



HAL
open science

Conductivité de l'ADN : études à l'échelle de la molécule unique

Olivier Legrand

► **To cite this version:**

Olivier Legrand. Conductivité de l'ADN : études à l'échelle de la molécule unique. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2005. Français. NNT : . tel-00110331

HAL Id: tel-00110331

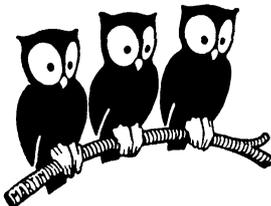
<https://theses.hal.science/tel-00110331v1>

Submitted on 27 Oct 2006

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.

DÉPARTEMENT DE PHYSIQUE
DE L'ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE



THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

(Spécialité Physique)

présentée par :

OLIVIER LEGRAND

pour obtenir le titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

sujet de la thèse :

**Conductivité de l'ADN :
études à l'échelle de la molécule unique**

soutenue le 31 mars 2005 devant la commission d'examen :

Mr.	Ulrich Bockelmann	Directeur de thèse
Mme.	Hélène Bouchiat	Rapporteuse
Mr.	Denis Côte	
Mr.	Jean-Noel Patillon	Examineur
Mme.	Régine Perzynski	Examinatrice
Mr.	Dominique Vuillaume	Rapporteur

Remerciements

Je remercie tout d'abord mon directeur de thèse, Ulrich Bockelmann, ainsi que le responsable du laboratoire MERL du Centre de Recherche Motorola, Jean Noel Patillon, et le directeur du Laboratoire Pierre Aigrain, Claude Delalande. Un grand merci aussi à Denis Cote, qui m'a fait profiter de son savoir et de sa bonne humeur durant ces trois années. De même, cette thèse n'aurait pas été aussi agréable sans mes compagnons de salle de manip Rafaele Attia, Cédric Gentil, et François Pouthas.

De nombreuses personnes de Motorola, de l'Ecole Normale, de l'université de Lecce, de l'IBPC, et du LPN m'ont prêté main-forte, par une aide directe ou par de simples conseils. La liste est longue, et je risque hélas d'en oublier : Adrian Bachtold, Thierry Bizebard, Laurence Goux Capes, Yong Chen, Aurélien Crut, David Darson, Alexandre Dawid, Antonio Della Torre, Zaïre Dissi, Pierre Desbiolles, Emilie Dupont, Arianna Filoramo, Sophie Guéron, Fabien Guillemot, François Heslot, Julien Husson, Yong Jin, Noël Le Rolland, Olivier Marnette, Anne Matignon, Xavier Monnin, Pascal Morfin, Martial Nicolas, Philippe Passe, Anne Pépin, Laurent Rea, Nicolas Regnault, Ross Rinaldi, Philippe Thomen, Louis-Anne de Vaultier, Carole Viaud.

Table des matières

Remerciements	iii
1 Introduction	1
2 Quelques notions de biologie moléculaire	3
2.1 Qu'est ce que l'ADN ?	3
2.1.1 Une succession de nucléotides	3
2.1.2 La double hélice	3
2.2 De l'ADN aux protéines	5
2.2.1 La transcription	6
2.2.2 Structures secondaires et tertiaires de l'ARN	7
2.2.3 La traduction	8
2.3 Techniques de biologie moléculaire	9
2.3.1 La Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR)	9
2.3.2 L'électrophorèse sur gel	11
3 Enjeux, buts et contraintes des expériences présentées	15
3.1 Conductivité de l'ADN	15
3.1.1 Le cadre général : l'électronique moléculaire	15
3.1.2 Transferts de charges à travers l'ADN : mécanismes et paramètres	18
3.1.3 Bilan bibliographique	20
3.2 Mesures de forces sur molécule unique d'ADN et d'ARN	26
3.2.1 Motivations et selection de travaux antérieurs	26
3.2.2 Expérience projetée	28
3.3 Bilans des buts et des contraintes des expériences projetées	28
4 Micro-manipulation de molécules uniques : montage optique et électronique.	31
4.1 Micro-manipulation d'une molécule unique	31
4.1.1 Panorama des techniques existantes : manipulation d'une micro-bille	31
4.1.2 Principe d'une pince optique[1]	33
4.1.3 Le double piège optique	35
4.2 Electroniques de mesures	38
4.2.1 Mesures de forces	38
4.2.2 Mesures de conductivités	41
5 Calibrage et étude des pinces optiques sur une surface opaque	43
5.1 Calibrage du piège optique	43
5.1.1 Scan d'une bille fixe sur une surface	43
5.1.2 Oscillation forcée d'une bille	46
5.1.3 Analyse du mouvement brownien d'une bille	50

5.1.4	Variation du coefficient de friction γ en fonction de la température et de la hauteur z entre le piège optique et la surface de silicium	55
5.1.5	Conclusions sur les trois techniques de calibrage	56
5.2	Mesures de forces sur un substrat opaque	57
5.2.1	Dérives thermiques du système optique	57
5.2.2	Effets thermiques du laser sur l'échantillon	58
5.2.3	Variations du calibrage du piège en fonction de la distance entre la bille et la surface	63
5.3	Conclusions sur le dispositif expérimental	65
6	Mesures de conductances de molécules d'ADN	69
6.1	Electrodes de mesures	69
6.1.1	Description	69
6.1.2	Nettoyage des électrodes	70
6.2	Synthèse d'un double brin d'ADN porteur de groupes disulfide	71
6.2.1	Le couple thiol-or	71
6.2.2	Synthèse PCR d'un double brin d'ADN porteur de groupes amine	72
6.2.3	Couplage avec du dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate)	73
6.3	Tests d'affinité entre l'ADN et l'or	75
6.3.1	Test de Mirkin	75
6.3.2	Tests d'adhésion entre l'ADN et une surface d'or par des expériences de fluorescence	75
6.4	Synthèse des billes fonctionnalisées et assemblage du système moléculaire final	78
6.5	Unicité et dépôt d'une molécule d'ADN	78
6.5.1	Capture d'une molécule d'ADN reliant deux billes de silice.	78
6.5.2	Mesure de force et unicité de la molécule : modèle du vers	79
6.5.3	Dépôt de la molécule	82
6.6	Principe de la mesure	83
6.7	Choix du tampon	85
6.8	Choix de la fréquence	87
6.9	Mesures sur molécules uniques	88
6.9.1	Mesures types	88
6.9.2	Mesures 2 points en solution et à sec	88
6.9.3	Ajout d'ions Mg^{2+}	89
6.9.4	Mesures 4 points en solution et à sec	90
6.9.5	Calcul de la borne inférieure de la résistance mesurée	90
6.10	Discussions des résultats et perspectives	92
7	Mesures de forces sur des molécules d'ARN : dégrafage d'une structure secondaire	97
7.1	Construction moléculaire hybride d'ADN et d'ARN	97
7.2	Résultats	98
7.2.1	Construction "C"	98
7.2.2	Construction "B" : dégrafage d'un fragment d'ARN	99
7.3	Analyse des résultats	101
7.4	Conclusions et perspectives	104

8 Conclusion

105

Chapitre 1

Introduction

Même si le métissage des connaissances des biologistes et des physiciens n'est pas une chose récente, ce n'est que récemment que les physiciens travaillent sur des systèmes à l'échelle de la molécule unique.

La biologie moléculaire est une science moderne. La structure de l'ADN et son rôle dans le stockage de l'information génétique par exemple sont des découvertes qui datent d'une cinquantaine d'années seulement. Depuis n'a cessé de croître notre compréhension du monde du vivant à l'échelle des molécules. En parallèle, notre conscience du niveau de complexité de tous ces processus moléculaires intriqués entre eux a elle aussi augmenté, et on n'a de cesse de se poser de nouvelles questions.

En plus de ceux effectués en biologie moléculaire, d'autres progrès (principalement en optique) rendent possible aujourd'hui la visualisation ou la mesure de l'action d'une molécule unique, et permettent de répondre de manière originale et innovante aux questions des biologistes. Les physiciens se sont intéressés depuis au fonctionnement de nombreux systèmes moléculaires, comme les moteurs moléculaires en tant que "micro machines" (ADN polymérase, myosine, canaux ioniques,...), à l'élasticité de polymères tel que l'ADN ou l'ARN, à l'énergie d'une liaison entre deux molécules, etc...

Nous nous intéresserons dans ce manuscrit principalement aux propriétés de transport de charges électriques de la molécule d'ADN (propriétés d'intérêts technologiques dans le cadre de l'électronique moléculaire), ainsi qu'à quelques mesures de forces d'intérêts biologiques sur des systèmes mixtes d'ADN et d'ARN. Notre étude sera effectuée à l'échelle de la molécule unique. Après avoir expliqué dans une première partie quelques notions de biologie moléculaire nécessaires à la bonne compréhension de nos travaux, nous exposerons les buts et les contraintes des expériences projetées. Une grande partie de la thèse a consisté à développer un dispositif expérimental complexe. Nous détaillerons donc dans une troisième partie le dispositif expérimental réalisé, puis le caractériserons (calibrage et propriétés diverses). Enfin, nous exposerons dans nos deux derniers chapitres les résultats obtenus sur la conductivité de l'ADN et sur les mesures de forces sur molécule unique.

Chapitre 2

Quelques notions de biologie moléculaire

La biologie moléculaire est une science moderne en pleine explosion. En 1953, Watson et Crick proposent un modèle de la structure de l'ADN qui suggère comment l'information génétique est stockée au niveau moléculaire. En l'espace de cinquante ans des progrès impressionnants ont été réalisés, permettant de nos jours de réaliser le décodage de codes génétiques entiers, le clonage, des aliments transgéniques ou bien encore la thérapie génique. Ce chapitre a pour but d'introduire quelques notions de biologie moléculaire utiles à la compréhension de quelques aspects des travaux exposés dans ce manuscrit.

2.1 Qu'est ce que l'ADN ?

2.1.1 Une succession de nucléotides

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est une succession de briques élémentaires composées d'un sucre à cinq carbones appelé désoxyribose, un groupement phosphate et une base azotée. Il existe quatre bases azotées pour l'ADN : l'adénine (A), la thymine (T), la cytosine (C) et la guanine (G). L'association d'un sucre, d'un phosphate et d'une base forme une sous unité appelée nucléotide (cf. figure 2.1). Ces nucléotides sont reliés de manière covalente pour former une chaîne polynucléotidique composée d'un squelette (alternance monotone de phosphates et de sucres) porteur d'une succession de bases azotées. Cette chaîne est appelée ADN simple brin. La succession de plusieurs bases représente une séquence génétique.

2.1.2 La double hélice

Lors d'un cycle cellulaire, l'ADN explore de multiples configurations topologiques. La structure la plus stable (dans une solution de salinité comparable à celle située au sein de la cellule et en l'absence d'enzymes) est constituée de deux chaînes polynucléotidiques complémentaires, maintenues ensemble par des liaisons hydrogène, et compactées sous la forme d'une double hélice . Deux couples de bases en vis à vis reliés par des liaisons hydrogène sont particulièrement stables :

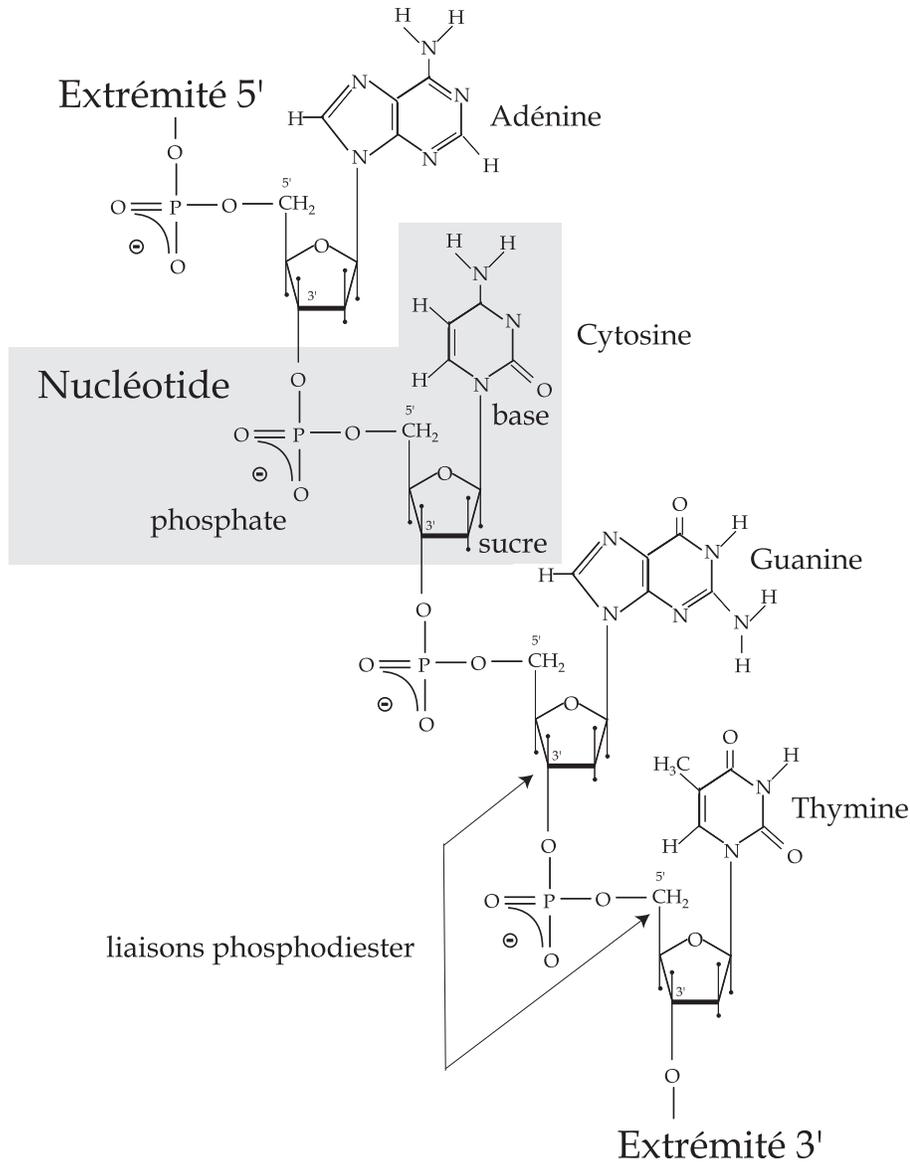


FIGURE 2.1: Structure chimique d'un simple brin d'ADN constitué de quatre nucléotides portant chacun une base différente. Les nucléotides sont joints les uns aux autres pour former une chaîne polynucléotidique, dans laquelle le phosphate attaché au carbone 5' d'un sucre est lié au groupement hydroxyle attaché au carbone 3' du sucre suivant par une liaison phosphodiester. Un brin d'ADN possède donc une orientation puisqu'une extrémité porte un groupement 5'-phosphate et l'autre un groupement 3'-hydroxyle. Cette asymétrie permet de définir le sens de lecture de la séquence de bases d'un gène.

il s'agit des paires de bases AT via deux liaisons hydrogène (A et T sont dites complémentaires) et des paires de bases GC via trois liaisons hydrogène (G et C sont dites complémentaires). En conséquence, deux simples brins portant des séquences de bases complémentaires s'associent dans une structure d'ADN double brin(cf. figure 2.2) : cette association est appelée hybridation. L'ensemble des liaisons hydrogène entre les bases complémentaires en regard, ainsi que les interactions attractives entre les bases empilées le long d'un simple brin d'ADN (forces de Van der

Waals et interactions hydrophobes) stabilisent la structure double brin en s'opposant aux répulsions électrostatiques entre groupements phosphate chargés négativement. Cependant, l'énergie des liaisons hydrogène est relativement faible (de l'ordre de 10 à 40 $kJ.mol^{-1}$), et il est possible de séparer les deux simples brins hybridés par une augmentation de température de quelques dizaines de Kelvin, selon la longueur de la chaîne : c'est la dénaturation. La forme la plus courante de l'ADN est la double hélice B. Dans ce cas, la distance entre deux bases successives est de 0,34 nm et l'hélice fait un tour complet toutes les 10 bases. Ainsi, la longueur cristallographique d'une molécule double brin de 1000 paires de bases (1 kbp) est de 0,34 μm . Le diamètre de la molécule double brin est de 2 nm. Il est aussi utile de savoir que 1,52 picomol d'ADN de 1 kbp pèsent un microgramme. Il existe sous certains environnements ou contraintes d'autres formes stables de l'ADN. L'ADN-B est la forme présente dans les conditions physiologiques "standard", l'ADN-A (surenroulement) se retrouve dans des conditions de faible hydratation, l'ADN-S (complètement désenroulée, en forme "d'échelle") lorsqu'on étire la molécule avec une force supérieure à 60 pN, l'ADN-Z ou ADN zigzag (double hélice gauche, elle n'a pas la même chiralité que les autres formes) lorsqu'on applique une torsion à la molécule ou encore l'ADN-P (dénaturation et orientation des bases vers l'extérieur de la double hélice).

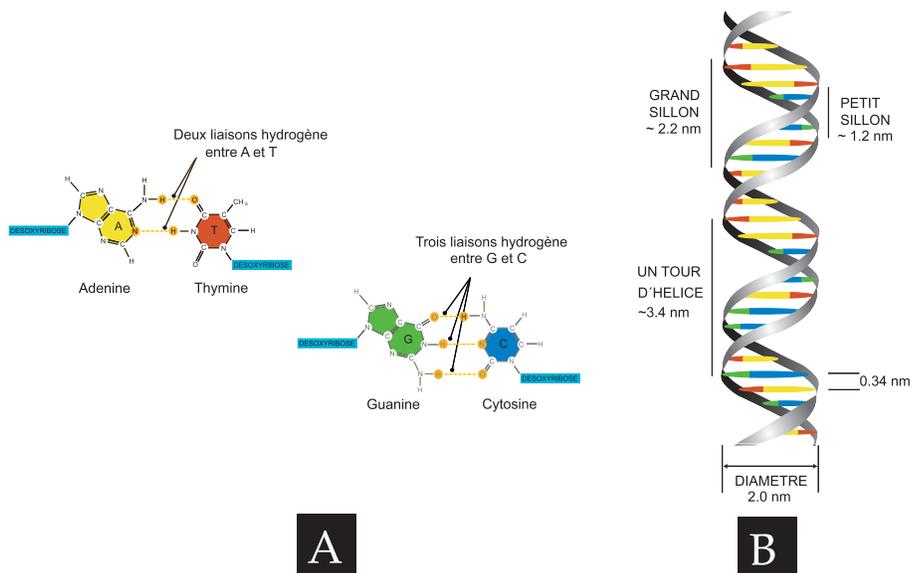


FIGURE 2.2: **A.** spécificité de l'appariement entre les bases complémentaires. L'adénine et la thymine sont associées par deux liaisons hydrogène, le couple cytosine-guanine, plus stable, par trois. **B.** deux simples brins d'ADN s'apparient en double hélice, dont la structure a été décrite la première fois par Watson et Crick (l'adénine est représentée en jaune, la thymine en rouge, la cytosine en bleu et la guanine en vert).

2.2 De l'ADN aux protéines

Une molécule d'ADN double brin peut atteindre chez certains organismes jusqu'à un mètre de long (cette molécule est compactée dans la cellule). Il y a en général au sein d'une cellule plusieurs de ces molécules, le long desquelles on peut distinguer des sous-ensembles d'acides nucléiques, appelés gènes. L'ensemble des gènes d'un organisme vivant constitue son génome. Les quatre bases A T G et C de l'ADN constituent l'alphabet qui code l'information génétique. L'information

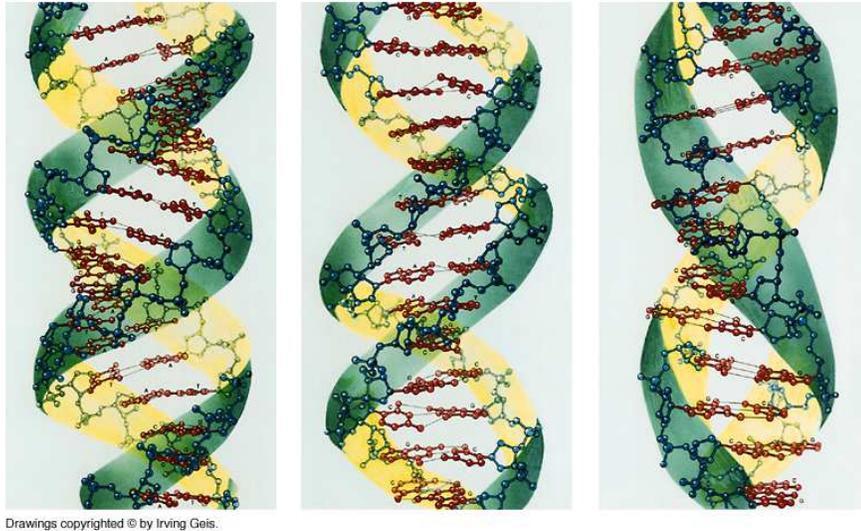


FIGURE 2.3: Représentation de trois formes de double hélice d'ADN. La forme A (à gauche) surenroulée se retrouve dans des conditions de faible hydratation. La forme B (au centre) est la forme qui est présente dans les conditions physiologiques standards. La forme Z (à droite) a la particularité de ne pas avoir la même chiralité que les autres : c'est une double hélice gauche

contenue dans la séquence de bases associée à un gène permet de diriger la production de protéines et d'enzymes nécessaires au fonctionnement de la cellule. Cette information est la même pour toutes les cellules d'un même organisme (mis à part les gamètes). Cependant, tous les gènes ne sont pas exprimés de la même manière dans chaque cellule. Par exemple, certains des gènes exprimés dans une cellule de cheveux (production de kératine) doivent être différents de ceux exprimés dans une cellule pancréatique nécessitant une grande production d'insuline. Cela est assuré par un système complexe de régulation de l'expression des gènes. Sans entrer dans une description aussi détaillée, il est cependant possible de dégager les grandes lignes du processus permettant de passer de l'ADN en protéines. La synthèse protéique comporte deux étapes : la transcription et la traduction.

2.2.1 La transcription

L'ADN n'est pas directement traduit en protéines. Il existe un intermédiaire, l'ARN (Acide Ribonucléique). La transcription de l'ADN en ARN a lieu en présence d'un substrat (l'ADN), d'une enzyme (l'ARN polymérase), d'ions Mg^{2+} et de ribonucléoside 5'-triphosphates qui servent de matière première. Les bases de ces nucléosides triphosphates (ATP, GTP, UTP, CTP) sont quasi-identiques à celles utilisées pour la synthèse de l'ADN (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), à l'exception de la thymine (T) qui est remplacée par l'uracile (U) (les deux bases ne diffèrent que par un seul groupe methyl).

La transcription de l'ADN en ARN se déroule en trois étapes :

- l'initiation consiste en la reconnaissance, par la polymérase, d'une séquence spécifique de l'ADN appelée promoteur, sur laquelle elle se fixe. Le promoteur marque en quelque sorte le début d'un gène. Pour un double brin d'ADN donné, un seul des brins est transcrit.

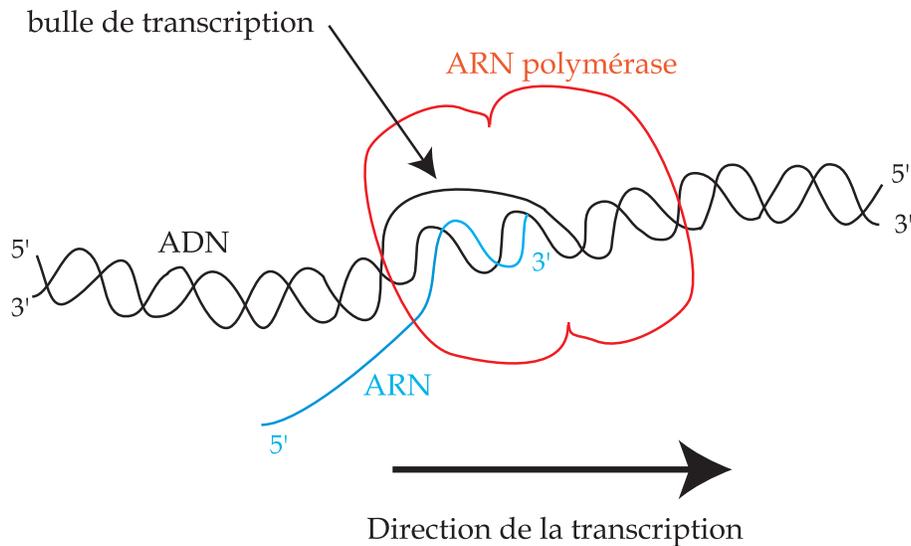


FIGURE 2.4: Le processus de transcription : La polymérase avance sur l'ADN de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' du brin codant d'ADN. A chaque pas, la polymérase incorpore un nucléotide provenant de la solution dans la chaîne d'ARN qu'elle synthétise. Pour cela, elle ouvre partiellement la double hélice d'ADN (formation d'une bulle de transcription) ; l'ordre d'incorporation est basé sur l'appariement des paires de bases : les nucléotides incorporés sont complémentaires du brin d'ADN copié, à l'exception près que la thymine (T) est remplacée par l'uracil (U) dans l'ARN.

- l'élongation, dont on décrit schématiquement le principe sur la figure 2.4 est la phase durant laquelle la polymérase copie l'information génétique sous forme d'ARN. L'ARN est synthétisé de l'extrémité 5' à l'extrémité 3'.
- la terminaison marque la fin de la transcription : une séquence spécifique arrête la polymérase qui se dissocie de l'ADN et de l'ARN.

Il existe très majoritairement trois types d'ARN : les ARN messagers (ARNm) codent pour des protéines, les ARN ribosomiques (ARNr) sont les constituants essentiels du ribosome, et les ARN de transferts (ARNt) sont des petits ARN dont le rôle lors de la traduction est détaillé par la suite¹.

2.2.2 Structures secondaires et tertiaires de l'ARN

Une fois synthétisées, les bases de l'ARN interagissent entre elles. Contrairement à l'ADN où l'hybridation s'effectue entre deux simples brins, l'ARN a plutôt tendance à "s'auto hybrider". Ainsi l'ARN peut former une double hélice A grâce à 3 liaisons hydrogène entre ses bases C et G et 2 liaisons hydrogène entre ses bases A et U. La séquence de l'ARN n'étant pas complémentaire, ces hybridations ne sont que partielles, et sont à l'origine de structures type tige-boucle, ou bien encore de pseudonœuds (cf. figure 2.5). Ces arrangements en structures bidimensionnelles sont appelés structures secondaires. La structure tertiaire de l'ARN résulte de l'interaction spatiale des motifs de structures secondaires entre eux et donne lieu à un repliement dans l'espace complexe de la molécule.

¹Par ailleurs, on connaît et on découvre encore de nombreux autres petits ARN dont certains remplissent un rôle important dans la cellule [2].

Les structures secondaires de l'ARN permettent d'obtenir des molécules plus stables, ayant une structure tertiaire donnée, et donc une fonction catalytique ou régulatrice donnée.

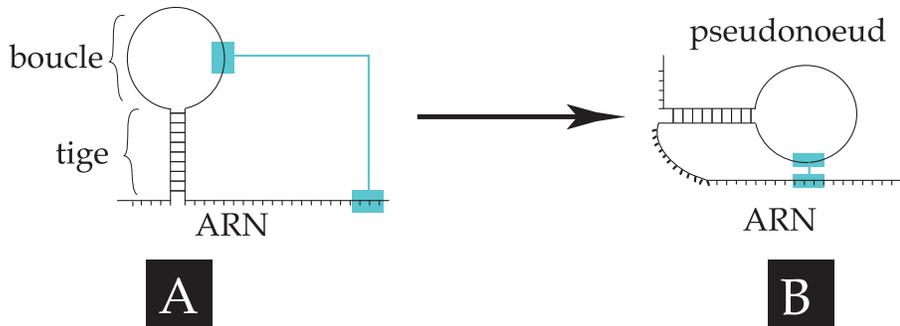


FIGURE 2.5: Structures secondaires de l'ARN : **A.** une molécule d'ARN s'hybride partiellement, suite à la complémentarité de deux fragments de sa séquence, donnant lieu à une structure type "tige-boucle". **B.** En cas d'affinités entre zones espacées d'une tige-boucle (zones en bleu), l'ARN se replie en pseudonoed (figure de droite).

Sur la figure 2.6 se trouve une illustration de structure secondaire et tertiaire d'un fragment d'ARN.

2.2.3 La traduction

Lors de la traduction d'un brin d'ARNm en protéine (figure 2.7), la séquence nucléotidique est lue par triplets de bases, appelés codons. La traduction se déroule en trois étapes :

- durant l'initiation, les sous unités du ribosome (formés d'ARNr et de protéines) se regroupent au niveau d'un codon initiateur AUG ou CUG (aussi appelé codon "start").
- pendant l'élongation, s'établit un défilé d'ARNt porteurs d'acides aminés. L'ARNt s'insère tout d'abord à l'intérieur du site A du ribosome. Lorsque le ribosome se déplace d'un codon, l'ARNt se retrouve au niveau du site P du ribosome et transmet son peptide à la chaîne polypeptidique en cours de synthèse. L'ARNt initialement au niveau du site P se retrouve quand à lui éjecté, sans son peptide. La succession des ARNt au sein du ribosome dépend de leur complémentarité avec la séquence de codons de l'ARNm : chaque codon commande l'insertion d'un aminoacide dans la chaîne peptidique. On trouve vingt types d'acides aminés différents dans les protéines du vivant. Le code génétique qui regroupe les correspondances codon/acide aminé est commun à tous les organismes connus.
- la terminaison à lieu au niveau d'un codon "stop" (UAA, UAG ou UGA).

L'implication de nombreuses molécules lors de la transcription et de la traduction (répresseurs, activateurs, facteurs de transcription, enzymes de restrictions) rend ces processus biologiques extrêmement complexes et permet notamment la diversité de l'expression des gènes en fonction des besoins de la cellule.

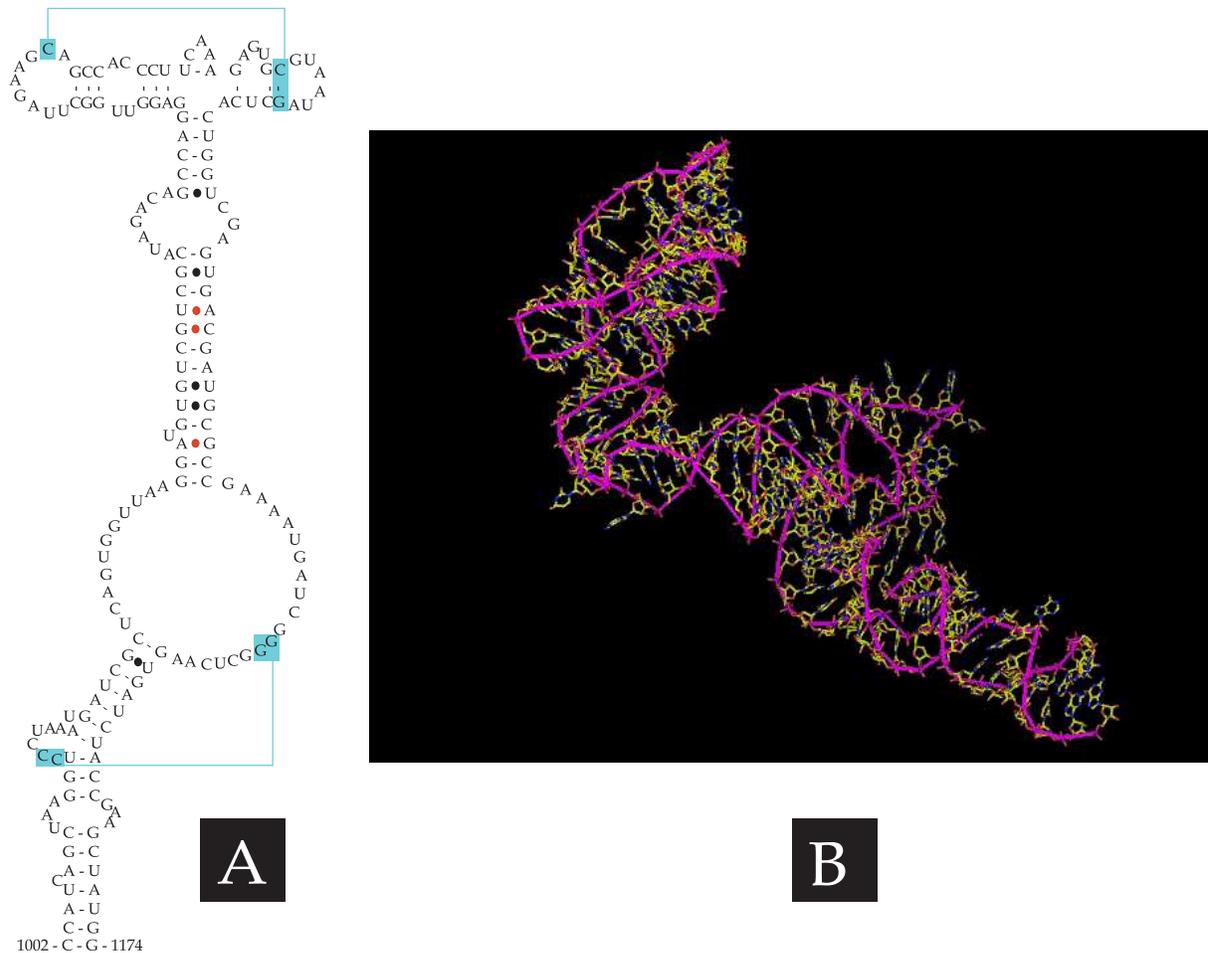


FIGURE 2.6: **A.** Structure secondaire d'un fragment de l'ARN ribosomique "23S" de *Deinococcus Radiodurans* dans le ribosome (nucléotides 1002 à 1174). **B.** structure tri-dimensionnelle de cette même séquence dans le ribosome, c'est à dire en tenant compte des interactions avec le reste de la séquence et des protéines du ribosome.

2.3 Techniques de biologie moléculaire

2.3.1 La Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR)

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une amplification enzymatique permettant de fabriquer des copies multiples d'un segment spécifique d'ADN [3]. Elle a été mise au point en 1984-1985 par le Cetus Corp, le scientifique Kary Mullis² et ses collaborateurs [4, 5]. Elle a eu un impact très important dans le domaine de l'analyse des gènes et est devenue une technique très couramment employée dans les laboratoires de biologie moléculaire. Les applications de la PCR sont très variées. Il s'agit tout d'abord une technique de synthèse : elle permet en effet la synthèse in-vitro d'une quantité significative d'un fragment d'ADN donné de manière simple et rapide (quelques heures). C'est aussi une méthode de détection : la PCR permet de détecter une séquence d'ADN recherchée dans un échantillon en l'amplifiant considérablement.

²Kary Mullis a obtenu le Prix Nobel de Chimie pour l'invention de la PCR en 1993

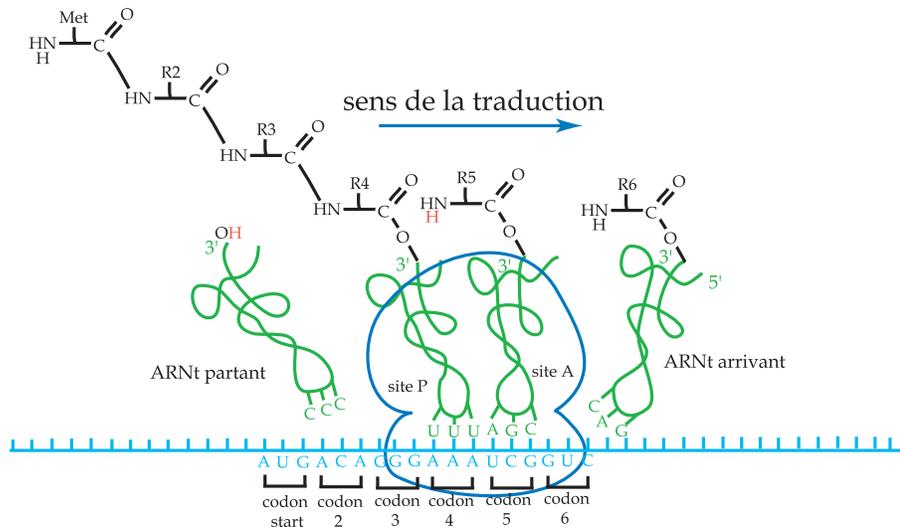


FIGURE 2.7: Traduction d'un brin d'ARNm en protéine : Des ARNt se succèdent au sein du ribosome et cèdent tour à tour le peptide qu'ils portent à une chaîne polypeptidique en cours de synthèse. La succession de ces ARNt est directement liée à la séquence des codons de l'ARNm.

Le principe de la PCR est schématisé sur la figure 2.8. Pour amplifier de manière spécifique un fragment d'ADN, il faut tout d'abord choisir deux courtes séquences d'ADN simple brin (des oligonucléotides de 15 à 40 bases) appelées amorces. Les amorces ont la propriété de reconnaître spécifiquement une séquence cible de l'ADN double brin. Les séquences cibles sont au nombre de deux, chacune étant localisée sur un brin, et encadrent le segment d'intérêt que l'on désire amplifier. En plus des amorces et du substrat, le mélange réactionnel initial comprend une enzyme appelée ADN polymérase et des désoxyNucléotides TriPhosphates (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). Cette réaction s'effectue en trois étapes successives constituant un cycle de PCR qui sera ensuite répété entre 25 et 35 fois :

- première étape, la dénaturation : elle consiste à dénaturer l'ADN double brin en chauffant le mélange ($\sim 94^{\circ}\text{C}$).
- deuxième étape, l'appariement des amorces : le milieu réactionnel est ensuite refroidi, ce qui permet aux amorces de s'hybrider spécifiquement au niveau des cibles. La température utilisée dépend de la séquence et de la longueur des amorces ainsi que du contenu en sel du milieu réactionnel. Elle se situe entre 50°C et 65°C .
- troisième étape, l'élongation : durant cette phase, une enzyme particulière, l'ADN polymérase, synthétise deux nouveaux brins à partir des deux amorces en utilisant l'ADN simple brin comme matrice et les nucléotides comme briques élémentaires. Cette étape s'effectuant vers 70°C , elle nécessite l'utilisation d'une enzyme stable à haute température. Une polymérase très couramment utilisée, est appelée Taq polymérase en raison de sa source, une bactérie thermo-résistante dénommée *Thermus Aquaticus* que l'on trouve dans la mer près des sources chaudes. La réaction s'effectue dans un appareil thermo-controlé dont les cycles de température sont gérés par ordinateur.
- finalement, la répétition des cycles : à la fin du premier cycle, on dispose d'une copie de chaque brin de l'ADN d'intérêt. La répétition du processus permet d'amplifier de manière exponentielle l'ADN souhaité car chaque brin nouvellement synthétisé peut servir de matrice pour la réaction. Le nombre théorique de copies double brin est de 2^n après n cycles.

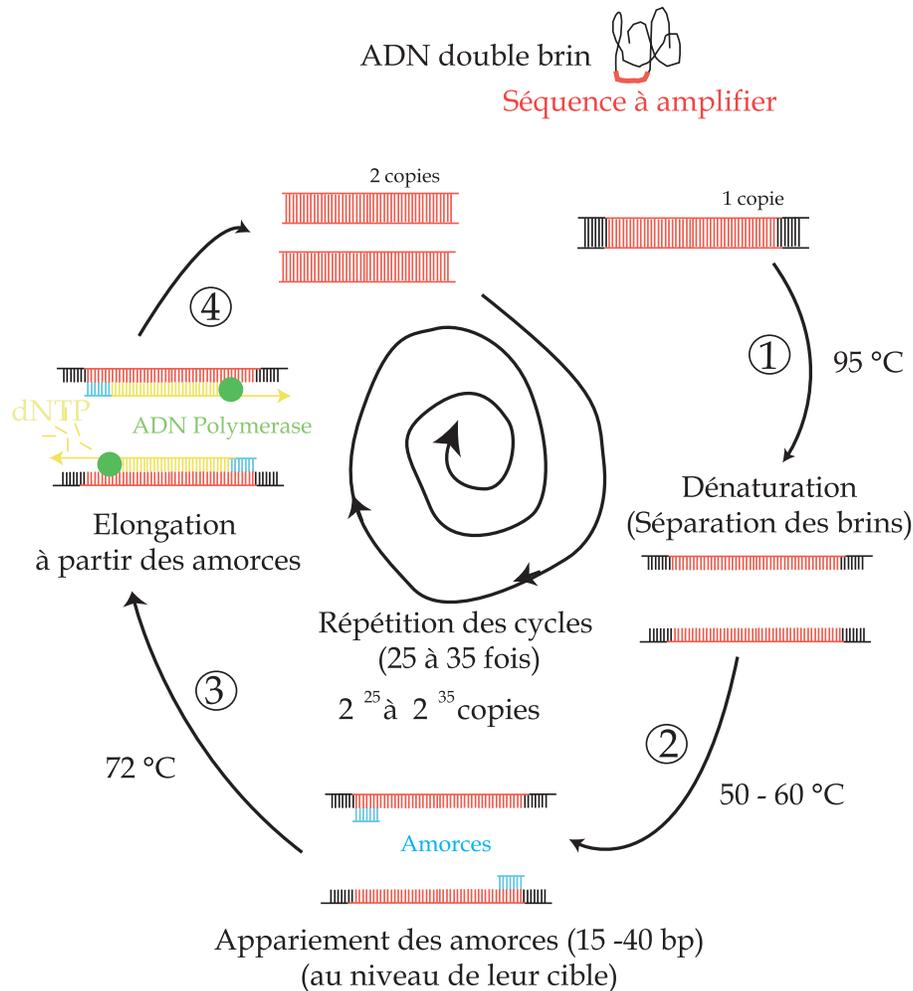


FIGURE 2.8: Principe de la PCR : amplification exponentielle spécifique d'un fragment d'ADN. Parmi les brins d'ADN en solution, ceux à amplifier jouent le rôle de patrons pour des ADN polymérase qui les répliquent en assemblant des nucléotides (dNTP) présents eux aussi en solution. La séquence à amplifier est sélectionnée par les amorces (15 à 40 bases) utilisées.

Cependant, après un certain nombre de cycles, l'appauvrissement du milieu en nucléotides, amorces ou enzymes ne permet plus une augmentation exponentielle. Une trentaine de cycles génèrent environ 1 million de copies.

A l'issue de la PCR, tous les réactifs ne sont pas consommés. Une étape de purification permet d'éliminer du milieu réactionnel sels, nucléotides non-incorporés, amorces et enzymes, pour ne conserver que les ADN synthétisés.

2.3.2 L'électrophorèse sur gel

Cette technique est utilisée afin de séparer, au sein d'un mélange, des molécules d'ADN de tailles différentes. Elle sert très souvent à isoler un morceau d'ADN chromosomal de longueur donnée à la suite de l'utilisation d'enzymes de restrictions, ou encore à vérifier le bon déroulement d'une PCR. Le principe de l'électrophorèse est fondé sur la charge négative que porte le squelette

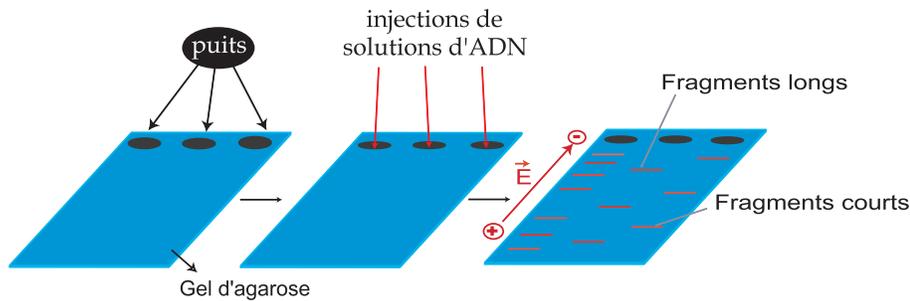


FIGURE 2.9: Electrophorèse sur gel d'agarose. Le gel fondu est coulé dans un moule contenant un peigne. Une fois le gel durci, le peigne est enlevé pour former des puits dans lesquels les échantillons d'ADN à analyser sont déposés. Un champ électrique est appliqué et provoque la migration des différents fragments à travers le gel. Les fragments les plus courts migrent plus rapidement que les fragments plus longs.

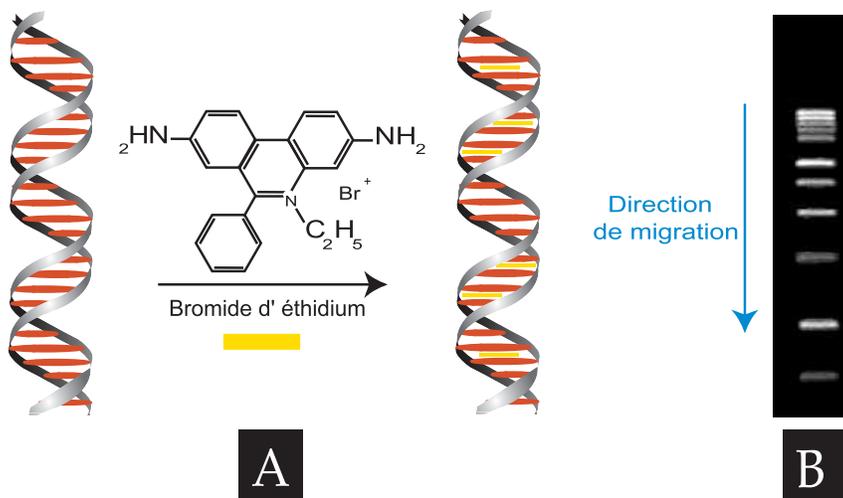


FIGURE 2.10: **A.** La révélation d'un gel s'effectue en utilisant le bromure d'éthidium qui est susceptible de s'intercaler entre les bases de la molécule d'ADN. Les brins d'ADN ainsi traités deviennent fluorescents sous une lampe UV. **B.** Photo d'un gel prise sous lampe UV. Les fragments les plus courts (en bas) ont migré plus rapidement que les fragments les plus longs (en haut)

phosphate des molécules d'ADN. L'application d'un champ électrique au sein d'un mélange provoquera un déplacement des molécules d'ADN vers l'anode. Dans un milieu homogène, les forces de friction entre l'ADN et le milieu environnant sont, comme la charge, proportionnelles à la longueur de la chaîne. Si maintenant l'électrophorèse est réalisée dans un gel, les molécules plus petites que les mailles du gel ne verront aucun changement, tandis que celles qui sont plus grandes que la taille des pores se feront piéger et devront se libérer par reptation. En utilisant un support permettant de diminuer sensiblement les vitesses de migration des brins longs par rapport aux brins courts, il devient possible de séparer des fragments de tailles différentes. Les figures 2.9 et 2.10 présentent le schéma général de réalisation d'un gel ainsi que la méthode utilisée pour visualiser les positions relatives des fragments une fois la migration arrêtée. La substance choisie pour réaliser le gel est évidemment très importante. L'utilisation de gels polyacrylamides permet de séparer des molécules d'ADN avec une résolution d'une base, mais est limitée à des tailles

inférieures à une kilobase. Pour les molécules plus longues, on utilise une substance naturelle extraite des algues, l'agarose, qui offre cependant une moins bonne résolution.

Chapitre 3

Enjeux, buts et contraintes des expériences présentées

3.1 Conductivité de l'ADN

3.1.1 Le cadre général : l'électronique moléculaire

Depuis une trentaine d'années, l'industrie des semiconducteurs suit la "loi de Moore", selon laquelle la performance et la densité des transistors des circuits intégrés (mémoires et processeurs) doublent tout les 18 mois[6]. Cette loi empirique ne pourra plus s'appliquer dans un avenir proche, quand la technologie du silicium atteindra ses limites physiques.

Il y a encore quelques années, le problème résidait dans la miniaturisation de la technologie du silicium : des limites de la lithographie optique (quelques centaines de nanomètres), nous sommes passés aux limites de la lithographie électronique ou par rayons X (quelques dizaines de nanomètres). Aujourd'hui, on peut faire croître des semiconducteurs sur des couches extrêmement minces de l'ordre du nanomètre, soit quelques couches moléculaires, et des techniques de laboratoire comme la Dip-Pen Nanolithography (DPN)[7] ou le Scanning Tunnelling Microscope (STM)[8] permettent de "dessiner" des traits à l'échelle de quelques molécules ou quelques atomes.

Le problème n'est donc plus vraiment de miniaturiser la technologie du silicium, car nous serons bientôt arrivés à une échelle physique où elle ne fonctionne plus, et ce pour plusieurs raisons [9]. Si l'on considère le cas d'un transistor MOS (Metal Oxid Semiconductor) que l'on retrouve à l'heure actuelle dans la majorité des circuits intégrés, la miniaturisation de ses sous parties (source, drain, grille) nécessite l'augmentation de la concentration en atomes dopant afin de garantir une résistance faible du composant. Depuis trois décennies leur taille diminue et leur vitesse de commutation ne cesse de croître. Cependant il existe une limite supérieure pour la concentration d'atomes dopants au delà de laquelle le cristal semiconducteur n'est plus thermodynamiquement stable. Cette limite est de l'ordre de grandeur du taux de dopage utilisé

actuellement. De même, si la miniaturisation de l'épaisseur d'oxyde entre la grille et le canal au nanomètre est possible techniquement, son utilisation reste délicate : à cette échelle risque d'apparaître de la conduction par effet tunnel entre la grille et la source ou le drain. Enfin, la taille des composants utilisés aujourd'hui est si petite que le nombre total d'atomes dopants peut être de l'ordre de la centaine : nous nous trouvons à une limite au delà de laquelle la variation de quelques atomes dopants sur leur nombre total induit une grande variabilité de comportements entre transistors.

L'idée d'utiliser une molécule pour l'électronique date des années 70 (premier brevet en 1972 par IBM [10]). On voit plusieurs avantages à son utilisation [11] :

- Sa taille. Le diamètre d'une molécule est de l'ordre du nanomètre ou plus, et sa longueur peut être très variable.
- Ses propriétés d'auto assemblage et de reconnaissance spécifique (comme l'hybridation de l'ADN). L'idée d'utiliser ce genre de propriétés pour synthétiser des nanostructures précises ou pour modifier des propriétés électroniques à des endroits ciblés est en effet séduisante.
- Sa synthèse. Dans un cristal de silicium dopé, on ne connaît pas exactement l'emplacement des atomes dopants, ni leur nombre exact ce qui peut induire une variabilité pour de très petits composants. Les outils de synthèse d'une molécule bien précise sont eux très développés.
- Sa stéréochimie dynamique. Une molécule peut posséder de nombreux états stables, et donc plusieurs états aux propriétés électroniques ou optiques variées. La molécule de retinal par exemple est une "photodiode moléculaire" : elle bascule entre deux états stables lorsqu'elle reçoit un photon, et réémet une impulsion électrochimique.

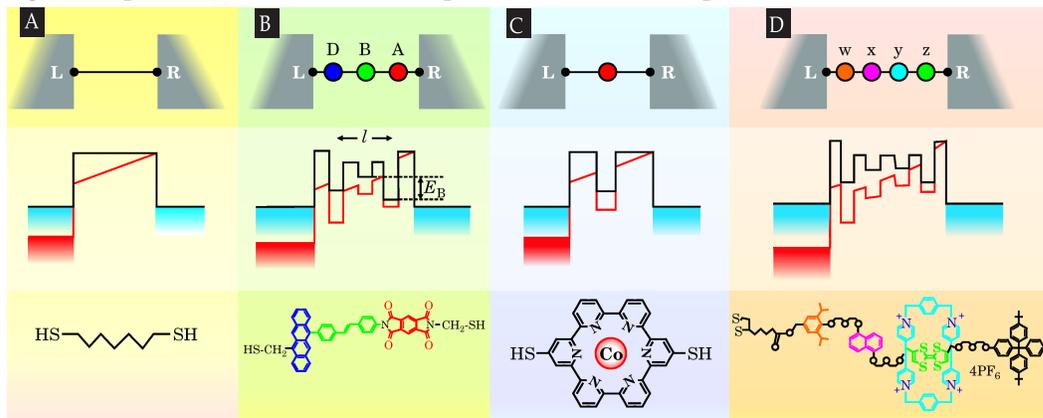


FIGURE 3.1: [d'après [11]] Exemples de molécules reliant deux électrodes L (à gauche) et R (à droite). Dans la partie du milieu, la ligne noire correspond aux niveaux d'énergies électroniques des molécules sans perturbation, et la ligne rouge aux niveaux d'énergies sous l'effet d'un champ électrique. **A**. Chaîne linéaire (alcane) **B**. Molécule "diode" donneur-pont-accepteur (**d**onor-**b**ridge-**a**ccpteur) avec une distance l entre le donneur et l'accepteur et une différence d'énergie E_B entre l'accepteur et le pont **C**. Boîte quantique moléculaire **D**. Molécule organique complexe possédant différentes sous-unités.

La question étant maintenant de savoir quelles molécules peuvent raisonnablement conduire du courant... Un des principaux problèmes, dans une mesure à l'échelle de la molécule unique, reste le contact entre les électrodes et la molécule. La nature de ce contact n'est pas bien définie : on ne sait pas toujours si la liaison est covalente, et on peut difficilement parler de surface de contact. Ceci implique d'une part, qu'une charge passant de l'électrode à la molécule doit franchir

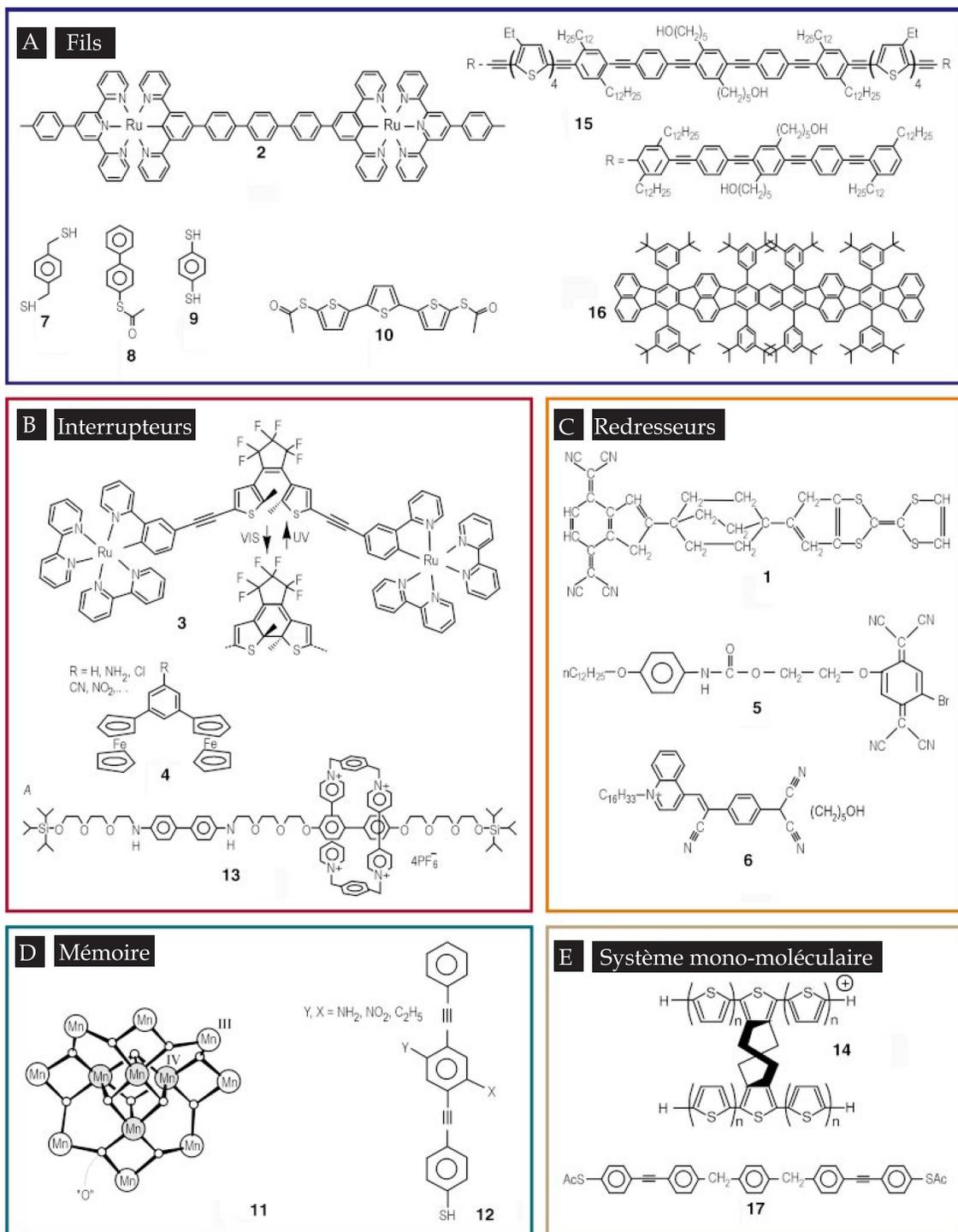


FIGURE 3.2: [d'après [12]] Exemples de molécules étudiées ou envisagées en électronique moléculaire : **A.** Fils **B.** Interrupteurs **C.** Redresseurs **D.** Molécules "mémoire" pouvant stocker une information **E.** Systèmes monomoléculaires de transistor (source-drain) et de résistances en série

une barrière de potentiel conséquente, ce qui induit une résistance de contact pas forcément

négligeable par rapport à la résistance de la molécule. D'autre part, le comportement de cette résistance de contact n'est pas forcément ohmique, et il n'est donc pas évident de discerner les non linéarités dues aux contacts de celles dues à la molécule elle-même (un mécanisme de conduction complexe et un libre parcours moyen des porteurs de charge grand par rapport à la longueur totale de la molécule implique a priori un comportement non linéaire). La figure 3.1 représente de manière schématique les niveaux d'énergie de plusieurs molécules connectant deux électrodes, entre lesquelles on applique ou non une tension ; on remarque la barrière énergétique au niveau de chacune des deux jonctions.

En 1974, on imagine une molécule qui se comporterait comme une diode [13]. Après des améliorations de la technique du STM [14] C. Joachim et son équipe [15] ont mesuré la résistance d'une molécule de fullerène ($55 M\Omega$). On commence à cataloguer quelques molécules pouvant servir de fils [12] ou d'interrupteurs [16] (voir figure 3.2), à imaginer un amplificateur moléculaire [17]. Les nanotubes de carbone sont des candidats sérieux pour l'électronique moléculaire [18]. Récemment, A. Bachtold [19] et son équipe ont construit un circuit logique de transistors à effet de champ (FETs) à base de nanotubes de carbone, de gain supérieur à 10.

Un des défis en électronique moléculaire est l'assemblage des nano-composants. Dans cette optique la molécule d'ADN séduit énormément, car elle possède des propriétés de reconnaissance, d'assemblage et d'adressage très développées [20]. De plus, on sait grâce aux progrès énormes de la biologie synthétiser une séquence spécifique d'ADN à la paire de base près. Il existe une multitude de nanomachines dans la nature permettant de couper, replier, séparer, reconnaître un morceau d'ADN. Enfin, l'empilement des orbitales π portées par les bases de l'ADN au sein de la double hélice en font un conducteur potentiel de courant électrique. La première étape de recherche consiste à étudier le transfert de charges à l'intérieur de l'ADN.

3.1.2 Transferts de charges à travers l'ADN : mécanismes et paramètres

Dès 1962, Eley et Spiley ont suggéré que l'ADN pourrait transporter du courant [21]. Les bases de cette molécule sont porteuses de noyaux aromatiques qui possèdent des orbitales atomiques π , perpendiculaires aux plans des bases. Les orbitales des paires de bases consécutives se recouvrant partiellement, on peut imaginer qu'un électron ou un trou puisse se déplacer le long de la molécule [22].

On évoque plusieurs mécanismes pour un transport de charge à travers l'ADN [24].

Dans le cas du transport d'un trou : celui-ci se fait via la guanine, qui est la base possédant le potentiel d'oxydation le plus bas [25]. Pour deux paires $G - C$ proches l'une de l'autre (quelques bases) le transport d'un trou peut avoir lieu au bout d'un temps raisonnable de manière cohérente par effet tunnel (voir la figure 3.3A). Cependant la probabilité de transfert de charge par ce mécanisme (appelé "super-échange") décroît exponentiellement et n'expliquerait donc pas un transport à grande distance, c'est à dire de plus de quelques paires de bases (figure 3.3B). Le second mécanisme de transport possible serait un processus activé thermiquement, appelé "hopping" [26] : grâce à l'agitation environnante, la molécule reçoit de l'énergie et explore une multitude de configurations jusqu'à ce que l'une soit favorable au transfert de charges de la paire $G - C$ portant une guanine oxydée vers la paire $G - C$ la plus proche, et ainsi de suite (voir

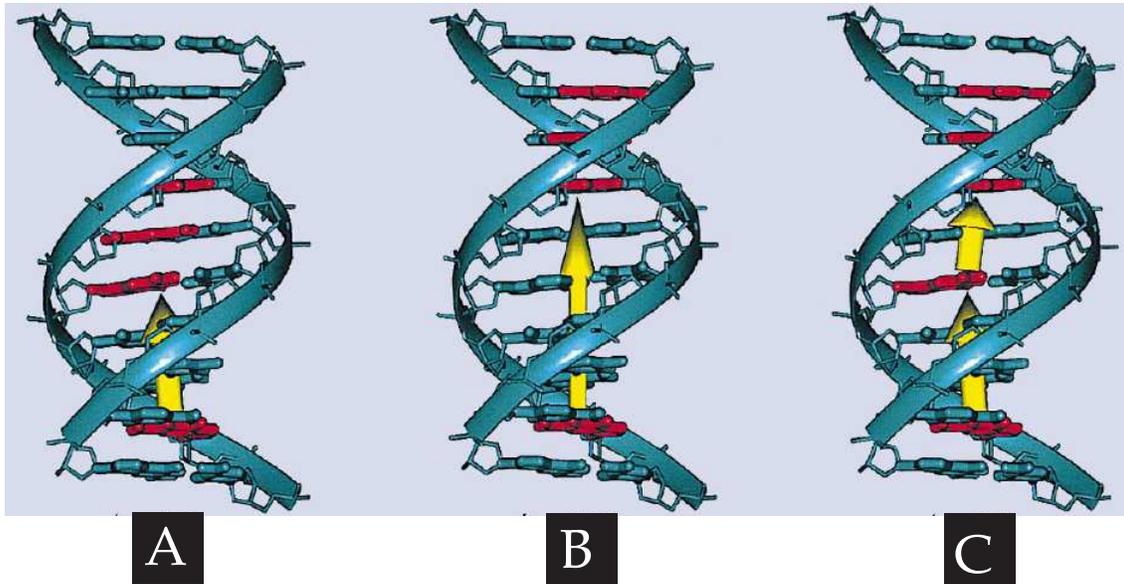


FIGURE 3.3: [figure d'après [23]] Transport de charges le long d'une molécule d'ADN. Les paires G-C sont représentées en rouge. **A.** Dans le cas du "super-échange", les trous passent d'une paire G-C à une autre, traversant par effet tunnel les paires A-T séparant ces deux paires G-C **B.** Plus le nombre de paires A-T séparant les deux paires G-C augmente, moins ce mode de transport est efficace **C.** Dans le cas du hopping, les trous passent de paires G-C en paires G-C par sauts activés thermiquement.

la figure 3.3C). Le trou parcourt donc une succession de sauts plus ou moins aléatoires dans le temps. La direction de propagation de la charge, elle, est due principalement à une éventuelle différence de potentiel imposée aux bornes de la molécule (voir la figure 3.1D).

Dans le cas du transport d'un électron, on s'attend à des processus identiques mais provenant de la réduction de la thymine ou de la cytosine, car leurs potentiels de réduction sont similaires [25].

La capacité de l'ADN à transporter des charges dépend donc d'une multitude de paramètres, comme :

- ses contraintes mécaniques. La manière dont les orbitales π se superposent dépend de la distance entre les paires de bases et de leur angle relatif, c'est à dire de l'étirement de la molécule et de sa forme (ADN A, B, Z, S, ou P).
- son support. L'ADN peut reposer sur une surface plus ou moins chargée, ce qui peut modifier le transport de charges le long de la molécule, ou encore la micro-structure de la molécule. (l'ADN étant chargé négativement en solution, une surface chargée positivement aura tendance à "écraser" la molécule)
- son environnement, qui ne se résout pas à la surface sur laquelle elle repose. L'ADN peut être en solution, et posséder ainsi des couches ioniques l'envoyant de concentrations variées. Il peut aussi être "à sec" ; cette appellation est assez vague : le vide, de l'air, ou encore du N_2 peuvent composer l'atmosphère, et avec une humidité plus ou moins importante.
- sa température, car par exemple le hopping est un processus activé thermiquement.
- sa séquence. Nous avons en effet vu que les paires $G - C$ et $A - T$ ne jouent pas le même

- rôle dans le transport de charges.
- sa longueur. Nous avons en effet vu que le hopping et le super-échange interviennent sur des échelles de tailles différentes.
- son unicité. Une molécule unique n'a pas à priori les mêmes propriétés qu'une corde de molécules d'ADN (quelques molécules "nouées" et donc en parallèle, pouvant emprisonner entre elles une mince couche d'eau) ou qu'un film.
- des contacts connectant la molécule. Nous avons vu à la partie 3.1.1 l'importance des contacts pour la mesure de conductance d'une molécule unique. On peut par exemple se servir d'électrodes en or ou en titane, lithographiées sur la molécule ou sur laquelle repose la molécule, ou encore se servir de la pointe d'un AFM ou d'un STM (en gardant à l'esprit que cette dernière technique peut éventuellement "doper" la molécule). L'utilisation de fonctionnalisations chimiques pour améliorer le contact entre la molécule et l'électrode est aussi possible.

Cette multitude de paramètres à contrôler explique la grande diversité de résultats expérimentaux obtenus dans la littérature.

3.1.3 Bilan bibliographique

De nombreuses expériences ont été réalisées pour mesurer la résistance de brins d'ADN, et les résultats vont d'un comportement d'isolant [27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34] à un comportement de semi-conducteur [35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47] ou de conducteur [48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56].

Par exemple, l'équipe de E. Braun [27] n'a mesuré aucun courant à travers des molécules uniques d'ADN λ de quelques microns contactées par des liaisons thiol à des électrodes en or, sur une surface de verre. Il en est de même pour l'équipe de P. J. de Pablo [29, 30, 31], qui a contacté entre une électrode en or et une pointe d'AFM, de l'ADN λ beaucoup plus court (une centaine de nanomètres) sur une surface de mica. L'équipe de Y. Zhang [32] est arrivée aux mêmes conclusions, sur plusieurs molécules d'ADN λ mises en parallèles, séparées de plusieurs microns entre deux électrodes d'or auxquelles elles étaient liées via des liaisons thiol, le tout sur une surface de quartz. Les groupes de M. Bockrath [33] et C. Lei [34] ont tous deux procédé à des mesures par EFM (Electrostatic Force Microscopy) sur de l'ADN λ disposé en réseau entre une surface de SiO_2 et une pointe d'AFM en silicium, et C. Lei a comparé ses résultats avec un polymère semi-conducteur, en réalisant la même expérience avec du poly-hexylthiophène. Enfin l'équipe d'A. J. Storm [28] a réalisé des mesures sur des molécules uniques d'ADN λ ainsi que sur de l'ADN de synthèse composé exclusivement de paires G-C, avec des électrodes peu espacées (40 à 500nm) en or ou en titane, sur des surfaces d'oxyde de silicium ou de mica. Malgré leurs diversités de substrats ou d'électrodes, les fonctionnalisations thiol, et l'utilisation d'ADN courts et riches en paires G-C, leurs résultats sont aussi négatifs. Les mesures de tous ces groupes ont été réalisées à sec, et à température ambiante. Aujourd'hui, quelques groupes étant arrivés à la conclusion que l'ADN est un isolant comme celui de E. Braun [27, 20, 57] ou J. Richter [58, 59], continuent d'étudier le rôle de l'ADN dans l'électronique moléculaire en tant que nano-substrat à "métalliser".

Quelques équipes ont observé un comportement type semi-conducteur. C'est le cas du groupe de D. Porath [36] qui a effectué ses mesures entre deux électrodes de platine très proches (8 nm)

sur des brins de poly dG-dC, sur un substrat de SiO_2 et sous vide. Les mesures de l'équipe de A. Rakitin sont plus surprenantes encore [38] puisqu'elle observe des courants comparables de l'ordre du nano-ampère mais pour des cordes d'ADN λ (\sim une centaine de molécules), entre deux électrodes d'or beaucoup plus espacées ($10 \mu m$) et sous vide. Le groupe de H. Watanabe [35] a utilisé pour ses mesures un AFM à trois sondes (T-AFM, composé de nanotubes et d'une pointe d'AFM classique en Or) espacées de $25 nm$ sur de l'ADN de sperme de saumon disposé sur un substrat de SiO_2 . L'équipe de T. Heim [39, 40, 41] a mesuré avec une pointe AFM et une électrode en or des courants comparables sur des cordes de 10 à 1000 molécules d'ADN λ de $1 \mu m$ de long et étalées notamment sur une surface de polystyrene. Enfin, l'équipe de T. Kawai a mené deux types d'études. L'une [37, 42, 43] consiste en des mesures prises entre une pointe d'AFM et une électrode en or espacées de 50 à 100 nm sur une surface de mica, sous vide, et ils remarquent que la conductance d'une molécule unique d'ADN décroît exponentiellement avec sa longueur, et que la conductance de poly dG-dC est plus grande que celle de poly dA-dT. Pour la deuxième étude [44, 45, 46, 47], sont utilisées des électrodes en or ou en titane espacées de 100 à 200 nm sur un substrat de silicium. Ces mesures effectuées sur des films d'ADN étudient l'influence de l'humidité sur la conductance de l'ADN (cette conductance croît avec l'humidité). Toutes ces expériences aussi ont été réalisées à sec, et à température ambiante.

Enfin, quelques personnes ont observé un comportement de type ohmique. C'est le cas de B. Hartzell [48, 49] qui, en effectuant des mesures sur une couche d'ADN λ attaché via des liaisons thiol entre deux électrodes d'or espacées de $8 \mu m$ sur une surface de SiO_2 , remarque une meilleur conductance pour de l'ADN sans "nick". P. Tran [50] et son équipe n'ont pas non plus effectué des mesures sur une molécule unique, mais sur tout un échantillon grâce à une cavité résonnante, ont mesuré une résistivité ($0,4 \Omega.cm$) plus faible en solution que à sec. H. W. Fink [51] effectue ses mesures sur des cordes d'ADN λ avec un microscope LEEPS ("Low Energy Electron Point Source") sous vide, mais ses mesures sont mises en doute [29] du fait d'un éventuel dopage provenant du microscope. Le groupe J. S. Hwang [54] a effectué des mesures sur quelques molécules de poly dG-dC entre deux électrodes d'or espacées de $20 nm$ sur un substrat de SiO_2 . L'équipe de K. H. Yoo [55] a mené ses expériences sur des brins de poly dG-dC et poly dA-dT, entre deux électrodes d'or distantes de $20 nm$ sur un substrat de SiO_2 , et a constaté d'une part que la résistance du poly dA-dT est environ 100 fois plus grande que celle du poly dG-dC, et que ces conductivités augmentent avec la température. Xu [56] a aussi réalisé des mesures sur des brins très courts d'ADN (8 à 14 paires de bases), en solution cette fois ci, entre une électrode en or et une pointe de STM. Il est arrivé à distinguer la conductance de 1, 2 ou 3 molécules, et a mesuré des résistances de l'ordre de $10 M\Omega$. Pour terminer, A. Y. Kasumov [52, 53] et son groupe ont mesuré, entre deux électrodes de platine traitées à la pentylamine distantes de 200 à 500 nm sur un substrat en mica et à température ambiante, une résistance de $550 k\Omega$ pour un à cinq molécules en parallèle. Notons que cette mesure particulièrement faible de la résistance de brins d'ADN se démarque des autres expériences de cette catégorie par l'utilisation d'un tampon riche en ions Mg^{2+} , et que des simulations numériques tendent à montrer l'importance de cet ion pour la conductivité de l'ADN[60].

Tous ces résultats sont résumés sur les figures 3.4, 3.5 et 3.6. On remarque tout d'abord qu'il existe une variation de plusieurs ordres de grandeurs entre les résultats, par exemple de l'expérience de Storm[28] ($R > 10 T\Omega$ pour une distance de $40 nm$) et celle de Kasumov[53] ($R \sim 100 k\Omega$ pour une distance de $500 nm$). Les deux articles exposant un comportement

ohmique de l'ADN en molécule unique [55, 56], ont été réalisés sur des fragments très courts (1 nm à 20 nm). On peut se demander si pour les autres l'ADN ne piège pas, lorsqu'il est sous forme de corde ou de film, une mince couche d'eau. Le plus étrange est que Yoo[55] se trouve dans des conditions expérimentales extrêmement proches de celle de Storm[28]. Dans son article, Storm nous fournit peut-être un élément de réponse : il mesure une hauteur pour ses brins d'ADN de 0,5 nm ; l'ADN qu'il utilise est écrasé et sa structure microscopique pourrait l'empêcher de transporter des charges. L'importance de la forme de l'ADN est aussi notée par Kasumov[53], qui ne mesure aucun courant lorsque l'ADN est écrasé, mais mesure des résistances très faibles lorsque sa surface est traitée de manière à ce que l'ADN ait une hauteur de l'ordre de 2nm. De même, Heim [39, 40, 41] observe un comportement type semi-conducteur, mais mesure aussi une valeur très élevée de la résistance ($R = 10 T\Omega$ pour 500 molécules en corde, une distance de 300 nm) qui n'est pas en désaccord avec les expériences de la catégorie "isolant", et une épaisseur moyenne de ses brins d'ADN inférieure au diamètre cristallographique.

Des chimistes se sont aussi intéressés au transport de charges le long de l'ADN [61, 62]. Leurs expériences, que ce soit par photolyse [63], par méthode électrocatalytique [64], par fluorescence [65] ou par mesure d'absorption transitoire femtoseconde [66, 67] ne donnent pas de valeur numérique de résistances et leurs résultats diffèrent légèrement, mais ils observent tous un transport de charges le long de courts fragments d'ADN. L'efficacité de ce transport semble considérablement décroître à partir d'une distance supérieure à quelques bases, comme s'il existait un mode de transport "courte distance" et un mode "longue distance" [63]. L'appariement des bases semble aussi importante (transport réduit pour des molécules simples brins ou comportant des paires mal appariées comme GA, AA, GT,... différentes de AT ou GC), ce qui implique des applications dans des détecteurs électroniques de mutations par exemple [64].

Au regard de tous ces résultats, nous nous proposons de réaliser des mesures de la conductivité de l'ADN dans les conditions suivantes :

- avec une molécule d'ADN, dont l'étirement et l'unicité seront contrôlés.
- avec des électrodes de mesures en or, sur un substrat d'oxyde de silicium.
- la molécule devra être fonctionnalisée avec des groupements thiol, pour un meilleur contact avec les électrodes.
- la distance entre les électrodes devra être de quelques dizaines de nanomètres, afin de réduire la résistance de la molécule.
- à température ambiante.
- surtout, les mesures de courant devront être possibles en solution et à sec. En effet, peu de mesures n'ont encore été réalisées en solution (celle de Tran [50], qui ne travaille pas en molécule unique et sans véritables électrodes, et celle très récente de Xu [56]). Or, les conditions en solution sont favorables pour une hauteur d'ADN proche de sa valeur cristallographique, et de plus l'ADN serait plus conducteur à forte humidité d'après Otsuka [45].

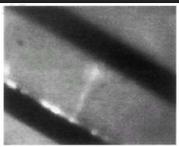
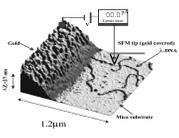
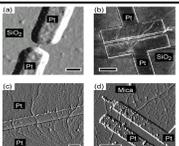
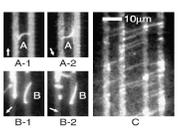
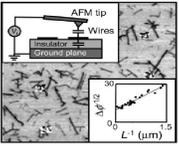
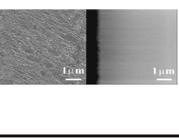
	Référence	Type d'ADN	Nombre de molécules	Espace entre les électrodes	Nature des électrodes	Surface	Étiré des molécules	Environnement	Athmosphère	Tampon de l'ADN	Tension maximum appliquée	Résistance (R) ou résistivité (ρ) mesurée	Température	Notes
	Braun, nature 1998	ADN λ	unique	12 μ m à 16 μ m	2 en or	verre	étirées par un flux en solution	mesures à sec		10-100mM NaCl rincé à l'eau	10V	R>10T Ω pour d=12 μ m	ambiante	groupements thiol aux extrémités
	de Pablo, PRL 2000	ADN λ	unique à quelques centaines en corde	70nm à 15 μ m	1 en or et une pointe d'AFM en titane recouverte d'or	mica	étirées par un flux en solution	mesures à sec			10V	R>1T Ω pour d=70nm	ambiante	
	Storm, APL 2001	ADN λ ou poly dG-dC	unique à quelques dizaines en corde	40nm à 500nm	2 en or ou en platine	oxyde de silicium ou mica	aucun	mesures à sec		20mM HEPES rincé à l'eau	10V	R>10T Ω pour d=40nm	ambiante	groupements thiol aux extrémités, hauteur de l'ADN mesurée =0,5nm
	Zhang, PRL 2002	ADN λ	un millier en parallèle	4 μ m à 8 μ m	2 en or	quartz	étirées par un flux en solution	mesures à sec	sous vide	tampon Tris-EDTA rincé à l'eau	20V	ρ >1G Ω .cm	ambiante	groupements thiol aux extrémités
	Bockrath, nanoletters 2002	ADN λ	en réseau	non applicable (mesure EFM)	pointe d'AFM en silicium	oxyde de silicium	aucun	mesures à sec		tampon Tris-EDTA rincé à l'eau	8V	ρ /S>10P Ω /cm	ambiante	
	Lei, APL 2003	ADN λ	en réseau	non applicable (mesure EFM)	pointe d'AFM en silicium	oxyde de silicium	aucun	mesures à sec		tampon Mg++ rincé à l'eau	5V	ρ >10M Ω .cm	ambiante	comparaison avec du poly-hexylthiophène

FIGURE 3.4: Résumé des expériences conduisant à un comportement isolant de l'ADN [27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34].

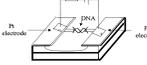
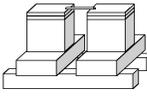
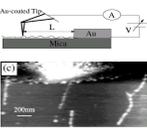
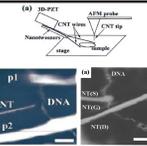
	Référence	Type d'ADN	Nombre de molécules	Espace entre les électrodes	Nature des électrodes	Surface	Étirement des molécules	Environnement	Athmosphère	Tampon de l'ADN	Tension maximum appliquée	Tension de seuil	Résistance (R) ou résistivité (ρ) mesurée	Température	Notes
	Porath, nature 2000	poly dG-dC	unique	8nm	2 en platine	oxyde de silicium	capture électrostatique	mesures à sec	sous vide	300mM NaCl 10mM NaCitrate 5mM EDTA rincé à l'eau	5V	2V	$R=4G\Omega$ pour $d=8nm$ et $U=4V$	ambiante et -20°C	
	Rakitin, PRL 2001	ADN λ	une centaine en corde	10 μ m	2 en or	"substrat diélectrique"	étirées par un flux en solution ou aucun étirement	mesures à sec	sous vide	"tampon standard"	0,75V	0,2V	$R=1G\Omega$ pour $d=10\mu m$, $U=0,4V$ et une centaine de molécules	ambiante	
	Kawai, nanotechnology 2001	ADN λ ou poly dG-dC	unique	50nm à 100nm	1 en or et une pointe d'AFM en or	mica traité (APS, PL, ou MEA)	étirées par capillarité	mesures à sec	sous vide	100mM TrisHCl 5mM EDTA pH7,6 rincé à l'eau	6V	4V	$R=25G\Omega$ pour $d=50nm$ et $U=5V$	ambiante	
	Kawai, JJAP 2002	poly dA-dT ou poly dG-dC	Film	100nm à 200nm	2 en or	oxyde de silicium		mesures "à sec"	air à humidité contrôlée	eau	4V	1V	$R=1M\Omega$ à $1G\Omega$ selon l'humidité pour un film d'ADN	ambiante	variation de la résistance avec l'humidité
	Watanabe, APL 2001	sperme de saumon	unique	5nm	T-AFM 2nanotubes et une pointe d'AFM en or	oxyde de silicium		mesures à sec	atmosphère de N ₂	300mM NaCl 10mM NaCitrate 5mM EDTA rincé à l'eau	0,7V	0,2V	$R=0,1G\Omega$ pour $d=5nm$ et $U=0,5V$	ambiante	
	Heim, APL 2004	ADN λ	cordes de 300 à 2000 molécules	300nm	1 en or et pointe d'AFM en or	oxyde de silicium traité au polystyrene, CH ₃ , vinyl, ou NH ₂		mesures à sec	air ambiant ou sous flux NH ₂	TrisHCl EDTA pH6,5 rincé à l'eau	8V	3V	$R=10T\Omega$ pour $d=300nm$, $U=7V$ et 500 molécules en corde	ambiante	hauteur de l'ADN mesurée $\approx 0,5-1nm$

FIGURE 3-5: Résumé des expériences conduisant à un comportement type semi-conducteur de l'ADN [35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47].

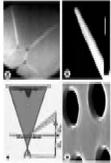
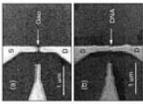
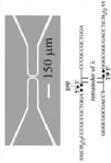
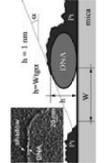
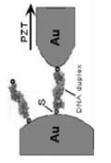
Notes	Température	Résistance (R) ou résistivité (ρ) mesurée	Tension de seuil	Tension maximum appliquée	Tampon de l'ADN	Atmosphère	Environnement	Etrement des molécules	Surface	Nature des électrodes	Espace entre les électrodes	Nombre de molécules	Type d'ADN	Référence	
	ambiante	$R=2\text{M}\Omega$ pour $d=60\text{nm}$, et une corde d'ADN		50mV	tampon Tris EDTA rincé à l'eau	sous vide	mesures à sec		carbone	Or et LEPS microscope	600nm	quelques molécules en corde	ADN λ	Fink, nature 1999	
	ambiante	$\rho=1\Omega\text{.cm}$ en solution et $\rho=0.3\Omega\text{.cm}$ à sec			tampon Tris EDTA rincé à l'eau		mesures en solution et à sec			cavité résonnante		tout un volume	ADN λ	Tran, PRL 2000	
	ambiante	$R=100\text{M}\Omega$ pour poly dA-dT et $R=1.3\text{M}\Omega$ pour poly dG-dC		10V		sous vide ou en atmosphère ambiante	mesures à sec	capture électrostatique	oxyde de silicium	2 en or	20nm	unique	poly dA-dT ou poly dG-dC	Yoo, PRL 2001	
	ambiante	$R=0.5\text{G}\Omega$ pour $d=20\text{nm}$ et quelques molécules		6V		atmosphère ambiante	mesures "à sec"	aucun	oxyde de silicium	2 en or	20nm	quelques molécules en parallèle	poly dG-dC	Hwang, APL 2002	
groupements thiol aux extrémités	ambiante	$R=0.4\text{G}\Omega$ pour $d=8\mu\text{m}$, et un nombre inconnu de molécules	5V uniquement en présence de nick	20V		atmosphère ambiante	mesures à sec	champ électrique MHz	oxyde de silicium	2 en or	8 μm	une couche de largeur 50 μm	ADN λ	Hartzell, APL 2003	
pas de signal pour les molécules "brisées" (diamètre 2nm)	ambiante	$R=55\text{k}\Omega$ pour $d=500\text{nm}$ et 1 à 5 molécules		2mV	20mM de CH_3COOH et 7 à 9 mM de MgCl_2		mesures à sec	aucun	mica traité à la pentylamine	2 en platine traitées à la pentylamine	500 nm	quelques molécules (1-5)	ADN λ	Kasumov, APL 2003	
groupements thiol aux extrémités	ambiante	$R=10\text{M}\Omega$ pour $d=1\text{nm}$ et molécule		0.8V	100mM NaCl + 10mM Phosphate		mesures en solution	STM	N.A.	1 en or et une pointe de STM (scanning tunneling microscope)	0.5nm à 2.5nm	quelques molécules (1-3)	5'(GC) ₃ ou 5'CGCG(AT) ₃ CGCG3' n=8	Xu, Nano Letters 2004	

FIGURE 3.6: Résumé des expériences conduisant à un comportement conducteur de l'ADN [48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56]

3.2 Mesures de forces sur molécule unique d'ADN et d'ARN

3.2.1 Motivations et selection de travaux antérieurs

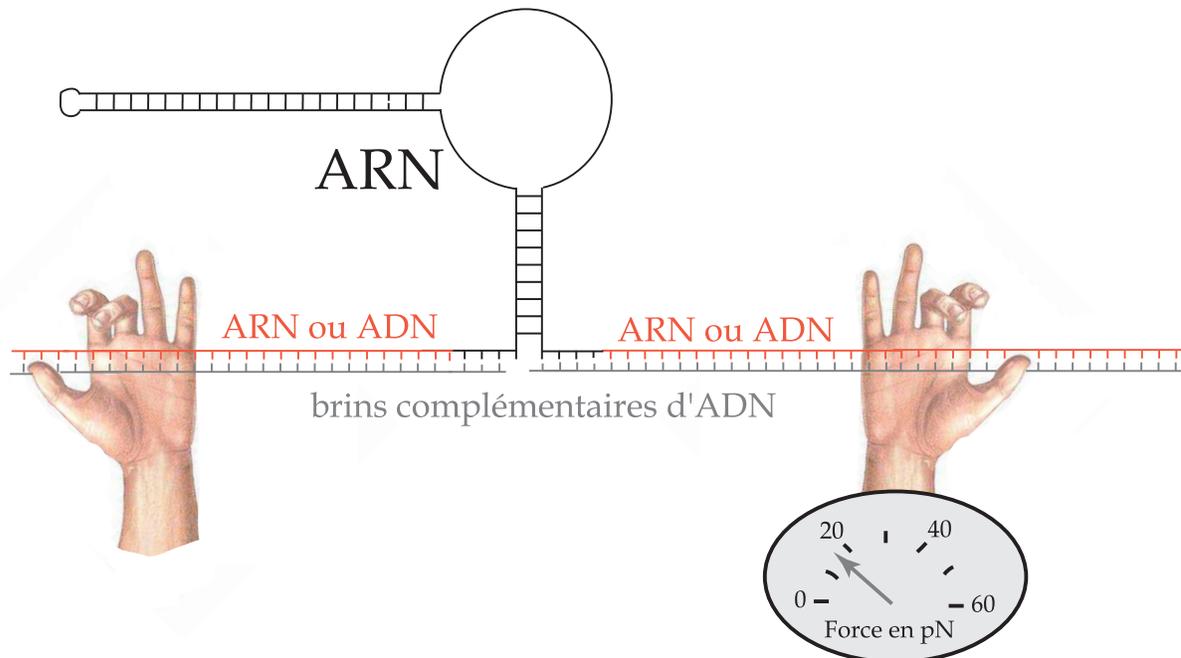


FIGURE 3.7: Principe d'une mesure de forces sur molécule unique d'ADN et d'ARN : des micromanipulateurs (dont la nature exacte sera détaillée plus tard au paragraphe 4.1.1, et représentés ici par des mains) étirent une molécule d'ARN repliée sur elle-même via deux "bras" de double hélice d'ADN [68] ou mixte d'ADN/ARN [69]. Une mesure de la force exercée en fonction de l'extension imposée est effectuée via l'un des micromanipulateurs.

Imaginons une molécule d'ARN repliée sur elle-même avec une structure secondaire et tertiaire particulière, et dont les extrémités sont reliées à des "bras" double brins d'ADN/ADN ou d'ADN/ARN (figure 3.7). Admettons que l'on puisse micromanipuler ces deux bras en double hélice (nous détaillerons les techniques possibles de micromanipulations au paragraphe 4.1.1) tout en mesurant la force exercée sur notre système. Lors du désenroulement de la molécule d'ARN, la mesure de la force en fonction de l'extension imposée à notre système devrait être sensible à plusieurs paramètres :

- A la séquence de l'ARN. Dans le cas d'une structure secondaire type double hélice, on "dégrafe" cette double hélice en tirant à ses extrémités. Les liaisons G-C étant plus stables que les liaisons A-T, la force requise pour séparer des régions riches en paires G-C doit être supérieure à celle requise pour séparer des régions riches en paires A-T, d'où une sensibilité à la séquence. Nous aborderons le problème de la résolution de cette sensibilité au paragraphe 7.3.
- A la nature des structures secondaires de l'ARN en général. La double hélice n'est pas la seule structure secondaire possible. Dans le cas d'une boucle insérée entre deux tiges par

exemple, la force requise pour ouvrir la boucle (extension de simples brins d'ARN) est clairement inférieure à celle exercée lors du dégrafage de la double hélice des tiges.

- De la même manière, aux structures tertiaires de l'ARN. Ce type de structure étant favorisée par des ions Mg^{2+} , la présence de ces ions ou non en solution peut permettre de différencier un signal dû à une structure tertiaire, d'un signal dû à une structure secondaire.

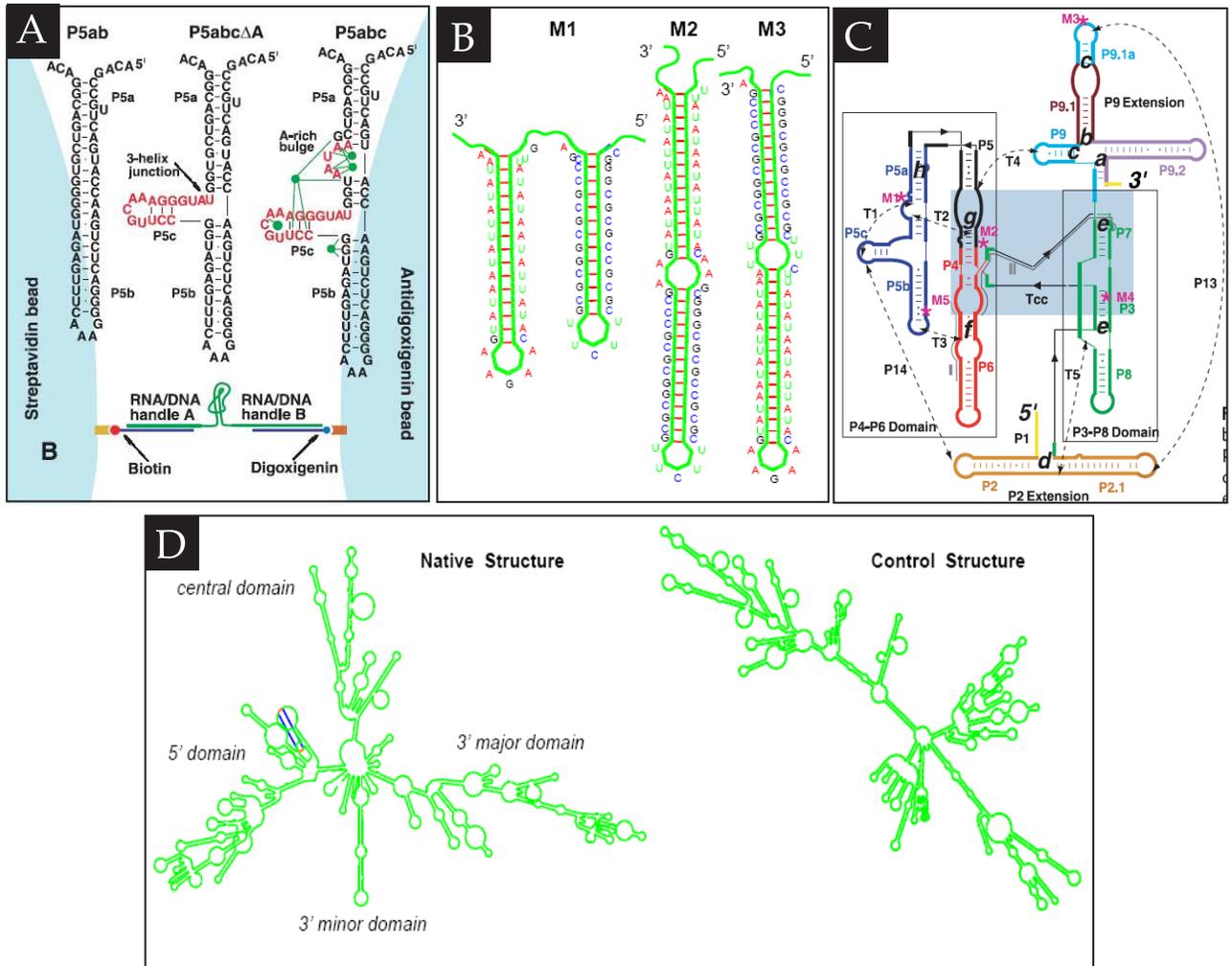


FIGURE 3.8: Structures simples d'ARN étudiées par les équipes de **A.**[69] C. Bustamante (tige, jonction à trois hélices) et **B.**[68] D. Chatenay (tiges en série, tige-boucle), et structures plus complexes étudiées par les équipes de **C.**[70] C. Bustamante et **D.**[68] D. Chatenay.

Des expériences de ce type ont déjà été réalisées par les groupes de C. Bustamante [69, 70] et D. Chatenay [68]. Ils ont réalisé leurs expériences sur des fragments d'ARN simples comme une tige, une jonction à trois hélices ou une tige-boucle, mais aussi sur des structures plus complexes (voir figure 3.8). Ils observent les phénomènes suivants :

- la force d'ouverture pour les structures simples ou complexes d'ARN est de l'ordre de la dizaine ou quinzaine de piconewtons.
- il existe un hysteresis entre le déenroulement et le réenroulement du fragment d'ARN, la

force mesurée lors du réenroulement étant plus faible que celle mesurée lors du déenroulement à une extension donnée. La taille de cet hysteresis est de l'ordre du piconewton, et augmente avec la vitesse des micromanipulateurs.

- pour les brins d'ARN possédant des structures tertiaires, les ions Mg^{2+} ont bien un effet sur le signal observé.
- pour les brins longs et dont la séquence est connue, on peut essayer de prédire numériquement le signal de force en fonction de l'extension, et de relier ce signal aux structures et configurations explorées par l'ARN lors de l'extension. La corrélation entre ces simulations et les courbes expérimentales n'est pas encore parfaite, et dépend notamment de la vitesse d'extension.

3.2.2 Expérience projetée

On se propose d'étudier un fragment d'ARN ribosomique 23S (base 989 à 1165) de la bactérie *Escherichia Coli*. D'une part, ce fragment court et simple est idéal pour tester notre montage avant de s'attaquer à un ARN plus complexe. On s'intéressera donc au déenroulement et aux phénomènes d'hysteresis décrits précédemment.

D'autre part, nous nous intéressons à son interaction avec des protéines présentes elles aussi dans le ribosome, comme la protéine L20. La protéine ribosomique L20 d'*E. coli* (13 kDa) est formée de deux domaines : l'un forme une longue extension et l'autre est globulaire. La protéine L20 est essentielle à l'assemblage de la sous-unité ribosomique 50S. Elle régule d'autre part sa propre synthèse en se fixant à des régions de son ARN messager. Assemblage et régulation procèdent via une étape analogue : la reconnaissance par le domaine globulaire de L20 de sites aux structures semblables sur l'ARN ribosomique 23S et sur l'ARN messager. On sait que notre fragment possède un des sites d'affinités entre l'ARN ribosomal et la protéine L20, mais on ne sait pas exactement dans quelle mesure la protéine influence la structure de l'ARN. Une étude de la structure de l'ARN ribosomique en molécule unique comme décrite à la section précédente pourrait être un moyen de donner des éléments de réponse.

3.3 Bilans des buts et des contraintes des expériences projetées

Avant de commencer la construction du montage expérimental, il est nécessaire d'effectuer un bilan des objectifs, des expériences projetées, et des contraintes qui en découlent. Nous voulons effectuer des mesures de conductivité et de forces sur des molécules uniques, ce qui implique de pouvoir :

- mesurer des conductivités de doubles brins d'ADN en solution et à sec. L'ADN étant potentiellement assez résistif (voir la section de bibliographie 3.1.3), les mesures vont s'effectuer sur des fragments courts, sub-micrométriques. D'autre part, nous devons être capables de nous affranchir de la conduction parasite de la solution. Enfin, nous devons pouvoir mesurer des courants de l'ordre du picoampère, et donc réduire le bruit de mesure électronique le plus possible.
- micromanipuler une molécule unique étendue au dessus d'une surface, ceci afin de pouvoir la positionner à un endroit bien précis, à savoir au niveau d'électrodes de mesures. La molécule

doit être étendue, on doit donc pouvoir "tenir" les deux extrémités de cette molécule. Le choix de l'utilisation d'un point d'ancrage et d'une seule micropince est à exclure, puisque cette molécule doit être micromanipulable. On doit donc utiliser deux micropinces.

Pour des raisons pratiques, ces deux pinces doivent pouvoir se déplacer par rapport à la surface de manière solidaire, mais leur distance doit pouvoir varier.

Pour terminer, les électrodes de mesures vont avoir une dimension microscopique, du fait de la petite taille de la molécule d'ADN. L'exploration de la surface sur laquelle elles se trouvent va donc s'effectuer via un objectif de microscope, et nos deux pinces doivent être alignées sur un axe perpendiculaire à l'axe optique du système.

- mesurer des forces à l'échelle de la molécule unique. Dans le cas de la mesure de conductivité, cela permet de vérifier l'unicité de la molécule déposée sur les électrodes, l'élasticité de l'ADN étant connue. De manière plus générale, on veut aussi pouvoir effectuer des mesures de forces sur des systèmes moléculaires plus complexes, comme des hybrides ADN/ARN afin d'étudier les structures secondaires et tertiaires de fragments d'ARN ou encore l'interaction de séquences d'ARN précises avec des protéines. On doit pouvoir mesurer des forces allant de $1pN$ à une cinquantaine de piconewtons, avec une précision idéalement de l'ordre du pourcent.
- réaliser tout ceci sur une surface opaque. Les constructions de microélectrodes se réalisent en effet sur des surfaces opaques comme le silicium. L'utilisation d'objectifs à immersion d'huile fonctionnant par transmission à travers un substrat de verre est donc exclue.

Chapitre 4

Micro-manipulation de molécules uniques : montage optique et électronique.

4.1 Micro-manipulation d'une molécule unique

4.1.1 Panorama des techniques existantes : manipulation d'une micro-bille

Il existe à l'heure actuelle de nombreux moyens expérimentaux pour manipuler la matière à l'échelle de la molécule unique. La plupart du temps, manipuler une molécule revient, pour des questions pratiques, à manipuler deux micro-billes reliées entre elles par une molécule. Ces micro-objets ont d'une part l'avantage d'être visibles au microscope optique, et d'autre part de délimiter clairement les extrémités de la molécule étudiée, ce qui permet un contrôle efficace de son extension et de sa torsion. Il arrive parfois aussi qu'une des extrémités de la molécule soit ancrée à une surface au lieu d'être attachée sur une micro-sphère.

La plus simple des méthodes de micro-manipulation est l'utilisation de micro-pipettes en verre [71](figure 4.1A). Pour fabriquer ces dernières, on étire un fin capillaire en verre chauffé en son milieu par un laser, obtenant ainsi deux aiguilles creuses en verre dont le diamètre à l'une des extrémités peut être inférieur au micron. En créant une dépression entre l'intérieur de la micro-pipette et le milieu environnant, on peut alors immobiliser une micro-bille au bout de la pointe par suction.

Une amélioration de cette technique consiste à utiliser une vésicule comme intermédiaire entre la micro-pipette et la bille [72](figure 4.1B). Par l'analyse vidéo de la déformation de la vésicule dont on connaît la raideur, on déduit la force s'exerçant sur la bille. La gamme typique des raideurs de ces systèmes, appelés BFP (pour "Bead Force Probe"), est de l'ordre de $100 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ à $2000 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$, ajustable selon la dépression de la pipette. Ils donnent accès à des mesures de forces allant de $1 \text{ pN} \pm 0.2 \text{ pN}$ à $1000 \text{ pN} \pm 10 \text{ pN}$.

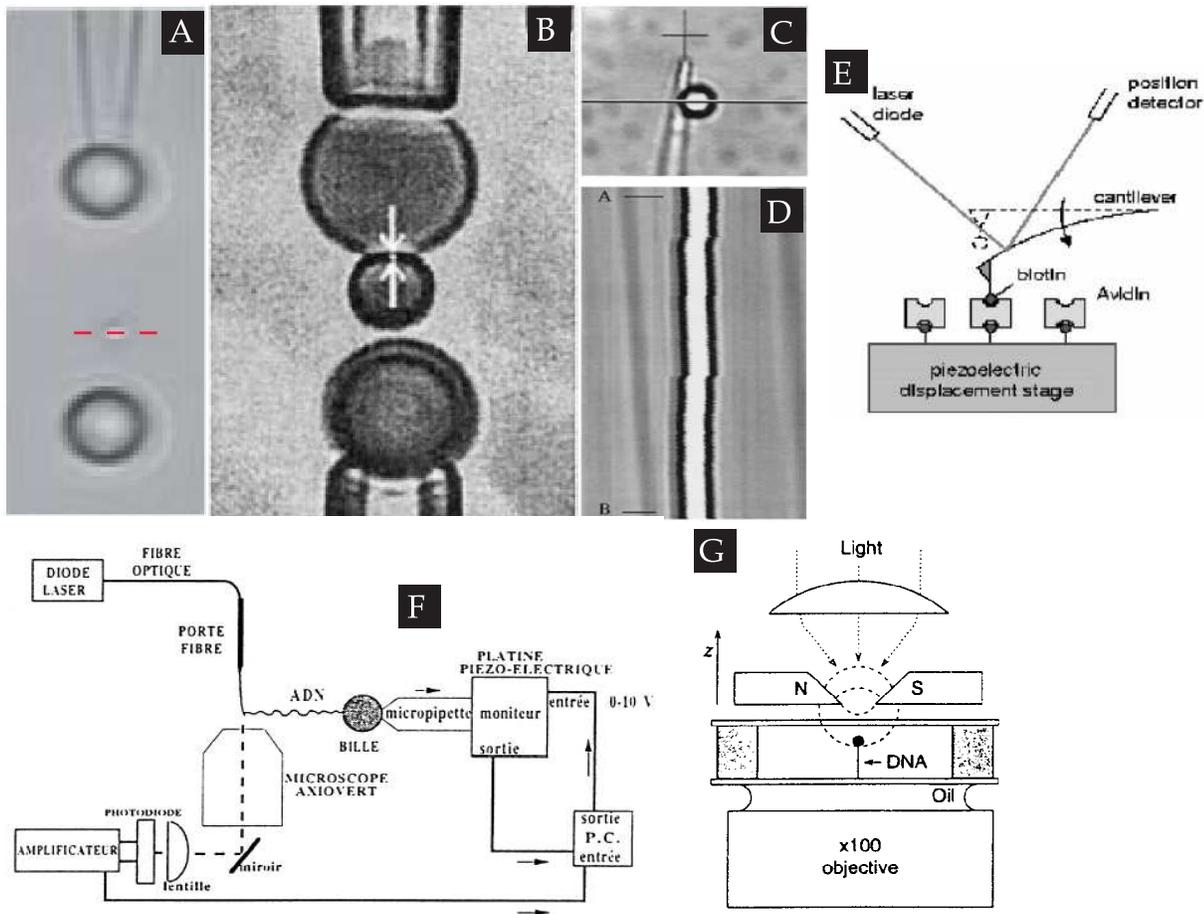


FIGURE 4.1: Dispositifs de micromanipulation : **A.** [71] Une micropipette piège une microbille en silice par succion en face d'une bille piégée par une pince optique (piège invisible) **B.** [72] Un BFP utilise une vésicule comme ressort intermédiaire entre la micropipette et la bille. La raideur de la vésicule étant connue, on peut calculer la force s'exerçant sur la bille **C.** [73] Micro levier en verre **D.** [73] Analyse vidéo de la position d'une bille collée sur un micro levier **E.** [74][75] Mesures de forces sur molécule unique par AFM **F.** [76][77] Utilisation d'une fibre optique comme micro levier. La mesure de forces s'effectue alors en mesurant la deflection du faisceau optique transporté par la fibre **G.** [78] Micromanipulation d'une molécule unique par pince magnétique

Une autre variation consiste à utiliser une tige en verre non plus creuse mais pleine [73](figure 4.1C et D). On colle chimiquement sur ce micro-levier la bille reliée à une molécule (par exemple en biotinilant le levier et en fonctionnalisant la bille avec de la streptavidine). La force exercée sur la bille est proportionnelle à la flexion du levier, d'une raideur de quelques piconewtons par microns. On mesure ainsi des forces de $1 \text{ pN} \pm 0.2 \text{ pN}$ à $100 \text{ pN} \pm 0.5 \text{ pN}$. Les variations sur le thème du micro-levier sont multiples. Par exemple, on peut remplacer le micro-levier en verre par le cantiliver d'un AFM (Atomic Force Microscope)[74][75] (figure 4.1E). Ceux-ci possèdent des raideurs bien plus élevées (autour de $10^4 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ à $10^6 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$). Certes la précision de lecture de la flexion du cantiliver est bien plus grande que dans le cas du micro-levier en verre (on mesure la déviation d'un faisceau LASER réfléchi par le cantiliver au lieu de faire une simple analyse vidéo de la flexion), mais elle reste néanmoins insuffisante pour compenser une

telle différence de raideur. De ce fait, les mesures de forces sur molécules uniques par AFM sont légèrement moins précises, mais permettent d'accéder à des forces plus grandes. Dans le même esprit, on peut utiliser une fibre optique comme levier [76][77] (figure 4.1F). La mesure de la force exercée sur la fibre se fait alors en mesurant la déviation du faisceau lumineux transporté par la fibre. Cette méthode est un bon compromis, du fait de la valeur raisonnable de la raideur de la fibre (de $10^2 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ à $10^4 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$) et de la bonne précision d'une mesure de position d'un faisceau optique.

Il est aussi possible de manipuler les billes reliées par une molécule sans les coller à un objet. Par exemple, l'équipe de V. Croquette [78] piège une bille magnétique en la plaçant sous un aimant (figure 4.1G). Celle-ci subit une force verticale due au gradient de champ magnétique dans lequel elle se trouve, ainsi qu'une autre force de direction opposée due à une molécule reliant cette même bille à une surface. En analysant l'image de la bille, on peut déterminer la force de tension exercée sur la molécule. Ce type de montage (appelé pince magnétique) permet de mesurer des forces allant de 10^{-2} pN à 10^2 pN avec une précision relative de 10%. De plus, les pinces magnétiques permettent aisément de contrôler la torsion d'une molécule, en faisant tourner l'aimant et donc la bille.

De même, en focalisant un faisceau laser, on crée un gradient de champ électrique au centre duquel un petit objet diélectrique se stabilise. Ce principe est appelé pince optique ou piège optique [79]. Il est plus largement détaillé dans la suite de ce manuscrit.

4.1.2 Principe d'une pince optique[1]

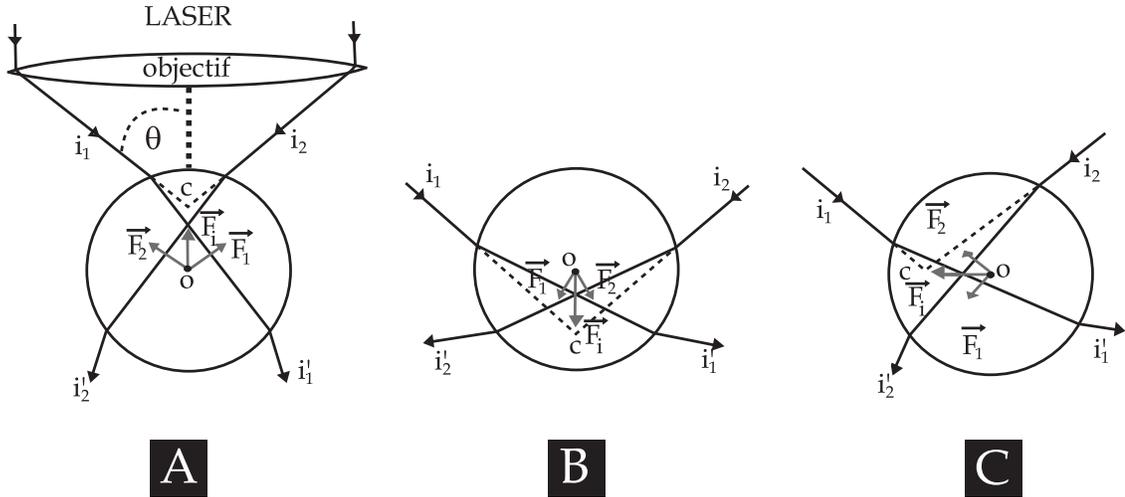


FIGURE 4.2: Principe d'une pince optique : un laser de longueur d'onde λ est focalisé dans un milieu d'indice n_0 sur une bille de diamètre d d'indice $n > n_0$. **A.** Si la bille est décalée du point de focalisation du laser selon le sens de propagation du laser, la bille est ramenée au point de focalisation par une force de module F_i . **B.** Il en va de même si la bille est décalée dans le sens inverse ou **C.** perpendiculairement à l'axe optique.

Considérons le cas d'une sphère d'indice n supérieure à l'indice du milieu l'entourant n_0 , de

coefficient de réflexion nul, de diamètre d , au point de focalisation d'un laser de longueur d'onde λ .

Comme nous venons de l'expliquer, dans le régime de Rayleigh ($d \ll \lambda$), la sphère se comporte comme un dipôle, et se stabilise au point focal du laser (vers lequel le gradient d'intensité du champ électrique pointe).

Dans le cas où $d \gg \lambda$, le problème doit être traité comme un problème d'optique géométrique. On appelle i_1 et i_2 les rayons incidents bornant une coupe de ce faisceau laser focalisé. Ces rayons sont composés d'un flux de photons de quantité de mouvement par unité de temps \vec{i}_1 et \vec{i}_2 . De même, i'_1 et i'_2 sont les rayons émergents de quantité de mouvement par unité de temps \vec{i}'_1 et \vec{i}'_2 .

Si l'on place cette sphère légèrement en dessous du point de focalisation de ce laser (figure 4.2A), la différence de quantité de mouvement entre les photons incidents et émergents est la source d'une force \vec{F}_i exercée sur la bille :

$$\vec{F}_i = \vec{F}_1 + \vec{F}_2 = \vec{i}_1 - \vec{i}'_1 + \vec{i}_2 - \vec{i}'_2 \quad (4.1)$$

En traçant ces faisceaux, on remarque que \vec{F}_i est dirigée vers le haut et vise donc à déplacer la bille vers le centre du piège. De même, si l'on place la bille au dessus du centre du piège (figure 4.2B), on remarque que la force exercée par le piège est dirigée vers le bas et ramène la bille vers le centre du piège. Dans les deux cas, on remarque que plus l'angle d'incidence θ augmente, plus le module de cette force augmente.

On considère maintenant que la bille réfléchit la lumière en partie, et on prend en compte les rayons réfléchis aux deux interfaces entre la bille et le milieu environnant. Un bilan identique mais plus complexe montre qu'une autre force \vec{F}_r s'applique en plus sur la bille, que cette force est dirigée selon la direction de propagation du faisceau lumineux, et que son module diminue quand θ augmente.

Si on décale la micro-sphère transversalement par rapport au centre du piège (figure 4.2C), un bilan identique nous montre que les forces \vec{F}_i et \vec{F}_r ramènent toutes deux la bille vers le centre du piège, et que \vec{F}_i croît avec θ .

Il existe donc deux régimes :

-pour une incidence θ supérieure à un angle critique $\theta_{critique}$, le faisceau laser focalisé forme une pince optique. La bille est ramenée vers une position d'équilibre. La position d'équilibre se trouve sur l'axe optique, près du point de focalisation du laser mais légèrement décalée dans la direction de propagation du faisceau du fait de \vec{F}_r . Plus l'ouverture numérique et l'intensité lumineuse du faisceau sont grandes, plus la pince optique piège fermement.

-pour une incidence θ inférieure à $\theta_{critique}$, la pression de radiation prend le dessus et le laser joue le rôle de "pousse objet". Il n'y a pas de position d'équilibre de la bille.

Expérimentalement, si on micromanipule des molécules biologiques via des billes en silice :

- λ la longueur d'onde du laser doit être en dehors du spectre d'absorption des molécules

(UV et visible) pour ne pas les dégrader, et en dehors du spectre d'absorption de l'eau (infra rouge moyen) car on travaille en solution. Typiquement, on travaille dans le rouge ou le proche infra rouge (700 *nm* à 1300 *nm*)

- les billes ont un diamètre de l'ordre du micron. On travaille donc dans un régime où $d \simeq \lambda$. Dans ce cas, aucune des deux descriptions (régime de Rayleigh ou optique géométrique) n'est satisfaisante.
- on s'arrange pour utiliser un objectif de grande ouverture numérique et un laser de forte intensité pour avoir un piège de grande raideur.

C'est Ashkin qui a commencé à utiliser les pinces optiques dans les années 70[80]. Les applications sont aujourd'hui multiples [81], du piégeage d'objets inertes comme une micro-sphère de silice [79] à la capture de quelques atomes [82, 83, 84] ou à l'étirement tri-dimensionnel d'une cellule biologique [85].

Notre objectif est, rappelons le, de pouvoir manipuler une molécule unique, de pouvoir la déplacer où bon nous semble et d'être capable de mesurer la force exercée à ses extrémités. Nous avons choisi cette technique de micro-manipulation car elle semble la plus adaptée à notre projet : les micropipettes ne permettent pas de mesurer des forces, sauf si on utilise des vésicules, mais celles-ci risquent de complexifier une expérience où se trouvent déjà en solution des molécules et des microbilles de silice. De plus, comme pour les micro-leviers ou les fibres optiques, il se pose un problème d'encombrement au niveau de l'objectif du microscope permettant de visualiser la manipulation lorsqu'on multiplie les pinces. Les AFM ou les pinces magnétiques ne sont, quant à eux, pas adaptés à une géométrie perpendiculaire à l'axe optique.

Les pinces optiques correspondent aux gammes de forces (0,1 *pN* à 100 *pN*) et à la géométrie de notre problème (cf. section 3.3). Il existe de nombreuses méthodes pour construire plusieurs pinces optiques dont on contrôle la position : l'utilisation de SLM (ou "Spatial Light Modulator", comme un miroir déformable, un modulateur acousto-optique, un réseau de diffraction, un cristal liquide [86, 87, 88, 89, 90, 91]), ou d'un miroir oscillant sur un moteur piezo ou un miroir galvanométrique [92, 93, 94], ou encore de plusieurs sources lumineuses [95].

4.1.3 Le double piège optique

Comme nous venons juste de le voir, une pince optique n'est rien de plus qu'une source de lumière focalisée. Notre montage optique est représenté schématiquement sur la figure 4.3. Dans notre cas, on utilise un laser Nd :YAG (pompé par une diode dans l'infra-rouge à 1064 *nm* et doublé à 532 *nm* par un cristal non linéaire) émettant dans le vert à 532 *nm* de 200 *mW* à 5,5 Watt (Millenia Vs, Spectra Physics) pour pomper une cavité Titane :Saphir (Model 3900S, Spectra Physics). On règle cette cavité à une longueur d'onde $\lambda = 800$ *nm*. Celle-ci peut fournir une puissance allant jusqu'à 1 Watt.

Le faisceau laser est d'abord élargi à un diamètre de 3.8 *mm* par un télescope formé par deux lentilles L1 et L2 de focales $f_{L1} = 100$ *mm* et $f_{L2} = 400$ *mm*. Ensuite, ce faisceau de polarisation horizontale traverse une lame $\frac{\lambda}{2}$ ($\lambda = 780$ *nm*, WPH05M-780, Thorlabs). Selon l'orientation de la lame biréfringente, le faisceau qui en émerge est polarisé elliptiquement. Un cube séparateur C1 (PBSK-700-900-050, CVI) sépare les deux polarisations *s* et *p*, de manière à pouvoir définir indépendamment la position de deux pièges optiques. Le faisceau de polarisation *p* est dirigé vers

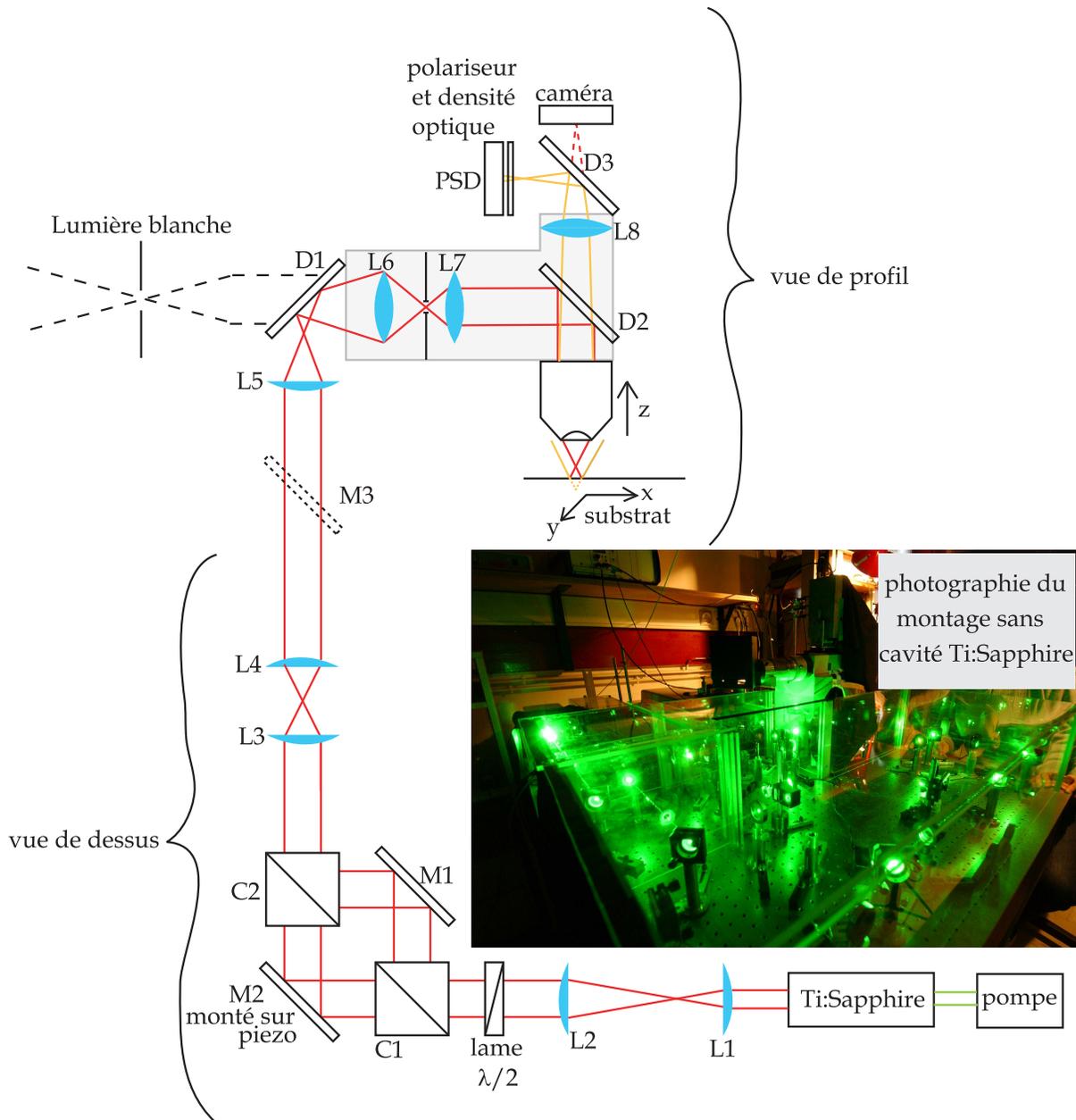


FIGURE 4.3: Schéma du montage d'un double piège optique. Deux lasers sont focalisés par un microscope quelques microns au dessus d'un substrat, formant ainsi deux pinces optiques. Les positions de ces deux pièges sont contrôlées de manière indépendante par deux miroirs $M1$ et $M2$. Une caméra permet de visualiser le substrat et les pièges, et une photodiode (PSD) permet de mesurer les forces exercées sur une bille piégée dans l'un des pièges. En encart, une photographie du montage optique sans cavité Ti:Saphir (Les faisceaux lasers sont alors visibles).

un miroir $M2$ monté sur un module piezo électrique régulé par une boucle de contrôle (PSH 35 SG, PiezoSystem Jena) : ce miroir piezo, dont l'orientation est contrôlée finement, sert à définir précisément l'écart entre les deux pièges. Le faisceau de polarisation s est renvoyé vers une série de miroirs schématisés ici par $M1$ puis vers un autre cube $C2$ qui recombine les deux voies :

ce piège, immobile, nous sert pour les mesures de forces. Les deux faisceaux quasi superposés traversent ensuite un couple de lentilles L3 et L4 de focales identiques $f_{L3} = f_{L4} = 100 \text{ mm}$. Ils sont ensuite réfléchis verticalement par un miroir M3, et traversent une lentille L5 de focale $f_{L5} = 75 \text{ mm}$. Les deux faisceaux sont alors couplés à un microscope droit commercial (BX50WI, Olympus) par son port d'épi-fluorescence (L6 et L7).

Là, un premier miroir dichroïque D1 (630dcspwr, Chroma) mélange la lumière blanche du microscope aux faisceaux laser. Un deuxième dichroïque D2 (620dcspxr-special, Chroma) réfléchit les faisceaux vers l'objectif du microscope (LUMPlanFl 100x/1.00W, Olympus). Les caractéristiques de ces miroirs dichroïques sont présentées sur la figure 4.4.

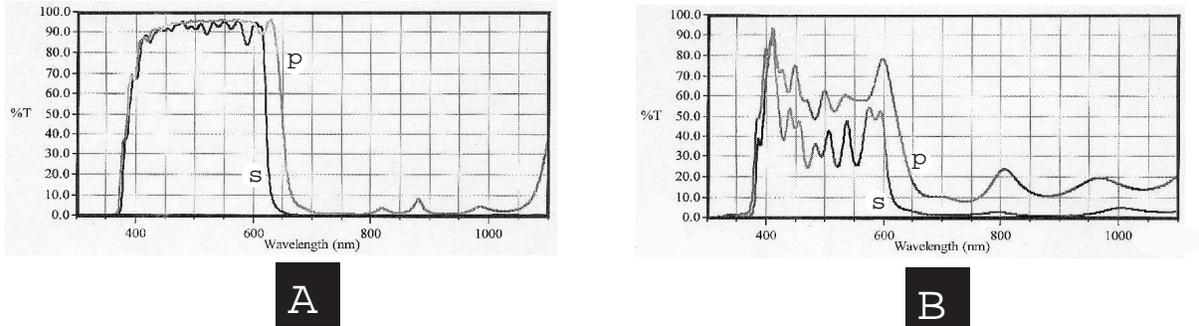


FIGURE 4.4: **A.** Courbe de transmission du dichroïque *D1* et **B.** *D2*. Ces miroirs ont été réalisés sur mesure par la société *Chroma*, et permettent de réfléchir la quasi totalité de la puissance laser vers le substrat pour créer les pinces optiques tout en transmettant une bonne partie de la lumière blanche du microscope vers la caméra.

Le diamètre de la pupille arrière de cet objectif est de $3,6 \text{ mm}$, c'est à dire légèrement inférieur aux diamètres des faisceaux, ceci afin de profiter de toute l'ouverture numérique de l'objectif avec le centre des faisceaux gaussiens pour maximiser la raideur des pièges optiques [96]. Les lentilles L3 et L4 et L5 sont utilisées pour conjuguer M2 et le plan focal arrière de cet objectif tout en maintenant parallèles les faisceaux atteignant l'objectif. La lame $\frac{\lambda}{2}$ est réglée pour que les deux faisceaux aient la même puissance au niveau de l'objectif. La puissance de ces faisceaux après l'objectif est déduite de la valeur de sa transmittance (valeurs nominales : 65% à 800 nm, 85% à 532 nm). Cet objectif à eau permet de travailler soit directement dans la solution, soit en plaçant un intermédiaire entre lui et la surface grâce à sa grande distance de travail ($w_D = 1,5 \text{ mm}$). On peut utiliser soit une lamelle de verre¹, soit un canal microfluidique en polydiméthylsiloxane (PDMS)² réalisé en collaboration avec le Laboratoire de Photonique et de Nanostructures (CNRS-UPR20).

Toutes les lentilles du montage (hors L6 et L7 du microscope) sont couvertes d'un traitement anti-reflet pour les longueurs d'ondes de 650 nm à 1050 nm (LA†-B, Thorlabs).

Les deux faisceaux laser focalisés par l'objectif forment ainsi deux pinces optiques, alignées sur un axe perpendiculaire à l'axe optique et dont on peut ajuster la distance relative en jouant

¹dans ce cas, les aberrations réduisent alors fortement l'efficacité du piège optique, car le contraste d'indice est fort ($n_{\text{verre}} = 1.5$, $n_{H_2O} = 1.33$).

²dans ce cas la différence d'indice est plus faible ($n_{PDMS} = 1.41$, $n_{H_2O} = 1.33$) et le piège fonctionne correctement

sur le miroir M2. Ces faisceaux sont réfléchis par la surface au dessus de laquelle ils sont focalisés, traversent le dichroïque D2 et sont focalisés par la lentille L8 du microscope sur une camera CCD (XC-ST50CE, Sony). Cette caméra est protégée par un filtre dans le proche infra rouge (BG39, Schott, d'épaisseur 1 mm ou 2 mm selon que l'on veuille visualiser ou non la tache du laser). Une partie des faisceaux est aussi dirigée sur une photodiode (Duo-lateral PSD DL2, UDT sensors) pour les mesures de forces, via une lame séparatrice D3 (03BTF058, Melles Griot). Ce détecteur est précédé d'une part par un polariseur (03FPI029, Melles Griot) afin d'y imager uniquement le piège fixe (i.e. celui réfléchi par M1), ainsi que par une densité optique de 2 (NE20B, Thorlabs) pour ne pas le saturer.

En plus du couplage des faisceaux laser au microscope, ce dernier a subi deux modifications annexes. Premièrement, la distance entre la lentille L8 et le support de la caméra CCD a été diminuée, pour faire correspondre le plan visualisé (lumière blanche) et le plan de focalisation des pièges (proche infra-rouge)³. Deuxièmement, on a ajouté entre la source de lumière blanche et le dichroïque D1 un diaphragme d'ouverture supplémentaire à celui du microscope (ID25, Thorlabs) entre deux condenseurs (LA1401, Thorlabs) afin d'augmenter le contraste de l'image.

4.2 Electroniques de mesures

4.2.1 Mesures de forces

Nous avons vu à la section 4.1.2 que, si en solution une bille de silice d'indice n supérieur à l'indice de l'eau $n_0 = 1,33$ est décalée perpendiculairement à l'axe optique C_z d'un piège optique, ce piège exerce sur la bille une force de rappel \vec{F} . On appelle C le point de focalisation du piège sans bille et O le centre de la bille, et l'on pose :

$$\vec{CO} = X \vec{u}_x \quad (4.2)$$

Ce décalage X peut être dû par exemple à une force $-\vec{F}$ exercée par une molécule d'ADN reliée à la bille selon la direction \vec{u}_x .

On suppose que pour des $|X|$ petits, la force de rappel \vec{F} du piège est linéaire en X , c'est à dire :

$$\vec{F} = -kX \vec{u}_x \quad (4.3)$$

pour $|X| < \frac{d}{2}$ avec d le diamètre de la bille et k la constante de raideur du piège (on vérifiera cette hypothèse expérimentalement par la suite).

Le faisceau laser traversant la bille est réfléchi par la surface et imagé sur une photodiode. Soit $X_{photodiode}$ et $Y_{photodiode}$ les coordonnées repérant la position du centre du spot au niveau de cette photodiode selon \vec{u}_x et \vec{u}_y . Cette photodiode est en général centrée de telle manière que le

³il suffit donc simplement de positionner la camera CCD de manière à ce que l'image d'une bille piégée soit nette.

faisceau laser frappe celle-ci en son milieu lorsque $X = 0$ et $Y = 0$, c'est à dire lorsqu'aucune force n'est appliquée sur la bille. Lorsque $X \neq 0$, on voit sur la figure 4.5A que le faisceau laser est dévié. La position du laser sur la photodiode selon \vec{u}_x varie elle aussi, dans des proportions dépendant de la focale de l'objectif, de la distance focale de L8, de la distance entre la photodiode et L8, mais aussi de la distance z entre la surface réfléchissante et la bille. Si l'on mesure $X_{photodiode}$, on peut en déduire X et donc \vec{F} pour une hauteur z donnée⁴.

Il existe principalement deux types de photodiodes servant à déterminer la position d'un spot lumineux dans un plan. Tout d'abord, les diodes à quatre cadrans. Chacun des cadrans de ce type de photodiode possède une anode distincte et génère un courant directement proportionnel aux nombres de photons reçus. Ainsi, si on appelle A, B, C, D ces 4 cadrans (figure 4.5B), et I_A, I_B, I_C et I_D les courants générés par chacun d'eux, on a :

$$X_{photodiode} \propto \frac{I_A + I_C - I_B - I_D}{I_A + I_B + I_C + I_D} \quad (4.4)$$

Ce type de photodiode possède un inconvénient pour notre application. On remarque en effet que la proportionnalité n'est obtenue que si $|X_{photodiode}|$ est inférieur au rayon de la tache du laser. Or pour un X donné, plus $X_{photodiode}$ est grand, plus la mesure de \vec{F} est précise.

On utilise donc dans notre montage une PSD ("Position sensing detector"). Une PSD n'est formée que d'un seul cadran, mais possède plusieurs cathodes sur sa face arrière. Si on appelle A et B ces deux cathodes (figure 4.5C), et I_A et I_B les courants générés par chacune d'elles, on a :

$$X_{photodiode} \propto \frac{I_A - I_B}{I_A + I_B} \quad (4.5)$$

Cette fois ci, la mesure est valable tant que $|X_{photodiode}|$ est inférieur à la somme du rayon de la photodiode et du rayon de la tache du laser : la relation linéaire est vérifiée même si le spot explore une grande partie de la surface sensible. Ce genre de détecteur existe à deux dimensions, soit avec deux autres cathodes alignées perpendiculairement aux deux premières sur la face arrière plus une unique anode sur la face avant (Tetra Lateral PSD), soit avec deux anodes sur la face avant de la photodiode (Duo Lateral PSD).

On travaille avec une Duo Lateral PSD (DL2, UDT sensors), dont les anodes C et D nous permettent de calculer la position verticale du spot laser :

$$Y_{photodiode} \propto \frac{I_C - I_D}{I_A + I_B} \quad (4.6)$$

Les courants I_A, I_B, I_C et I_D sont transformés en tension, additionnés puis divisés par une succession d'amplificateurs opérationnels. Les quatre tensions analysées expérimentalement en sortie de l'électronique de la photodiode sont :

⁴ce point (dépendance en z) sera développé au paragraphe 5.2.3

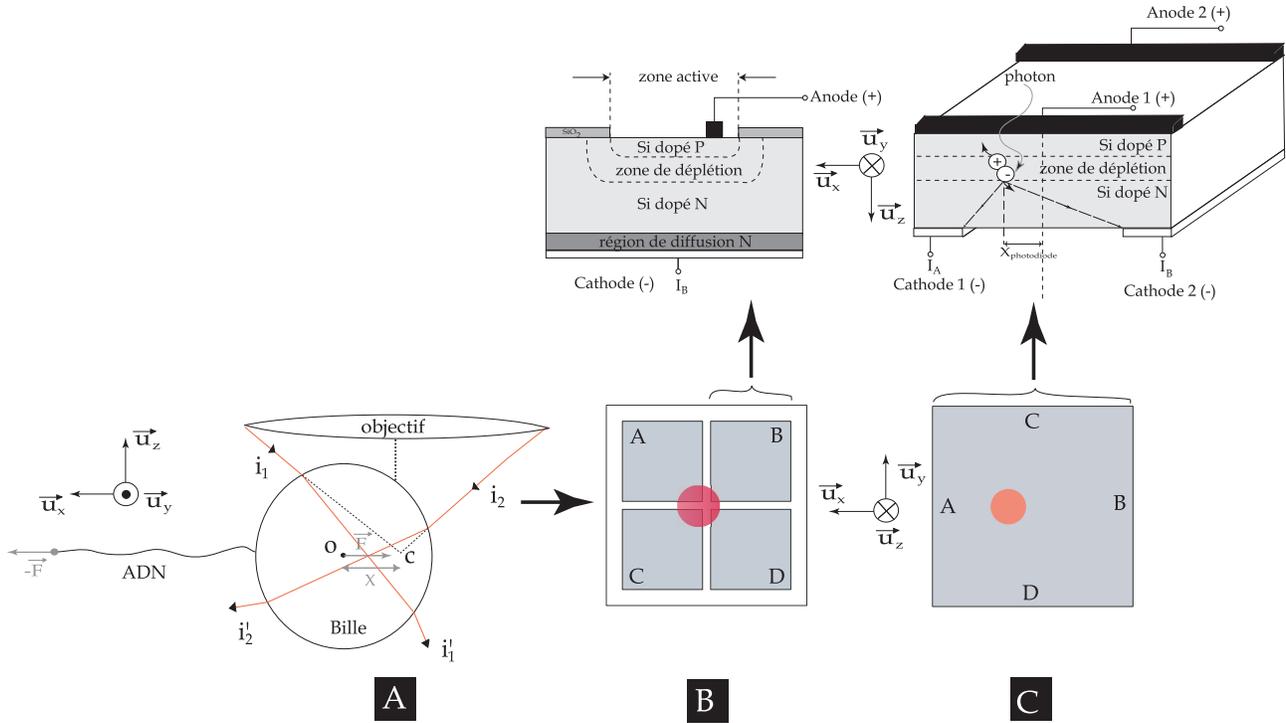


FIGURE 4.5: **A.** Une bille sur laquelle on exerce une force perpendiculaire à l'axe optique de la pince la piégeant se décale transversalement. Le faisceau laser la traversant (en rouge) est alors dévié. **B.** La déviation du laser est imagée sur une photodiode. On aurait pu utiliser une diode à quatre cadrans, mais **C.** nous avons préféré utiliser pour des raisons pratiques une PSD ("Position Sensitive Detector").

$$U_{A-B} \propto I_A - I_B \quad (4.7)$$

$$U_{C-D} \propto I_C - I_D \quad (4.8)$$

$$U_{A+B} \propto I_A + I_B \quad (4.9)$$

$$U_{\frac{A-B}{A+B}} \propto \frac{I_A - I_B}{I_A + I_B} \quad (4.10)$$

Le diviseur (AD538, Analog Devices) qui calcule analogiquement $U_{\frac{A-B}{A+B}}$ ne supporte que des tensions positives à son entrée. C'est pourquoi on s'arrange pour centrer la photodiode telle que $U_{A-B} \gtrsim 0$ quand $X = 0$, et pour que X soit positif lors de mesures de forces, de telle sorte que :

$$U_{A-B} \propto I_A - I_B \propto X_{photodiode} \propto X > 0 \quad (4.11)$$

$$U_{\frac{A-B}{A+B}} = g \frac{U_{A-B}}{U_{A+B}} > 0 \quad (4.12)$$

avec $g = 10 V$ le gain dû au diviseur de tension. $U_{\frac{A-B}{A+B}}$ est envoyé vers un analyseur de spectre (3561A Dynamic Signal Analyzer, Hewlett Packard) pour calibrer le piège. U_{A-B} , U_{C-D} , U_{A+B} , sont connectés à une carte d'acquisition (iDSC1816, Microstar Laboratories) et sauvegardés sur un PC. Ce PC est relié via une carte GPIB à l'analyseur de spectre, et à une détection synchrone (SR830 DSP Lock-in Amplifier, Stanford Research Systems) dont on contrôle la sortie de tension auxiliaire qui impose une tension au miroir piezo M2. On contrôle ainsi la distance entre les deux pièges optiques. La sortie de contrôle de la boucle de rétroaction du piezo est branchée sur la carte iDSC (partie en rouge et en bleu du schéma 4.6).

4.2.2 Mesures de conductivités

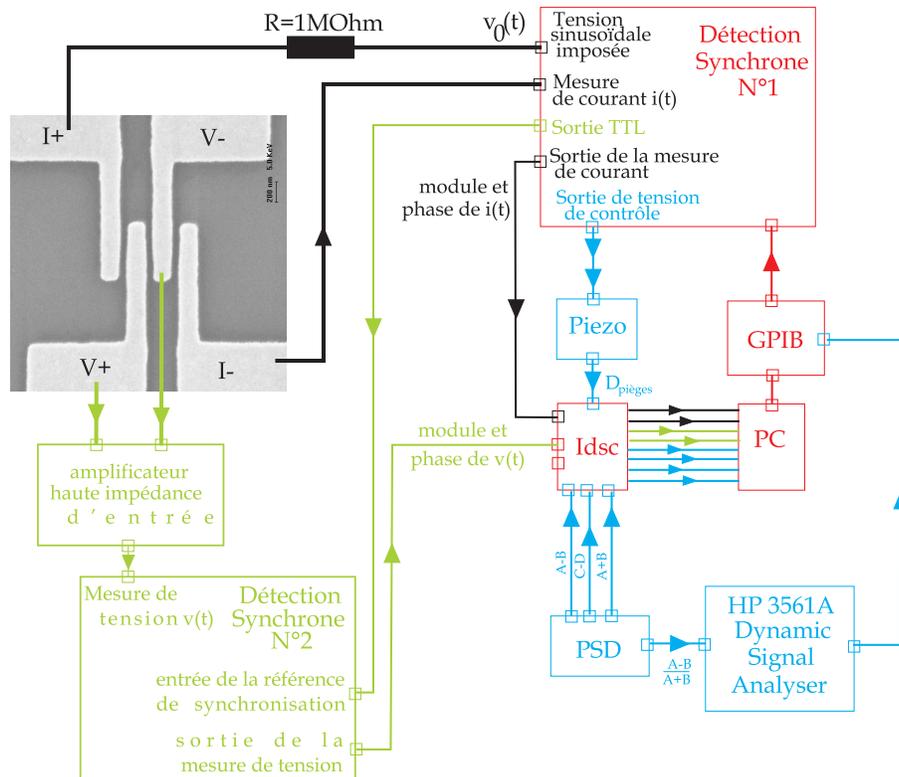


FIGURE 4.6: Acquisition électronique des mesures : un ordinateur muni d'une carte iDSC et GPIB (partie en rouge) gère l'acquisition **1**) d'une mesure de forces (partie en bleu) **2**) du signal $i(t)$ lors d'une mesure deux ou quatre points de conductance (partie en noir) **3**) et du signal $v(t)$ lors d'une mesure quatre points de conductance (partie en vert).

On se propose de faire des mesures de conductance en mode détection synchrone. Ce mode de mesure permet en effet :

- de réduire le bruit de mesure, en sélectionnant dans le signal mesuré une fréquence donnée.

- de mesurer de très faibles courants. Le plus faible calibre de la détection synchrone est en effet de 2 fA.
- d'amoinrir la conduction parasite de l'eau, en se plaçant à des fréquences très faibles ($< 0,1 \text{ Hz}$)

Pour une mesure deux points de la conductance, on impose aux bornes de deux électrodes contactées à de l'ADN une tension $v_0(t)$ oscillant à la fréquence $f < 0,1 \text{ Hz}$, et on mesure le module ainsi que la phase du courant $i(t)$. On utilise pour cela la même détection synchrone qui impose la position du piège mobile (voir section 4.2.1). Une résistance de protection de $1 \text{ M}\Omega$ est placée en série (partie en rouge et noir du schéma 4.6).

On peut aussi effectuer des mesures quatre points, pour s'affranchir des résistances de contact entre les électrodes et l'ADN. On impose dans ce cas une tension $v_0(t)$ entre les électrodes I_+ et I_- et on mesure la tension $v(t)$ aux bornes de deux électrodes V_+ et V_- situées entre I_+ et I_- grâce à une deuxième détection synchrone. Cette deuxième détection synchrone a la même référence de phase que la première. L'impédance d'entrée de la détection synchrone pour la mesure de tensions étant de $10 \text{ M}\Omega$, on place en entrée de la mesure de $v(t)$ un adaptateur d'impédance. Cet étage de préamplification, construit au laboratoire autour d'un ampli d'instrumentation (INA111, Burr-Brown), possède une impédance d'entrée de $10^{12} \Omega$ (partie en rouge, noir et vert du schéma 4.6). On fait l'acquisition des modules et des phases de $i(t)$ et $v(t)$ via la carte iDSC.

Chapitre 5

Calibrage et étude des pinces optiques sur une surface opaque

5.1 Calibrage du piège optique

Nous avons vu au chapitre précédent que le calcul théorique de la force exercée par un piège optique de longueur d'onde $\lambda \simeq 1000 \text{ nm}$ sur une bille de diamètre $d \simeq 1 \text{ }\mu\text{m}$ n'est pas évident. En effet, même si l'on connaît l'ouverture numérique de l'objectif, la puissance du faisceau laser, et l'indice de la bille, le fait de se trouver à la limite du régime de Rayleigh ainsi que les imperfections des éléments optiques, rend nécessaire de calibrer expérimentalement le piège.

Trois méthodes sont présentées dans la suite. Nous discuterons de leurs avantages et inconvénients respectifs.

5.1.1 Scan d'une bille fixe sur une surface

Comme nous l'avons vu à la section 4.2.1, le signal $\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}$ de la photodiode varie linéairement avec la position X de la bille dans le piège. On note :

$$\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}} = C^{-1}X \quad (5.1)$$

Pour déterminer le coefficient C , on se place dans la configuration de la figure 5.1A : on focalise l'objectif à eau sur une bille de diamètre d collée sur une surface de silicium. Cette lamelle est posée sur une table de micro-déplacement (NPS-XY-100A et NPS3330-LD-LN-ANA, Queensgate Ltd) qui nous permet de scanner la bille selon les axes \vec{u}_x et \vec{u}_y , tout en enregistrant les signaux $\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}$ et $\frac{U_{C-D}}{U_{A+B}}$.

Une telle mesure est présentée sur la figure 5.2. Le diamètre de la bille est de $0,97 \text{ }\mu\text{m}$ (SS03N, Bangs Laboratories), les pas sont de 10 nm selon l'axe \vec{u}_x et de 100 nm selon l'axe \vec{u}_y , et la

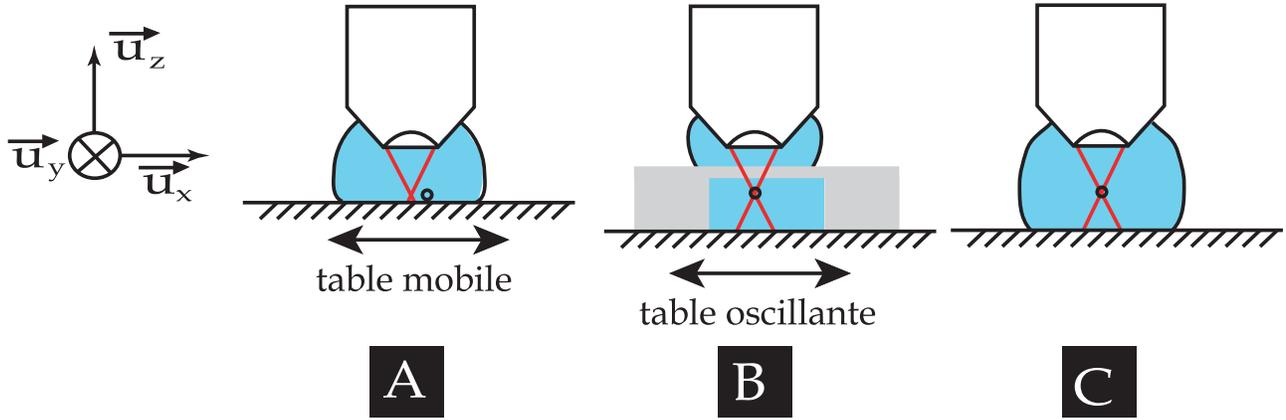


FIGURE 5.1: Configurations expérimentales utilisées lors des différentes méthodes de calibration d'un piège optique. **A.** Pour le scan d'une bille sur une surface, l'objectif focalise le piège dans le plan d'une bille collée sur une surface. **B.** Pour l'oscillation forcée d'une bille, l'objectif focalise le piège en solution à quelques microns d'une surface réfléchissante. Cette surface oscille afin de faire osciller le tampon entourant la bille. On utilise une lamelle de verre ou une couche de PDMS pour isoler le liquide entourant la bille de l'eau en contact avec l'objectif immobile. **C.** Pour l'analyse du mouvement brownien d'une bille, l'objectif focalise le piège en solution à quelques microns d'une surface réfléchissante.

puissance du piège est de 115 mW après l'objectif. Soit X_p et Y_p les coordonnées du piège sur la surface (origine arbitraire). On remarque que lorsque l'on regarde des coupes à X_p fixé (figure 5.3), la pente $\frac{d(\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}})}{d(X_p)}(X_p; Y_p)$ passe par un maximum pour $Y_p = 0,3 \mu\text{m}$ correspondant à la tranche passant par un diamètre de la bille. Quand une bille est piégée, elle se déplace selon cette tranche puisque qu'aucune force n'est exercée selon \vec{u}_y . Sur cette tranche, on voit que la réponse du piège est linéaire en X_p sur un intervalle de $0,7 \mu\text{m}$. Cet intervalle est lui même inclus entre un maximum et un minimum de $\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}$ séparé par une distance $d = 1 \mu\text{m}$ (le diamètre de la bille). On vérifie donc expérimentalement que la réponse du piège est linéaire sur 70% du rayon de la bille.

On détermine ainsi le paramètre C^{-1} caractérisant notre piège en interpolant la partie centrale de $\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}$ par une droite :

$$C^{-1} = \frac{d(\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}})}{d(X_p)}(Y_p = 0,3\mu\text{m}) = 0,80 \pm 0,01\mu\text{m}^{-1} \quad (5.2)$$

Ce coefficient dépend bien évidemment de la puissance du laser et des gains de l'électronique de la photodiode. Connaître ce coefficient C ne nous permet pas cependant de déterminer la force s'exerçant sur la bille, puisque :

$$F = kX = kC \frac{U_{A-B}}{U_{A+B}} \quad (5.3)$$

la constante de raideur du piège reste à déterminer.

Cette méthode de calibrage permet donc de déterminer l'intervalle dans lequel le système de

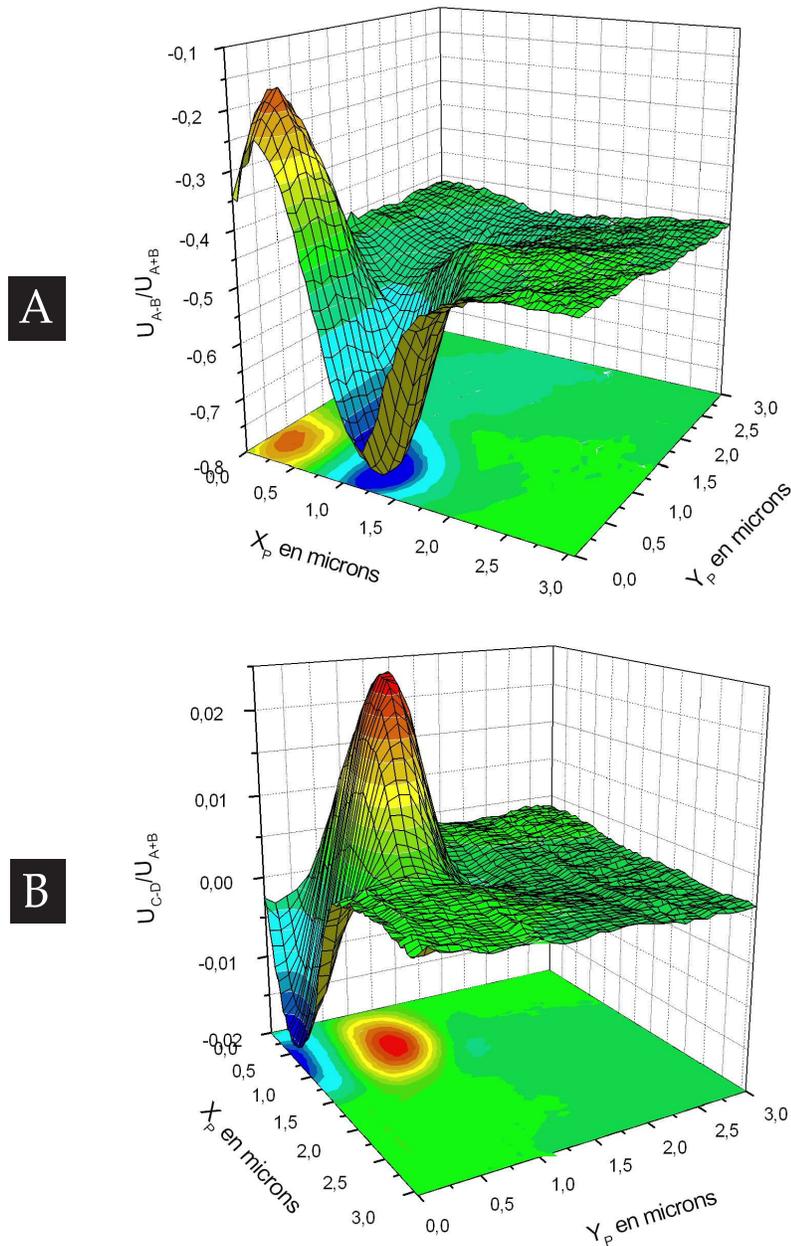


FIGURE 5.2: Scan d'une bille sur une surface. **A.** variation de $\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}$ en fonction de la position $(X_p; Y_p)$ du piège sur la surface **B.** variation de $\frac{U_{C-D}}{U_{A+B}}$ en fonction de la position $(X_p; Y_p)$ du piège sur la surface

détection possède une réponse en force linéaire au déplacement de la bille. Elle ne permet pas de mesurer des forces.

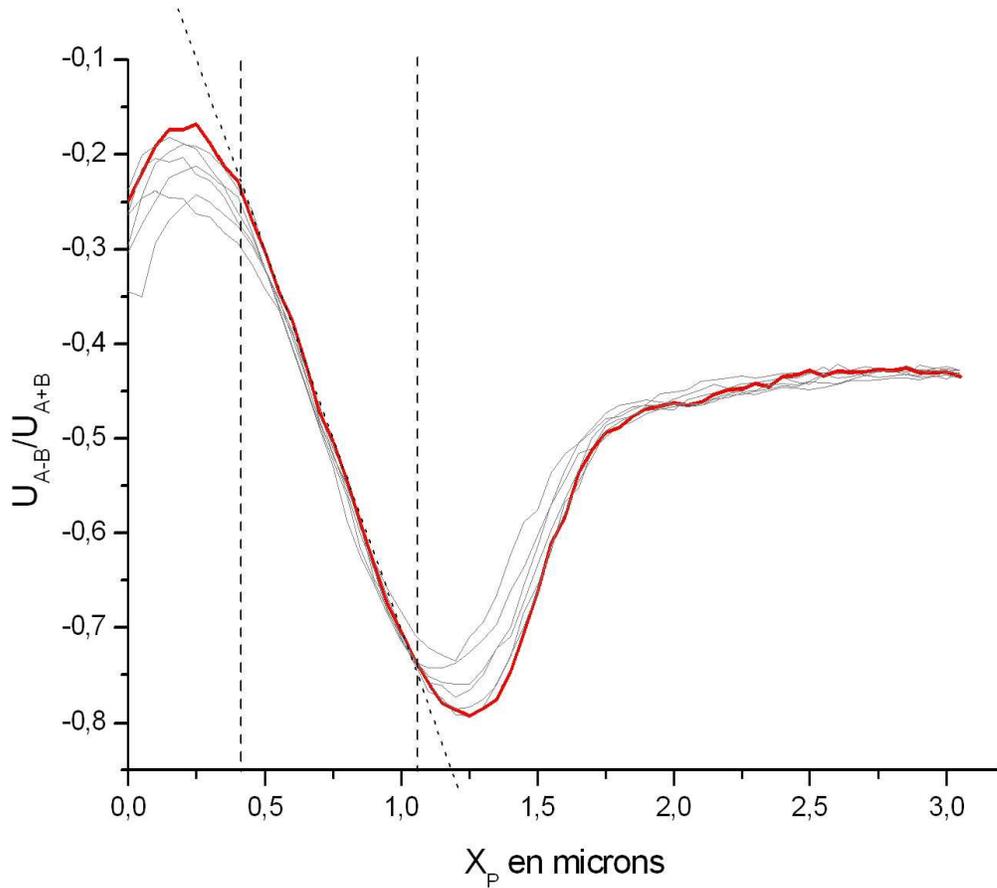


FIGURE 5.3: Scan d'une bille sur une surface : variation de $\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}$ en fonction de la position X_p du piège sur la surface, pour différentes valeurs de Y_p . La courbe rouge correspond à Y_p fixé tel que le piège coupe la bille par un de ses diamètres. On remarque alors que $\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}$ est linéaire sur 70% du diamètre de la bille

5.1.2 Oscillation forcée d'une bille

On se propose maintenant de déterminer expérimentalement la grandeur kC reliant le signal de la photodiode à la force F exercée sur une bille piégée :

$$F = kX = kC \frac{U_{A-B}}{U_{A+B}} \quad (5.4)$$

Pour cela, on piège une bille de diamètre d légèrement au dessus de la surface de silicium. Soit z la distance entre cette surface et le centre du piège. On fait osciller la table de microdéplacement à une pulsation Ω avec une amplitude X_0 selon l'axe \vec{u}_x . Enfin, pour éviter toute perturbation de l'objectif, on isole l'objectif du microscope de la lamelle de silicium par un micro-canal en PDMS ou une lamelle de verre légèrement surélevée. La vitesse v de l'eau environnant le piège est alors homogène et égale à la vitesse imposée par la platine piezo (voir figure 5.1B). La position de

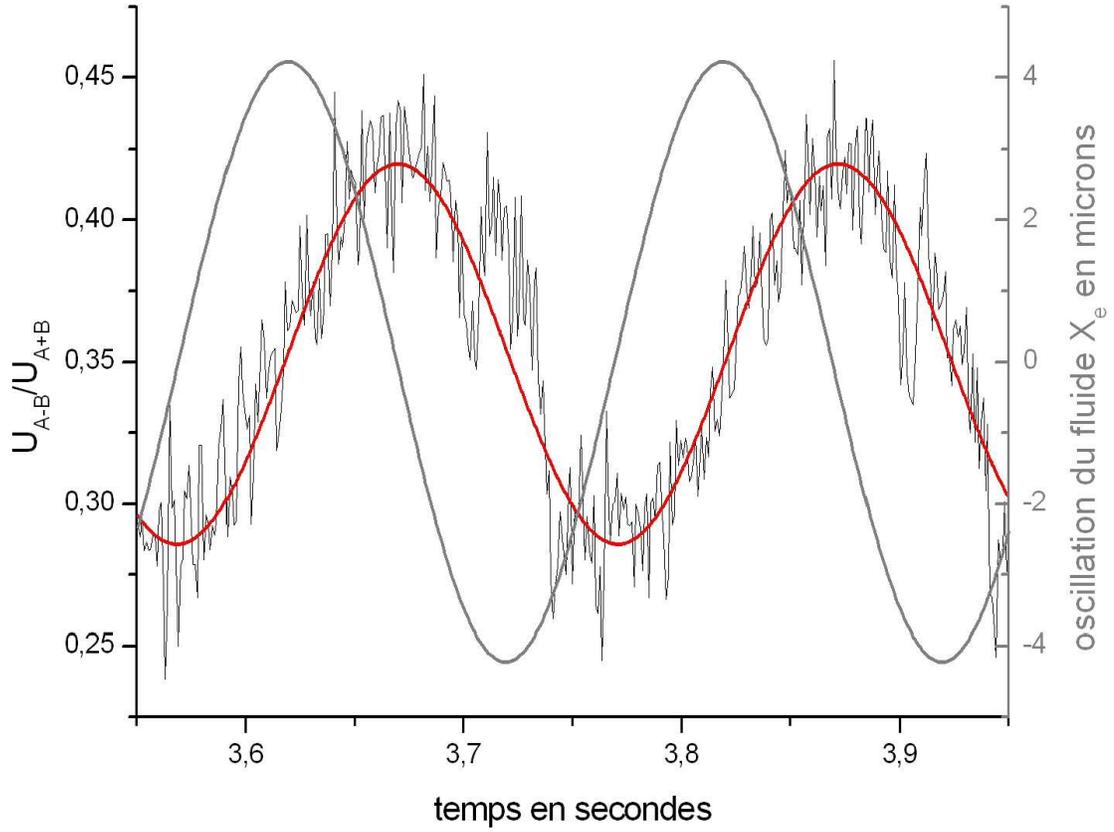


FIGURE 5.4: Signal $\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}$ (courbe bruitée) d'une bille entourée d'un liquide soumis à une oscillation X_e (courbe grise) de fréquence 5 Hz et d'amplitude $4,2 \mu\text{m}$ ($z = 4 \mu\text{m}$, $P = 115 \text{ mW}$). On remarque le déphasage de $\frac{\pi}{2}$ entre $\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}$ et X_e . Une interpolation sinusoïdale de $\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}$ (en rouge) nous donne une valeur de l'amplitude crête à crête de ce signal $A_{\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}}$ égale à 0,14.

l'eau par rapport au centre du piège X_e est alors :

$$X_e = X_0 \cos(\Omega t) \quad (5.5)$$

dans le cas d'un nombre de Reynolds $\frac{vd\rho}{\eta}$ faible (ρ la masse volumique et $\eta = \rho\nu$ la viscosité dynamique de l'eau) et en négligeant le mouvement brownien, l'équation du mouvement de la bille se réduit à :

$$kX + \gamma \frac{d(X - X_e)}{dt} = 0 \quad (5.6)$$

avec γ le coefficient de friction de la bille dans l'eau.

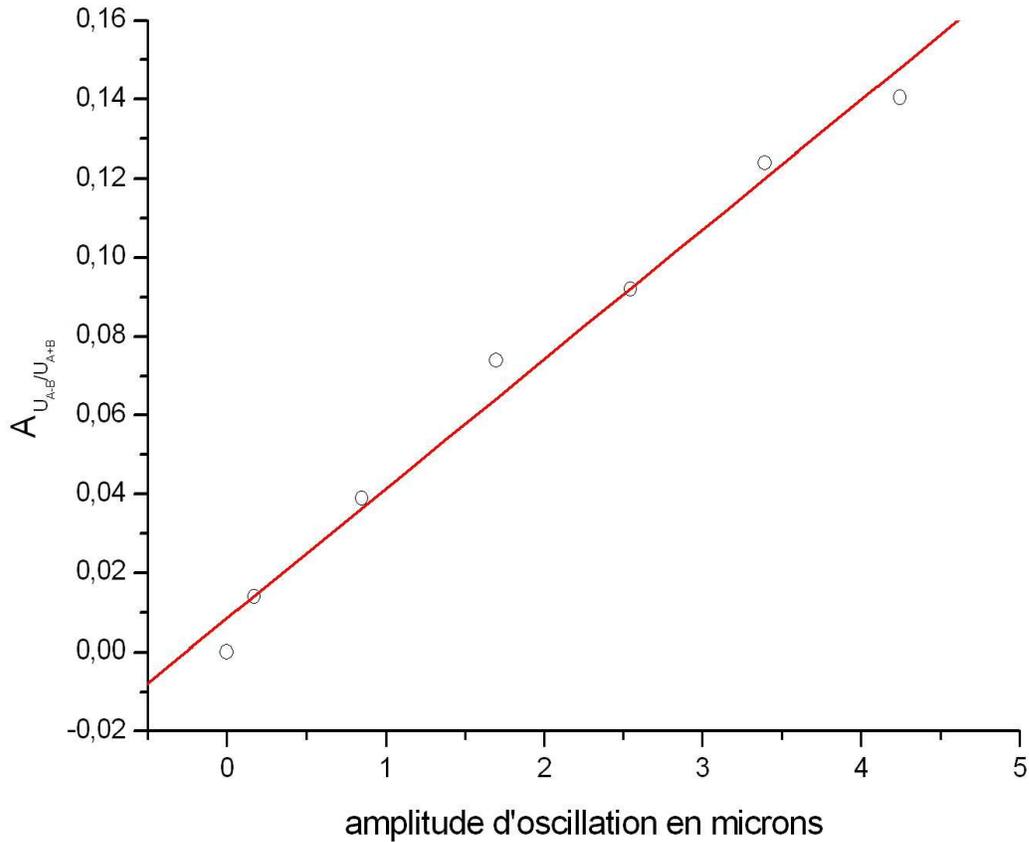


FIGURE 5.5: Amplitude crête à crête $A_{\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}}$ du signal $\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}$ d'une bille entourée d'un liquide soumis à une oscillation X_e de fréquence 5 Hz et d'amplitude X_0 , en fonction de X_0 ($z = 4 \mu\text{m}$, $P = 115 \text{ mW}$). $A_{\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}}$ dépend bien linéairement de X_0 .

On établit alors :

$$X = \frac{\Omega\tau X_0}{\sqrt{1 + \Omega^2\tau^2}} \cos(\Omega t + \frac{\pi}{2} - \arctan(\Omega\tau)) \quad (5.7)$$

avec $\tau = \frac{\gamma}{k}$.

Dans le régime $\Omega\tau \ll 1$ ¹, le mouvement de la bille est en quadrature de phase par rapport au mouvement du fluide imposé :

$$X = \Omega\tau X_0 \cos(\Omega t + \frac{\pi}{2}) \quad (5.8)$$

¹Cette condition sera vérifiée plus loin (équation 5.12.)

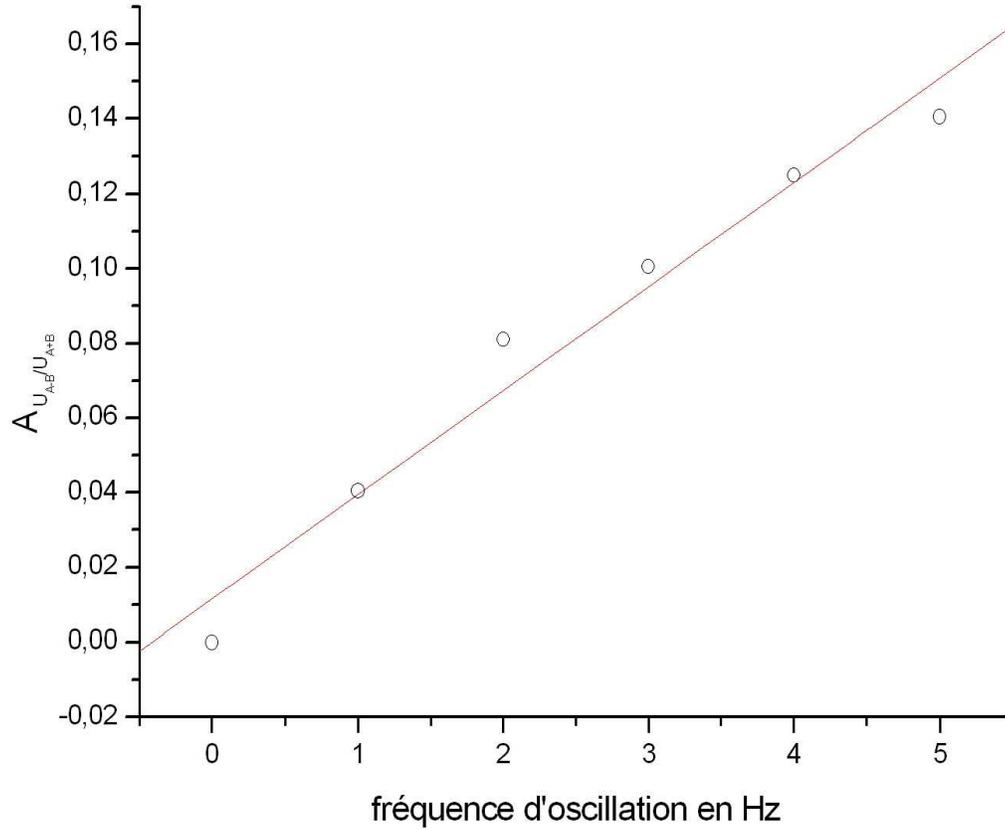


FIGURE 5.6: Amplitude crête à crête $A_{\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}}$ du signal $\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}$ d'une bille entourée d'un liquide soumis à une oscillation X_e de fréquence $\frac{\Omega}{2\pi}$ et d'amplitude $X_0 = 4,2 \mu m$, en fonction de $\frac{\Omega}{2\pi}$ ($z = 4 \mu m$, $P = 115 mW$). $A_{\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}}$ dépend bien linéairement de Ω .

De plus, on remarque que l'amplitude crête à crête d'oscillation de la bille A_X en μm (ou $A_{\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}}$ à la sortie de la photodiode) dépend linéairement de X_0 et de Ω .

On a donc finalement :

$$A_X = 2\frac{\gamma}{k}\Omega X_0 = C A_{\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}} \quad (5.9)$$

$$kC = 2\gamma\Omega \frac{X_0}{A_{\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}}} \quad (5.10)$$

Les figures 5.4, 5.5 et 5.6 présentent des résultats obtenus pour la même bille avec $d = 0,97$

μm , $z = 4 \mu m$ $P = 115 mW$ la puissance du piège, $\gamma[T = 25^\circ C, z = 4\mu m] = 8,75.10^{-9} kg.s^{-1}$, $0,2 Hz \leq \frac{\Omega}{2\pi} \leq 5 Hz$ et $0,2 \mu m \leq X_0 \leq 4,2 \mu m$. Les expériences sont réalisées dans du tampon PB ($10 mM Na_2HPO_4 KH_2PO_4$) et avec une lamelle de verre entre la surface de silicium et l'objectif. Dans ces conditions, on a :

$$\frac{vd\rho}{\eta} \sim 10^{-5} \ll 1 \quad (5.11)$$

De plus, si l'on considère que $k \sim 100 pN.\mu m^{-1}$ (on vérifiera cette hypothèse par la suite), on a bien :

$$\Omega \frac{\gamma}{k} \sim 10^{-4} s \ll 1 \quad (5.12)$$

La figure 5.4 illustre le déphasage de $\frac{\pi}{2}$ entre $\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}$ et X_e ($\frac{\Omega}{2\pi} = 5 Hz$ et $X_0 = 4,2 \mu m$). Les figures 5.5 et 5.6 illustrent la linéarité de $A \frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}$ en fonction de X_0 et de Ω . L'ensemble des mesures nous donne une valeur de kC contenue dans un intervalle :

$$kC = 13,6 \pm 2,5 pN \quad (5.13)$$

Cette méthode de calibrage manque de précision, surtout si on réalise que l'ensemble des mesures présentées ici a été réalisé avec une seule bille et donc qu'aucun biais issue d'une disparité entre billes n'intervient. Ce manque de précision provient en partie du bruit sur l'oscillation de la bille (et donc du signal $\frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}$), qui rend l'interpolation de $A \frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}$ par une sinusoïdale parfois difficile.

5.1.3 Analyse du mouvement brownien d'une bille

On expose dans cette partie une méthode de détermination de C et de k à la fois. On s'intéresse pour cela au mouvement brownien d'une bille dans un piège optique. On se place dans la configuration de la figure 5.1C : la bille est libre dans le piège en solution, à une hauteur z de la surface de silicium. On suppose alors que les seules forces s'exerçant sur la bille sont la force de friction de l'eau proportionnelle à γ (le coefficient de friction de la bille dans l'eau), la force de rappel du piège proportionnelle à k (la constante de raideur du piège) et le bombardement des particules d'eau agitées thermiquement $F_l(t)$. Le mouvement de la bille est alors décrit par l'équation de Langevin :

$$\gamma \frac{dX}{dt} + kX = F_l(t) \quad (5.14)$$

La force $F_l(t)$ est issue d'un processus stochastique activé thermiquement, autrement dit la moyenne temporelle de cette force est nulle, mais son spectre en fréquence f est une constante (i.e. un bruit blanc) proportionnelle à la température :

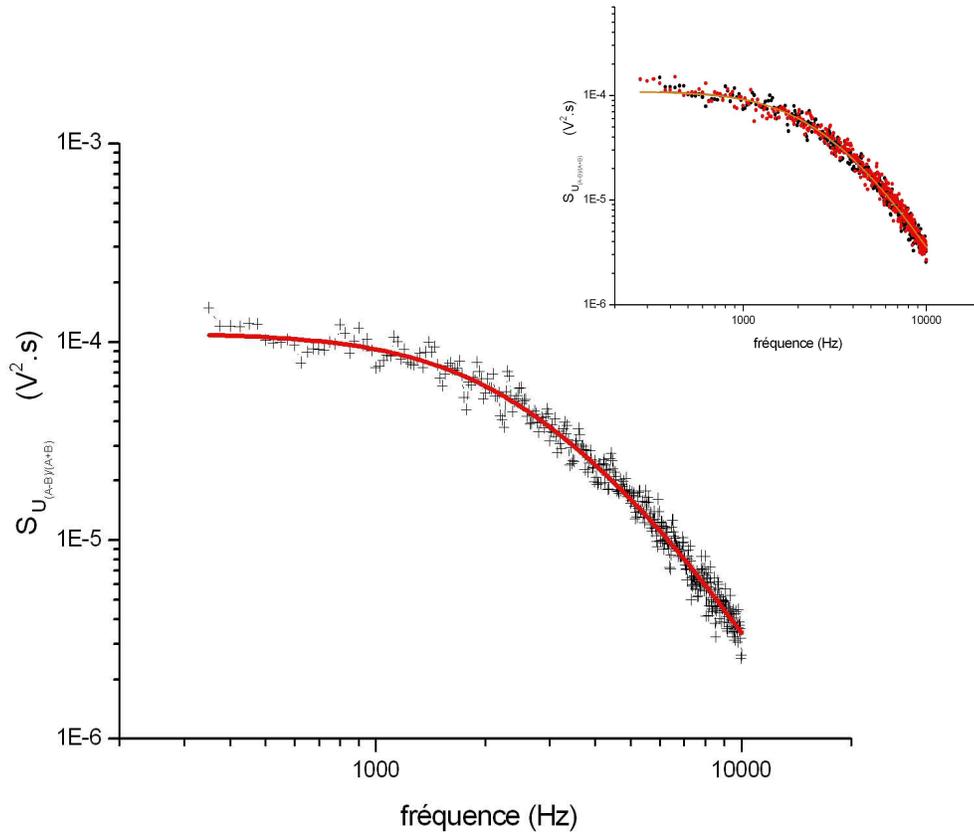


FIGURE 5.7: Densité de puissance spectrale du signal $U_{\frac{A-B}{A+B}}$ d'une bille de diamètre $d = 0,97 \mu m$, à une hauteur $z = 4 \mu m$ de la surface de silicium, pour une puissance du piège $P = 115 mW$, et à $25^\circ C$. Une interpolation de la lorentzienne obtenue nous donne une fréquence de coupure $f_c = 2200 \pm 30 Hz$ et une valeur à l'origine $S_{U_{\frac{A-B}{A+B}}}(0) = 11.10^{-5} \pm 0,2.10^{-5} V^2.s$, soit $C^{-1} = 10,57 \pm 0,08 \mu m^{-1}$ et $kC = 11,44 \pm 0,08 pN$. En insert : la superposition de deux lorentziennes obtenues pour la même bille. Les résultats sont très reproductibles pour une même bille, mais différents d'une dizaine de pourcents d'une bille à l'autre.

$$\langle F_l(t) \rangle = 0 \quad (5.15)$$

$$\|\tilde{F}_l(f)\|^2 = 4\gamma k_b T \quad (5.16)$$

où $\tilde{F}_l(f)$ est la transformée de Fourier de $F_l(t)$, k_b est la constante de Boltzmann, T la température. On pose :

$$S_X(f) = \|\tilde{X}(f)\|^2 \quad (5.17)$$

avec $\tilde{X}(f)$ est la transformée de Fourier de $X(t)$. $S_X(f)$ (en $m^2.s$) est appelée densité de

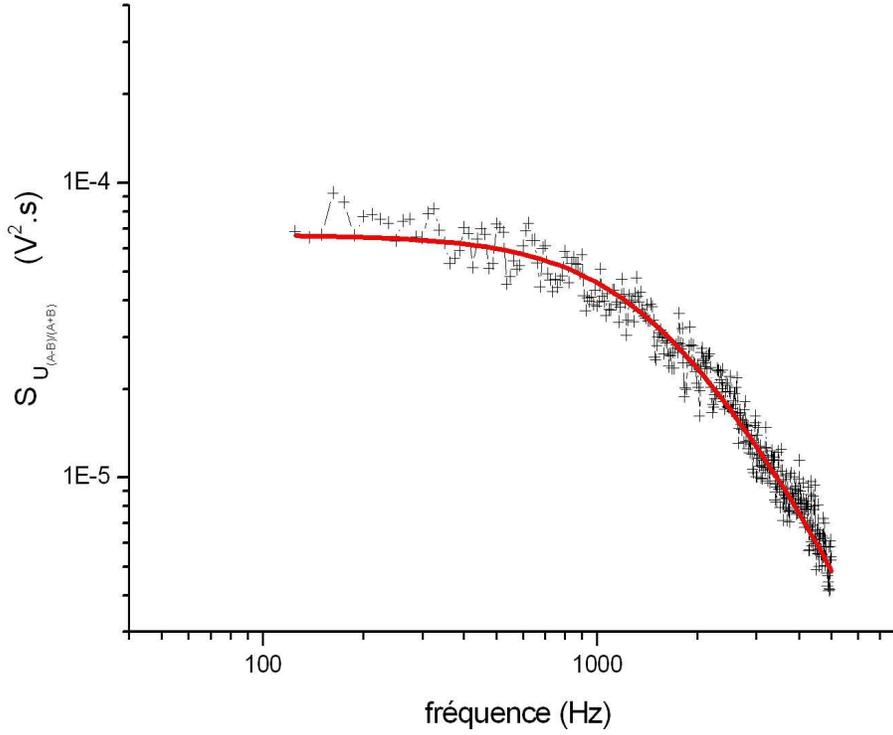


FIGURE 5.8: Densité de puissance spectrale du signal $U_{\frac{A-B}{A+B}}$ d'une bille de diamètre $d = 0,97 \mu m$, à une hauteur $z = 4 \mu m$ de la surface de silicium, pour une puissance du piège $P = 115 mW$, et à $25^\circ C$. L'objectif et la lamelle de silicium sont séparés par une lamelle de verre afin de se mettre dans les mêmes conditions expérimentales que lors de la calibration du piège par oscillation forcée d'une bille. Une interpolation de la lorentzienne obtenue nous donne une fréquence de coupure égale à $f_c = 1494 \pm 20 Hz$ et une valeur à l'origine $S_{U_{\frac{A-B}{A+B}}}(0) = 7.10^{-5} \pm 0,09.10^{-5} V^2.s$, soit $C^{-1} = 5,73 \pm 0,04 \mu m^{-1}$ et $kC = 14,3 \pm 0,1 pN$

puissance spectrale. Ne connaissant pas l'expression de la fonction $\tilde{F}(t)$, on résout l'équation 5.14 dans l'espace de Fourier. On trouve que $S_X(f)$ est décrite par une fonction de Lorentz :

$$S_X(f) = \frac{k_b T}{\gamma \pi^2 (f_c^2 + f^2)} \quad (5.18)$$

où l'on a posé :

$$f_c = \frac{k}{2\pi\gamma} \quad (5.19)$$

f_c est la fréquence de coupure de la lorentzienne.

On distingue donc deux régimes :

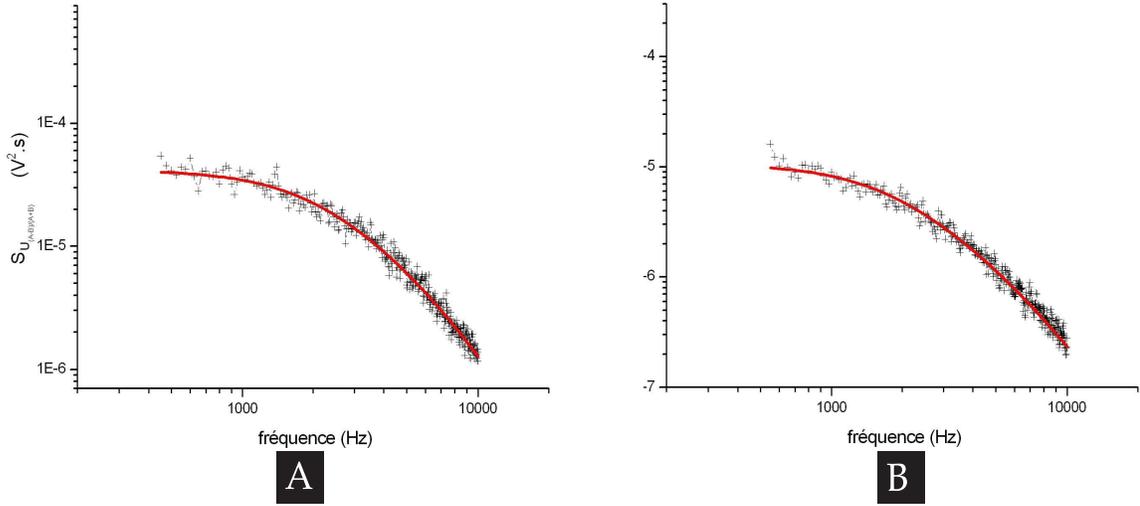


FIGURE 5.9: Densité de puissance spectrale du signal $U_{\frac{A-B}{A+B}}$ d'une bille de diamètre $d = 0,97 \mu\text{m}$, pour une puissance du piège $P = 115 \text{ mW}$, et à 25°C . **A.** A une hauteur $z = 1,5 \mu\text{m}$ de la surface de silicium, une interpolation de la lorentzienne obtenue nous donne une fréquence de coupure égale à $f_c = 2202 \pm 30 \text{ Hz}$ et une valeur à l'origine $S_{U_{\frac{A-B}{A+B}}}(0) = 4.10^{-5} \pm 0,07.10^{-5} \text{ V}^2.\text{s}$, soit $C^{-1} = 6,71 \pm 0,06 \mu\text{m}^{-1}$ et $kC = 20 \pm 0,2 \text{ pN}$. **B.** A une hauteur $z = 1 \mu\text{m}$ de la surface de silicium, une interpolation de la lorentzienne obtenue nous donne une fréquence de coupure égale à $f_c = 1847 \pm 30 \text{ Hz}$ et une valeur à l'origine $S_{U_{\frac{A-B}{A+B}}}(0) = 1.10^{-5} \pm 0,02.10^{-5} \text{ V}^2.\text{s}$, soit $C^{-1} = 2,92 \pm 0,03 \mu\text{m}^{-1}$ et $kC = 41,4 \pm 0,5 \text{ pN}$.

- un régime basses fréquences $f \ll f_c$ pour lequel la densité de puissance spectrale est constante :

$$S_X(f \ll f_c) \sim S_X(f = 0) = \frac{4\gamma k_b T}{k^2} \quad (5.20)$$

- un régime hautes fréquences $f \gg f_c$ pour lequel $S_X(f)$ décroît en $\frac{1}{f^2}$.

Expérimentalement, on utilise un analyseur de spectre (voir section 4.2.1) qui analyse le signal $U_{\frac{A-B}{A+B}}$. En gardant à l'esprit que :

$$U_{\frac{A-B}{A+B}} = g \frac{U_{A-B}}{U_{A+B}} = gC^{-1}X \quad (5.21)$$

avec $g = 10 \text{ V}$ le gain du diviseur de tension. En tenant en plus compte de la fréquence de coupure de l'électronique de la photodiode f_{elec} [97, 98], la courbe expérimentale est décrite par l'équation :

$$S_{U_{\frac{A-B}{A+B}}}(f) = g^2.C^{-2}S_X(f) \frac{1}{1 + \frac{f^2}{f_{elec}^2}} = g^2.C^{-2} \frac{k_b T}{\gamma \pi^2 f_c^2} \frac{1}{1 + \frac{f^2}{f_c^2}} \frac{1}{1 + \frac{f^2}{f_{elec}^2}} \quad (5.22)$$

En interpolant les courbes obtenues, on détermine $S_{U_{\frac{A-B}{A+B}}}(f = 0)$ et f_c . La valeur de f_{elec} est

connue ($f_{elec} = 14 \text{ kHz}$). On détermine ainsi k , C , kC , et F la force qu'exerce le piège sur la bille :

$$k = 2\pi\gamma f_c \quad (5.23)$$

$$C = g \sqrt{\frac{S_X(f=0)}{S_{U_{\frac{A-B}{A+B}}}(f=0)}} = g \sqrt{\frac{k_b T}{\gamma \pi^2 f_c^2 S_{U_{\frac{A-B}{A+B}}}(0)}} \quad (5.24)$$

$$kC = 2g \sqrt{\frac{\gamma k_b T}{S_{U_{\frac{A-B}{A+B}}}(0)}} \quad (5.25)$$

$$F = 2g \sqrt{\frac{\gamma k_b T}{S_{U_{\frac{A-B}{A+B}}}(0)} \frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}} \quad (5.26)$$

La figure 5.7 présente une courbe pour $d = 0,97 \text{ } \mu\text{m}$, $z = 4 \text{ } \mu\text{m}$ $P = 115 \text{ mW}$, $\gamma[T = 25^\circ\text{C}, z = 4 \text{ } \mu\text{m}] = 8,75 \cdot 10^{-9} \text{ kg.s}^{-1}$. Une interpolation de la lorentzienne obtenue nous donne $f_c = 2200 \pm 30 \text{ Hz}$ et $S_{U_{\frac{A-B}{A+B}}}(0) = 11 \cdot 10^{-5} \pm 0,2 \cdot 10^{-5} \text{ V}^2 \cdot \text{s}$, soit $C^{-1} = 10,57 \pm 0,08 \text{ } \mu\text{m}^{-1}$ et $kC = 11,44 \pm 0,08 \text{ pN}$. En haut à droite de la figure se trouve en insert la superposition de deux lorentziennes obtenues pour la même bille.

Comparaison des résultats avec le calibrage par oscillation de la bille

En réalisant plusieurs calibrations par analyse du mouvement brownien, on remarque que l'erreur relative sur kC est bien meilleure pour cette technique que pour la technique d'oscillation si l'on travaille sur une même bille. Cela est dû au fait que l'analyseur de spectre moyenne en réalité une multitude de courbes de densité de puissance spectrale, ce qui lisse les résultats et améliore la qualité de leur interpolation. Par contre, la différence relative sur C^{-1} et kC entre des billes différentes est aussi de l'ordre de 10% dans le cas de l'étude du mouvement brownien.

Si l'on recommence la même expérience avec une lamelle de verre entre l'objectif et la surface de silicium afin de reproduire les conditions expérimentales du calibrage par oscillation (figure 5.8), on trouve $f_c = 1494 \pm 20 \text{ Hz}$ et $S_{U_{\frac{A-B}{A+B}}}(0) = 7 \cdot 10^{-5} \pm 0,09 \cdot 10^{-5} \text{ V}^2 \cdot \text{s}$, soit $C^{-1} = 5,73 \pm 0,04 \text{ } \mu\text{m}^{-1}$ et $kC = 14,3 \pm 0,1 \text{ pN}$. En prenant compte de la variabilité entre bille, la valeur de kC finalement obtenue $kC = 14,3 \pm 2 \text{ pN}$ est bien comparable à $kC = 13,6 \pm 2,5 \text{ pN}$ trouvé à la section 5.1.2. Ces deux techniques de calibrage sont donc cohérentes.

Comparaison des résultats avec le calibrage par scan d'une bille sur une surface

La valeur $C^{-1} = 10,57 \pm 0,08 \text{ } \mu\text{m}^{-1}$ est très différente de la valeur $C^{-1} = 0,80 \pm 0,01 \text{ } \mu\text{m}^{-1}$ trouvée à la section 5.1.1. Pour s'approcher des conditions expérimentales du scan d'une bille

sur une surface, on réalise l'étude du mouvement brownien d'une bille, très près de la surface. On recommence donc l'expérience précédente (sans lamelle, $d = 0,97 \mu m$, $P = 115 mW$), mais pour des valeurs de z plus faibles.

Pour $z = 1,5 \mu m$ ($\gamma[T = 25^\circ C, z = 1,5 \mu m] = 9,68.10^{-9} kg.s^{-1}$), on trouve $f_c = 2202 \pm 30 Hz$ et $S_{U_{\frac{A-B}{A+B}}}(0) = 4.10^{-5} \pm 0,07.10^{-5} V^2.s$, soit $C^{-1} = 6,71 \pm 0,06 \mu m^{-1}$ et $kC = 20 \pm 0,2 pN$ (courbe 5.9A).

Pour $z = 1 \mu m$ ($\gamma[T = 25^\circ C, z = 1 \mu m] = 10,43.10^{-9} kg.s^{-1}$), on trouve $f_c = 1847 \pm 30 Hz$ et $S_{U_{\frac{A-B}{A+B}}}(0) = 1.10^{-5} \pm 0,02.10^{-5} V^2.s$, soit $C^{-1} = 2,92 \pm 0,03 \mu m^{-1}$ et $kC = 41,4 \pm 0,5 pN$ (courbe 5.9B).

On voit donc que pour z tendant vers 0, la valeur de C^{-1} tend vers une valeur faible s'approchant de la valeur déterminée lorsque la bille est collée à la surface. Ces deux techniques de calibrage sont donc cohérentes.

Cela nous montre surtout que C^{-1} et donc kC dépendent de manière dramatique de z .

5.1.4 Variation du coefficient de friction γ en fonction de la température et de la hauteur z entre le piège optique et la surface de silicium

L'expression du coefficient de friction d'un fluide de viscosité dynamique η pour une bille de rayon r dans le cas d'un faible nombre de Reynolds est donnée par la formule de Stokes :

$$\gamma = 6\pi\eta r \quad (5.27)$$

Dans le cas où la bille se trouve à une faible distance z d'une surface, on doit prendre en compte l'interaction avec cette surface. Au premier ordre [100] :

$$\gamma = 6\pi\eta r \left(1 + \frac{9}{16} \frac{r}{z}\right) \quad (5.28)$$

De plus, la viscosité dépend de la température. On retiendra comme ordre de grandeur $\eta[T = 25^\circ C] = 0,896.10^{-3} kg.m^{-1}.s^{-1}$ et $\eta[T = 35^\circ C] = 0,727.10^{-3} kg.m^{-1}.s^{-1}$, soit une variation d'environ 20% pour une augmentation de 10 K. Pour une bille de rayon $r = 0,485 \mu m$, $\gamma[T = 25^\circ C, z = 4 \mu m] = 8,75.10^{-9} kg.s^{-1}$. Lorsque que l'on augmente la température de 10 K où que l'on diminue z de 3 μm , γ varie environ de 20% mais dans des sens contraires ($\gamma[T = 35^\circ C, z = 4 \mu m] = 7,10.10^{-9} kg.s^{-1}$, $\gamma[T = 25^\circ C, z = 1 \mu m] = 10,43.10^{-9} kg.s^{-1}$, $\gamma[T = 35^\circ C, z = 1 \mu m] = 8,46.10^{-9} kg.s^{-1}$).

Le calibrage du piège optique dépend de la valeur de γ , il est donc important de connaître la température et la hauteur z à laquelle s'effectue la calibration.

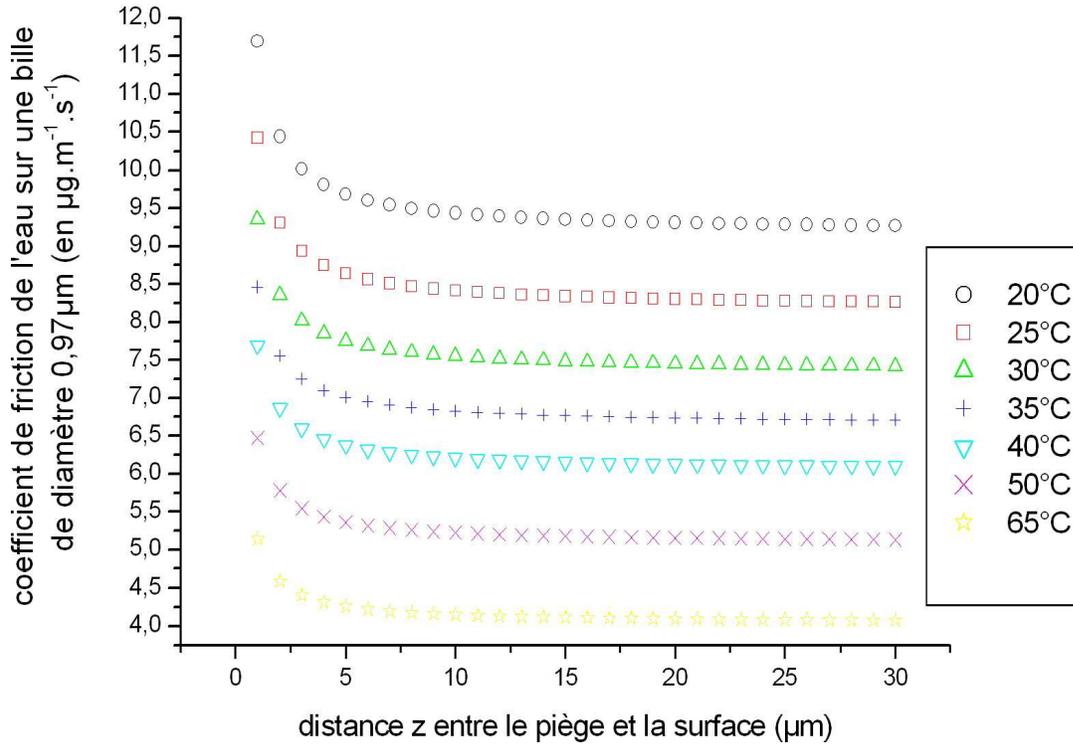


FIGURE 5.10: Variations attendues du coefficient de friction γ d'une bille de diamètre $d = 0,97 \mu\text{m}$ dans l'eau, en fonction de la distance z entre la bille et la surface réfléchissante de silicium ($0 \mu\text{m} \leq z \leq 30 \mu\text{m}$) et de la température T ($20^\circ\text{C} \leq T \leq 65^\circ\text{C}$). La dépendance en z est calculée d'après 5.28 et la variation en température est tirée de la référence [99].

5.1.5 Conclusions sur les trois techniques de calibrage

Que nous a appris la comparaison de ces trois techniques de calibrage? D'une part, la détermination de C^{-1} , qui dépend de z , par la méthode du scan d'une bille sur une surface n'est pas très utile, car pour cette méthode $z = 0$. Ensuite, la méthode par analyse du mouvement brownien est la plus rapide, la plus complète (c'est la seule à nous fournir à la fois k et C), et la plus proche des conditions expérimentales d'une mesure de force sur une molécule ($z \neq 0$, absence de lamelle). Enfin, elle nous permet de nous rendre compte de la nécessité de contrôler certains paramètres :

- la température. Une variation de 20°C à 25°C pour $z = 1 \mu\text{m}$ fait varier γ de 10%, soit le module de la force $F \propto \sqrt{\gamma}$ de quelques pourcents.
- la hauteur z . Une variation de $z = 4 \mu\text{m}$ à $z = 5 \mu\text{m}$ pour $T = 20^\circ\text{C}$ fait varier γ de 1%. Par contre, nous avons vu que C^{-1} et donc $F \propto kC$ dépendent de manière dramatique de z .

Pour ces raisons, nous allons nous intéresser maintenant à l'échauffement local de la solution par le laser, et nous allons essayer de comprendre la dépendance de C^{-1} par rapport à z .

5.2 Mesures de forces sur un substrat opaque

5.2.1 Dérives thermiques du système optique

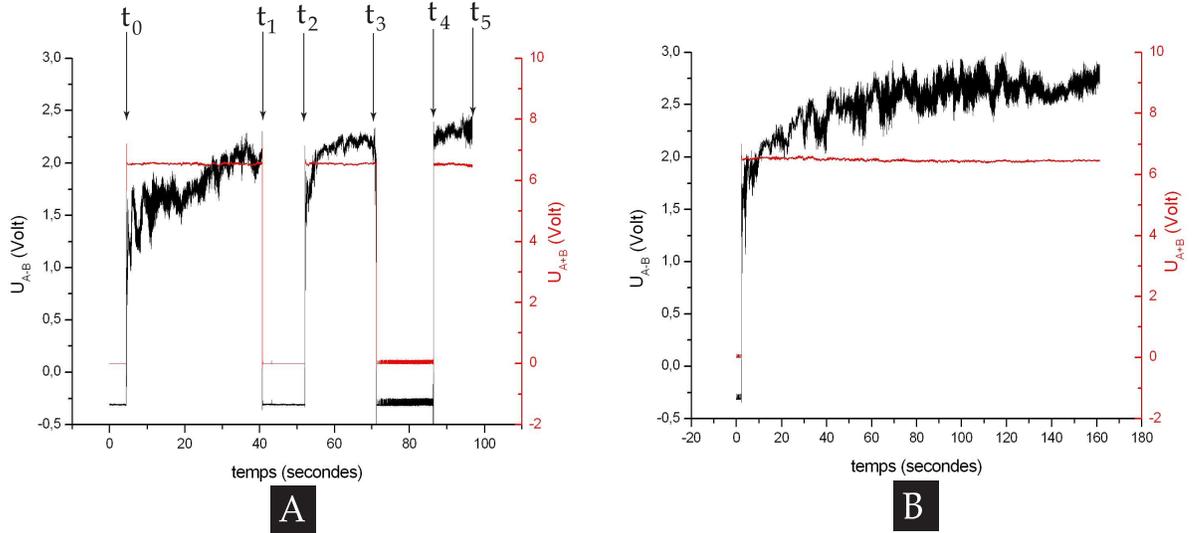


FIGURE 5.11: Dérives thermiques des composants optiques des pinces optiques. **A.** Signaux U_{A-B} et U_{A+B} en fonction du temps. Seul le signal U_{A-B} dérive, et l'intensité du laser est constante. On ouvre le shutter du laser en t_0 , on coupe le laser entre t_1 et t_2 , et on place un écran devant la photodiode entre t_3 et t_4 . **B.** Le temps d'équilibre de la dérive de U_{A-B} est de quelques minutes.

Le long de son chemin optique, le laser perd de sa puissance. Typiquement, pour une puissance laser en sortie de la cavité Titane :saphir de l'ordre de 900 mW , les deux pièges possèdent une puissance d'une centaine de milliwatt. Cette perte d'énergie se traduit par un échauffement et donc par une déformation des lentilles et des miroirs. Il en résulte une légère déviation de la position du laser dans le temps, jusqu'à un certain régime permanent. La figure 5.11A montre les signaux U_{A-B} et U_{A+B} en fonction du temps pour un faisceau laser de puissance $P = 115 \text{ mW}$ focalisé sur une surface réfléchissante de silicium.

A l'instant t_0 , le laser est allumé. Entre t_0 et t_1 , le signal U_{A-B} dérive. Si l'on coupe le laser quelques secondes ($t_1 < t < t_2$), on remarque que le signal U_{A-B} recommence à dériver mais démarre à un niveau $U_{A-B}[t_2]$ inférieur à $U_{A-B}[t_1]$: entre t_1 et t_2 , les composants optiques se sont refroidis.

Si maintenant on place un écran devant la photodiode ($t_3 < t < t_4$), les composants ne refroidissent pas. A l'instant t_4 , lorsque l'on enlève l'écran, on remarque que le signal U_{A-B} continue de dériver comme si il n'y avait pas eu d'interruption.

Pendant toute l'expérience, le signal U_{A+B} est stable : la position du laser sur la photodiode dérive, mais son intensité est constante. Il faut quelques minutes environ pour arriver à un

équilibre (voir figure 5.11B).

5.2.2 Effets thermiques du laser sur l'échantillon

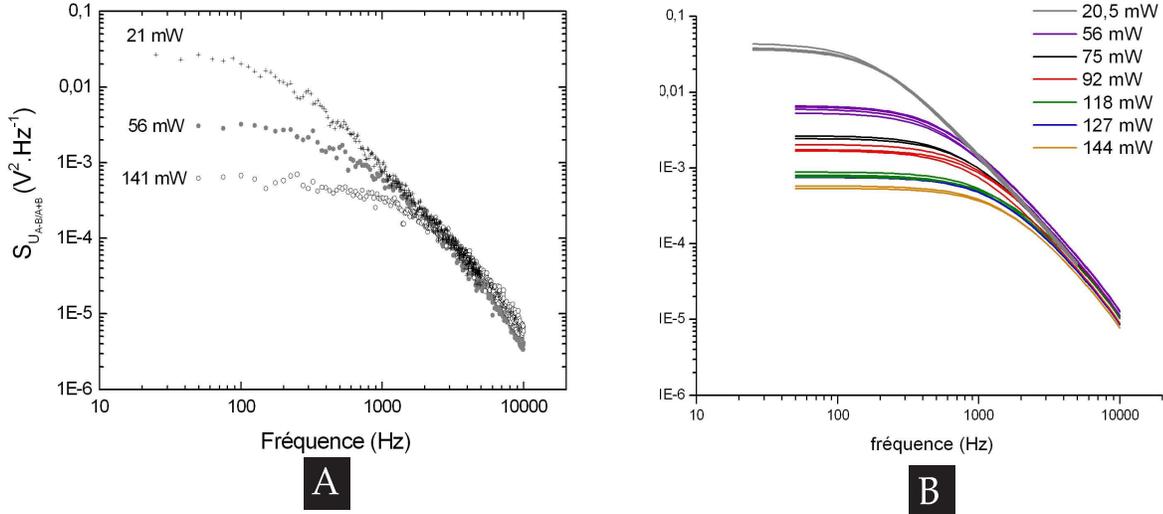


FIGURE 5.12: **A.** Densités de puissances spectrales du signal $U_{\frac{A-B}{A+B}}$ d'une même bille de diamètre $d = 0,97 \mu m$, pour $T = 25^\circ C$, $z = 3 \mu m$ et différentes puissances P du piège. **B.** Interpolations des densités de puissances spectrales du signal $U_{\frac{A-B}{A+B}}$ de plusieurs billes de diamètre $d = 0,97 \mu m$, pour $T = 25^\circ C$, $z = 5 \mu m$ et différentes puissances P du piège. La variation des valeurs obtenues selon les billes est de l'ordre de la dizaine de pourcents.

Nous sommes en droit de nous demander maintenant si la surface de silicium absorbe elle aussi une partie de l'énergie du laser. Dans ce cas, sa température pourrait augmenter localement, ce qui influencerait le calibrage du piège. Pour quantifier cette augmentation de température, on suit la procédure décrite dans la référence [99]².

Premier cas : $\lambda = 800 \text{ nm}$

La température au niveau du piège est égale à la température ambiante T_0 à laquelle s'ajoute une augmentation proportionnelle à la puissance du laser P :

$$T = T_0 + \beta[z]P \quad (5.29)$$

avec $\beta[z]$ le coefficient caractérisant l'échauffement produit par le laser, qui dépend à priori de la géométrie du problème et donc de z . On considère que la dépendance de la viscosité à la température [99] est donnée par :

²Les résultats présentés à partir de maintenant jusqu'à la fin de ce chapitre ont été obtenus avec une amplification des signaux de la photodiode différente des calibrations présentées précédemment, d'où des valeurs de $SU_{\frac{A-B}{A+B}}$ supérieures à puissance laser égale. L'amplification ici est bien plus grande, car on ne procède qu'à des mesures d'un mouvement brownien d'une bille (X petits)

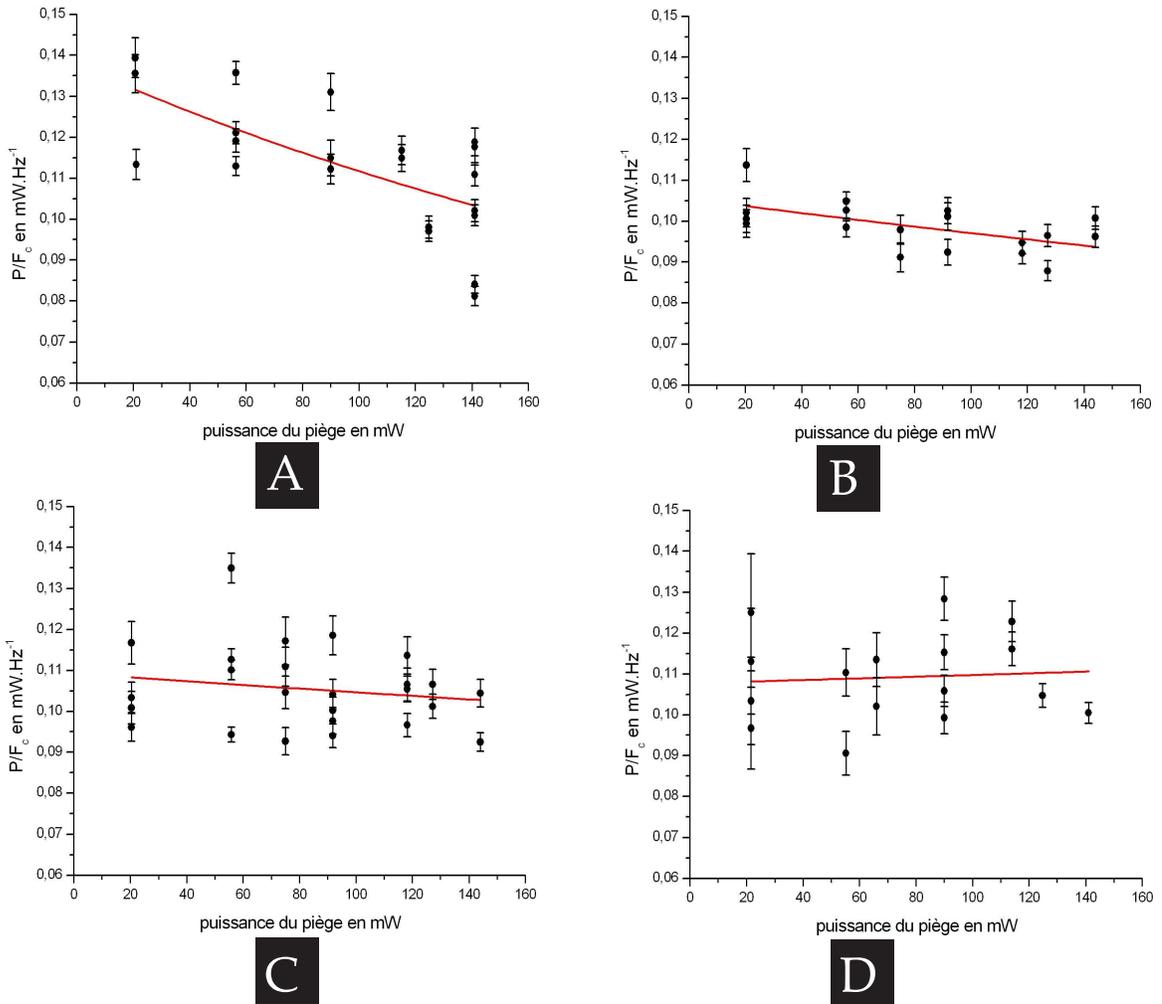


FIGURE 5.13: Variation du quotient $\frac{P}{f_c}$ en fonction de la puissance du piège P d'une bille de diamètre $d = 0,97 \mu m$ ($\lambda = 800 nm$). **A.** pour $z = 3 \mu m$ au dessus d'un substrat de silicium **B.** pour $z = 5 \mu m$ au dessus d'un substrat de silicium **C.** pour $z = 7 \mu m$ au dessus d'un substrat de silicium **D.** pour $z = 3 \mu m$ au dessus d'un substrat de saphir

$$\eta[T] = 10^{\left[\frac{1,3272 \cdot (293,15 - T) - 0,001053 \cdot (T - 293,15)^2}{T - 168,15} - 2,999 \right]} \quad (5.30)$$

La dépendance géométrique étant donnée par :

$$\gamma = 6\pi\eta[T]r\left(1 + \frac{9}{16}\frac{r}{z}\right) \quad (5.31)$$

En l'absence d'échauffement, P est proportionnel à f_c . On considère alors la quantité suivante, dont les variations éventuelles traduisent les effets d'échauffement :

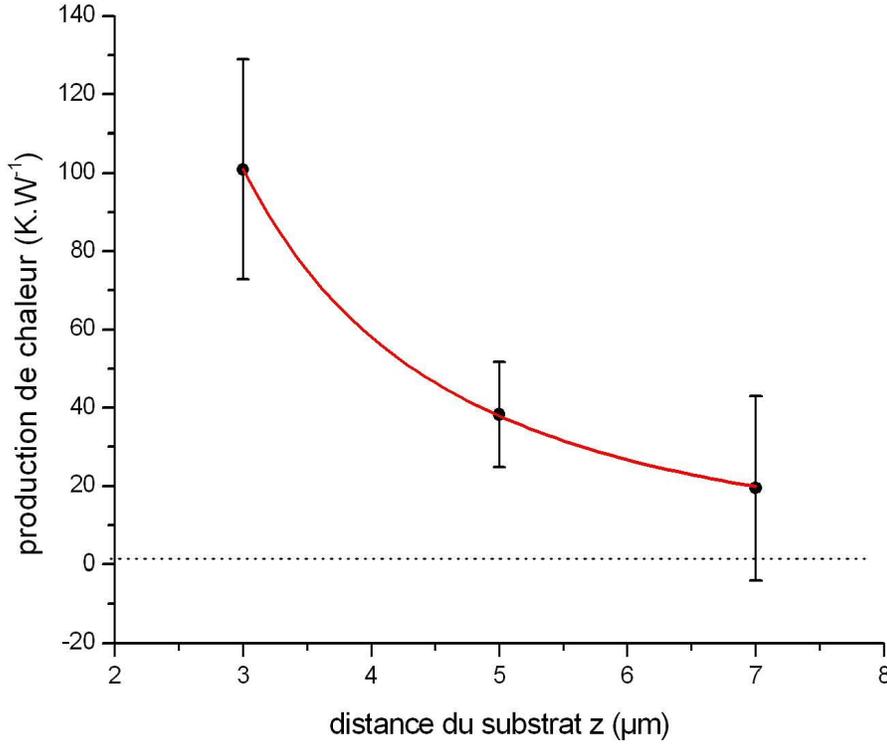


FIGURE 5.14: Décroissance de la production de chaleur due au laser en fonction de la distance z entre le point de focalisation du laser et la surface de silicium ($\lambda = 800 \text{ nm}$). La ligne en pointillé correspond à l'échauffement attendu dans l'eau loin de la surface de silicium, d'environ $2 \text{ K}\cdot\text{W}^{-1}$ [101]

$$\frac{P}{f_c} = \frac{6\pi^2 d \left(1 + \frac{9}{16} \frac{r}{z}\right)}{k[z]} P \eta [T_0 + \beta[z]P] \quad (5.32)$$

Pour étudier expérimentalement la dépendance à P de $\frac{P}{f_c}$, on effectue plusieurs calibrages du piège par analyse du mouvement brownien d'une bille, à hauteur z fixée mais en faisant varier la puissance, comme sur la figure 5.12A. La figure 5.12B montre l'ensemble des interpolations des lorentziennes obtenues pour $z = 5 \mu\text{m}$ et pour $21 \text{ mW} < P < 144 \text{ mW}$, et donne une idée de la variabilité de cette méthode de calibrage.

En interpolant $\frac{P}{f_c}[P]$ par l'équation 5.32, on en déduit $\beta[z]$. Les figures 5.13A,B,C regroupent les données obtenues sur silicium pour $z = 3 \mu\text{m}$, $z = 5 \mu\text{m}$, et $z = 7 \mu\text{m}$. On obtient : $\beta[z = 3\mu\text{m}] = 100 \pm 28 \text{ K}\cdot\text{W}^{-1}$, $\beta[z = 5\mu\text{m}] = 38 \pm 14 \text{ K}\cdot\text{W}^{-1}$, $\beta[z = 7\mu\text{m}] = 19 \pm 24 \text{ K}\cdot\text{W}^{-1}$. On remarque qu'à $z = 5 \mu\text{m}$, l'échauffement est toujours nettement supérieur à celui dû à l'eau, d'environ $2 \text{ K}\cdot\text{W}^{-1}$ [101]. On observe donc clairement une élévation de la température due à l'absorption du laser par la surface sous le piège, et qui décroît lorsque la distance entre le substrat de silicium et le piège augmente (cf. figure 5.14).

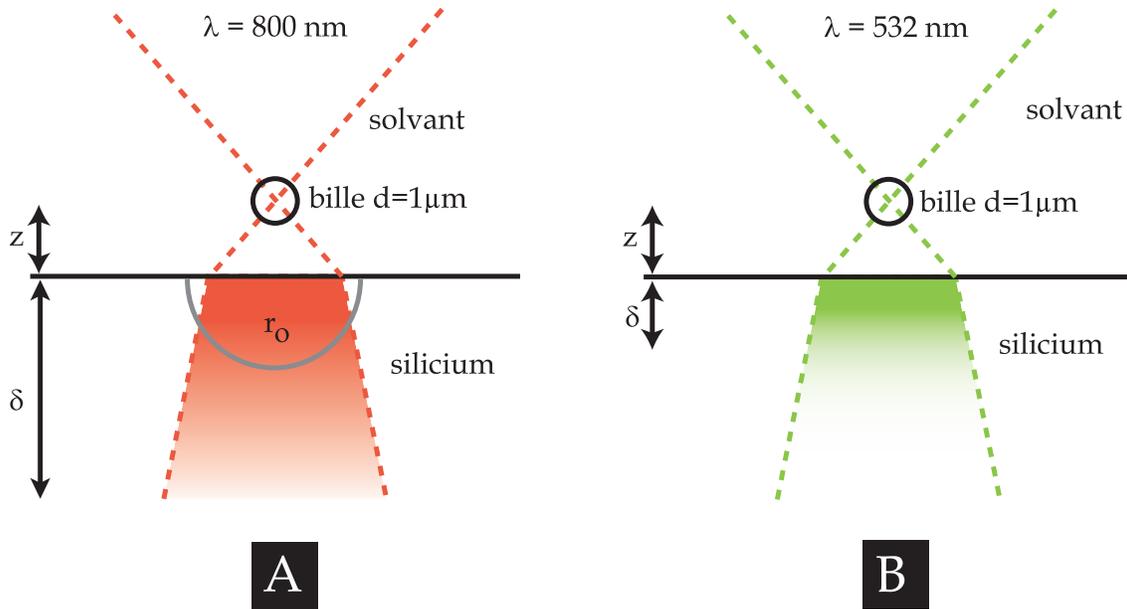


FIGURE 5.15: Laser focalisé quelques microns au dessus d'une surface de silicium. **A.** Dans le cas où la longueur d'onde du laser est 800nm , la distance de pénétration est $\delta \sim 15 \mu\text{m}$ **B.** Dans le cas où la longueur d'onde du laser est 532 nm , la distance de pénétration est $\delta \sim 1,5 \mu\text{m}$

L'expérience a aussi été réalisée sur un substrat de saphir (figure 5.13D) mais aucun effet thermique n'a été observé, même pour $z = 3 \mu\text{m}$ ($\beta[z = 3\mu\text{m}] = -9 \pm 30 \text{ K.W}^{-1}$).

On peut expliquer ces élévations de température par un petit modèle assez simple. Pour un milieu d'indice optique complexe (fonction de λ) $n[\lambda] = n'[\lambda] + n''[\lambda]i$, la distance de pénétration est donnée par :

$$\delta = \frac{\lambda}{4\pi n''} \quad (5.33)$$

Pour une longueur d'onde $\lambda = 800 \text{ nm}$ ($n'[\lambda = 800\text{nm}] = 3,7$ et $n''[\lambda = 800\text{nm}] = 4.10^{-3}$), la distance de pénétration dans le silicium est de $\delta = 15 \mu\text{m}$. Comme nous montre la figure 5.15A, lorsque le laser est focalisé à une hauteur z de la surface, la lumière absorbée génère de la chaleur dans un volume quasi-cylindrique d'ordre de grandeur δz^2 . La conductivité thermique du silicium ($K_{Si} = 150 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$) étant beaucoup plus grande que celle de l'eau ($K_{H_2O} = 0,6 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$), cette chaleur est dissipée principalement à l'intérieur du silicium.

Le profil de température dans le silicium est alors, en supposant le régime stationnaire, ainsi que la symétrie sphérique du demi espace de silicium :

$$\Delta T = 0 \Rightarrow T_{Si}[r] = T_0 + \frac{b}{r} \quad (5.34)$$

avec r la distance au point d'intersection entre l'interface eau/silicium et l'axe optique du piège. La chaleur Q passant à travers la demi sphère de rayon r_0 est alors :

$$Q = 2\pi r_0^2 K_{Si} \frac{dT}{dr}[r_0] = (1 - R)P \quad (5.35)$$

avec P la puissance du laser et $R \simeq 0,2$ le coefficient de réflexion d'incidence normale entre l'eau ($n_{H_2O} = 1,3$) et le silicium ($n_{Si} = 3,7$). On obtient, pour $P = 1 W$:

$$b = \frac{(1 - R)P}{2\pi K_{Si}} = 850 \mu m.K \quad (5.36)$$

$$T[r = \delta] - T_0 = \frac{b}{\delta} = 56K \quad (5.37)$$

Bien évidemment, la température est plus élevée en $r = 0$. Cette estimation de β donne cependant le bon ordre de grandeur de la valeur précédemment mesurée pour un z de quelques microns.

Le saphir quand à lui possède une transparence quasi parfaite dans le visible et l'infra rouge, ($\delta \sim \infty$) il est normal de n'observer aucune élévation de température lorsqu'il est utilisé comme substrat.

Deuxième cas : $\lambda = 532 nm$

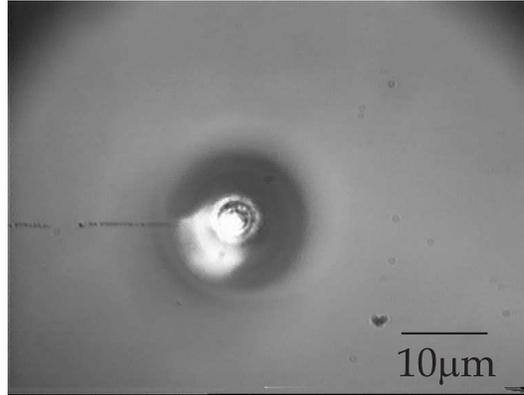


FIGURE 5.16: Cavitation et gravure d'une surface provoquée par un laser de longueur d'onde $\lambda = 532 nm$, de puissance $P = 300 mW$ et focalisé sur une surface de silicium.

Nous avons vu lors de la description du montage optique que pour une puissance maximum du laser pompe ($5,5 W$), la puissance de sortie de la cavité Titane :saphir est de l'ordre de $1 W$. Dans le but d'augmenter la raideur des pièges, nous avons supprimé la cavité Ti :Saphir afin de réaliser des pinces optiques à la longueur d'onde $\lambda = 532 nm$ et possédant une puissance jusqu'à cinq fois supérieure. Nous avons pour cela remplacé toutes les lentilles et les miroirs par d'autres composants portant le traitement de surface anti reflet adéquat, ainsi que la lame $\frac{\lambda}{2}$, les cubes séparateurs, les dichroïques, le polariseur et les filtres colorés afin qu'ils correspondent à la nouvelle longueur d'onde utilisée.

Deux problèmes nous ont empêché d'utiliser ce montage :

- Pour une puissance de piège $P = 300 \text{ mW}$, le piège grave le silicium lorsqu’il est focalisé sur la surface, et on observe de la cavitation (voir photo 5.16). L’augmentation de la puissance du piège paraît donc limitée. Si l’on reprend le modèle précédent, on calcule $T[r_0] - T_0 \sim 500 \text{ K}$ pour $P = 1 \text{ W}$. En effet, pour une longueur d’onde $\lambda = 532 \text{ nm}$ ($n'[\lambda = 532 \text{ nm}] = 4,2$ et $n''[\lambda = 532 \text{ nm}] = 30.10^{-3}$), la distance de pénétration dans le silicium $\delta = 1,5 \text{ }\mu\text{m}$ est bien plus faible que précédemment (figure 5.15B).
- De plus pour des puissances assez faibles comme $P = 60 \text{ mW}$, la manipulation par deux pièges optiques d’une molécule d’ADN de longueur L_0 reliant deux billes est impossible. En effet, au bout de quelques secondes de capture, on peut espacer les billes d’une distance très supérieure à L_0 sans observer aucune force de rappel sur celles-ci. Les billes ne sont plus reliées entre elles par un fil invisible d’ADN. La rupture a lieu soit au niveau de la liaison biotine/streptavidine, soit au niveau de la liaison digoxygénine/antidigoxygénine, soit le long du double brin d’ADN. On observe cette rupture pour des faibles puissances, des distances z petites ou grandes ($\sim 50 \text{ }\mu\text{m}$) ainsi qu’au dessus d’un substrat de silicium ou de saphir. L’origine de la dégradation de la construction moléculaire ne semble pas être thermique, mais plutôt due à la plus grande énergie des photons dans le visible.

5.2.3 Variations du calibrage du piège en fonction de la distance entre la bille et la surface

Pour étudier la manière dont le calibrage du piège dépend de z , on s’intéresse aux deux quantités suivantes :

$$\frac{P}{f_c} = \frac{6\pi^2 d (1 + \frac{9}{16} \frac{r}{z})}{k[z]} P \eta[T[z]] \quad (5.38)$$

$$\varpi = P S_U \frac{A-B}{A+B} [f = 0] f_c = \frac{2P g^2 k_b T[z] \cdot C^{-2}[z]}{\pi \cdot k[z]} \quad (5.39)$$

$\frac{P}{f_c}$ possède trois dépendances selon z . Premièrement, $\eta[T[z]]$ dépend de la température, qui, elle même dépend de z : plus z est petit, plus la température augmente, plus la viscosité diminue, plus $\frac{P}{f_c}$ diminue. Deuxièmement, l’interaction hydrodynamique joue un rôle opposé : plus z diminue, plus $\gamma \propto (1 + \frac{9}{16} \frac{r}{z})$ augmente, plus $\frac{P}{f_c}$ augmente. Enfin, on pourrait s’attendre [102, 103, 104] à une variation de la raideur du piège k avec z , du fait de la superposition entre le faisceau incident et le faisceau réfléchi par le substrat de silicium. Proche de la surface, on s’attend à une augmentation de la raideur du piège et $\frac{P}{f_c}$ devrait diminuer. Expérimentalement, l’interaction hydrodynamique semble prendre le dessus pour les z faibles (voir figure 5.17).

ϖ dépend aussi de z de trois manières. Expérimentalement, on voit que cette expression croît linéairement, quasiment d’un facteur 4 sur un intervalle d’un peu moins de $10 \text{ }\mu\text{m}$ (voir figure 5.18). Tout d’abord, la température $T[z]$ est plus élevée près de la surface ; ϖ devrait donc diminuer près de la surface. Cependant, nous avons vu que la variation typique de T pour un piège de 100 mW était de quelques Kelvins ; la température ambiante étant de 300 K environ, cette variation est négligeable. k dépend lui aussi de z , mais l’effet devrait être observé à courte portée (et non sur une dizaine de microns, car on travaille avec une grande ouverture numérique),

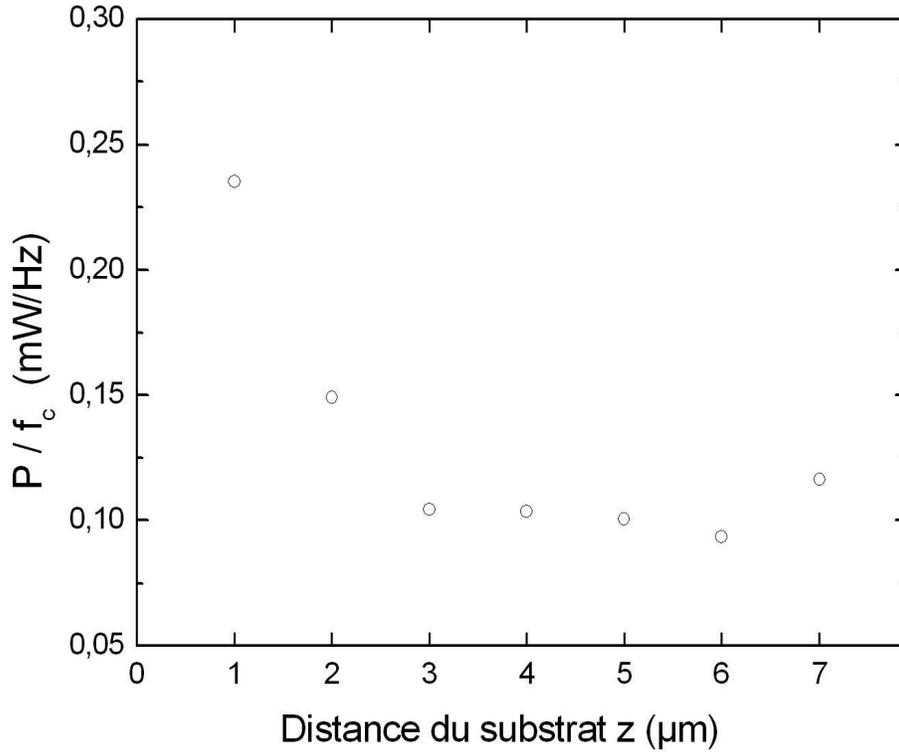


FIGURE 5.17: Variation du quotient $\frac{P}{f_c}$ en fonction de z . Pour des z petits, l'interaction hydrodynamique entre la bille et la surface augmente le coefficient de friction γ et donc $\frac{P}{f_c}$

et pas avec un effet aussi important que celui observé. Autrement dit, la variation de ϖ reflète principalement la variation de C^{-2} .

On peut difficilement prévoir cette variation en z par un petit calcul simple à partir des caractéristiques des composants optiques du montage : lorsqu'une bille se déplace d'une distance X dans le piège, le spot laser réfléchi par la surface se déplace de $X_{photodiode}$ sur la photodiode. Le rapport $\frac{X_{photodiode}}{X}$ dépend de la focale de l'objectif, de la distance focale de L8, de la distance z entre la surface réfléchissante et le piège, de la distance entre l'objectif et L8, de la distance entre la lentille L8 et la photodiode, et de l'indice optique de la bille. De plus, la taille du spot laser sur la photodiode et donc la sensibilité de cette dernière évolue quand z varie.

En effet, si on prête attention à la taille du spot laser sur la PSD, on remarque que celle-ci devient comparable aux dimensions de la photodiode à partir de $z \simeq 10 \mu\text{m}$. Lorsque la taille du spot est supérieure à la taille de la photodiode, on voit sur la figure 5.20 que la réponse de la PSD n'est plus linéaire en déplacement de la bille et qu'il n'est plus possible de calibrer le piège : dans le cas de l'analyse du mouvement brownien d'une bille, les courbes obtenues ne sont plus des lorentziennes.

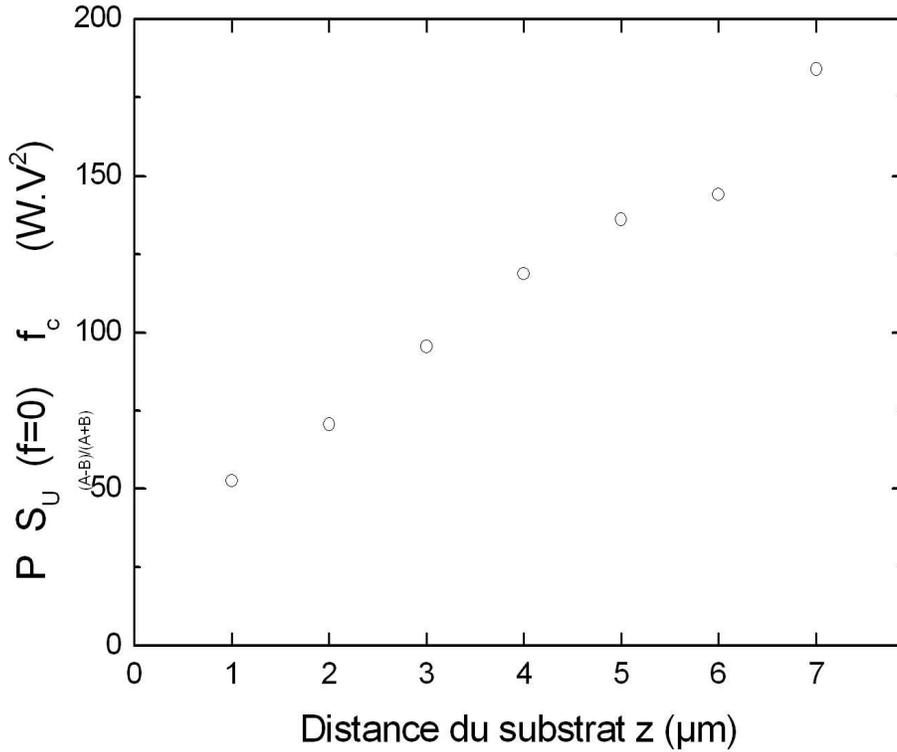


FIGURE 5.18: Variation de $PS_U \frac{A-B}{A+B} [f=0] f_c$ en fonction de z .

5.3 Conclusions sur le dispositif expérimental

Nous avons construit un système de double pince optique tout à fait apte à piéger deux billes en silice et donc de micromanipuler une molécule d'ADN.

Cependant, nos pièges optiques possèdent quelques défauts :

- la faible raideur des pièges. Nous savons que notre piège optique (de raideur k de $50 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ à $100 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-1}$) est harmonique sur une distance de l'ordre de 70% du rayon de la bille r . Notre système possède donc une limite des forces mesurables dans le domaine linéaire de l'ordre de :

$$kr0,7 \simeq 25\text{pN} \quad (5.40)$$

- la variation de C^{-1} avec la distance z entre le piège et la surface de silicium nous oblige à travailler à une hauteur fixée pour laquelle le piège a été calibré.
- l'élévation de température due à l'absorption du laser par le substrat de silicium. Lorsque l'on impose une distance D entre les deux pièges optiques de raideur k (fréquence de coupure f_c), piégeant deux billes de rayon r reliées par une molécule d'ADN, et que l'on mesure une force F s'exerçant sur les billes piégées, l'extension E_{xt} de la molécule est :

$$E_{xt} = D - 2\frac{F}{k} - 2r \quad (5.41)$$

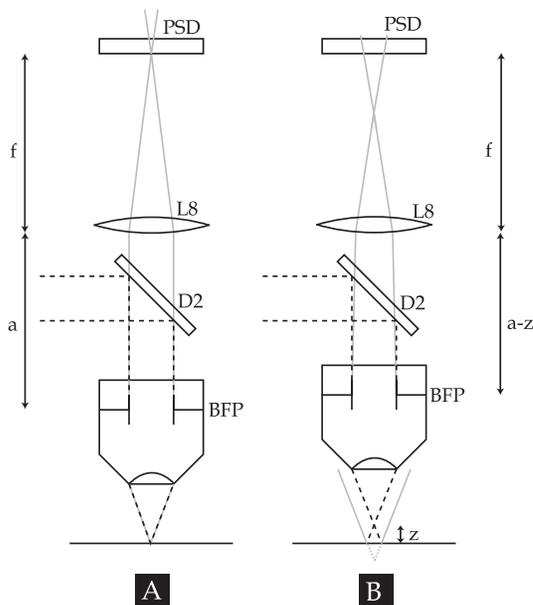


FIGURE 5.19: Lorsque l'on monte l'objectif d'une longueur z , la distance entre le plan focal arrière de l'objectif et la lentille L8 du montage passe **A.** de a **B.** à $a - z$. Le grandissement du système et donc C^{-1} varie, ce qui explique la grande variation de $PSU_{\frac{A-B}{A+B}}[f = 0]f_c$ en fonction de z précédemment observée. De plus, la tache du laser sur la photodiode se défocalise, jusqu'à être plus grande que la photodiode.

Plus le piège est faible (c'est notre cas), plus le terme $2\frac{F}{k}$ est important. Une incertitude en température de $5^\circ C$ implique une incertitude sur γ et donc sur le calibrage de la raideur $k = 2\pi\gamma f_c$ du piège. Pour $\Delta T \simeq 5^\circ C$, $F \simeq 10 \text{ pN}$, $f_c \simeq 1000 \text{ Hz}$, on obtient une erreur de l'ordre de 50 nm sur le calcul de l'extension de la molécule.

Ainsi, notre dispositif expérimental est tout à fait apte à micromanipuler une molécule unique, mais paraît limité en ce qui concerne la valeur maximale des forces mesurées. De plus, il faut prendre en compte l'augmentation de température près de la surface de silicium, sous peine de ne pouvoir déterminer très précisément l'extension de la molécule manipulée.

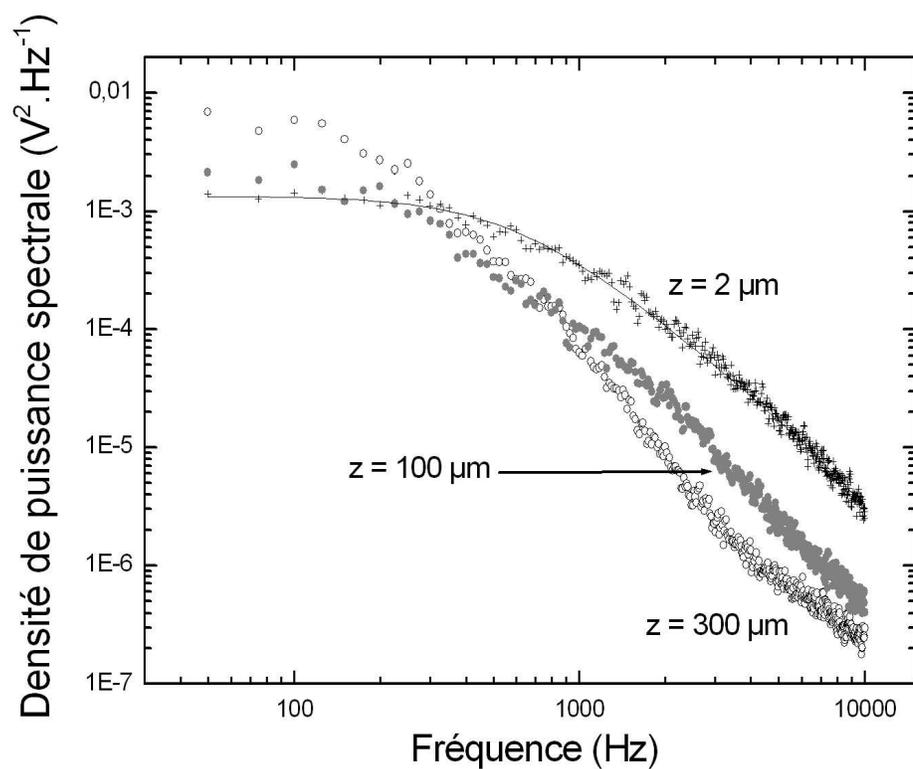


FIGURE 5.20: Pour des grandes valeurs de z , la taille du spot laser sur le plan de la photodiode est plus grande que la photodiode, et la densité de puissance spectrale du signal $U \frac{A-B}{A+B}$ n'est plus lorentzienne.

Chapitre 6

Mesures de conductances de molécules d'ADN

6.1 Electrodes de mesures

6.1.1 Description

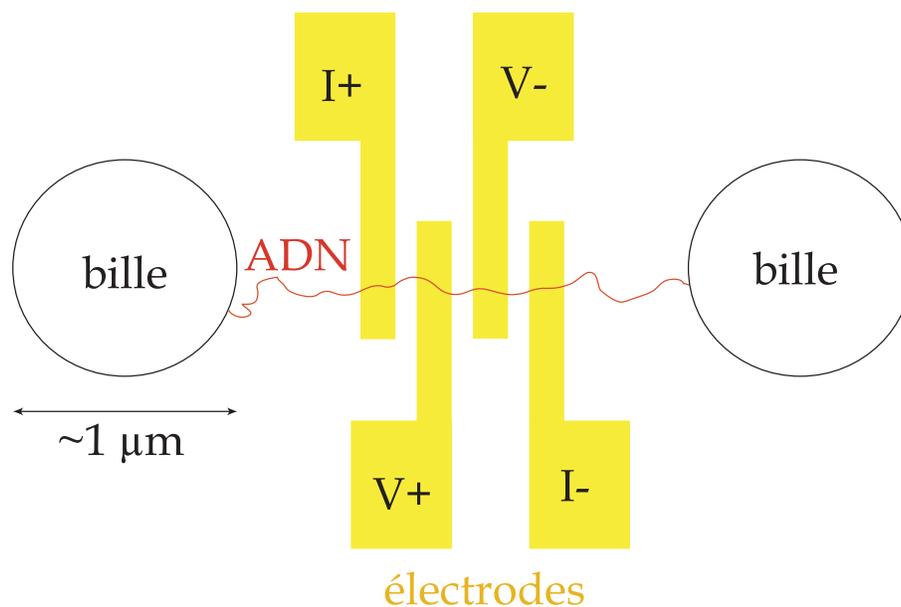


FIGURE 6.1: L'expérience projetée : on dépose grâce à un double piège optique une molécule d'ADN sur des électrodes en or afin d'en mesurer la conductance en solution et à sec.

Notre but dans cette partie est de capturer une molécule d'ADN reliant deux billes de silice grâce au double piège optique présenté précédemment, puis de déposer par micromanipulation cette molécule sur un jeu d'électrodes nous permettant de mesurer sa conductance (voir figure 6.1).

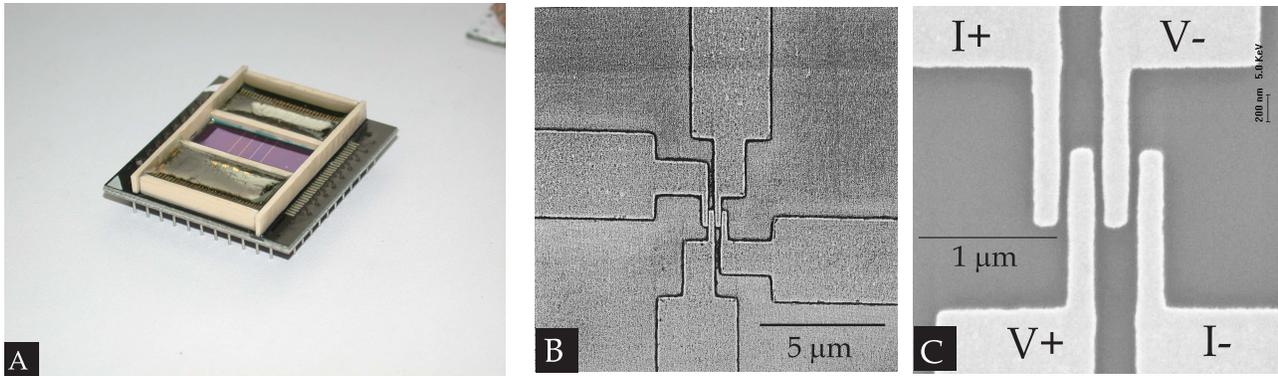


FIGURE 6.2: **A.** Echantillon porteur de quatre jeux de quatre électrodes en or sur son support à force d'insertion nulle. **B.** et **C.** Agrandissements de la partie centrale d'un jeu de quatre électrodes.

Nous avons utilisé pour les résultats présentés dans ce chapitre trois échantillons identiques à celui de la figure 6.2A. Il sont composés de quatre groupes d'électrodes en or fabriquées par lithographie électronique sur un substrat en silicium (la couche d'oxyde SiO_2 est épaisse, $\gtrsim 100$ nm). Chaque groupe est distant d'un autre d'environ 2 mm, et comporte 4 électrodes en or qui, au niveau d'un point d'intersection (voir figure 6.2B), sont parallèles sur une longueur légèrement inférieure à 1 μm . A ce niveau, l'épaisseur de la couche d'or est de 30 nm (sans compter la couche d'accroche de chrome de 8 nanomètres), la largeur de chaque électrode est de 160 nm, et la distance entre les électrodes est de 70 nm (figure 6.2C). On appelle I_+ et I_- la paire externe d'électrodes, et V_+ et V_- la paire interne d'électrodes. Ces échantillons nous ont été généreusement fournis par l'équipe de Ross Rinaldi, Antonio Della Torre, et Giuseppe Maruccio (Dipartimento di Ingegneria dell'Innovazione, Université de Lecce, Italie).

Après réception, ils ont été bondés avec des fils d'or (diamètre 17,5 μm) par Yong Jin (LPN, CNRS-UPR20) sur des supports à force d'insertion nulle (Part No.95-132I25, ARIES electronics). Les bondings sont recouverts par une colle ¹ isolante, pour les protéger des rincages des échantillons entre les mesures.

6.1.2 Nettoyage des électrodes

Après chaque dépôt d'ADN sur ces électrodes, celles-ci sont nettoyées en déposant localement une goutte de mélange sulfochromique (mélange saturé de chrome VI CrO_3 dans acide sulfurique H_2SO_4 à 95%, Prolabo n°25333247) de quelques dizaines de micro-litres pendant trois minutes. On prend soin de ne pas mettre en contact l'acide et l'ensemble de PVC et de colle entourant les bondings. L'acide est ensuite rincé à l'eau déionisée (18,2 $M\Omega.cm$).

La durée de vie des électrodes n'est pas infinie : on remarque que, au fur et à mesure des lavages, le courant de fuite à travers le substrat de silicium augmente (nous avons observé des augmentations d'environ un ordre de grandeur).

Cette étape est cependant nécessaire, pas seulement pour débarrasser les électrodes en or de tout composant organique résiduel, mais aussi pour nettoyer la surface de silicium. Sans ce

¹48% de Glycid ether, 36% de Dodecenylsuccinic anhydride 90% (DDSA), 18% de Methyl-5-norbornene-2,3-dicarboxylic anhydride (MNA) et 3% de 2,4,6 Tris(dimethylaminomethyl)-phenol 95% (DMP-30).

nettoyage, les billes en silice adhèrent à la surface, empêchant leur micro-manipulation et donc celle d'une molécule d'ADN.

6.2 Synthèse d'un double brin d'ADN porteur de groupes disulfide

6.2.1 Le couple thiol-or

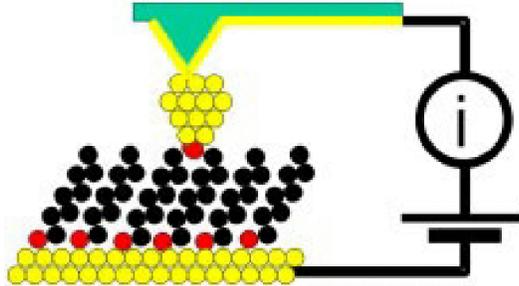


FIGURE 6.3: Mesure de la résistance d'une molécule unique d'octanedithiol, par Cui et son group [105], entre une surface d'or et une pointe d'AFM.

En 2001, Cui [105] et son équipe ont mesuré la résistance d'une molécule unique d'octanedithiol. Cette molécule est connectée par des liaisons thiol d'un côté à une surface en or et d'un autre côté à une nanoparticule d'or (voir figure 6.3). Une pointe d'AFM en or est en contact avec la nanoparticule, et joue le rôle de deuxième électrode. La résistance mesurée est de l'ordre de $1\text{ G}\Omega$, mais augmente de plusieurs ordres de grandeurs ($> 10^4\text{ G}\Omega$) en l'absence de la liaison thiol vers la pointe AFM. Les liaisons de type soufre-or semblent donc nécessaires pour connecter des molécules sur lesquelles on désirerait procéder à des mesures de conductance.

Malgré par exemple de récents efforts par simulation numérique [106], la nature des réactions responsables des interactions or-soufre n'est pas aujourd'hui très claire [107, 108] (que ce soit par le biais d'un groupement thiol ou disulfide). On sait par contre que ce type de liaisons possède quelques avantages. D'une part, les liaisons basées sur des groupements thiol ou apparentées fonctionnent sur beaucoup de métaux couramment utilisés pour construire des électrodes (or, argent, platine, mercure,...), et sont faciles à faire : leur réalisation ne demandent pas de conditions particulières d'anaérobie ou de vide. Elle se réalise en général en solution, en quelques secondes ou minutes, sans grande restriction de solvant, sur une surface en métal relativement propre sans que cela soit critique (même si l'utilisation d'électrodes dépourvues de résidus organiques est préférable, la haute affinité entre le soufre et le métal semble pouvoir déplacer des impuretés plus faiblement absorbées[109]). D'autre part, ce type de liaison est relativement stable (une monocouche d'alkanethiol semble stable quasi-indéfiniment en solution ou à l'air libre à température ambiante, et il faut dépasser 70°C pour la désorber[110]).

Nous avons donc choisi d'utiliser ce type de liaison pour contacter une molécule d'ADN sur des électrodes en or. On sait aussi que ce type de liaison se crée plus facilement en solution salée[111] plutôt que dans de l'eau déionisée. Nous travaillerons cependant la plupart du temps

dans une solution de force ionique modérée (tampon PB (Phosphate Buffer), 8,3 mM Na_2HPO_4 KH_2PO_4 pH 7,2, P3288 Sigma), car un tampon plus concentré en sel risquerait de nous gêner lors de la mesure de conductance en solution.

6.2.2 Synthèse PCR d'un double brin d'ADN porteur de groupes amine

L'introduction de groupements thiol ou disulfide est un peu plus complexe dans notre cas que dans celui des expériences de conductance présentées à la section 3.1.3 [27, 28, 32, 48, 49]. Dans ces expériences, l'ADN était greffé *entre* deux électrodes en or, et seul les amorces utilisées lors de la synthèse par PCR des doubles brins d'ADN devaient être fonctionnalisées par des groupements thiol. Notre montage de micromanipulation nous permet de déposer une molécule unique *sur* une paire d'électrodes, autrement dit la molécule doit être fonctionnalisée le long de sa séquence au niveau des électrodes.

Pour y parvenir, on réalise une PCR (figure 6.5A) à partir d'une séquence de 10000 paires de bases (soit une longueur cristallographique de 3,4 μm) issue de l'ADN viral de 48502 paires de bases du bactériophage λ , infectant la bactérie *E.coli*. Le protocole est inspiré de celui du mélange de polymérase utilisé, l'"expand long template PCR system" (Roche cat. n°1681834). Les polymérase n'étant pas habituées à fonctionner avec des nucléotides modifiés, il a fallu optimiser le rapport entre les concentrations de dTTP et de AAdUTP, ainsi que la température d'hybridation de la PCR (ici 63°C) :

- préparation d'une première solution :
 - 20 μl d'eau déionisée.
 - 1,75 μl d'un mélange de nucléotides dATP, dTTP, dGTP, dCTP à 10 mM chacun.
 - 0,7 μl de nucléotides AAdUTP (5-(3.aminoallyl)dUTP, i.e. porteurs de groupes amine, Sigma Aldrich AO410) à 2,5 mM.
 - 0,75 μl d'amorce de 34 bases² porteuse d'une molécule de digoxygénine à son extrémité 5' à 20 $pmol.\mu l^{-1}$.
 - 0,75 μl d'amorce de 34 bases³ porteuse d'une molécule de biotine à son extrémité 5' à 20 $pmol.\mu l^{-1}$.
 - 1 μl d'ADN λ à 20 $ng.\mu l^{-1}$.
- préparation d'une deuxième solution :
 - 19,25 μl d'eau déionisée.
 - 5 μl de tampon $MgCl_2$ à 17,5 mM.
 - 0,75 μl d'un mélange d'enzyme (ADN polymérase Taq et Pwo) à 3,5 $units.\mu l^{-1}$.

On mélange les deux solutions, et on soumet les 50 μl résultants aux cycles PCR suivants :

- 2 minutes à 94°C (rampe de 3°C.s⁻¹).
- 10 fois le cycle suivant :
 - 10 secondes à 94°C (rampe de 3°C.s⁻¹).
 - 30 secondes à 63°C (rampe de 1°C.s⁻¹).
 - 8 minutes à 68°C (rampe de 3°C.s⁻¹).

²5'DigCTGATGAGTTTCGTGTCCGTACAACCTGGCGTAATC3'

³5'BiotATACGCTGTATTTCAGCAACACCGTCAGGAACACG3'

- 15 fois le cycle suivant :
 - 10 secondes à $94^{\circ}C$ (rampe de $3^{\circ}C.s^{-1}$).
 - 30 secondes à $63^{\circ}C$ (rampe de $1^{\circ}C.s^{-1}$).
 - 8 minutes plus 20 secondes par cycle supplémentaire à $68^{\circ}C$ ($1^{\circ}C.s^{-1}$) (ainsi le quinzième cycle dure 12 minutes et 40 secondes).
 - 7 minutes à $68^{\circ}C$ (rampe de $3^{\circ}C.s^{-1}$).
 - conservation à $10^{\circ}C$.

En admettant qu'une base de AAdUTP est utilisée pour dix bases dTTP (c'est à dire que leurs taux d'incorporation sont identiques), on devrait avoir de l'ordre de vingt-cinq bases AAdUTP le long de la molécule sur une longueur de 160 nm (la largeur des électrodes).



FIGURE 6.4: Gel par électrophorèse de produits PCR. Les puits 1, 2 et 3 contiennent les brins porteurs de AAdUTP, et les puits 5,6,7 contiennent des brins issus de la même PCR sans nucléotides modifiés. Le puits 4 sert de référence et contient de l'ADN digéré λ BstEII. Les raies des puits 1,2,3,5,6 et 7 (10kb) se trouvent bien entre la raie de 8 kb et de 15 kb de l'ADN λ BstEII.

La figure 6.4 représente le négatif d'une photo d'un gel par électrophorèse comportant 8 puits. En partant de la gauche : on a injecté dans les puits 1, 2 et 3 le produit de la PCR présentée précédemment, dans le puits 4 de l'ADN digéré λ BstEII, dans les puits 5, 6 et 7 le produit de la PCR présentée précédemment mais où la solution de AAdUTP a été remplacée par de l'eau, et dans le puits 8 le produit de la PCR après purification. L'ADN digéré nous sert d'étalon et nous permet de dire que les PCR ont fonctionné, et qu'elles ont toutes deux synthétisé des molécules d'une dizaine de kilo de paires de bases à la concentration approximative de $20 \text{ ng}.\mu\text{l}^{-1}$.

6.2.3 Couplage avec du dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate)

On fait ensuite réagir les groupements amine des AAdUTP incorporés dans l'ADN synthétisé avec des groupements succinimidyl de molécules de dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate) (DTSSP) [112, 113]. La réaction se fait pendant 30 minutes dans une solution diluée en ADN ($0,2 \text{ ng}.\mu\text{l}^{-1}$, donc de l'ordre de $0,1 \text{ nM}$) et concentrée en DTSSP ($3,4 \mu\text{M}$, Pierce product nb. 21578) pour éviter tout phénomène de réticulation. On stoppe la réaction en injectant du Tris (Sigma T1503) à la concentration finale de 50 mM , pendant 15 minutes. L'ADN est ensuite purifié grâce à plusieurs filtrations (kit microcon, Millipore corporation) puis resuspendue dans

de l'eau ou dans un tampon comme du PB (Phosphate Buffer, 8,3 mM Na_2HPO_4 KH_2PO_4 pH 7,2, Sigma-Aldrich P3288) ou du PBS (Phosphate Buffer Saline, 138 mM $NaCl$, 10 mM Na_2HPO_4 KH_2PO_4 , 2,7 mM KCl , pH 7,4, Sigma-Aldrich P3813). Les groupes disulfide ayant tendance à se décomposer (oxydation) facilement en solution diluée [114], l'ADN finalement obtenu est conservé à $-25^\circ C$ par aliquot de 10 μl .

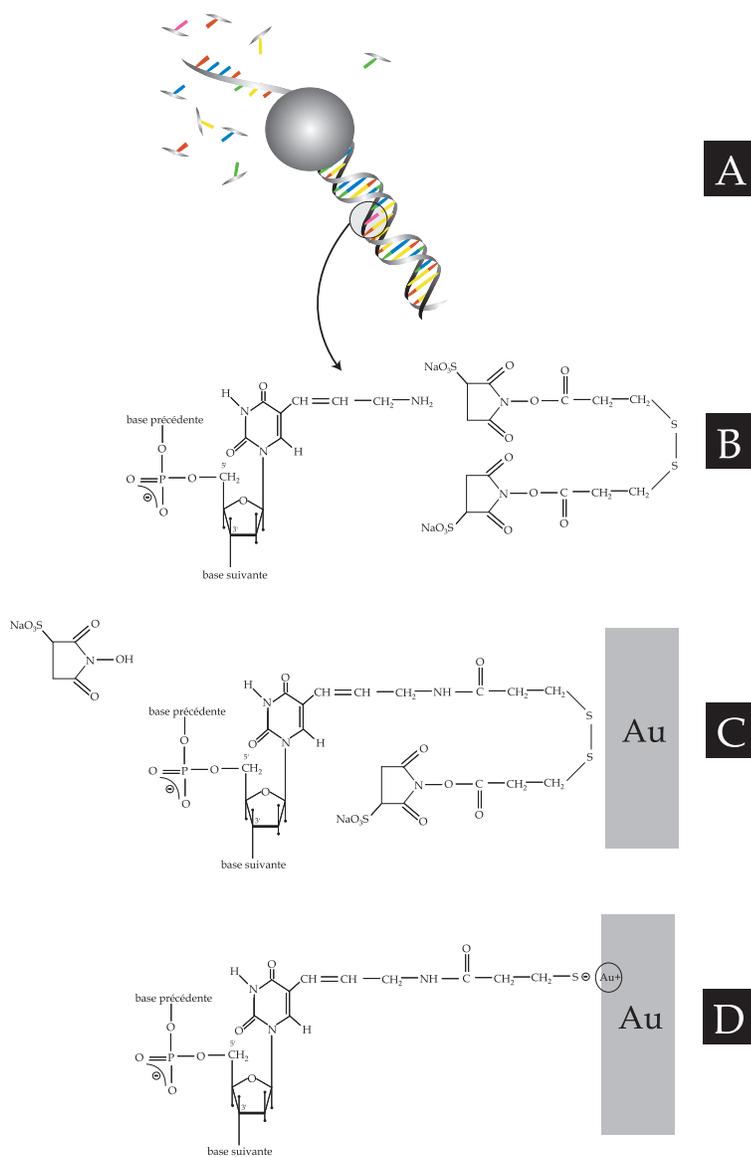


FIGURE 6.5: Synthèse d'un double brin d'ADN porteur de groupes disulfide **A**. PCR du double brin 10 kb incorporant des nucléotides 5-(3-aminoallyl)dUTP porteurs de groupes amine (en rose) **B**. Couplage de la molécule synthétisée avec du dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate) **C**. et **D**. Liaison entre un groupe disulfide de l'ADN de synthèse et la surface en or d'une électrode.

6.3 Tests d'affinité entre l'ADN et l'or

6.3.1 Test de Mirkin

L'interaction or-soufre a aussi été étudiée avec des nanoparticules d'or [115] et ses applications, développées notamment par l'équipe de C. A. Mirkin, sont multiples[116] (diagnostic médical par exemple). Afin de savoir si la fonctionnalisation des doubles brins d'ADN est effective, on utilise le test colorimétrique de Mirkin, en mélangeant un de nos ADN de synthèse avec ou sans AAdUTP, à une solution de nanoparticules en suspension d'or (nanoparticules d'or de 10 nm de diamètre à 7 nM, Sigma-Aldrich G1527) dans les proportions couramment utilisées pour ce type de protocole[117, 118] (voir protocole ci dessous).

La solution pure de nanoparticules de 10 nm diffuse la lumière, ce qui lui confère un aspect rouge-rosé. En présence de molécules "pont" portant plusieurs groupes thiol ou disulfide, les nanoparticules se collent entre elles. La dimension moyenne des agrégats en solution augmente, et la couleur de la solution vire vers le bleuté[119]. Dans le cas d'une forte concentration de ponts, la taille de ces agrégats est telle que toutes les billes sédimentent : la solution devient translucide comme de l'eau.

Pour ce test, nous avons préparé 5 tubes, que nous avons laissé incuber 48 heures :

- le tube 1 : 1 μ l d'eau + 9 μ l de nanoparticules d'or à 7 nM, reste rouge-rosé.
- le tube 2 : 1 μ l d'ADN 10 kbp sans AAdUTP à 2 $ng.\mu$ l⁻¹ + 9 μ l de nanoparticules d'or à 7 nM, reste rouge-rosé.
- le tube 3 : 1 μ l d'ADN 10 kbp sans AAdUTP, traité au DTSSP, puis filtré, à 2 $ng.\mu$ l⁻¹ + 9 μ l de nanoparticules d'or à 7 nM, vire au rouge-mauve.
- le tube 4 : 1 μ l d'ADN 10 kbp avec AAdUTP, traité au DTSSP, puis filtré, à 2 $ng.\mu$ l⁻¹ + 9 μ l de nanoparticules d'or à 7 nM, vire au bleu quasi translucide.
- le tube 5 : 1 μ l de PBS concentré 10 fois + 9 μ l de nanoparticules d'or à 7 nM, devient translucide quasi instantanément.

Le tube 2 montre que l'ADN sans groupes disulfide ne forme pas de ponts entre les nanoparticules d'or. Le tube 3 nous permet de dire qu'il reste quelques traces de DTSSP en solution après la purification de la solution d'ADN. L'effet est tout autre pour le tube 4 qui vire au bleu quasi translucide : l'ADN fonctionnalisé se couple au DTSSP, et connecte les nanoparticules d'or entre elles. La cinétique de cette réaction est assez lente par rapport à un effet de sel (tube 5), qui fait précipiter les billes quasi instantanément.

En conclusion, nous avons donc réussi à synthétiser de l'ADN porteur de groupes disulfide.

6.3.2 Tests d'adhésion entre l'ADN et une surface d'or par des expériences de fluorescence

On se propose de tester la différence d'affinité entre de l'ADN porteur ou non de groupes disulfide, avec l'or via une expérience de fluorescence.

Pour cela, on dispose de lamelles de verre sur lesquelles on dépose par évaporation une fine couche d'or. On injecte ensuite par capillarité, entre une de ces surfaces d'or nettoyées et une lamelle de verre, une solution d'ADN marqué par un fluorochrome, YOYO-1. Lors de

cette injection, les molécules d'ADN sont soumises à un flux représenté sur la figure 6.6A. Le fluorochrome nous permet de visualiser les molécules d'ADN à la proximité des surfaces d'or. On utilise pour cela le montage optique de l'équipe de Aurélien Crut et Pierre Desbiolles (Laboratoire Kastler Brossel, UMR 8552) : schématiquement, celui-ci illumine l'échantillon dans le visible ($\lambda = 470 \pm 17 \text{ nm}$) et récupère la fluorescence émise ($\lambda = 515 \text{ nm}$) sur une caméra CCD refroidie (voir la figure 6.6B).

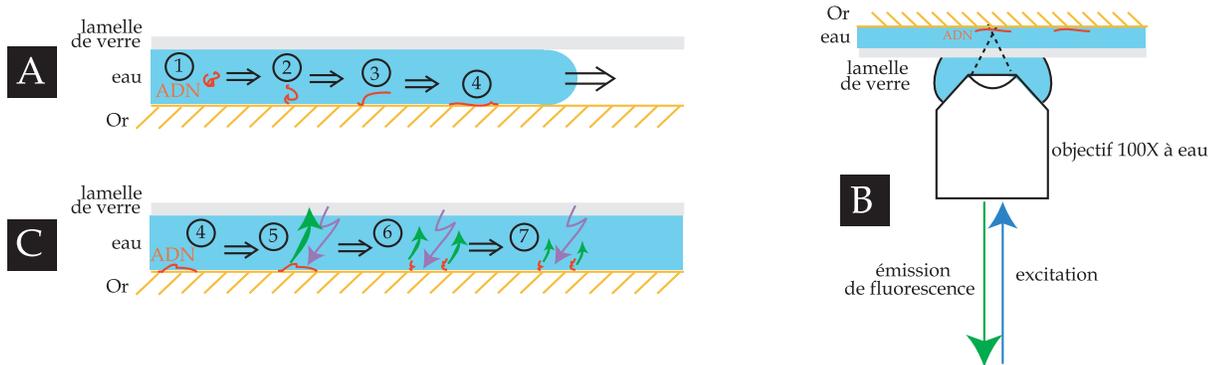


FIGURE 6.6: **A. 1** Lorsque des molécules d'ADN sans AAdUTP sont injectées dans un "capillaire" (i.e. une lamelle de verre et une couche d'or espacées par un peu de parafilm), **2** elles s'ancrent par une de leur extrémité à la surface d'or, **3** sont étirées par le flux du liquide qui continue d'avancer dans le capillaire **4** avant que la deuxième extrémité de la molécule s'ancre à son tour. On observe une assez grande proportion de molécules étirées, quasi parallèles entre elles. Les molécules qui ont rencontré la surface une fois que le capillaire était plein sont quant à elles collées en pelote sur la surface d'or **B**. On visualise ces molécules par un montage de fluorescence (excitation : $\lambda = 490 \text{ nm}$; émission : $\lambda = 515 \text{ nm}$) **C. 5 à 7** l'émission de fluorescence décroît dans le temps et finit par casser en deux la molécule

Nous avons commencé par réaliser l'expérience avec une solution de tampon PB contenant de l'ADN de 10 kbp sans AAdUTP traité au DTSSP puis filtré, avec ou sans amorces biotine et digoxygénine. Dans ces deux cas, les résultats sont identiques. Premièrement, l'ADN non modifié, c'est à dire sans biotine, digoxygénine ou disulfide, possède toujours quelques paires de bases ouvertes à ses extrémités ("sticky ends" [3] p.987), qui ont plus tendance à se greffer sur des surfaces que le reste du double brin. Dans notre cas, une molécule d'ADN qui se colle par l'une de ses extrémités à la surface d'or lors de son injection, s'étire à cause du flux auquel elle continue d'être soumise. Elle finit donc immobile, étirée le long de la surface lorsque sa deuxième extrémité s'ancre elle aussi à la surface. On observe une assez grande proportion de molécules étirées, quasi parallèles entre elles, et d'autres molécules collées en pelote. Deuxièmement, l'émission de fluorescence n'est pas constante, le fluorochrome "s'usant" au cours du temps (phénomène de blanchiment). Enfin, on remarque que le fluorochrome inséré au coeur de la double hélice peut briser la molécule d'ADN après l'émission de photons (voir figure 6.6C) [120]. La molécule alors coupée en deux étant initialement ancrée à ses deux extrémités, les deux brins se regroupent en deux pelotes et on visualise expérimentalement deux points lumineux. La partie de gauche de la figure 6.7 représente trois photos prises à deux secondes d'intervalle, dans le cas de molécules porteuses d'amorces biotine et digoxygénine. Des cercles verts entourent les molécules étirées et immobiles sur la surface d'or.

Les résultats sont tout autre quand on utilise une solution de tampon PB contenant de l'ADN de 10 kbp avec AAdUTP traité au DTSSP puis filtré (donc porteur de groupes disulfide), sans

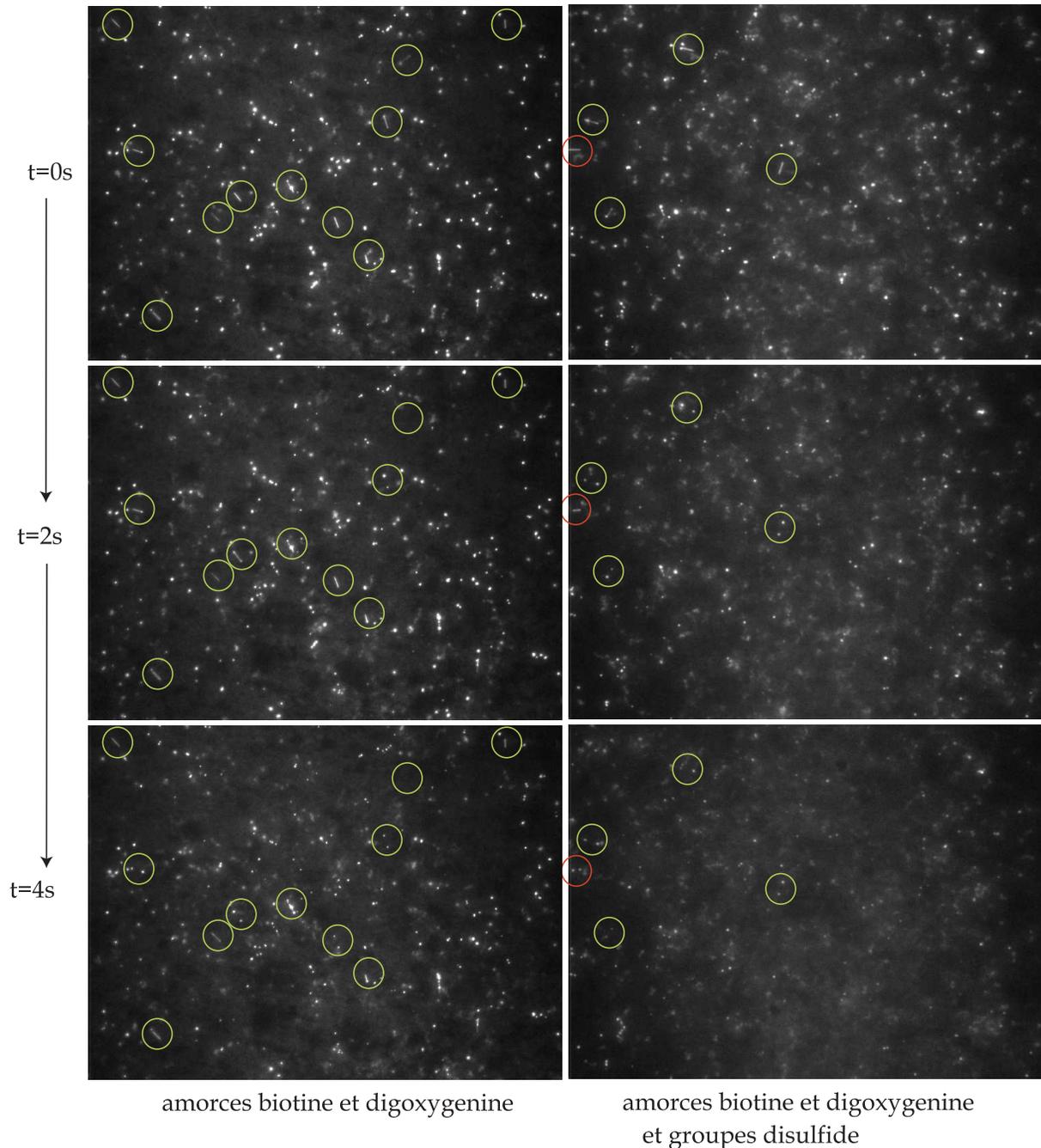


FIGURE 6.7: **à gauche** : évolution dans le temps de l'émission de fluorescence de molécules d'ADN de 10 *kb* synthétisées par PCR avec des amorces fonctionnalisées à la biotine et à la digoxygenine **à droite** : évolution dans le temps de l'émission de fluorescence de molécules d'ADN de 10 *kb* synthétisées par PCR avec des amorces fonctionnalisées à la biotine et à la digoxygenine et porteuses de groupes disulfide. Les molécules étirées sont plus rares. La molécule entourée en rouge possède trois points d'ancrage distincts.

amorces biotine et digoxygenine. Dans cette expérience, réalisée plusieurs fois, la totalité des molécules d'ADN collées à la surface est alors en pelote. Cela peut s'expliquer si on imagine que les molécules possèdent plusieurs points d'ancrages le long de leur chaîne, et ne sont donc pas

étirées d'une extrémité à l'autre. Comme dans le cas précédent, l'émission de fluorescence décroît dans le temps.

La situation est quasi identique quand l'ADN porte des groupes disulfide et des amorces biotine et digoxygénine, mais nous avons tout de même réussi à voir quelques rares molécules étirées sur la surface lors d'une expérience. Celles-ci sont entourées sur les photos de la partie droite de la figure 6.7. L'une d'elles (entourée en rouge) possède trois points d'ancrage au lieu de deux, comme le prouvent les deux clivages successifs le long de sa double hélice (à $t = 2$ s et $t = 4$ s).

L'ADN portant des groupes disulfide colle donc à l'or, et semble posséder plus de points d'ancrage que l'ADN non modifié.

6.4 Synthèse des billes fonctionnalisées et assemblage du système moléculaire final

Pour fabriquer le système moléculaire final composé d'une molécule d'ADN entre deux billes, on fabrique deux types de billes recouvertes de streptavidine et d'antidigoxigénine qui se lient respectivement avec les amorces biotine et digoxygénine de l'ADN. Le principe de la synthèse des microbilles est le suivant : on commence par fonctionnaliser des billes de silice de diamètre $0,97 \mu\text{m}$ (SS03N, Bangs Lab) avec un silane. On fait ensuite croître sur ce silane de manière aléatoire un polymère formé d'acide maléique et d'acrylamide. Cette couche de polymères est ensuite activée. Enfin, on procède à une réaction standard de couplage entre ces polymères et les groupements amine d'une protéine, comme la streptavidine ou l'antidigoxigénine. Ce protocole est identique à celui décrit dans [121], mis à part que l'activation est réalisée avec du glutaraldehyde à la place de EDC NHSS (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide N-hydroxysulfosuccinimide), ceci afin d'éviter la formation d'agrégats de billes (réaction plus lente). Pour la même raison, toutes les réactions se déroulent sur un moteur tournant après sonication.

L'assemblage du tout se déroule en laissant incuber trois heures quelques microlitres d'une solution d'ADN (à environ $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) et de billes recouvertes de streptavidine ou d'antidigoxigénine.

6.5 Unicité et dépôt d'une molécule d'ADN

6.5.1 Capture d'une molécule d'ADN reliant deux billes de silice.

On injecte sur une lamelle de silicium porteuse d'électrodes la solution incubée de $3\text{-}4 \mu\text{l}$ de billes et d'ADN que l'on complète avec $500 \mu\text{l}$ de tampon PB.

En solution, on repère assez facilement au microscope des billes de silice agitées par un mouvement brownien, mais qui restent constamment proches l'une de l'autre. Le plus souvent, ces billes sont en fait reliées entre elle par une molécule d'ADN. Pour piéger ces deux billes, on procède de la manière suivante : on commence par piéger une première bille avec un premier piège optique (l'autre piège étant pour l'instant éteint). On déplace ensuite la bille piégée dans

la solution : la deuxième bille est alors "traînée" par la première par un fil invisible. On allume ensuite le deuxième piège optique pour piéger la deuxième bille. On a alors deux billes piégées dans deux pièges optiques, et reliées entre elles par une molécule d'ADN (ou plus, l'unicité de la molécule n'ayant pas encore été démontrée à cette étape).

6.5.2 Mesure de force et unicité de la molécule : modèle du vers

Chaîne librement jointe

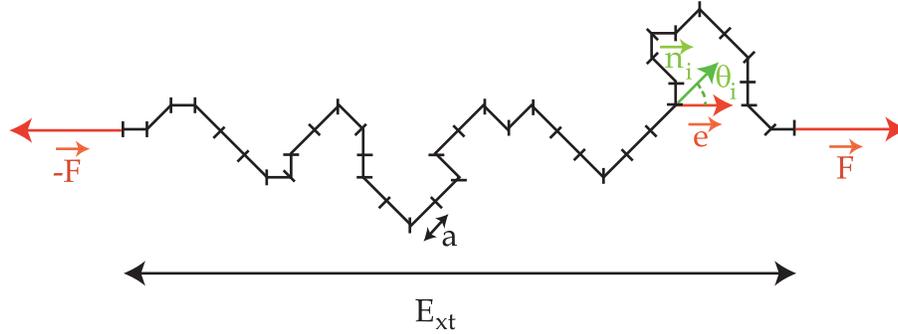


FIGURE 6.8: Modèle de la chaîne librement jointe : une chaîne de N monomères indépendants est étirée par une force F .

On considère un polymère formé de N monomères de longueur a , sans interactions entre eux (voir figure 6.8). La longueur totale de cette chaîne est $L_0 = Na$. Si cette chaîne est soumise à une force $\vec{F} = F\vec{e}$ tendant à l'orienter suivant un axe \vec{e} , l'énergie de chacun des monomères associée à cette force est $E_i = -Fa \cos(\theta_i)$, avec θ_i l'angle entre le vecteur unitaire tangent \vec{n}_i du monomère i et celui de la force \vec{e} . L'extension E_{xt} de la molécule est alors :

$$E_{xt} = Na \langle \cos \theta \rangle = L_0 \frac{\int_{\theta=0}^{\pi} e^{\frac{Fa}{kT} \cos \theta} \cos \theta \sin \theta d\theta}{\int_{\theta=0}^{\pi} e^{\frac{Fa}{kT} \cos \theta} \sin \theta d\theta} \quad (6.1)$$

$$E_{xt} = L_0 \left(\coth \frac{Fa}{kT} - \frac{kT}{Fa} \right) \quad (6.2)$$

ce qui nous donne une relation entre l'extension de la molécule et la force exercée sur celle-ci.

Modèle du ver

L'orientation des monomères entre eux n'est en fait pas totalement aléatoire, et on peut en rendre compte en considérant la longueur :

$$\xi = a \sqrt{\sum_{i=0}^{\infty} (\vec{n}_0 \cdot \vec{n}_i)^2} \quad (6.3)$$

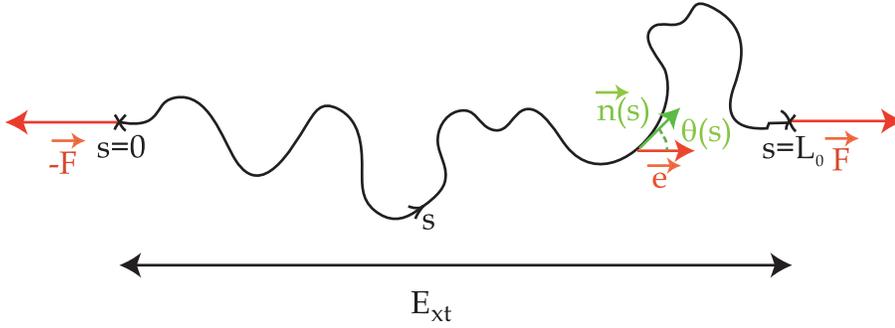


FIGURE 6.9: Modèle du ver : une chaîne continue qui possède une corrélation d'orientation de son vecteur unitaire tangent $n(s)$ sur une longueur ξ est étirée par une force F .

au bout de laquelle les corrélations d'orientations du polymère sont perdues. ξ est appelé longueur de persistance. Pour l'ADN simple brin, $\xi \simeq 1,5 \text{ nm}$ est suffisamment petit pour considérer une description type chaîne librement jointe. L'ADN double brin est beaucoup plus rigide ($\xi \simeq 50 \text{ nm}$), et un modèle du ver est plus adapté à la description de ses propriétés mécaniques. Dans le cas limite $a \rightarrow \infty$ (valable si $\xi \ll L_0$), on passe à une description continue de la chaîne (voir figure 6.9), qui, en plus de l'énergie due à la force s'exerçant sur elle, possède maintenant aussi un terme tenant compte de la rigidité de sa courbure :

$$E = kT \int_0^{L_0} \left(\frac{\xi}{2} \left(\frac{d\vec{n}(s)}{ds} \right)^2 - F \cos \theta(s) \right) ds \quad (6.4)$$

avec s l'abscisse curviligne de la chaîne et E l'énergie totale de la chaîne. Numériquement, on obtient la forme dite "de Marko et Siggia"[122] :

$$F = \frac{kT}{\xi} \left(\frac{1}{4(1 - \frac{E_{xt}}{L_0})^2} - \frac{1}{4} + \frac{E_{xt}}{L_0} \right) \quad (6.5)$$

En rajoutant aux deux termes entropiques de l'énergie une élasticité enthalpique, on corrige cette expression :

$$F = \frac{kT}{\xi} \left(\frac{1}{4(1 - \frac{E_{xt}}{L_0} + \frac{F}{K_0})^2} - \frac{1}{4} + \frac{E_{xt}}{L_0} - \frac{F}{K_0} \right) \quad (6.6)$$

avec K_0 le module élastique de la chaîne. Dans le cas où $\frac{L_0 - E_{xt}}{L_0} \ll 1$, la solution est plutôt de la forme dite "d'Odiijk"[122] :

$$E_{xt} = L_0 \left(1 - \frac{1}{2} \left(\frac{kT}{F\xi} \right)^{\frac{1}{2}} + \frac{F}{K_0} \right) \quad (6.7)$$

Pour l'ADN double brin, ξ est de l'ordre de 40 nm ou 50 nm , et diminue avec l'augmentation de concentration des sels en solution (écranage des répulsions électrostatiques de l'ADN chargé

négativement). K_0 est de l'ordre de 1000 pN [122, 123, 124, 125]. Dans notre cas, L_0 est de l'ordre de 3,4 μm , on a donc bien $\xi \ll L_0$.

Extension d'une molécule

Ainsi, lorsque l'on piège une molécule d'ADN entre deux pièges optiques, on peut tracer expérimentalement l'expression de la force F exercée sur la molécule en fonction de son extension. La valeur de la force nous est donnée par le signal de la photodiode, comme nous l'avons vu avec l'équation 5.26 :

$$F = 2g \sqrt{\frac{\gamma k_b T}{S_{U_{\frac{A-B}{A+B}}}(0)} \frac{U_{A-B}}{U_{A+B}}} \quad (6.8)$$

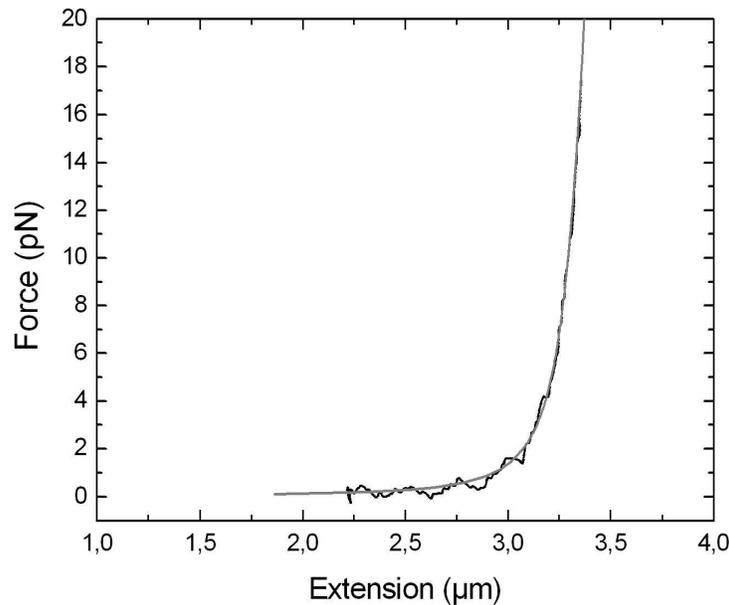


FIGURE 6.10: Réponse en force de l'extension d'une molécule double brin d'ADN de 10 kb . On interpole les données expérimentales par l'équation 6.7 (courbe grise). On impose $L_0 = 3,41 \mu m$, et on obtient $\xi = 50 nm$ et $K_0 = 1000 pN$.

L'extension de la molécule est, quant à elle :

$$E_{xt} = D - 2r - 2X = D - 2r - 2C \frac{U_{A-B}}{U_{A+B}} \quad (6.9)$$

avec D la distance entre les deux pièges optiques, imposée par le miroir piezo, r le rayon d'une bille de silice, et X l'écart entre le centre d'une bille et le centre de la pince qui piège celle-ci. Une telle courbe expérimentale est représentée sur la figure 6.10. On a représenté en

gris l'interpolation de cette courbe par l'équation 6.7 : on impose $L_0 = 3,41 \mu m$, et on obtient $\xi = 50 nm$ et $K_0 = 1000 pN$. La bonne superposition de ces deux courbes nous permet d'affirmer l'unicité de la molécule reliant les deux billes piégées par les pinces optiques.

6.5.3 Dépôt de la molécule

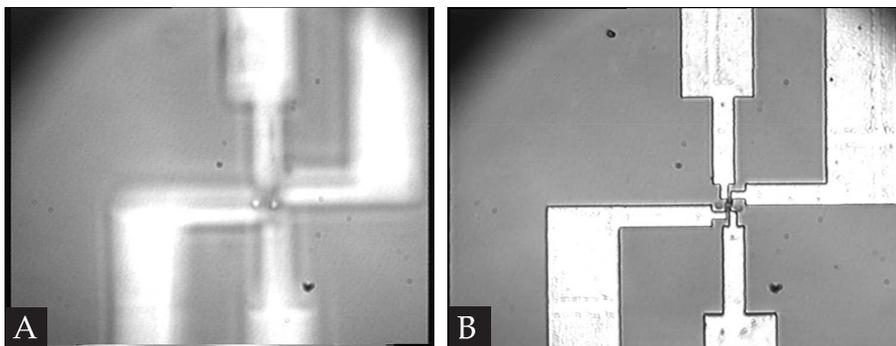


FIGURE 6.11: Dépôt d'une molécule d'ADN sur des électrodes par micromanipulation avec deux pinces optiques **A**. On commence par localiser les électrodes, et à placer les deux billes reliées par une molécule perpendiculairement aux électrodes. Les pinces optiques piègent les billes au dessus de la surface de silicium : la surface est donc floue mais les billes, dans le plan des pièges et donc de l'objectif, sont nettes. **B**. On descend ensuite l'objectif pour déposer la molécule sur les électrodes, puis on éteint les pinces pour pouvoir procéder à une mesure de conductance.

Une fois la molécule piégée entre les deux pinces, on localise les nano-électrodes en or en déplaçant la platine portant l'échantillon, puis on dépose la molécule perpendiculairement aux quatre électrodes en abaissant l'objectif. La figure 6.11 illustre un tel dépôt.

Le contrôle de l'extension de la molécule nous permet d'avoir une idée de l'empilement des bases du double brin d'ADN. On se place dans un état où la force exercée sur la molécule est quasi nulle, ce qui correspond à l'état où les orbitales π se recouvrent le plus. Typiquement une molécule de longueur $L_0 = 3,4 \mu m$ est déposée avec une extension $E_{xt} = 2 \mu m$ ($F < 0,1 pN$, régime entropique).

Après le dépôt de la molécule porteuse de groupes disulfide, on éteint le laser. Les billes de silice collent à la surface dans la plupart des cas. Cependant, il arrive qu'une ou deux billes soient animées d'un mouvement brownien sans pour autant s'éloigner de plus d'un demi micron de la zone du dépôt. Les billes paraissent donc "ancrées" à la surface par un fil invisible, c'est à dire l'ADN. En effet, si on réalise la même manipulation de dépôt sans ADN reliant les billes, ces dernières s'éloignent de plusieurs dizaines de microns en quelques minutes une fois le laser éteint. Ces petites observations sont très importantes, car elles prouvent l'existence d'un contact entre l'ADN déposé et le substrat. Ceci confirme nos 2 tests d'adhésion entre nos brins d'ADN et l'or. On peut alors procéder à une mesure de conductance de l'ADN déposé.

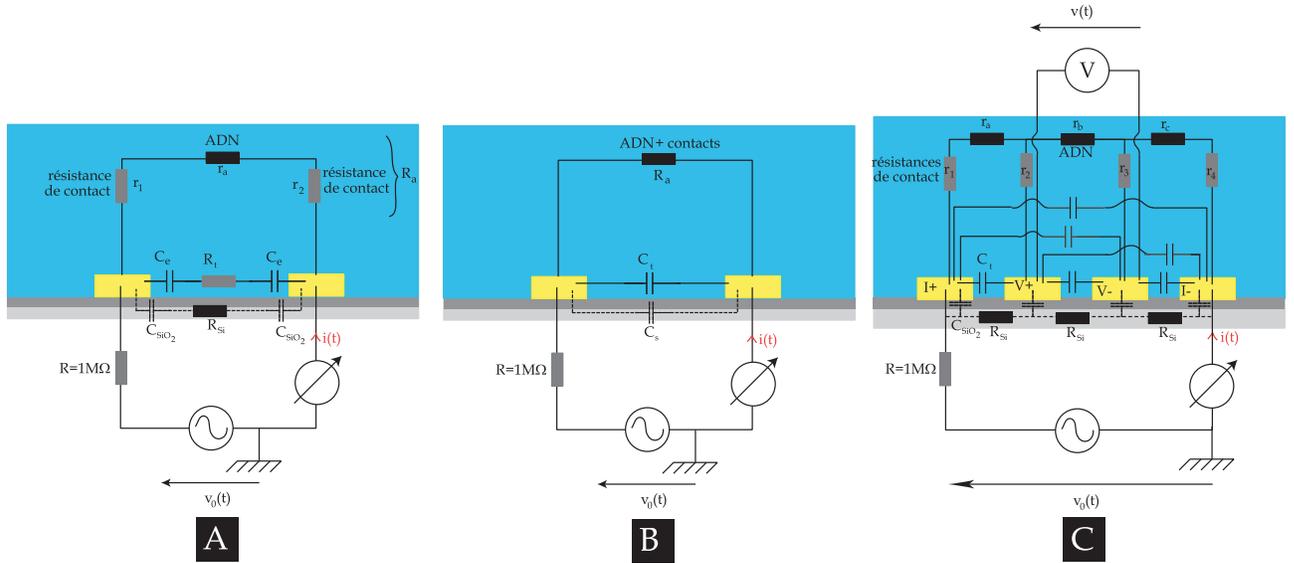


FIGURE 6.12: Principe de la mesure électronique : on impose une tension $v_0(t)$ à un système composé d'eau (C_e et R_t), d'ADN (r_1 , r_a et r_2) et de silicium (C_{SiO_2} et R_{Si}) en parallèle. On place une résistance de protection R en série. **A.** mesure 2 points : on mesure le courant $i(t)$ **B.** mesure 2 points simplifiée, en négligeant R_t et R_{Si} . **C.** mesure quatre points : la tension $v_0(t)$ est imposée entre les deux électrodes externes. On mesure le courant $i(t)$ en sortie, ainsi que la tension $v(t)$ entre les deux électrodes internes.

6.6 Principe de la mesure

Pour mesurer la conductance d'une molécule d'ADN en solution, on se limite à des mesures très basses fréquences pour limiter la conduction de l'eau, et à faibles potentiels imposés pour éviter des réactions d'oxydo-réduction aux interfaces entre les électrodes et la solution.

La figure 6.12 représente le schéma électronique équivalent d'une mesure de conductance d'une molécule d'ADN déposée sur des électrodes. Pour une mesure à deux points (figure 6.12A) on impose une tension sinusoïdale $v_0(t) = V_0\sqrt{2}\cos(\omega t)$ (notation complexe $\tilde{v}_0(t)$) aux bornes du système, de valeur efficace V_0 de quelques dizaines de millivolts et de pulsation ω faible ($f = \frac{\omega}{2\pi} = 0,01 \text{ Hz}$ à $0,1 \text{ Hz}$, constante de temps de la détection synchrone de 10 s à 300 s). La distance entre les deux électrodes de mesure est de 70 nm, 300 nm ou 530 nm selon le choix des électrodes parmi I_+ , V_+ , V_- ou I_- . Expérimentalement, on mesure le courant sortant $i(t)$ (notation complexe $\tilde{i}(t)$) donné par :

$$\tilde{i}(t) = -\frac{\tilde{v}_0(t)}{\tilde{Z}} \quad (6.10)$$

avec \tilde{Z} l'impédance complexe du système. L'ADN de résistance r_a et les résistances de contact r_1 et r_2 entre la molécule et les électrodes forment un objet de résistance R_a , et comme nous l'avons discuté au paragraphe 3.1.1, les contributions respectives de r_a , r_1 et r_2 sont difficilement discernables expérimentalement.

Lorsque l'on impose une différence de potentiel entre deux électrodes, des cations migrent vers l'électrode au potentiel le plus bas (cathode), formant ainsi une couche d'écrantage d'épaisseur

égale à la longueur de Debye l_D de la solution. Il en va de même avec la deuxième électrode (anode) et les anions en solutions. Chacune des couches aux interfaces forme donc une capacité de valeur C_e , espacées d'une épaisseur d d'un tampon de résistance R_t . Dans le cas d'un tampon PB à $25^\circ C$, on a $l_D \simeq 2 \text{ nm}$. On a alors :

$$C_e = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_{rH_2O} S_{elec}}{l_D} \simeq 0,3 \cdot 10^{-8} F \quad (6.11)$$

avec $\varepsilon_{rH_2O} \simeq 80$ la permittivité diélectrique relative de l'eau, $\varepsilon_0 \simeq 8,84 \cdot 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$ la permittivité diélectrique du vide et $S_{elec} \simeq 10^{-8} \text{ m}^2$ la surface immergée des électrodes. Donc :

$$\frac{1}{C_e w} \gg R_t = \frac{r_t d}{S} \simeq 20 M\Omega \quad (6.12)$$

avec $r_t = 10 \Omega.m$ la résistivité du tampon PB, S la surface en regard des électrodes, et $w = 0,01 \text{ Hz}$ (pour le calcul en ordre de grandeur de R_t , on néglige un éventuel facteur de cellule). L'impédance d'une double couche $\frac{1}{C_e w} \Omega$ est dans ce domaine de fréquence (0,01 Hz à 0,01 Hz) très grande devant la résistance en volume de l'eau, qui de l'ordre de quelques $M\Omega$.⁴ On peut donc négliger R_t devant $\frac{1}{C_e w}$.

De même, on peut modéliser le substrat sur lequel sont déposées les électrodes par deux capacités (l'oxyde) de valeur C_{SiO_2} séparées par une épaisseur d de silicium de résistance R_{Si} . Nous avons choisi des substrats avec une épaisseur de silice épaisse ($> 100 \text{ nm}$) tel que R_{Si} soit négligeable devant $\frac{1}{C_{SiO_2} w}$.

On place en plus une résistance de protection $R = 1 M\Omega$ en série. On mesure avec une détection synchrone le courant $i(t)$ de module I et déphasé de φ par rapport à la tension $V_0(t)$. On peut alors simplifier le schéma équivalent de la mesure par le schéma 6.12B : on impose avec une résistance de protection R une tension $v_0(t)$ à un système formé de trois composants en parallèle :

- une résistance R_a de l'ADN et de ses contacts.
- une capacité du tampon $C_t = \frac{C_e}{2}$.
- une capacité du substrat $C_s = \frac{C_{SiO_2}}{2}$.

Autrement dit, on mesure :

$$\tilde{i}(t) = - \frac{\tilde{v}_0(t)}{R + \frac{1}{\frac{1}{R_a} + jC_t w + jC_s w}} \quad (6.13)$$

Soit, en notations réelles (qui nous seront utiles à la section 6.9.5) :

$$i(t) = I\sqrt{2} \cos(\omega t + \varphi) = I_{re}\sqrt{2} \cos(\omega t) + I_{im}\sqrt{2} \sin(\omega t) \quad (6.14)$$

⁴Dans une expérience de conductivité en solution aqueuse, réalisée à des fréquences de l'ordre de quelques kHz ou avec des électrodes plus écartées, la situation est inverse : R_t est dominant.

avec :

$$I_{re} = \frac{(\frac{1}{R_a^2} + \omega^2(C_t + C_s)^2)(\frac{R}{R_a^2} + R\omega^2(C_t + C_s)^2 + \frac{1}{R_a})V_0}{(\frac{R}{R_a^2} + R\omega^2(C_t + C_s)^2 + \frac{1}{R_a})^2 + \omega^2(C_t + C_s)^2} \quad (6.15)$$

$$I_{im} = \frac{(\frac{1}{R_a^2} + \omega^2(C_t + C_s)^2)(-\omega(C_t + C_s))V_0}{(\frac{R}{R_a^2} + R\omega^2(C_t + C_s)^2 + \frac{1}{R_a})^2 + \omega^2(C_t + C_s)^2} \quad (6.16)$$

$$I = \sqrt{I_{re}^2 + I_{im}^2} \quad (6.17)$$

$$\varphi = \arctan\left(\frac{I_{im}}{I_{re}}\right) \quad (6.18)$$

Sans ADN ($R_a \rightarrow \infty$), on a :

$$I_{re} = \frac{R\omega^2(C_t + C_s)^2V_0}{R^2\omega^2(C_t + C_s)^2 + 1} \ll I_{im} = \frac{\omega(C_t + C_s)V_0}{R^2\omega^2(C_t + C_s)^2 + 1} \quad (6.19)$$

autrement dit le phénomène observé est essentiellement capacitif et $i(t)$ est en quadrature de phase : $\varphi = -90^\circ$ et $I = \sqrt{I_{im}^2}$.

Le principe de la mesure 4 points est représenté sur la figure 6.12C. La distance entre I_+ et I_- entre lesquelles on impose $v_0(t) = V_0 \cos(\omega t)$ est de 530 nm , et on mesure la tension $v(t) = V \cos(\omega t + \varphi')$ entre V_+ et V_- distant de 70 nm . On appelle r_a , r_b et r_c les résistances comprises respectivement entre I_+ et V_+ , V_+ et V_- , et V_- et I_- , ainsi que r_1 , r_2 , r_3 et r_4 les résistances de contact entre l'ADN et respectivement I_+ , V_+ , V_- et I_- . Dans le cas idéal où la résistance de l'ADN est petite par rapport aux effets capacitifs :

$$r_a \simeq r_b \simeq r_c \ll \frac{1}{C_t \omega}, \frac{1}{C_s \omega} \quad (6.20)$$

alors $v(t)$ est la tension aux bornes de r_b et $i(t)$ est le courant traversant r_b :

$$r_b = \frac{v(t)}{i(t)} \quad (6.21)$$

On s'affranchit ainsi des résistances de contact.

6.7 Choix du tampon

On commence par des mesures deux points du courant $i(t)$ en solution sans ADN, afin de déterminer quel est le tampon le plus adéquat. La figure 6.13 représente des mesures à $0,1 \text{ Hz}$ entre deux électrodes distantes de 70 nm , pour $30 \text{ mV} < V_0 < 60 \text{ mV}$ dans de l'eau déionisée à $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$, du tampon PB (Phosphate Buffer, $8,3 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,2, Sigma-Aldrich P3288), PBS (Phosphate Buffer Saline, 138 mM NaCl , $10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$

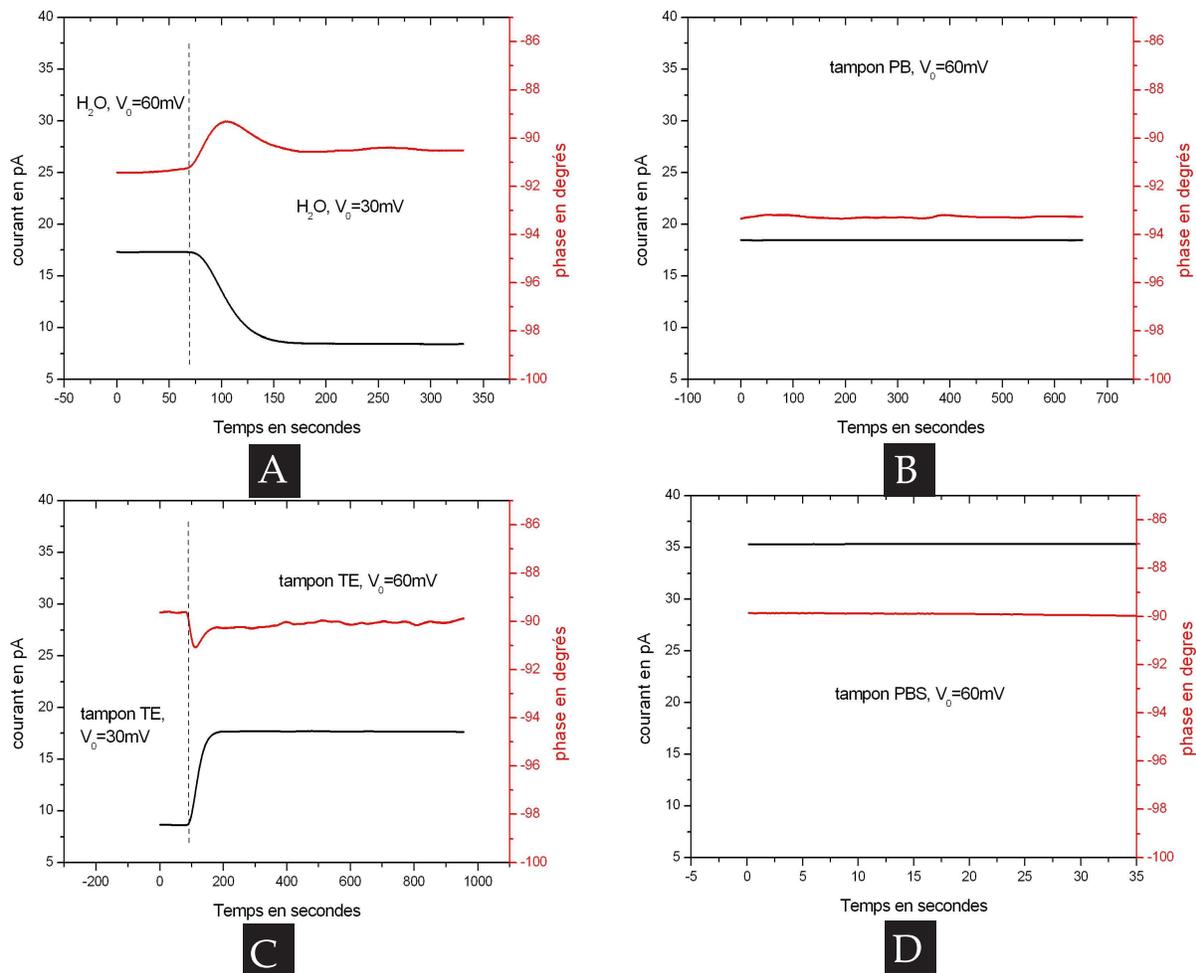


FIGURE 6.13: Mesure du module I du courant $i(t)$ et de sa phase φ en fonction du temps, entre deux électrodes distantes de $70 nm$, avec une fréquence de $v_0(t)$ $f = 0,1 Hz$, et dans différents tampons. **A.** Mesure dans de l'eau déionisée. Initialement, $V_0 = 60 mV$. On passe cette valeur à $V_0 = 30 mV$ en cours de mesure (pointillés). **B.** Mesure dans du tampon PB, $V_0 = 60 mV$. **C.** Mesure dans du tampon TE. Initialement, $V_0 = 30 mV$. On passe cette valeur à $V_0 = 60 mV$ en cours de mesure (pointillés). **D.** Mesure dans du tampon PBS, $V_0 = 60 mV$.

KH_2PO_4 , $2,7 mM KCl$, pH 7,4, Sigma-Aldrich P3813), ou TE (Tris EDTA Buffer pH=7,4, Fluka Biochemika 933302). On remarque que :

- φ est proche de -90° , le système a un comportement capacitif : on peut bien négliger les résistances R_t du tampon et R_{Si} du substrat de silicium (l'épaisseur d'oxyde est épaisse). On remarque cependant qu'au fur et à mesure des nettoyages à l'acide sulfochromique, la phase φ s'éloigne de -90° et le module du courant I augmente : l'acide attaque l'oxyde, C_{SiO_2} augmente et le courant de fuite à travers R_{Si} augmente (I peut augmenter d'un ordre de grandeur et φ peut valoir -60° ou plus).
- le module du courant mesuré dépend bien linéairement de la tension imposée. Ainsi, dans l'eau, lorsque V_0 passe de $60 mV$ à $30 mV$, I passe de $17,3 pA$ à $8,5 pA$.

- le module du courant mesuré dépend de la concentration en sel de la solution. Ainsi, pour $V_0 = 60 \text{ mV}$, le module du courant $i(t)$ dans l'eau, du TE, du PB et du PBS est respectivement $17,3 \text{ pA}$, $17,7 \text{ pA}$, $18,5 \text{ pA}$ et $35,3 \text{ pA}$.

On choisit dans ce qui suit de travailler dans du tampon PB. L'eau pure est à éviter car le couple thiol-or se crée de préférence en solution salée (voir paragraphe 6.2.1), et de plus il faut une force ionique suffisante pour éviter la dénaturation de l'ADN.

6.8 Choix de la fréquence

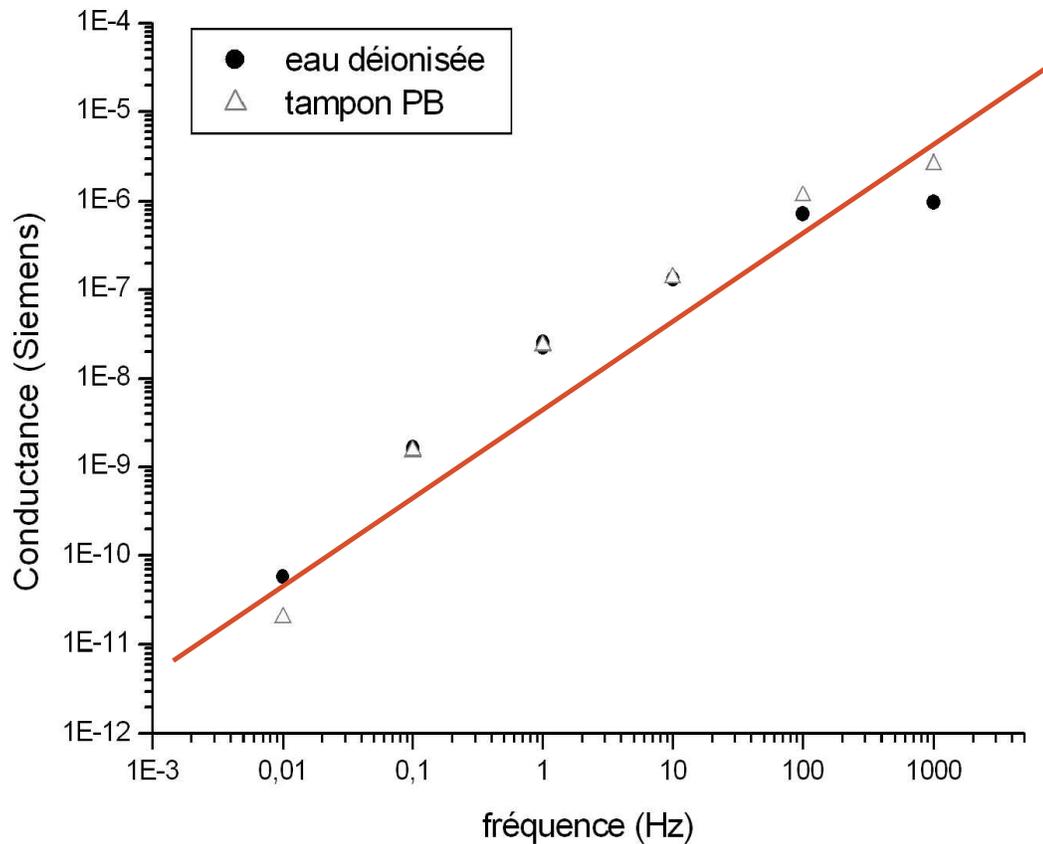


FIGURE 6.14: Valeur de la conductance entre deux électrodes distantes de 70 nm , dans de l'eau et du tampon PB, pour $V_0 = 60 \text{ mV}$, en fonction de la fréquence f de $v_0(t)$.

La figure 6.14 représente la valeur de la conductance σ de l'échantillon mesurée pour de l'eau ou du tampon PB, entre deux électrodes distantes de 70 nm , $V_0 = 60 \text{ mV}$ et pour différentes valeurs de fréquences de la tension appliquée $v_0(t)$:

$$\sigma = \frac{I}{V_0 - RI} \quad (6.22)$$

Dans la région des basses fréquences, on observe bien une conductance proportionnelle à la fréquence conformément à l'équation 6.13 : quand w augmente, $\frac{1}{C_{ew}}$ diminue et le courant $i(t)$ augmente de plus en plus jusqu'à être en phase avec $v(t)$ lorsque $\frac{1}{C_{ew}} \ll R_t$. On choisit de travailler à un centième de hertz pour limiter le plus possible ce courant. Pour des valeurs inférieures à 0,01 Hz, le temps d'intégration de la détection synchrone serait de plusieurs heures et donc trop long.

6.9 Mesures sur molécules uniques

6.9.1 Mesures types

Une mesure type dure une heure, une fois que le dépôt d'une molécule unique d'ADN λ porteuse de groupes disulfide sur les électrodes d'or a eu lieu. Elle est effectuée à 0,01 Hz, dans du tampon PB. La molécule n'est pas étirée ($E_{xt} = 2 \mu m$), les pinces optiques sont éteintes. La distance entre les électrodes est de 70 nm pour une mesure deux points, et la température est de l'ordre de 25°C. Des mesures de ce type sont représentées sur la figure 6.15 pour $V_0 = 60 mV$. On remarque que avec ou sans ADN sur les électrodes (figures 6.15A et B) $I \simeq 1,5 pA$ et $\varphi \simeq -90^\circ$.

On peut aussi effectuer les mesures "à sec". Une fois le dépôt de la molécule réalisé en solution, on sèche la surface avec un flux très faible d'air comprimé. On vérifie avec un objectif 100X à air que les deux billes de silice encadrent toujours les électrodes de mesure (figure 6.16). De telles mesures sont présentées sur les figures 6.15 C et D. Les courants mesurés sont plus faibles qu'en solution (de l'ordre de 30 fA), mais la phase est aussi de l'ordre de -90° . Ces signaux sont aussi moins stables qu'en solution, le courant mesuré étant plus faible. Enfin, on ne remarque aucune différence significative avec ou sans ADN sur les électrodes ($I \simeq 30 fA$ et $\varphi \simeq -90^\circ$).

Nous avons été en mesure de réaliser en tout une soixantaine de mesures avec de l'ADN. Les différents types de mesures (deux ou quatre points, en solution ou à sec, avec ou non ajout d'ions Mg^{2+}) sont détaillés par la suite.

6.9.2 Mesures 2 points en solution et à sec

Les figures 6.17A,B,C,D présentent des résultats de mesures deux points en solution et à sec, avec ou sans ADN, pour des valeurs de V_0 allant de 4 mV à 60 mV.

Pour les expériences sans ADN, la phase est égale à $\varphi = -90^\circ$ (figure 6.17B et D) et on observe donc principalement l'effet de la capacité $C_t + C_s$. A sec, les mesures présentées sur la figure 6.17C nous donnent $C_{s,sec} = 0,01 \pm 0,005 nF$. Les mesures en solution présentées sur la figure 6.17A permettent de calculer une valeur moyenne de $C_t > C_s$ égale à $C_{t,PB} = 0,6 \pm 0,1$

⁵Nous avons augmenté V_0 jusqu'à des valeurs de quelques centaines de millivolts à 1 V, mais les électrodes sont détruites pour de telles tensions.

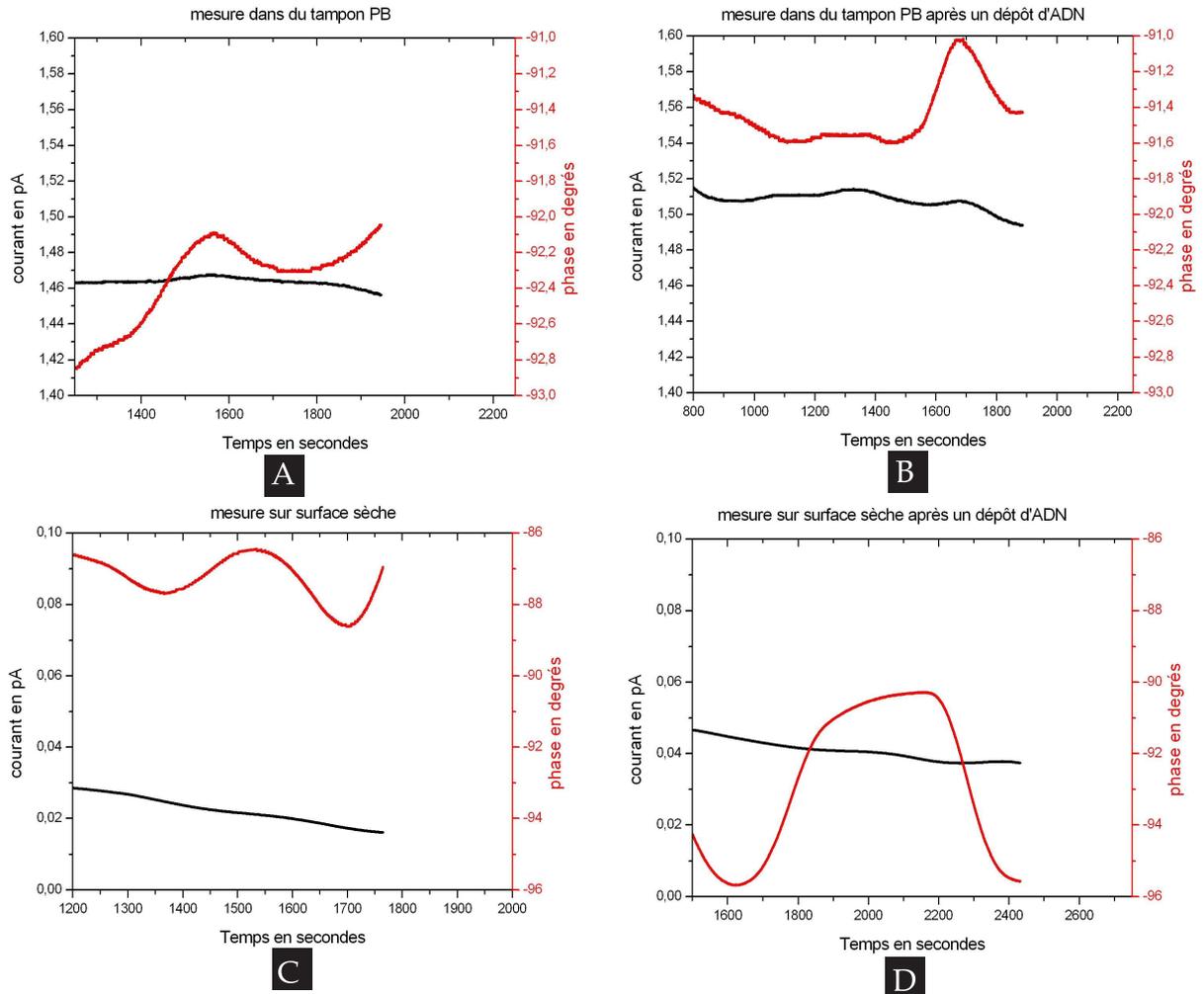


FIGURE 6.15: Mesure du module I du courant $i(t)$ et de sa phase φ en fonction du temps, entre deux électrodes distantes de 70 nm , pour $f = 0,01 \text{ Hz}$ et $V_0 = 60 \text{ mV}$. **A.** Mesure dans du tampon PB sans ADN. **B.** Mesure dans du tampon PB après le dépôt d'une molécule d'ADN sur les électrodes. **C.** Mesure sur une surface "sèche", sans ADN. **D.** Mesure sur une surface "sèche", avec une molécule d'ADN déposée sur les électrodes.

nF . On remarque que les barres d'erreurs des quantités mesurées sont plus grandes à sec, les signaux étant beaucoup plus faibles.

On n'observe aucune différence significative lorsqu'une molécule d'ADN a été déposée sur les électrodes. Le module efficace du courant I varie de la même manière en fonction du module efficace de la tension imposée V_0 , et $i(t)$ est toujours en quadrature de phase par rapport à $v(t)$, à sec comme en solution.

6.9.3 Ajout d'ions Mg^{2+}

L'ion Mg^{2+} s'intercale dans les sillons d'un double brin d'ADN. Nous avons parlé de l'importance éventuelle de cet ion pour la conductivité de l'ADN à la section 3.1.3. Nous avons donc



FIGURE 6.16: Mesure de conductance sur une surface "sèche". Il n'y a pas d'eau sur l'échantillon positionné sous l'objectif du microscope. L'échantillon est encadré par deux réservoirs contenant du gel de silice granulé. La mesure s'effectue à l'intérieur d'une cage en toile de cuivre finement tressée.

réalisé des expériences comparables à celles décrites précédemment, en ajoutant au tampon PB 1 mM d'ions Mg^{2+} . Les résultats, présentés sur la figure 6.18, sont similaires aux expériences sans ions Mg^{2+} . La phase φ reste égale à -90° , la variation de I en fonction de V_0 est la même avec ou sans ADN, mais en solution la pente est légèrement plus grande que sans ions Mg^{2+} (la solution étant plus salée).

6.9.4 Mesures 4 points en solution et à sec

La mesure quatre points de $i(t)$ (figure 6.19) est identique à sa mesure deux points : La valeur de C_t ne semble pas dépendre de la distance entre les deux électrodes, entre lesquelles on impose $v_0(t)$ (70 nm ou 530 nm). Ceci est facilement compréhensible : lorsque la distance d entre les électrodes augmente, la valeur de R_t augmente mais reste toujours négligeable devant la valeur de C_e qui elle ne change pas, étant caractéristique de la surface en regard des électrodes et de la concentration en sel du tampon.

Les mesures du courant $i(t)$ et de la tension $v(t)$ restent identiques avec ou sans dépôt de molécules d'ADN (en solution ou à sec). L'impédance d'entrée pour la mesure de $v(t)$ ($10^{12} \Omega$) n'étant pas très supérieure à $\frac{1}{(C_t+C_s)\omega}$ ($10^{11} \Omega$ en solution et $10^{13} \Omega$ à sec et pour une fréquence de 0,01 Hz), il est difficile de donner un sens à cette mesure (figure 6.20).

6.9.5 Calcul de la borne inférieure de la résistance mesurée

La figure 6.21 est un tracé de la valeur théorique de φ et I en fonction de la résistance R_a à partir des équations 6.17 et 6.18, pour une fréquence $f = 0,01 Hz$, pour $V_0 = 4 mV$ ou 60 mV , en solution ou à sec. On voit que si en solution, R_a était égal à $10^{11} \Omega$, on devrait être

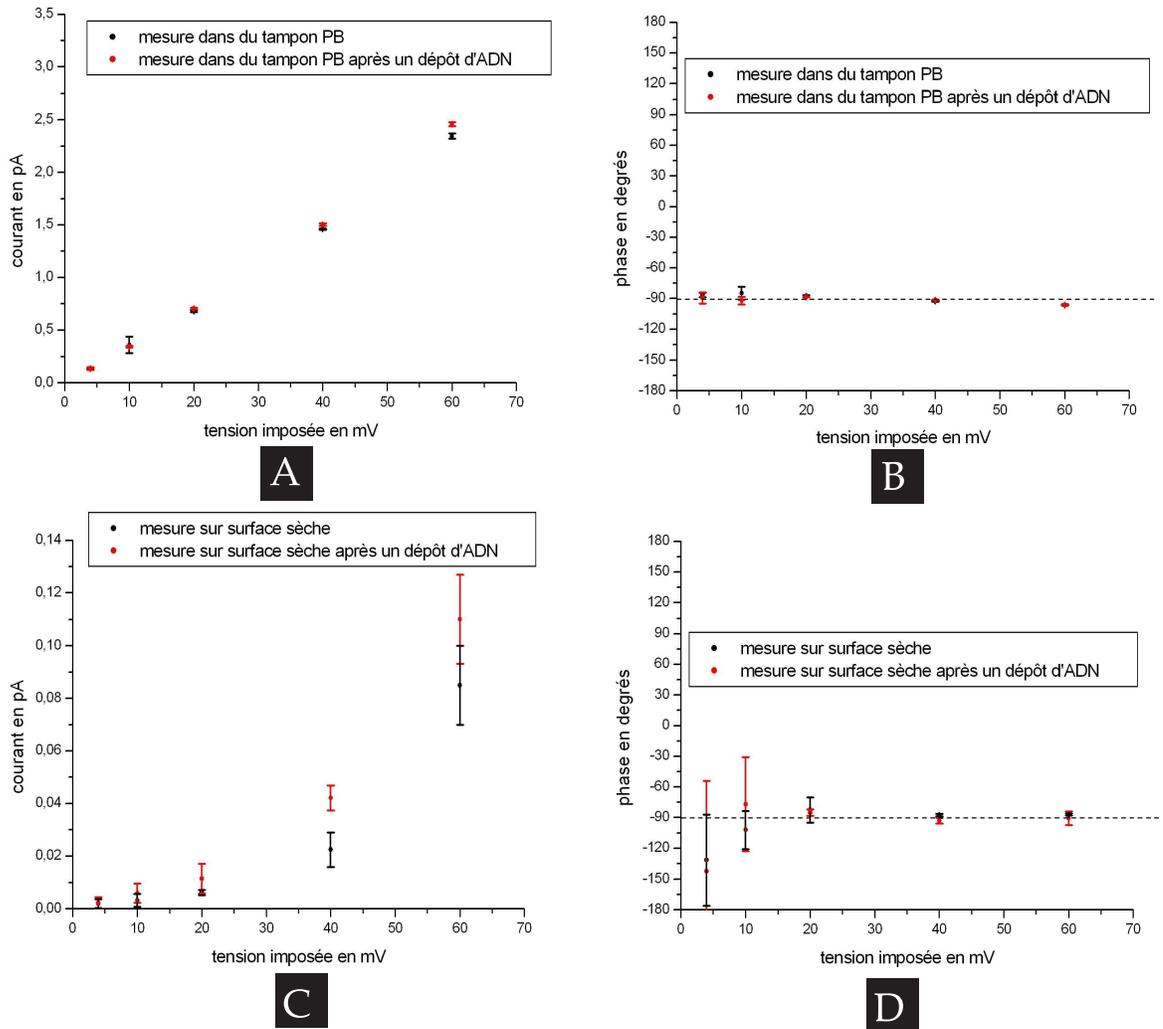


FIGURE 6.17: Mesures du module I du courant $i(t)$ et de sa phase φ entre deux électrodes distantes de 70 nm , pour une fréquence $f = 0,01 \text{ Hz}$, en fonction de V_0 . Mesures avec (points en rouge) ou sans (points en noir) ADN. **A.** Mesure dans du tampon PB du module I du courant $i(t)$. **B.** Mesure dans du tampon PB de la phase φ du courant $i(t)$. **C.** Mesure à sec (après une incubation en tampon PB de l'échantillon) du module I du courant $i(t)$. **D.** Mesure à sec (après une incubation en tampon PB de l'échantillon) de la phase φ du courant $i(t)$.

en mesure de détecter après un dépôt d'ADN un changement de la phase de -90° à -80° . Ceci nous permet de donner une borne inférieure de la résistance R_a en solution :

$$R_{a,solution} \geq 10^{11} \Omega \quad (6.23)$$

De même, à sec :

$$R_{a,sec} \geq 10^{13} \Omega \quad (6.24)$$

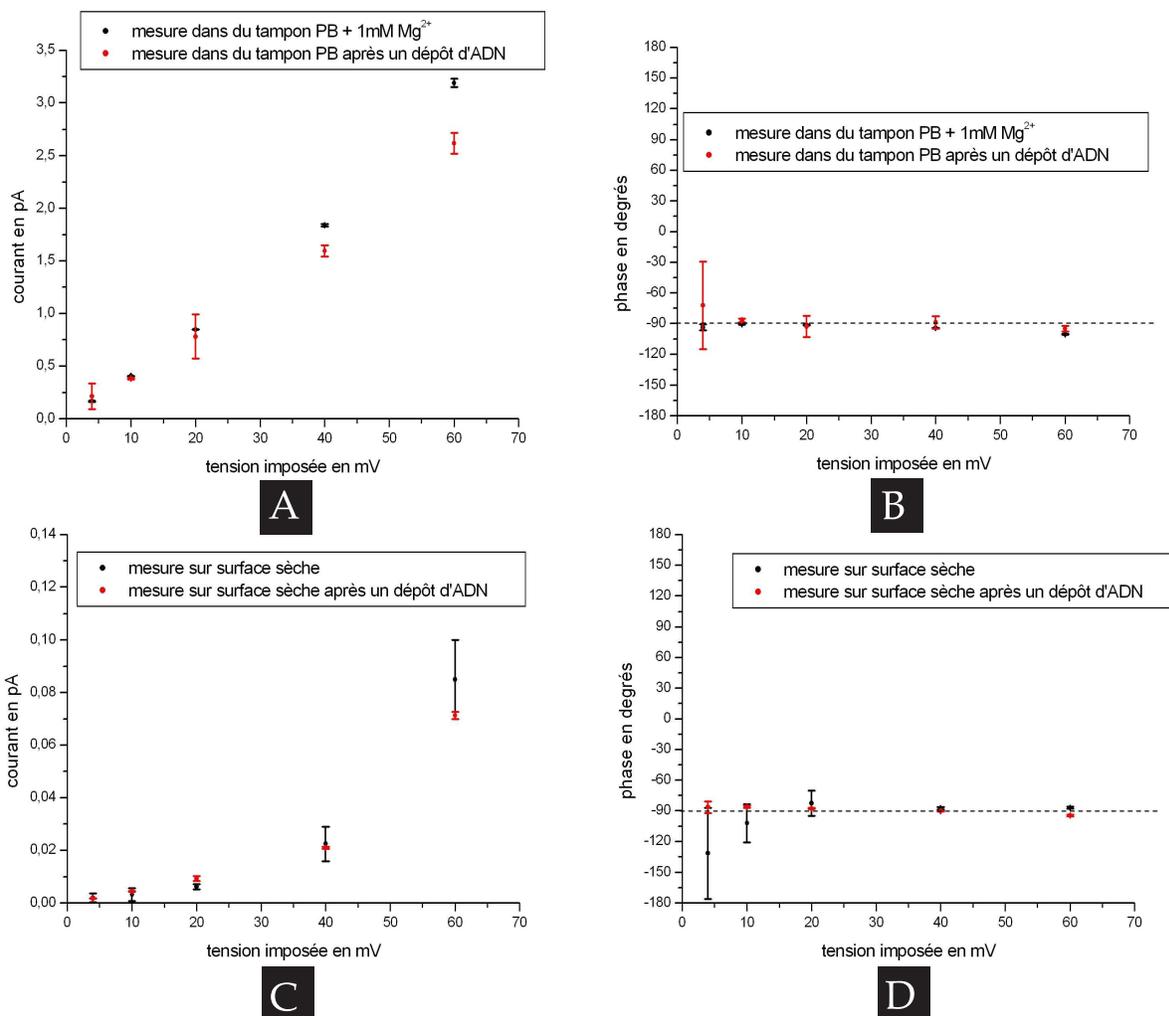


FIGURE 6.18: Mesures du module I du courant $i(t)$ et de sa phase φ entre deux électrodes distantes de 70 nm , pour $f = 0,01 \text{ Hz}$, en fonction de V_0 . Mesures avec (points en rouge) ou sans (points en noir) ADN. **A.** Mesure dans du tampon PB+1 $mM \text{ Mg}^{2+}$ du module I du courant $i(t)$. **B.** Mesure dans du tampon PB+1 $mM \text{ Mg}^{2+}$ de la phase φ du courant $i(t)$. **C.** Mesure à sec (après une incubation en tampon PB+1 $mM \text{ Mg}^{2+}$ de l'échantillon) du module I du courant $i(t)$. **D.** Mesure à sec (après une incubation en tampon PB+1 $mM \text{ Mg}^{2+}$ de l'échantillon) de la phase φ du courant $i(t)$.

6.10 Discussions des résultats et perspectives

Notre conclusion est donc que l'ADN est isolant dans nos conditions expérimentales. Plusieurs éléments peuvent expliquer nos grandes valeurs des bornes inférieures de R_a en solution et à sec :

- les résistances de contact entre l'ADN et les électrodes. En effet, R_a représente à la fois la résistance de l'ADN et de ses contacts. Nous avons vu que la résistance d'une chaîne de quelques atomes de carbone et d'une liaison thiol était de l'ordre de $1G\Omega$ à la section 6.2.1, mais nous ne sommes pas en mesure de déterminer combien de liaisons thiol-or entre la molécule et les électrodes existent dans nos expériences. Peut-être faut il nettoyer les

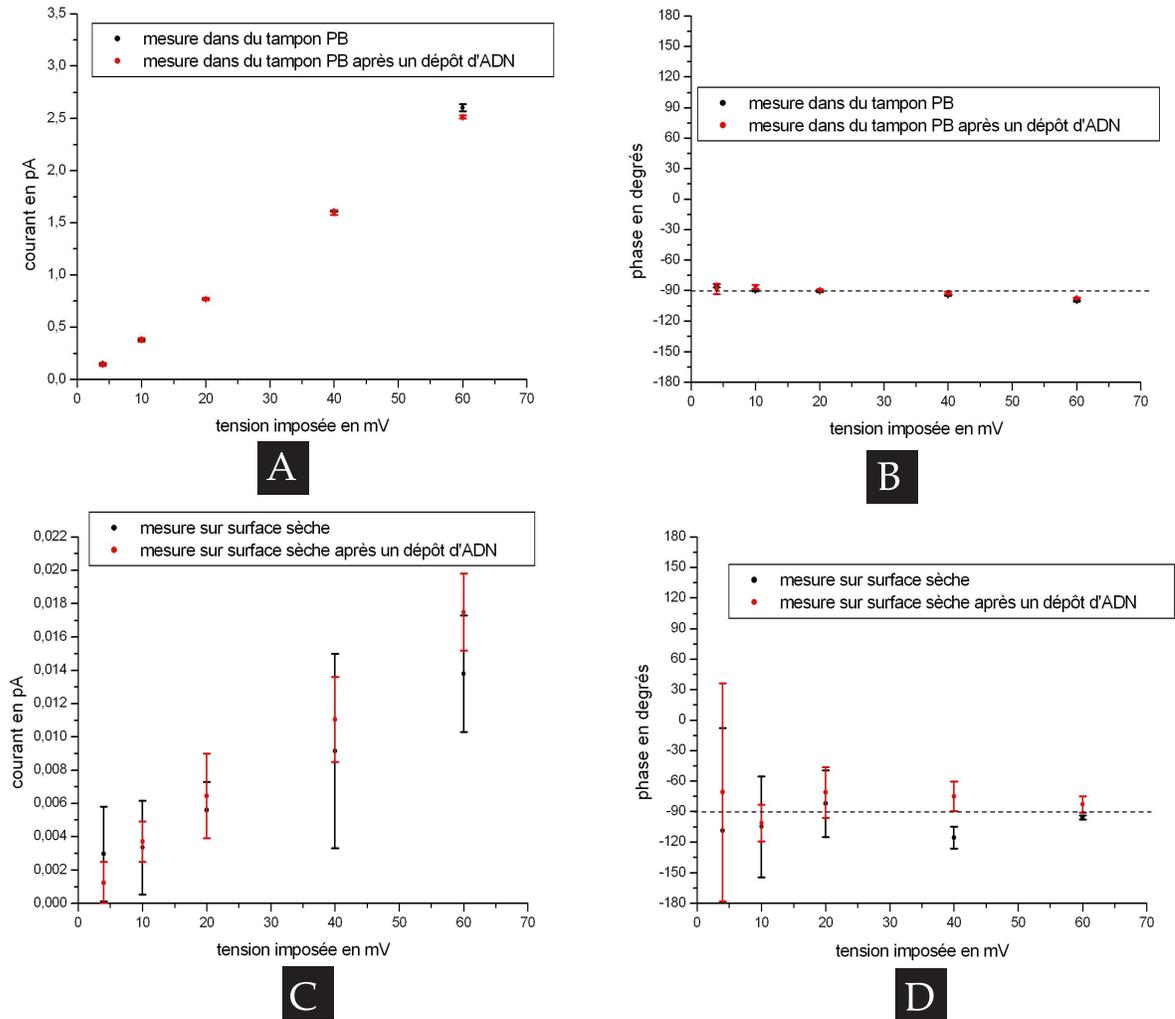


FIGURE 6.19: Mesures du module I du courant $i(t)$ et de sa phase φ en mesure quatre points, avec une fréquence f de $V_0(t)$ égale à $f = 0,01$ Hz, en fonction de v_0 . Mesures avec (points en rouge) ou sans (points en noir) ADN. **A.** Mesure dans du tampon PB du module I du courant $i(t)$. **B.** Mesure dans du tampon PB de la phase φ du courant $i(t)$. **C.** Mesure à sec (après une incubation en tampon PB de l'échantillon) du module I du courant $i(t)$. **D.** Mesure à sec (après une incubation en tampon PB de l'échantillon) de la phase φ du courant $i(t)$.

électrodes à l'ozone plutôt qu'à l'acide, ou bien revoir la nature même de ces contacts.

- la distance entre les électrodes. Les deux expériences en molécule unique concluant que l'ADN est conducteur [55, 56] s'effectuent entre deux électrodes distantes de $d = 1\text{nm}$ à $d = 20\text{nm}$, alors que dans notre cas nous avons disposé d'électrodes dont $d = 70\text{nm}$.
- la nature de notre ADN. Nous avons utilisé de l'ADN λ , qui est schématiquement une succession aléatoire de paires $A - T$ et $G - C$. Or, l'expérience de Yoo [55] montre que les paires $A - T$ conduisent cent fois moins bien que les paires $G - C$. Pour nous placer dans une configuration optimale, notre dispositif de micromanipulation nous demanderait de disposer de brins d'ADN poly dG-dC de quelques microns de long, ce qui est difficilement

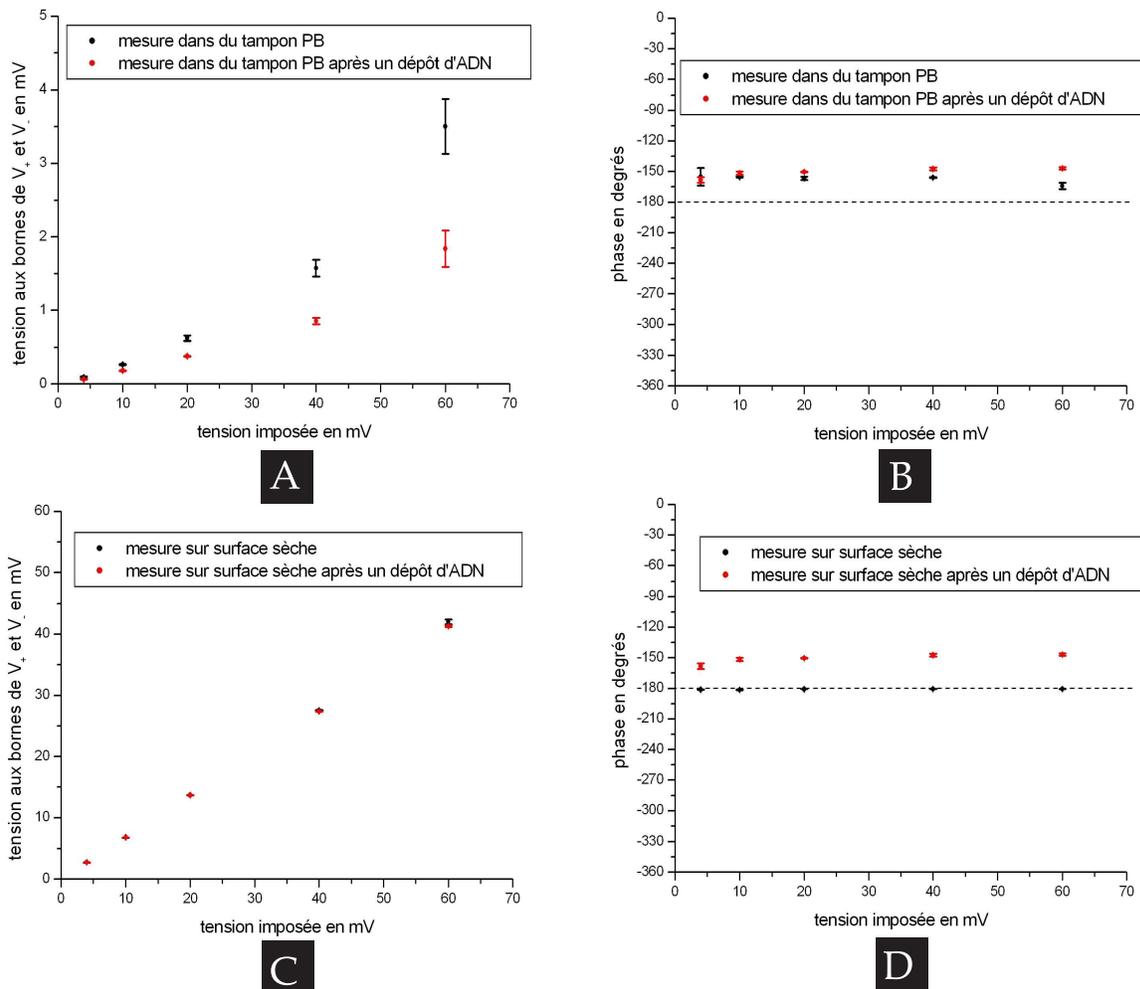


FIGURE 6.20: Mesures du module V du courant $v(t)$ et de sa phase φ' en mesure quatre points, avec une fréquence f de $v_0(t)$ égale à $f = 0,01 \text{ Hz}$, en fonction de V_0 . Mesures avec (points en rouge) ou sans (points en noir) ADN. **A.** Mesure dans du tampon PB du module V du courant $i(t)$. **B.** Mesure dans du tampon PB de la phase φ' du courant $i(t)$. **C.** Mesure à sec (après une incubation en tampon PB de l'échantillon) du module V du courant $i(t)$. **D.** Mesure à sec (après une incubation en tampon PB de l'échantillon) de la phase φ' du courant $i(t)$.

réalisable ⁶.

- l'existence éventuelle d'une tension de seuil. Certaines expériences concluent à un comportement "semi-conducteur" de l'ADN, avec des tensions de seuil de l'ordre de 0,2 V à 5 V. Nous n'avons pas pu atteindre de telles tensions en solution sans endommager les électrodes.
- l'interaction avec la surface. Nous avons vu que certains groupes mettent en avant l'importance de l'épaisseur de l'ADN déposé sur un substrat avec lequel la molécule interagit. Il serait donc intéressant de procéder à des mesures sur des surfaces traitées à la pentylamine ou du mica par exemple.

⁶L'ADN polymérase ne peut pas amplifier de séquence trop régulière

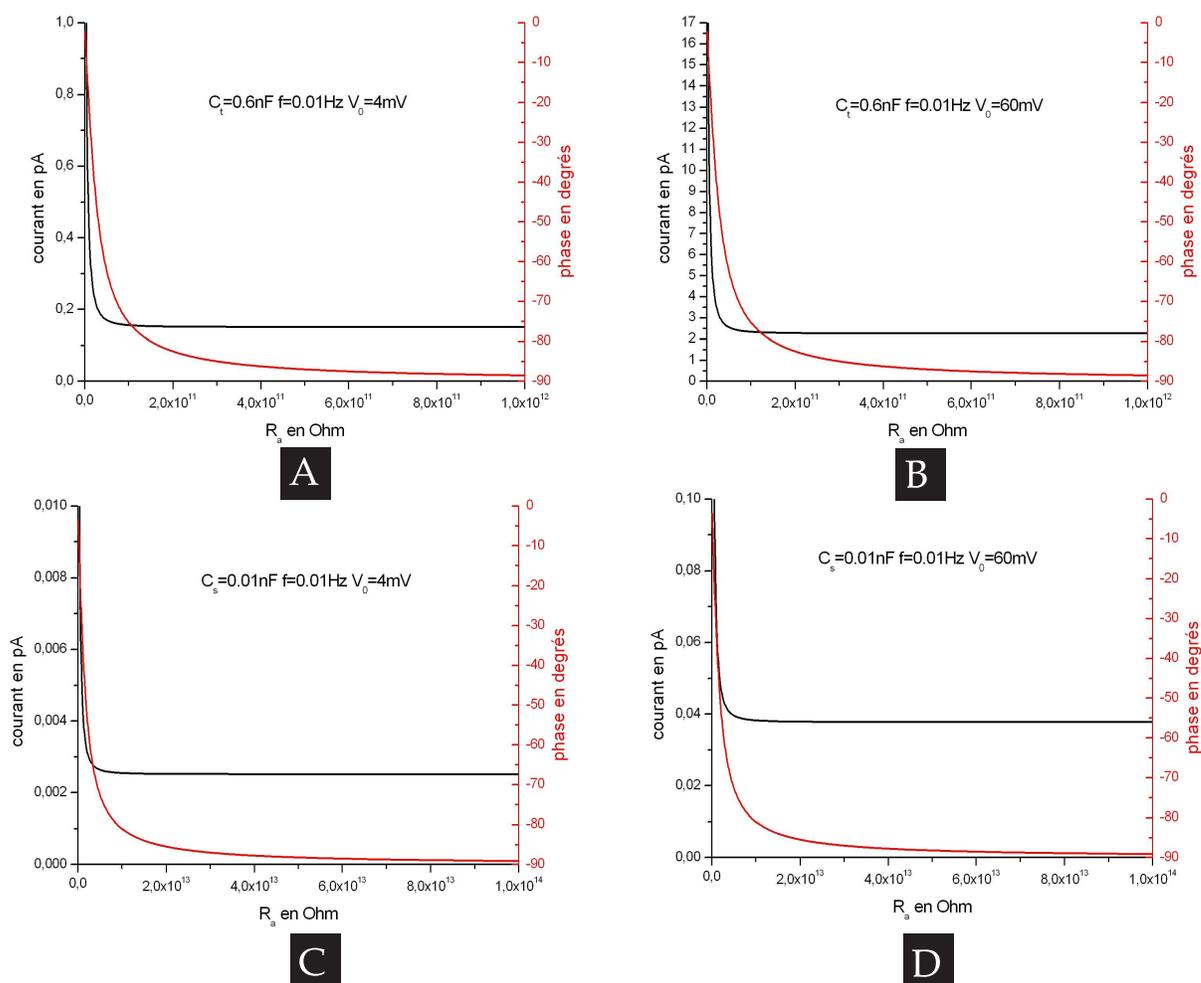


FIGURE 6.21: Valeurs théoriques de φ et I en fonction de la résistance R_a , calculées à partir des équations 6.17 et 6.18, pour une fréquence $f = 0,01 \text{ Hz}$ de $v_0(t)$. **A.** Mesure en solution pour $V_0 = 4 \text{ mV}$. **B.** Mesure en solution pour $V_0 = 60 \text{ mV}$. **C.** Mesure à sec pour $V_0 = 4 \text{ mV}$. **D.** Mesure à sec pour $V_0 = 60 \text{ mV}$.

Chapitre 7

Mesures de forces sur des molécules d'ARN : dégrafage d'une structure secondaire

7.1 Construction moléculaire hybride d'ADN et d'ARN

On se propose de réaliser une expérience sur le principe décrit au paragraphe 3.2.1 avec les constructions moléculaires présentées sur la figure 7.1. Ces systèmes sont le fruit du travail de Thierry Bizebard de l'Institut de Biologie Physico-Chimique de Paris (IBPC). Ils sont composés :

- d'un fragment d'ARN ribosomique 23S d'*Escherichia Coli* de 5662 bases, dont la partie centrale (base 989 à 1165) peut être ou non hybridée à une séquence complémentaire d'ADN.
- d'un fragment d'ADN de 3185 bases (noté brin λ_b) fonctionnalisé biotine en 3', hybridant l'extrémité 5' du fragment d'ARN.
- d'un fragment d'ADN (noté brin λ_d) fonctionnalisé digoxygénine en 5', hybridant l'extrémité 3' du fragment d'ARN. Selon la taille de ce simple brin d'ADN (2306 bases ou 2481 bases), la partie centrale du fragment d'ARN peut être hybridée ou non. On appelle construction "C" celle dont la partie centrale du fragment d'ARN est hybridée à une séquence complémentaire d'ADN (longueur cristallographique de 1,93 μm), et construction "B" celle dont la partie centrale du fragment d'ARN est repliée sur elle même (longueur cristallographique de 1,87 μm , en négligeant les bases 989 à 1165 du fragment d'ARN).

L'ARN a été transcrit à partir d'un plasmide contenant son gène par transcription in vitro. Les fragments d'ADN sont synthétisés par PCR. Les nucléotides, les enzymes et les amorces résiduelles ont été éliminées par filtration (Qiagen-Qiaquick). L'ADN λ_b et λ_d encore hybridés à leurs brins complémentaires (respectivement λ_b^* et λ_d^*) et l'ARN ont été mélangés à 85°C (en présence de formamide) puis refroidis afin d'hybrider l'ARN avec les brins λ_b et λ_d . Les brins isolés résiduels (λ_b , λ_d , λ_b^* , λ_d^* , les systèmes λ_b/λ_b^* , λ_d/λ_d^* , ARN/ λ_b , ARN/ λ_d) ont ensuite été éliminés (ou non) par purification sur gel d'agarose, les systèmes ARN/ λ_d/λ_b se démarquant du reste par une migration plus lente. La construction moléculaire est ensuite renaturée à 60°C puis

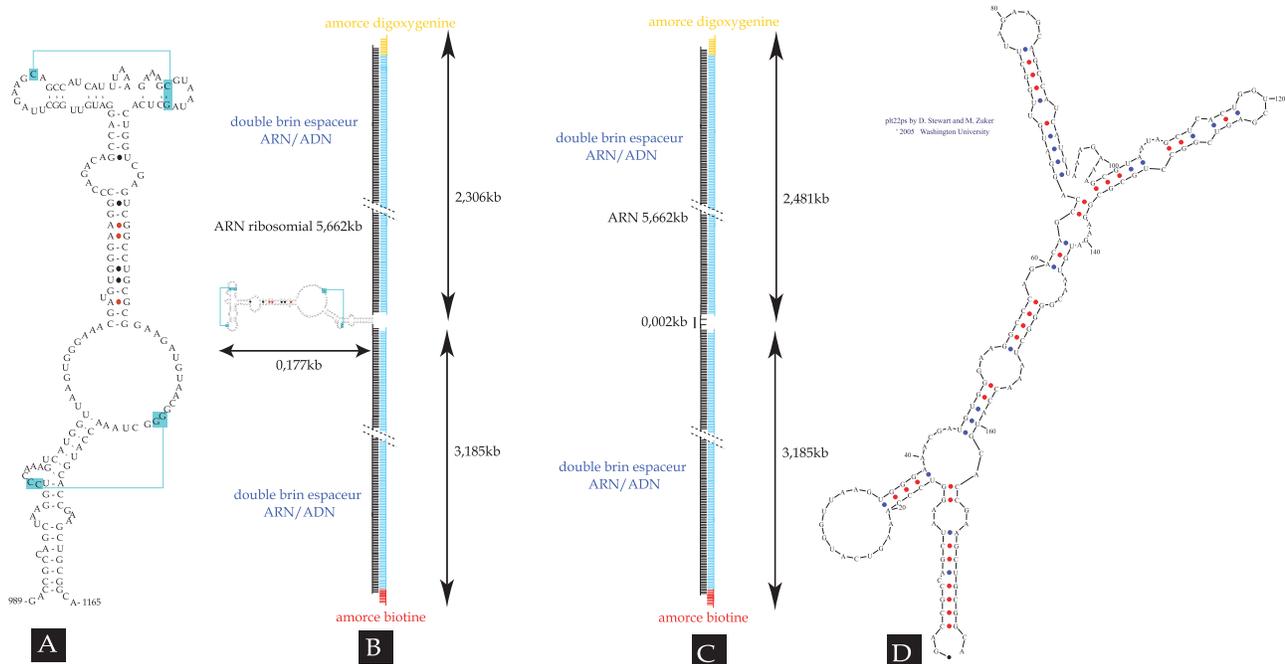


FIGURE 7.1: **A.** Structure secondaire d'un fragment d'ARN ribosomique 23S d'*Escherichia Coli* dans le ribosome (nucléotides 989 à 1165). **B.** Construction moléculaire *B* : Le fragment d'ARN présenté précédemment est inclus entre deux doubles hélices d'ADN et d'ARN, reliées à des micro-billes de silice. **C.** Construction moléculaire *C* : un fragment d'ARN est entièrement hybridé à deux simples brins d'ADN complémentaires, et reliés par ses deux extrémités à des micro-billes de silice. **D.** Structure secondaire du fragment d'ARN ribosomique 23S d'*Escherichia Coli* obtenue d'après le programme de M. Zuker *mfold* [126].

conservée en aliquot à $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ et -25°C dans une solution de 100 mM KCl, 7 mM MgCl_2 , 10 mM Tris et 1 mM EDTA.

L'assemblage de la construction moléculaire et de billes en silice (diamètre $0,97 \mu\text{m}$), pour en faire un système micromanipulable, se réalise en laissant incubé pendant trois heures quelques microlitres d'une solution de billes recouvertes de streptavidine ou de anti-digoxigénine et de la construction moléculaire à $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Le système final est piégé comme au chapitre précédent (section 6.5.1).

7.2 Résultats

7.2.1 Construction "C"

La figure 7.2 présente le signal de force mesuré en fonction du temps durant l'extension d'une construction moléculaire "C". Lors de cette expérience, on commence par éloigner le piège optique mobile du piège fixe, puis on inverse le mouvement du piège mobile une vingtaine de secondes après le début de l'expérience (trait vertical gris). Une vingtaine d'extensions similaires ont été réalisées. On ne remarque rien de particulier entre 10 pN et 14 pN, pas de chute brutale

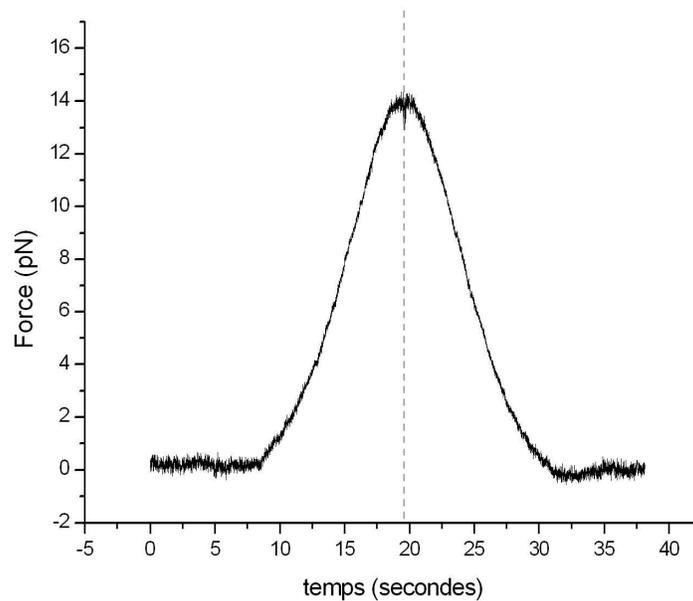


FIGURE 7.2: Courbe expérimentale d'extension d'une construction moléculaire C (force mesurée en fonction du temps) : on commence par éloigner le piège optique mobile du piège fixe à $0,1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, puis on inverse le mouvement du piège mobile une vingtaine de secondes après le début de l'expérience (trait vertical gris).

de la force pouvant correspondre à un dégrafrage ¹. L'expérience a été réalisée dans une solution de 100 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 10 mM Tris et 1 mM EDTA. La vitesse du piège mobile est de $0,1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, et la raideur des pièges est d'environ $70 \text{ pN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$.

7.2.2 Construction "B" : dégrafrage d'un fragment d'ARN

Lorsque qu'on réalise la même expérience avec une construction moléculaire "B" (même tampon et vitesse de séparation des pièges, voir figure 7.3), on remarque quelques différences. Pour l'expérience présentée, un accident vers $11,6 \text{ pN}$ se produit lors de la séparation des pièges (flèche verticale noire, correspondant au dénouement de l'ARN). Un accident quasi symétrique se produit aux alentours de $10,7 \text{ pN}$ lorsque le piège mobile se redirige vers le piège fixe (flèche verticale grise, correspondant au rénouement de l'ARN). L'expérience avec la construction "C" nous permet de conclure que ces pics sont dus à la séquence d'ARN non hybridée à une séquence d'ADN complémentaire. Pour ce qui est de la nature exacte de l'effet observé, il provient de la structure secondaire de l'ARN replié, la séquence très courte étudiée ne possédant a priori pas de structure tertiaire.

Pour cette même expérience, on a représenté la force mesurée en fonction de l'extension de la molécule sur la figure 7.4. On remarque que :

- il y a un hysteresis entre les pics du dénouement et du rénouement de l'ARN, d'en-

¹on remarque cependant que à haute force, le piège commence à saturer et à ne plus être linéaire.

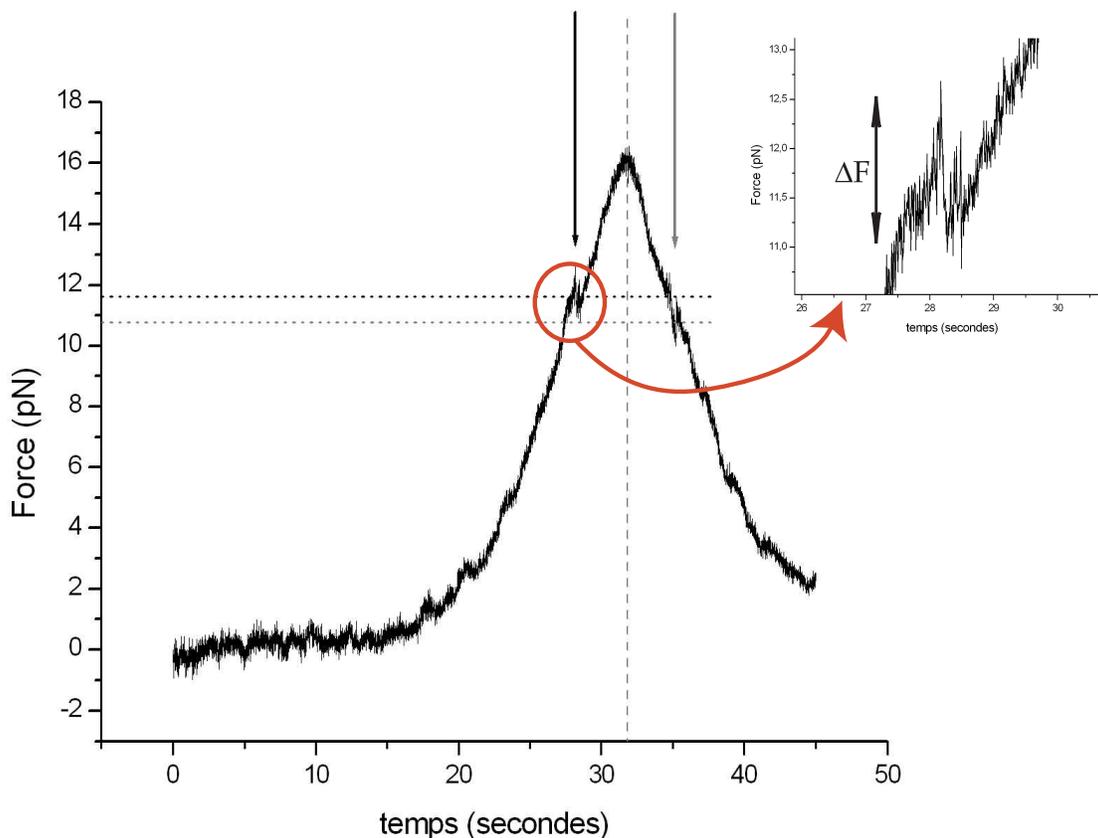


FIGURE 7.3: Courbe expérimentale d'extension d'une construction moléculaire B (force mesurée en fonction du temps) : on commence par éloigner le piège optique mobile du piège fixe à $0,1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, puis on inverse le mouvement du piège mobile une trentaine de secondes après le début de l'expérience (trait vertical gris). On observe un pic lors du dénouement (flèche verticale noire) et du rénouement (flèche verticale grise) du fragment d'ARN replié sur lui-même. Ces deux pics sont décalés d'environ 1 pN .

viron 1 pN .

- la hauteur de chacun des pics est de l'ordre de $\Delta F = 1,5 \text{ pN}$.
- ce dénouement s'effectue donc sur une longueur d'environ 50 nm à 75 nm (voir figure 7.4)².
- On remarque de plus un très léger décalage en extension entre la courbe pour laquelle le piège mobile s'éloigne du piège fixe, et la courbe pour laquelle le piège mobile revient vers le piège fixe. Ce décalage est attribué à la dérive du piezo électrique contrôlant la position du piège mobile.

Sur une centaine d'extensions réalisées (et une trentaine de molécules différentes), seules 18 présentaient un pic comparable durant l'extension de la molécule. Les pics ne se trouvent pas exactement à la même valeur de force pour toutes ces expériences, mais sont regroupés

²Aux alentours de $F = 10 \text{ pN}$, la raideur locale d'une double hélice de longueur $1,87 \mu\text{m}$ est de $\frac{k_{ADN}}{2} = 254 \text{ pN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$. En prenant pour raideur d'un des pièges $k_{\text{piège}} = 56 \text{ pN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$, on obtient pour notre système une raideur totale $k_{\text{tot}} = \frac{1}{\frac{2}{k_{ADN}} + \frac{2}{k_{\text{piège}}}} = 25 \text{ pN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$. On peut donc aussi estimer la longueur sur laquelle se dégrade l'ARN d'après la figure 7.3 : $\frac{\Delta F}{k_{\text{tot}}} = 60 \text{ nm}$.

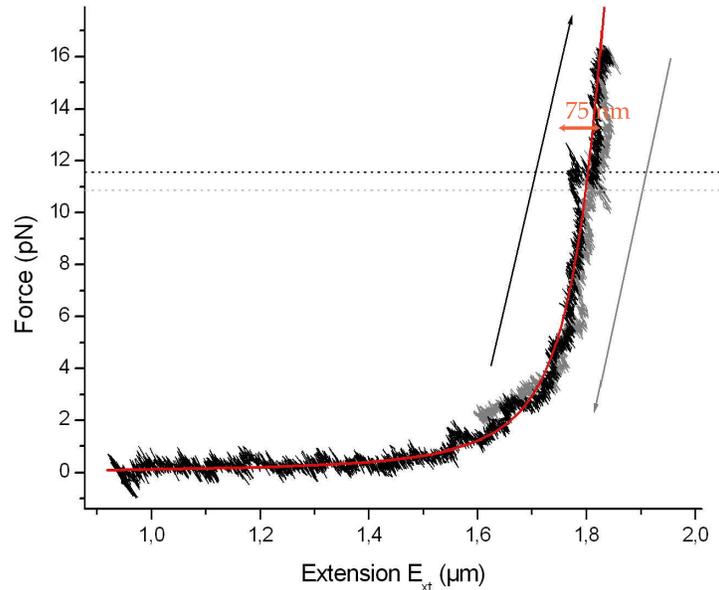


FIGURE 7.4: Courbe expérimentale d'extension d'une construction moléculaire B (force mesurée fonction de l'extension) : les pics observés au dénouement (courbe bruitée noire) et au renouement (courbe bruitée grise) sont décalés d'environ 1 pN. Leur hauteur est de l'ordre du pico-newton, et leur largeur d'une quarantaine de nanomètre. En rouge est représentée la courbe d'extension théorique de la construction (équation 6.7, $L_0 = 1,87 \mu m$ $K_0 = 1000 pN$ $\xi = 40 nm$)

globalement sur un intervalle de 11 pN à 13 pN. Sur ces 18 expériences :

- 33,3% présentent des pics lors du renouement de l'ARN, décalés d'environ $-1 pN$ par rapport au dénouement.
- 50% se sont achevées avant de pouvoir renouer l'ARN. En effet, du fait de la faible raideur des pièges optiques, les billes sortent des pièges pour des forces de l'ordre de 20pN.
- 16,7% ne présentent pas de pics lors du renouement de l'ARN. Dans ce cas, on peut expliquer l'absence de pic de deux manières : soit l'ARN se renoue progressivement, sans accroc, soit il se renoue brutalement mais lorsque la force appliquée sur la construction moléculaire est nulle.

Ces résultats sont comparables à ceux déjà obtenus par d'autres groupes pour de courts fragments d'ARN [69, 68, 70]. On peut essayer d'expliquer ces résultats observés par un modèle simple.

7.3 Analyse des résultats

La construction moléculaire étudiée (schématisée sur la figure 7.5) est composée de :

- deux pièges optiques, distants d'une longueur variable D selon l'axe \vec{u}_x , et de raideur $k_{piège}$ chacun.

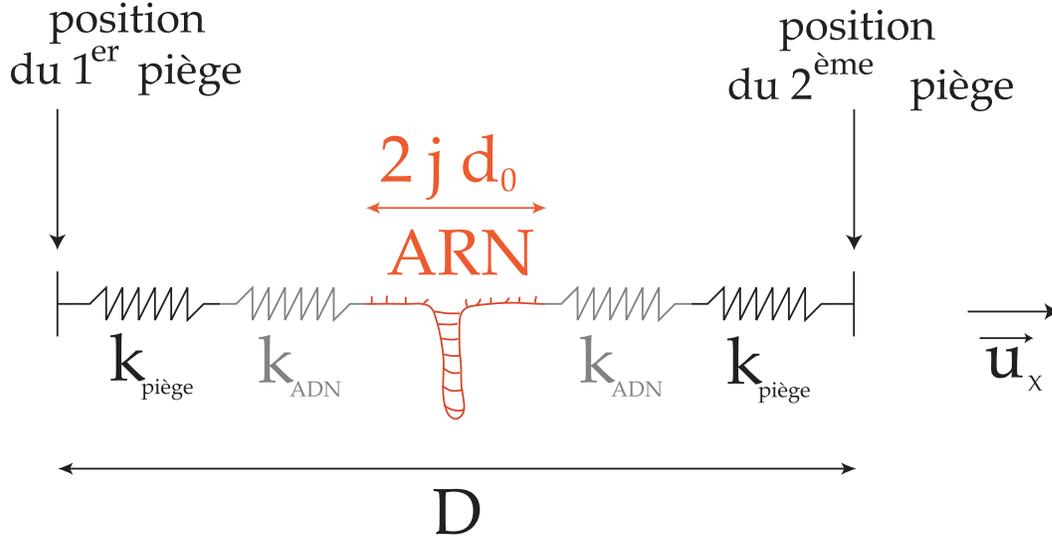


FIGURE 7.5: Schématisation du système étudié : deux pièges optiques (raideur k_{piege}) séparés d'une distance D étirent des doubles hélices d'ADN/ARN (raideur k_{ADN} à un niveau de force F donné) et ouvrent j paires de bases d'un fragment d'ARN de $2j_{\text{max}}$ bases.

- deux bras de double hélice ADN/ARN, de raideur k_{ADN} chacun.
- d'une partie dégrafée de j paires de bases d'ARN. Si la distance entre deux bases d'une molécule simple brin d'ARN, étirée avec une force de 10-15 pN, est notée $d_0 = 0,5 \text{ nm}$ [73, 127, 128, 121], la longueur de l'ARN dégrafé selon l'axe \vec{u}_x est $2jd_0$.
- d'une partie d'ARN encore en pelote de $j_{\text{max}} - j$ paires de bases. L'énergie nécessaire pour séparer une paire de bases G-C d'indice i est notée $E_{\text{ARN}}(i) = E_1$. Pour une paire de bases A-U, $E_{\text{ARN}}(i) = E_2 < E_1$. On néglige les interactions entre paires de bases voisines.

La raideur totale de notre système est alors donnée par :

$$\frac{1}{k_{\text{tot}}} = \frac{2}{k_{\text{ADN}}} + \frac{2}{k_{\text{piege}}} \quad (7.1)$$

Afin de décrire de manière simple le dégrafage de la molécule d'ARN, on fait l'hypothèse que, au voisinage de l'ouverture, notre système élastique global de raideur k_{tot} et de longueur $D - 2jd_0$ se comporte de manière harmonique (on néglige l'énergie élastique des bases d'ARN dégrafées, le fragment d'ARN étant très petit par rapport aux doubles hélices). L'énergie totale de la construction moléculaire étirée est donc la somme de l'énergie fournie pour ouvrir les j premières paires de bases, plus l'énergie élastique du système. Elle est de la forme :

$$E_{\text{tot}}(j) = \sum_{i=1}^j E_{\text{ARN}}(i) + \frac{1}{2} k_{\text{tot}} (D - D_0 - 2jD_0)^2 \quad (7.2)$$

avec D_0 une constante d'origine. Considérons maintenant le cas simple d'une succession de paires G-C suivie à partir de la paire de bases d'indice i_s d'une succession de paires de bases A-U. On a représenté sur la figure 7.6A la valeur de $E_{\text{ARN}}(i)$ en fonction de l'indice i de la paire

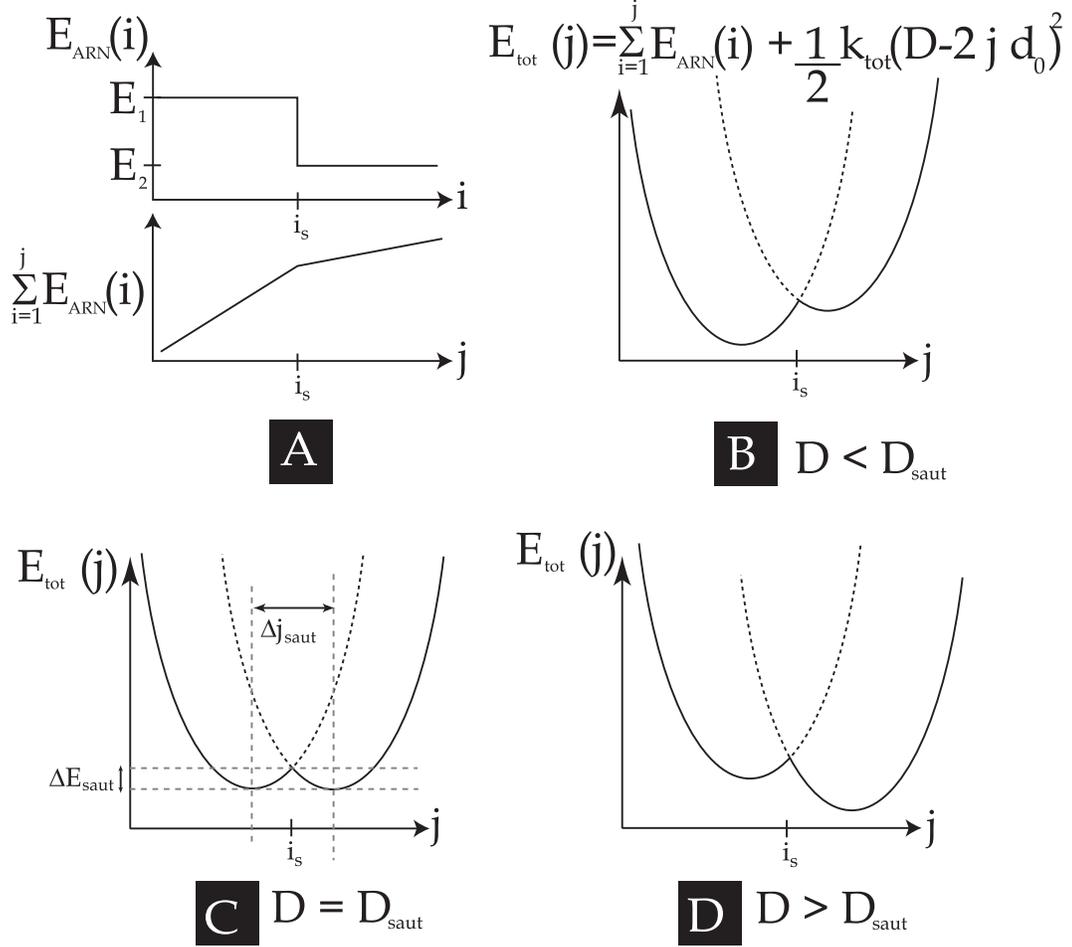


FIGURE 7.6: **A.** Energies d'ouvertures des paires de bases d'indice i , et somme de ces énergies en fonction du nombre de paires de bases ouvertes j . On considère le cas d'une suite de paires G-C suivie à partir de la paire d'indice i_s d'une suite de paires A-U. **B.** Allure de l'énergie totale du système en fonction de j dans les cas $D < D_{\text{saut}}$. **C.** Allure de l'énergie totale du système en fonction de j dans les cas $D = D_{\text{saut}}$. **D.** Allure de l'énergie totale du système en fonction de j dans les cas $D > D_{\text{saut}}$.

de bases, ainsi que de l'énergie totale fournie $\sum_{i=1}^j E_{\text{ARN}}(i)$ pour ouvrir l'ARN jusqu'à la paire de bases j . L'énergie totale E_{tot} est une parabole dont l'équation varie selon que j est supérieur ou inférieur à i_s . On remarque aussi que la différence de niveau entre les minimums de ces deux paraboles dépend de D . Pour $D < D_{\text{saut}}$ la parabole correspondant à $j < i_s$ possède le niveau d'énergie le plus bas, pour $D = D_{\text{saut}}$ les deux paraboles ont le même minimum d'énergie, et pour $D > D_{\text{saut}}$ la parabole correspondant à $j > i_s$ possède le niveau d'énergie le plus bas (voir figure 7.6A,B,C). A partir de $D = D_{\text{saut}}$, la solution $j > i_s$ devient aussi stable que $j < i_s$, et le système peut faire un saut en j de Δj_{saut} à condition de franchir une barrière d'énergie ΔE_{saut} grâce à l'agitation thermique ambiante notamment. On calcul :

$$\Delta j_{\text{saut}} = \frac{E_1 - E_2}{2d_0^2 k_{\text{tot}}} \quad (7.3)$$

$$\Delta E_{saut} = \frac{(E_1 - E_2)^2}{32d_0^2 k_{tot}} \quad (7.4)$$

L'énergie de liaison entre bases est de quelques kT , et correspond au travail d'une force de 10 pN dégrafant sur une distance $2d_0 = 1 \text{ nm}$ ($4 \text{ pN.nm} = kT_{300K}$). Ceci explique pourquoi on observe expérimentalement un signal autour de 10 pN .

Aux alentours de $F = 10 \text{ pN}$, la raideur locale d'une double hélice de longueur 1,87 μm selon le modèle du ver est de $254 \text{ pN.}\mu m^{-1}$. En prenant pour une paire G-C $E_1 = 3,2kT$, pour une paire A-U $E_2 = 1,6kT$, $d_0 = 0,5 \text{ nm}$, et une raideur d'un des pièges de $56 \text{ pN.}\mu m^{-1}$, on obtient $k_{tot} = 25 \text{ pN.}\mu m^{-1}$ et $\Delta j_{saut} = 140$. A l'équilibre, on dégrafe ainsi l'ARN par paquets d'une centaine de paires de bases.

Dans notre cas, le fragment d'ARN de 177 bases (soit environ 88 "paires") est composée d'abord d'une zone riche en paires G-C (4 paires à la suite), suivie de paires A-U, G-C, et surtout de plusieurs boucles "molles" (figure 7.1D). En ordre de grandeur, le petit modèle précédent nous explique donc pourquoi expérimentalement dans notre cas le dégrafage de l'ARN est brutal et s'effectue d'une seule traite. Une description bien plus détaillée de ce modèle se trouve dans les références [127, 128, 121].

7.4 Conclusions et perspectives

Ces mesures de forces sur des systèmes hybrides d'ADN et d'ARN ne sont que préliminaires. D'une part, il serait intéressant de voir l'effet de la protéine L20 sur la construction moléculaire. A plus court terme, il faudrait aussi résoudre certaines limitations de notre montage, à savoir :

- La dérive du piezo-électrique contrôlant la position du piège mobile nous oblige à réaliser des expériences de courtes durées. L'insertion en cours d'un module PID (Proportional Integral Derivative gain) d'asservissement en position du faisceau laser devrait nous permettre de résoudre ce problème.
- La configuration expérimentale du piège optique n'est pas idéale pour des mesures de forces. L'utilisation d'un substrat opaque en silicium pour les mesures de conductance nous avait contraint à utiliser un objectif à eau à grande distance de travail. En utilisant un montage en microscope inversé "plus classique" composé d'un objectif à immersion d'huile à grande ouverture numérique ($\sim 1,3$) en transmission sur des substrats en verre, on augmenterait considérablement la raideur des pièges à puissance laser donnée et on se débarrasserait du problème d'augmentation de température mal contrôlée due au substrat de silicium. En augmentant la raideur des pièges, on diminue la taille des paquets de paires de bases dégrafées et on augmente ainsi la résolution des expériences.
- Le fragment d'ARN étudié est très court. Pour superposer un signal expérimental d'ouverture à sa simulation numérique, il serait plus intéressant d'utiliser un long fragment se dégrafant en plusieurs "paquets" de formes reproductibles, et dont la structure ne débute pas par une région riche en paires G-C.

Chapitre 8

Conclusion

Nous avons construit un montage de double pince optique, nous permettant de pratiquer des micromanipulations à l'échelle de la molécule unique sur des surfaces opaques, et de mesurer des forces jusqu'à une vingtaine de piconewtons. Ce montage a été caractérisé et calibré de plusieurs manières cohérentes entre elles. Il a été utilisé pour déposer des molécules d'ADN à un endroit précis de surfaces de silicium, à savoir sur des électrodes de mesures.

Nous avons ainsi pu mener des mesures de la conductance de molécules d'ADN ; cette molécule est étudiée pour son rôle en électronique moléculaire. Nos mesures ont été réalisées sur des molécules d'ADN de synthèse. Nous avons développé un protocole de synthèse, par une étape de PCR et une étape de couplage, de molécules d'ADN de 10 kbp porteuses de groupes disulfide répartis le long de la chaîne. L'affinité de ces molécules avec des surfaces d'or a été démontrée par une expérience avec des nanoparticules d'or et par une expérience de fluorescence. La liaison de ces molécules a été expérimentalement observée sur des électrodes en or. Les mesures ont été effectuées :

- entre des électrodes en or distantes, de 70 nm, fabriquées par lithographie électronique sur des substrats de silicium.
- sur des molécules peu étirées (extension nettement inférieure à la longueur cristallographique).
- en solution dans des tampons avec ou sans ions Mg^{2+} , ou à sec.
- en détection synchrone, à des fréquences entre 0,01 Hz et 0,1 Hz, et à des tensions inférieures à la centaine de millivolt. Ce mode de mesure nous a permis de mesurer des courants faibles jusqu'à quelques femtoampères, et de minimiser la conduction du tampon.
- à température ambiante.

Dans ces conditions nous n'avons observé aucun courant dû à la présence de la molécule. Nous en avons conclu que, pour la résistance des brins d'ADN de 70 nm de long, il existe une borne inférieure de $10^{11} \Omega$ en solution, et de $10^{13} \Omega$ à sec. Ce comportement isolant, valable dans notre configuration expérimentale, peut s'expliquer par la distance entre nos électrodes (supérieure à celle utilisée pour les expériences en molécule unique qui concluent à un comportement conducteur de l'ADN (environ 1 nm pour [56] et 20 nm pour [55])), par le manque de maîtrise des contacts entre l'ADN et les électrodes, ou encore par une éventuelle interaction entre la molé-

cule d'ADN et la surface isolante inter-électrodes qui annihilerait les propriétés de transport de charges de la molécule. Il serait donc intéressant de poursuivre ces mesures sur des distances plus courtes, avec des dépôts de molécule unique de brins d'ADN polydG-dC ou de polymères conducteurs, en insistant sur le traitement chimique de la surface et sur l'état de la molécule d'ADN (existence de nicks, mesures de l'épaisseur de la molécule déposée).

Par ailleurs, lors de la caractérisation du montage de double pince optique, nous avons démontré une importante élévation de la température due à l'absorption du laser par le substrat de silicium. Cet effet doit être pris en compte lors du calibrage du piège. De plus, notre dispositif expérimental étant prévu pour fonctionner sur des surfaces opaques, nous n'avons pu utiliser d'objectif à très courte distance de travail fonctionnant par transmission, limitant ainsi notre ouverture numérique, et donc les raideurs de nos pièges.

Malgré ces deux constatations, nous avons entrepris des mesures de forces sur un système d'intérêt biologique : le dégrafage d'un fragment de l'ARN ribosomique 23S de la bactérie *Escherichia Coli* possédant un site d'affinité avec la protéine L20. Cette étude préliminaire nous a permis d'arriver à quelques conclusions en accord avec d'autres expériences du même type [69, 68, 70], à savoir :

- le dégrafage du fragment d'ARN a lieu vers une dizaine ou une quinzaine de piconewtons.
- il existe un hysteresis entre le dégrafage et le réenroulement du fragment d'ARN, de l'ordre du piconewton.
- la structure secondaire du fragment d'ARN se dégrafe par paquets, de l'ordre d'une centaine de paires de bases.

Ces constatations ont été expliquées par une description théorique simple du dégrafage d'une structure secondaire.

Il serait dorénavant intéressant d'étudier l'effet de la protéine sur la structure de ce fragment d'ARN. L'utilisation d'une configuration en microscope inversé, avec des pièges de plus grandes raideurs, ainsi que l'utilisation de fragments d'ARN plus longs de plusieurs centaines de paires de bases, seraient cependant plus indiquées pour des études futures.

Bibliographie

- [1] A. Ashkin, "Forces of a single beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime," in *Laser Tweezers in Cell Biology*, M. P. Sheetz, ed., *Methods in Cell Biology* **55**, pp. 1–27, 1998.
- [2] S. Gottesman, "The small rna regulators of escherichia coli : roles and mechanisms," *Annual Review of Microbiology* **58**, pp. 303–328, 2004.
- [3] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, and M. M. Cox, *Principles of biochemistry (2nd edition)*, Worth Publishers, New York, 1993.
- [4] K. B. Mullis and F. Faloona, "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction," *Methods Enzymol.* **155**, pp. 335–350, 1987.
- [5] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim, "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia," *Science* **230**, pp. 1350–1354, 1985.
- [6] G. Moore, "Progress in digital integrated electronics," *Proceedings of IEEE Digital Integrated Electronic Device Meeting*, pp. 11–13, 1975.
- [7] H. Ohnishi, Y. Kondo, and K. Takayanagi, "Quantized conductance through individual rows of suspended gold atoms," *Nature* **395**, pp. 780–783, 1998.
- [8] L. M. Demers, D. S. Ginger, S. J. Park, Z. Li, S. W. Chung, and C. A. Mirkin, "Direct patterning of modified oligonucleotides on metals and insulators by dip-pen nanolithography," *Science* **296**, pp. 1836–1838, 2002.
- [9] A. Packan, "Pushing the limits," *Science* **285**, p. 2079, 1999.
- [10] A. Aviram and P. Seiden, "U.S. patent *n*^o 258.639," june 1972.
- [11] J. R. Heath and M. A. Ratner, "Molecular electronics," *Physics Today* **May**, pp. 43–49, 2003.
- [12] C. Joachim, J. K. Gimzewski, and A. Aviram, "Electronics using hybrid-molecular and mono-molecular devices," *Nature* **408**, pp. 541–548, 2000.
- [13] A. Aviram and M. Ratner, "Molecular rectifiers," *Chem. Phys. Lett.* **29**, pp. 277–283, 1974.
- [14] D. Eigler and E. K. Schweizer, "Positioning single atoms with a scanning tunnelling microscope," *Nature* **344**, pp. 524–526, 1990.
- [15] C. Joachim, J. K. Gimzewski, R. R. Schlittler, and C. Chavy, "Electronic transparency of a single *c*₆₀ molecule," *Phys. Rev. Lett.* **74**, pp. 2102–2105, 1995.
- [16] F. Moresco, G. Meyer, and K. H. Reider, "Conformational changes of single molecules induced by scanning tunneling microscopy manipulation : A route to molecular switching," *Phys. Rev. Lett.* **86**, pp. 672–, 2001.
- [17] C. Joachim and J. K. Gimzewski, "An electromechanical amplifier using a single molecule," *Chem. Phys. Lett.* **265**, pp. 353–357, 1997.
- [18] P. G. Collins, M. S. Arnold, and P. Avouris*, "Engineering carbon nanotubes and nanotube circuits using electrical breakdown," *science* **292**, pp. 706–709, 2001.

- [19] A. Bachtold, P. Hadley, T. Nakanishi, and C. Dekker, "Logic circuits with carbon nanotube transistors," *Science* **294**, pp. 1317–1320, 2001.
- [20] K. Keren, M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan, and E. Braun, "Sequence-specific molecular lithography on single DNA molecules," *Science* **297**, pp. 72–75, 2002.
- [21] D. D. Eley and D. I. Spivey, "Semiconductivity of organic substances. part 9. \ddot{O} nucleic acid in the dry state," *Transactions of the Faraday Society* **58**, pp. 411–415, 1962.
- [22] R. G. Endres, D. L. Cox, and R. R. P. Singh, "Colloquium : The quest for high-conductance DNA," *Reviews of modern physics* **76**, pp. 195–214, 2004.
- [23] M. Ratner, "Electronic motion in DNA," *Nature* **397**, pp. 480–481, 1999.
- [24] C. Dekker and M. A. Ratner, "Electronic properties of DNA," *Physics world* **August**, pp. 29–33, 2001.
- [25] M. Bixon, B. Giese, S. Wessely, T. Lagenbacher, M. E. Michel-Beyerle, and J. Jortner, "Long-range charge hopping in DNA," *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, pp. 11713–11716, 1999.
- [26] B. Giese, "Long-range charge transport in DNA : the hopping mechanism," *American Chemical Society* **33**, pp. 631–636, 2000.
- [27] E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, and G. Ben-Yoseph, "DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire," *Nature* **391**, pp. 775–778, 1998.
- [28] A. J. Storm, J. van Noort, S. de Vries, and C. Dekker, "Insulating behavior for DNA molecules between nanoelectrodes at the 100nm length scale," *Applied Physics Letters* **79**, pp. 3881–3883, 2001.
- [29] P. J. de Pablo, F. Moreno-Herrero, J. Colchero, J. Gomez-Herrero, A. M. Baro, P. Ordejon, J. M. Soler, and E. Artacho, "Absence of dc-conductivity in λ -DNA," *Physical Review Letters* **85**, pp. 4992–4995, 2000.
- [30] A. Gil, P. J. de Pablo, J. Colchero, J. Gomez-Herrero, and A. M. Baro, "Electrostatic scanning force microscopy images of long molecules : single-walled carbon nanotubes and DNA," *Nanotechnology* **13**, pp. 309–313, 2002.
- [31] C. Gomez-Navarro, F. Moreno-Herrero, P. J. de Pablo, J. Colchero, J. Gomez-Herrero, and A. M. Baro, "Contactless experiments on individual DNA molecules show no evidence for molecular wire behavior," *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, pp. 8484–8487, 2002.
- [32] Y. Zhang, R. H. Austin, J. Kraeft, E. C. Cox, and N. P. Ong, "Insulating behavior of λ -DNA on the micro scale," *Physical Review Letters* **89**, pp. 198102–1, 2002.
- [33] M. Bockrath, N. Markovic, A. Shepard, and M. Tinkham, "Scanned conductance microscopy of carbon nanotubes and λ -DNA," *Nano letters* **2**, pp. 187–190, 2002.
- [34] C. H. Lei, A. Das, M. Elliot, and J. E. Macdonald, "Conductivity of macromolecular networks measured by electrostatic force microscopy," *Applied Physics Letters* **83**, pp. 482–484, 2003.
- [35] H. Watanabe, C. Manabe, T. Shigematsu, K. Shimotani, and M. Shimizu, "Single molecule DNA device measured with triple-probe atomic force microscope," *Applied Physics Letters* **79**, pp. 2462–2464, 2001.

- [36] D. Porath, A. Bezryadin, S. de Vries, and C. Dekker, "Direct measurement of electrical transport through DNA molecules," *Nature* **403**, pp. 635–638, 2000.
- [37] L. Cai, H. Tabata, and T. Kawai, "Probing electrical properties of oriented DNA by conducting atomic force microscopy," *Nanotechnology* **12**, pp. 211–216, 2001.
- [38] A. Rakitin, P. Aich, C. Papadopoulos, Y. Kobzar, A. S. Vedenev, J. S. Lee, and J. M. Xu, "Metallic conduction through engineered DNA : DNA nanoelectronic building blocks," *Physical Review Letters* **86**, pp. 3670–3673, 2001.
- [39] T. Heim, D. Deresmes, and D. Vuillaume, "Charge transport in λ -DNA probed by conducting-AFM, and relationship with its structure," <http://hal.ccsd.cnrs.fr/docs/00/00/07/03/PDF/DNA-CAFm-letter.pdf>, pp. 1–5, 2004.
- [40] T. Heim, D. Deresmes, and D. Vuillaume, "Conductivity of DNA probed by conducting-atomic force microscopy : Effects of contact electrode, DNA structure, and surface interactions," *Journal of Applied Physics* **96**, pp. 2927–2936, 2004.
- [41] T. Heim, T. Melin, D. Deresmes, and D. Vuillaum, "Localization and delocalization of charges injected in DNA," *Applied Physics Letters* **85**, pp. 2637–2639, 2004.
- [42] L. Cai, H. Tabata, and T. Kawai, "Self-assembled DNA networks and their electrical conductivity," *Applied Physics Letters* **77**, pp. 3105–3106, 2000.
- [43] J. Gu, S. Tanaka, Y. Otsuka, H. Tabata, and T. Kawai, "Self-assembled dye-dna network and its photoinduced electrical conductivity," *Applied Physics Letters* **80**, pp. 688–690, 2002.
- [44] H. Y. Lee, H. Tanaka, Y. Otsuka, K. H. Yoo, J. O. Lee, and T. Kawai, "Control of electrical conduction in DNA using oxygen hole doping," *Applied Physics Letters* **80**, pp. 1670–1672, 2002.
- [45] Y. Otsuka, H. Y. Lee, J. H. Gu, J. O. Lee, K. H. Yoo, H. Tanaka, H. Tabata, and T. Kawai, "Influence of humidity on the electrical conductivity of synthesized DNA film on nanogap electrodes," *Japanese Journal of Applied Physics* **41**, pp. 891–894, 2002.
- [46] J. Gu, L. Cai, S. Tanaka, Y. Otsuka, and H. Tabata, "Electric conductivity of dye modified dna films with and without light irradiation in various humidities," *Journal of Applied Physics* **92**, pp. 2816–2820, 2002.
- [47] D. H. Ha, H. Nham, K. H. Yoo, H. So, H. Y. Lee, and T. Kawai, "Humidity effects on the conductance of the assembly of DNA molecules," *Chemical Physics Letters* **355**, pp. 405–409, 2002.
- [48] B. Hartzell, B. McCord, D. Asare, H. Chen, J. J. Heremans, and V. Soghomonian, "Comparative current-voltage characteristics of nicked and repaired λ -DNA," *Applied Physics Letters* **82**, pp. 4800–4802, 2003.
- [49] B. Hartzell, B. McCord, D. Asare, H. Chen, J. J. Heremans, and V. Soghomonian, "Current-voltage characteristics of diversely disulfide terminated λ -deoxyribonucleic acid molecules," *Journal of Applied Physics* **94**, pp. 2764–2766, 2003.
- [50] P. Tran, B. Alavi, and G. Gruner, "Charge transport along the λ -DNA double helix," *Physical Review Letters* **85**, pp. 1564–1567, 2000.
- [51] H. W. Fink and C. Schonenberger, "Electrical conduction through DNA molecules," *Nature* **398**, pp. 407–410, 1999.

- [52] A. Y. Kasumov, M. Kociak, S. Guéron, B. Reulet, V. T. Volkov, D. V. Klinov, and H. Bouchiat, "Proximity-induced superconductivity in DNA," *Science* **291**, pp. 280–282, 2001.
- [53] A. Y. Kasumov, D. V. Klinov, P. E. Roche, S. Guéron, and H. Bouchiat, "Thickness and low-temperature conductivity of DNA molecules," *Applied Physics Letters* **84**, pp. 1007–1009, 2004.
- [54] J. S. Hwang, K. J. Kong, D. Ahn, G. S. Lee, D. J. Ahn, and S. W. Hwang, "Electrical transport through 60 base pairs of poly(dG)-poly(dC) DNA molecules," *Applied Physics Letters* **81**, pp. 1134–1136, 2002.
- [55] K. H. Yoo, D. H. Ha, J. O. Lee, J. W. Park, J. Kim, J. J. Kim, H. Y. Lee, T. Kawai, and H. Y. Choi, "Electrical conduction through poly(dA)-poly(dT) and poly(dG)-poly(dC) DNA molecules," *Physical Review Letters* **87**, pp. 198102–1, 2001.
- [56] B. Xu, P. Zhang, X. Li, and N. Tao, "Direct conductance measurement of single DNA molecules in aqueous solution," *Nano Letters* **4**, pp. 1105–1108, 2004.
- [57] E. Braun and K. Keren, "From DNA to transistors," *Advances in Physics* **53**, pp. 441–496, 2004.
- [58] J. Richter, M. Mertig, W. Pompe, I. Monch, and H. K. Schackert, "Construction of highly conductive nanowires on a DNA template," *Applied Physics Letters* **78**, pp. 536–538, 2001.
- [59] J. Richter, M. Mertig, W. Pompe, and H. Vinzelberg, "Low-temperature resistance of DNA-templated nanowires," *Applied Physics A* **74**, pp. 725–728, 2002.
- [60] R. G. Endres, D. L. Cox, and R. R. P. Singh, "Electronic properties of DNA : structural and chemical influence on the quest for high conductance and charge transfer," *e-print cond-mat* **0201404**, 2002.
- [61] E. M. Boon and J. Barton, "Charge transport in DNA," *Current Opinion in Structural Biology* **12**, pp. 320–329, 2002.
- [62] S. Delaney and J. K. Barton, "Long-range DNA charge transport," *Journal of Organic Chemistry* **68**, pp. 6475–6483, 2003.
- [63] B. Giese, J. Amaudrut, A. K. Kohler, M. Sormann, and S. Wessely, "Direct observation of hole transfert through DNA by hopping between adenine bases and tunneling," *Nature* **412**, pp. 318–320, 2001.
- [64] E. M. Boon, D. M. Ceres, T. G. Drummond, M. G. Hill, and J. K. Barton, "Mutation detection by electrocatalysis at DNA-modified electrodes," *Nature Biotechnology* **18**, pp. 1096–1100, 2000.
- [65] S. O. Kelley and J. K. Barton, "Electron transfert between bases in double helical DNA," *Science* **283**, pp. 375–381, 1999.
- [66] C. Wan, T. Fiebig, S. O. Kelley, C. R. Treadway, J. K. Barton, and A. H. Zewail, "Femtosecond dynamics of DNA-mediated electron transfer," *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, pp. 6014–6019, 1999.
- [67] F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, and M. R. Wasielewski, "Distance-dependent electron transfer in DNA hairpins," *Science* **277**, pp. 673–676, 1997.
- [68] S. Harlepp, T. Marchal, J. Robert, J. F. Leger, A. Xayaphoummine, H. Isambert, and D. Chatenay, "Probing complex RNA structures by mechanical force," *The European Physical Journal E* **12**, pp. 605–615, 2003.

- [69] J. Liphardt, B. Onoa, S. B. Smith, I. Tinoco, and C. Bustamante, "Reversible unfolding of single RNA molecules by mechanical force," *Science* **292**, pp. 733–737, 2001.
- [70] B. Onoa, S. Dumont, J. Liphardt, S. B. Smith, I. Tinoco, and C. Bustamante, "Identifying kinetic barriers to mechanical unfolding of the *t. thermophila* ribozyme," *Science* **299**, pp. 1892–1895, 2003.
- [71] Z. Bryant, M. D. Stone, J. Gore, S. B. Smith, N. R. Cozzarelli, and C. Bustamante, "Structural transitions and elasticity from torque measurements on DNA," *Nature* **424**, pp. 338–341, 2003.
- [72] E. Evans, A. Leung, D. Hammer, and S. Simon, "Chemically distinct transition states govern rapid dissociation of single L-selectin bonds under force," *PNAS* **98**, pp. 3784–3789, 2001.
- [73] B. Essevaz-Roulet, U. Bockelmann, and F. Heslot, "Mechanical separation of the complementary strands of DNA," *PNAS* **94**, pp. 11935–11940, 1997.
- [74] A. F. Oberhauser, P. E. Marszalek, H. P. Erickson, and J. M. Fernandez, "The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin," *Nature* **393**, pp. 181–185, 1998.
- [75] E. L. Florin, V. T. Moy, and H. E. Gaub, "Adhesion force between individual ligand-receptor pairs," *Science* **264**, pp. 415–417, 1994.
- [76] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J. L. Viovy, D. Chatenay, and F. Caron, "DNA : An extensible molecule," *Science* **271**, pp. 792–794, 1996.
- [77] J. F. Leger, J. Robert, L. Bourdieu, D. Chatenay, and J. F. Marko, "RecA binding to a single double-stranded DNA molecule : A possible role of DNA conformational fluctuations," *PNAS* **95**, pp. 12295–12299, 1998.
- [78] T. R. Strick, J. F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette, "The elasticity of a single supercoiled DNA molecule," *Science* **271**, pp. 1835–1837, 1996.
- [79] M. J. Lang, C. L. Asbury, J. W. Shaevitz, and S. Block, "An automated two-dimensional optical force clamp for single molecule studies," *Biophys. J.* **83**, pp. 491–501, 2002.
- [80] A. Ashkin, "Acceleration and trapping of particules by radiation pressure," *Phys. Rev. Lett.* **24**, pp. 156–159, 1970.
- [81] K. Svoboda and S. M. Block, "Biological applications of optical forces," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, pp. 247–285, 1994.
- [82] A. Ashkin, "Trapping of atoms by resonance radiation pressure," *Physical Review Letters* **40**, pp. 729–732, 1978.
- [83] S. Chu, "Laser manipulation of atoms and particles," *Science* **253**, pp. 861–866, 1991.
- [84] S. Chu, "Laser trapping of neutral particles," *Scientific American* **266** ;2, pp. 49–54, 1992.
- [85] J. E. Curtis and J. P. Spatz, "Getting a grip : Hyaluronan-mediated cellular adhesion," *Proceedings of SPIE* **5514**, p. 455, 2004.
- [86] M. Reicherter, T. Haist, E. U. Wagemann, and H. J. Tiziani, "Optical particle trapping with computer-generated holograms written on a liquid-crystal display," *Optics Letters* **24**, pp. 608–610, 1999.
- [87] D. G. Grier, "A revolution in optical manipulation," *Nature* **424**, pp. 810–816, 2003.
- [88] G. Sinclair, P. Jordan, J. Leach, M. J. Padgett, and J. Cooper, "Defining the trapping limits of holographical optical tweezers," *Journal of Modern Optics* **51**, pp. 409–414, 2004.

- [89] E. R. Dufresne and D. G. Grier, "Optical tweezer arrays and optical substrates created with diffractive optics," *Review of Scientific Instruments* **69**, pp. 1974–1976, 1998.
- [90] E. R. Dufresne, G. C. Spalding, M. T. Dearing, S. A. Sheets, and D. G. Grier, "Computer-generated holographic optical tweezer arrays," *Review of Scientific Instruments* **72**, pp. 1810–1816, 2001.
- [91] V. R. Daria, R. L. Eriksen, and J. Gluckstad, "Dynamic optical manipulation of colloidal systems using a spatial light modulator," *Journal of Modern Optics* **50**, pp. 1601–1614, 2003.
- [92] C. Mio, T. Gong, A. Terray, and D. W. M. Marr, "Design of a scanning laser optical trap for multiparticle manipulation," *Review of scientific instruments* **71**, pp. 2196–2190, 2000.
- [93] K. Sasaki, M. Koshioka, H. Misawa, N. Kitamura, and H. Masuhara, "Laser-scanning micro-manipulation and spatial patterning of fine particles," *Japanese Journal of Applied physics* **30**, pp. L907–L909, 1991.
- [94] E. Fallman and O. Axner, "Design for fully steerable dual-trap optical tweezers," *Applied Optics* **36**, pp. 2107–2113, 1997.
- [95] Y. Ogura, K. Kagawa, and J. Tanida, "Optical manipulation of microscopic objects by means of vertical-cavity surface-emitting laser array sources," *Applied Optics* **40**, pp. 5430–5435, 2001.
- [96] K. C. Neuman and S. M. Block, "Optical trapping," *Review of scientific instruments* **75**, pp. 2787–2809, 2004.
- [97] K. Berg-Sorensen, L. Oddershede, E. L. Florin, and H. Flyvbjerg, "Unintended filtering in a typical photodiode detection system for optical tweezers," *Journal of Applied Physics* **93**, pp. 3167–3176, 2003.
- [98] K. Berg-Sorensen and H. Flyvbjerg, "Power spectrum analysis for optical tweezers," *Review of Scientific Instruments* **75**, pp. 594–612, 2004.
- [99] E. J. G. Peterman, F. Gittes, and C. F. Schmidt, "Laser-induced heating in optical traps," *Biophysical Journal* **84**, pp. 1308–1316, 2003.
- [100] M. D. Wang, M. J. Schnitzer, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block, "Force and velocity measured for single molecules of rna polymerase," *Science* **282**, pp. 902–905, 1998.
- [101] A. Schonle and S. W. Hell, "Heating by absorption in the focus of an objective lens," *Optics Letters* **23**, pp. 325–327, 1998.
- [102] P. Jakl, M. Sery, J. Jezek, A. Jonas, M. Liska, and P. Zemanek, "Behavior of an optically trapped probe approaching a dielectric interface," *Journal of Modern Optics* **50**, pp. 1615–1625, 2003.
- [103] A. Jonas, P. Zemanek, and E. L. Florin, "Single-beam trapping in front of reflective surfaces," *Optics Letters* **26**, pp. 1466–1468, 2001.
- [104] P. Jakl, M. Sery, J. Jezek, and P. Zemanek, "How the size of a particle approaching dielectric interface influences its behavior," *Proceedings of SPIE* **5514**, pp. 636–642, 2004.
- [105] X. D. Cui, A. Primak, X. Zarate, J. Tomfohr, O. F. Sankey, A. L. Moore, T. A. Moore, D. Gust, G. Harris, and S. M. Lindsay, "Reproducible measurement of single-molecule conductivity," *science* **294**, pp. 571–574, 2001.

- [106] H. Basch and M. A. Ratner, "Molecular binding at gold transport interfaces. iv. thiol chemisorption," *Journal of chemical physics* **120**, pp. 5771–5780, 2004.
- [107] G. M. Whitesides and P. E. Laibinis, "Wet chemical approaches to the characterization of organic surfaces : self assembled monolayers, wetting, and the physical-organic chemistry of the solid-liquid interface," *Langmuir* **6**, pp. 87–96, 1990.
- [108] J. B. Schlenoff, M. Li, and H. Ly, "Stability and self-exchange in alkanethiol monolayers," *Journal of American Chemical Society* **117**, pp. 12528–12536, 1995.
- [109] H. O. Finklea, *Encyclopedia of analytical chemistry : Self-assembled monolayers on electrodes*, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 2000.
- [110] C. D. Bain, E. B. Troughton, Y. T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, and R. G. Nuzzo, "Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold," *Journal of American Chemical Society* **111**, pp. 321–335, 1989.
- [111] T. M. Herne and M. J. Tarlov, "Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces," *Journal of American Chemical Society* **119**, pp. 8916–8920, 1997.
- [112] A. H. Dent, *The Immunoassay Handbook : conjugation methods*, David Wild, New York, 2001.
- [113] E. Y. Katz, "A chemically modified electrode capable of a spontaneous immobilization of amino compounds due to its functionalization with succinimidyl groups," *J. Electroanal. Chem.* **291**, pp. 257–260, 1990.
- [114] R. G. Nuzzo, F. A. Fusco, and D. L. Allara, "Spontaneous organized molecular assemblies. 3. preparation and properties of solution of absorbed monolayers of organic disulfides on gold surfaces.," *Journal of American Chemical Society* **109**, pp. 2358–2368, 1987.
- [115] C. S. Weisbecker, M. V. Merritt, and G. W. Whitesides, "Molecular self-assembly of aliphatic thiols on gold colloids," *Langmuir* **12**, pp. 3763–3772, 1996.
- [116] C. A. Mirkin, "Programming the assembly of two- and three-dimensional architectures with DNA and nanoscale inorganic building blocks," *Inorg. Chem.* **39**, pp. 2258–2272, 2000.
- [117] R. Elghanian, J. M. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, and C. A. Mirkin, "Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles," *Science* **277**, pp. 1078–1081, 1997.
- [118] R. C. Mucic, J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, and R. L. Letsinger, "DNA-directed synthesis of binary nanoparticle network materials," *J. Am. Chem. Soc.* **120**, pp. 12674–12675, 1998.
- [119] J. J. Storhoff, A. A. Lazarides, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, and G. C. Schatz, "What controls the optical properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies?," *J. Am. Chem. Soc.* **122**, pp. 4640–4650, 2000.
- [120] B. Akerman and E. Tuite, "Single- and double-strand photocleavage of DNA by YO, YOYO and TOTO," *Nucleic Acids Research* **24**, pp. 1080–1090, 1996.
- [121] U. Bockelmann, P. Thomen, B. Essevaz-Roulet, V. Viasnoff, and F. Heslot, "Unzipping DNA with optical tweezers : high sequence sensitivity and force flips," *Biophysical Journal* **82**, pp. 1537–1553, 2002.
- [122] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block, "Stretching DNA with optical tweezers," *Biophysical Journal* **72**, pp. 1335–1346, 1997.

- [123] C. Baumann, S. Smith, V. Bloofield, and C. Bustamante, "Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules," *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, pp. 6185–6190, 1997.
- [124] P. Cluzel, *L'ADN une molécule extensible*, Thèse de l'université Pierre et Marie Curie, Paris, 1996.
- [125] J. F. Allemand, *Micro manipulations de molécules d'ADN isolées*, Thèse de l'université Pierre et Marie Curie, Paris, 1997.
- [126] M. Zucker, "<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/form1-2.3.cgi>," *Department of Mathematical Sciences, Rensselaer Polytechnic Institute*, pp. –.
- [127] U. Bockelmann, B. Essevaz-Roulet, and F. Heslot, "Molecular stick-slip motion revealed by opening DNA with piconewton forces," *Physical Review Letters* **79**, pp. 4489–4492, 1997.
- [128] U. Bockelmann, B. Essevaz-Roulet, and F. Heslot, "DNA strand separation studied by single molecule force measurements," *Physical Review E* **58**, pp. 2386–2394, 1998.

Résumé :

Nous présentons dans ce manuscrit la réalisation et la caractérisation d'une double pince optique, nous permettant de pratiquer des micromanipulations à l'échelle de la molécule unique sur des surfaces opaques, et de mesurer des forces jusqu'à une vingtaine de piconewtons.

Ce montage est d'abord utilisé pour déposer sur des électrodes de mesures des molécules uniques d'ADN, afin d'en explorer les propriétés de transport de charges (propriétés d'intérêts technologiques dans le cadre de l'électronique moléculaire). Nous n'avons observé aucun courant dû à la présence de la molécule. Nous concluons pour la résistance des brins d'ADN de 70 nm de long à une borne inférieure de $10^{11} \Omega$ en solution, et de $10^{13} \Omega$ à sec.

Nous présentons de plus des mesures de forces sur un système d'intérêt biologique : le dégrafage d'un fragment de l'ARN ribosomique 23S de la bactérie *Escherichia Coli*. Cette étude préliminaire nous a permis d'arriver à des conclusions en accord avec d'autres expériences du même type.

Mots clés : *biophysique, molécule unique, piège optique, ADN, micro-manipulation, conductance, électronique moléculaire, nanotechnologie, ARN, dégrafage, mesures de forces.*

Abstract :

We present in this script the building and the characterization of a double optical trap setup that enables single molecule manipulations over an opaque substrate, and force measurements up to 20 piconewtons.

This setup is first used to deposit a single DNA molecule on electrodes, and to explore its charge transport properties. The interest of such a work is molecular electronics. We observe no current due to the presence of the molecule. We conclude that there is a lower bound for the resistance of a 70 nm long DNA molecule equal to $10^{11} \Omega$ (in buffer conditions) or $10^{13} \Omega$ (in dry conditions).

We also present force measurements on a molecular system of biological interest : the unzipping of a short sequence of 23S rRNA from *Escherichia Coli*. This preliminary work gives results that are in good agreement with previous experiments from other teams.

Key words : *biophysics, single molecule, optical trap, DNA, micro-handling, conductivity, molecular electronics, nanotechnology, RNA, unzipping, force measurements.*