contact du substrat parallèlement avec le film. L'avantage de cette technique est de pouvoir maîtriser la formation du film. Enfin, l'ADN est stable dans la structure du film. Des études structurales montrent qu'il est en forme B. De plus, d'après la masse déposée la densité d'ADN est très importante (95% de couverture).

4. Cas particulier du mica

Une particularité du mica est de pouvoir transférer à l'inverse de la partie précédente des objets posés sur un substrat solide (du graphite) à la surface de l'eau. La différence d'affinité de l'eau entre le carbone (hydrophobe) et le mica (hydrophile) peut expliquer certainement pourquoi cette technique marche. En effet, une goutte d'eau déposée sur une surface de mica va essayer de se loger entre le mica et le carbone. On peut améliorer le dispositif en insérant l'échantillon avec un ascenseur perpendiculairement à la surface du liquide, un peu comme la technique de Langmuir Blodgett représentée page précédente mais en déposant quelque chose sur la surface.

D'après Le Cam [Le Cam 1991], et d'autres, cette technique permet d'obtenir des surfaces de carbone très propre pour l'observation en microscopie électronique. Il est possible de transférer de cette manière des films bidimensionnel fragiles qui seraient difficiles à manipuler autrement.

5. Conclusion

Les techniques présentées utilisent la capacité d'organisation de molécules d'ADN avec des surfactants à l'interface liquide – air. Il est possible de transférer ces molécules vers un substrat solide et de les observer en microscopie.

Le mica permet de transférer un film hydrophobe de carbone à l'interface liquide – air et de le transférer sur un autre substrat (pour faire des grilles de microscope électronique). Cette méthode peut être utile pour manipuler des films bidimensionnels.

Bibliographie

[Aimé 1999]

J. P. Aimé, R. Boisgard, L. Nony, and G. Couturier
Physical Review Letters, **1999**, 82(17), 3388-3391

[Alivisatos 1996]

A.P.Alivisatos, K.P.Johnsson, X.Peng, T.E.Wilson, C.J.Loweth, M.P.Bruchez Jr., and P.G.Schultz
Nature, **1996**, 382, 609-611

[Allemand 1997]

J.F.Allemand, D.Bensimon, L.Jullien, A.Bensimon, and V.Croquette
Biophysical Journal, **1997**, 73, 2064 - 2070

[Allemand 1998]

J.F.Allemand, D.Bensimon, R.Lavery et V.Croquette,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1998**, Vol. 95, 14152-14157

[Allongue 2000]

P.Allongue, C.H. de Villeneuve, S.Morin, R.Boukherroub, D.D.M. Wayner,
Electrochimica Acta, **2000**, 45, 4591-98

[Amrein 1989]

M. Amrein, R. Dürr, A. Stasiak, H. Gross, G. Travaglini
Science, **1989**, 243, 1708-1711

[Aviram 1998]

A.Aviram, M.Ratner
Molecular Electronics Science and Technology
Annals of the New York Academy of Sciences, **1998**, 852, 1-372

[Bain 1989]

C.D.Bain, E.B.Troughton, Y.Tayo, J.Evall, G.M.Whitesides, R.G.Nuzzo
J. Am. Chem. Soc. **1989**, 111, 321

[Bamdad 1998]

Cynthia Bamdad
Biophysical Journal, **1998**, 75, 1997-2003

[Bardeen 1961]

J.Bardeen
Phys. Rev. Lett., **1961**, 6 , 57

[Barnett 2001]

R.N.Barnett, C.L.Cleveland, A.Joy, U.Landman, G.B.Schuster
Science, **2001**, 294, 567-571

Bibliographie

[Barrat 1996]

J.-L.Barrat and J.-F.Joanny

Advances in Chemical Physics, Vol XCIV. I. Prigogine and S.A.Rice editors. John Wiley and Sons, New York. 16-20. **1996**

[Bartholtt 1997]

W.Bartholtt, C.Neinhuis

Planta, **1997**, 202, 1-8

[Baumann 2000]

Cristoph G. Baumann, Victor A. Bloomfield, Steven B. Smith, Carlos Bustamante, Michelle D. Wang and Steven M. Block

Biophysical Journal, **2000**, 78, 1965-1978

[Bednar 1994]

Jan Bednar, Patrick Furrer, Andrzej Stasiak, Jacques Dubochet

J. Mol. Biol., **1994**, 235, 825-847

[Beebe 1989]

T.B.Beebe Jr., T.E.Wilson, D.F.Ogletree, J.E.Katz, R.Balhorn, M.B.Salmeron, W.J.Siekhaus
Science, **1989**, 243, 370-372

[Behrend 1999]

O. P. Behrend, L. Odoni and J. L. Loubet, N. A. Burnham

Applied Physics Letters, **1999**, 75(17), 2551- 2553

[Bensimon 1994]

A.Bensimon, A.Simon, A.Chiffaudel, V.Croquette, F.Heslot, and D.Bensimon

Science, **1994**, 265, 2096-98

[Bezryadin 1997]]

A.Bezryadin and C. Dekker, G. Schmid

Appl. Phys. Lett., **1997**, 71(9), 1273-1275

[Binning 1982]

G.Binning, H. Rohrer, C. Berger, and E.Weibel

Phys. Rev. Lett., **1982**, 49, 57

[Bixon 2001]

Mordechai Bixon and Joshua Jortner

J. Am. Chem. Soc., **2001**, 123, 12556-12567

[Bloomfield 1996]

V.A.Bloomfield

Curr. Opin. Struct. Biol., 1996, 6, 334-341

[Bockrath 2001]

Marc Bockrath, Nina Marcovik, Adam Shepard, and M. Tinkham, Leonid Gurevich and Leo P. Kouwenhoven, Mingshaw W. Wu and L. L. Sohn

Nano Letters, **2001**, 0(0),

Bibliographie

[Bottger 1985]

H.Bottger, V.V.Bryskin, *Hooping Conduction in Solids*
Akademie-Verlag, Berlin, **1985**

[Bottomley 1992]

L.A Bottomley and J.N. Haseltine, D.P. Allison, R.J. Warmack, and T.Thundat, R.A. Sachleben and G.M. Brown, R.P. Woychik and K. Bruce Jacobson, T. L. Ferrel
J. Vac. Sci. Technol. A, **1992**, 10(4), 591-594

[Bouchiat 1999]

C.Bouchiat, M.D.Wang, J.-F. Allemand, T.Strick, S.M. Block, and V.Croquette
Biophysical Journal, **1999**, 76, 409-413

[Bratosin 1992]

Susan Bratosin-Guttman
Journal of structural biology, **1992**, 108, 162-167

[Breuil 2000]

L.Breuil
Thèse université Lille 1, **2000**

[Brzoska 1992]

J.B.Brzoska, N.Shahidzadeh, F.Rondelez,
Nature, **1992**, 360, 719

[Bruinsma 2000]

R.Bruinsma, G.Gruner, M.R.D'Orsogona, J.Rudnick
Phys. Rev. Lett. , **2000**, 85, 4393-4396

[Burnahm 1993]

N. A. Burnham, R. J. Colton and H. M. Pollock
Nanotechnology, **1993**, 4, 64-80

[Bustamante 1992]

Carlos Bustamante, James Vesenka, Chun Lin Tang, Williams Rees, Martin Guthold, and Rebecca Keller
Biochemistry, **1992**, 31, 22-26

[Cahn 1996]

R.W.Cahn, P.Haasen, E.J.Kramer: Processing of semiconductors
Materials Science and technology **1996**

[Cai 2000]

Lintao Cai, Hitoshi Tabata and Tomoji Kawai
Applied Physics Letters, **2000**, 77(19), 3105-3106

[Cai 2001]

Lintao Cai, Hitoshi Tabata and Tomoji Kawai
Nanotechnology, **2001**, 12, 211-216

Bibliographie

[Chen 2002]

Xiaodong Chen, Jinben Wang, Nan Shen, Yanhong Luo, Lin Li, Minghua Liu, and Robert K. Thomas

Langmuir, **2002**, 18 (16), 6222-6228

[Cherny 1998]

Dimitry I. Cherny, Alain Fourcade, Fedor Svinarchuk, Peter E. Nielsen, Claude Malvi, and Etienne Delain

Biophysical Journal, **1998**, 74, 1050-1023

[Choi 2000]

K.H.Choi, J.P.Bourgoin, S.Auvray, D.Esteve, G.S.Duesbey, S.Roth, M.Burghard

Surface Science, **2000**, 462(1-3), 195-200

[Clausen 2000]

Hauke Clausen-Schaumann, Matthias Rief, Carolin Tolksdorf, and Hermann E. Gaub

Biophysical Journal, **2000**, 78, 1997-2007

[Cleveland 1998]

J. P. Cleveland, B. Anczykowski, A. E. Schmid, and V. B. Elings

Applied Physics Letters, **1998**, 72(20), 2613-2615

[Cornil 2001]

J.Cornil, D.Beljonne, J.P.Calbert, J.L.Brédas,

Advanced Materials, **2001**, 13 N°14, 1053-67

[Courjon 2001]

D. Courjon, C.Bainier

Le champ proche optique, théorie et applications Springer et Verlag, Paris, **2001**

[Coury 1995]

J.E. Coury, L. McFail-Isom, S. Presnell, L. D. Williams and L. A. Bottomley

J. Vac. Sci. Technol. A, **1995**, 13(3), 1746-1751

[Coury 1997]

Joseph E. Coury, Jaimie R. Anderson, Lori McFail-Isom, Loren Dean Williams, and Lawrence A. Bottomley

J. Am. Chem. Soc., **1997**, 119, 3792-3796

[Couture 1992]

L.Couture, R.Zitoun

Physique statistique, **1992**, ellipses

ISBN 2-7298-9262-1

[Cuniberti 2002]

Gianaurelio Cuniberti, Luis Craco, Danny Porath, and Cees Dekker

Physical Review B, **2002**, 65, 241314

[Dai 1996]

Bibliographie

H.Dai, J.H.Hafner, A.G.Rinzler, D.T.Colbert, and R.E.Smalley,
Nature, **1996**, 356, 56

[Dekker 2001]

Cees Dekker and Mark A. Ratner
Physics World, **2001**, 29-33

[de Pablo 2000]

P. J. de Pablo, F. Moreno-Herrero, J. Colchero, J. Gomez Herrero, P. Herrero, A. M. Baro, Pablo Ordejon, José M. Soler, and Emilio Artacho
Physical Review Letters, **2000**, 85(23), 4992-4995

[Dubochet 1971]

Jacques Dubochet, Michel Ducommun, Max Zollinger, and Edouard Kellenberger
J. Ultrastructure Research, **1971**, 35, 147-167

[Dunlap 1996]

David Dunlap
IEEE Engineering in Medecine and Biology, **1996**, January/February, 46-50

[Eley 1962]

D.D.Eley, D.I.Spivey
Trans. Faraday Soc. , **1962**, 58, 411

[Emberly 1998]

E.Emberly, G.Kirczenow,
Phys. Rev. Lett., **1998**, 81, 5205

[Fang 1998]

Ye Fang, Jan H. Hoh,
Nucleic Acids Research, **1998**, Vol. 26, no. 2, 588-593

[Fang 1999]

Ye Fang, Jan H. Hoh,
FEBS Letters,459, **1999**, 173-176

[Ferreiro 2000]

V.Ferreiro, Y.Pennec, R.Seguella, G.Coulon,
Polymer – Guildford, **2000**, Vol. 41, No. 4, 1561-69

[Fink 1999]

Hans-Werner Fink and Christian Schönenberger
Nature, **1999**, 398, 407-410

[Finklea 1996]

Finklea et al.
Langmuir, **1986**, 2, 239

[Freitag 2000]

M. Freitag, M. Radosavljevic, W. Clauss, and A. T. Johnson

Bibliographie

Physical Review B, **2000**, 62(4), 2307-2310

[Fried 1984]

Michael G. Fried and Victor A. Bloomfield,
Biopolymers, **1984**, 23, 2141-2155

[Fukui 1999]

Ken-ichi Fukui, Hiroshi Onishi, Yasuhiro Iwasawa
Applied Surface Science, **1999**, 140, 259-264

[Gani 1999]

S. A. Gani, D. C. Mukherjee, and D. K. Chattoraj
Langmuir, **1999**, 15(21), 7130-7138

[Garoff 2002]

R.A.Garoff, E.A.Litzinger, R.E.Connor, I.Fishman, B.A.Armitage
Langmuir, **2002**, 18, 6330-6337

[Giese 2001]

Brend Giese, Jérôme Amaudrut, Anne-Kathrin Köhler, Martin Spormann and Stephan Wessely
Nature, **2001**, 412, 318-320

[Giessibl 1995]

F.J.Giessibl
Science, **1995**, 267, 68-71

[Gilbert 1999]

Dara E. Gilbert and Juli Feigon
Current Opinion in Structural Biology, **1999**, 9, 305-314

[Gomez 2002]

Cristina Gomez – Navarro, Fernando Moreno-Herrero, Pedro J. de Pablo, Adriana Gil, Jaime Colchero, Julio Gomez-Herrero and Arturo M. Baro
Phantoms Newsletter, **2002**, 4, 4-6

[Gray 1985]

H.B.Gray, G.P.Haight
Principes de chimie, interéditions **1985**

[Gronbech 1997]

Niels Gronbech-Jensen, Robert J. Mashl, Robijn F. Bruinsma, and William M. Gelbart
Physical Review Letters, **1997**, 78(12), 2477-2480

[Grosberg 1986]

Grosberg and Zhestkov
J. Biomol. Struct. Dyn. **1986**, 3, 859-72

[Gu 2002]

Jianhua Gu, Shinnichi Tanaka, Youichi Otsuka, Hitoshi Tabata, and Tomoji Kawai

Bibliographie

Applied Physics Letters, **2002**, 80(4), 688-690

[Gu 2002-b]

Jianhua Gu, Lintao Cai, Shinnichi Tanaka, Youri Otsuka, Hitoshi Tabata, and Tomoji Kawai
Journal of Applied Physics, **2002**, 92(5), 2816-2820

[Guéron 2000]

M. Guéron, J. -Ph. Demaret, and M. Filoche
Biophysical Journal, **2000**, 78, 1070-1083

[Ha 2002]

Dong Han Ha, Hyunsoo Nham, Kyung-Hwa Yoo, Hye-mi So, Hae-Yeon Lee, Tomoji Kawai
Chemical Physics Letters, **2002**, 355, 405-409

[Haber 2000]

Charbel Haber and Denis Wirtz
Biophysical Journal, **2000**, 79, 1530-1536

[Haguet 2002]

V.Haguet Thèse université Lille1 **2002**

[Han 1998]

Wenhai Han, S. M. Lindsay
Applied Physics Letters, **1998**, 72(13), 1656-1658

[Hansma 1996]

Helen G. Hansma, Irene Revenko, Kerry Kim and Daniel E. Laney
Nucleic Acids Research, **1996**, 24(4), 713-720

[Haugstadt 1998]

G.D.Haugstad, J.A.Hammerschmidt, and W.L.Gladfelter
Polym. Prep., **1998**, 39, 1189

[Henderson 1999]

Paul T. Henderson, Denise Jones, Gregory Hampikian, Yongzhi Kan, and Gary B. Schuster
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1999**, 96, 8353-8358

[Henderson 1992]

E.Henserson, P.G.Haydon, and D.S.Sakagushi
Science, **1992**, 257, 1944

[Herbomel 1993]

P.Herbomel
L'expression du génome du noyau à l'organisme E.S.T.E.M. **1993**
ISBN : 2-909455-14-9

[Higashi 1999]

Nobuyuki Higashi, Minoru Takahashi, and Masazo Niwa
Langmuir, **1999**, 15, 111-115

Bibliographie

[Hjort 2001]

Mattias Hjort and Sven Stafström
Physical Review Letters, **2001**, 87(22)

[Hölscher 1999]

H. Hölscher, U. D. Schwarz, R. Wiesendanger
Applied Surface Science, **1999**, 140, 344-351

[Jackson]

J.D.Jackson
Wiley, second edition, ISBN: 0-471-43132-x

[James 2001]

P. J. James, M. Antognozzi, J. Tamayo, T. J. McMaster, J. M. Newton, and M. J. Miles
Langmuir, **2001**, 17, 349-360

[Jortner 1998]

Joshua Jortner, Mordechai Bixon, Thomas Langenbacher, and Maria E. Michel-Beyerle
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1998**, 95, 12759-12765

[Kang 2001]

Seong Ho Kang, Michael R. Shortreed, and Edward S. Yeung
Anal. Chem. **2001**, 73, 1091-1099

[Kanno 2000]

Takashi Kanno and Hiroyuki Tanaka, Norio Miyoshi, Tomoji Kawai
Applied Physics Letters, **2000**, 77(23), 3848-3850

[Kasas 1997]

Sandor Kasas, Neil H. Thomson, Bettye L. Smith, Helen G. Hansma, Xingshu Zhu, Martin Guthold, Carlos Bustamante, Eric T. Kool, Mikhail Kashlev, and Paul K. Hansma
Biochemistry, **1997**, 36(3), 461-468

[Kasumov 2001]

A.Yu.Kasumov, M.Kociak, S.Guéron, B.Reulet, V.T.Volkov, D.V.Klinov, H.Bouchiat
Science, **2001**, 291, 280-282

[Kasumov 2002]

A.Yu.Kasumov, and D.V.Klinov
À paraître.
<http://www.arxiv.org/form/cond-mat>

[Keller 1989]

David Keller, Carlos Bustamante, and Rebecca W. Keller
Proc. Natl. Acad.Sci. USA, **1989**, 86, 5356-5360

[Kelley 1999]

S.O.Kelley, N.M.Jackson, M.G.Hill, J.K.Barton,
Angew. Chem. Int. Ed., **1999**, 38 No 7, 941-945

Bibliographie

[Kelley 2001]

S.O.Kelley, P.Leroy,
Biofutur, Technoscope, No 214, septembre **2001**

[Kergueris 1998]

C.Kergueris
Thèse université Paris-Sud, **1998**

[Kleinschmidt 1959]

A.K.Kleinschmidt, R.K.Zahn,
Naturforsch. B, **1959**, 14, 770-779

[Koltover 1998]

Ilya Koltover, Tim Salditt, Joachim O. Rädler, Cyrus R. Safinya
Science, **1998**, 281, 78-81

[Koltover 2000]

Ilya Koltover, Kathrin Wagner, Cyrus R. Safinya,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Décembre **2000**, Vol 97, no. 26, 14046-51

[Krzeminski 2001]

C.Krzeminski
Thèse Université Lille1, **2001**

[Laemmler 1975]

Laemmler et al.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1975**, 72, 4288-4292

[Landau 1989]

L.Landau et E.Lifchitz
Physique théorique
TOME 6 : Mécanique des fluides, **1989**, (seconde édition), éditions MIR

[Landauer 1957]

R.Landauer
IBM J. Res. Dev., **1957**, 1, 223

[Lee 1989]

Gil Lee, Patricia G. Arscott, Victor A. Bloomfield, D. Fennell Evans,
Science, **1989**, 244, 475-477

[Lee 2002]

Hea-Yeon Lee, Hidekazu Tanaka, and Yoichi Otsuka, Kyung-Hwa Yoo and Jeong-O Lee,
Tomoji Kawai,
Applied Physics Letters, **2002**, 80(9), 1670-1672

[Lee 1998]

Baek-woon Lee and Noel A. Clark
Langmuir, **1998**, 14, 5495-5501

Bibliographie

[Leslie 1980]

A. G. W. Leslie, Struther Arnott, Rengaswami Chandrasekaran and R. L. Ratliff
J. Mol. Biol., **1980**, 143, 49-72

[Lenfant 2001]

S.Lenfant
Thèse université Lille 1, **2001**

[Li 2001]

X.Li, Y.Yan,
Appl. Phys. Lett., **2001**, 79 No 14, 2190-2192

[Lindsay 1989]

S. M. Lindsay, T. Thundat, L. Nagahara, U. Knipping, R.L. Rill
Science, **1989**, 244, 1063-1064

[Linford 1993]

M.R.Linford, C.E.D.Chidsey
J. Am. Chem. Soc., **1993**, 115, 12631

[Linford 1995]

M.R.Linford, P.Fenter, P.M.Eisenberger, C.E.D.Chidsey
J. Am. Chem. Soc., **1995**, 117, 2145

[Liu 1994]

D.J.Liu and L.A.Day
Science, **1994**, 265, 671-674

[Livolant 1989]

F. Livolant, A. M. Levelut, J. Doucet and J. P. Benoit
Nature, **1989**, 339, 724-726

[Lyubchenko 1997]

Yuri L. Lyubchenko and Luda S. Shlyakhtenko
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1997**, 94, 496-501

[Maeda 1999]

Y. Maeda, T. Matsumoto, T. Kawai
Applied Surface Science, **1999**, 140, 400-405

[Manning 1978]

G.S.Manning
Q. Rev. Biophys. , **1978**, 11, 179-246

[Marcus 1965]

Marcus
J.Chem Phys. **1965**, 43, 679

[Margeat 1998]

Emmanuel Margeat, Christian Le Grimellec, and Catherine A. Royer

Bibliographie

Biophysical Journal, **1998**, 75, 2712-2720

[Martel 2000]

B.Martel

Thèse université Lille 1, **2000**

[Matsumoto 1981]

S.Matsumoto, K.Morikawa, and M.Yangida,

J. Mol. Biol. **1981**, 152, 501-516

[Mayor 1968]

Heather D. Mayor, Liane E. Jordan,

Science, **1968**, 161, 1246-1247

[Melnik 2002]

O.Melnyk, X.Duburcq, C.Olivier, F.Urbès, C.Auriault, H.Gras-Masse

Bioconjugate Chemistry, **2002**, 13, 713-720

[Michalet 1997]

Xavier Michalet, Rosemary Ekong, Françoise Fougerousse, Sophie Rousseaux, Catherine Schurra, Nick Hornigold, Marjon van Slegtenhorst, Jonathan Wolfe, Sue Povey, Jacques S. Beckmann, Aaron Bensimon

Science, **1997**, 277, 1518-1523

[Mirkin 2000]

C.A.Mirkin,

MRS Bulletin, **2000**, 43-54

[Mirkin 1996]

C.A.Mirkin, R.L.Letsinger, R.C.Mucic, and J.J.Storhoff,

Nature, **1996**, 382, 607-609

[Moser 1992]

C.C. Moser, J.M. Kesle, K. Warncke, K.S.Farid, P.L.Dritton,

Nature, 1992, 355, 796-802

[Mott 1971]

N.F.Mott, E.A.Davis

Electronic Process in Non-Crystalline Solids (Oxford University, London, **1971**)

[Mou 1995]

Jianxum Mou, Daniel M. Czajkowsky, Yiyi Zhang, Zhifeng Shao

FEBS Letters, **1995**, 371, 279-282

[Muir 1998]

T.Muir et al.

J.Vac.Sci.Technol. A, **1998**, 16(2), 1172

[Nakayama 2001]

Hajime Nakayama, Hiroyuki Ohno and Yoshio Okahata

Bibliographie

Chem. Commun., **2001**, 2300-2301

[Neves 1999]

C. R. A. Neves, D. N. Leonard, M. E. Salmon, P. E. Russell and E. B. Troughton Jr
Nanotechnology, **1999**, *10*, 399-404

[Nony 2001]

L. Nony, R. Boisgard, and J. -P. Aimé
Biomacromolecules, **2001**, *2*, 827-835

[Nony 1999]

L. Nony, R. Boisgard, and J. P. Aimé
Journal of Chemical Physics, **1999**, *111(4)*, 1615-1627

[Odom 2000]

D.T.Odom, E.A.Dill, J.K.Barton
Chem. Biol., **2000**, *7*, 475-481

[Ohnesirge 1993]

F.Ohnesirge and G.Binning
Science, **1993**, *260*, 1451

[Okahata 1998]

Y. Okahata, T. Kobayashi, H. Nakayama, and K. Tanaka
Supramolecular Science, **1998**, *5(3-4)*, 317-320

[Okahata 1998-b]

Yoshio Okahata, Takuya Kobayashi, Kentaro Tanaka, and Shimomura
J. Am. Chem. Soc., **1998**, *120*, 6165-6166

[Olvera 1995]

M.Olvera de la Cruz, L.Belloni, M.Delsanti, J.P.Dalbiez, O.Spalla and M. Drifford
J. Chem. Phys., **1995**, *103*, 5781-5791

[Onsager 1949]

Onsager
Annu. Rev. Biochim , **1949**, *51*, 627-659

[Oosawa 1968]

Fumio Oosawa
Biopolymers, **1968**, *6*, 1633-1647

[Ouate 1994]

C.F. Quate
Surface Science, **1994**, *299*, 980-995

[Petri 1999]

Denise F. Siqueira Petri, Gerhard Wenz, Peter Schunk, and Thomas Schimmel
Langmuir, **1999**, *15*, 4520-4523

Bibliographie

[Pirrung 2000]

Michael C. Pirrung, Janice D. Davis, Amy L. Odenbaugh
Langmuir, **2000**, *16*, 2185-2191

[Porath 2000]

D.Porath, A.Bezryadin, Simon de Vries, and C.Dekker
Nature, **2000**, *403*, 635-638

[Post 1979]

Carol Beth Post and Bruno H. Zimm
Biopolymers, **1979**, *18*, 1487-1501

[Radler 1997]

J.Radler, I.Koltover, T.Salditt, and C.R.Safinya
Science, **1997**, *275*, 810-814

[Rakitin 2001]

A. Rakitin, P. Aich, C. Papadopoulos, Yu. Kobzar, A. S. Vedeneev, J. S. Lee, and J. M. Xu
Physical Review Letters, **2001**, *86(16)*, 3670-3673

[Raspaud 1998]

E. Raspaud, M. Olvera de la Cruz, J.-L. Sikorav, and F. Livolant
Biophysical Journal, **1998**, *74*, 381-393

[Reich 1994]

Ziv Reich, Ellen J. Wachtel, Abraham Minsky
Science, **1994**, *264*, 1460-1463

[Rivetti 1996]

Claudio Rivetti, Martin Guthold, and Carlos Bustamante
J. Mol. Biol., **1996**, *264*, 919-932

[Rouzina 1996]

Ioulia Rouzina and Victor A. Bloomfield
J. Phys. Chem., **1996**, *100*, 4292-4304

[Rouzina 1996-b]

Ioulia Rouzina and Victor A. Bloomfield
J. Phys. Chem., **1996**, *100*, 4305-4313

[Rouzina 1996-c]

Ioulia Rouzina and Victor A. Bloomfield
J. Phys. Chem., **1996**, *100*, 9977-9989

[Satjapipat 2001]

Munlika Satjapipat, Raymond Sanedrin, and Feimeng Zhou
Langmuir, **2001**, *17*, 7637-7644

[Schellman 1984]

John A. Schellman and Nambi Parthasarathy

Bibliographie

J. Mol. Biol., **1984**, *175*, 313-329

[Schouten 1999]

Stefan Schouten, Pieter Stroeve, and Marjorie L. Longo
Langmuir, **1999**, *15*, 8133-8139

[Schulz 1998]

Alexandra Schulz, Norbert Mücke, Jörg Langowski and Karsten Rippe
J. Mol. Biol., **1998**, *283*, 821-836

[Silberzan 1991]

P.Silberzan, L.Leger, D.Ausseré, J.Benattar
Langmuir, **1991**, *7*, 1647

[Simmel 2002]

F.C.Simmel, B.Yurke,
Appl. Phys. Lett., **2002**, *80*, N°5, 883-885

[Smith 2001]

Emily A. Smith, Matt J. Wanat, Yufei Cheng, Sérgio V. P. Barreira, Anthony G. Frutos, and Robert M. Corn
Langmuir, **2001**, *17*, 2502-2507

[Sottas 1999]

Pierre-Edouard Sottas, Eric Larquet, Andrzej Stasiak, and Jacques Dubochet
Biophysical Journal, **1999**, *77*, 1858-1870

[Storm 2001]

A. J. Storm, J. van Noort, S. de Vries, and C. Dekker
Applied Physics Letters, **2001**, *79*(23), 3881-3883

[Strick 1996]

T.R.Strick, J.-F. Allemand, D.Bensimon, A.Bensimon, and V.Croquette
Science, **1996**, *271*, 1835-1837

[Strick 1998]

T.R.Strick, J.-F. Allemand, D.Bensimon, and V.Croquette
Biophysical Journal, **1998**, *74*, 2016-2028

[Strother 2000]

Todd Strother, Wei Cai, Xincheng Zhao, Robert J. Hamers, and Lloyd M. Smith
J. Am. Chem. Soc., **2000**, *122*, 1205-1209

[Strzelecka 1987]

Teresa E. Strzelecka and Randolph L. Rill
J. Am. Chem. Soc., **1987**, *109*, 4513-4518

[Sugawara 1995]

Yasuhiro Sugawara, Masahiro Ohta, Hitoshi Ueyama, Seizo Morita
Science, **1995**, *270*, 1646-1648

Bibliographie

[Szent 1962]

Albert Szent – Gyorgyi

Horizons in biochemistry, Eds. M.Kasha and B.Pullman, Academic Press, New York **1962**

[Tamayo 1999]

Javier Tamayo

Applied Physics Letters, **1999**, 75(22), 3569-3571

[Tamayo 1998]

Javier Tamayo and Ricardo Garcia

Applied Physics Letters, **1998**, 73(20), 2926-2928

[Tanaka 1996]

Kentaro Tanaka and Yoshio Okahata

Journal of the American Chemical Society, **1996**, 118(44), 10679-10683

[Thundat 1992]

T. Thundat, D. P. Allison, R. J. Warmack and T. L. Ferrell

Ultramicroscopy, **1992**, 42-44, 1101-1106

[Thundat 1994]

T.Thundat, D. P. Allison, R.J.Warmack,

Nucleic Acids Research, **1994**, Vol. 22, No. 20, 4224-4228

[Tran 2000]

P. Tran, B. Alavi, and G. Gruner

Physical Review Letters, **2000**, 85(7), 1564-1567

[Uchihashi 2000]

Takayuki Uchihashi, Masato Tanigawa, Makoto Ashino, Yasuhiro Sugawara, Kousuke Yokoyama, Seizo Morita, and Mitsuru Ishikawa

Langmuir, **2000**, 16, 1349-1353

[Ulman 1991]

A.Ulman

An introduction to ultrathin organic films, Academic Press, **1991**

[Umeno 1998]

D.Umeno, M.Kawasaki, and M.Maeda,

Supramolecular Science, **1998**, 5, 427-431

[Vandenberg 1991]

E.T. Vandenberg, L. Bertilsson, B. Liedberg, K. Uvdal, R. Erlandsson, H. Elwing et I. Lundström,

J. Colloid Interface Sci., **1991**, 147, 103

[Vasquez 1998]

Karen M. Vasquez and John H. Wilson

Techniques, **1998**, 23, 4-9

Bibliographie

[Vesenska 1992]

J. Vesenska, M. Guthold, C. L. Tang, D. Keller, E. Delaine and C. Bustamante
Ultramicroscopy, **1992**, 42-44, 1243-1249

[Vitaly 1994]

Vitaly A. Buckin, B.I.Kankiya, Dionisios Rentzeperis, and Luis A. Marky,
J. Am. Chem. Soc., **1994**, 116, 9423-9429

[Vollenweider 1975]

J.Vollenweider, J.M.Sogo, T.Koller,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, janvier **1975**, Vol. 72, No.1, 83-87

[Vrancken 1992]

K.C. Vrancken, P. Van Der Voort, I. Gillis-D'Hamers, E.F. Vansant et P. Grobet, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 88, 3197 (**1992**).

[Vrancken 1995]

K.C. Vrancken, K. Possemiers, P. Van der Voort et E.F. Vansant, *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 98, 235 (**1995**).

[Wan 1999]

C.Wan, T.Fiebig, S.O.Kelley, C.R.Treadway, J.K.Barton, A.H.Zewail
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1999**, 96, 6014-19

[Warman 1996]

John M. Warman, Matthijs P. de Haas, Allan Rupprecht
Chemical Physics Letters, **1996**, 249, 319-322

[Washizu 1990]

Masao Washizu, member, ieee, and Osamu Kurosawa
Ieee Transactions on Industry Applications, **1990**, 26, 6, 1165-1172

[Watanabe 2001]

Hiroyuki Watanabe, Chikara Manabe, Taishi Shigematsu, Kei Shimotani and Masaaki Shimizu
Applied Physics Letters, **2001**, 79(15), 2462-2464

[Watson 1953]

J.D.Watson, F.H.C.Crick
Nature, **1953**, 171, 737

[Williams 1992]

R.E. Williams, *Gallium arsenide processing techniques*, **Artech House** (1984).

[Wilson 1979]

Robert Wilfred Wilson and Victor A. Bloomfield
Biochemistry, **1979**, 18(11), 2192-2196

[Wissenburg 1995]

Bibliographie

Petra Wissenburg and Theo Odijk, Peter Cirkel and Michel Mandel
Macromolecules, **1995**, 28, 2315-2328

[Yoo 2001]

K. -H. Yoo, D. H. Ha, J. -O. Lee, J. W. Park, Jinhee Kim, J. J. Kim, H. -Y. Lee, T. Kawai,
and HanYong Choi

Physical Review Letters, **2001**, 87(19), 198102

[Yu 2001]

Z. G. Yu and Xueyu Song

Physical Review Letters, **2001**, 86(26), 6018-6021

[Zhang 2002]

Y.Zhang, R.H.Austin, J.Kraeft, E.C.Cox, and N.P.Ong

Physical Review Letters, novembre **2002**, Vol. 89, No. 19

Bibliographie

Transport électronique dans l'ADN

Ce travail se situe dans le cadre des recherches en électronique moléculaire. La problématique de la conduction électrique dans l'ADN a été posée en 1962 par Eley et Spivey peu de temps après la découverte de la structure en double hélice de l'ADN par Watson et Crick en 1953.

A l'heure actuelle, il n'y a pas de consensus sur les propriétés de conduction à travers l'ADN. Le transfert de charges sur des distances de quelques nanomètres a été étudié en solution et est assez bien compris. En revanche, les mesures directes sur des électrodes donnent des comportements allant de la supraconductivité induite à l'isolant, en passant par semi-conducteur.

Notre travail a été motivé par cette controverse. Nous avons étudié les propriétés électroniques de l'ADN déposé sur différentes couches moléculaires auto-assemblées sur des substrats de silicium.

La préparation des surfaces et le dépôt d'ADN constituent la première partie de notre étude. La conductivité de l'ADN a ensuite été mesurée entre des électrodes fabriquées sur un support isolant ou par le biais d'un AFM conducteur. Dans ce dernier cas, la pointe de l'AFM permet tout à la fois d'imager la surface et de servir de seconde électrode pendant la mesure électrique.

Deux types de résultats ont été obtenus : les comportements vont de l'isolant au conducteur, les résistances s'étalent sur au moins 6 ordres de grandeur, de $10^9 \Omega$ à $10^{15} \Omega$, avec toutefois une plus faible fréquence de mesure des conductivités élevées. Deux points permettent d'expliquer cette grande disparité : d'une part, l'obtention d'un contact électrique entre l'électrode et l'ADN et, d'autre part, la méthode de dépôt de l'ADN sur la surface.

La formation d'un contact électrique entre l'électrode et l'ADN nécessite des traitements en général destructifs pour la molécule. Ce contact peut être amélioré en utilisant un paquet de molécules d'ADN comme intermédiaire entre l'électrode évaporée et la corde d'ADN que l'on étudie. Cependant, cette méthode ajoute une résistance série importante. Des mesures systématiques ont été réalisées en fonction de la distance de la pointe AFM au paquet d'ADN et du nombre estimé de brins d'ADN dans la corde.

Le dépôt de l'ADN étant un facteur primordial, nous concentrons nos efforts sur ce point pour comprendre plus avant le lien entre la structure de l'ADN et ses propriétés de conduction.

Mots-clés : Electronique moléculaire, nanobiotechnologie, ADN, dépôt d'ADN, Microscopie à Force Atomique, AFM conducteur, monocouche auto-assemblée

Electronic transport in DNA

This work belongs to the field of molecular electronics. Questions about the electric conduction in DNA was firstly put in 1962 by Eley and Spivey, after the discovery of the double helix structure of DNA by Watson and Crick in 1953.

Until now, no consensus has emerged about the electric properties of DNA. Charge transfers over nanometric distances have been studied in solution and are quite well understood. However, direct measurements between electrodes present various behaviors, from induced supraconductivity to insulator or semiconductor.

This debate is at the basis of our work. We have studied the electronic properties of DNA deposited over different self-assembled molecular layers on silicon substrates.

The first part of the study deals with the preparation of the surface and deposition of DNA. Then, conductivity of DNA is measured between electrodes built on an insulating substrate or thanks to a conducting AFM. In this last case, the AFM tip allows to image the surface and to be used as a second electrode during the electrical measurement.

Two kinds of results have been obtained : insulating to conducting behaviors are observed. Resistances are spread out over at least 6 orders of magnitude, from $10^9 \Omega$ to $10^{15} \Omega$, but with a lower frequency of appearance for high conductivities. Two points can be put forward to explain such a disparity : on the one hand, production of an electrical contact between the electrode and DNA, on the other hand, DNA deposition method over the surface.

Formation of an electrical contact between the electrode and DNA implies some treatments which usually destroy the molecules. This contact can be improved by using piles of DNA molecules to link the evaporated electrode and the studied DNA rope. However, this method adds a high series resistance. Systematic measurements have been realized according to the distance of the AFM tip to the pile of DNA molecules, and to the estimated number of DNA strands in the rope.

DNA deposition being a primordial parameter, this point is deeper studied to understand the link between DNA structure and its properties of conduction.

Keywords : Molecular electronics, nanobiotechnologie, DNA, deposition of DNA, Atomic Force Microscope, conducting AFM, self-assembled monolayer
