

UNIVERSITÉ DE LILLE 1 - USTL

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Sciences de la Matière

présentée par :

Carine Douarche

Étude de l'adsorption de l'ADN
simple brin et double brin
aux interfaces

Sous la direction de Rabah Boukherroub
et Jean-Louis Sikorav

soutenue le 12 mars 2007 devant le jury composé de :

M. Didier Chatenay	Président
M. Loïc Auvray	Rapporteur
M. Bruno Fabre	Rapporteur
M. Thierry Charitat	Examineur
M. Philippe Allongue	Examineur
M. Rabah Boukherroub	Directeur de thèse
M. Jean-Louis Sikorav	Directeur de thèse

numéro d'ordre : 3970

Remerciements

Les personnes qui m'ont aidée et soutenue pendant cette thèse ont été nombreuses. Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude à l'égard des membres de mon jury clément qui m'a accordé le titre de docteur : je souhaite remercier Didier Chatenay qui a présidé le jury, les rapporteurs Loïc Auvray et Bruno Fabre ainsi que Philippe Allongue et Thierry Charitat pour l'examen approfondi de mon travail et mes deux directeurs de thèse Jean-Louis Sikorav et Rabah Boukherroub.

Cette thèse a été faite en collaboration entre le Laboratoire de Biophysique de l'ADN (CEA de Saclay) sous la direction de Jean-Louis Sikorav et l'Interdisciplinary Research Institute (IRI) sous la direction de Rabah Boukherroub. Au tout début de ma thèse, l'IRI venait à peine d'être fondé et les nouvelles équipes de recherche étaient en pleine installation dans les locaux de l'IEMN. Afin de commencer les expériences dans de bonnes conditions, Rabah a alors eu la bienveillance de me confier au groupe d'électrochimie du Laboratoire de Physique de la Matière Condensée (PMC) de l'École Polytechnique pour démarrer le travail sur la fonctionnalisation des surfaces de silicium. Je tiens particulièrement à remercier Rabah à cet égard, d'autant qu'il m'a permis par la suite de continuer à travailler à PMC.

J'ai alors été immédiatement intégrée dans le groupe d'électrochimie grâce à Philippe Allongue qui a toujours tout mis en oeuvre pour que je puisse travailler dans de bonnes conditions au laboratoire, je lui en suis très reconnaissante.

Je tiens également à remercier François Ozanam qui a joué un rôle important dans le déroulement de ma thèse. Toujours disponible, j'ai eu la chance de pouvoir souvent interagir scientifiquement avec François. Les nombreuses discussions que nous avons eues ainsi que sa relecture minutieuse du manuscrit ont été extrêmement enrichissantes. Je tiens également à lui exprimer toute ma gratitude pour son soutien et ses encouragements en tant que directeur du laboratoire.

Le travail d'élaboration des surfaces a donc été effectué à PMC. J'ai alors appris à fonctionnaliser les surfaces de silicium sur les conseils de Catherine Henry de Villeneuve, toujours disponible et jamais avare d'explications. Je tiens également à remercier Fouad Maroun qui s'est toujours montré très disponible et très présent. Fouad étant en charge du spectro Brückner, nous avons fait ensemble toutes mes premières mesures infrarouges de monocouches greffées, j'ai alors appris énormément à ses côtés. À PMC, j'ai également eu la chance de me trouver dans un environnement de microscopistes qui m'ont fait découvrir le monde à l'échelle de

l'ångström : ainsi, sur les conseils rigoureux et précieux de Philippe et Catherine, j'ai appris la microscopie à force atomique.

Je tiens également à remercier Anne-Chantal Gouget-Laemmel, Anne Moraillon et Jean-Noël Chazalviel qui ont toujours été de très bons conseils.

Je remercie tous les membres du laboratoire PMC qui font du labo un lieu de vie hors du commun. Également un grand merci aux "Dames" Anne-Marie, Anne-Marie, Eve et Annie et à Patrice qui sont toujours là pour assurer, merci à Dominique et Bernard pour m'avoir aidée à concevoir les cellules des mesures de réflectivité, merci à Julien et Denis de m'avoir souvent réconciliée avec mon PC.

Je tiens également à remercier les chimistes de l'aile 4 chez lesquels j'ai trouvé refuge moult fois pour répondre à mes soucis en chimie organique.

Merci à Georges Lampel qui m'a très aimablement accueillie dans le bureau pendant ces quelques années.

Merci à tous les étudiants qui mettent une ambiance formidable au laboratoire. Merci à Greg et Patricia d'avoir été là pour partager tous ces moments avec moi. Un grand merci à Caro qui a toujours été là pour me soutenir, corriger les photos d'orthographe et pour papoter, dans le bureau ou à Connelles et j'espère bientôt à Marseille!

Une grande partie de ma thèse a également été effectuée dans le Laboratoire de Biophysique de l'ADN du Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire au CEA de Saclay. Je tiens à cet égard à remercier Michel Werner et Marie-Claude Marsolier-Kergoat de m'avoir accueillie dans le laboratoire.

J'ai eu la chance d'interagir avec Jean-Louis Sikorav et de participer à des discussions extrêmement enrichissantes, m'apportant alors un regard éclairé sur le monde de la biologie. Toujours disponible pour apporter son aide et ses conseils, Jean-Louis m'a permis de développer mon travail avec une immense liberté. Ses encouragements et sa confiance m'ont permis d'avancer, jusqu'au-delà de la thèse. Alors c'est vrai, on n'a pas fait Paglia Orba, mais quand même c'était bien...

À différentes reprises j'ai eu la chance de travailler avec Arach Goldar alors en postdoc au CEA dans le groupe de Jean-Louis ou bien à Imperial College. Arach m'a alors montré les techniques de biologie moléculaire ainsi que de réflectivité de neutrons à Orphée ou de rayons X à Bath. Je remercie Arach pour m'avoir montré qu'on peut toujours travailler dans la bonne humeur, pour toutes ces discussions scientifiques devant une bitter à Bath ou à Londres, ou encore devant une myrte à Cargèse!

Et à propos de myrte à Cargèse, je tiens à remercier Olivier Hyrien de m'avoir

accueillie dans son laboratoire pour la préparation d'ADN simple brin et pour avoir été toujours disponible pour nous donner de bonnes idées sur les manip.

Les expériences de réflectivité de rayons-X ont été effectuées grâce à l'aide d'Alan Braslau qui a eu la générosité de me faire partager un peu de son immense savoir sur les rayons-X. La participation d'Alan dans l'analyse des résultats m'a permis d'enrichir de façon significative ce travail de thèse et je lui en suis particulièrement reconnaissante.

Je tiens aussi à remercier Steve Roser de l'Université de Bath pour sa disponibilité et sa bonne humeur, qui m'a accueillie régulièrement pour faire des mesures de réflectivité dans son laboratoire et qui est venu à Grenoble plein d'optimisme et d'entrain.

En parlant d'optimisme, dans les moments de doute à l'ESRF, Robert Cortès n'a eu de cesse de me répéter cette citation : "Il n'est pas nécessaire d'espérer pour entreprendre, ni de réussir pour persévérer". Je tiens à exprimer toute ma gratitude à l'égard de Robert qui a cru en ce projet dès le premier jour et qui m'a apporté son aide et son expérience au quotidien.

Une pensée pour mes amis très chers : Nico, Vince, Eric et Patricia, Philou, Stuff, Didier, Anne, Pitou et petit Chouchou ; ainsi que pour ma famille, mon frère et mes parents qui ont toujours cru en moi et m'ont apporté un soutien sans faille.

Table des matières

1	Notions générales	7
1	Structure de l'ADN	8
1.1	L'ADN simple brin	8
1.2	La structure en double hélice	10
2	Conformation d'une chaîne polymérique isolée	12
2.1	La chaîne idéale	12
2.2	La marche auto-évitante	12
2.3	Conformation en mauvais solvant	13
3	Conformation des acides nucléiques	15
3.1	Effets des sels	15
3.2	Interactions de courte portée : hydratation, aromaticité	17
3.3	Adsorption sur une interface	18
4	Motivations de ce travail	19
2	Fonctionnalisation de surfaces de silicium	21
1	Surfaces de silicium	24
1.1	Choix du substrat et propriétés du silicium	24
1.2	Les surfaces de silicium (111) hydrogénées	24
1.3	Modification des surfaces par des molécules organiques	31
2	Greffage d'une monocouche terminée par des esters	34
2.1	Le greffage de l'ester	34
2.2	La calibration de l'ester	42
2.3	Le greffage de couches mixtes	45
3	L'hydrolyse de l'ester	52
3.1	La procédure	53
3.2	La cinétique	56
3.3	La section efficace de la liaison carbonyle	58
3.4	La compacité des couches hydrolysées	60
4	L'étape d'activation de l'acide	61
4.1	La procédure	63
4.2	La compacité des couches ester NHS	69
5	L'amidation de la surface	71

5.1	Le greffage de terminaisons amines	71
5.2	Les surfaces terminées par des phénols	73
5.3	La compacité des couches terminées par des phénols	78
	Résumé des principales conclusions du chapitre 2	79
3	ADN aux interfaces solides	81
1	L'ADN sur des substrats phénolés	83
1.1	Protocole de dépôt	85
1.2	L'interaction de l'ADN avec l'interface	87
1.3	L'interaction de l'ADN avec le phénol : images AFM sur mica	90
2	DNA adsorption on aminated silicon substrate	95
2.1	Introduction	95
2.2	Surface preparation	96
2.3	X-ray reflectivity	98
2.4	Prevention of surface degradation under irradiation	113
2.5	Data analysis	113
2.6	Amine-terminated surface characterization	116
2.7	DNA adsorption on a functionalized surface	119
3	Conclusions	126
	Résumé des principales conclusions du chapitre 3	127
4	Phase separations in nucleic acid solutions	129
1	Introduction	130
2	Material and methods	135
2.1	Chemicals	135
2.2	Plasticware	135
2.3	DNA labeling	136
2.4	Studies of the solubility of ϕ X174 virion DNA by sedimentation	136
2.5	Studies of the solubility of ϕ X174 virion DNA combining autoradiography and sedimentation	137
3	Results	138
3.1	Sedimentation studies of DNA solubility	138
3.2	Solubility studies combining autoradiography and sedimentation	144
4	Discussion	149
4.1	General shape of the phase diagrams	149
4.2	Decreased solubility of DNA in D ₂ O	150
4.3	Significance of the phase diagrams : A role for adsorption	151
4.4	Comparison with the works of Frommer and Miller and Eickbush and Moudrianakis	154
4.5	Mechanism of the adsorption and aggregation processes	154
4.6	Implications	157
	Résumé des principales conclusions du chapitre 4	158

A	La microscopie AFM	163
B	La spectroscopie FTIR	167
	B.1 Le principe expérimental	167
	B.2 Calibration de la mesure	171
C	Silanisation des tubes	177
D	Marquage radioactif au ³²Phosphore	179
	D.1 Linéarisation du ϕ X174 virion	179
	D.2 Marquage au ³² P	182
E	Protocole de l'amplification par PCR	185
	E.1 Le principe de l'amplification par PCR	185
	E.2 Amplification d'une séquence de 300 paires de bases	187
	Bibliographie	189

Introduction

Les molécules d'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) sont contenues dans les cellules des êtres vivants. L'ADN contient l'information génétique transmise de génération en génération. L'ensemble des chaînes d'ADN constitue le génome de chaque organisme. Le fonctionnement de ces macromolécules est complexe. L'ADN, à l'aide d'enzymes spécifiques, doit être capable de se répliquer et de se transcrire. L'interaction avec son environnement joue un rôle essentiel. Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à appréhender certaines interactions de l'ADN simple brin et double brin avec les interfaces solides et liquides. Ce travail a été effectué d'une part dans le but fondamental de comprendre les interactions qui existent *in vivo* avec les protéines ou les membranes qui composent la cellule. D'autre part, l'intérêt grandissant pour les biotechnologies ("lab-on-chip", biopuces,...) nous a conduit à porter les efforts sur la compréhension de l'interaction entre l'ADN et des substrats fonctionnalisés.

Ce travail est constitué essentiellement de l'étude de l'adsorption sur deux types d'interfaces. Une première étude porte sur l'adsorption de l'ADN sur les surfaces solides qui sont des substrats de silicium fonctionnalisés. Une chimie de surface minutieuse permet d'obtenir des monocouches de molécules organiques greffées. Ces molécules peuvent avoir différentes fonctionnalités chimiques : elles peuvent être aromatiques telles que les phénols ou bien chargées telles que les amines. L'analyse par spectroscopie infrarouge permet de déterminer rigoureusement la nature et la densité des molécules greffées sur la surface. Parallèlement, la microscopie à force atomique permet de caractériser la topographie des surfaces de silicium cristallines greffées, planes à l'échelle atomique. L'adsorption des molécules d'ADN sur ces substrats chimiquement et physiquement contrôlés peut être observée par des techniques classiques de caractérisation de surface telle que la réflectivité de rayons X. L'interaction électrostatique qui existe entre la surface chargée par des

molécules amines et les molécules d'ADN a été mise en évidence. Une analyse fine des courbes de réflectivité a permis de caractériser l'adsorption de l'ADN double brin qui pénètre dans la couche de molécules greffées. En revanche, nous montrerons que l'interaction aromatique des molécules de phénol greffées avec l'ADN n'est pas suffisante pour permettre une adsorption.

La deuxième partie de ce travail de thèse consiste à étudier les séparations de phases des acides nucléiques en solution. Ces séparations de phases consistent en une agrégation et une adsorption à l'interface eau/air. Nous verrons qu'il est possible d'agréger l'ADN dans le volume en présence de sels. Nous avons observé par des expériences d'autoradiographie que cette agrégation est strictement corrélée à une adsorption des acides nucléiques à l'interface eau/air. Cette observation est cruciale pour l'interprétation des diagrammes de phases qui décrivent la solubilité de l'ADN en présence de sels.

CHAPITRE 1

Notions générales

"Dans les sciences, le chemin est plus important que le but. Les sciences n'ont pas de fin."

Erwin Chargaff

Sommaire

1	Structure de l'ADN	8
1.1	L'ADN simple brin	8
1.2	La structure en double hélice	10
2	Conformation d'une chaîne polymérique isolée	12
2.1	La chaîne idéale	12
2.2	La marche auto-évitante	12
2.3	Conformation en mauvais solvant	13
3	Conformation des acides nucléiques	15
3.1	Effets des sels	15
3.2	Interactions de courte portée : hydratation, aromaticité	17
3.3	Adsorption sur une interface	18
4	Motivations de ce travail	19

Les premiers résultats sur la constitution des acides nucléiques ont été obtenus à la fin du XIX^{ème} et début du XX^{ème} siècle. Bien que l'idée que les facteurs héréditaires puissent être contenus dans l'ADN ait été proposée assez tôt, les biochimistes ont continué à penser que les protéines étaient les "molécules de l'hérédité" jusqu'à la fin des années 1940. C'est en 1944 que la découverte de l'ADN comme principe transformant a été faite par Avery. Cette idée nouvelle a alors été suivie neuf ans plus tard par la découverte de la structure en double-hélice. À partir des clichés cristallographiques de diffraction de rayons X obtenus par Maurice Wilkins et Rosalind Franklin, l'américain James Watson et l'anglais Francis Crick établissent en 1953 que l'ADN est formé de deux brins antiparallèles qui s'enroulent en une double hélice.

1 Structure de l'ADN

Dans les biopolymères, on distingue plusieurs structures à différentes échelles : la structure primaire (la séquence), la structure secondaire (en double hélice pour l'ADN, en feuillet β et hélice α pour les protéines) et la structure tertiaire. Dans ce paragraphe nous allons décrire les structures primaires et secondaires.

1.1 L'ADN simple brin

Un brin d'ADN (ADN simple brin) est constitué d'un squelette qui est une alternance de désoxyriboses (sucres) et de phosphates. Ce squelette porte des bases qui sont des groupements aromatiques planaires : des purines et des pyrimidines. Elles sont attachées au squelette phosphatique par une liaison avec le sucre.

L'ensemble constitué d'une base, d'un sucre et d'un phosphate est appelé nucléotide. Il existe 4 sortes de bases : deux purines qui sont l'adénine (A) et la guanine (G) et deux pyrimidines qui sont la thymine (T) et la cytosine (C). Le carbone du sucre lié à la base est numéroté 1'. Ce sont les carbones 3' et 5' de deux nucléotides successifs qui sont reliés par une liaison phosphodiester pour former le squelette. La séquence des nucléotides est donc orientée : il existe une extrémité 5' et une extrémité 3' (voir figure 1.1).

Chaque base a la capacité de s'apparier avec une unique base complémentaire : une purine s'attache à une pyrimidine (voir figure 1.2). L'appariement entre bases est établi par des liaisons hydrogène. Les seuls appariements possibles sont l'adénine avec la thymine par deux liaisons hydrogène et la cytosine avec la guanine par trois

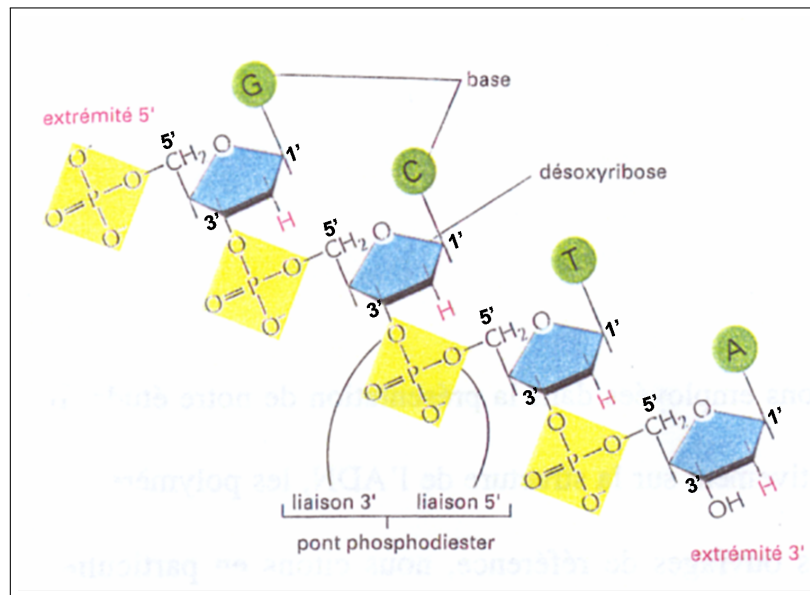


FIG. 1.1 – Séquence de nucléotides constituant un simple brin d'ADN [Alberts et al., 2002].

liaisons hydrogène. On constate que la force de la liaison est différente pour les deux types de paires de bases.

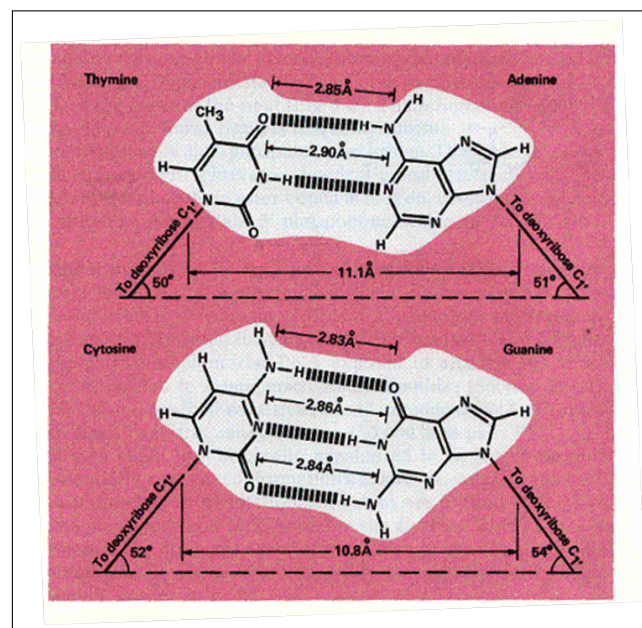


FIG. 1.2 – Appariement des quatre bases de l'ADN [Kornberg & Baker, 1992].

L'appariement de deux simples brins de séquences complémentaires conduit à la formation d'une molécule d'ADN double brin.

1.2 La structure en double hélice

Les deux brins de la double hélice sont orientés de manière antiparallèle. Ils s'arrangent dans des directions opposées chimiquement et s'enroulent l'un autour de l'autre pour adopter une structure en double hélice (voir figure 1.3).

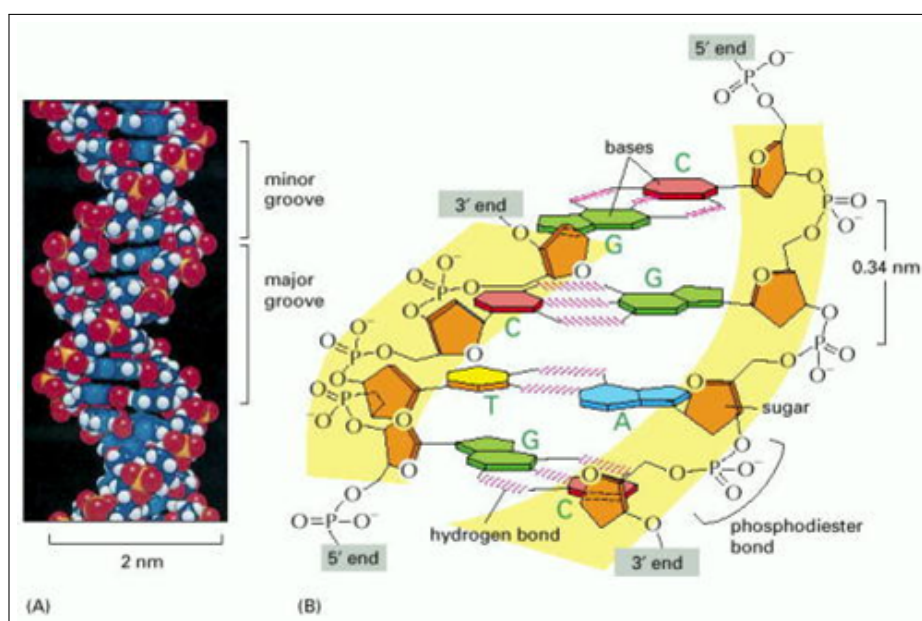


FIG. 1.3 – Double hélice d'ADN (forme B) [Alberts et al., 2002].

La structure en double hélice est caractérisée par son sens d'enroulement (droite ou gauche) et son nombre de bases par pas d'hélice. La double hélice peut exister sous différentes formes. La forme la plus courante en solution est la forme B. Dans la forme B, le squelette phosphatique des deux brins forme une hélice droite d'un diamètre de 20 Å. Le squelette est à l'extérieur de l'hélice alors que les bases sont à l'intérieur. Les bases sont dans des plans presque perpendiculaires à l'axe de l'hélice. Les mesures cristallographiques donnent un résultat de 10 paires de bases par tour d'hélice. Chaque paire de bases est ainsi tournée de 36° par rapport aux voisines. Un pas d'hélice correspond à 34 Å. Les mesures en solution donnent les mêmes dimensions pour le pas, mais il y a 10,5 paires de bases par tour d'hélice.

Les bases de l'ADN sont aromatiques. Dans la structure en double hélice, sur un même brin, les bases s'empilent par interaction π . Cet empilement permet de stabiliser la structure en double hélice.

2 Conformation d'une chaîne polymérique isolée

L'ADN est constitué d'une succession de monomères appelés nucléotides : c'est un polymère. En première approximation, les propriétés physiques des polymères neutres et flexibles peuvent décrire une molécule d'ADN.

2.1 La chaîne idéale

Pour décrire un polymère constitué de N monomères, on définit R la distance bout à bout entre les deux extrémités de la chaîne. Si les N monomères sont indépendants les uns des autres, la chaîne est totalement flexible. Si l est la taille d'un monomère, on obtient la description mathématique : $\langle R_o^2 \rangle^{1/2} = N^{1/2} \times l$. La probabilité pour que la distance bout à bout R d'une chaîne idéale de N monomères soit égale à R_o suit une loi gaussienne. Cette chaîne est appelée "chaîne gaussienne".

2.2 La marche auto-évitante

Dans la cas d'une marche auto-évitante, le polymère est toujours considéré comme une chaîne gaussienne avec la différence principale que cette marche ne peut pas s'entrecouper. C'est le cas lorsque les monomères de la chaîne préfèrent être en contact avec les molécules du solvant, il en résulte une répulsion effective entre monomères. On dit que l'ADN est en bon solvant. Le volume occupé par la chaîne est alors plus important que lorsqu'elle est gaussienne. Flory a élaboré une théorie de champ moyen en 1953 pour décrire les polymères en tenant compte de ces interactions entre monomères.

On définit α comme le coefficient de gonflement tel que $R = \alpha R_o$, où R est la distance bout à bout de la chaîne dans le solvant et R_o est la distance bout à bout de la chaîne gaussienne.

L'énergie libre F d'une chaîne est la somme d'une contribution d'origine entropique qui est l'énergie élastique et d'une énergie due aux interactions entre monomères. Dans ce cas, les interactions à trois corps sont négligées. Le terme élastique $-TS(\alpha)$ correspond à l'entropie d'une chaîne idéale. La participation due à la répulsion entre les monomères est égale à $A_2 kTVn^2$, où A_2 est le second coefficient du viriel (terme d'interaction à deux corps), k est la constante de Boltzmann, T est la température, V est le volume de la chaîne et n est la concentration en monomères

dans le volume de la pelote ($n = N/R^3$). La valeur à l'équilibre de α s'obtient en minimisant l'énergie libre F . On obtient alors la relation : $R \propto N^\nu$ avec $\nu = 3/5$.

En réalité, ce calcul repris par de Gennes donne un exposant ν égal à 0,588 [de Gennes, 1979].

2.3 Conformation en mauvais solvant

En mauvais solvant, les interactions entre monomères sont attractives : le second coefficient du viriel A_2 est négatif. Contrairement au cas d'un polymère en bon solvant, il faut tenir compte des interactions à trois corps : l'énergie d'interaction s'écrit $VkT(A_2n^2 + A_3n^3)$, où A_3 est le troisième coefficient du viriel.

La minimisation de l'énergie libre F par rapport à α conduit à une relation du type : $\alpha^5 - \alpha = x + y\alpha^{-3}$, où x est un paramètre significatif de la qualité du solvant ($x \propto A_2$) et y est un paramètre significatif de la rigidité de la chaîne ($y \propto A_3$). Pour une chaîne semi-flexible (voir paragraphe 3) y est constant et très petit devant 1, la figure 1.4 représente la variation du coefficient de gonflement α en fonction de x .

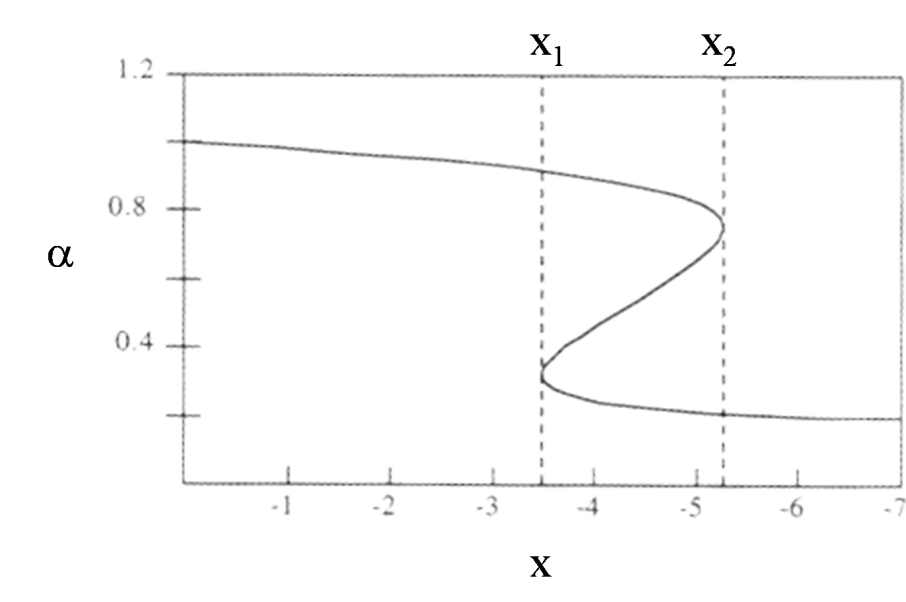


FIG. 1.4 – Variation du coefficient de gonflement de la chaîne en fonction de x dans le cas où y est négligeable.

Dans la région correspondant à $x \geq x_1$, α a une valeur unique proche de 1. La conformation de la chaîne est en pelote et pour $x = 0$, $R = R_o$.

Pour les valeurs de x comprises entre x_1 et x_2 , α a trois solutions mathématiques. Les solutions extrémales représentent la chaîne à l'équilibre : la valeur proche de 1 correspond à une conformation en pelote, la valeur proche de 0,1 correspond à une conformation en globule ($R \ll R_o$). La solution intermédiaire ne représente pas la chaîne à l'équilibre. Dans cette région il y a coexistence de pelotes et de globules.

Pour des valeurs de x inférieures à x_2 , le coefficient de gonflement de la chaîne a une valeur unique et est le plus faible. La conformation de la chaîne est en globule.

On peut déterminer la relation entre R et N lorsque la chaîne est en conformation globulaire (pour les petites valeurs de α). On obtient alors la relation : $R \propto N^\nu$ avec $\nu = 1/3$.

3 Conformation des acides nucléiques

L'ADN est un polymère chargé. Les groupements phosphates PO_4^- qui constituent le squelette sont chargés négativement : l'ADN est un polyélectrolyte. La conformation des acides nucléiques dépend de la concentration et de la nature des ions présents dans la solution. En l'absence de sels, des phénomènes de répulsion entre les monomères conduisent par exemple à une expansion de la chaîne par rapport à la conformation qu'aurait une chaîne chimiquement identique mais neutre. La chaîne d'ADN est caractérisée par une marche auto-évitante. Les différentes propriétés physiques évoquées précédemment permettent donc de décrire une chaîne d'ADN.

D'autre part, la structure en double hélice n'est pas aussi flexible qu'une chaîne idéale (contrairement au simple brin d'ADN). On la décrit comme une chaîne semi-flexible, caractérisée par une longueur de persistance. Il existe différents facteurs qui contribuent à la déformation ou à la stabilité de la structure des molécules d'ADN simple brin et double brin. Ces facteurs sont de deux types : l'effet des sels dans la solution et les interactions de courte portée (liaisons hydrogène et empilement des bases).

3.1 Effets des sels

Les groupements phosphates du squelette de la double hélice d'ADN portent chacun une charge négative. En l'absence de sel, la répulsion électrostatique de longue portée entre les groupements phosphates tend à déstabiliser la structure en double hélice de l'ADN double brin et à étendre l'ADN simple brin.

Dans des solutions dont la concentration en sels monovalents est modérée (typiquement entre 10 mM et 1 M), les interactions électrostatiques sont écrantées par des contre-ions. L'ADN double brin a alors une structure locale en hélice de forme B et adopte une conformation en pelote à grande échelle. L'ADN simple brin peut se replier sur lui-même en fonction de la concentration en sels, en formant des appariements intrabrin imparfaits.

Longueur de persistance

Lorsque les positions des monomères d'une chaîne ne sont pas indépendants. On peut décrire cette dépendance par une distance caractéristique appelée longueur de

persistance l_p . La longueur de persistance est une longueur caractéristique au-delà de laquelle deux monomères ne sont plus corrélés en position. La corrélation en position des monomères le long de la chaîne suit une décroissance exponentielle :

$$\langle \vec{u}(s) \cdot \vec{u}(s') \rangle = \exp\left(-\frac{|s' - s|}{l_p}\right) \quad (1.1)$$

où \vec{u} est le vecteur unitaire tangent en chaque point de la chaîne et s est l'abscisse curviligne.

Dans le cas de l'ADN double brin, la longueur de persistance varie en fonction de la concentration en sels dans la solution (monovalents ou multivalents). En présence d'ions monovalents, pour une force ionique de 1,9 mM la longueur de persistance l_p vaut environ 100 nm. Cette valeur décroît jusqu'à 50 nm pour une force ionique de 10 mM à 1 M. Dans le cas de l'ADN simple brin, la longueur de persistance de la chaîne est beaucoup plus faible. Pour une force ionique de 0,1 M en sel, l_p est de l'ordre de 13 Å [Tinland et al., 1997].

On observe la loi en $R \propto N^{3/5}$ pour des chaînes d'ADN double brin seulement pour des molécules plus grandes que 6 à 10 kilobases car la longueur de persistance de l'ADN est assez grande.

Agrégation de l'ADN : salting out et condensation

La présence de cations dans la solution peut conduire à des conditions de mauvais solvant pour l'ADN, avec des phénomènes d'agrégation. On distingue classiquement deux grands types d'agrégation : le salting out et la condensation [Pelta et al., 1996].

Pour des concentrations en sels monovalents élevées, on observe un "salting out" des acides nucléiques. Cela consiste en un processus d'agrégation qui conduit à une séparation de phases. Le "salting out" de l'ADN double brin s'effectue à de grandes concentrations en LiCl (supérieures à 9 M) [Borochoy & Eisenberg, 1984]. Eisenberg et Felsenfeld [Eisenberg & Felsenfeld, 1967] ont décrit les diagrammes de phases de l'acide (poly)riboadénylique en fonction de la concentration en sel et de la température. Ils observent une séparation de phases à partir de 1 M en NaCl. Dans ces cas, la séparation de phases est due à une diminution de l'activité de l'eau qui implique directement une diminution de la solubilité de l'ADN (voir paragraphe 3.2).

De même, les conditions de mauvais solvant peuvent être obtenues par la présence de cations multivalents dans la solution [Bloomfield, 1997]. On parle alors de condensation de l'ADN. Les cations multivalents permettent en effet d'écranter

suffisamment les charges négatives portées par les phosphates et rendent attractives la résultante des forces entre les nucléotides. C'est le cas des cations tels que la spermine (4+) et la spermidine (3+) qui sont présents naturellement dans la cellule. Ils produisent un effondrement d'une chaîne sur elle-même et/ou une agrégation à l'échelle de plusieurs molécules.

Dans la cellule, l'ADN n'a généralement pas une conformation en pelote. Il est compacté sous forme beaucoup plus dense. À titre d'exemple, les 23 chromosomes constituant le génome humain ont une longueur de 990 mm mis bout à bout. Ces chaînes d'ADN d'une longueur totale de presque 1 m sont contenues dans un noyau cellulaire de 5 μm de diamètre. Dans la cellule, le rayon R des chaînes chromosomiques correspond bien au modèle théorique d'un polymère en mauvais solvant en conformation globulaire : $R \propto N^{1/3}$.

3.2 Interactions de courte portée : hydratation, aromaticité

Nous avons vu que les bases de l'ADN sont planaires et aromatiques et peuvent former des liaisons hydrogène. Les bases interagissent ensemble par des interactions π . La compétition entre l'interaction attractive due à l'empilement de deux bases adjacentes et la répulsion électrostatique des phosphates chargés du squelette confère à l'ADN sa structure en hélice. De même, les interactions hydrogène entre les bases des deux brins complémentaires stabilisent la double hélice. Les interactions d'empilement ou hydrogène reposent sur le caractère polaire des bases de l'ADN.

D'autre part, le caractère hydrophile de l'oxygène négativement chargé du groupement phosphate implique que les molécules d'eau jouent un rôle essentiel dans la stabilisation de la structure de l'ADN [Westhof, 1988]. Le fait que l'ADN puisse adopter plusieurs conformations est lié dans certains cas au changement du taux d'hydratation de la molécule (c'est-à-dire un changement de l'activité de l'eau) [Saenger et al., 1986]. Il y a environ 18 à 23 molécules d'eau par nucléotide dans la forme B de l'ADN. Le déplacement des molécules d'eau au voisinage de l'ADN est restreint à son enveloppe d'hydratation, ceci implique une diminution de l'entropie [Westhof, 1988]. La présence d'une grande quantité de sels dans la solution peut ainsi affecter notablement l'activité de l'eau qui enveloppe l'ADN et donc modifier la conformation de l'ADN.

3.3 Adsorption sur une interface

La proximité d'une interface joue un rôle essentiel sur la structure des acides nucléiques. Lorsqu'une molécule d'ADN est adsorbée sur une interface, elle perd des degrés de liberté. Ceci modifie les paramètres physiques décrivant la conformation de l'ADN, tels que l'exposant de volume exclu ν et la longueur de persistance l_p [Joanicot & Revet, 1987], [Frontali et al., 1979], [Rivetti et al., 1996]. La chaîne dispose d'un espace plus restreint qu'en solution pour évoluer.

Si on considère l'ADN comme une chaîne idéale, la distance bout à bout ne dépend pas de la dimensionnalité. La relation : $\langle R_o^2 \rangle^{1/2} = N^{1/2} \times l$ est vraie même pour une chaîne gaussienne à 2 dimensions.

En revanche, nous avons vu qu'il est plus correct de considérer l'ADN comme une chaîne semi-flexible chargée qu'il convient de décrire en prenant en compte les effets de volume exclu. Dans ce cas, la dépendance de la distance bout à bout de la chaîne est en loi de puissance selon la dimensionnalité du système. La relation générale est donnée par : $R \propto N^\nu$ avec $\nu = \frac{3}{d+2}$, où d est la dimensionnalité ($d \leq 3$). Ainsi, alors qu'on avait $R \propto N^{3/5}$ pour une chaîne auto-évitante à 3 dimensions, on a maintenant $R \propto N^{3/4}$ pour une chaîne auto-évitante à 2 dimensions.

L'ADN qui a une conformation de chaîne à 3 dimensions dans le volume peut s'adsorber de différentes façon sur l'interface. Cela dépend de la nature et de la force des interactions. Dans certains cas, l'ADN peut se réarranger librement sur l'interface. C'est le cas d'une adsorption sur une interface liquide ou lorsque l'interaction est faible ou encore lorsque l'adsorption est suffisamment lente. Dans ce cas, la chaîne d'ADN adsorbée prend une conformation à 2 dimensions telle que $R \propto N^{3/4}$ [Joanicot & Revet, 1987].

En revanche, dès lors que l'interaction est forte et que l'adsorption de l'ADN se fait brutalement sur la surface, la structure à 3 dimensions est projetée perpendiculairement sur l'interface. En théorie, cela devrait réduire la longueur du contour de la chaîne ainsi que la longueur bout à bout d'un facteur de proportionnalité. Joanicot et Revet ont fait des expériences d'observation de la structure de l'ADN sur une surface [Joanicot & Revet, 1987]. Dans le cas d'une adsorption brutale sur une surface chargée, ils n'ont pas réussi à observer une diminution de la taille de la chaîne. En revanche, ils mettent en évidence la présence de nombreux croisements de la chaîne avec elle-même et ils observent une loi de puissance en $0,59 \pm 0,02$ qui correspond à une conformation de volume exclu à 3 dimensions. Dans ce cas, l'ADN s'adsorbe en de nombreux points de contact et les boucles entre deux points sont ensuite collées de force à la surface.

4 Motivations de ce travail

D'un point de vue fondamental, comprendre les forces d'interaction qui conduisent à la localisation des acides nucléiques aux interfaces est un objectif commun aux sciences biologiques, physiques et chimiques. Cette compréhension est au coeur des problèmes biologiques car les interactions entre l'ADN et les interfaces sont essentielles dans bon nombre de situations biologiques.

Un exemple de cette interaction *in vivo* est l'association de l'ADN avec des protéines ou des enzymes. Lorsque l'ADN est associé à une protéine, on peut en effet comprendre facilement que la molécule d'ADN interagit en fait avec la surface de la protéine associée. Ceci peut avoir par exemple des conséquences sur la topologie de l'ADN [Bates & Maxwell, 1993]. Le fait de localiser de l'ADN sur une interface constitue un modèle simple qui peut nous permettre de mieux comprendre les interactions plus complexes entre l'ADN et les protéines.

D'autre part, les acides nucléiques *in vivo* n'ont pas tout l'espace dont ils disposent dans une solution diluée. En effet, ils possèdent moins de degrés de liberté. Les éléments structuraux qui existent *in vivo* tels que l'intérieur d'une capsid virale, l'intérieur d'une membrane bactérienne ou encore l'intérieur de l'enveloppe nucléaire, peuvent être considérés comme des contraintes pour la structure et le mouvement de l'ADN contenu. L'étude du confinement des molécules d'ADN dans des systèmes simples pourrait permettre de mieux appréhender ces interactions.

De manière générale, la localisation de molécules sur une interface est un sujet qui s'étend au-delà du cas des acides nucléiques. En effet, on s'attend à ce que les propriétés à la fois thermodynamiques et cinétiques soient largement modifiées par un effet de confinement. Le transfert des molécules du volume vers une surface peut par exemple augmenter leur concentration locale et cela joue un rôle important pour la chimie de surface. D'un point de vue cinétique, le confinement sur une surface peut conduire à l'augmentation de la vitesse d'une réaction chimique (catalyse de surface). Selon Adam et Delbrück [Adam & Delbrück, 1968], pour un système contrôlé par la diffusion, la réduction de la dimensionnalité permet d'augmenter la cinétique d'une réaction pour des paramètres appropriés (coefficients de diffusion de volume ou de surface, constantes d'associations et de dissociation,...).

Il a ainsi été montré qu'un certain nombre de protéines atteignent leur cible sur l'ADN à des vitesses qui excèdent largement celle d'un mouvement de diffusion à trois dimensions [Winter et al., 1981]. En réalité, elles s'attachent d'abord de façon non spécifique sur la chaîne d'ADN et procèdent ensuite à une diffusion à une dimension le long de la molécule jusqu'à atteindre leur cible. Ceci peut en fait être

décrit comme une diffusion à deux dimensions de la protéine sur la surface de l'ADN.

L'adsorption des acides nucléiques à l'interface solide/liquide constitue un système simple qui permet de mieux appréhender les interactions plus complexes qui existent *in vivo*. L'étude de ces interactions est également d'un intérêt certain du point de vue plus appliqué des biotechnologies. À l'heure où les biocapteurs et les technologies "lab-on-chip" sont en plein essor, il est important de comprendre comment l'ADN s'adsorbe sur une interface.

CHAPITRE 2

Fonctionnalisation de surfaces de silicium

"Le commencement de toutes les sciences, c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont."

Aristote

Sommaire

1	Surfaces de silicium	24
1.1	Choix du substrat et propriétés du silicium	24
1.2	Les surfaces de silicium (111) hydrogénées	24
1.3	Modification des surfaces par des molécules organiques	31
2	Greffage d'une monocouche terminée par des esters	34
2.1	Le greffage de l'ester	34
2.1.1	Le procédé expérimental	35
2.1.2	L'importance des ringages de surface	37
2.1.3	Identification de l'ester sur la surface	37
2.2	La calibration de l'ester	42
2.3	Le greffage de couches mixtes	45
3	L'hydrolyse de l'ester	52
3.1	La procédure	53
3.2	La cinétique	56

3.3	La section efficace de la liaison carbonyle	58
3.4	La compacité des couches hydrolysées	60
4	L'étape d'activation de l'acide	61
4.1	La procédure	63
4.1.1	Influence des concentrations	64
4.1.2	Le procédé en deux étapes	66
4.2	La compacité des couches ester NHS	69
5	L'amidation de la surface	71
5.1	Le greffage de terminaisons amines	71
5.2	Les surfaces terminées par des phénols	73
5.3	La compacité des couches terminées par des phénols . . .	78
	Résumé des principales conclusions du chapitre 2	79

Introduction

Cette partie du travail de thèse consiste à préparer des substrats solides fonctionnalisés de façon à pouvoir déposer de l'ADN et caractériser l'interaction qui existe entre l'interface et l'ADN. Dans le but d'étudier certaines interactions plus spécifiquement (interactions aromatiques ou électrostatiques), nous avons cherché à fonctionnaliser le substrat solide de différentes façons. Pour ce faire, le choix du substrat solide est essentiel. Le silicium est un matériau qui possède de multiples possibilités d'utilisation. Le choix d'utiliser le silicium pour y déposer de l'ADN fut assez naturel de par sa chimie maîtrisable et sa topographie de surface.

Dans ce chapitre, nous mettrons tout d'abord en avant les propriétés du silicium importantes pour notre problématique ainsi que l'état de l'art en ce qui concerne le greffage moléculaire. Nous décrirons les étapes chimiques successives qui permettent l'obtention d'une surface qui possède une fonctionnalité chimique désirée. Nous nous concentrerons ensuite sur la première étape qui consiste à greffer une monocouche bien compacte, en évitant soigneusement la formation d'oxyde. Ceci assure une bonne passivation électronique de la surface et peut être utile dans des contextes voisins : par exemple pour la détection électrique de la présence ou de l'hybridation d'ADN. Enfin, nous étudierons les étapes successives de chimie de surface qui permettent *in fine* d'obtenir une fonctionnalité de surface choisie.

Pour caractériser les molécules d'ADN adsorbées sur la surface, il est important de pouvoir discriminer entre l'ADN et d'éventuels résidus de réactions chimiques physisorbés sur la surface : ces résidus peuvent avoir une taille du même ordre de grandeur que l'ADN. Pour s'affranchir de cette incertitude, la topographie des surfaces doit être parfaite après les différentes réactions chimiques : elle doit respecter exactement celle des surfaces de silicium hydrogéné. Il va de soi que si l'une des étapes forme des impuretés qui restent accrochées sur la monocouche greffée, il sera difficile d'obtenir une surface dont la topographie est parfaite aux étapes suivantes. Les notions de propreté de surface et d'homogénéité sont relatives aux outils que l'on utilise pour la caractériser. Les techniques utilisées dans ce travail de thèse sont la microscopie à force atomique (AFM) et la spectroscopie infrarouge (voir Annexes A et B). La microscopie AFM autorise une résolution selon la direction perpendiculaire au plan de la surface de quelques angströms : les surfaces sont observées avec une très grande exigence. Lors de l'élaboration des surfaces de silicium fonctionnalisées, une grande partie de nos efforts a donc été portée sur le contrôle de la chimie de surface à l'échelle moléculaire à chaque étape du protocole expérimental.

1 Surfaces de silicium

1.1 Choix du substrat et propriétés du silicium

Depuis le milieu des années 1990, la modification par des espèces organiques des surfaces de silicium hydrogénées a été largement étudiée en raison de ses divers domaines d'application tels que la microélectronique ou les biocapteurs [Buriak, 2002] [Wayner & Wolkow, 2002] [Boukherroub, 2005]. Le silicium Si(100), largement utilisé comme substrat par l'industrie électronique, possède de très bonnes propriétés électroniques mais sa surface n'est pas parfaitement organisée à l'échelle atomique à l'issue de préparations classiques. En revanche, la face cristallographique (111) du silicium est un plan dense du cristal et se structure en marches planes à l'échelle atomique par dissolution anisotrope dans une solution de NH_4F . Les liaisons pendantes de la surface de silicium (111) ainsi formée sont saturées par des atomes d'hydrogène. Certains modes opératoires permettent de préparer des surfaces parfaitement planes et ordonnées sur une échelle de plusieurs dizaines de microns [Munford et al., 2001]. Ces surfaces planes constituent un substrat idéal pour des études bien contrôlées de chimie de surface et favorisent la réalisation de monocouches organiques denses. Elles permettent ainsi d'envisager un dépôt homogène de molécules d'ADN sur de larges zones. Ceci présente un intérêt évident pour l'étude de la conformation de grandes molécules d'ADN par des techniques classiques de caractérisation de surface.

D'autres propriétés du silicium ont également orienté notre choix vers ce matériau pour ce travail de thèse : le silicium est un bon semi-conducteur qui possède des propriétés électroniques intéressantes pour les mesures électriques à l'interface. Ces mesures permettent l'étude des variations de charges à l'interface silicium/électrolyte. Enfin, les surfaces de silicium (111) telles que nous les préparons ont l'avantage d'être planes à l'échelle atomique et leur rugosité est inférieure à 3 Å. Cette propriété de la topographie de surface autorise ainsi l'utilisation des techniques de réflectivité de rayons X.

1.2 Les surfaces de silicium (111) hydrogénées

La maille élémentaire du cristal de silicium est une maille diamant : deux mailles cubiques à faces centrées décalées de 1/4 l'une de l'autre sur la diagonale principale. Cette maille possède une famille de plans denses orientés selon la direction cristallographique [111]. Dans notre cas, la coupe du cristal est légèrement

désorientée par rapport à cette face. Un mode opératoire précis, bien détaillé au paragraphe suivant, permet de faire apparaître une surface vicinale, structurée en réseau de marches régulières dont la hauteur (3,14 Å) correspond exactement à la distance entre 2 plans atomiques. Ces marches monoatomiques, rectilignes et parallèles séparent des terrasses atomiquement planes.

La figure 2.1 représente le schéma du miscut¹, c'est-à-dire le plan de coupe du cristal par rapport à la face cristallographique (111).

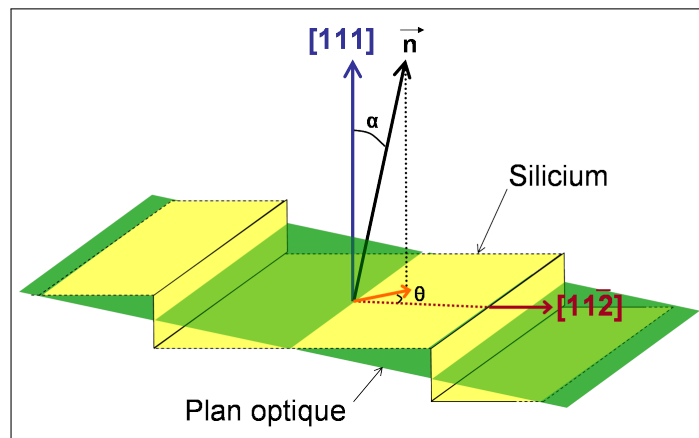


FIG. 2.1 – Schéma d'une surface vicinale de silicium (111). α est l'angle du miscut par rapport à la normale à la surface et θ est la direction du miscut dans le plan de la surface.

Le miscut est défini par 2 angles. L'angle α entre la normale au plan optique et la direction [111] est l'angle du miscut. L'angle θ qui définit l'azimut du miscut est formé par la projection de la normale au plan optique sur la face cristallographique [111] et par la direction [112]. Pour révéler la structure en terrasses de la face cristallographique (111), il convient de dissoudre de façon anisotrope la couche d'oxyde qui se forme naturellement sur la surface de silicium en présence d'oxygène.

Les premiers travaux sur la passivation du silicium par traitement au HF datent de la fin des années 1960. En 1974, les travaux de Harrick et Beckmann de spectroscopie infrarouge sur un substrat de silicium traité par HF ont montré la présence de liaisons silicium-hydrogène sur la surface [Harrick & Beckmann, 1974]. En 1984, Ubara et ses collaborateurs ont confirmé la présence de liaisons Si-H sur la surface [Ubara et al., 1984]. Puis indépendamment en 1985, Tardella et

¹le "miscut" est le terme anglais généralement utilisé pour parler de désorientation de la coupe du wafer par rapport aux axes cristallins

Chazalviel ont confirmé la présence d'une couche d'hydrure à la surface du silicium par une étude de spectroscopie infrarouge en réflexions multiples internes [Tardella & Chazalviel, 1985]. Plus tard, les travaux détaillés de Chabal ont permis de montrer qu'il s'agissait en fait d'une monocouche de liaisons Si-H à la surface du silicium [Yablonovitch et al., 1986] [Burrows et al., 1988] [Chabal et al., 1989].

Beaucoup de travaux ont été conduits pour comprendre le processus de dissolution du silicium. La liaison Si-F est plus stable que la liaison Si-O. La présence de fluor dans la solution permet donc de casser la liaison Si-O de l'oxyde pour la remplacer par une liaison Si-F. Ubara et al. ont montré que la liaison Si-F est fortement polaire et polarise ainsi la liaison silicium-silicium voisine [Ubara et al., 1984]. Higashi, Chabal et al. ont ensuite proposé un mécanisme de dissolution [Trucks et al., 1990] : dans un premier temps, le fluor remplace les liaisons Si-O de l'oxyde, la surface est terminée par des liaisons silicium-fluor. Le fluor est très électronégatif ce qui rend la liaison Si-F fortement polaire et fragilise la liaison silicium-silicium voisine. Une autre molécule de HF attaque ensuite la liaison silicium-silicium fragilisée : une liaison Si-H se forme sur l'atome de silicium $\text{Si}^{-\delta}$ alors qu'un autre atome de fluor se fixe sur le silicium $\text{Si}^{+\delta}$ lié au fluor. Ce processus répété plusieurs fois conduit à la solubilisation d'une molécule de SiF_4 et à la formation de liaisons Si-H sur la surface. Comme l'étape qui consiste à former une liaison Si-F à partir d'une Si-H est beaucoup plus lente que l'étape décrite ci-dessus de solvololyse des liaisons Si-Si, en régime stationnaire la surface est hydrogénée. Elle s'oxyde ensuite lentement dans la solution en présence d'eau et le mécanisme de dissolution se reproduit.

Beaucoup de recherches ont été effectuées dans le but d'étudier la structure de la surface de silicium après la dissolution de l'oxyde. Higashi ainsi que Chabal et ses collaborateurs ont montré que cette structure est dépendante du pH de la solution [Higashi et al., 1990] [Jakob & Chabal, 1991] [Jakob et al., 1992]. Leurs travaux ont permis de constater que les dihydrures et trihydrures de surface disparaissent avec l'augmentation du pH pour ne laisser que des monohydrures à pH 8-9. Ces travaux ont permis de constater qu'une surface plongée dans le fluorure d'ammonium NH_4F , de pH 8-9, a une structure en terrasses atomiquement planes. En revanche, une surface plongée dans une solution de HF à 5% a une structure rugueuse qui correspond à l'empreinte laissée par la silice sur le réseau cristallin. Le silicium lui-même se dissout très lentement dans l'acide fluorhydrique alors que le décapage de la silice SiO_2 est beaucoup plus rapide [Zhang et al., 1989].

L'équipe d'Allongue a mis en évidence la coexistence de deux voies réactionnelles de dissolution dans le NH_4F : une réaction chimique et une réaction électrochimique [Allongue et al., 1995]. La cinétique de la réaction chimique est beaucoup plus rapide sur les sites de crans et de bords de marches que sur les terrasses. Cette réaction

est très anisotrope et dépend très peu du potentiel électrochimique. En effet, cette réaction consiste dans un premier temps à oxyder le silicium par les molécules d' H_2O , qui réagissent préférentiellement sur les sites de crans et les bords de marches pour des raisons stériques. La réaction électrochimique, en revanche, a lieu presque de façon aléatoire sur la surface grâce à la dissociation électrochimique de la liaison Si-H. L'hydrogène est alors remplacé par un oxygène pour former une liaison Si-OH. Cette étape d'oxydation électrochimique se fait de façon presque isotrope sur la surface (figure 2.2). Dans les deux cas, les liaisons Si-OH sont ensuite substituées par des liaisons Si-F selon le processus chimique décrit plus haut.

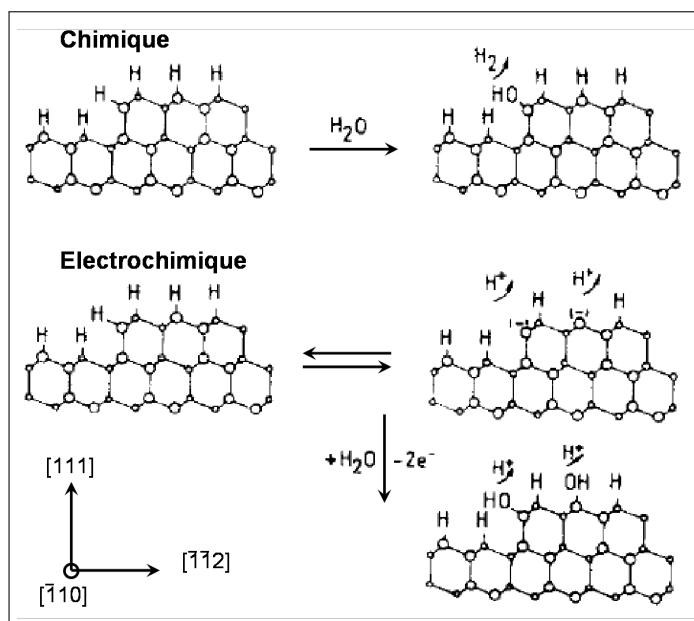


FIG. 2.2 – Modèle structural en coupe du silicium (111) représentant la substitution Si-H \rightarrow Si-OH selon le procédé chimique (dissolution anisotrope) et électrochimique (dissolution isotrope), d'après [Allongue et al., 1995].

Pour obtenir des surfaces de silicium hydrogénées composées de terrasses atomiquement planes et régulières, il convient de privilégier la réaction chimique. Des simulations numériques ont montré que pour obtenir des surfaces planes, la réaction chimique doit être de 7 ordres de grandeur plus lente sur les terrasses que sur les bords de marches [Flidr et al., 1998]. La planéité des surfaces est donc une conséquence de la différence de vitesse de réaction selon la nature du site attaqué. Les cinétiques des réactions de dissolutions chimique et électrochimique augmentent avec le pH [Allongue et al., 1995] et cette augmentation est plus significative pour la réaction chimique. Ainsi à pH faible, les deux réactions sont en compétition alors

qu'à pH élevé la réaction chimique est prépondérante.

D'autre part, lorsqu'une surface de silicium est plongée sans potentiel extérieur dans une solution de NH_4F , une surface rugueuse a un potentiel de repos plus négatif qu'une surface polie. Lorsqu'un échantillon comporte à la fois une face rugueuse d'un côté et une face polie de l'autre, et qu'il est plongé dans le NH_4F , son potentiel de repos prend une valeur intermédiaire entre le potentiel de la face rugueuse et celui de la face polie. Dans ce cas, la face rugueuse fait préférentiellement l'objet de réactions d'oxydation électrochimiques, c'est une anode sacrificielle. La face polie est sous protection cathodique, la réaction de dissolution électrochimique y est fortement ralentie et le décapage s'y fait de façon anisotrope selon le processus chimique.

La présence d'oxygène dans la solution de dissolution affecte notablement la topographie de la surface en initiant la formation de piqûres sur les terrasses [Wade & Chidsey, 1997]. L'oxygène est réduit en ion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ qui réagit avec un hydrogène de surface, laissant un radical silyle sur la surface capable de réagir pour former une liaison Si-F ou Si-O. Ceci fragilise la liaison silicium-silicium adjacente et à terme, solubilise un atome de silicium. Cette dissolution se fait selon les plans denses du cristal du silicium, la croissance des piqûres se fait donc en triangle sur la face cristallographique (111) du silicium. L'ajout d'ions sulfites SO_3^{2-} dans la solution permet de s'affranchir de ce phénomène : les sulfites réduisent l'oxygène dissous dans la solution de NH_4F [Fukidome & Matsumura, 2000], prévenant la formation de piqûres.

Enfin, l'azimut du miscut est un paramètre qui conditionne la structure des bords de marches après la dissolution dans le NH_4F . Pour une direction θ de 0° , les sites de bord de marches sont composés de monohydrures et sont rectilignes. On peut alors déterminer la largeur moyenne des terrasses atomiques ($L = 3,14/\tan(\alpha)$). Pour un angle du miscut de $0,2^\circ$, la largeur des terrasses est d'environ 90 nm. Si la direction θ du miscut est de 180° , alors les sites de bords de marches sont des dihydrures. Lorsque la direction a une valeur comprise entre 180 et 0° , les sites de bord de marche sont constitués à la fois de sites monohydrures et dihydrures dont les vitesses de dissolution sont différentes (la dissolution des dihydrures est plus rapide), ce qui conduit à la formation de macros crans [Kasparian et al., 1997] [Flidr et al., 1998]. La figure 2.3 -(a) représente l'image en microscopie AFM d'une surface de silicium hydrogénée après dissolution dans le NH_4F en présence de sulfite d'ammonium. La dissolution n'a pas du tout révélé une structure en marches atomiques régulières. Une étude par diffraction de rayons X a montré que la direction du miscut est de 189° (modulo 120°) par rapport à la direction $[11\bar{2}]$. Cette désorientation du miscut a des conséquences drastiques sur la morphologie de la surface : sa topographie n'a pas du tout une structure en terrasses avec des

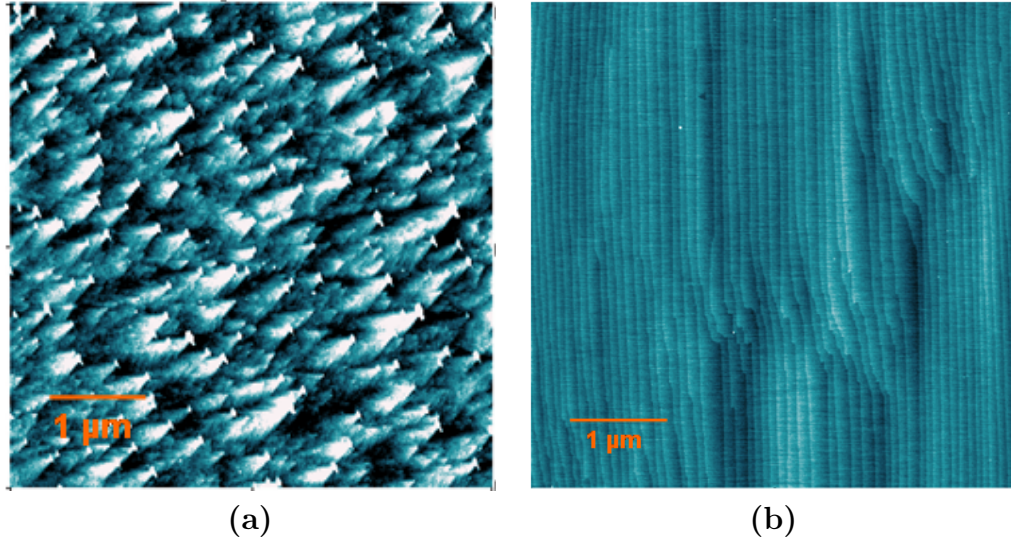


FIG. 2.3 – Images en microscopie AFM d’une surface de silicium après dissolution dans NH_4F en présence de sulfite d’ammonium. (a) Le miscut est de $0,2^\circ$ tourné de $\theta=189^\circ$ (modulo 120°) par rapport à la direction $[11\bar{2}]$. (b) Le miscut est de $0,2^\circ$ tourné de $\theta=180^\circ$ (modulo 120°) par rapport à la direction $[11\bar{2}]$.

bords de marches parallèles.

Le mode opératoire que nous utilisons au laboratoire permet d’obtenir des surfaces de silicium atomiquement planes dont les bords de marches sont rectilignes et parallèles. Le silicium utilisé (Siltronix, France) est monocristallin, orienté selon la direction cristallographique $[111]$, faiblement dopé n et sa résistivité varie selon l’utilisation. L’angle α du miscut est en général de $0,2^\circ$ avec une direction voisine de $\theta=180^\circ$. Le silicium utilisé pour les mesures FTIR a les deux faces polies (une zone de l’échantillon est dépolie à l’aide de papier de verre pour garder la planéité atomique lors du bain dans le fluorure d’ammonium) et il est obtenu par un procédé de fabrication "Float Zone" (FZ) pour minimiser la quantité d’oxygène contenue dans le volume. L’épaisseur du silicium varie de 500 à 550 microns. Le silicium est d’abord nettoyé dans une solution piranha ($\text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{SO}_4$) (1 : 2) pendant au moins 20 min à 80°C puis rincé abondamment à l’eau ultra pure (milliQ). Il est ensuite plongé 15 min dans un bécher en PTFE² rempli d’une solution de NH_4F dans laquelle une faible quantité de sulfite d’ammonium a été préalablement dissous. Le bécher est hermétiquement fermé pour éviter la présence d’oxygène. L’échantillon est ensuite rincé abondamment à l’eau ultra pure (milliQ). La figure

²Polytétrafluoroéthylène

2.3 -(b) représente l'image en microscopie AFM d'une surface de silicium hydrogéné préparée selon le procédé décrit ci-dessus. La surface présente une structure en terrasses atomiquement planes. Les bords de marches sont rectilignes et réguliers.

Quelle que soit la topographie de la surface, le passage dans HF ou NH_4F permet de passiver le silicium grâce à la formation d'une monocouche de liaisons Si-H. Ces liaisons Si-H confèrent à la surface une certaine stabilité chimique à l'échelle de quelques heures. Cependant, une exposition prolongée à l'air entraîne une oxydation de la surface. La figure 2.4 met en évidence cette évolution de la chimie d'une surface de silicium hydrogénée qui a été traitée au NH_4F .

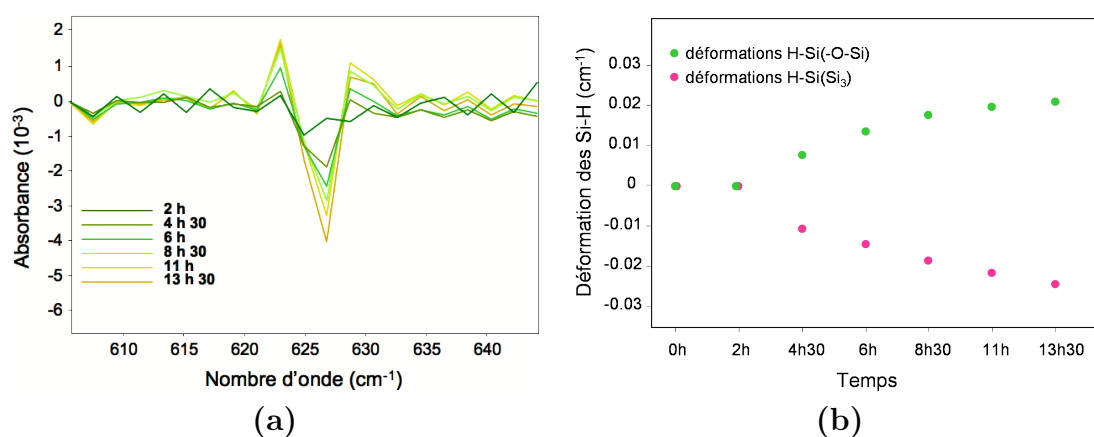


FIG. 2.4 – Modification de la chimie de surface lors de l'exposition prolongée à l'air d'une surface de silicium hydrogénée. (a) Spectres FTIR en transmission autour de 625 cm^{-1} d'une surface de silicium hydrogénée dans l'air. Les spectres sont mesurés à différents intervalles de temps. (b) Représentation graphique des intégrales des fonctions de Voigt qui ont servi à ajuster les pics des spectres représentés en (a).

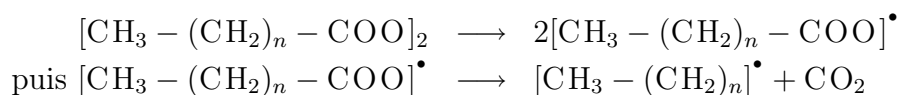
Des mesures FTIR en transmission sont régulièrement effectuées de façon à observer la formation de liaisons Si-O-Si. Le mode d'élongation des liaisons Si-H (autour des nombres d'onde situés entre 2000 et 2200 cm^{-1}) a une faible section efficace et ne sont pas détectables par cette technique. Nous nous intéressons alors aux modes de déformations des liaisons Si-H pour lesquels cette mesure est plus sensible. La figure 2.4 -(a) correspond à une série de spectres FTIR en transmission d'une surface de silicium hydrogénée autour de 625 cm^{-1} . Les pics sont ajustés avec deux fonctions de Voigt : une fonction positive centrée autour de 625 cm^{-1} qui correspond à l'apparition des déformations de la liaison H-Si(-O-Si) et une fonction négative centrée autour de 626 cm^{-1} qui correspond à la disparition des déformations de la liaison H-Si(Si₃). L'évolution de l'intégrale des pics en fonction du temps est représentée

sur la figure 2.4 -(b). On remarque que la surface est stable sur les deux premières heures puis s'oxyde lentement au-delà de deux heures.

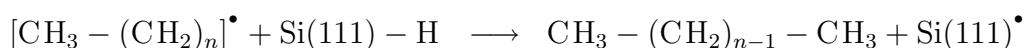
1.3 Modification des surfaces par des molécules organiques

Dans ce travail de thèse, nous avons élaboré des surfaces de silicium fonctionnalisées avec des molécules organiques. Les groupements organiques sont greffés sur la surface de silicium par une liaison covalente silicium-carbone.

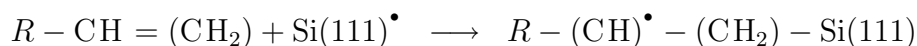
L'équipe de Chidsey a obtenu la première une monocouche organique greffée de façon covalente sur la surface de silicium préalablement hydrogénée [Linford & Chidsey, 1993]. Cette monocouche a été obtenue par réaction d'hydrosilylation entre un alcène et une surface de silicium hydrogénée, en présence de peroxyde de diacycle ($[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}]_2$, $n=10, 14$ et 16), à 100°C pendant 1h. La réaction d'hydrosilylation consiste à insérer une double liaison carbone-carbone sur une liaison silicium-hydrogène. L'équipe de Chidsey a proposé un mécanisme radicalaire qui consiste à utiliser les radicaux provenant du clivage homolytique de la liaison oxygène-oxygène du peroxyde $[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}]_2$, qui se décompose ensuite en dioxyde de carbone et en radical R^\bullet .



Ces radicaux attaquent ensuite la liaison silicium-hydrogène pour donner un radical silyle Si^\bullet .



Le radical silyle de surface réagit alors avec la liaison insaturée de l'alcène pour former une liaison covalente entre l'atome de silicium et l'atome de carbone terminal de l'alcène, le radical se déplace en β de cet atome de carbone.



Ce radical attaque ensuite une liaison Si-H proche. La chaîne alkyle est alors saturée et un nouveau radical de silicium de surface est créé. De proche en proche la réaction se poursuit, assurant le greffage sur la totalité de la surface.

Cette réaction d'hydrosilylation peut être effectuée à haute température ($\geq 150^\circ\text{C}$) [Sieval et al., 1998]. La réaction serait alors initiée par une rupture homolytique de la liaison Si-H induite par la température, créant ainsi un radical silyle de

surface. Ce radical réagirait ensuite avec la liaison alcène pour former une liaison silicium-carbone.

Cette réaction peut également être obtenue par un procédé photochimique. En effet, le groupe de Chidsey a également montré que cette réaction peut être initiée par irradiation UV. L'irradiation de la liaison Si-H dans l'UV engendrerait un clivage homolytique de la liaison. Ainsi, l'irradiation UV (à des longueurs d'onde inférieures à 350 nm) pendant 2h à température ambiante d'une surface de silicium hydrogéné, en présence d'alcènes aliphatiques, permet le greffage de chaînes alkyles [Terry et al., 1999] [Terry et al., 1997a] [Cicero et al., 2000] [Terry et al., 1997b]. Il a été montré plus tard qu'en irradiant à des longueurs d'onde plus grandes (≥ 385 nm) pendant 20 à 24h à une température de 50°C en présence d'alcène, on obtient également des monocouches alkyles [Effenberger et al., 1998]. Le mécanisme qui est proposé par le groupe de Chidsey est controversé : Stewart et Buriak [Stewart & Buriak, 2001] prétendent que le clivage homolytique de la liaison Si-H nécessite un photon UV très énergétique (157 nm, 7,9 eV). Le mécanisme radicalaire n'a donc pas lieu dans leur système où la longueur d'onde la plus courte est de 400 nm. Ils proposent que la lumière favorise la formation d'un trou (charge +) sur la surface qui pourrait réagir avec la liaison nucléophile de l'alcène pour former un β -carbocation. Ce carbocation serait ensuite capable de réagir avec un hydrure adjacent. Le mécanisme précis de la réaction d'hydrosilylation par irradiation dans l'UV demeure à ce jour mal compris.

Le greffage de molécules organiques par une voie radicalaire peut également être obtenue par des procédés électrochimiques. Parmi ces procédés, l'équipe de Chalviel a mis en œuvre l'utilisation de composés organomagnésiens [R-Mg-X] pour greffer des molécules organiques sur les surfaces de silicium [Dubois et al., 1997] [Ozanam et al., 1998] [Vieillard et al., 1996]. Dans ce cas, un courant anodique permet de créer un intermédiaire radicalaire provenant de la décomposition du réactif de Grignard [R-Mg-X]. Une autre méthode électrochimique a été étudiée par le groupe d'Allongue [Henry de Villeneuve et al., 1997] [Allongue et al., 2003] [Allongue et al., 1998]. Cette méthode consiste à réduire cathodiquement des sels de diazonium : un potentiel négatif est appliqué à l'échantillon dans une solution de sel de diazonium [ArN₂⁺] créant ainsi un radical aryle. Ce radical peut arracher un atome d'hydrogène à la liaison Si-H en formant le radical silyle Si(111)[•]. Des espèces aryles liées au silicium sont ainsi greffées par la formation d'une liaison silicium-carbone. Cette méthode qui consiste à appliquer un potentiel négatif au silicium permet de l'enrichir en électrons, évitant en principe l'oxydation de la surface, même en milieu aqueux.

Le greffage de molécules organiques par hydrosilylation ne requiert pas forcément d'utiliser un radical pour initier la réaction. La réaction est catalysée par des acides

de Lewis. Buriak et Allen ont d'abord réalisé la réaction d'hydrosilylation sur du silicium hydrogéné poreux à température ambiante avec des alcènes en présence du catalyseur $[\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-Al-Cl}_2]$ [Buriak & Allen, 1998] [Buriak et al., 1999] [Holland et al., 1999]. Puis elle a été faite sur du silicium atomiquement plan [Boukherroub et al., 1999]. Une autre méthode repose sur une procédure d'halogénéation/alkylation de la surface en deux étapes : l'alkylation se produit sur une surface de silicium terminée par des groupements halogénés. Les premiers travaux, de l'équipe de Lewis [Bansal et al., 1996] [Bansal & Lewis, 1998], consistaient à faire réagir des réactifs de Grignard sur une surface modifiée par des halogènes. Boukherroub et al. ont montré par ailleurs que des couches denses de chaînes alkyles peuvent être obtenues par la réaction d'un organomagnésien avec une surface Si(111)-H, cette réaction étant activée thermiquement [Boukherroub et al., 1999].

Toutes ces techniques permettent d'obtenir des surfaces de silicium fonctionnalisées par des molécules organiques, plus ou moins denses et ordonnées. Dans la plupart des cas, les alcènes sont utilisés pour le greffage par la réaction d'hydrosilylation. L'obtention d'une surface fonctionnalisée peut se faire de deux façons différentes : la molécule est soit fonctionnalisée puis greffée sur la surface [Buriak & Allen, 1998], soit d'abord greffée puis modifiée par une série de réactions [Boukherroub & Wayner, 1999]. La réaction d'hydrosilylation est très sélective, mais le groupement fonctionnel peut aussi réagir avec la surface de silicium hydrogéné. Ceci est le cas pour les alcools, les aldéhydes et les amines qui peuvent former une liaison Si-O-C ou Si-N-C. Jusqu'aux travaux récents de l'équipe de Chazalviel sur le greffage de molécules acides [Faucheux et al., 2006], on pensait que le groupement acide carboxylique pouvait réagir sur la surface de silicium hydrogéné. Cela constitue une des raisons pour lesquelles, au début de ce travail de thèse, nous avons choisi de greffer des molécules dont le groupement fonctionnel est un ester : l'ester ne réagit pas avec la surface de silicium hydrogéné. La voie de greffage thermique a été privilégiée. Les esters sont ensuite hydrolysés en acide carboxylique qui est modifié par la suite par plusieurs réactions chimiques. Cette procédure a été utilisée plusieurs fois pour l'étude de molécules biologiques ou pour la réalisation de biopuces [Wagner et al., 1997] [Strother et al., 2000a] [Strother et al., 2000b] [Yin et al., 2004].

Dans notre cas, l'élaboration de surfaces fonctionnalisées est un procédé multi-étapes qui consiste à terminer la couche organique greffée sur le silicium par une espèce chimique variable. Pour cela, nous avons mis au point un procédé qui permet de greffer, en bout de chaînes alkyles, des molécules contenant la fonction amine. Pour ce qui nous concerne, ces molécules sont la tyramine $[\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5\text{OH}]$ ou l'éthylènediamine $[\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2]$. Dans la suite de ce chapitre, nous nous sommes efforcés d'établir ce protocole.

2 Greffage d'une monocouche terminée par des esters

Pour obtenir la fonction chimique désirée *in fine* sur la surface, les molécules greffées lors de la première étape subissent ensuite une série de réactions chimiques. La qualité de la monocouche n'est pas améliorée par ces réactions chimiques et risque même d'être détériorée. Le greffage de la première monocouche a donc un rôle essentiel dans la fonctionnalisation de la surface. Il est nécessaire que les molécules s'organisent en une monocouche sans impureté, homogène et la plus dense possible. Plus la monocouche est dense, plus l'interface silicium-molécules organiques est protégée de l'eau et de l'oxygène, évitant ainsi son oxydation ultérieure. Ceci est un des points sur lequel nous avons porté nos efforts dans cette partie.

2.1 Le greffage de l'ester

La première étape de fonctionnalisation de la surface consiste à greffer des chaînes alkyles terminées par des fonctions esters. Comme nous l'avons vu au paragraphe 1.3, la réaction la plus utilisée pour le greffage de molécules organiques sur la surface de silicium hydrogéné est une réaction d'hydrosilylation. En résumé, cette réaction permet l'insertion d'une liaison insaturée carbone-carbone dans une liaison silicium-hydrogène (figure 2.5).

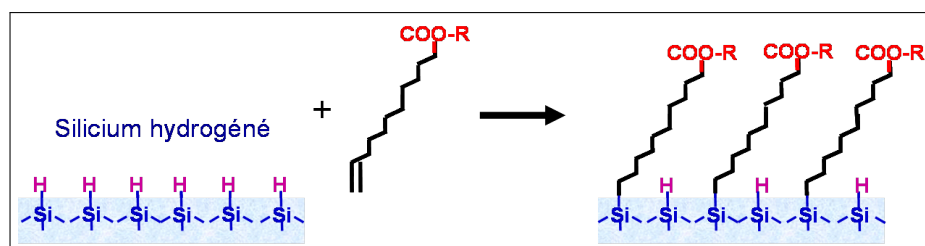


FIG. 2.5 – Réaction d'hydrosilylation sur la surface de silicium.

En présence d'un alcène, la surface de silicium hydrogéné réagit avec cette molécule pour former une liaison silicium-carbone. En revanche, la liaison Si-H est peu polaire et donc faiblement réactive. Dans ce cas, la réaction d'hydrosilylation nécessite d'être initiée. Ceci peut se faire de différentes façons : soit par voies thermiques [Linford et al., 1995] [Bateman et al., 1998] [Sieval et al., 1998] [Sieval et al., 2000b] [Sieval et al., 1999], soit par voies photochimiques [Terry et al., 1997a] [Boukherroub & Wayner, 1999], soit encore en présence

d'un catalyseur composé de chlorure d'éthyle d'aluminium [Buriak & Allen, 1998] [Buriak et al., 1999] [Holland et al., 1999] [Boukherroub et al., 1999]. Cette réaction d'hydrosilylation permet de créer une monocouche de molécules organiques sur la surface de silicium.

Pour des raisons d'encombrement stérique, tous les sites de Si-H de la surface de silicium ne réagissent pas avec l'alcène. Pour des chaînes alkyles, environ 50% des liaisons Si-H seulement pourraient être substituées, les autres restent inchangées [Sieval et al., 2000a] [Sieval et al., 2001]. La distance entre deux atomes de silicium sur la surface est de 3,84 Å. Les molécules que nous greffons sont constituées de chaînes alkyles dont la longueur varie entre 8 et 11 carbones. Le diamètre de ces molécules projeté sur la surface dépend de l'inclinaison et de la longueur de la chaîne. Il est d'environ 4,3 Å. On comprend bien que tous les sites de Si-H ne peuvent être occupés. Seules les petits groupements tels que les méthyles [Fidélis et al., 2000] peuvent occuper tous les sites Si-H de surface. Ceci est important pour comprendre que la fabrication de monocouches denses de molécules greffées est un problème difficile. Des études préliminaires [Faucheux, 2005] ont montré que la méthode de greffage par voie thermique est celle qui permet d'obtenir les couches les plus denses. Nous avons privilégié cette méthode de greffage de l'ester.

2.1.1 Le procédé expérimental

Pour garder les surfaces propres, il est essentiel que les ustensiles qui servent à la manipulation des produits et des surfaces tels que les pinces et la verrerie soient parfaitement nettoyés. Pour l'ensemble des expériences concernant les surfaces, la verrerie est lavée aux solvants (acétone ou éthanol) puis au détergent pendant au moins 20 mn et rincée soigneusement à l'eau ultra pure (milliQ) afin d'éliminer les traces de contaminations organiques. Pour éviter la formation d'une couche d'oxyde sur la surface de silicium, il est important de travailler toujours en milieu très sec, sans trace d'eau ni d'oxygène. La verrerie est donc séchée à l'étuve à 80°C pendant au moins une nuit avant utilisation.

La surface de silicium hydrogéné fraîchement préparée – pour éviter une oxydation de la surface (voir paragraphe 1.2) – est placée dans un Schlenk contenant le produit préalablement purifié par un passage sur une colonne de silice. Le Schlenk est chauffé à 120°C pendant au moins 20 min avec un barbotage d'argon de façon à éliminer les traces résiduelles d'eau et d'oxygène. Pour les solutions contenant de l'octène, cette étape est éliminée afin d'éviter l'évaporation de l'octène qui est très volatil. Le Schlenk est ensuite fermé de façon étanche avec une légère surpression d'argon et chauffé à une température de 220°C pendant au moins 20h. Ce temps de

greffage est important pour la compacité de la monocouche. Nous avons remarqué que l'interface a tendance à s'oxyder moins rapidement lors des étapes chimiques qui suivent lorsque le temps de greffage est long. Nous reviendrons sur ce point lors de l'étape d'hydrolyse de l'ester (paragraphe 3).

Les alcènes utilisés pour la fonctionnalisation des surfaces (octène, décène, undécylénate d'éthyle $[\text{CH}_2=\text{CH}-(\text{CH}_2)_8-\text{COOC}_2\text{H}_5]$ et acide undécylénique $[\text{CH}_2=\text{CH}-(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}]$) proviennent du fournisseur Aldrich. Les produits utilisés sont liquides et ont la pureté la plus élevée proposée par le fournisseur. Pour autant, cette pureté n'est pas toujours suffisante. Les traces d'impuretés – de peroxydes par exemple – aussi infimes soient-elles, gênent le greffage d'une monocouche propre et/ou homogène chimiquement. Avant chaque utilisation, les produits sont passés sur une colonne de silice afin d'éliminer l'eau et les impuretés (peroxydes) éventuellement présentes dans les solutions. La silice est du Florisil® qui est utilisée avec du pentane de qualité HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) comme éluant. Sur la figure 2.6, l'image AFM de gauche (figure 2.6 -(a)) correspond à une surface greffée avec de l'undécylénate d'éthyle qui n'est pas purifié sur colonne de silice : la surface est sale, on observe des impuretés accrochées à la surface. Sur l'image de droite (figure 2.6 -(b)), le produit de greffage utilisé est purifié sur colonne de silice : dans ce cas la topographie de la surface est identique à celle d'une Si-H, la monocouche de molécules esters est parfaitement homogène. Ce procédé améliore nettement la propreté des surfaces.

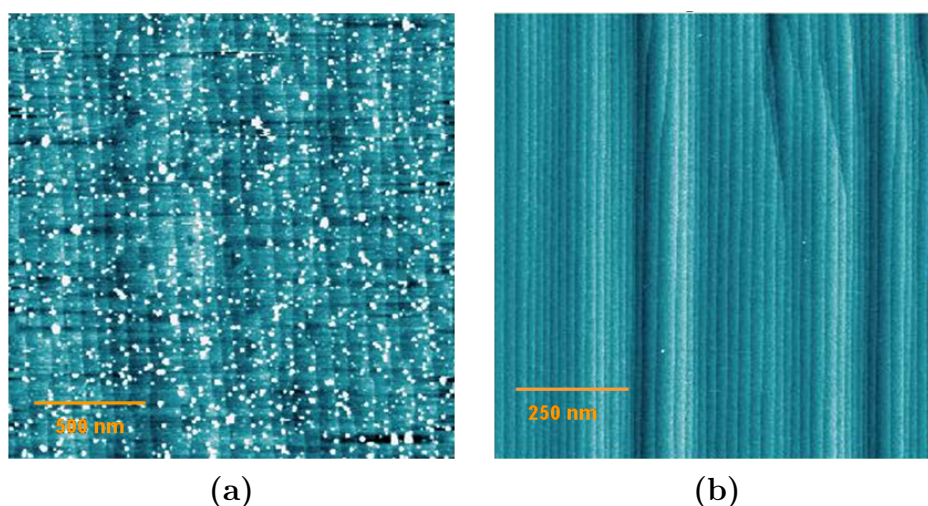


FIG. 2.6 – Images en microscopie à force atomique de deux surfaces terminées par un ester : (a) Le produit de greffage utilisé est l'undécylénate d'éthyle $[\text{CH}_2=\text{CH}-(\text{CH}_2)_8-\text{COOC}_2\text{H}_5]$ du fournisseur. (b) Le même produit est passé sur colonne de Florisil® avant utilisation.

Une fois le greffage terminé, le Schlenk est refroidi jusqu'à température ambiante, la surface est sortie du Schlenk puis rincée aux solvants : d'abord tétrahydrofuranne puis dichlorométhane. Cette étape de rinçage est essentielle dans la propreté de la surface.

2.1.2 L'importance des rinçages de surface

Les réactions chimiques que nous pratiquons sur la surface du silicium sont bien maîtrisées en phase homogène mais elles deviennent beaucoup plus difficiles à mettre en œuvre dès lors qu'on souhaite les effectuer sur une surface. La difficulté n'est pas de séparer des produits différents mais bien de séparer deux phases différentes : une surface de silicium solide du reste du liquide. Le choix des produits de rinçage est alors crucial et dépend fortement de leurs interactions avec la fonctionnalité chimique de la surface.

Les produits de rinçage doivent être d'une extrême pureté. Des traces résiduelles (par exemple des peroxydes dans le tétrahydrofuranne) seraient capables d'interagir avec la surface et de se physisorber. La qualité de tous les solvants est alors choisie HPLC. D'autre part, il est important que la molécule greffée sur la surface soit soluble dans le solvant de rinçage. Les molécules organiques qui restent physisorbées sur la surface après le greffage sont ainsi solubilisées dans le solvant et décrochées de la surface. Il ne reste sur la surface que les molécules liées de façon covalente. Enfin, terminer les rinçages par un solvant volatil permet de ne pas laisser de molécules de solvant physisorbées. On peut ainsi utiliser une série de solvants miscibles les uns avec les autres, en commençant avec un bon solvant pour la molécule greffée et en terminant par un solvant assez volatil pour ne pas en laisser sur la surface. À la fin du greffage de l'ester, la surface est rincée dans du tétrahydrofuranne suivi du dichlorométhane.

2.1.3 Identification de l'ester sur la surface

Pour s'assurer que le greffage a bien été réalisé et que la fonctionnalité chimique de la surface est bien celle qui est attendue, nous utilisons la technique de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Cette méthode vibrationnelle permet de sonder la nature des liaisons interatomiques engagées sur la surface de silicium (voir Annexe B). Pour observer les liaisons interatomiques des molécules organiques, le spectre FTIR correspondant à la surface modifiée est divisé par le spectre d'une surface de référence. Dans notre cas, la surface de référence est du silicium hydrogéné. Les spectres FTIR sont montrés en absorbance. Cela correspond

à des pics positifs pour les espèces qui apparaissent sur la surface mesurée et des pics négatifs pour les espèces qui disparaissent par rapport à la surface de référence. Selon la loi de Beer-Lambert, l'intensité d'une onde se propageant dans un milieu semi infini selon la direction x s'écrit :

$$I(x) = I_o \cdot e^{-\alpha \cdot x}$$

où I_o est l'intensité du faisceau incident et α est le coefficient d'absorption du milieu, proportionnel à la densité d'espèces absorbantes. On a $\alpha = \sigma \cdot N_{vol}$ où N_{vol} est la densité des espèces en cm^{-3} et σ est la section efficace des molécules absorbantes en cm^2 qui dépend de la longueur d'onde λ .

Dans le cas d'une couche d'épaisseur d , l'intensité de l'onde mesurée après avoir traversé la couche peut être écrite :

$$\begin{aligned} I_{mes} &= I_o \cdot e^{-\alpha \cdot d} \\ I_{mes} &= I_o \cdot e^{-\sigma(\lambda) \cdot N_{vol} \cdot d} \end{aligned}$$

dans ce cas, $N_{vol} \cdot d$ correspond à la densité surfacique des espèces N_s . Avec : $N_{vol} \cdot d = N_s$, on obtient finalement :

$$I_{mes} = I_o \cdot e^{-\sigma(\lambda) \cdot N_s}$$

Ainsi, l'intensité du faisceau infrarouge mesurée après avoir traversé une surface de Si-H est :

$$I_{Si-H} = I_o \cdot e^{-\sigma_{Si-H}(\lambda) \cdot N_{s,Si-H}}$$

et celle mesurée après avoir traversé la surface greffée par les molécules organiques s'écrit :

$$I_{mol} = I_o \cdot e^{-\sigma_{mol}(\lambda) \cdot N_{s,mol}}$$

La fonction représentée par le spectre en absorbance est :

$$f(\lambda) = -\ln(I_{mol}/I_{SiH})$$

donc

$$f(\lambda) = \sigma(\lambda)_{mol} \cdot N_{s,mol} - \sigma_{Si-H}(\lambda) \cdot N_{s,Si-H}$$

Ainsi les espèces qui ont disparu ont des valeurs négatives d'absorbance tandis que les espèces qui sont apparues sur la surface mesurée ont des valeurs positives d'absorbance.

L'allure générale des spectres n'est pas la même pour les différentes espèces greffées. La figure 2.7 représente le spectre FTIR d'une surface de silicium hydrogénée

greffée avec des molécules d'undécylénate d'éthyle. Le spectre de référence est celui d'une surface Si-H préparée dans du NH_4F .

On observe un pic étroit à 2083 cm^{-1} correspondant à la disparition partielle des liaisons Si-H qui ont été substituées par les molécules greffées lors du traitement de la surface hydrogénée idéale Si(111). Sur les terrasses de silicium (111) hydrogénée,

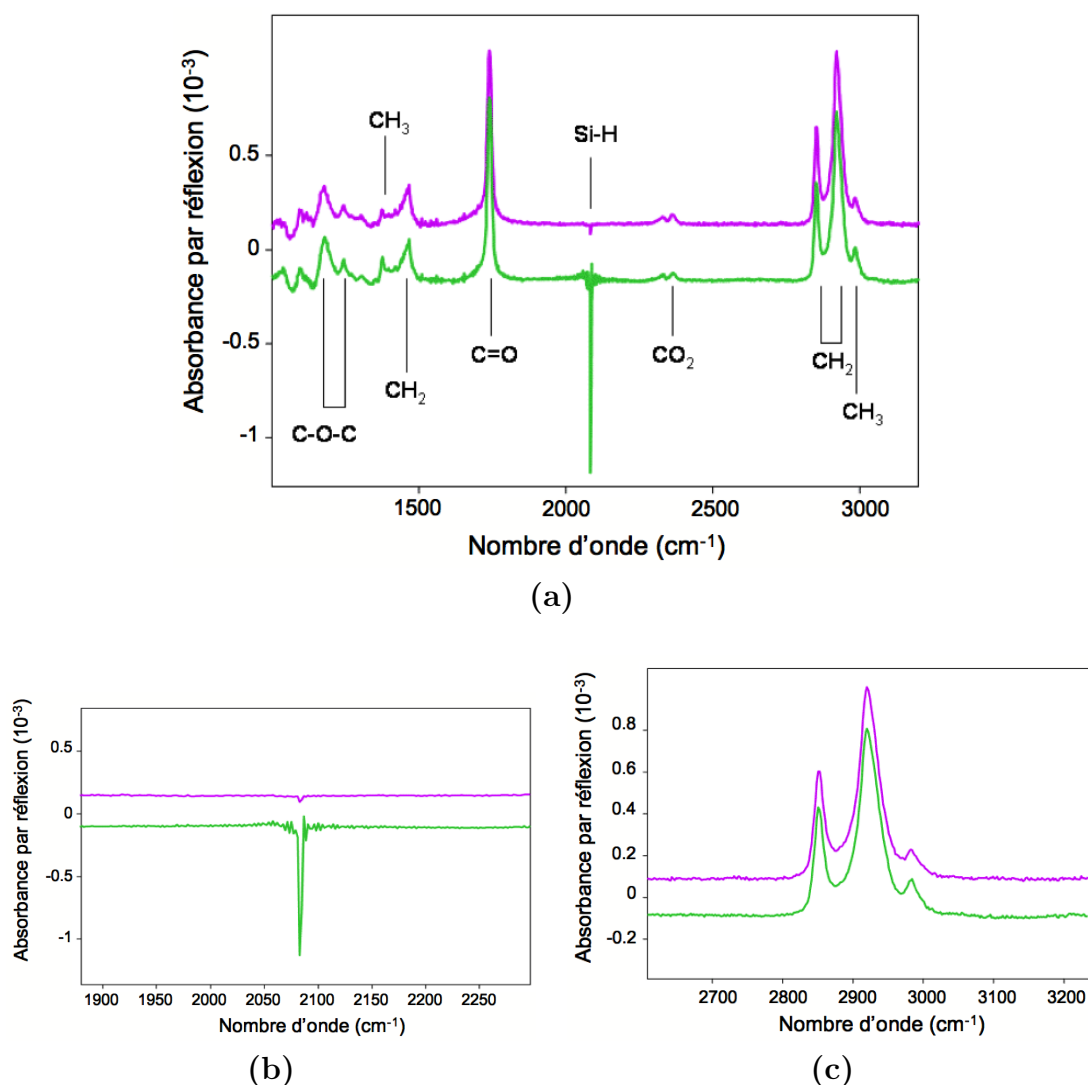


FIG. 2.7 – (a) Spectres en géométrie ATR d'une surface de silicium greffée à partir des molécules d'undécylénate d'éthyle en polarisation s (en haut) et p (en bas). La surface de référence est une surface de silicium hydrogénée. (b) Détail du spectre autour des vibrations des liaisons Si-H. (c) Détail du spectre autour des vibrations des groupements CH_2 et CH_3 .

il n'y a qu'une seule liaison Si-H par atome de silicium et celle-ci est en moyenne perpendiculaire à la surface [Higashi et al., 1990]. La vibration d'élongation (ν Si-H à 2083 cm^{-1}) ne devrait donc être détectée qu'en polarisation p. Sur la figure 2.7 -(b), on remarque un pic centré à 2083 cm^{-1} qui est très intense en polarisation p et faible en polarisation s. Il peut y avoir plusieurs explications à la présence d'un signal faible en polarisation s. Expérimentalement, le polariseur peut être légèrement désorienté ce qui entraîne que la polarisation s n'est pas strictement perpendiculaire au plan d'incidence du faisceau. Plus intrinsèquement, sur une surface vicinale, le bord des marches de la surface de silicium peut également induire une déformation locale du champ, ou cela peut encore correspondre à la contribution des liaisons Si-H des bords de marches qui ne sont pas normales à la surface. L'intensité du pic en polarisation p, comparée à celle en polarisation s, montre que les liaisons Si-H sont majoritairement perpendiculaires à la surface. Si on regarde de plus près dans la région des liaisons Si-H, il apparaît également un pic positif plus large vers 2070 cm^{-1} . Ce pic correspond aux liaisons Si-H non substituées par l'undécylénate d'éthyle. L'élargissement du pic est dû aux interactions avec les molécules greffées.

Les pics situés entre 2320 et 2389 cm^{-1} sont associés à la présence de CO_2 atmosphérique résiduel en quantité différente lors de la mesure de la surface de référence et lors de celle de la mesure de la surface modifiée.

Les intensités des pics CH_2 varient selon la longueur de la chaîne alkyle des molécules greffées. Dans le cas du greffage de l'undécylénate d'éthyle, les 10 CH_2 de la chaîne alkyle ainsi que celui contenu dans le groupement ester contribuent à l'intensité de ces pics (figure 2.7 -(c)). Les pics autour de 2850 cm^{-1} et 2920 cm^{-1} correspondent respectivement aux modes d'élongation symétrique et antisymétrique des liaisons C-H des groupements méthylènes CH_2 . On retrouve un pic correspondant à la déformation des CH_2 (δCH_2) avec le pic moins intense à 1465 cm^{-1} . Les pics autour de 2870 cm^{-1} et 2984 cm^{-1} correspondent respectivement aux modes d'élongation symétrique et antisymétrique des liaisons C-H dans le groupement méthyle CH_3 du groupement ester. De même, on retrouve la déformation symétrique des CH_3 avec le pic autour de 1374 cm^{-1} ; la déformation antisymétrique étant à 1450 cm^{-1} , son pic est confondu avec le pic des δCH_2 .

Sur le spectre du produit (figure 2.8) on observe les pics de l'élongation de la liaison alcène $\text{C}=\text{C}$ autour de 1641 cm^{-1} et le pic de l'élongation antisymétrique de la liaison C-H des groupements vinyliques autour de 3077 cm^{-1} (le pic d'élongation symétrique correspondant est certainement noyé dans le massif des C-H de la chaîne alkyle). Ces pics n'apparaissent pas sur le spectre de la surface greffée (figure 2.7 -(a)). Ceci indique que les molécules sont greffées de façon covalente et qu'elles ne sont pas physisorbées sur la surface, bien que le rapport signal sur bruit empêche

d'exclure totalement la présence de quelques molécules physisorbées. On observe la vibration d'élongation de la liaison carbonyle autour de 1740 cm^{-1} sur le spectre de la surface greffée, signature de la présence d'ester (figure 2.8). Ceci est conforté par la présence de 2 pics autour de 1175 cm^{-1} et 1243 cm^{-1} correspondant à l'absorption de la liaison C-O-C du groupement ester sur la surface.

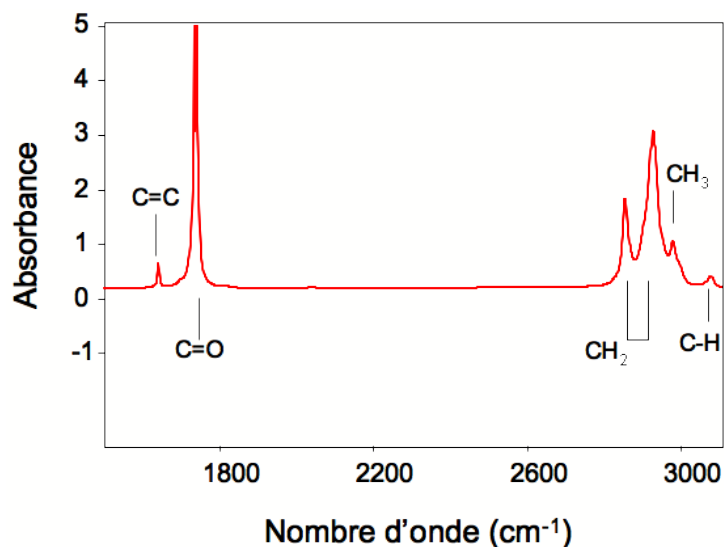


FIG. 2.8 – Spectre FTIR de l'undécylénate d'éthyle pur mesuré en transmission entre deux lames de BaF₂. Ce spectre donne la position des pics d'absorbance des molécules.

Sur le spectre de la figure 2.7, entre 1000 et 1100 cm^{-1} il est difficile de déterminer la ligne de base de façon exacte : le spectre est assez perturbé par les pics voisins. Pour autant, on observe que les variations d'amplitude sont très faibles. L'épaisseur d'oxyde de silicium formé à la surface peut être calculée à partir de l'amplitude du pic d'oxyde [daFonseca et al., 1996]. Ici, le pic (s'il existe) est mal défini. Toutefois, les variations du spectre entre 1000 et 1100 cm^{-1} permettent de déterminer une borne supérieure à l'épaisseur équivalente de la couche d'oxyde. On trouve $0,1\text{ \AA}$. Ceci correspondrait à 4.10^{13} atomes d'oxygène par cm^2 . Cette quantité est très faible et peu de techniques de greffage permettent de préserver à ce point la surface de l'oxydation.

La spectroscopie infrarouge est une technique très puissante qui peut apporter des informations quantitatives et cruciales sur la densité moléculaire des couches greffées. Il convient de déterminer la section efficace des molécules greffées et nous devons pour cela faire une calibration de l'intensité infrarouge des molécules en solution.

2.2 La calibration de l'ester

La spectroscopie infrarouge permet de connaître la densité de molécules organiques greffées sur la surface à partir de l'absorbance de leurs pics caractéristiques [Faucheux et al., 2006]. Il est nécessaire de faire une calibration de l'intensité infrarouge des molécules en mesurant l'intégrale des pics caractéristiques pour des concentrations connues en molécules au sein d'un liquide simulant au mieux l'environnement diélectrique des molécules sur la surface. Dans notre cas, nous nous intéressons à la raie à 1743 cm^{-1} de la liaison C=O des groupements esters ainsi qu'à une raie correspondant à un mode de vibration des CH_2 des chaînes alkyles. On choisit pour cela de calibrer l'absorption infrarouge d'une solution d'undécanoate d'éthyle dans le dodécane. Ce choix paraît raisonnable pour les vibrations CH_2 , car les groupements méthyles sont situés au sein d'un environnement d'hydrocarbures saturés sur la surface comme dans la solution. Cela est plus discutable pour les liaisons C=O qui sont situées à l'interface couche/air à la surface. Pour la calibration des vibrations CH_2 , il convient pour cela de décorrélérer les différents modes de vibration. La raie à 2850 cm^{-1} est celle pour laquelle la valeur de l'intégrale est la moins sensible aux erreurs d'ajustement, elle est donc choisie pour l'analyse de la surface. La densité des chaînes greffées sur la surface est obtenue en comparant les intensités des pics correspondant à la mesure en solution à celles des pics correspondant à la mesure de la monocouche greffée sur la surface.

La procédure expérimentale consiste à utiliser une cellule contenant une solution de molécules dont on veut déterminer la section efficace. Un des côtés de la cellule est un prisme de silicium comportant de l'oxyde natif préalablement nettoyé dans une solution piranha ($\text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{SO}_4$) (1 : 2) pendant au moins 20 min (pour éliminer toutes les contaminations organiques) puis rincé à l'eau ultra pure (milliQ). Le faisceau infrarouge parcourt la surface de silicium en géométrie ATR (Attenuated Total Reflection), ce qui permet de sonder le liquide adjacent à la surface sur une épaisseur δ . Cette épaisseur δ est la longueur d'atténuation de l'onde évanescente. La calibration de l'intensité infrarouge des molécules telle que nous l'aborderons est réalisable dans la mesure où l'indice du milieu liquide ne varie pas trop et où sa composante complexe affecte δ de façon négligeable (voir Annexe B et [Faucheux et al., 2006]). Les molécules calibrées sont donc diluées dans le dodécane pour assurer la validité des conditions portant sur l'indice de réfraction. Dans ce cas, l'undécanoate d'éthyle [$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_9-\text{COOC}_2\text{H}_5$] est dilué à 1% dans le dodécane.

La figure 2.9 représente les spectres FTIR dans la région de la liaison C=O (figure 2.9 -(a)) et dans la région des liaisons C-H (figure 2.9 -(b)) de l'undécanoate d'éthyle dilué à 1% dans le dodécane.

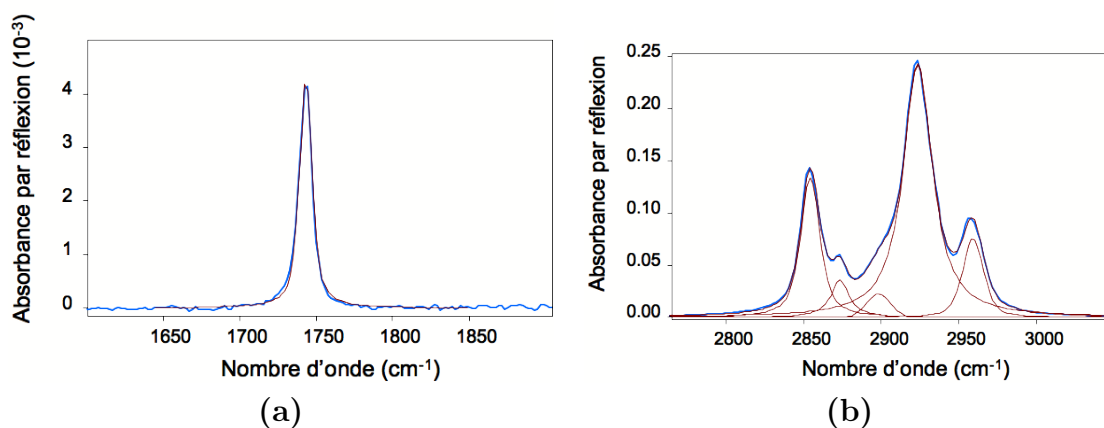


FIG. 2.9 – Spectres FTIR en géométrie ATR et en polarisation p d'une solution d'undécanoate d'éthyle à 1% (en volume) dans du dodécane. La surface de référence est l'oxyde de silicium natif. (a) Pic du C=O de la liaison carbonyle à 1743 cm^{-1} avec la fonction de Voigt qui s'ajuste sur le spectre. (b) Pics des liaisons CH avec les 5 fonctions de Voigt qui s'ajustent sur le spectre et qui correspondent aux différents modes de vibration des molécules.

Le pic de la liaison C=O de l'ester (figure 2.9 -(a)) est ajusté avec une fonction de Voigt centrée autour de 1740 cm^{-1} (une ligne de base linéaire est ajustée simultanément). L'intégrale évaluée de 1675 à 1825 cm^{-1} du pic vaut $0,036\text{ cm}^{-1}$ pour la polarisation s.

Les pics correspondant à l'élongation des liaisons C-H de la chaîne alkyle (figure 2.9 -(b)) sont ajustés avec 5 fonctions de Voigt. Deux d'entre elles sont centrées autour d'environ 2850 et 2920 cm^{-1} correspondant respectivement aux vibrations d'élongations symétrique et antisymétrique des groupements méthylènes CH_2 . Deux autres sont centrées sur d'environ 2870 et 2960 cm^{-1} correspondant respectivement aux vibrations d'élongations symétrique et antisymétrique des groupements méthyles CH_3 en fin de chaînes alkyles. Une cinquième fonction centrée autour d'environ 2900 cm^{-1} correspond à la deuxième harmonique du pic de déformation des δCH_2 à 1465 cm^{-1} , augmenté par résonance de Fermi avec le pic d'élongation symétrique des CH_2 à 2850 cm^{-1} [Ward et al., 1994]. Une ligne de base linéaire est ajustée en même temps que les fonctions de Voigt. Les valeurs des intégrales des pics obtenues autour de 1740 et 2850 cm^{-1} sont prises comme référence quantitative de l'adsorption des modes νCO et $\nu_s\text{CH}_2$ pour la quantité (connue) de molécules sondées dans le liquide.

On peut, avec la même décomposition, ajuster les spectres des couches greffées

en surface. Les valeurs des intégrales des vibrations considérées (autour de 1740 et 2850 cm^{-1}) permettent de déterminer deux quantités caractéristiques : N_{\parallel} et N_{\perp} . Ces quantités sont liées à la valeur de la projection du dipôle dynamique du mode considéré dans le plan et sur la normale à la surface greffée (voir Annexe B). Pour un angle d'incidence de 47°, on obtient :

$$N_{\parallel} = 1,1 \cdot 10^{16} \cdot \text{Abs}_s \quad (2.1)$$

$$N_{\perp} = 1,0 \cdot 10^{16} \cdot (2,03 \cdot \text{Abs}_p - 1,85 \cdot \text{Abs}_s), \text{ pour les C=O} \quad (2.2)$$

et :

$$N_{\parallel} = 1,7 \cdot 10^{17} \cdot \text{Abs}_s \quad (2.3)$$

$$N_{\perp} = 1,6 \cdot 10^{17} \cdot (2,03 \cdot \text{Abs}_p - 1,85 \cdot \text{Abs}_s), \text{ pour les CH}_2 \quad (2.4)$$

où Abs_s et Abs_p sont les valeurs des intégrales des pics des espèces greffées sur la surface (soit des C=O soit des C-H) respectivement en polarisation s et p, et où les coefficients numériques sont obtenus à partir de la mesure de calibration dans le mélange dodécane/undécanoate d'éthyle (voir Annexe B).

N_{\parallel} et N_{\perp} permettent de déterminer le nombre total de dipôles greffés sur la surface par la relation : $N = N_{\parallel} + N_{\perp}$. À l'aide des spectres de la figure 2.7, on obtient les valeurs récapitulées dans le tableau 2.1, ce qui permet de déterminer la quantité de chaînes ester greffées sur la surface.

C=O	Abs_s (cm^{-1})	Abs_p (cm^{-1})	N_{\parallel} (cm^{-2})	N_{\perp} (cm^{-2})	Densité de groupements esters greffés (cm^{-2})
ester	0,021	0,023	$2,2 \cdot 10^{14}$	$7,8 \cdot 10^{13}$	$3,0 \cdot 10^{14}$

TAB. 2.1 – Valeurs des intégrales et des densités d'espèces greffées sur la surface. Ces valeurs sont calculées à partir des intégrales des pics C=O et des formules 2.1 et 2.2.

Sur une surface de silicium (111), la densité d'atomes de silicium est de $7,8 \cdot 10^{14} \text{ cm}^{-2}$. La densité de chaînes greffées obtenue par la mesure de la densité de liaisons C=O est de $3,0 \cdot 10^{14} \text{ cm}^{-2}$, le taux de couverture de la surface lors du greffage de molécules d'ester est donc d'environ 38%.

De la même manière, on peut obtenir le nombre de chaînes greffées sur la surface en utilisant la calibration des groupements CH_2 . À partir des spectres de la figure 2.7 -(c), on obtient les valeurs rassemblées dans le tableau 2.2 :

C-H	Abs _s (cm ⁻¹)	Abs _p (cm ⁻¹)	N (cm ⁻²)	N _⊥ (cm ⁻²)	Densité de groupements CH ₂ greffés (cm ⁻²)	Densité totale de chaînes esters greffées (cm ⁻²)
ester	0,0125	0,0135	2,3.10 ¹⁵	7,5.10 ¹⁴	3,1.10 ¹⁵	3,1.10 ¹⁴

TAB. 2.2 – Valeurs des intégrales et des densités de dipôles greffés sur la surface. Ce calcul est obtenu à partir des valeurs des pics de C-H et des formules 2.3 et 2.4.

On remarque que la densité de chaînes ainsi déterminée est très proche de celle mentionnée au tableau 2.1.

En conclusion, la densité surfacique de la monocouche greffée 100% ester est d'environ 3.10¹⁴ molécules cm⁻². Cette valeur est obtenue par deux calibrations indépendantes portant sur la mesure de la densité des liaisons C=O et des liaisons C-H et qui donnent le même résultat à moins de 10% près. Ceci permet d'être confiant sur la qualité du résultat obtenu.

2.3 Le greffage de couches mixtes

Il est possible de greffer des molécules organiques qui ont toutes la même fonction chimique comme sur les surfaces esters précédemment étudiées. Pour rendre les sites fonctionnels plus accessibles à l'échelle moléculaire ou même pour améliorer la compacité des monocouches, il est avantageux de mélanger les molécules esters à du décène ou de l'octène lors de la réaction. Ainsi les groupements esters sont dilués sur la surface au milieu de molécules dont la fonction n'est pas modifiable par les étapes chimiques qui suivent.

En mélangeant l'undécylénate d'éthyle à l'octène ou au décène, on espère obtenir une surface où les molécules fonctionnelles sont réparties au sein d'une couche dense. Ces molécules alcènes sont également capables de faire une réaction d'hydrosilylation sur la surface de Si-H. Toutefois, rien ne garantit que les propriétés des monocouches mixtes ester/décène ou ester/octène soient les mêmes que celles des 100% ester : par exemple, leur compacité peut changer. On peut aussi se demander si la stoechiométrie de la monocouche respecte celle de la solution de greffage et si la répartition spatiale des molécules est homogène.

La figure 2.10 représente les différents spectres obtenus dans le cas des surfaces mixtes 100% ester, 50% ester, 25% ester et 10% ester en volume, l'ester étant dilué dans du 1-décène $[\text{CH}_2=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3]$.

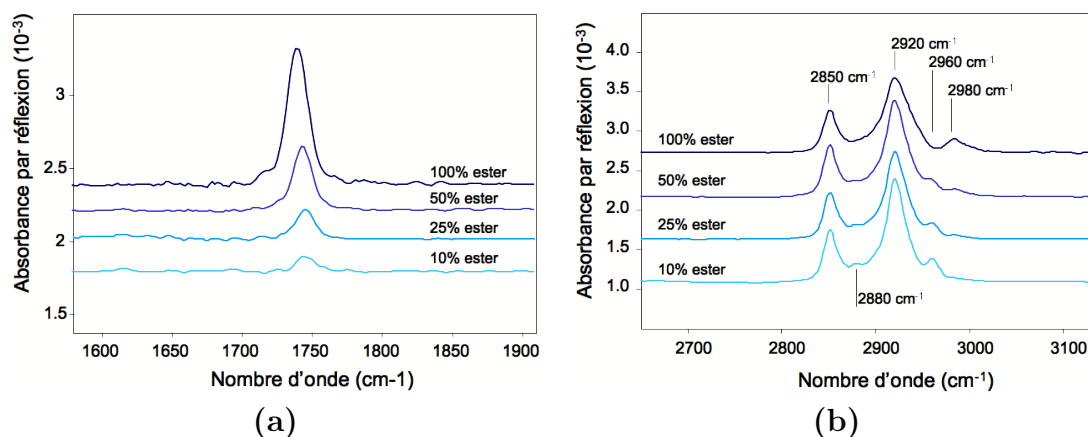


FIG. 2.10 – Spectres FTIR en géométrie ATR des différentes surfaces mixtes un-décylénate d'éthyle/décène. (a) Région du C=O pour les différentes dilutions. (b) Région des C-H pour les différentes dilutions.

L'allure générale des spectres des surfaces d'esters dilués dans des chaînes alkyles (figure 2.10) est la même que celle du spectre 100% ester : elle est dominée par les vibrations caractéristiques des chaînes méthylènes. Seules les petites contributions associées à la terminaison des chaînes varient. Ainsi le pic autour de 2984 cm^{-1} venant des CH_3 des groupements esters diminue avec la dilution de l'ester, pendant que les intensités des pics autour de 2961 et 2878 cm^{-1} augmentent (figure 2.10 -(b)). Ces derniers proviennent des vibrations d'élongation des groupements CH_3 présents en bout de chaînes décyles. D'autre part, l'intensité du pic de la liaison carbonyle C=O centré autour de 1740 cm^{-1} diminue progressivement lors de la dilution de l'ester dans le décène (figure 2.10 -(a)).

La figure 2.11 représente les nombres d'onde caractéristiques et la valeur de l'intégrale du pic de la liaison C=O de l'ester en fonction de sa dilution dans le décène, dans la solution de greffage.

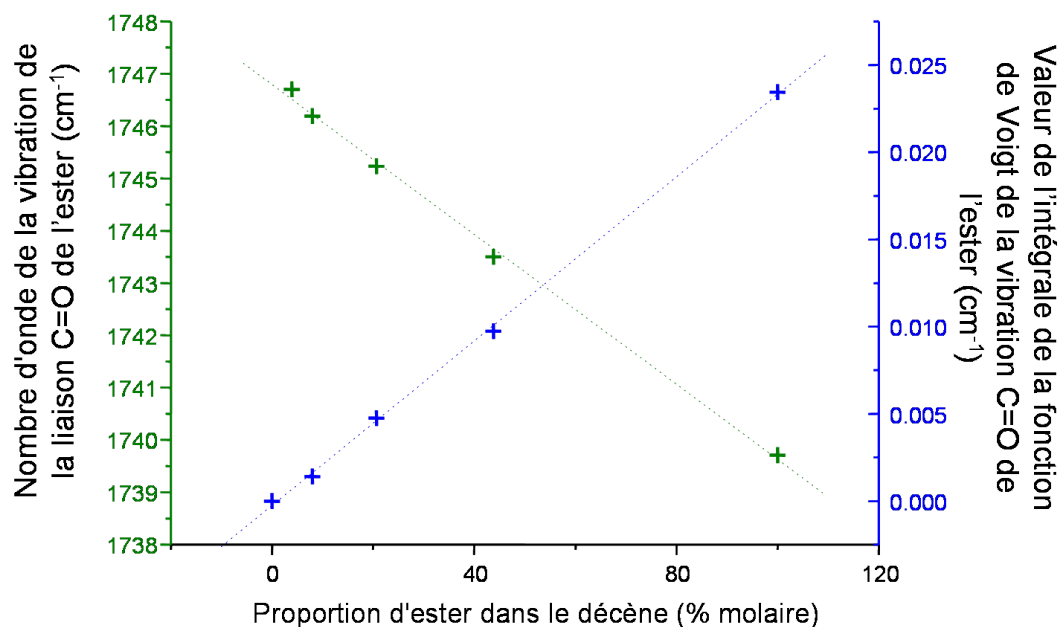


FIG. 2.11 – Représentation graphique de la position ainsi que de la valeur de l'intégrale du pic de la vibration de la liaison C=O de l'ester en fonction de sa dilution dans le décène.

Pour une solution à 5% d'ester, le nombre d'onde du pic de la liaison carbonyle est de $1746,7 \text{ cm}^{-1}$. Cette valeur décroît linéairement avec l'augmentation de la quantité d'ester dans la solution pour atteindre $1739,7 \text{ cm}^{-1}$ pour une surface greffée avec 100% d'ester. Le décalage du nombre d'onde caractéristique de la liaison carbonyle de l'ester est un effet de la dilution des fonctions esters au milieu du décène³ [Liu et al., 2004]. La valeur du nombre d'onde de la vibration de la liaison C=O de l'ester donne ainsi une indication sur la compacité de la couche : plus les molécules d'ester sont denses et plus leur énergie de vibration est faible. D'autre part, la diminution linéaire du nombre d'onde de la vibration C=O en fonction de la concentration d'ester dans la solution de greffage révèle peut-être une dilution d'ester homogène sur la surface et non pas la formation de domaines. Si les molécules d'ester étaient organisées en domaines au milieu des chaînes décyles, seules les molécules de bords de domaines seraient sensibles à un changement d'environnement et la diminution ne serait pas linéaire.

³Cette propriété n'était pas observée chez Liu et al.

On remarque également que la valeur de l'intégrale de la fonction de Voigt de la vibration C=O de l'ester augmente de façon linéaire. Pour étudier ce phénomène plus précisément, il convient de faire les mesures FTIR en polarisation s et p. Ces mesures ont été effectuées pour une dilution de l'ester dans l'octène. Tout comme dans le paragraphe précédent, il est alors possible de déterminer le nombre de groupements esters ainsi que le nombre de CH₂ présents sur la surface en fonction des proportions d'ester dans la solution. Le tableau 2.3 est un récapitulatif des densités de fonctions esters greffées sur la surface lors de la dilution de l'ester dans l'octène [CH₂=CH-(CH₂)₅-CH₃]; ces densités sont obtenues par la mesure de l'intégrale des pics de la liaison C=O de l'ester en polarisation s et p.

C=O	Abs _s (cm ⁻¹)	Abs _p (cm ⁻¹)	N (cm ⁻²)	N _⊥ (cm ⁻²)	Densité de groupements esters greffés (cm ⁻²)	Densité de CH ₂ apportés par les chaînes esters (cm ⁻²)
100% ester	0,021	0,023	2,2.10 ¹⁴	7,8.10 ¹³	3,0.10 ¹⁴	3,0.10 ¹⁵
50% ester	0,0080	0,0103	8,7.10 ¹³	6,1.10 ¹³	1,5.10 ¹⁴	1,5.10 ¹⁵
25% ester	0,0040	0,0048	4,3.10 ¹³	2,4.10 ¹³	6,7.10 ¹³	6,7.10 ¹⁴
10% ester	0,0021	0,0017	1,8.10 ¹³	1,1.10 ¹³	3,0.10 ¹³	3,0.10 ¹⁴

TAB. 2.3 – Valeurs des intégrales et des densités de liaisons C=O d'ester greffés sur la surface en fonction de la dilution volumique du produit dans l'octène. Ce calcul est obtenu à partir des valeurs des intégrales des pics de C=O.

Les groupements esters sont situés en bout de chaînes alkyles constituées de 10 groupements CH₂. Le tableau 2.3 permet d'obtenir la densité de groupements esters greffés sur la surface, on peut ainsi en déduire la densité de CH₂ apportés par les chaînes d'undécylénate d'éthyle.

Par ailleurs, la calibration des groupements CH₂ via l'intégration du pic centré autour de 2850 cm⁻¹ permet d'obtenir la densité totale de CH₂ greffés sur la surface. Ces résultats sont récapitulés dans les premières colonnes du tableau 2.4.

C-H	Abs _s (cm ⁻¹)	Abs _p (cm ⁻¹)	N (cm ⁻²)	N _⊥ (cm ⁻²)	Densité de groupements CH ₂ greffés (cm ⁻²)	Densité totale de chaînes greffées (cm ⁻²)
100% ester	0,0125	0,0135	2,3.10 ¹⁵	7,5.10 ¹⁴	3,1.10 ¹⁵	3,1.10 ¹⁴
50% ester	0.0121	0.0128	2,2.10 ¹⁵	6.4 ¹⁴	2,9.10 ¹⁵	3,5.10 ¹⁴
25% ester	0.0122	0.0126	2,2.10 ¹⁵	5.3 ¹⁴	2,8.10 ¹⁵	3,7.10 ¹⁴
10% ester	0.0094	0.0114	1,7.10 ¹⁵	1.10 ¹⁵	2,7.10 ¹⁵	3,8.10 ¹⁴
Octène	0.0113	0.012	2,1.10 ¹⁵	6,1.10 ¹⁴	2,7.10 ¹⁵	3,8.10 ¹⁴
Décène	0.0138	0.0148	2,5.10 ¹⁵	7,9.10 ¹⁴	3,3.10 ¹⁵	3,7.10 ¹⁴

TAB. 2.4 – Valeurs des intégrales et des densités des liaisons CH apportées par les chaînes greffées sur la surface en fonction de la dilution volumique dans l'octène. Ce calcul est obtenu à partir des valeurs des intégrales des pics de C-H. À partir de là, la dernière colonne donne la densité totale de chaînes greffées en utilisant le nombre de chaînes ester greffées en surface.

En faisant la différence entre les groupements CH₂ apportés par les chaînes d'undécylénate d'éthyle (dernière colonne du tableau 2.4) et la densité totale de CH₂ greffés, on obtient la densité de CH₂ apportés par les chaînes octènes, donc la densité de chaînes octènes. La densité totale de chaînes greffées sur la surface est obtenue par la somme de la densité de chaînes esters et de chaînes octènes. Ce résultat est récapitulé dans la dernière colonne du tableau 2.4.

Dans la première colonne du tableau 2.4, la dilution de l'ester dans l'octène est exprimée en pourcentage volumique. Il semble plus pertinent de l'exprimer en fonction du pourcentage molaire. Pour convertir le pourcentage volumique en pourcentage molaire, il convient de considérer la différence de masses molaires et de densités de l'undécylénate d'éthyle et de l'octène. La masse molaire de l'undécylénate d'éthyle est de 212,33 g.mol⁻¹ et sa densité est de 0,879 g.ml⁻¹ et la masse molaire de l'octène est de 112,21 g.mol⁻¹ et sa densité est de 0,715 g.ml⁻¹. Le rapport de la concentration de l'ester sur l'octène est alors de 0,65 et la fraction molaire de l'ester dans l'octène devient :

$$Y = \frac{0,65X}{(1 - 0,35X)}$$

où Y est la fraction molaire d'ester dans l'octène et X la fraction volumique.

La figure 2.12 représente graphiquement cette densité totale de chaînes greffées sur la surface.

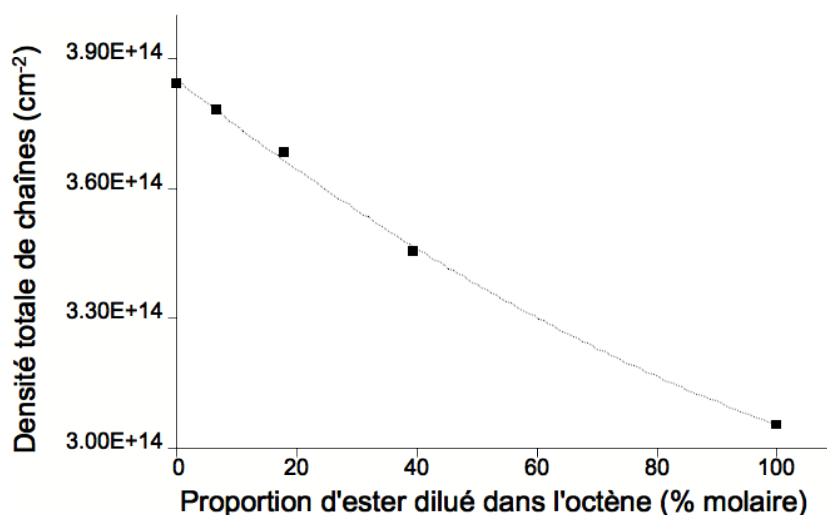


FIG. 2.12 – Densité totale de chaînes greffées sur la surface en fonction de la proportion molaire d'ester dans la solution de greffage.

Sur cette figure (figure 2.12), on remarque que la densité de la monocouche greffée augmente avec la quantité d'octène dans la solution. Cette augmentation n'est pas linéaire. Les molécules d'octène sont plus petites et moins encombrantes que celles d'ester, cela leur permet sans doute de remplir la surface plus facilement. Les molécules d'ester, plus grosses, couvrent la surface de "seulement" $3,0 \cdot 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ ⁴ alors qu'une surface greffée uniquement avec de l'octène a une densité de $3,84 \cdot 10^{14} \text{ cm}^{-2}$. Ceci correspond à un recouvrement de surface d'environ 38% pour l'ester et d'environ 49% pour l'octène. D'autre part, la densité de la monocouche greffée avec du décène est de $3,71 \cdot 10^{14} \text{ cm}^{-2}$, ce qui correspond à une couverture de 47,5%. Cette valeur est légèrement inférieure à celle de l'octène. Ceci va encore dans le sens où les petites molécules permettent une plus grande densité surfacique. La surface décène est du reste plus compacte que la surface greffée avec de l'ester. Ceci se comprend encore par le fait que les groupements esters sont plus gros que les groupements CH_3 terminaux des chaînes décènes et la densité des monocouches esters reste alors plus faible pour cause d'encombrement stérique.

⁴Cette valeur de densité est toutefois très bonne comparée aux autres techniques de greffages de molécules alcènes.

On obtient la stoechiométrie de la surface en divisant la densité de chaînes esters par la densité totale de chaînes greffées sur la surface. La figure 2.13 représente graphiquement cette stoechiométrie de surface en fonction de la dilution de l'ester dans l'octène.

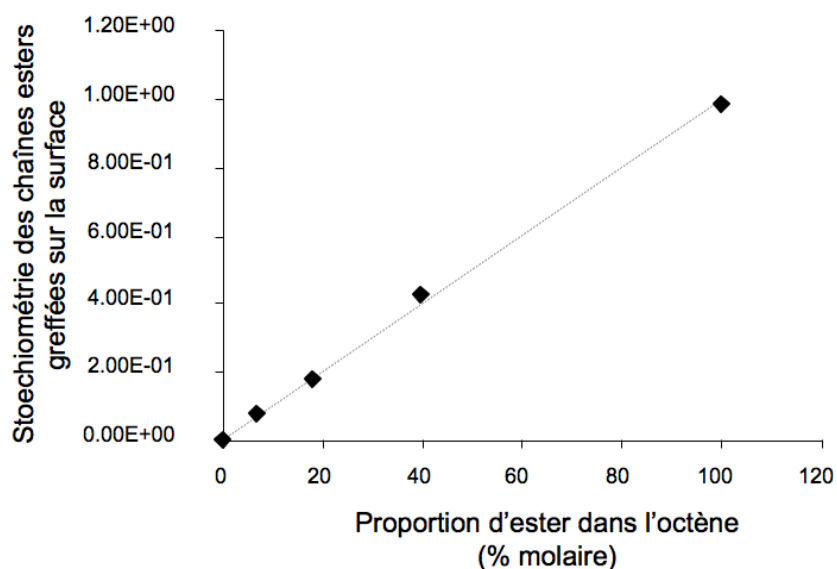


FIG. 2.13 – Stoechiométrie des chaînes esters greffées sur la surface en fonction de la dilution molaire d'undécylénate d'éthyle dans l'octène dans la solution de greffage.

Sur la figure 2.13, on remarque que la stoechiométrie des chaînes esters est linéaire en fonction de la dilution molaire de l'ester dans l'octène dans le produit de greffage. Ceci confirme le résultat obtenu précédemment avec la dilution de l'ester dans le décène. On peut en conclure que les cinétiques de greffage, sur le temps de la réaction (20h de greffage), diffèrent peu en fonction de la nature des molécules. L'ester, le décène ou l'octène se greffent à la même vitesse, contrairement au cas de l'acide undécylénique [Fauchoux et al., 2006].

3 L'hydrolyse de l'ester

La première couche terminée par des groupements esters subit toute la chimie de fonctionnalisation qui permet d'obtenir la fonction chimique désirée *in fine*. Cette succession de réactions chimiques que subit la monocouche d'ester commence par une réaction d'hydrolyse. L'hydrolyse consiste à transformer la fonction ester [CO-O-C₂H₅] en fonction acide carboxylique [CO-O-H] [Vollhardt & Schore, 1999]. L'hydrolyse de l'ester est une réaction très lente qui nécessite d'être catalysée et d'être activée par la température.

Elle peut se faire en milieu basique par la réaction :



dont le mécanisme est représenté sur la figure 2.14 -(a).

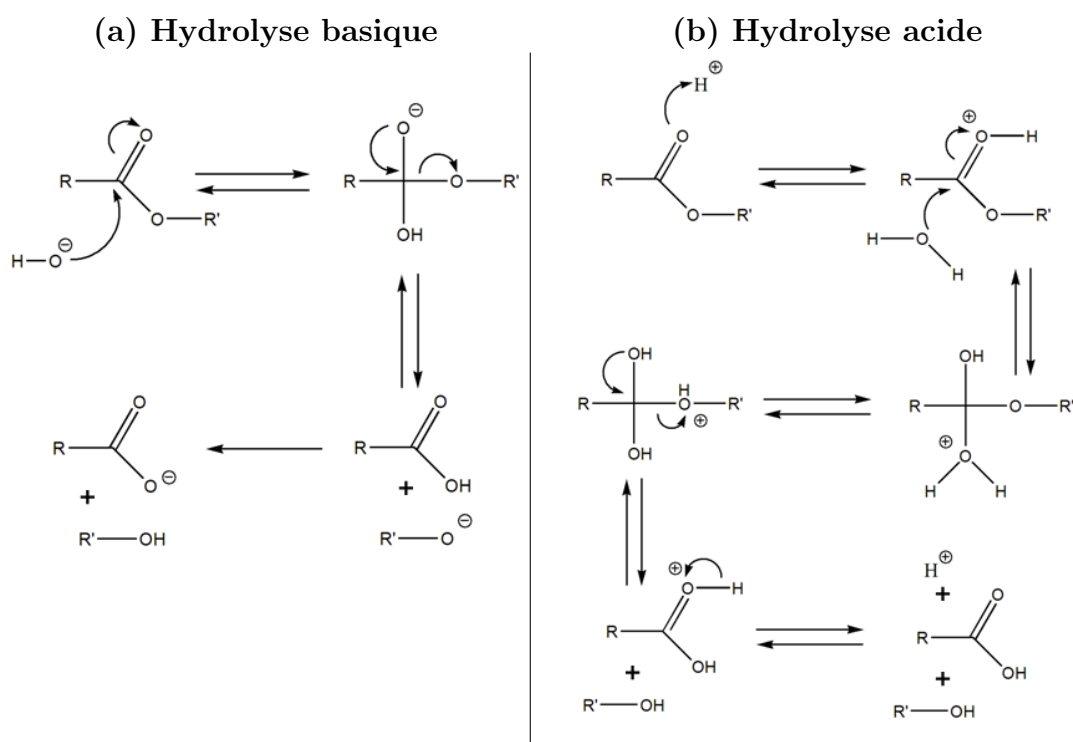
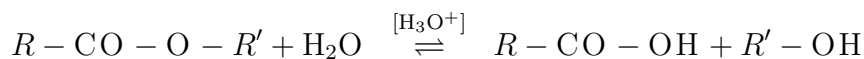


FIG. 2.14 – (a) Mécanismes chimiques de l'hydrolyse de l'ester en milieu basique. (b) Hydrolyse de l'ester en milieu acide.

Et elle peut également se faire en milieu acide par la réaction :



dont le mécanisme réactionnel est décrit sur la figure 2.14 -(b).

Cette réaction doit se faire sans détériorer la couche de molécules organiques préalablement greffée. Or, les couches organiques sont instables en milieu alcalin donc la catalyse acide paraît la plus appropriée à notre cas.

3.1 La procédure

Pour l'hydrolyse, la surface de silicium modifiée par une monocouche terminée par des esters est placée dans un Schlenk contenant une solution aqueuse d'acide. Lors de l'hydrolyse la solution est thermostatée à 40°C et un barbotage d'argon est maintenu dans le Schlenk.

Le choix de l'acide est important. Tous les acides n'ont pas la même capacité à hydrolyser l'ester. La figure 2.15 représente les spectres FTIR dans la région de la liaison carbonyle d'une surface ester et d'une surface ester hydrolysée.

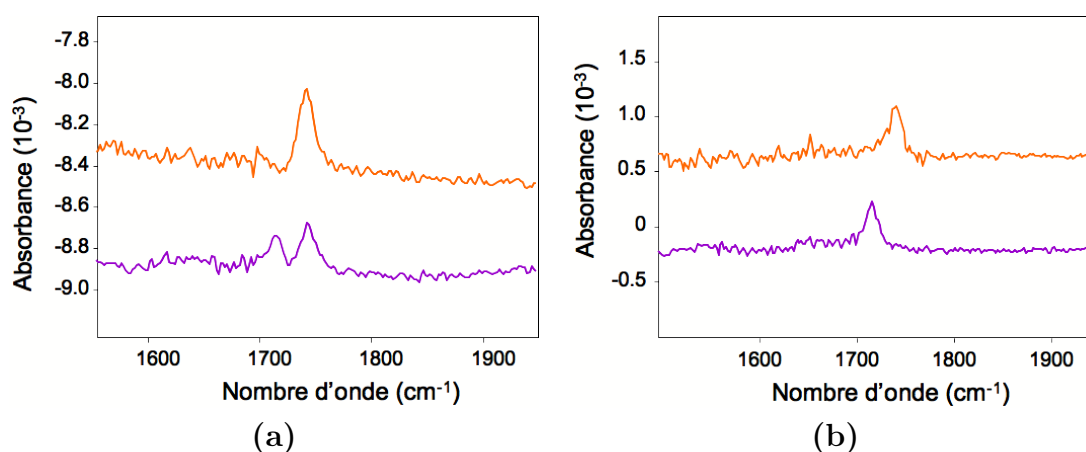


FIG. 2.15 – Spectres FTIR en transmission d'une surface ester (en haut) et d'une surface ester après hydrolyse (en bas). Le pic de la liaison carbonyle de l'ester à 1743 cm⁻¹ se déplace vers 1712 cm⁻¹, nombre d'onde significatif de la présence d'acide. La référence est une surface de Si-H. (a) 1h30 d'hydrolyse dans H₂SO₄ à 4 M. (b) 1h30 d'hydrolyse dans HCl à 5,6 M.

Après 1h30 d'hydrolyse dans H_2SO_4 à 4 M à 40°C , il reste un pic d'ester à 1743 cm^{-1} relativement important (figure 2.15 -(a)) par rapport à l'hydrolyse dans HCl (figure 2.15 -(b)) à 5,6 M à 40°C . La nature de l'acide ainsi que sa concentration sont des paramètres qui peuvent être importants pour la cinétique de la réaction d'hydrolyse. Par la suite, l'hydrolyse est faite à l'aide de l'acide chlorhydrique.

Les surfaces acides sont très difficiles à maintenir propres. Le groupement terminal acide possède une très grande affinité avec l'eau par exemple. C'est un groupement très polaire sur lequel peuvent se physisorber une grande quantité de molécules qui sont également capables d'engager des liaisons hydrogènes avec d'autres composés. Le rinçage de la surface après la réaction d'hydrolyse devient une étape extrêmement délicate. L'image de la figure 2.16 -(a) correspond à une surface 50% ester hydrolysée (nous reviendrons sur les surfaces diluées dans le paragraphe suivant) rincée au tétrahydrofurane.

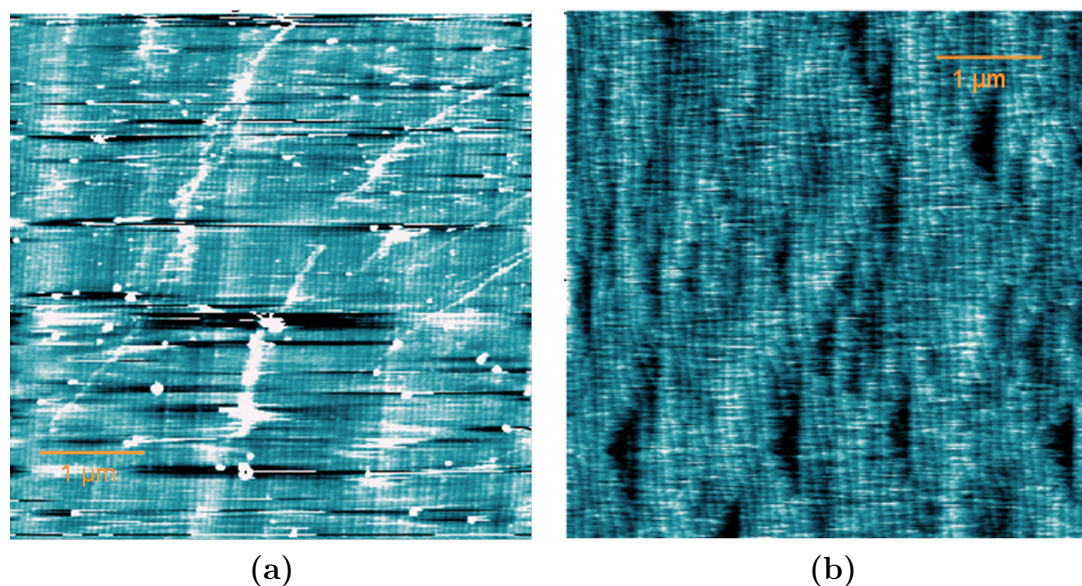
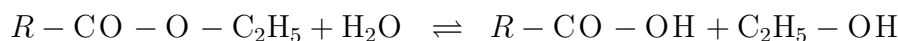


FIG. 2.16 – Images AFM d'une surface ester hydrolysée après différents rinçages. L'hydrolyse est faite dans HCl pendant 2h à 40°C avec un barbotage d'argon. (a) Image d'une surface 50% ester hydrolysée et rincée au tétrahydrofurane. (b) Image d'une surface 100% ester hydrolysée et rincée à l'acide acétique.

La surface possède de nombreuses impuretés dont certaines sont collées sur la surface et d'autres sont balayées par la pointe du microscope AFM. Les rinçages aux solvants organiques ne donnent pas un résultat satisfaisant.

Le produit de l'hydrolyse de l'undécylénoate d'éthyle est de l'éthanol :



qui est soluble dans l'eau. On pourrait penser que l'eau est un solvant convenable pour rincer les surfaces hydrolysées mais l'eau est peu volatile et à température ambiante les molécules restent physisorbées sur la surface. Une méthode convenable est le rinçage de la surface à l'acide acétique. La température d'ébullition de ce solvant est de l'ordre de 117°C et il est très volatil. La surface d'esters après hydrolyse est plongée dans un Schlenk rempli d'acide acétique chauffé à 60°C avec un barbotage d'argon pendant 15 min. Lorsque la surface est sortie du Schlenk, l'acide acétique chaud s'évapore immédiatement et laisse la surface propre. La figure 2.16 -(b) correspond à l'image AFM d'une surface ester hydrolysée et rincée à l'acide acétique à 60°C pendant 15 min. La surface est très propre et homogène : il ne reste aucune impureté physisorbée.

L'hydrolyse et l'oxydation

La réaction d'hydrolyse se fait en milieu aqueux. Une difficulté est de ne pas oxyder l'interface entre la monocouche ester et le silicium. Des mesures FTIR en transmission ont montré qu'une surface dont le greffage de l'ester n'a duré que 15h s'oxyde au cours du temps pendant la réaction d'hydrolyse. Un pic significatif de l'oxyde à 1100 cm^{-1} croît avec le temps. Lorsqu'on augmente le temps de greffage, ce phénomène est très atténué. L'oxydation de l'interface lors de l'hydrolyse est très dépendante de la qualité de la couche d'ester. Si cette couche est compacte, la pénétration des molécules d'eau jusqu'à l'interface est rendue difficile. La surface s'oxyde moins facilement. Le temps de greffage de l'ester doit donc être au moins de 20h pour avoir une monocouche assez dense qui passive le silicium. D'autre part, l'hydrolyse de l'ester nécessite un ajustement entre le rendement réactionnel et l'oxydation de la surface. En effet, l'augmentation de la température favorise la réaction d'hydrolyse mais favorise également l'oxydation de l'interface en milieu aqueux. La température de la réaction d'hydrolyse est donc un paramètre important. Elle doit être suffisamment élevée pour que la réaction d'hydrolyse soit rapide sans pour autant favoriser l'oxydation de l'interface. Il semble que 40°C soit un bon compromis. À cette température, la cinétique de l'hydrolyse est relativement rapide.

3.2 La cinétique

La figure 2.17 montre les spectres FTIR en transmission d'une surface ester après différents temps d'hydrolyse dans HCl à 5,6 M à 40°C avec un barbotage d'argon.

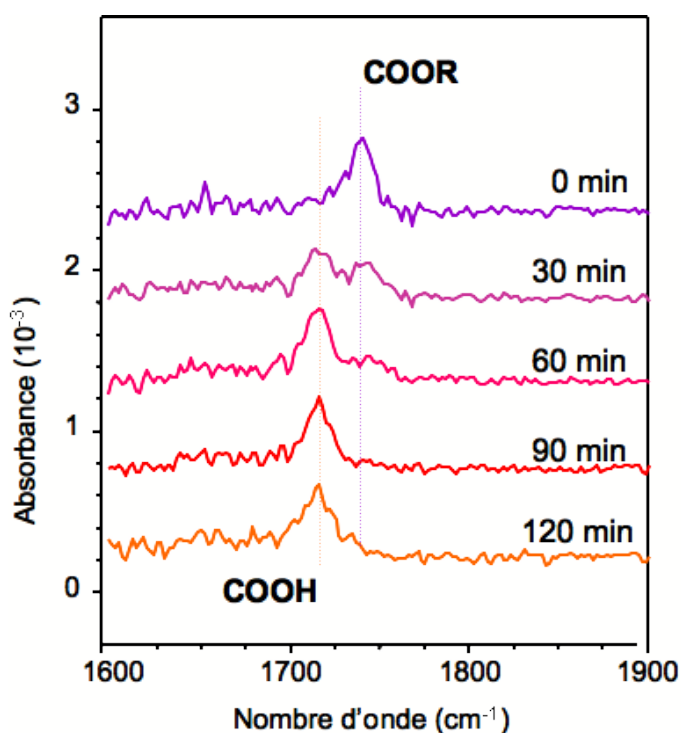


FIG. 2.17 – Cinétique de la réaction d'hydrolyse de l'ester greffé sur une surface de silicium, observée par spectroscopie infrarouge en transmission. La référence est une surface de Si-H.

Le spectre du haut correspond à celui de la surface ester : le pic autour de 1740 cm^{-1} est caractéristique de la liaison C=O de l'ester. Sur le spectre du bas, après un temps d'hydrolyse de 2h, on observe un pic autour de 1715 cm^{-1} qui correspond à l'acide carboxylique. Après 90 min d'hydrolyse, on n'observe plus le pic correspondant à l'ester sur le spectre FTIR en transmission. Pour garantir une réaction complète, un temps de 2h est choisi pour hydrolyser les surfaces esters.

L'inconvénient de la spectroscopie infrarouge en transmission est son manque de sensibilité. Intrinsèquement, pour une réflexion, la géométrie ATR est environ

2 fois plus sensible qu'en transmission (grâce aux coefficients I_x , I_y et I_z qui interviennent dans l'expression de l'absorbance, voir Annexe B). D'autre part, le détecteur MCT utilisé en ATR est bien meilleur que le DTGS utilisé en transmission ce qui compense en partie la perte de lumière infrarouge à l'entrée du prisme. Mais la grande sensibilité de la géométrie ATR par rapport à la transmission est apportée par les réflexions multiples. Chaque réflexion amplifie d'autant le signal mesuré. Le nombre de réflexions dépend de la longueur et de l'angle du prisme : dans notre cas ce nombre varie entre 25 et 26. Sur le spectre du bas (120 min) de la figure 2.17, il est difficile de statuer définitivement sur la présence d'un pic d'ester à 1740 cm^{-1} . Pour mieux apprécier la présence d'ester, il convient de mesurer la surface par spectroscopie infrarouge en géométrie ATR.

La figure 2.18 représente les spectres FTIR en géométrie ATR d'une surface ester et d'une surface ester hydrolysée.

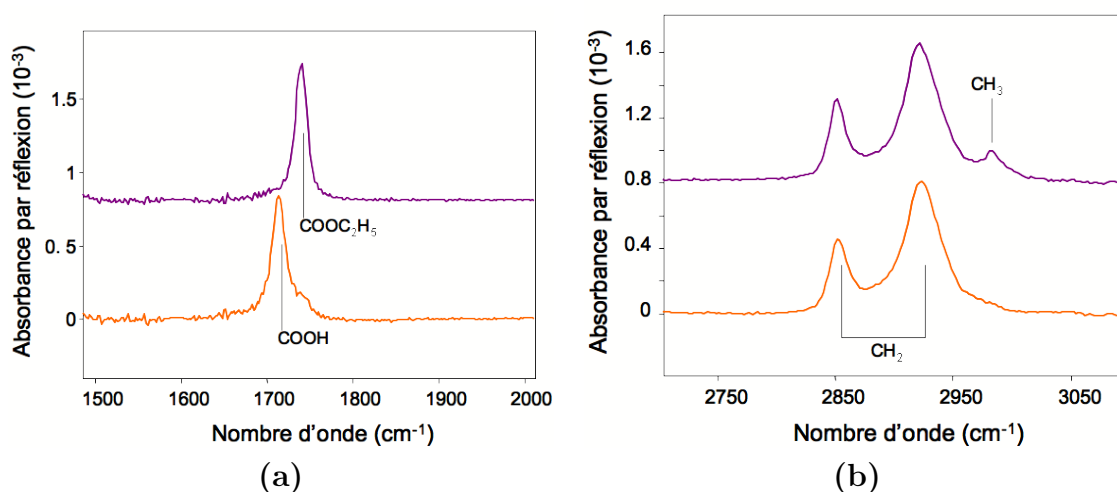


FIG. 2.18 – Spectres FTIR en géométrie ATR d'une surface greffée avec un ester puis hydrolysée dans HCl pendant 2 heures à 40°C . La surface de référence est une Si-H. (a) Spectres FTIR dans la région des C=O de la surface ester en haut et de la surface ester hydrolysée en bas. (b) Spectres FTIR dans la région des C-H de la surface ester en haut et de la surface ester hydrolysée en bas.

Dans la région des C=O (figure 2.18 -(a)), le spectre du haut correspond au pic autour de 1740 cm^{-1} de la liaison C=O de l'ester. Le pic a été déplacé autour de 1714 cm^{-1} après l'hydrolyse (spectre du bas), ce qui correspond bien à la liaison C=O de l'acide carboxylique. Ce pic est asymétrique, il possède un épaulement au-

tour de 1742 cm^{-1} . Deux hypothèses peuvent être envisagées. Cet épaulement pourrait correspondre à des groupements esters qui n'ont pas été hydrolysés. Lorsque le pic de cet épaulement est ajusté avec une fonction de Voigt, son intégrale est de 0,0016 en polarisation p alors que l'intégrale de celui à 1714 cm^{-1} est de 0,0254. Si on tient compte de la différence de section efficace entre les liaisons C=O de l'ester et de l'acide (voir prochain paragraphe), cela pourrait être significatif de la présence d'environ 10% de molécules d'ester qui n'auraient pas été pas hydrolysées. Cet épaulement reste présent malgré l'augmentation du temps d'hydrolyse. Il pourrait également correspondre à des modes de vibrations de la liaison C=O de l'acide carboxylique monomérique qui vibrent à de plus grands nombres d'onde que l'acide carboxylique dimérique qui vibre lui autour de 1715 cm^{-1} [Lin-Vien et al., 1991].

3.3 La section efficace de la liaison carbonyle

Lorsque les pics à 1714 cm^{-1} de la liaison C=O de l'acide et à 1740 cm^{-1} de la liaison C=O de l'ester (figure 2.18 -(a)) sont ajustés à l'aide de fonctions de Voigt, les intégrales de ces pics sont différentes. La tendance montre que l'intégrale du pic d'acide est plus grande que celle du pic d'ester. On peut alors se demander :

- s'il existe un excès d'acide dû en particulier à la présence d'acide acétique [$\text{CH}_3\text{-COOH}$] qui reste physisorbé sur la surface par liaisons hydrogènes avec l'acide carboxylique greffé [$\text{Si-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CO-OH}$]
- ou si la section efficace de la liaison C=O de l'acide est plus grande que celle de la liaison C=O de l'ester.

La mesure de l'acide undécanoïque en solution permet de connaître la section efficace de la liaison C=O de l'acide carboxylique, tout comme elle a été mesurée pour la liaison C=O de l'ester (voir paragraphe 2.2). La méthode consiste à diluer de l'acide undécanoïque [$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_9\text{-COOH}$] dans du dodécane et à faire une mesure FTIR en géométrie ATR à l'aide d'un prisme de silicium oxydé. La surface utilisée est un prisme de silicium comportant de l'oxyde natif nettoyé préalablement pendant au moins 20 min dans une solution piranha puis rincé à l'eau ultra pure (milliQ). Lors de la mesure effectuée sur l'ester (paragraphe 2.2), il n'y a pas de réelle interaction entre le groupement ester et la surface de silicium oxydé. La mesure porte donc sur la partie du liquide adjacente à la surface sur une épaisseur δ qui est homogène.

Les intégrales des pics des fonctions qui ont servi à ajuster le pic à 1714 cm^{-1} (2.19 -(a)) sont représentées sur la figure 2.19 -(b) en fonction de la concentration volumique d'acide undécanoïque dans la solution.

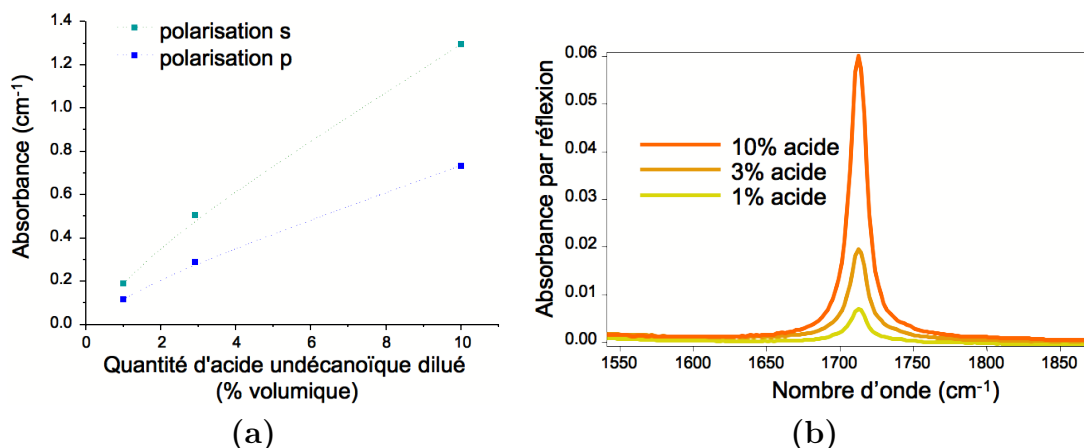


FIG. 2.19 – (a) Absorbance intégrée entre 1645 cm^{-1} et 1800 cm^{-1} du pic C=O centré autour de 1712 cm^{-1} dans le spectre enregistré en géométrie ATR des solutions d'acide undécanoïque dilué dans le dodécane, en fonction de la concentration volumique en acide. (b) Spectres FTIR en ATR des solutions d'acide pour les différentes dilutions.

Dans ce cas, la tendance de la représentation graphique n'est pas linéaire. On peut alors présumer d'une interaction entre les molécules d'acide et l'oxyde de surface : le groupement acide peut s'adsorber facilement par des liaisons hydrogènes sur la surface de silicium oxydé. À faibles concentrations en groupements acides dans la solution, la mesure est biaisée par une couche de molécules adsorbées. Pour s'affranchir de ce phénomène, la valeur à 10% d'acide est utilisée pour la calibration. Pour cette proportion, la valeur maximale du coefficient complexe de l'indice de réfraction du liquide est de l'ordre de 0,013, ce qui demeure acceptable pour satisfaire les hypothèses de la calibration. Pour des concentrations élevées, la quantité de molécules sondées dans le volume d'épaisseur δ adjacent à la surface devient prépondérante par rapport à la quantité de molécules adsorbées sur la surface.

La valeur de l'intégrale du pic à 10% d'acide est de 1,296 en polarisation p et de 0,736 en polarisation s. Ceci permet d'obtenir les quantités caractéristiques N_{\parallel} et N_{\perp} :

$$N_{\parallel} = 6,5 \cdot 10^{15} \cdot Abs_s \quad (2.5)$$

et :

$$N_{\perp} = 6,0 \cdot 10^{15} \cdot (2,03 \cdot Abs_p - 1,8 \cdot Abs_s) \quad (2.6)$$

où Abs_s et Abs_p sont les valeurs des intégrales des pics des espèces greffées sur la surface (soit des C=O soit des C-H) respectivement en polarisation s et p, et où les coefficients numériques sont obtenus à partir de la mesure de calibration dans le mélange dodécane/acide undécanoïque (voir Annexe B).

En comparant ces équations avec les équations 2.1 et 2.2 correspondant à l'ester, on remarque que la section efficace de la liaison C=O de l'acide carboxylique est plus grande que celle de la liaison carbonyle de l'ester.

3.4 La compacité des couches hydrolysées

De la même manière que la densité des monocouches esters a pu être mesurée, on peut également obtenir la densité des monocouches après leur hydrolyse. Le tableau 2.5 récapitule le résultat.

C-H	Abs_s (cm^{-1})	Abs_p (cm^{-1})	N_{\parallel} (cm^{-2})	N_{\perp} (cm^{-2})	Densité de groupements CH_2 greffés (cm^{-2})	Densité totale de chaînes greffées (cm^{-2})
acide	0.0132	0.0138	$2,4 \cdot 10^{15}$	$6,1 \cdot 10^{14}$	$3,0 \cdot 10^{15}$	$3,0 \cdot 10^{14}$

TAB. 2.5 – Valeurs des intégrales et des densités de dipôles greffés sur la surface. Ce calcul est obtenu à partir des valeurs des pics de C-H du spectre de la surface d'ester hydrolysé et des formules 2.3 et 2.4.

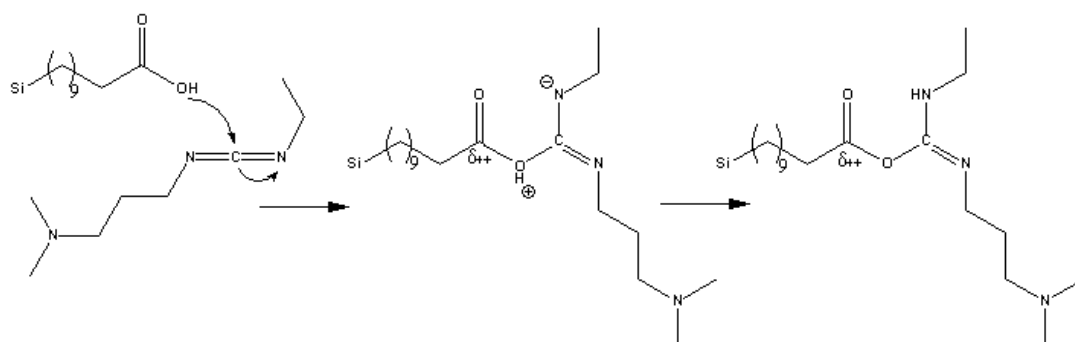
La densité de chaînes acides est de $3,0 \cdot 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ ce qui correspond à la valeur de la densité de la monocouche d'ester. Les molécules ne se sont pas désorbées et l'hydrolyse n'a donc pas altéré la compacité de la couche.

4 L'étape d'activation de l'acide

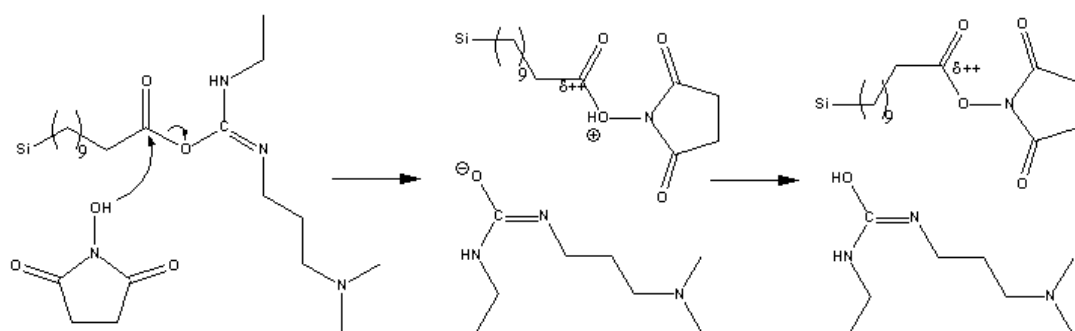
La fonction chimique acide carboxylique est ensuite transformée en ester activé, ce qui permet de rendre le carbone de la liaison carbonyle très réactif aux groupements amines. En utilisant l'approche développée pour la synthèse en phase solide [Seneci, 2000] ou pour la synthèse de peptides en phase aqueuse [Sheehan & Hlavka, 1956][Bodanszky, 1985], on peut coupler l'acide carboxylique à des molécules contenant des groupements amines [Wojtyk et al., 2002]. Un carbodiimide soluble dans l'eau, le chlorure de N-(3-diméthylamino)propyl)-N'-éthylcarbodiimide (EDC), est très utilisé pour l'attachement covalent de protéines sur les surfaces [Timkovich, 1977]. L'EDC est en effet un intermédiaire de réaction très efficace pour permettre la formation de liaisons amides entre l'acide carboxylique et les groupements amines [Nakajima & Ikada, 1995]. Cette réaction est favorisée par la présence du N-hydroxysuccinimide (NHS) [Grabarek & Gergely, 1990]. Cette molécule, une fois greffée sur le carboxyle pour former l'ester N-hydroxysuccinimide, rend le carbone de la liaison carboxyle très électrophile, favorisant la réaction avec les groupements amines (figure 2.20). Cette méthode de modification de surface par le NHS est utilisée couramment pour le couplage de molécules biologiques [Caruso et al., 1997] [Strother et al., 2000a].

La figure 2.20 représente les mécanismes de réaction de l'EDC et du NHS sur le groupement acide carboxylique. L'EDC et le NHS sont solubles dans l'eau ; ceci présente l'avantage de pouvoir faire la réaction en milieu aqueux. Le caractère électrophile du carbone de la liaison carbonyle de l'acide lui permet de se coupler avec un groupement amine. Or, dans la liaison carbonyle de l'acide, le carbone n'est pas suffisamment électrophile.

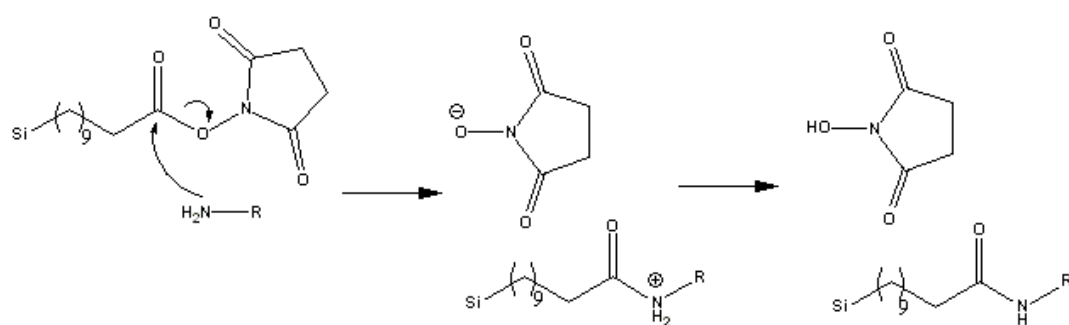
La première étape consiste alors à le coupler avec l'EDC par une attaque de l'oxygène du OH de l'acide sur le carbone électrodéficient du carbodiimide de l'EDC (figure 2.20 -(a)). L'hydrogène de l'acide se réarrange, et dans le groupement O-acyluréé ainsi formé le carbone de la liaison carbonyle présente maintenant un caractère beaucoup plus électrophile. Il peut ensuite subir l'attaque de l'oxygène du groupe OH du NHS pour former l'ester NHS et un produit dérivé d'urée (figure 2.20 -(b)). Le carbone de la liaison carbonyle de l'ester NHS est maintenant fortement électrophile et réagit facilement avec le doublet d'électrons apporté par l'amine (figure 2.20 -(c)).



(a) Attaque de l'acide carboxylique sur l'EDC



(b) Attaque du NHS sur l'O-acyl-urée



(c) Attaque du groupement amine sur l'ester NHS

FIG. 2.20 – Mécanismes réactionnels permettant le couplage d'une amine sur l'acide carboxylique.

4.1 La procédure

Les fonctions acides carboxyliques de surface sont donc modifiées en esters N-hydroxysuccinimidiques (NHS) en utilisant le chlorure de N-(3-diméthylamino)propyl)-N'-éthylcarbodiimide (EDC) comme agent de couplage. L'EDC et le NHS sont tous les deux solubles dans l'eau, ce qui offre l'avantage de faire cette réaction en milieu aqueux.

Nous avons tout d'abord essayé d'activer la surface dans une solution NHS/EDC avec des concentrations inférieures aux conditions classiques [Caruso et al., 1997]. La surface est plongée pendant 1h dans une solution d'EDC à 0,4 M et de NHS à 0,1 M avec un barbotage d'argon. L'échantillon est ensuite rincé à l'eau ultra pure (milliQ). La figure 2.21 représente l'image AFM de la surface ainsi obtenue.

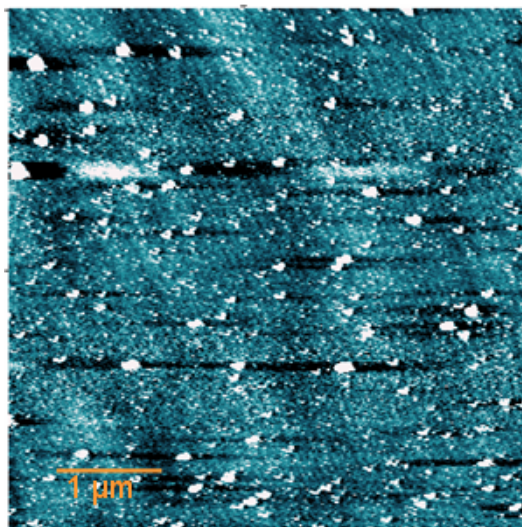


FIG. 2.21 – Image en microscopie AFM d'une surface fonctionnalisée avec du NHS dans les conditions classiques de greffage : EDC à 0,4 M et NHS à 0,1 M pendant 1 heure sous argon. La surface est ensuite rincée à l'eau.

L'image AFM montre que la surface n'est pas du tout homogène, la topographie de la surface Si-H initiale n'est pas retrouvée : des impuretés sont collées sur la surface et la structure en marches monoatomiques est difficile à observer.

Dans les conditions classiques de greffage du NHS telles que décrites par Caruso [Caruso et al., 1997], les surfaces fonctionnalisées observées par AFM ont une topographie qui ne permet pas de discriminer entre de l'ADN et des résidus réactionnels. La surface doit être chimiquement homogène pour que l'adsorption de l'ADN soit uniforme sur la surface. Nous avons donc cherché à améliorer le protocole initial pour obtenir des surfaces dont la topographie est beaucoup mieux définie à l'échelle de quelques angströms et qui possèdent une bonne homogénéité chimique après le traitement au NHS.

Dans un premier temps, nous avons porté nos efforts sur le rinçage de la surface. Comme nous l'avons vu au paragraphe 2.1.2, un rinçage adapté permet de désorber les molécules physisorbées sur la surface. À la fin de la réaction, la surface devrait être maintenant un ester NHS. Nous avons donc essayé de rincer cette surface à l'aide de solvants organiques tels que le dichlorométhane HPLC pour essayer d'enlever l'excès de matière physisorbée. Nous avons alors constaté que le rinçage aux solvants organiques n'a pas amélioré la propreté. La réaction du NHS sur l'acide carboxylique via l'EDC se fait en milieu aqueux, l'eau est donc un bon solvant pour rincer la surface. Nous partons alors du principe que la surface peut être rincée uniquement à l'eau ultra pure (milliQ) après cette réaction chimique. Or, malgré différents essais de rinçages à l'eau, avec ou sans sonification, les surfaces modifiées dans ces conditions de concentrations élevées en EDC ou NHS – telles que celles utilisées couramment – ont encore une topographie très inhomogène. À 0,4 M en EDC et 0,1 M en NHS, il peut éventuellement se produire une agrégation des molécules et une adsorption non covalente irréversible sur la surface terminée par des groupements acides. Nous avons alors cherché un protocole permettant l'activation de la surface tout en évitant la physisorption d'un excès de matière.

4.1.1 Influence des concentrations

La dilution des réactifs pourrait entraîner une diminution de la quantité de molécules de NHS et d'EDC adsorbées sur la surface. Les premiers paramètres que nous avons étudiés sont les concentrations en EDC et NHS.

La figure 2.22 -(a) représente l'image AFM d'une surface d'esters hydrolysés traitée avec une solution à 40 mM d'EDC et à 10 mM de NHS pendant 1h avec un barbotage d'argon. La figure 2.22 -(b) représente l'image AFM d'une même surface qui a subi un traitement similaire avec des concentrations en réactifs diluées 10 fois par rapport à la surface représentée en (a). Malgré la baisse de la concentration des réactifs, la topographie de la surface varie très peu. La figure 2.22 montre bien que lorsque les réactifs sont dilués, la topographie de la surface reste très imparfaite.

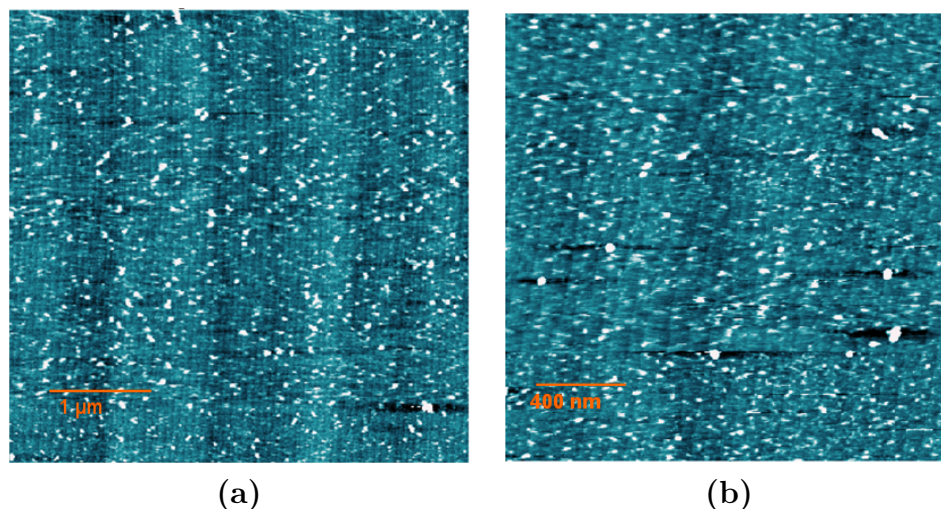


FIG. 2.22 – Images AFM après le traitement au EDC/NHS sur une surface ester hydrolysée. (a) EDC à 40 mM et NHS à 10 mM pendant une heure sous barbotage d'argon - (b) EDC à 4 mM et NHS à 1 mM pendant une heure sous barbotage d'argon. Les deux surfaces sont rincées à l'eau.

Même dans des conditions de réactifs très dilués, les surfaces esters hydrolysés traités à l'EDC et au NHS ne possèdent pas une monocouche homogène de molécules après observation par AFM. Les images montrent que des impuretés physisorbées sur la surface sont traînées par la pointe de l'AFM. Nous nous sommes demandés lequel du NHS ou de l'EDC est le plus limitant du point de vue de la propreté.

Sur la figure 2.23, la première image (figure 2.23 -(a)) représente une image AFM d'une surface ester plongée dans une solution d'EDC à 10^{-3} M. La seconde image (figure 2.23 -(b)) représente une surface similaire plongée dans une solution de NHS à 10^{-3} M. La surface plongée dans le NHS est beaucoup plus sale que celle plongée dans l'EDC : la pointe du microscope balaye beaucoup plus d'impuretés qui ne sont pas bien fixées sur la surface plongée dans le NHS. Les molécules de NHS ont tendance à s'adsorber beaucoup plus facilement que celles d'EDC sur la surface. La figure 2.23 -(c) représente une image AFM d'une surface ester hydrolysé plongée dans une solution de NHS à 10^{-5} M : la solution est 100 fois plus diluée en NHS que sur la figure (b). Malgré la dilution, la surface acide ressort de la solution de NHS avec plus d'impuretés physisorbées que la surface d'esters.

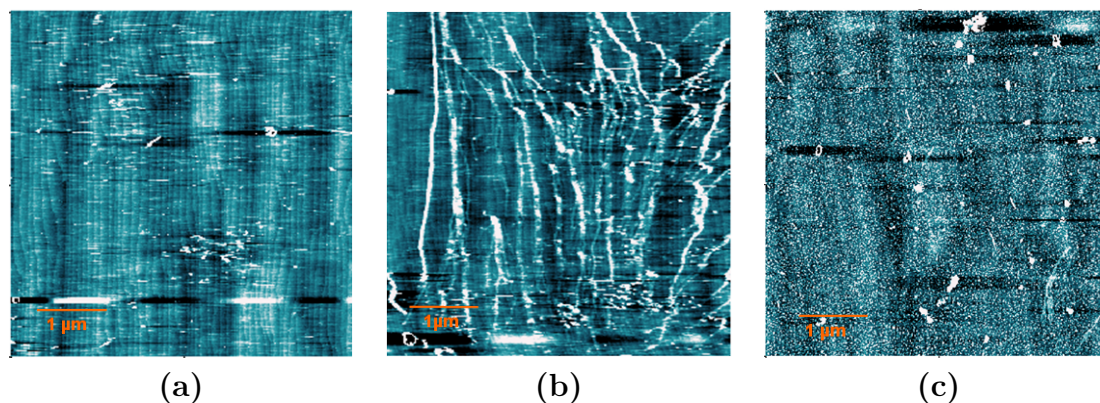


FIG. 2.23 – (a) Image AFM d’une surface ester plongée dans une solution d’EDC à 1 mM. (b) Image AFM d’une surface ester plongée dans une solution de NHS à 1 mM. (c) Image AFM d’une surface ester hydrolysé plongée dans une solution de NHS à 10^{-5} M.

Cette molécule possède une affinité très grande avec la surface acide, on comprend alors que la surface soit recouverte d’impuretés lorsqu’elle a été plongée dans un mélange d’EDC et de NHS.

4.1.2 Le procédé en deux étapes

Nous avons vu que le NHS réagit avec un intermédiaire formé par réaction de l’acide carboxylique avec l’EDC. Pour limiter l’adsorption du NHS sur la surface acide, nous avons donc essayé de faire réagir l’EDC préalablement sur la surface acide pour que dans un deuxième temps, les molécules de NHS puissent réagir sur la surface préactivée pour former une liaison covalente sur la surface. La concentration en EDC n’étant donc pas limitante pour la propreté de la surface, elle est choisie à 10 mM.

Il convient alors d’établir un protocole qui permet d’utiliser des concentrations plus élevées sans laisser d’impuretés sur la surface. L’EDC est un composé chimique instable car il s’hydrolyse. Il est conservé à -20°C en solution à 0,1 M, dégelé et dilué 10 fois dans de l’eau ultra pure (milliQ) au moment de l’utilisation. Cela permet de ralentir sa vitesse d’hydrolyse et donc sa dégradation. La surface ester hydrolysé est plongée dans cette solution à 10 mM d’EDC pendant 30 min avec un

barbotage d'argon. Ce temps de réaction est nécessaire pour que l'EDC réagisse avec la surface. Le NHS, conservé à 4°C en solution à 1 mM, est ajouté de sorte que les concentrations finales de la solution soient de $6 \cdot 10^{-3}$ M pour l'EDC et de $3 \cdot 10^{-4}$ M pour le NHS. La surface est laissée 1h dans cette solution avec un barbotage d'argon à température ambiante.

La figure 2.24 montre le spectre FTIR en ATR d'une surface greffée dans une solution d'EDC à $6 \cdot 10^{-3}$ M et de NHS à $3 \cdot 10^{-4}$ M, comme décrit ci-dessus.

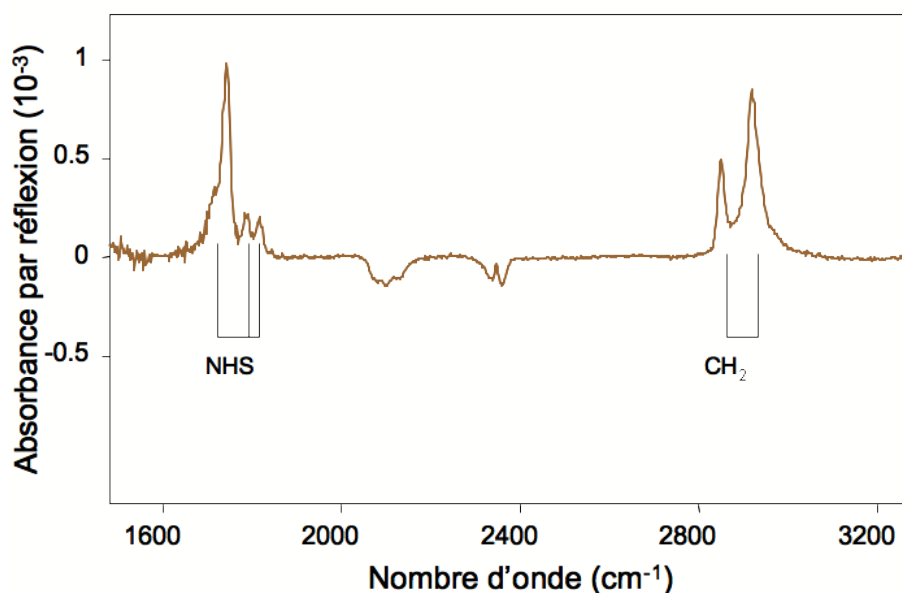


FIG. 2.24 – Spectre FTIR en géométrie ATR d'une surface 100% ester hydrolysé, exposée à une solution d'EDC à $6 \cdot 10^{-3}$ M pendant 30 min, puis à une solution de NHS à $3 \cdot 10^{-4}$ M pendant 1 heure. La référence est une surface Si-H.

On note la présence de pics à 1740, 1780 et 1820 cm^{-1} significatifs de la présence de groupements NHS sur la surface. La forte atténuation du pic caractéristique de l'acide à 1712 cm^{-1} (qui n'apparaît plus que sous la forme d'un épaulement sur le flanc basse énergie du pic à 1740 cm^{-1}) montre que la plupart des groupements acides initiaux ont été transformés en ester succinimidique.

La figure 2.25 montre le spectre FTIR en transmission d'une surface qui a été traitée avec une solution d'EDC à 6.10^{-3} M et de NHS à 3.10^{-6} M.

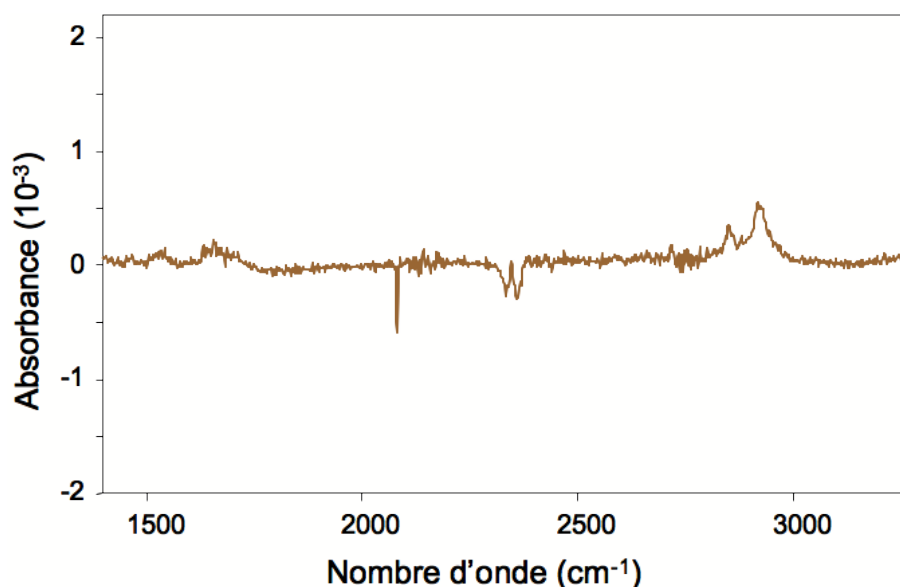


FIG. 2.25 – Spectre FTIR en transmission d'une surface 100% ester hydrolysé, exposée à une solution d'EDC à 6.10^{-3} M pendant 30 min, puis à une solution de NHS à 3.10^{-6} M pendant 1 heure. La référence est une surface Si-H.

Dans la région de la signature du groupement NHS (entre 1740 et 1820 cm^{-1}) il n'y a aucune vibration sur la surface après 1h30 de réaction. La concentration en NHS utilisée dans ce cas n'est pas assez élevée. Ainsi, si la concentration est trop faible le greffage ne fonctionne pas bien (car il peut exister une compétition entre l'hydrolyse et l'estérification), ou bien la cinétique de la réaction est supérieure à quelques heures. En revanche, des concentrations d'EDC à 6.10^{-3} M et de NHS à 3.10^{-4} M permettent d'obtenir une surface modifiée en ester activé NHS en 1h30, ce qui est un bon résultat.

La figure 2.26 représente une image AFM d'une surface fonctionnalisée au NHS dans les conditions de réaction en deux étapes : d'abord dans une solution d'EDC à 6.10^{-3} M puis dans une solution de NHS à 3.10^{-4} M.

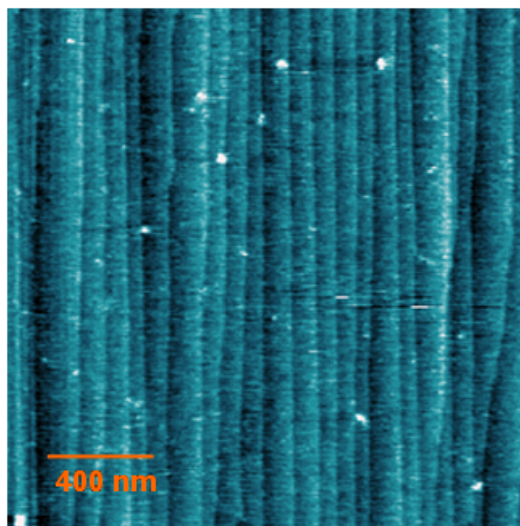


FIG. 2.26 – Image en microscopie AFM d'une surface fonctionnalisée avec du NHS par la procédure en deux étapes : d'abord dans une solution d'EDC à 6.10^{-3} M puis dans une solution de NHS à 3.10^{-4} M.

Les concentrations en réactifs restent similaires voire plus élevées qu'au paragraphe précédent (figure 2.23 -(c)) et la topographie de la surface est pourtant plus convenable. La surface est propre et chimiquement homogène, aucune impureté ne peut gêner les prochaines étapes chimiques qui permettent de finaliser la fonctionnalisation de la surface.

Ce procédé qui permet dans un premier temps de greffer l'EDC, intermédiaire de réaction, pour que le NHS puisse ensuite réagir de façon covalente sur la surface, permet d'obtenir des surfaces propres et homogènes chimiquement.

4.2 La compacité des couches ester NHS

On peut également obtenir la densité des monocouches après le traitement à EDC et NHS par la calibration du pic centré autour de 2850 cm^{-1} correspondant aux groupements CH_2 . Le tableau 2.6 récapitule le résultat.

C-H	Abs _s (cm ⁻¹)	Abs _p (cm ⁻¹)	N (cm ⁻²)	N _⊥ (cm ⁻²)	Densité de groupements CH ₂ greffés (cm ⁻²)	Densité totale de chaînes greffées (cm ⁻²)
ester NHS	0.0132	0.0136	2,4.10 ¹⁵	5,7.10 ¹⁴	3,0.10 ¹⁵	3,0.10 ¹⁴

TAB. 2.6 – Valeurs des intégrales et des densités de chaînes greffées sur la surface. Ce calcul est obtenu à partir des valeurs des pics de C-H du spectre de la surface d'ester NHS et des formules 2.3 et 2.4.

La densité de chaînes d'ester NHS est de $3,0 \cdot 10^{14}$ par cm^2 ce qui correspond aux mêmes valeurs de densités des monocouches d'ester et d'ester après hydrolyse. Le traitement à EDC et NHS n'a pas altéré la compacité de la couche.

5 L'amidation de la surface

La dernière étape de cette série de réactions chimiques consiste à greffer des molécules contenant un groupement amine sur l'ester activé NHS. Cette technique de fonctionnalisation permet une grande liberté dans le choix de la fonction chimique terminale. Aussi avons-nous fonctionnalisé les surfaces de silicium avec différentes molécules aminées.

5.1 Le greffage de terminaisons amines

Pour obtenir des surfaces terminées par des fonctions amines, nous avons étudié le greffage de l'éthylènediamine [$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{NH}_2$] qui est susceptible de se coupler par amidation à l'ester activé NHS de la surface, en laissant l'autre groupement amine de la molécule accessible sur la surface. Dans une solution de pH adéquat, le groupement amine NH_2 terminal est protonné en NH_3^+ et peut attirer l'ADN négativement chargé.

Le protocole de greffage des molécules d'éthylènediamine consiste à plonger la surface d'esters activés NHS dans un Schlenk contenant de l'éthylènediamine pur pendant 1 heure sous un barbotage d'argon. L'éthylènediamine fourni par Aldrich a une pureté de 99,5%. La surface est ensuite rincée soigneusement à l'eau ultra pure (milliQ). La figure 2.27 représente le spectre FTIR d'une surface fonctionnalisée dans les conditions décrites ci-dessus.

La surface greffée est une surface de silicium hydrogénée dans du NH_4F qui possède une structure en marches monoatomiques composée de monohydrures. La surface de référence en revanche, est une surface de silicium hydrogénée dans une solution d'acide fluorhydrique (HF), elle a donc une structure rugueuse composée de mono-, di- et trihydrures. Ainsi, sur le spectre de la figure 2.27, on observe trois pics négatifs centrés autour de 2080, 2106 et 2136 cm^{-1} correspondant respectivement aux liaisons monohydrures, dihydrures et trihydrures présentes sur la surface de référence et absentes sur la surface fonctionnalisée. Un quatrième pic positif plus fin centré autour de 2075 cm^{-1} , qui n'est guère visible sur le spectre, correspond aux liaisons Si-H monohydrures non substituées présentes sur la surface modifiée.

Les pics centrés autour de 2850 et 2920 cm^{-1} correspondent respectivement aux modes d'élongation symétrique et antisymétrique des liaisons C-H des groupements méthylènes CH_2 des chaînes alkyles. On retrouve sur le spectre la vibration du mode de déformation de ces liaisons autour de 1465 cm^{-1} .

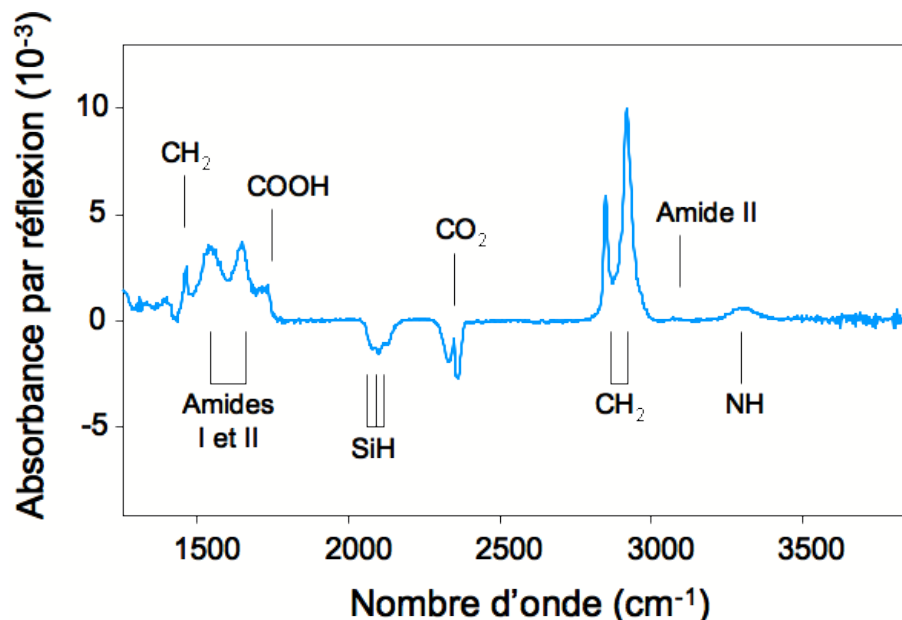


FIG. 2.27 – Spectre FTIR en géométrie ATR d'une surface modifiée dans l'éthylènediamine pendant 1 heure sous barbotage d'argon. La référence est une surface de silicium hydrogénée dans une solution de HF.

L'étude des pics caractéristiques de ce spectre [Lin-Vien et al., 1991] permet de confirmer le greffage covalent des molécules d'amines par la présence des liaisons amides. On observe deux pics centrés autour de 1542 et 1648 cm^{-1} correspondant respectivement aux vibrations des liaisons amides I et II, attestant de la présence de liaisons covalentes. Ceci est conforté par la présence de l'harmonique de la liaison amide II centrée autour 3070 cm^{-1} . On observe également un pic centré autour de 3300 cm^{-1} qui correspond aux modes d'élongation des liaisons N-H.

À la vue de ce spectre, il est extrêmement délicat de mettre en évidence la présence du groupement amine NH_2 en bout de chaîne. Les vibrations des liaisons amines peuvent en effet se confondre avec celles des liaisons amides (1542 et 1648 cm^{-1}). Dans ce cas, on ne peut pas exclure le pontage des molécules d'éthylènediamine qui pourraient éventuellement se greffer par leurs deux extrémités amines sur la surface.

On remarque également la présence d'un pic centré autour de 1718 cm^{-1} significatif de la présence d'acide résiduel sur la surface. La réaction n'est donc pas

totale, une partie de l'ester activé NHS a pu être hydrolysée à nouveau.

La figure 2.28 représente les images en microscopie AFM d'une surface modifiée par l'éthylènediamine.

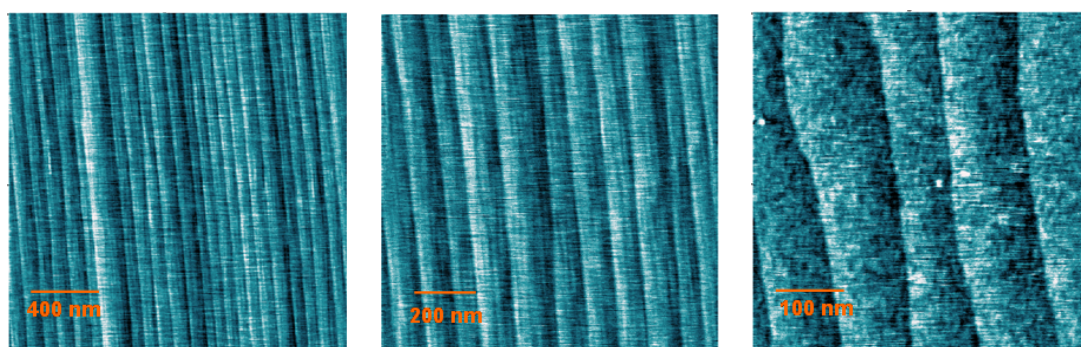


FIG. 2.28 – Images AFM d'une surface modifiée avec l'éthylènediamine à différentes échelles.

Les trois images correspondent à la même surface à différentes échelles. On reconnaît parfaitement la structure en marches monoatomiques du silicium cristallin. Sur ces images aucune impureté n'est physisorbée, la surface est homogène. Cette qualité de la topographie de surface est très satisfaisante pour le dépôt et la caractérisation d'ADN.

5.2 Les surfaces terminées par des phénols

Outre les molécules d'éthylènediamine, toute molécule comprenant un groupe-ment aminé est susceptible de pouvoir se greffer de façon covalente sur l'ester activé NHS. Pour obtenir une surface terminée par des groupements phénols, les molécules de tyramine sont parfaitement adaptées à notre problématique : elles se composent d'un groupement amine séparé du groupement phénol par deux groupements CH_2 . Le greffage de l'amine sur l'ester activé NHS laisse le groupement phénol accessible sur la surface.

Dans un premier temps, nous avons recherché des conditions expérimentales permettant de greffer la tyramine en milieu aqueux. La tyramine utilisée provient de chez Fluka et a une pureté supérieure à 99%. Sa solubilité dans l'eau est très faible : de l'ordre de 76,5 mM [Hodgman, 1957].

La figure 2.29 représente l'image AFM d'une surface d'ester activé NHS plongée dans une solution à 36,4 mM de tyramine dans de l'eau ultra pure (milliQ) pendant une heure avec un barbotage d'argon. La surface est ensuite rincée abondamment à l'eau ultra pure (milliQ).

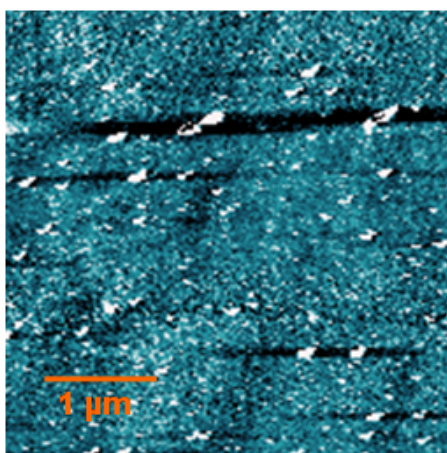


FIG. 2.29 – Image AFM d'une surface d'ester activé plongée dans une solution à 36,4 mM de tyramine dans l'eau, pendant 1h avec un barbotage d'argon. La surface est ensuite rincée abondamment à l'eau ultra pure (milliQ).

L'image AFM de la surface montre une topographie très imparfaite : de nombreuses impuretés couvrent la surface qui n'est pas du tout homogène. On observe très difficilement la structure en marches monoatomiques qui existait pourtant à l'étape précédente. À cette concentration, la limite de solubilité de la tyramine dans l'eau est presque atteinte. Des agrégats microscopiques de molécules sont certainement en suspension dans la solution et se physisorbent sur la surface. Une concentration plus faible permettrait d'obtenir une topographie de surface plus homogène. En diluant la tyramine dans l'eau de plusieurs ordres de grandeur, la densité d'impuretés physisorbées sur la surface pourrait également diminuer.

Nous avons alors essayé différentes conditions expérimentales pour greffer la tyramine sur la surface d'esters activés NHS. Une surface terminée par des groupements NHS a été plongée dans une solution de tyramine à $4 \cdot 10^{-4}$ M pendant 1h, à $4 \cdot 10^{-3}$ M pendant 2h et pendant 12h, à $4 \cdot 10^{-3}$ M pendant 1h à 40°C , sans résultat clairement visible par infrarouge d'un greffage réussi de la tyramine sur la surface. Nous avons également essayé de greffer directement la ty-

ramine sur l'acide carboxylique grâce à l'intermédiaire de réaction EDC, sans succès.

Ces tentatives infructueuses du greffage de la tyramine sur l'ester activé NHS laissent penser que la méthode choisie n'est pas la plus judicieuse. Nous avons donc orienté nos efforts vers un greffage en milieu organique. Le choix du solvant s'est alors porté vers le diméthyle sulfoxyde (DMSO). D'une part, la constante diélectrique du DMSO est de 45 alors que celle de l'eau est de 78,4 dans des conditions normales de température et de pression. Ainsi le DMSO écranne moins facilement que l'eau les charges en solution; il permet peut-être plus facilement l'attaque du doublet de l'amine sur le carbone électrophile de la liaison carbonyle. La réaction d'amidation est théoriquement facilitée dans le DMSO. D'autre part, la tyramine est beaucoup plus soluble dans le DMSO que dans l'eau ce qui permet d'augmenter la concentration de la solution de greffage. Alors qu'il est difficile d'obtenir le spectre FTIR de la tyramine en solution dans l'eau (à la limite de solubilité, le signal provenant des molécules de tyramine n'est pas suffisant), on obtient ce spectre de calibration dès lors que la tyramine est en solution dans le DMSO.

La figure 2.30 représente le spectre FTIR en géométrie ATR en polarisation p d'une solution de tyramine diluée à 160 mM dans le DMSO.

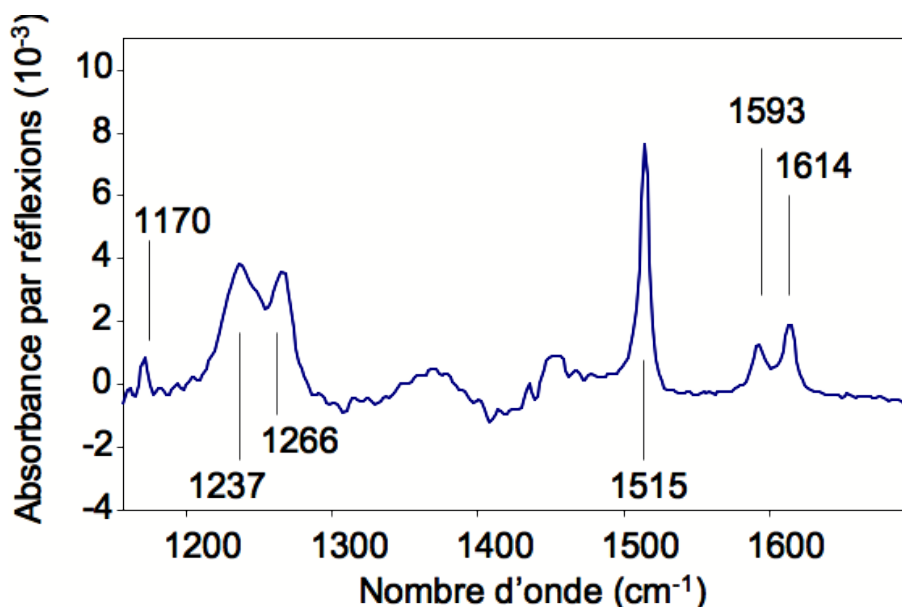


FIG. 2.30 – Spectre FTIR en géométrie ATR d'une solution de tyramine à 160 mM dans le DMSO.

Le principe de l'expérience est celui décrit dans le paragraphe 2.2 pour l'ester. Ceci permet d'une part d'identifier le signal de la tyramine et consiste d'autre part à calibrer ce signal en fonction de la concentration en molécules.

Le spectre de la figure 2.30 est référencé par rapport au spectre correspondant à la solution de DMSO seule, seuls les pics significatifs des molécules de tyramine apparaissent. En comparant ce spectre avec celui d'une surface traitée avec de la tyramine, on peut statuer sur la présence ou non de molécules greffées sur la surface. La figure 2.31 représente le spectre FTIR en géométrie ATR d'une surface d'ester activé NHS plongée dans une solution de tyramine à 160 mM dans du DMSO pendant 15 heures. La surface est ensuite rincée dans une solution de DMSO à 60°C pendant 1 heure puis est plongée plusieurs fois dans une solution d'éthanol VLSI à 60°C. La surface est ensuite rincée au tétrahydrofurane qui s'évapore rapidement. Le DMSO est un solvant qui a un haut point d'ébullition (189°C), il convient de s'assurer qu'il ne reste pas physisorbé sur la surface.

La figure 2.31 représente le spectre FTIR en géométrie ATR d'une surface d'ester activé NHS traitée dans une solution de tyramine à 160 mM dans le DMSO pendant 15 heures.

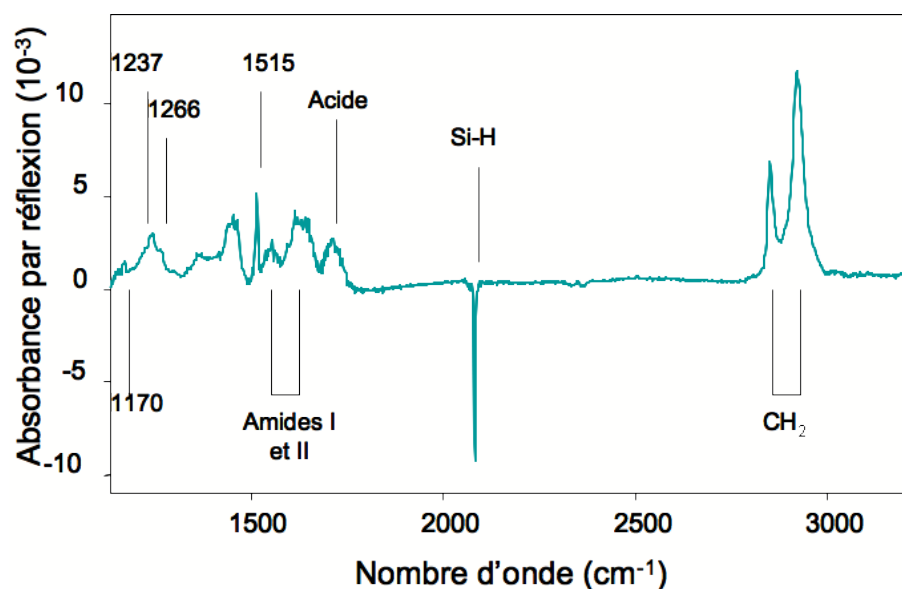


FIG. 2.31 – Spectre FTIR en géométrie ATR d'une surface d'ester activé NHS traitée dans une solution de tyramine à 160 mM avec un barbotage d'argon pendant 15 heures. La référence est une surface Si-H.

En comparant le spectre de la figure 2.31 à celui de la figure 2.30, on observe

la présence des pics significatifs de la tyramine en dessous de 1530 cm^{-1} . D'autre part, le greffage covalent est conforté par la présence des pics caractéristiques des liaisons amides I et II : ce sont des pics larges centrés autour de 1550 et 1640 cm^{-1} . Un pic centré autour de 1715 cm^{-1} montre la présence de liaisons carbonyles de l'acide carboxylique. La réaction n'est pas totale, il est possible que l'ester activé NHS s'hydrolyse dans la solution de tyramine. Par ailleurs, un pic négatif centré autour de 2080 cm^{-1} montre la disparition des liaisons Si-H par rapport à la surface de référence et les pics à 2850 et 2920 cm^{-1} sont caractéristiques des groupements CH_2 des chaînes alkyles.

La figure 2.32 représente l'image AFM d'une surface de tyramine greffée selon le protocole décrit ci-dessus.

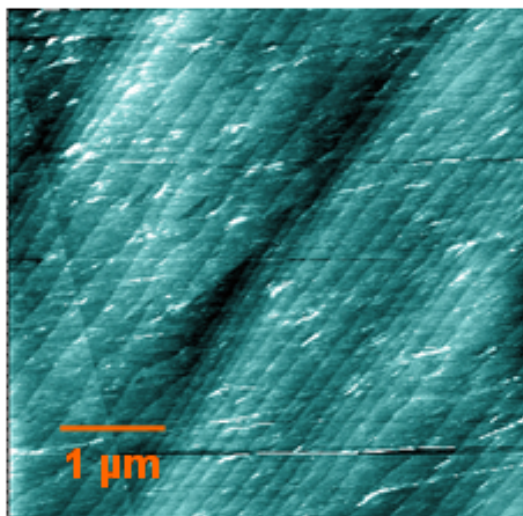


FIG. 2.32 – Image AFM d'une surface de tyramine rincée dans du DMSO à 60°C pendant une heure, dans une solution d'éthanol à 60°C et puis rincée au tétrahydrofurane.

L'image AFM montre que la topographie de surface de tyramine est satisfaisante. Il y a peu d'impuretés balayées par la pointe et on peut reconnaître aisément la structure en marches monoatomiques de la surface de silicium hydrogénée initiale.

5.3 La compacité des couches terminées par des phénols

On obtient de la même manière que précédemment, la densité des monocouches après la réaction de la tyramine sur l'ester NHS par la calibration du pic centré autour de 2850 cm^{-1} correspondant aux CH_2 . Le tableau 2.7 récapitule le résultat.

C-H	Abs _s (cm^{-1})	Abs _p (cm^{-1})	N (cm^{-2})	N _⊥ (cm^{-2})	Densité de groupements CH ₂ greffés (cm^{-2})
tyramine	0.0140	0.0147	$2,6 \cdot 10^{15}$	$6,9 \cdot 10^{14}$	$3,3 \cdot 10^{15}$

TAB. 2.7 – Valeurs des intégrales et des densités de CH_2 greffées sur la surface. Ce calcul est obtenu à partir des valeurs des pics de C-H du spectre de la surface de tyramine et des formules 2.3 et 2.4.

La densité de CH_2 est de $3,3 \cdot 10^{14}$ par cm^2 . Cette densité est supérieure aux valeurs précédentes des surfaces esters, ester hydrolysées et ester NHS. Elle correspond à la contribution des 10 CH_2 des chaînes alkyles ainsi qu'aux CH_2 des molécules de tyramine [$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5\text{OH}$]. Il y a alors plus de CH_2 greffés sur la surface que précédemment, cela explique la valeur supérieure de la densité.

Résumé des principales conclusions du chapitre 2

Dans ce chapitre nous nous sommes consacrés à l'élaboration de surfaces de silicium fonctionnalisées par des molécules organiques. Ce travail consiste dans un premier temps à greffer une monocouche dense de molécules alcènes par un processus d'hydrosilylation. Une série de réactions chimiques réalisées sur cette monocouche greffée permet ensuite d'obtenir une fonctionnalité chimique choisie. Il est important pour notre problématique d'adsorption de molécules d'ADN que les surfaces gardent une topographie plane à l'échelle atomique. Nous avons eu ce souci constant d'élaborer des surfaces sans impureté physisorbée. Nous avons pour cela utilisé un microscope à force atomique pour caractériser les surfaces.

L'étude en spectroscopie infrarouge du greffage de molécules alcènes a permis d'établir de façon quantitative la densité de molécules greffées sur la surface. Nous avons pu montrer que pour un greffage par voie thermique, les molécules d'octène forment une couche plus dense avec 49% de taux de couverture que les molécules d'ester dont la couverture est de 38%. Ainsi, en élaborant des surfaces mixtes ester/octène ou ester/décène, nous avons mis en évidence que plus la proportion d'octène est grande dans la solution de greffage et plus les monocouches formées sont denses, respectant la stoechiométrie du mélange de la réaction.

Nous avons ensuite trouvé des conditions d'hydrolyse suffisamment douces pour ne pas oxyder la surface greffée dans la solution aqueuse. Nous avons étudié la cinétique de la réaction d'hydrolyse. Cela nous a permis de conclure que dans une solution d'acide chlorhydrique à 5,6 M à 40°C pendant deux heures, l'hydrolyse est complète à 90%.

Nous avons mis au point un protocole qui permet de modifier les fonctions acides carboxyliques en bout de chaînes alkyles en fonctions esters NHS. Ce protocole en deux étapes consiste à traiter d'abord la surface avec un carbodiimide EDC, agent de couplage soluble dans l'eau, pour ensuite permettre au NHS de réagir de façon covalente sur la surface. Ce protocole nous a permis d'obtenir des surfaces terminées par des esters activés et qui sont chimiquement homogènes.

La dernière étape est une amidation de la surface par des molécules organiques composées d'une fonction amine. Nous avons constaté que cette amidation se réalise plus facilement en milieu organique. Le greffage de l'éthylènediamine et de la tyramine a été effectué, conduisant à une fonctionnalité de surface choisie. L'étude quantitative de la densité de la monocouche à chaque étape du protocole nous a permis de vérifier que la chimie effectuée sur la surface n'endommage pas la monocouche.

CHAPITRE 3

ADN aux interfaces solides

"The sciences do not try to explain, they hardly even try to interpret, they mainly make models."

John von Neumann

Sommaire

1	L'ADN sur des substrats phénolés	83
1.1	Protocole de dépôt	85
1.2	L'interaction de l'ADN avec l'interface	87
1.3	L'interaction de l'ADN avec le phénol : images AFM sur mica	90
1.3.1	Le protocole expérimental	91
1.3.2	L'influence du phénol sur la conformation de l'ADN	93
2	DNA adsorption on aminated silicon substrate	95
2.1	Introduction	95
2.2	Surface preparation	96
2.3	X-ray reflectivity	98
2.4	Prevention of surface degradation under irradiation	113
2.5	Data analysis	113
2.6	Amine-terminated surface characterization	116
2.7	DNA adsorption on a functionalized surface	119
2.7.1	Double-stranded DNA	119

2.7.2	Single-stranded DNA	124
3	Conclusions	126
	Résumé des principales conclusions du chapitre 3	127

Introduction

Il est important d'élaborer des surfaces bien contrôlée chimiquement et physiquement pour comprendre de façon précise les mécanismes d'interactions moléculaires entre la molécule d'ADN et la surface. En éliminant les impuretés physisorbées sur la surface, l'ADN ne peut interagir qu'avec les molécules qui fonctionnalisent la surface. On peut alors tenter de caractériser ces mécanismes d'interaction en sondant les surfaces exposées à l'ADN par différentes techniques.

Dans un premier temps, nous nous sommes consacrés à l'étude de l'interaction de molécules d'ADN avec des surfaces terminées par des fonctions phénols. Nous verrons de quelle manière nous avons déposé l'ADN sur la surface puis les observations que nous en avons faites. Enfin, nous caractériserons la conformation des molécules d'ADN en présence de phénol par microscopie à force atomique.

Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé par réflectivité de rayons X l'adsorption d'ADN sur des surfaces chargées fonctionnalisées par des amines. Ces expériences ont été réalisées au synchrotron ESRF. Nous présenterons dans un premier temps la méthode d'analyse des courbes de réflectivité qui a été développée et qui permet de caractériser l'adsorption de l'ADN. Nous présenterons ensuite les résultats que nous avons obtenus lors de l'adsorption de l'ADN simple brin et double brin et les conclusions que nous en avons tirées.

1 L'ADN sur des substrats phénolés

La renaturation d'ADN dans une émulsion de phénol et d'eau grâce à une agitation vigoureuse est connue sous le nom de PERT (Phenol Emulsion Reassociation technique) [Kohne et al., 1977]. Cette technique permet d'accélérer la renaturation d'ADN simple brin. Goldar et Sikorav ont étudié en détail cette technique et les mécanismes impliqués.

Leurs expériences récentes ont montré que l'interaction qui existe avec le phénol est spécifique à l'ADN simple brin [Goldar & Sikorav, 2004]. Sikorav et Goldar ont étudié des solutions très diluées de molécules d'ADN simple brin dans des systèmes biphasiques contenant de l'eau et du phénol en présence de sels monovalents (NaCl).

En l'absence de son brin complémentaire, l'ADN simple brin est adsorbé à l'interface eau/phénol dans un certain régime de concentrations en sels. La quantité d'ADN adsorbée dépend de la concentration en sels dans la solution : à 0,85 M NaCl, 85% des chaînes sont confinées de façon irréversible. En revanche, en diluant le sel cette adsorption est réversible. En l'absence d'agitation, l'adsorption est lente et contrôlée par la diffusion. En revanche, dès lors qu'une agitation est appliquée au système, elle s'effectue en quelques secondes.

Une fois que l'ADN simple brin est adsorbé à l'interface liquide eau/phénol, l'ajout du brin complémentaire entraîne une réaction de renaturation. Sikorav et Goldar ont démontré que cette réaction de renaturation est strictement interfaciale. L'ADN double brin ainsi formé est expulsé dans la phase aqueuse. Dans ce système, avec des concentrations adéquates en sels monovalents, la cinétique de renaturation peut être augmentée d'un facteur un million par rapport aux conditions classiques de renaturation dans le volume.

Les études faites par Kohne puis par Goldar et Sikorav ont été effectuées en l'absence de protéines. Pourtant, il existe de fortes similarités avec des protéines qui permettent par exemple d'obtenir de forts taux de renaturation. En effet, les protéines SSBP (Single Strand Binding Proteins) qui se lient préférentiellement à l'ADN simple brin permettent une renaturation rapide de longs brins d'ADN grâce à une adsorption et une diffusion de surface. Certaines de ces protéines ont été étudiées en détail d'un point de vue cristallographique. La figure 3.1 représente la protéine T4 GP32 décrite par Shamoo [Shamoo et al., 1995].

Le groupement latéral porté par la tyrosine est le phénol. Sur la figure 3.1, on remarque que le centre de la protéine où circule l'ADN est constitué de tyrosines (en vert). Ceci suggère que les sites de la protéine qui interagissent avec l'ADN sont

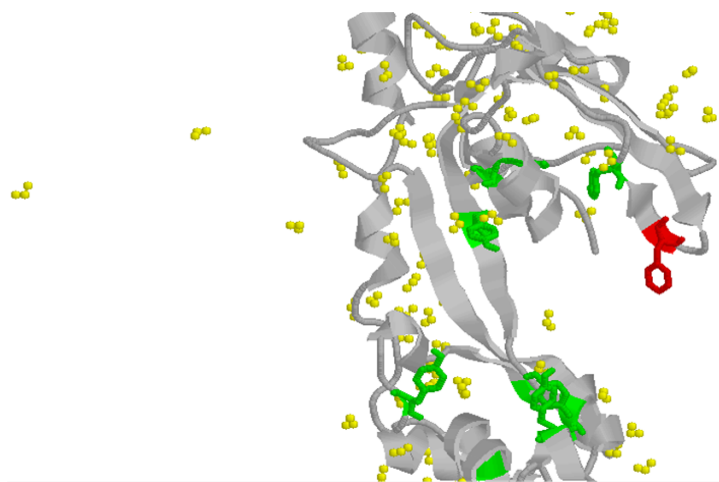


FIG. 3.1 – Protéine T4 GP32 qui se lie au simple brin d'ADN [Shamoo et al., 1995]. La structure cristallographique révèle qu'au centre de la protéine où circule l'ADN, des tyrosines sont présentes majoritairement. Les tyrosines ont un groupement latéral de phénol représenté en vert. Le groupement phénylalanine est représenté en rouge.

essentiellement des groupements de tyrosines.

D'autres protéines chargées de la reconnaissance de lésions des acides nucléiques possèdent des résidus de tyrosines qui interagissent avec l'ADN. Une des ces protéines est UvrB. Goosen et ses collaborateurs ont mis en évidence certaines de ses interactions [Moolenaar et al., 2001]. Ils ont montré que certains groupements tyrosines de UvrB (Tyr⁹²/Tyr⁹³) lui permettent de ne pas se fixer sur les sites intacts de l'ADN. Il a été confirmé par la suite [Skorvaga et al., 2004] que ces fonctions tyrosines permettent d'extruder un nucléotide abîmé hors de la double hélice et se glissent dans la place libre. D'autres tyrosines (Tyr⁹⁵/Tyr⁹⁶) ont un rôle de reconnaissance de lésions et se placent à leur voisinage. Ces résidus s'empilent dans la double hélice en déplaçant la base abîmée ou stabilisent la base abîmée déplacée. Enfin, les fonctions (Tyr¹⁰¹/Phe¹⁰⁸) de UvrB ont une activité importante de séparation des brins.

Ces études montrent que les interactions aromatiques jouent un rôle essentiel dans les liaisons entre les protéines et l'ADN. Mieux comprendre ces interactions pourrait conduire à une meilleure appréhension des interactions ADN/protéines *in vivo* et ainsi des mécanismes de reconnaissance et de réparation d'erreurs génétiques. Néanmoins, des questions de base restent encore en suspens :

- Est-ce que le phénol interagit avec les bases par empilement ?
- Est-ce qu'au contraire le phénol désorganise les bases ?

Pour étudier ces interactions, nous avons fonctionnalisé des surfaces de silicium par des molécules de phénol dans le but de pouvoir étudier la conformation de l'ADN par des techniques classiques de caractérisation de surface. D'autre part, Goldar et Sikorav ont montré que l'ADN, confiné à l'interface liquide phénol/eau, se renature de façon plus efficace. Si ce phénomène peut être reproduit sur des surfaces de silicium phénolées, ceci comporte un intérêt pour l'optimisation de capteurs biologiques tels que les biopuces ; la cinétique pourrait en être améliorée en permettant une diffusion à la fois à 2 et à 3 dimensions.

Pour observer l'interaction de surfaces phénolées avec des acides nucléiques, nous avons utilisé des molécules d'ADN radioactives que nous avons déposées sur des substrats solides.

1.1 Protocole de dépôt

Pour étudier les interactions ADN/substrat spécifiquement, il convient de perturber le système le moins possible. On doit s'efforcer de caractériser l'adsorption sans induire d'artefact de manipulation du système.

Le principe de l'expérience consiste à déposer sur la surface une solution de molécules d'ADN marquées de façon radioactive, à rincer ensuite la surface puis à exposer les échantillons pour compter la radioactivité adsorbée.

Pour ce faire, un cône troué en PTFE d'un diamètre de 8 mm est appliqué sur la surface de silicium. Le cône et la surface étant hydrophobes, pour une pression suffisante du cône sur la surface, le système est étanche (voir figure 3.2).

L'adsorption d'ADN simple brin et double brin a été étudiée. L'ADN simple brin est un ADN de synthèse d'une longueur de 118 bases obtenu chez Prologo. L'ADN double brin a une longueur de 300 paires de bases, il a été obtenu par amplification (PCR) à partir du phage ϕ X174 (voir Annexe E). Les molécules sont ensuite marquées radioactivement au ^{32}P en bout de chaînes (voir Annexe D). Tous les tubes ayant servi à la manipulation des solutions d'ADN ont été préalablement silanisés pour éviter une adsorption non spécifique sur les parois des tubes (voir Annexe C).

L'ADN est dissous dans une solution de tampon phosphate de pH 7,2 dont la

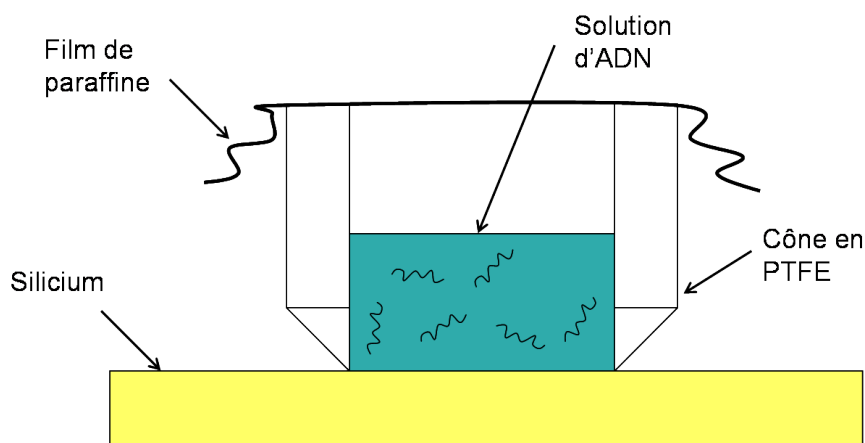


FIG. 3.2 – Schéma du principe de l'expérience permettant de déposer de l'ADN sur une surface de silicium. La solution d'ADN est déposée dans un cône en PTFE posé sur le silicium puis recouverte d'un film de paraffine.

concentration en sels monovalents (NaCl) varie. 100 μl de solution sont déposés à l'aide d'une pipette à l'intérieur du cône qui est ensuite recouvert d'un film de paraffine pour éviter l'évaporation et garder la concentration constante. La solution est laissée pendant 20 minutes au bout desquelles la surface est rincée.

Les surfaces fonctionnalisées par des molécules de phénol ont un caractère relativement hydrophobe. Dès lors qu'il ne reste pas assez de liquide sur la surface, un ménisque d'eau peut se créer, appliquant une force sur les molécules d'ADN qui pourraient alors être déposées de façon irréversible sur la surface par un phénomène différent de celui étudié. Pour éviter un tel phénomène et être sûr de compter uniquement la radioactivité provenant des molécules adsorbées pendant les 20 min, le rinçage de la solution se fait de façon précautionneuse. Tout d'abord, 400 μl de tampon identique à la solution de dépôt sont ajoutés, puis 400 μl sont ensuite prélevés; ceci est reproduit 4 fois. Lors du dernier rinçage, 400 μl sont ajoutés puis la totalité de la solution (500 μl) est prélevée. Chaque prélèvement après chaque rinçage est conservé dans un tube puis compté par effet Cherenkov.

La figure 3.3 représente le nombre de coups par minute par microlitre comptés par effet Cherenkov dans un prélèvement de rinçage, en fonction du nombre de rinçages.

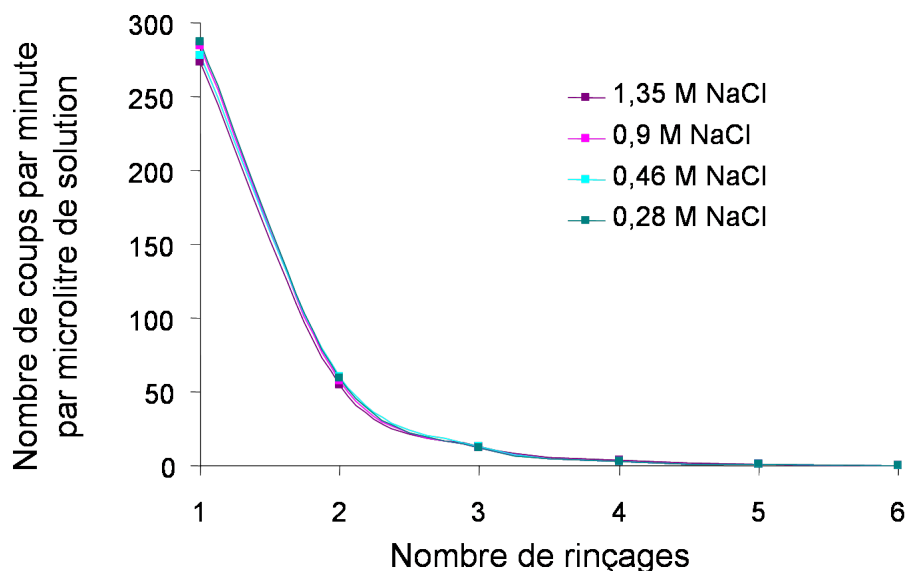


FIG. 3.3 – Graphique représentant le nombre de coups par minute par microlitre de solution de rinçage en fonction du nombre de rinçages d'un dépôt d'ADN simple brin de 118 bases. Les différentes courbes correspondent à différentes concentrations en NaCl dans la solution tampon.

La décroissance du nombre de coups par minute se fait de façon exponentielle et on remarque qu'après 6 rinçages, le nombre de coups dans la solution prélevée est négligeable. De cette manière, la radioactivité détectée sur la surface ne provient que de l'ADN adsorbé et non pas de celui qui serait resté dans la solution.

Une fois que la surface est rincée, la radioactivité émise par les molécules adsorbées est comptée à l'aide d'un Instant-Imager (Packard Instrument Company).

1.2 L'interaction de l'ADN avec l'interface

L'adsorption d'ADN simple brin a été étudiée à différentes concentrations en sels monovalents NaCl. Dans le cas de l'interface liquide/liquide étudiée par Goldar et Sikorav, l'adsorption est optimale à partir de 0,85 M.

La figure 3.4 représente le nombre de coups par minute émis par l'ADN adsorbé sur les surfaces de silicium fonctionnalisées. Dans ce cas, l'ADN est un simple brin de 118 bases de long.

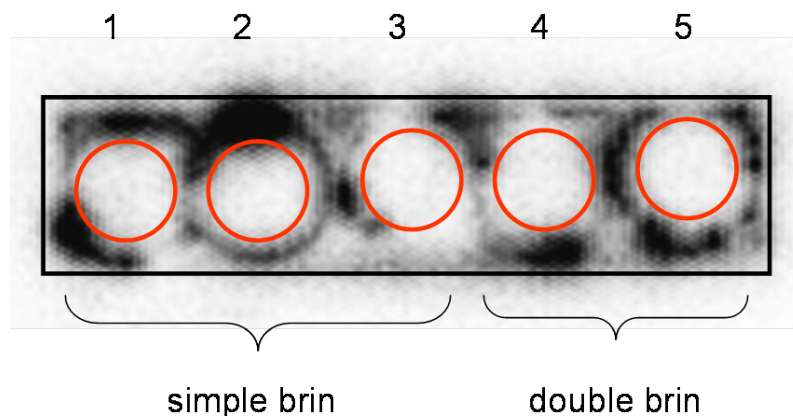


FIG. 3.4 – Coups par minute émis par l'ADN adsorbé sur des surfaces de silicium fonctionnalisées pour différentes solutions de dépôt. Différentes solutions d'ADN simple brin et double brin sont déposées avec différentes concentrations en NaCl. 1) solution de simple brin à 16,8 mM en NaCl, 2) solution de simple brin à 8,4 mM en NaCl, 3) solution de simple brin à 1,7 mM en NaCl, 4) solution de double brin à 16,8 mM en NaCl, 5) solution de double brin à 8,4 mM en NaCl.

On dépose sur la surface des solutions dont la concentration en ADN est constante (environ $2 \times C^{*1}$ c'est-à-dire autour de $2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ compte-tenu de la géométrie du cône, autant pour le simple brin que pour le double brin) et dont les concentrations en sels varient sont déposées sur la surface.

Chaque surface est découpée en différentes parties sur lesquelles le cône en PTFE est appliqué. Chaque solution différente est déposée sur un nouveau morceau. Sur la figure 3.4, on note la présence de cercles correspondant à de la radioactivité due à l'infiltration de la solution entre le cône et la surface. Cette partie de la solution n'a pas pu être rincée et reste sur la surface après avoir enlevé le cône. Ces cercles ne sont pas significatifs d'une adsorption spécifique de l'ADN.

Sur la figure 3.4, la zone 1) correspond à une solution de simple brin à 16,8 mM en NaCl, la 2) correspond à une solution de simple brin à 8,4 mM en NaCl, 3) correspond à une solution de simple brin à 1,7 mM en NaCl, la 4) correspond à une solution de double brin à 16,8 mM en NaCl et la zone 5) correspond à une solution de double brin à 8,4 mM en NaCl. On remarque qu'il n'y a aucun signal

¹ C^* est la concentration pour laquelle le nombre de molécules contenues dans la solution permet de recouvrir la surface de façon dense.

radioactif provenant de l'intérieur des cercles. La figure montre qu'il n'y a aucune adsorption d'ADN simple brin sur les surfaces fonctionnalisées par de la tyramine pour les différentes concentrations en sels.

Lors des expériences réalisées par Goldar et Sikorav, dans le mélange d'eau et de phénol, il existe une partition du phénol dans l'eau et de l'eau dans le phénol qui dépend de la concentration en sels. Pour des grandes concentrations en NaCl, la limite d'un mélange monophasique est de 5% de phénol en volume dans l'eau. Il est possible que cette quantité de phénol dissout dans l'eau intervienne lors du confinement de l'ADN à l'interface. Nous avons alors refait les expériences précédentes en présence de 5% phénol en volume dans la solution aqueuse tamponnée. Le phénol provenant de chez Sigma est d'abord saturé en tampon phosphate à pH 7,2 selon le protocole décrit par Maniatis [Sambrook et al., 1989], avant d'être ajouté aux solutions de dépôt. D'autre part, Goldar et Sikorav observent une adsorption à l'interface pour des concentrations en sels relativement élevées (supérieures à 1 M). Nous avons alors étudié l'adsorption de l'ADN simple brin et double brin dans ces conditions.

La figure 3.5 montre différentes surfaces sur lesquelles ont été déposées des solutions d'ADN contenant ou non 5% de phénol pour différentes concentrations en NaCl.

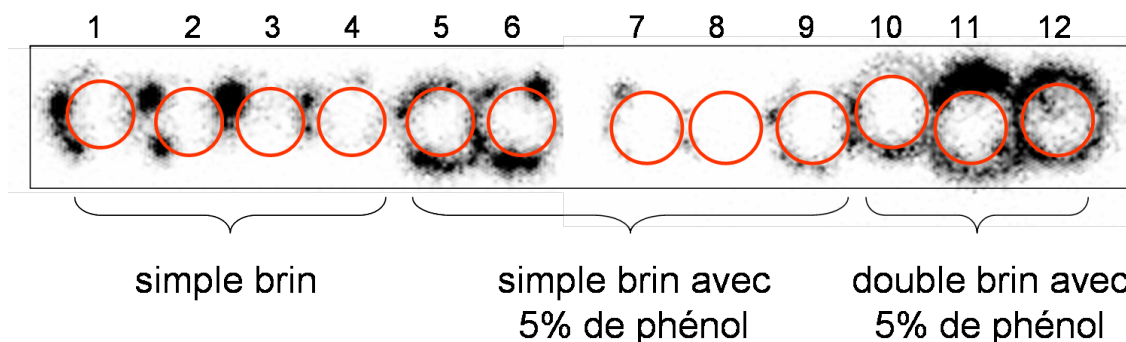


FIG. 3.5 – Coups par minute émis par l'ADN adsorbé sur des surfaces de silicium fonctionnalisées pour différentes solutions de dépôt. Différentes solutions d'ADN simple brin (zones 1 à 9) et double brin (zones 10 à 12) sont déposées avec différentes concentrations en NaCl, avec (zones 5 à 12) ou sans (zones 1 à 4) phénol dans la solution.

La concentration de la solution de dépôt est la même que précédemment (environ $2 \times C^*$, c'est-à-dire autour de $2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ pour le simple brin et le double

brin). Les zones 1, 2, 3 et 4 correspondent à une solution d'ADN simple brin, sans phénol et dont les concentrations en sels sont respectivement 1,35 M, 0,9 M, 0,46 M et 0,28 M. Les zones 5, 6, 7, 8 et 9 correspondent à une solution d'ADN simple brin avec 5% de phénol dans la solution et dont les concentrations en sels sont respectivement 1,35 M, 0,9 M, 0,46 M, 2 M et 3 M. Les zones 10, 11 et 12 correspondent à une solution d'ADN double brin avec 5% de phénol dans la solution et dont les concentrations en sels sont respectivement 3 M, 2 M et 1,35 M.

On observe également des cercles correspondant aux pourtours du cône sous lequel la solution s'est insérée. En revanche, de la même manière que précédemment, aucune radioactivité n'est détectée à l'intérieur des cercles. Il n'y a pas d'adsorption spécifique d'ADN simple brin ou double brin sur les surfaces de silicium fonctionnalisées par la tyramine. Ceci est vrai pour différentes concentrations en sels et en présence ou non de phénol dans la solution. D'autre part, lorsqu'on additionne la totalité des coups par minute de chaque prélèvement de rinçage, on retrouve l'équivalent de l'activité de la solution d'ADN initiale aux erreurs de comptage et de mesure près. Cela confirme que la radioactivité mesurée sur les surfaces est négligeable comparée à l'activité de la solution de dépôt.

Alors qu'un confinement à l'interface liquide/liquide a été observé précédemment dans un mélange biphasique d'eau et de phénol, il semblerait que dans le cas d'une surface solide et atomiquement plane, le confinement n'a pas lieu. Les propriétés physiques intrinsèques aux interfaces solide/liquide sont différentes de celles de l'interface liquide/liquide. Ces propriétés peuvent être à l'origine d'une adsorption dans certains cas. Les interactions de l'ADN avec des molécules de phénol en solution (c'est-à-dire avec plus de degrés de liberté) sont peut-être plus faciles.

1.3 L'interaction de l'ADN avec le phénol : images AFM sur mica

Nous venons de voir qu'il n'existe pas d'interaction spécifique entre l'ADN et les surfaces de silicium fonctionnalisées par la tyramine. Nous avons procédé de façon différente pour observer l'interaction du phénol avec l'ADN simple brin. En effet, en fonctionnalisant des surfaces par des molécules chargées, l'ADN s'adsorbe sur la surface. Après avoir rincé la surface, il est alors possible de faire des images par microscopie AFM. De cette manière, la conformation des molécules peut être caractérisée, selon qu'il y ait du phénol ou non dans la solution de dépôt.

1.3.1 Le protocole expérimental

Le protocole expérimental consiste à utiliser des surfaces de mica. Le mica est constitué de feuillets tenus entre eux par des liaisons électrostatiques. Une fois clivé à l'aide d'un morceau de scotch, un plan atomique est alors découvert. Une solution tampon 5 mM HEPES avec 5 mM NaCl et 5 mM MgCl₂ est déposée sur la surface et laissée à incuber pendant 2 minutes. La solution tampon est ensuite enlevée, la surface est rincée à l'eau ultra pure (milliQ) puis laissée à sécher. Une solution d'ADN dans le même tampon (5 mM HEPES, 5 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) est ensuite déposée sur la surface, laissée à incuber 10 minutes. La surface est ensuite rincée à l'eau ultra pure (milliQ) et séchée. Cette technique étudiée en détail par Hansma [Hansma & Laney, 1996] permet d'accrocher de l'ADN sur les surfaces de mica. L'ADN utilisé est du ϕ X174 virion. Ces molécules d'ADN simple brin sont circulaires et ont une longueur de 5386 bases.

Dans ce protocole, la concentration en ADN est un paramètre important. La figure 3.6 représente les images en microscopie AFM des surfaces de mica sur lesquelles une solution d'ADN a été déposée. La surface est ensuite rincée puis séchée.

Sur l'image de la figure 3.6 -(a), la concentration de la solution en ADN utilisée pour le dépôt sur la surface est de $14,8 \cdot 10^{-10}$ M en chaînes d'ADN. De larges zones de la surface sont couvertes par des molécules d'ADN agrégées. Dans ces zones, la conformation des agrégats est homogène.

Sur l'image de la figure 3.6 -(b), la concentration de la solution en ADN utilisée pour le dépôt sur la surface est de $14,8 \cdot 10^{-11}$ M en chaînes d'ADN. Cette solution est donc 10 fois plus diluée que celle utilisée pour obtenir l'image (a). On remarque dans ce cas que les molécules n'adoptent pas du tout la même conformation que précédemment. On observe des agrégats de quelques microns parsemés sur la surface. La hauteur des agrégats est pratiquement constante et de l'ordre de 14-15 Å. Cette hauteur constante suggère d'une part que les agrégats observés correspondent bien à de l'ADN simple brin (et non pas à des impuretés physisorbées), et qu'il pourrait y avoir d'autre part une réorganisation de la conformation des molécules à 2 dimensions.

Un changement d'un facteur 10 dans la concentration en ADN de la solution de dépôt peut avoir des conséquences importantes sur la géométrie des agrégats d'ADN adsorbés sur la surface.

À ce stade, nous nous sommes interrogés sur le processus d'agrégation des molécules d'ADN dans ce système, à savoir :

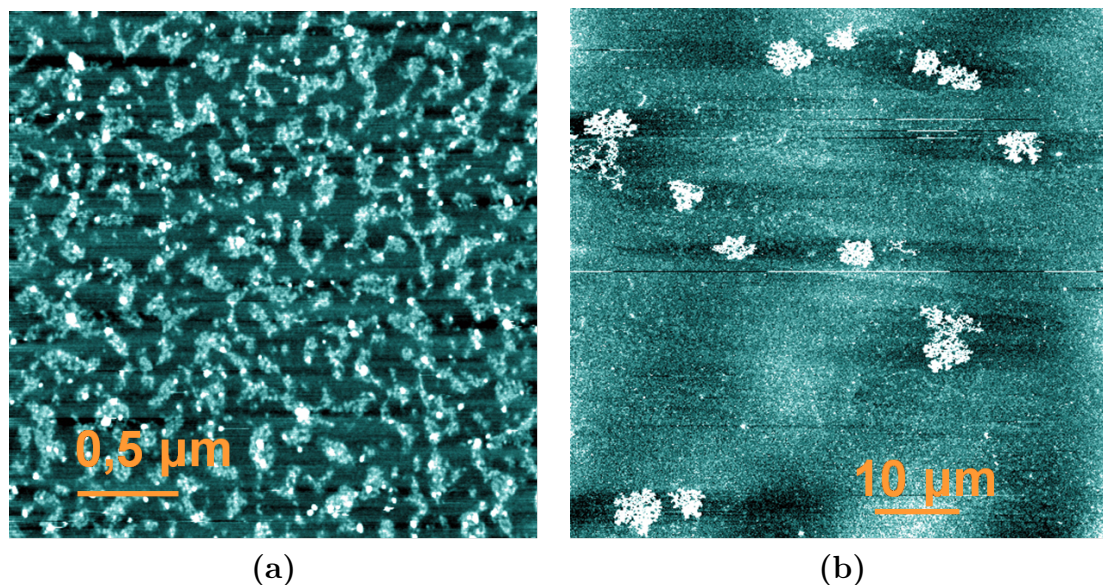


FIG. 3.6 – Images en microscopie AFM à l’air de molécules d’ADN déposées sur du mica. (a) La concentration d’ADN dans la solution de dépôt est de $14,8 \cdot 10^{-10}$ M en chaînes. (b) La concentration d’ADN dans la solution de dépôt est de $14,8 \cdot 10^{-11}$ M en chaînes.

- est-ce que les molécules s’agrègent d’abord dans le volume grâce à la présence de NaCl et de $MgCl_2$, pour ensuite s’adsorber sur la surface,
- ou bien est-ce que les molécules s’adsorbent d’abord sur la surface de mica chargée puis diffusent à 2 dimensions pour s’agrèger ?

Nous avons alors étudié l’agrégation de l’ADN simple brin dans le volume en présence de NaCl et de $MgCl_2$ dans la solution. La figure 3.7 montre la fraction d’ADN soluble dans une solution à 5 mM HEPES et 5 mM NaCl, en fonction de la concentration en $MgCl_2$.

La figure 3.7 montre que la fraction d’ADN soluble dans la solution est constante pour une concentration en $MgCl_2$ inférieure à 150 mM environ. Au-delà de 150 mM, l’ADN n’est plus dans le volume de la solution après centrifugation, il peut être agrégé. Cela signifie que dans les conditions de dépôt d’ADN sur les surfaces de mica, l’ADN ne s’agrège pas dans la solution. Les molécules peuvent s’adsorber sur la surface dans un premier temps, puis diffuser ensuite à 2 dimensions pour s’agrèger.

Nous verrons dans le chapitre 4 qu’il convient d’être prudent quant à l’interprétation des diagramme de phases de la solubilité de l’ADN simple brin en présence de sels et notamment sur ce qu’il advient de l’ADN non solubilisé. En effet, il existe des

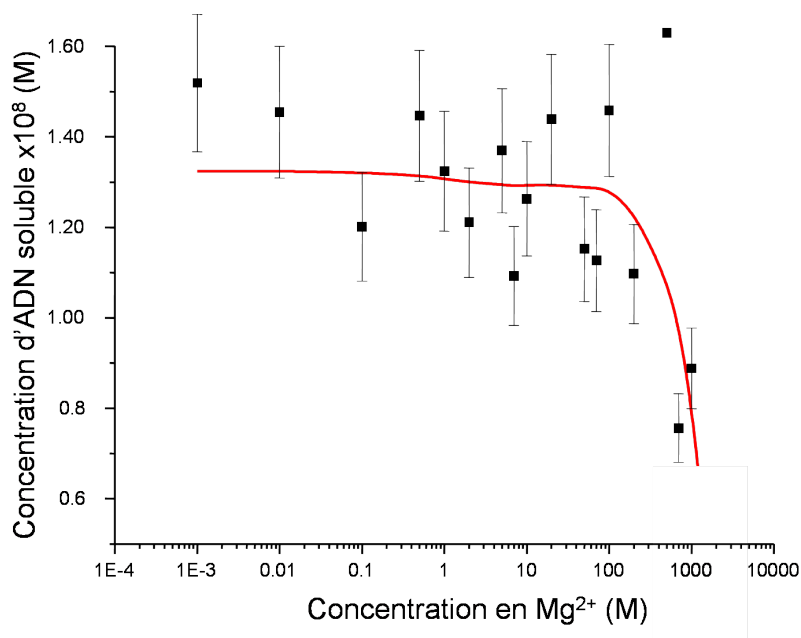


FIG. 3.7 – Solubilité de l'ADN simple brin ϕ X174 virion dans une solution à 5 mM HEPES et 5 mM NaCl en fonction de la concentration en $MgCl_2$.

processus complexes de changement de phases corrélés à une adsorption à l'interface eau/air des acides nucléiques dont nous étudierons plus tard certains mécanismes. Ceci ne concerne pas les conditions de concentrations utilisées dans ces expériences de dépôt d'ADN sur des surfaces de mica.

1.3.2 L'influence du phénol sur la conformation de l'ADN

Nous avons ensuite cherché à savoir, de quelle façon le phénol peut influencer la conformation des chaînes adsorbées sur la surface. De la même manière que précédemment, nous avons déposé une solution d'ADN contenant 4% (en volume) de phénol. La figure 3.8 montre des images AFM de surfaces de mica sur lesquelles une solution d'ADN a été déposée. La solution est la même que précédemment : 5 mM HEPES, 5 mM NaCl et 5 mM $MgCl_2$ avec une concentration en ADN de $14,8 \cdot 10^{-11}$ M en chaînes. Le phénol a été préalablement saturé en Tris à pH 7 pour fixer le pH de la solution.

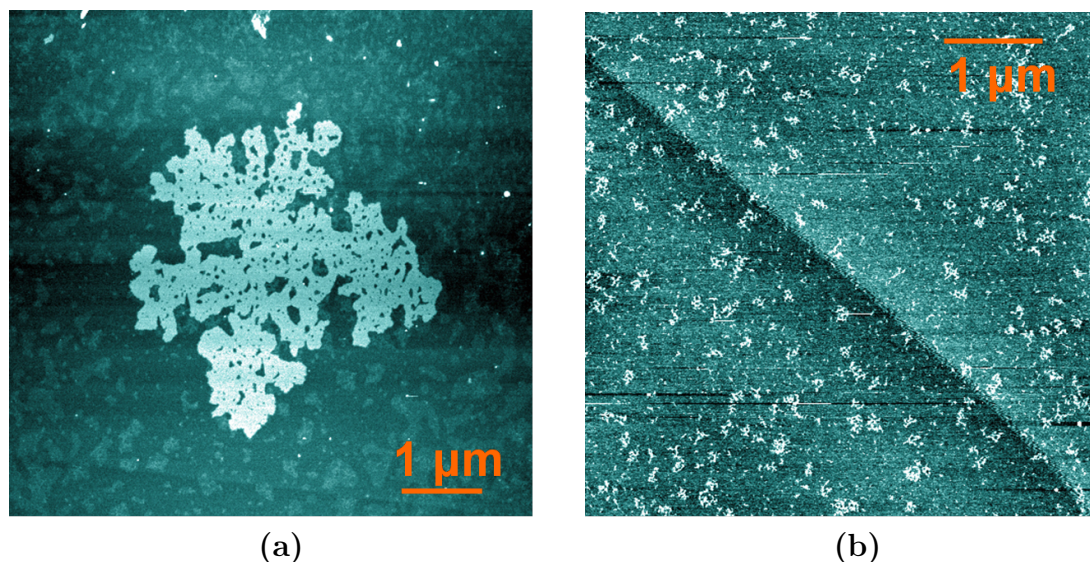


FIG. 3.8 – Images en microscopie AFM à l’air de molécules d’ADN déposées sur du mica. (a) La solution de dépôt à $14,8 \cdot 10^{-11}$ M en chaînes de ϕ X174 virion ne contient pas de phénol. (b) La solution de dépôt à $14,8 \cdot 10^{-11}$ M en chaînes de ϕ X174 virion contient 4% de phénol.

Sur les deux images de la figure 3.8, le seul paramètre qui diffère est la présence de 4% phénol dans la solution de dépôt de l’image de droite. Les deux images sont à la même échelle. On remarque que la conformation des chaînes de ϕ X174 virion est totalement différente dans les deux cas. Dans la cas de la figure 3.8 -(a), on note la présence d’un agrégat comme décrit dans le paragraphe précédent. Dans la cas de la figure 3.8 -(b), les chaînes d’ADN sont complètement éparpillées sur la surface. Elles ne forment pas de gros agrégats. La présence de phénol dans la solution entraîne une brisure des agrégats ou les empêche de se former.

2 DNA adsorption at amine-functionalized Si/buffer interfaces studied by X-ray reflectivity

2.1 Introduction

Une des interactions les plus importantes entre de l'ADN et une interface est le cas d'une surface chargée positivement. L'adsorption de polymères chargés sur des surfaces ou interfaces est un problème classique de physique des polymères qui a été étudié de façon extensive durant ces quelques dernières dizaines d'années. L'intérêt porté à ce sujet est sans cesse stimulé par son importance dans divers domaines scientifiques, allant de la physique des matériaux à la biologie.

L'adsorption d'ADN sur des surfaces chargées est d'une part utile pour étudier la conformation des molécules qui y sont adsorbées, comme nous l'avons fait au paragraphe précédent. D'autre part, l'étude en soi des mécanismes d'adsorption dans un système modèle permet de mieux comprendre les interactions qui existent *in vivo*. L'ADN est entouré dans la cellule d'éléments chargés avec lesquels il interagit par interaction coulombienne (nucléosome, protéines, parois internes des membranes,...).

Pour discriminer les mécanismes d'interaction électrostatique entre une surface chargée et l'ADN des autres interactions non spécifiques, il convient de contrôler à la fois chimiquement et physiquement les interfaces. D'autre part, afin de ne pas perturber le système, la technique d'observation doit être la moins invasive possible. Il est en effet intéressant de caractériser l'adsorption de l'ADN lorsqu'il est en solution et qu'il garde ses propriétés structurales (couche d'hydratation, contre-ions,...) (voir chapitre 1).

La technique de réflectivité de rayons X permet de sonder la surface solide à l'interface avec une solution. Il est ainsi possible de caractériser l'adsorption de molécules d'ADN sur une surface de silicium fonctionnalisée par des molécules amines. En solution, pour un pH autour de 7, les amines sont protonnées en NH_3^+ . Il existe alors une interaction électrostatique avec l'ADN. Dans ce paragraphe, nous utiliserons la technique de réflectivité de rayons X qui nous permettra, après une analyse fine, de caractériser l'interaction entre la surface et l'ADN.

2.2 Surface preparation

Single-crystal silicon is a substrate material of choice, as it is quite widely used in the semiconductor industry and is fairly easily manipulated. Its surface chemistry is, in principle, well controlled and its topography well defined. Large, flat, very smooth surfaces can be obtained.

In this work, Si(111) wafers² were first cleaned in a “piranha” solution ($1 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 : 2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$), then stripped of their native oxide layer by anisotropic etching in an ammonium fluoride (NH_4F) bath (pH 7-8) in the presence of a trace amount of ammonium sulfite $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3]$. (The presence of SO_3^{2-} ions in the etching solution prevents the pitting of the surface (see chapter 2).) This chemical reaction removes the surface oxide down to the Si(111) dense plane, yielding a stairway of regular, monoatomic steps when the miscut is oriented in the crystallographic $[11\bar{2}]$ direction (see figure 3.9).

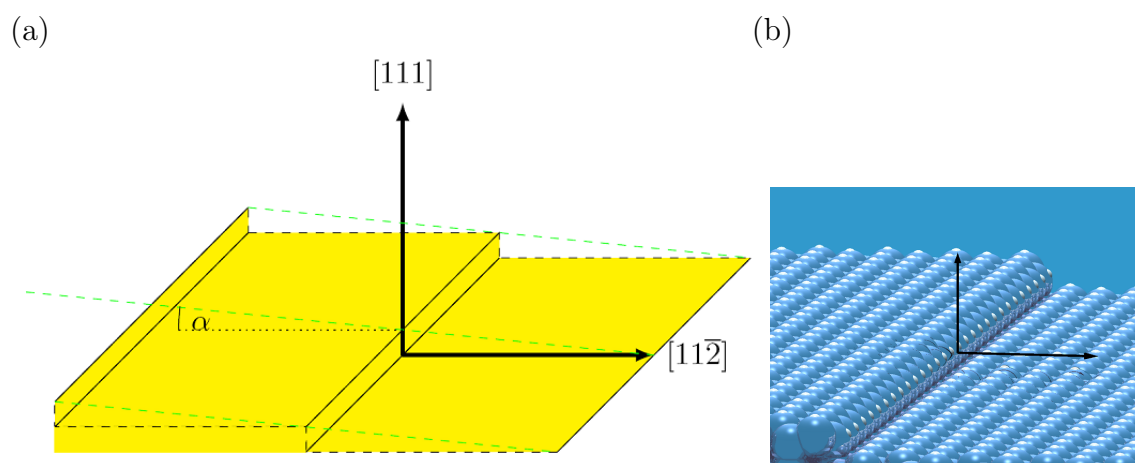


FIG. 3.9 – Si(111). (a) A miscut of angle α in the $[11\bar{2}]$ direction yields regular steps of height $d_{(111)} = 0.314 \text{ nm}$ and width $\ell = d_{(111)}/\tan \alpha$. (b) Hydrogen-terminated, atomic-scale lattice model.

The hydrogen passivated pure silicon surface will oxidize if not protected. Through a multi-step chemical process, a covalently-bonded functionalized mo-

²The Si(111) 4" wafers, 500 – 550 μm thick, n-doped (resistance $5 - 10 \Omega \cdot \text{cm} \rightarrow 4 - 9 \times 10^{14} \text{ P/cm}^3$), polished on one side, were obtained from Siltronix, France.

nomolecular monolayer is assembled. Firstly, an ester terminated alkyl chain, ethyl undecylenate [$\text{CH}_2=\text{CH}-(\text{CH}_2)_8-\text{CO}-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_5$, $M_w = 212.33 \text{ g/mol}$, $\rho = 0.878 \text{ g/cm}^3$], is covalently and regularly attached to the silicon crystal lattice (see figure 3.10).

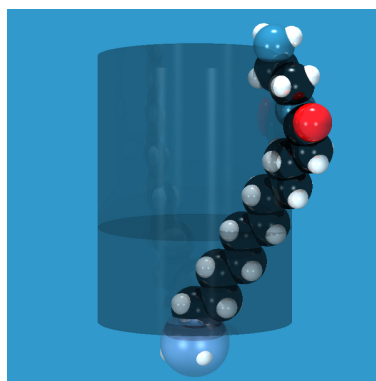


FIG. 3.10 – Molecular model of ethylenediamine functionalized ethyl undecylenate bound to a silicon atom. Red : oxygen, blue : nitrogen, black : carbon, white : hydrogen. The transparent cylinder represents a volume of $0.294 \text{ nm}^2 \times 1.504 \text{ nm}$.

The chemical reaction is thermally activated, yielding a dense surface coverage, limited by steric hindrance to every other exposed silicon binding site. The ester can be transformed by hydrolysis to an acid group (COOH), allowing the subsequent coupling to an amine group of various molecules, yielding the desired chemical functionalization of the organic layer. For example, a positively charged surface is obtained through the attachment of ethylenediamine ($\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$, $M_w = 60.1 \text{ g/mol}$, $\rho = 0.899 \text{ g/cm}^3$). A hydrophobic surface can be obtained through the use of 1-octene [$\text{CH}_2=\text{CH}-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_3$, $M_w = 112.24 \text{ g/mol}$, $\rho = 0.715 \text{ g/cm}^3$] or 1-decene.

Through very careful and clean chemistry, the atomically-flat staircase structure of the etched, perfect silicon surface can be preserved. Atomic force microscopy images at three different magnifications of the resulting ethylenediamine functionalized surface are shown in figure 3.11.

Whereas each step is indeed atomically flat in these substrates of exceptional quality, the numerically calculated the root-mean-squared roughnesses σ depend on the image size and were given as 0.155, 0.148 and 0.144 nm, respectively. For a

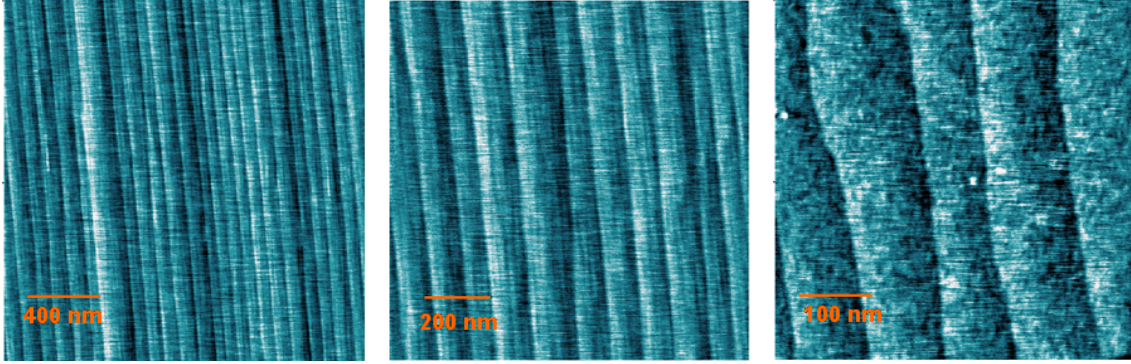


FIG. 3.11 – AFM images at three magnifications of an amine terminated Si(111) functionalized surface (see chapter 2). The step size of ~ 100 nm corresponds to a miscut of 0.18° .

simple, one-dimensional step-like interface, $z(x) = d_{(111)}x/\ell$ $[0, \ell]$,

$$\sigma = \left\{ \frac{1}{\ell} \int_0^\ell dx [z(x) - \langle z \rangle]^2 \right\}^{1/2} = \frac{d_{(111)}}{2\ell} \left(\frac{1}{\ell} \int_0^\ell dx x^2 \right)^{1/2} = \frac{d_{(111)}}{2\sqrt{3}} = 0.091 \text{ nm} \quad (3.1)$$

(the discrete AFM roughness is therefore overestimated). This technique does not take into account the atomic roughness (ionic radius : $R_{\text{Si}} = 0.117$ nm).

2.3 X-ray reflectivity

Atomic force microscopy can be performed in solution with a lateral resolution of the surface morphology as small as several nanometers. It is a local technique, scanning only a small region of the surface. Reflectivity is a complementary, non-invasive, reciprocal-space technique that yields a model for the density profile, $\langle \rho(z) \rangle_{xy}$, averaged over the surface. The use of X rays measures the electron density profile, neutrons can advantageously enhance the sensitivity or contrast through selective deuteration and ellipsometry measures the optical index profile, all with atomic resolution in the \hat{z} direction. For the study of DNA adsorption, we chose to perform X-ray reflectivity studies as the details of the physical chemistry are found to be strongly affected in D_2O . Nevertheless, we were inspired here by the neutron reflectivity technique to use contrast variation to improve the determination of the interface profile.

The optical index for X rays depends on the wavelength, is inferior to unity for all matter and is complex :

$$n(\lambda) = 1 - \delta(\lambda) + i\beta(\lambda). \quad (3.2)$$

The real difference from unity $\delta(\lambda)$ is given by

$$\delta(\lambda) = \rho\lambda^2 \frac{N_A}{2\pi A} [Z + \Delta f'(\lambda)]r_0 \quad (3.3)$$

where ρ is the mass density, $N_A = 6.023 \times 10^{23}$ is Avogadro's number, λ is the X-ray wavelength ($E = hc/\lambda$ with $hc = 1.239852$ keV · nm), A is the atomic weight, Z is the atomic number, $\Delta f'(\lambda)$ is the (zero angle) dispersion correction to the atomic scattering factors due to core-electron screening and $r_0 = 2.818 \times 10^{-13}$ cm is the classical electron radius for Thompson scattering. The energy-dispersive core-electron screening correction $\Delta f'$ is very small for the light elements : 0.1 for Si and P, 0.2 for Ge, etc. at 17.4 keV [MacGillavry & Rieck, 1983] and can be neglected here. The real difference from unity of the X-ray optical index is directly proportional to the mass density and to the square of the wavelength, as the ratio Z/A is a constant and equal to $\frac{1}{2}$ to a good approximation for all chemical compositions under study. The formalism for neutron reflectivity is the same, substituting nuclear scattering lengths b for the quantity Zr_0 . The imaginary part of the X-ray optical index $\beta(\lambda)$ is

$$\beta(\lambda) = \frac{\mu(\lambda)\lambda}{4\pi} \quad (3.4)$$

where $\mu(\lambda)$ is the wavelength-dependent absorption coefficient (inverse of the absorption length). In terms of atomic scattering factors, the index can be written : $n = 1 - N r_0 \lambda^2 (f_1 + if_2)/(2\pi)$ for $N = N_A \rho / A$ atoms per unit volume. f_1 exhibits characteristic resonances but otherwise varies slowly with X-ray energy and tends toward the atomic number Z in the limit of high energies; f_2 varies strongly with energy and exhibits discontinuities at the characteristic absorption edges. Between these absorption edges, to a very good approximation as given by Victoreen [Victoreen, 1948, Victoreen, 1949, Victoreen, 1943], the absorption coefficient $\mu = N2r_0\lambda f_2$ varies as $(\mu/\rho)_Z = [C_Z\lambda^3 - D_Z\lambda^4 + N_A\sigma_{K-N}(\lambda) + \dots]$ where C_Z and D_Z are empirical constants and $\sigma_{K-N}(\lambda)$ is the scattering coefficient of a free electron [MacGillavry & Rieck, 1983] (see figure 3.12).

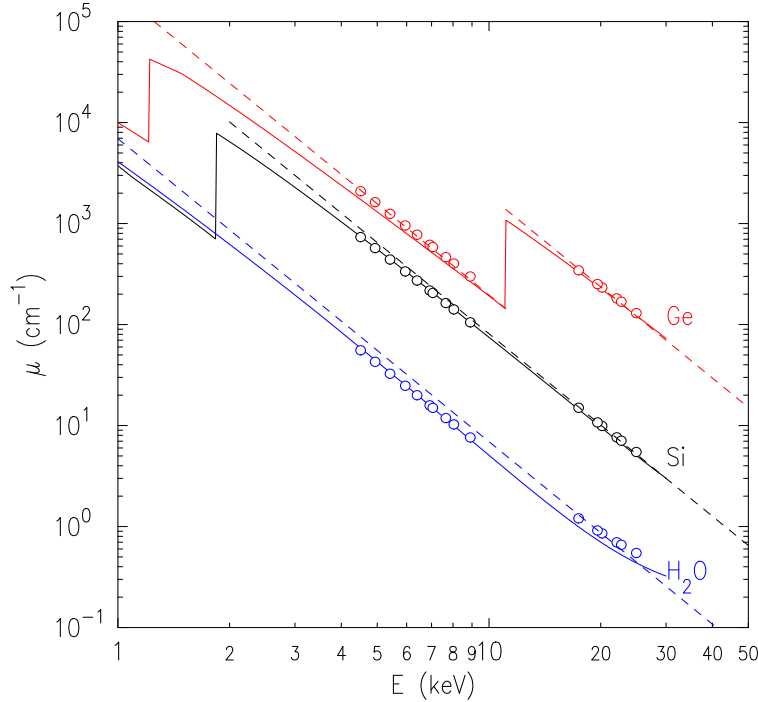


FIG. 3.12 – Linear absorption coefficients. Blue : H₂O; black : Si; red : Ge. Solid lines are calculated according to reference [Henke et al., 1993] (see also [CXRO, 2007]); circles : tabulated values from the International Tables of Crystallography [MacGillavry & Rieck, 1983, Victoreen, 1948, Victoreen, 1949, Victoreen, 1943]; dashed lines are best fits (above 10 keV) to a simple λ^3 power-law dependence. Note the significant differences between the calculated (lines) and tabulated (circles) absorption coefficients, although not prominent in this log-log plot.

For 22.2 keV X rays (see below), the e^{-1} absorption length in water is 1.44 cm.

Total external reflection of grazing-incidence X rays occurs up to a critical angle $\theta_c \approx \sqrt{2\Delta n}$ where $\Delta n = \delta_- - \delta_+$ is the difference in X-ray optical indices between the two semi-infinite media. Thus, the critical angle, $\theta_c \approx \lambda\sqrt{\Delta\rho N_A r_0}/2\pi$, is proportional to the wavelength and is calculated to be 0.0802° (1.40 mrad) for the air/Si interface and 0.0607° (1.06 mrad) for the H₂O/Si interface at $\lambda = 0.05586$ nm, $hc/\lambda = 22.2$ keV (see below); the critical wavevector transfer, $Q_c = (4\pi/\lambda)\theta_c = 2\sqrt{2\pi\Delta\rho N_A r_0}$, is a constant, independent of the X-ray wavelength (0.315 nm⁻¹ and 0.238 nm⁻¹, respectively for the air/silicon and water/silicon

interfaces).

At larger angles of grazing incidence, the reflectivity $I(\theta)/I_0$ decreases rapidly with angle of incidence, as given by the Fresnel law which can be approximated beyond about twice the critical angle of total reflection by :

$$R_F(\theta) \approx (\theta_c/2\theta)^4 \quad (\text{for } \theta_c \ll \theta \ll 1). \quad (3.5)$$

In the context of the first Born approximation (neglecting multiple scattering, thus “far” from the critical angle for total reflection), the effect of a non-step interface profile is given by [Beckmann & Spizzichino, 1963], [Wu & Webb, 1973], [Braslau et al., 1988] :

$$R(Q_z) \approx \left(\frac{Q_c}{2Q_z} \right)^4 \left| \int dz e^{iQ_z z} \frac{1}{\rho_0} \frac{\partial \rho(z)}{\partial z} \right|^2 \quad (3.6)$$

(valid only at $Q_z \gg Q_c$); $\rho_0 \equiv \rho(-\infty)$. The “Fresnel” reflectivity of the ideal silicon interface is modulated by the absolute-value squared of the Fourier transform of the derivative of the real surface density profile, yielding a series of Kiessig fringes [Kiessig, 1931b], [Kiessig, 1931a] for a thin surface layer. For a stratified interface, described by the sum of error-function profiles between “slabs” of constant density, the Fourier transform yields a sum of Gaussians modulating the overall Q^{-4} dependence.

Alternately, the reflectivity can be calculated efficiently using the matrix transfer multiplication method [Abelès, 1948] taking into account interfacial widths [Nevot & Croce, 1980]. This has the advantage of remaining valid near the critical angle (note, however, that X-ray beam coherence effects can be observed very close to the critical angle when using a synchrotron wiggler or undulator source).

As the reflectivity depends both on incidence angle and on wavelength, different schemes can be employed, each presenting specific advantages, mostly technical, depending on the experimental conditions. Figure 3.13 -(a) shows schematically the wavevector transfer kinematics of a fixed-energy experiment where the angle of incidence is varied ; figure 3.13 -(b) shows the kinematics of a fixed-angle experiment where the X-ray beam energy is varied. This second scheme is used for neutron time-of-flight reflectivity measurements. Both schema are presented below.

In a real experiment, the instrumental resolution reciprocal-space volume is determined by incident and detected beam divergences as well as by the wavelength or energy resolution (see figure 3.13c).

The intensity measured is not purely specular : Both diffuse scattering from the volume of the substrate or the surrounding environment and from surface roughness

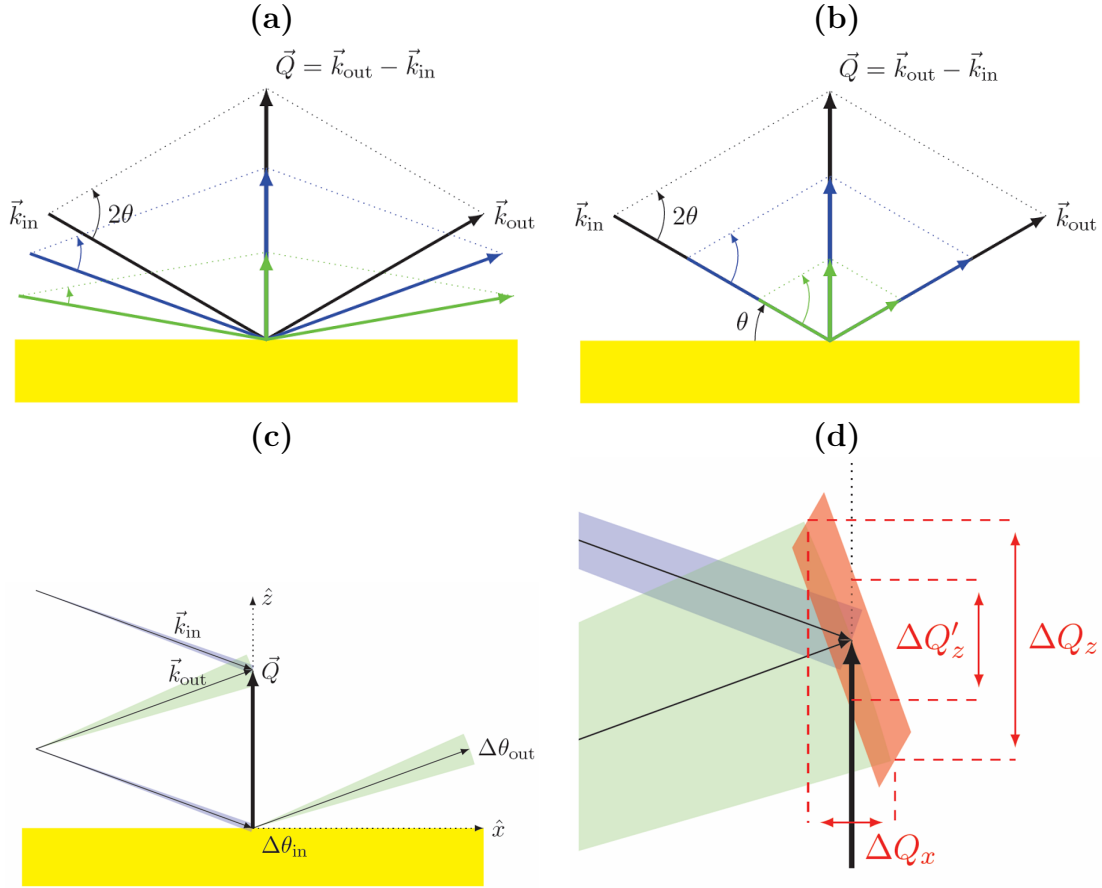


FIG. 3.13 – Schematic of the kinematics of specular reflectivity. (a) fixed wavelength(λ), variable angle of incidence (θ); (b) fixed angle of incidence, variable wavelength. $|\vec{k}_{in}| = |\vec{k}_{out}| = 2\pi/\lambda$, $\vec{Q} = (4\pi/\lambda) \sin\theta \hat{z}$. (c) The blue(green) shaded region schematize the incident(detector) divergence $\Delta\theta_{in}(\Delta\theta_{out})$; (d) Resolution volume around the scattering vector. The red region shows a section of the convoluted resolution volume. $\Delta Q'_z = 2\frac{2\pi}{\lambda} \Delta\theta_{in} \cos\theta_{in}$; $\Delta Q_z = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta\theta_{out} \cos\theta_{out}$; $\Delta Q_x = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta\theta_{out} \sin\theta_{out}$. The divergences in the third dimension, out of the incidence plane, are not shown for clarity.

(non-planar morphology of the surface) contribute to the measured signal. This is an often-overlooked, non-trivial problem to be addressed through the careful design of the experiments and data analysis presented below. In the present problem, the diffuse scattering due to penetration to the bulk of the single-crystal silicon substrate is minimal, however the diffuse scattering due to density fluctuations in the aqueous environment is significant.

Energy-dispersive reflectivity

Preliminary reflectivity experiments were first performed at the University of Bath, England using an energy dispersive reflectometer [Felici, 1995] (see figure 3.14).

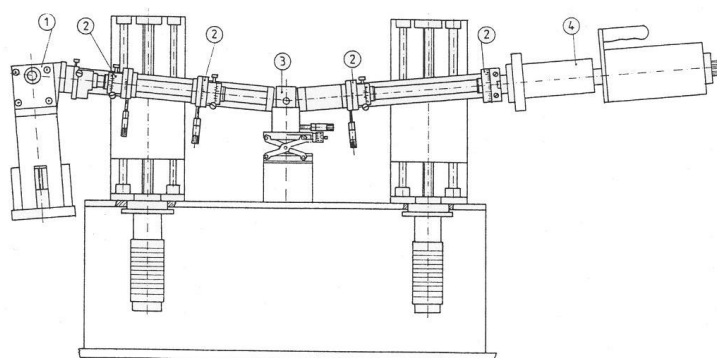


FIG. 3.14 – The energy-dispersive reflectometer at Bath [Felici, 1995]. (1) X-ray tube source; (2) collimating slits (3) sample position (4) Germanium solid-state energy sensitive detector.

The continuous *bremsstrahlung* radiation from a tungsten sealed-tube X-ray source, run at a stabilized high voltage of 55 kV and a regulated current of 25 mA (reduced to 15 mA when the samples were in air), is collimated using tungsten slits and detected using an energy-sensitive solid-state Ge detector. The transmitted radiation spectra are shown in figure 3.15.

The high-energy end of the spectra is limited by the applied high-voltage; The low-energy fall-off of the *bremsstrahlung* spectrum is further attenuated by

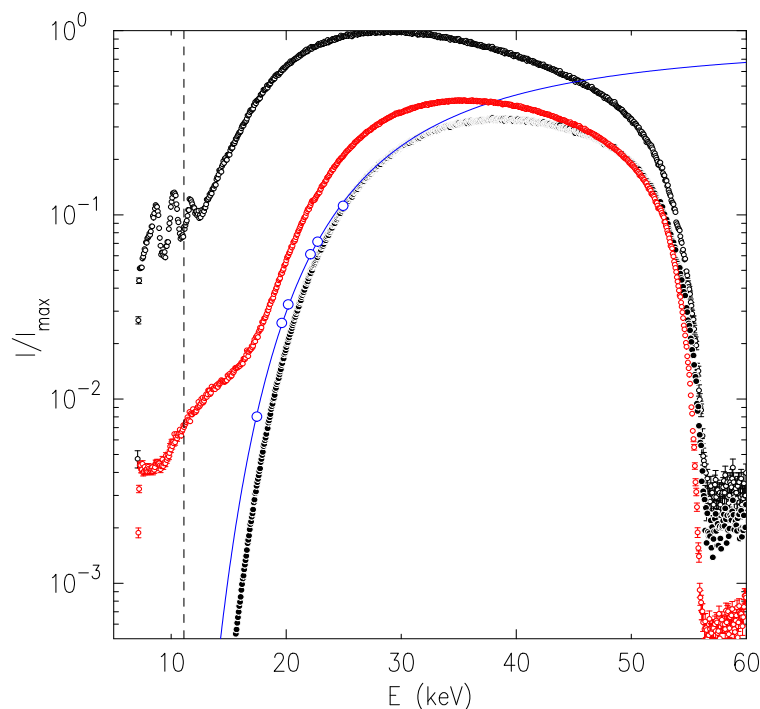


FIG. 3.15 – “White beam” energy spectra of the Bath energy-dispersive reflectometer. Black hollow circles : spectrum in air ; blue solid line : transmission $\{\exp[-\mu(\lambda)t]\}$ through $t = 4$ cm of water ; black filled circles : product of the measured in air spectrum by the calculated water transmission ; red circles : spectrum measured in water. The dashed line at 11.105 keV is the Ge adsorption edge of the detector

absorption. The useful range of energies is $\sim 15 - 55$ keV for this instrument and a wavevector transfer range of $\sim 3.6\times$ is available for a fixed angle of incidence. The spectrum obtained upon reflection at a fixed angle of incidence is normalized to the transmitted, “white” spectrum acquired directly without reflection. A full reflectivity curve is acquired using multiple angles of incidence, each with different slit openings to insure a fixed incident beam “footprint” and a fixed angular resolution, $\Delta\theta/\theta = 0.05$. An example of one such composite curve is shown in figure 3.16.

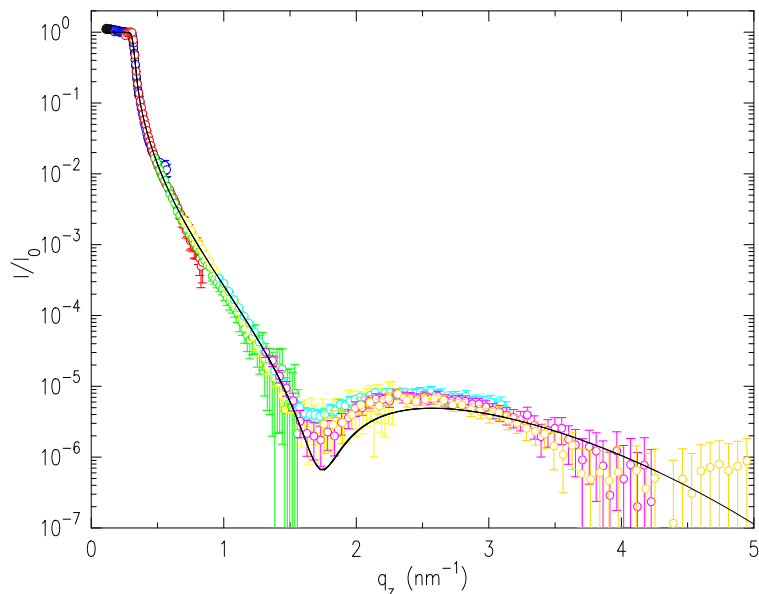


FIG. 3.16 – A composite energy-dispersive reflectivity spectra of the sample shown in figure 3.11 in air. Black : 0.0405° ; blue : 0.063° ; red : 0.097° ; green : 0.18° ; yellow : 0.26° ; cyan : 0.36° ; magenta : 0.49° ; gold : 0.63° . The solid line shows the expected reflectivity according to the structural model fit to the data obtained at the ESRF as presented below.

The calibration of each segment in absolute reflectivity is complicated by the practice of not only opening the collimating slits with increasing angle of incidence, but also by the opening of the slits in the direction out of the incidence plane with decreasing reflected intensity to improve the counting statistics. In addition, a constant background arising from the bulk diffuse scattering (that differs for each angle of incidence) must be subtracted from each acquisition. As will be shown below, this is a fundamental limitation in the confidence of the results obtained with this instrument.

The use of penetrating X-ray wavelengths allows the study of surfaces under an aqueous environment. The functionalized silicon sample is placed in the beam inside a small plastic box (polystyrene, $40 \times 18 \text{ mm}^2$ interior dimensions, $44 \times 22 \text{ mm}^2$ exterior) and filled with a 1 mM sodium phosphate buffer solution ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.2). The low-energy portion of the spectrum is absorbed upon transmission through water, as shown in figure 3.15 (red data). The resulting reflectivity spectra are shown in figure 3.17 in comparison to the spectra obtained in air (figure 3.16).

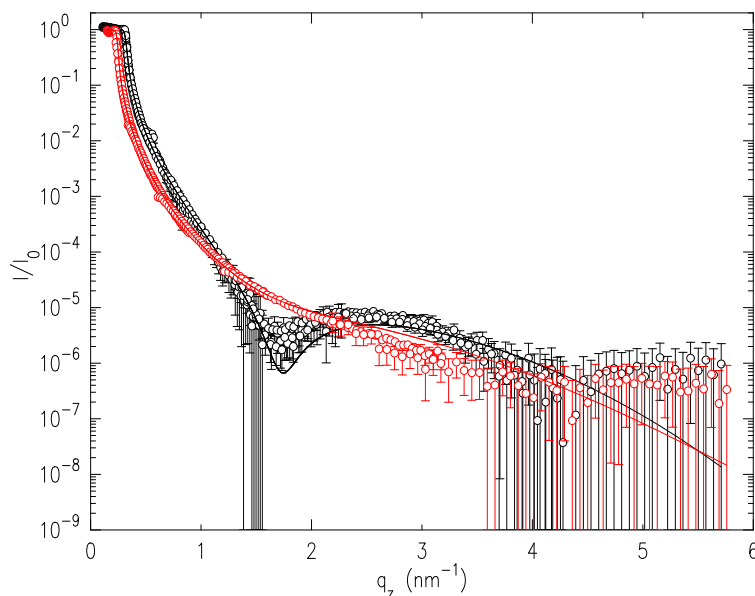


FIG. 3.17 – Reflectivity spectra obtained at Bath of the sample shown in figure 3.11 in air (black – same data as figure 3.16) and in buffer (red). The scale of the graph is chosen to be the same as that of figure 3.26. The solid lines are calculated according to the structural model that fit to the data obtained at the ESRF (see figure 3.26).

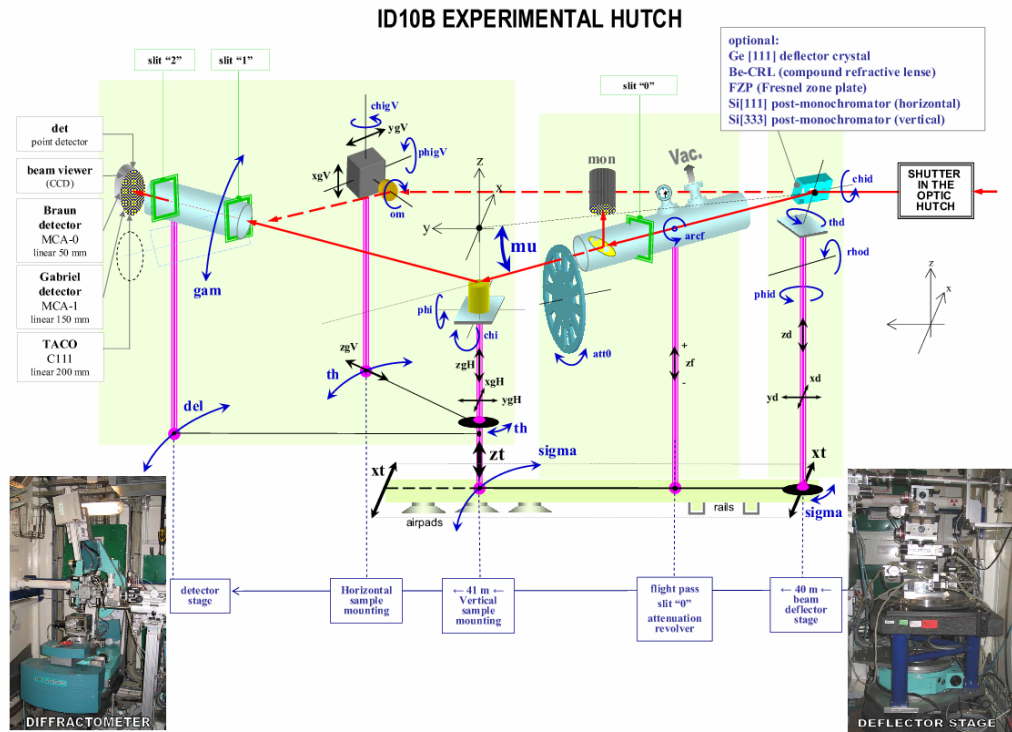
The two curves, of differing contrasts, can be analyzed together, as described in the following section. The data obtained using a laboratory X-ray tube source at Bath, although satisfactory, served mainly to justify the allocation of synchrotron beam time at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF).

Fixed-energy reflectivity

A second strategy for measuring reflectivity uses a fixed wavelength : either the characteristic ray of a laboratory X-ray source or an undulator peak from a synchrotron radiation source. The later presents the advantage of very high intensity and very low divergence, but at the risk of damaging the samples under study. This question will be addressed below.

Experiments were performed at the ESRF on beamline “ID10b” [ID10B, 2007] (see figure 3.18).

(a)



(b)

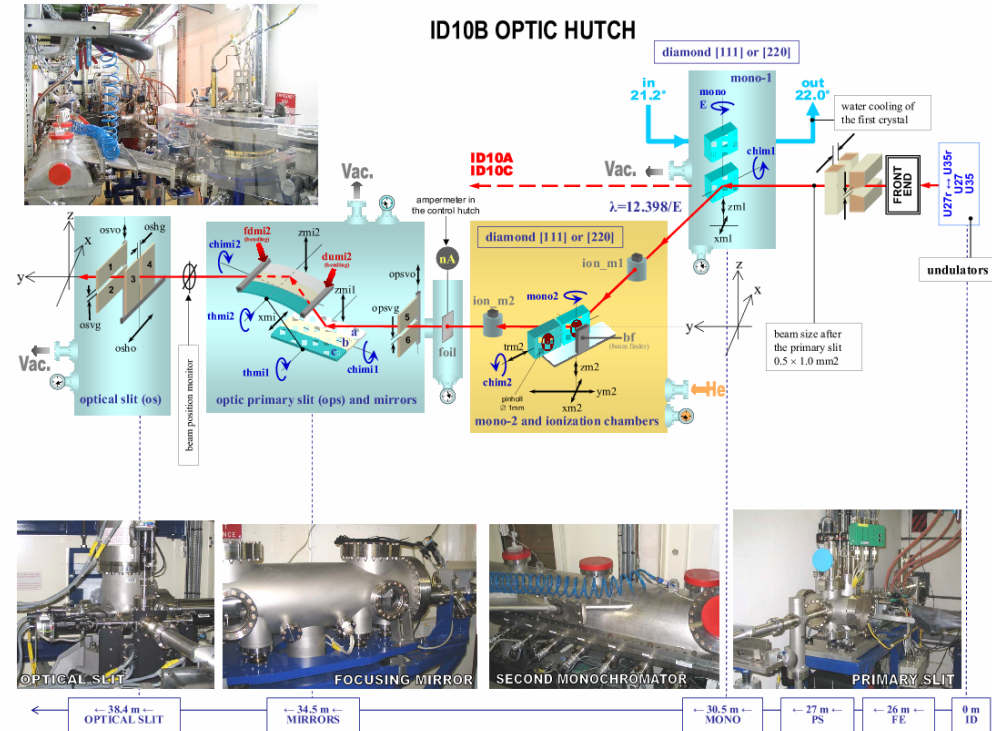


FIG. 3.18 – ESRF ID10b beamline [ID10B, 2007]. (a) experimental hutch ; (b) optics hutch.

The third harmonic of an undulator source is selected by a pair of diamond monochromator crystals (220). Lower-energy radiation is filtered and the beam is focussed in the horizontal plane by a pair of mirrors and in the vertical plane by a third mirror. The highest energy available on this beamline due to geometrical constraints is 22.2 keV (0.05583 nm). The minimum focused beam size incident on the sample is $\sim 50 \mu\text{m}$ in the vertical, incidence plane. At the critical angle of incidence for a water/silicon interface, 1.06 mrad at this energy, the beam “footprint” is thus $\sim 47 \text{ mm}$. The vertical beam size can be further reduced to about half this height using limiting slits before the sample ($\sim 0.02 \times 1 \text{ mm}^2$); however, the very high spatial coherence of the undulator beam yields diffraction effects with such a small vertical slit.

The sample was placed in a polytetrafluoroethylene (PTFE) cell with $50 \mu\text{m}$ semi-crystalline tetrafluoroethylene and hexafluoropropylene copolymer (FEP) windows to allow aggressive chemical cleaning (piranha) and to prevent any DNA adsorption on the cell walls, held in place by two aluminum-alloy flasks (see figure 3.19).

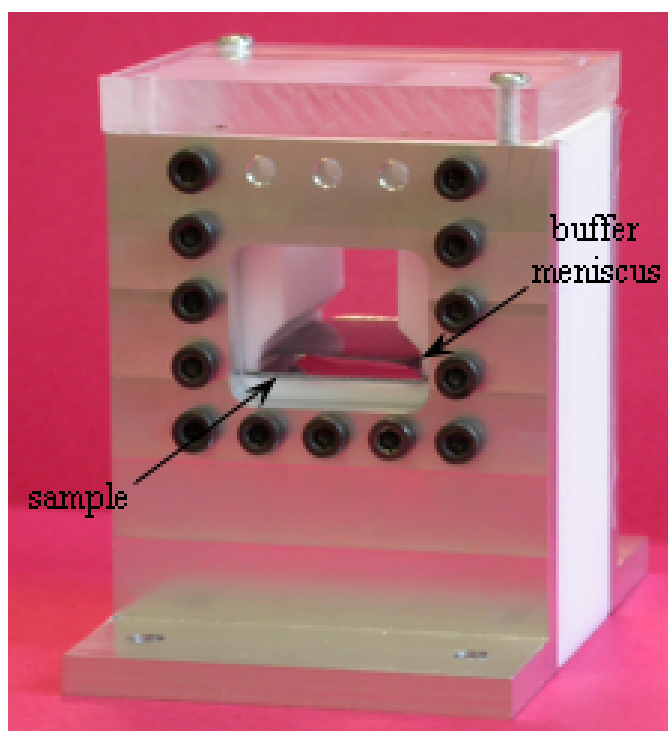


FIG. 3.19 – PTFE sample cell. The horizontal silicon wafer is covered by the buffer solution whose meniscus against the thin copolymer windows can be seen in the photograph.

The X-ray transmission of the filled cells was measured to be $15 \pm 2\%$ for a ~ 30 mm path length. The functionalized silicon substrates were cut 30×24 mm² from a 4" wafer; the thickness (0.5 mm) was, in fact, largely insufficient to assure the strict planarity of the substrate, as observed below.

We note in passing that the optimal synchrotron beam energy for this experiment would be somewhat higher than the 22.2 keV available at beamline ID10, lying in the range 40 – 45 keV. The greater transmission through the 3 cm sample cell filled with water at higher X-ray energies is accompanied by a decreasing critical angle for total external reflection. The geometrical beam footprint increases linearly with decreasing incidence angle, therefore linearly with energy (for a fixed value of the wavevector transfer). For a fixed sample size, this would require a corresponding reduction in vertical beam dimension, thus a (linear) reduction in incident X-ray beam intensity that ultimately limits the advantage of using higher-energy X rays.

The transmitted beam with the solid surface lowered out of the beam path, as well as the reflected beam, were detected using a NaI(Tl) scintillator and photomultiplier. The incident beam intensity was $\sim 10^{10}$ photons/s (or 4×10^{-5} W) which varied according to the synchrotron electron-beam current. A wheel of increasing number of pure copper 46 μ m foil filters before the sample was used to variably attenuate the incident beam. The detector arm angular resolution was limited by slits (0.2×1 mm²) located before the detector, 640 mm from the sample. (A second pair of slits located on the detector arm 190 mm from the sample were kept relatively open at 5×5 mm².) The detection angular resolution was thus $\Delta\theta_{\text{out}} = 0.0179^\circ$ in the vertical plane. The incident beam divergence $\Delta\theta_{\text{in}}$ was somewhat smaller than that of the undulator source ($\sim 0.001^\circ$).

The instrumental resolution for specular reflectivity ($\theta_{\text{out}} = \theta_{\text{in}}$) is independent of the detector arm slits [Pershan et al., 1987], as can be seen in figure 3.13d : $\Delta Q'_z = 2\frac{2\pi}{\lambda}\Delta\theta_{\text{in}}\cos\theta_{\text{in}}$ for $\Delta\theta_{\text{out}} > \Delta\theta_{\text{in}}$. However, opening the detector arm slits increases the resolution volume and thus the sensitivity to diffuse scattering from bulk density fluctuations and from surface roughness. The resolution in the direction of the surface plane, $\Delta Q_x = \frac{2\pi}{\lambda}\Delta\theta_{\text{out}}\sin\theta_{\text{out}}$ is very high; the in-plane coherence length $\lambda/(\Delta\theta_{\text{out}}\sin\theta_{\text{out}})$ ranged from 3 mm at the critical angle down to 92 μ m at the highest measured angles of incidence.

The X-ray intensity incident on the sample was systematically measured before each data run through a “scan” of the detector arm with the sample slightly lowered (by 0.5 mm) so as not to intercept the incident beam, yet traversing the liquid buffer (direct beam in figure 3.20).

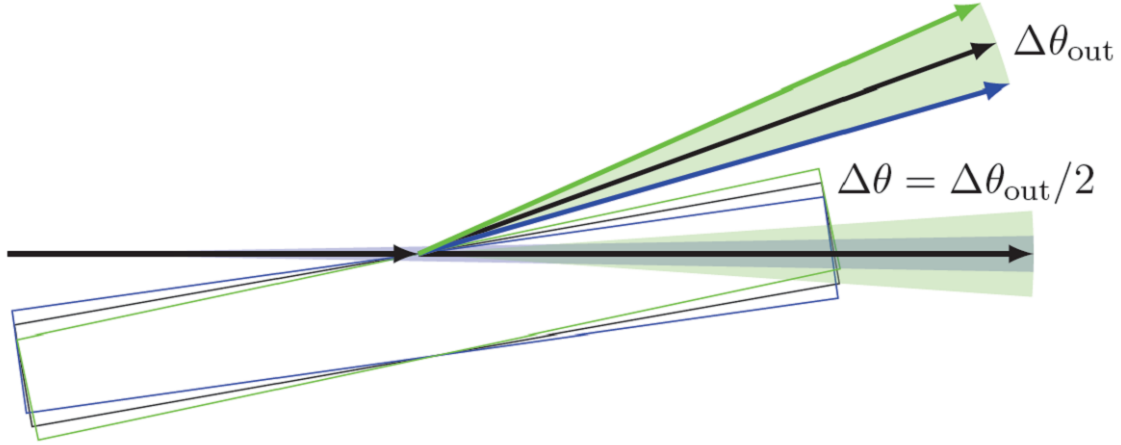


FIG. 3.20 – Schema of the measurement of the direct-beam (with the sample lowered out of the figure) and rocking-curve profiles.

A convenient, empirical, analytical function that we use to model the trapezoidal slit function is

$$I(\theta_{\text{out}}) = \frac{I_0}{1 + \left(\frac{\theta_{\text{out}} - \theta_0}{\Delta\theta_{\text{out}}/2}\right)^p} + \text{background} \quad (3.7)$$

which varies from a Lorentzian form for $p = 2$ to a square-like function for higher values of this exponent (see figure 3.21).

Real slits inevitably scatter from their edges, and this scattering depends highly on the quality of the beamline alignment. As this alignment varied from electron-beam refill to refill as well as from very small changes in mechanical stability, the exact form of the measured resolution function (parameters I_0 , $\Delta\theta_{\text{out}}$ and p) differed slightly for each measurement. Thus, the area under the curve, $A = 2\pi I_0 \Delta\theta_{\text{out}}/p \sin p$ is calculated for each measurement and is used for the normalization of each measured reflectivities.

The diffuse scattering from thermal density fluctuations in the buffer solution is independent of any length scale and therefore constant with wavevector transfer. However, the resolution volume does vary with angle and this contribution to the “background” is not constant. Secondly, the diffuse scattering from surface roughness is modulated along the \hat{Q}_z direction in the very same manner as the specular reflectivity [Daillant et al., 2005]. It is therefore essential to attempt to se-

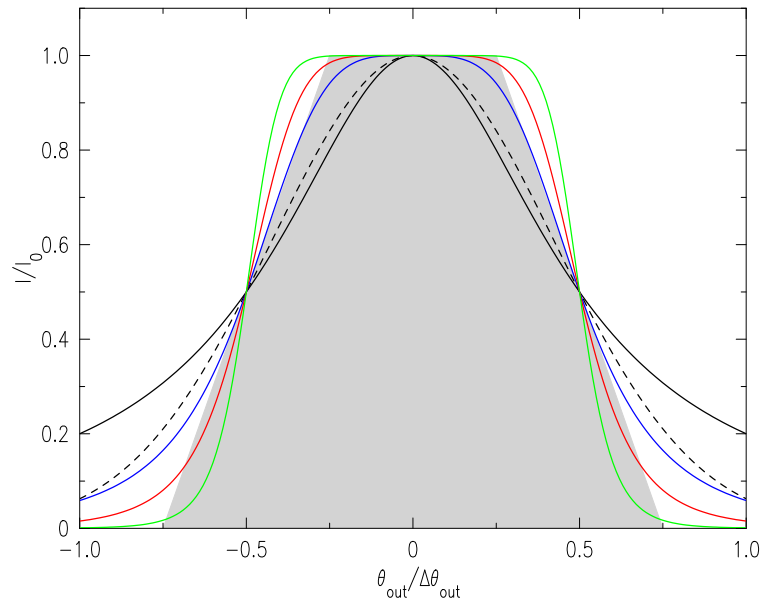


FIG. 3.21 – Resolution function. Dashed line : Gaussian ; solid lines : equation 3.7 – black : $p = 2$ (Lorentzian) ; blue : $p = 4$; red : $p = 6$; green : $p = 10$; gray : ideal trapezoidal slit function with $\Delta\theta_{\text{out}} = 2\Delta\theta_{\text{in}}$.

parate surface diffuse scattering contribution as well from the measured reflectivity signal. Two schemes that can be employed to this end are schematized in figure 3.22.

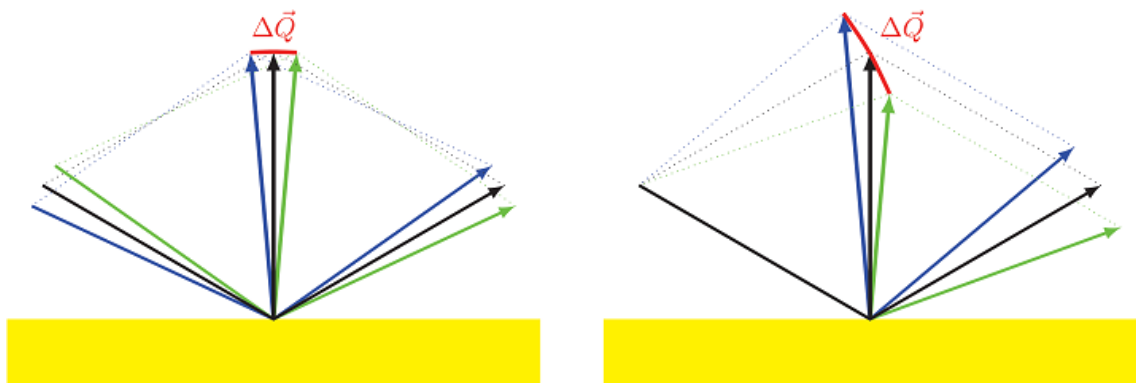


FIG. 3.22 – Kinematics of a (a) “rocking curve” ($\theta_{\text{in}} + \theta_{\text{out}} = \text{constant}$) ; (b) “detector scan” ($\theta_{\text{in}} = \text{constant}$). $\vec{Q} = \frac{2\pi}{\lambda}[(\cos \theta_{\text{out}} - \cos \theta_{\text{in}})\hat{x} + (\sin \theta_{\text{out}} + \sin \theta_{\text{in}})\hat{z}]$

In the first scheme, a “rocking curve” is recorded for each angle of incidence to be measured, the width of which should be exactly half that of the measured direct beam profile (see figure 3.20). (The second scheme, a “detector scan”, makes a sloping cut through reciprocal space and can lead to a poor estimation of the diffuse scattering contribution.) Figure 3.23 illustrates a real measurement of a series of rocking curves around the specular reflection.

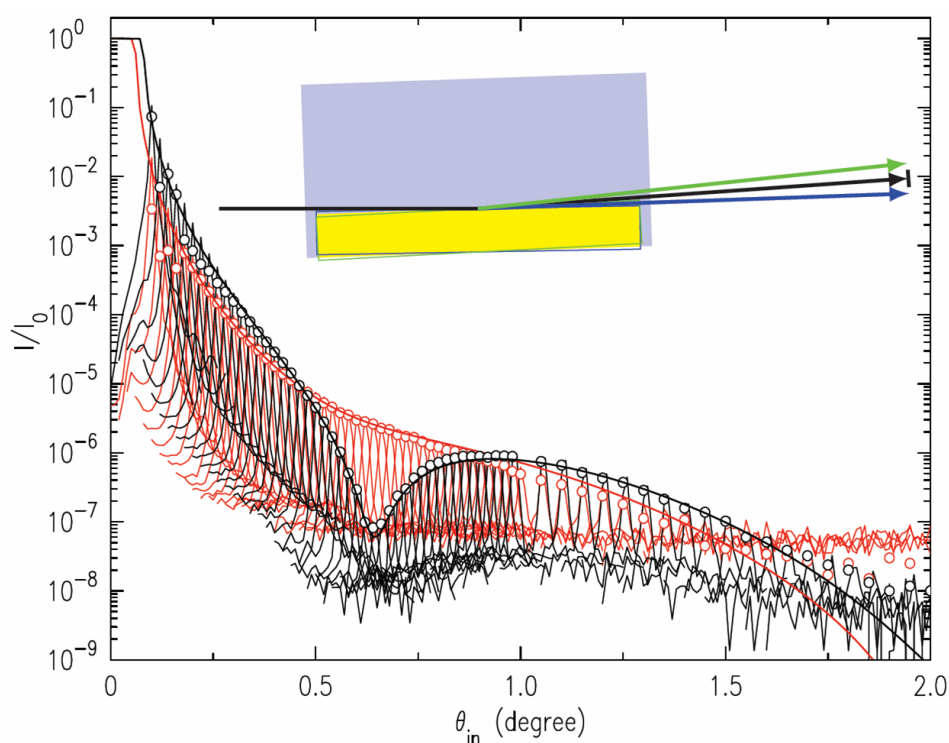


FIG. 3.23 – Measured rocking curves ($\theta_{\text{in}} + \theta_{\text{out}} = 2\theta$) for the acid-terminated sample in air (black) and under buffer solution (red). The background scattering in air, modulated as for the specular reflectivity, arises from the surface roughness; Under buffer, the background is constant except for very grazing angles of incidence and is due to diffuse scattering from density fluctuations in the aqueous solution. Notice the anomalous surface reflections or Yoneda [Yoneda, 1963] peaks around $\theta_{\text{in}} = \theta_c$ and $\theta_{\text{out}} = \theta_c$.

2.4 Prevention of surface degradation under irradiation

The very high intensity of the synchrotron radiation beam can rapidly degrade the thin organic functionalization layers of samples to be studied, both from photoelectrons ejected from the silicon substrate upon absorption of the penetrating X-ray beam as well as through ionization of the semi-infinite media (principally production of ozone). In order to understand and control this undesirable effect, we first studied under the synchrotron beam a sample that was simply functionalized with a terminating acid group, the first step in the chemical process of functionalization. The results are shown in figure 3.24 for the sample measured at two contrasts : both in air and under buffer solution.

In order to determine the possible degradation of the organic layer under irradiation, a series of fairly rapid direct reflectivity curves (scans of $\theta_{\text{in}} = \theta_{\text{out}}$, often called “ $\theta : 2\theta$ ”) were successively recorded for the sample under buffer solution. Because of the curvature of the substrate and the widening of the specularly reflected beam, the data normalized to the maximum I_0 of the transmitted beam had to be corrected according to the same linear function as found for the widening of the recorded rocking curves. From this data is subtracted a constant background of diffuse scattering, as fit to the data large angles of incidence ($Q_z > 6 \text{ nm}^{-1}$). The resulting data is superimposed on figure 3.24 as a series of green traces. The contrast of the interference fringe sequentially diminishes under irradiation.

Through a reduction in the incident beam intensity (by a factor of 60) and an optimization of the data acquisition times and spacings, as well as the adoption of a procedure of laterally displacing the sample by one millimeter in the direction perpendicular to the incident plane, highly reproducible results were obtained.

2.5 Data analysis

In the data shown in figure 3.24, where a rocking curve was recorded for each angle of incidence, it was observed that the sample was in fact slightly curved, leading to a widening of the rocking curve (see figure 3.25) by about a factor of two (this corresponds to a radius of curvature of the silicon surface of the order of 50 m).

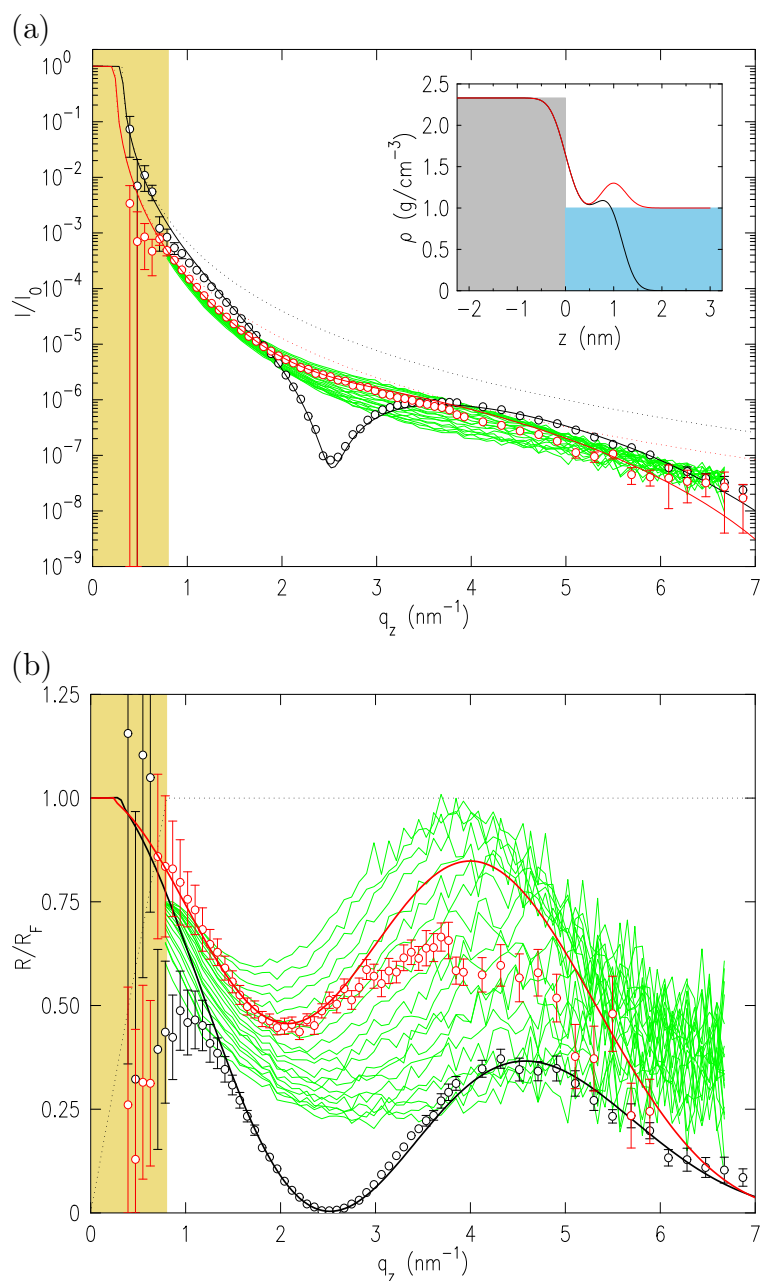


FIG. 3.24 – An acid-terminated functionalized silicon sample. (a) Reflectivity; (b) Normalized to the Fresnel step reflectivity. The open symbols are the results of rocking curves recorded for each angle of incidence (black : in air ; red : under buffer solution). The insert shows the real-space density profiles used to model the data (see text) with the molecular model drawn schematically for illustration.

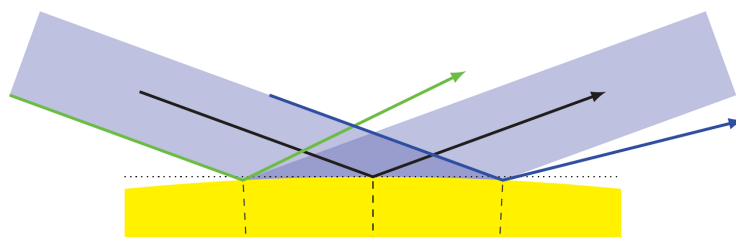


FIG. 3.25 – Schema of the spreading upon reflection by a curved surface. The beam footprint is $h/\sin\theta$ where h is the beam height; The spreading angle, $4\sin^{-1}[h/(2R\sin\theta)]$ where R is the radius of curvature, is a function of this footprint and thus would decrease with increasing incidence angle.

Indeed, the curvature could be aggravated by a very slight pressure on the inverted U-shaped clamp used to hold the substrate in place inside the sample cell (see figure 3.19). This observed widening of the rocking curves was compensated through the normalization of the areas under the peak using the function of equation 3.7. Data at low values of the wavevector transfer, in particular the “plateau” of total external reflection, were not recorded, for it was not possible to reduce the beam size sufficiently for such small angles of incidence.

In figure 3.24 -(b), the same data are represented divided by the calculated Fresnel reflectivities of an ideal, step air/silicon and water/silicon interface, neutralizing the overall Q_z^{-4} dependence. Also shown as solid lines are a fit to a simple model for the density profiles, as drawn in the insert of figure 3.24 -(a); they differ only in the index of the semi-infinite media. X-ray reflectivity measures a root-mean-squared roughness that is a weighted average of the height-height correlation function over length scales ranging from the atomic dimensions up to the surface in-plane correlation length as given by the resolution of the instrument. This roughness is found³ to be 0.254 ± 0.011 nm, only slightly larger than expected : the ionic radius of silicon of 0.117 nm is to be added to the crystalline step roughness of 0.091 nm (see 3.1). The nominal thickness of the acid-terminated organic layer is found to be 1.085 ± 0.025 nm. The surface density is $(1.26 \pm 0.06) \times 10^{-7}$ g/cm² = $(3.6 \pm 0.2) \times 10^{14}$ molecules/cm². This value of the density is in perfect agreement with the value of 3.0×10^{14} molecules/cm² obtained by surface infrared spectroscopy on an acid-terminated surface (see Chapter 2). Notice the absence of any oxide layer.

The model divides the profile into two layers of constant density, associated with up to two fitting parameters : the density ρ and the thickness. In fact the free fitting

³We note here that the very lowest r.m.s. roughness that we have been able to measure [Daillant et al., 2005] on super-polished (oxidized and silanated), thick silicon wafers was ≤ 0.1 nm.

parameters are quite correlated, especially when the thickness is of the same order of magnitude as the overall roughness (a fifth fitting parameter) which is the case for the acid head-groups. The method employed here of simultaneously fitting measurements obtained with two different contrasts, as commonly the practice for neutron scattering, robustly converges to the displayed density profiles with reasonably low quantitative uncertainties.

We would like to insist here on the interpretation of the determined density profiles, as shown in the insert of figure 3.24a. Whereas the profiles $\rho(z)$ can be constructed using “layers” of constant density, such a construction is over-determined, in particular when the “thickness” of each layer is of the same order of magnitude as the roughness. This is reflected in the coupling of the model parameters, as stated above. Nevertheless, the overall thickness of the grafted layer, its integral mass density excess, and the general form of the profile are well determined by the models, and only these parameters will be considered in the interpretation of the results presented here. A reasonable conceptual illustration can be seen in figure 3.10 where the transparent cylinder centered on the silicon atom anchor for the grafted ethyl undecylenate molecule shows the molecular volume as determined by X-ray reflectivity. We note that the fully-extended molecular model extends outside and above this cylindrical volume, and one can easily imagine the molecular disorder, both static and dynamic, of the molecules of the monolayer. An attentive eye can see that the cylinder shows, in fact, an interface between a lower and an upper region; this corresponds to the layer thicknesses used in the construction of the reflectivity profiles for the regions of lower and higher electron or mass densities. Indeed, the top of the organic layer presents a higher mass density than the part of the molecules near the silicon crystal. Moreover, looking at the density profile, one can think that the organic layer is thicker under buffer solution than in air : this only corresponds to a more important change in the density between the layer and the air than the solution. The structural parameters that describe the organic layer are identical in air and under solution.

2.6 Amine-terminated surface characterization

DNA adsorption is expected at a positively charged surface. We first have precisely characterized the amine-terminated surfaces in order to subsequently well define the DNA adsorption. The amine-terminated surface shown in figure 3.11 was studied by X-ray reflectivity as described above under conditions where the degradation by the synchrotron beam was minimized. Data have been treated in the same manner than those concerning acid-terminated surface described above. The results are shown in figure 3.26 which is somewhat more complicated than the previous figure 3.24.

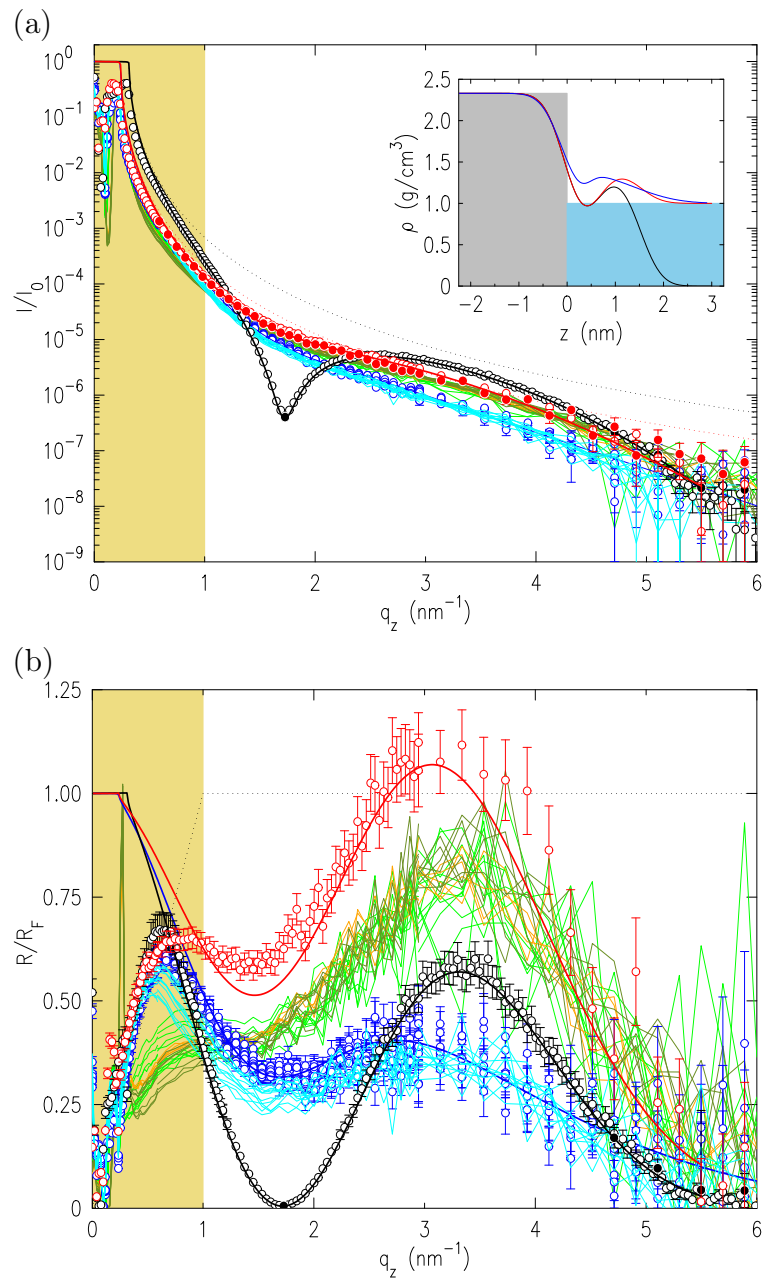


FIG. 3.26 – DNA adsorption on an amine-terminated functionalized silicon surface. (a) Reflectivity; (b) Normalized to the Fresnel step reflectivity. The open symbols are direct reflectivity scans and the filled symbols are the results of rocking curves recorded for each angle of incidence and the (black : in air; red : under buffer solution). The insert shows the real-space density profiles used to model the data (see text) with the molecular model drawn schematically for illustration (black; in air; red : under buffer solution). The green, orange, cyan and blue traces are described in the text; The blue symbols and continuous curves show the reflectivity and model after adsorption of DNA.

Firstly, mostly direct reflectivity curves were recorded; only the solid-filled red and black data points correspond to rocking curves. Secondly, data at small values of the wavevector transfer are shown, and the maximum reflectivities recorded under conditions of total external reflection were only 32% in air and 36% under buffer solution. It can be seen by the linear rise in the data for $Q_z < 1 \text{ nm}^{-1}$ in the Fresnel-normalized data shown in figure 3.26, that this is a simple effect of the incident-beam footprint overhang.

The data drawn in black (in air) and red (under buffer solution) are well described by a simple model for the density profiles, as for the acid-terminated sample presented above. The root-mean-squared roughness is $0.3542 \pm 0.0039 \text{ nm}$ and the organic layer thickness is $1.504 \pm 0.114 \text{ nm}$, both larger than found for the acid-terminated functionalized surface. There is greater disorder, however the surface density is $(1.54 \pm 0.15) \times 10^{-7} \text{ g/cm}^2 = (3.40 \pm 0.33) \times 10^{14} \text{ molecules/cm}^2$, in good agreement with the surface coverage as determined by infrared spectroscopy : $(3.1 \pm 0.3) \times 10^{14} \text{ molecules/cm}^2$ (see Chapter 2). This is to be compared to the Si(111) surface density of Si-H binding sites ($7.8 \times 10^{14} \text{ Si/cm}^2$). The coverage is therefore $44 \pm 4\%$.

We note that this surface density corresponds to an area per molecule of $0.294 \pm 0.028 \text{ nm}^2$ (see figure 3.10) which is only about 40% greater than that of a very dense-packed alkyl chain (0.214 nm^2 for liquid parafins [Warren, 1933], $0.205 \pm 0.01 \text{ nm}^2$ for monolayers of fatty acids [Adam, 1941] and 0.185 nm^2 for crystalline n-hydrocarbons [Müller, 1928]). The organic monolayer, covalently bonded to the silicon crystal lattice, has a surface density corresponding to a tilted condensed phase [Kaganer et al., 1999]. Indeed, the Si-C bond being oriented in the crystallographic (111) direction, the lines joining successive carbon atoms being inclined according to the tetrahedral angle of $109^\circ 28'$, the average backbone would adopt a tilt angle of $35^\circ 16'$ and the expected area per molecule projected on the surface plane would thus be $0,262 \text{ nm}^2$, only slightly smaller than the X-ray reflectivity value, within experimental error.

A molecular-scale model representation is drawn in figure 3.27. The illustration is drawn with the molecule in the stretched configuration; however, the surface packing clearly leaves some room for molecular disorder. The model of the density profile (see insert in figure 3.26 -(a)) is obtained by fitting the reflectivity curves simultaneously in air and under buffer solution as mentioned above. We note again that the mass density of the organic layer is higher at the top of the molecules than for the part near the silicon crystal. The structural parameters that define the organic layer are the same in air and buffer solution.

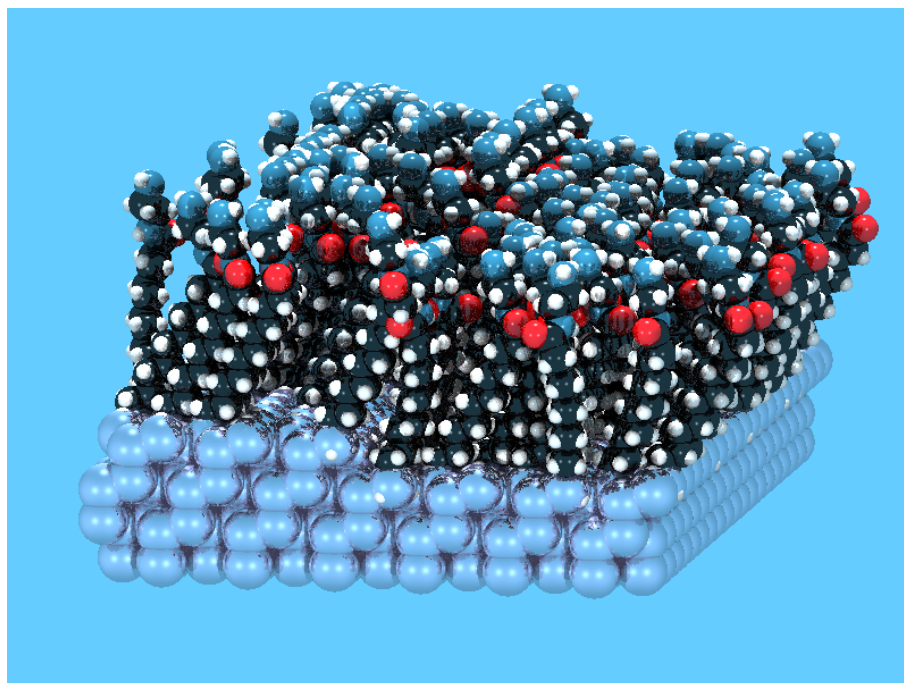


FIG. 3.27 – Molecular-scale model representation of the functionalized silicon surface. Red : oxygen, blue : nitrogen, black : carbon, white : hydrogen. The model is drawn with a random surface coverage of 44% of the available Si-H bonding sites (and an (arbitrary) in-plane nematic order parameter for the azimuthal carbon-chain tilt direction, β , of $S = \langle \frac{1}{2}(3 \cos^2 \beta - 1) \rangle = 0.25$).

2.7 DNA adsorption on a functionalized surface

2.7.1 Double-stranded DNA

The mass density of double-stranded DNA [Cohen & Eisenberg, 1968] at 10 mM of NaCl is⁴ 0.998 g/cm³. So on average, there will be a very little electron density contrast with water and so it is not to be expected to be able to easily detect the adsorption of a *disordered* layer of DNA by X-ray reflectivity. It was therefore necessary to prepare well-characterized, monodisperse DNA molecules for the present experiments. Over 100 μ g of material was prepared by PCR amplification from a 294 base-pair (bp) sequence of the 5386 bp Φ X174 viral DNA (locations

⁴A simple estimation of the density of double-stranded DNA yields $641 \text{ g/mole} \cdot \text{bp} / [N_A \pi (1 \times 10^{-7} \text{ cm})^2 \cdot 3.4 \times 10^{-8} \text{ cm/bp}] = 0.997 \text{ g/cm}^3$.

175-470)⁵. Super-coiled double-stranded Φ X174 (form RFI) was used as a PCR template, chosen to have about equal proportion of A and G (and T and C) without too many A-tracks. The amplified DNA was purified using Sigma-Aldrich GenElute™ PCR Clean-Up Kit and the quality of the final product was analyzed using poly-acrylamide gel electrophoresis.

The length of the 294 bp double-stranded DNA fragment, $294 \times 0.34 = 100$ nm, is about two persistence-lengths and the molecule can be viewed as a semi-rigid cylinder of diameter 2 nm (see figure 3.28).

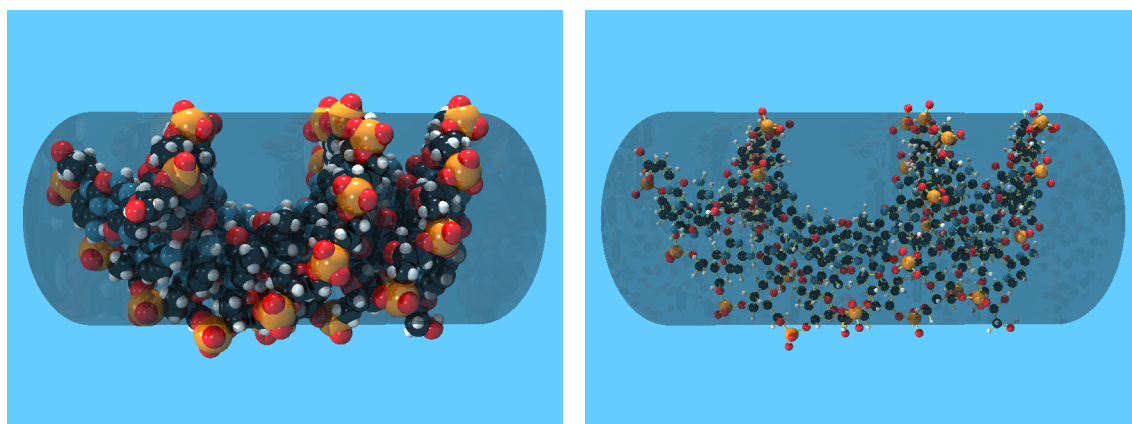


FIG. 3.28 – A 14-base pair segment of base-stacked crystalline B-DNA (pdb 1K8J, show here for illustration) is drawn inside a cylinder of diameter 2 nm and length 14×0.34 nm. Double-stranded DNA is a helical ribbon with a very prominent major groove.

This diameter is about $2\frac{1}{2}$ times the spacing of the functionalized organic molecules, covalently-bonded to the single-crystal silicon substrate and slightly less than the thickness of this layer. The projected surface area of **one** base-pair of the adsorbed cylinder (which carries two negative charges) is $2 \text{ nm} \times 0.34 \text{ nm} = 0.68 \text{ nm}^2$. If the surface were to be completely covered by adsorbed cylinders of double-stranded DNA, one can naively define an overlap

⁵294 bp double-stranded DNA :

```
5'-ACTTTGCGACCTTTCGCCATCAACTAACGATTCTGTCAAAAAGTACGCGTTGGA-
TGAGGAGAAGTGGCTTAATATGCTTGGCACGTTTCGTCAAGGACTGGTTTA-
GATATGAGTCACATTTTGTTCATGGTAGAGATTCTCTTGTGACATTTTA-
AAAGAGCGTGGATTACTATCTGAGTCCGATGCTGTTCAACCACTAATAGG-
TAAGAAATCATGAGTCAAGTTACTGAACAATCCGTACGTTTCCAGACCGC-
TTTGGCCTCTATTAAGCTCATTACAGGCTTCTGCCGTTTT-3'.
```

concentration C^* , given by the quantity of DNA necessary to achieve this total coverage, assuming that **all** of the DNA is adsorbed. As the total surface available is $3 \text{ cm} \times 2.4 \text{ cm}$, the required amount of DNA for total coverage is therefore $(660 \text{ g} \cdot \text{mole}^{-1} \text{bp}^{-1} / N_A) \cdot (7.2 \times 10^{14} \text{ nm}^2 / 0.68 \text{ nm}^2) = 1.16 \text{ } \mu\text{g}$. The volume of buffer contained in the sample cell is 1.7 ml , thus the reference concentration used is $C^* = 1.16 \text{ } \mu\text{g} / 1.7 \text{ cm}^3 = 0.68 \text{ } \mu\text{g} / \text{cm}^3$.

After the characterization of the amine-functionalized sample both in air and under buffer, as presented above, we proceeded to mix a small quantity of DNA (equivalent to “ $1 \times C^*$ ”, as calculated above) in the buffer solution, followed by measurements of the reflectivity curve. The procedure adopted was to gently remove as much buffer as possible, assuring that the surface remains entirely wet. The removed buffer was mixed with the DNA solution and then redeposited over the wet silicon surface (the total volume of the solution is the same for all measurements). This assured a uniform distribution of DNA. The thickness of the remaining wetting layer can be estimated to be on the order of $100 - 200 \text{ } \mu\text{m}$. The measured reflectivity curves reproduced one another to a very good accuracy (light green traces as drawn on figure 3.26, each trace taking about 9 minutes to acquire). However, as can be more clearly seen in the Fresnel-normalized reflectivity (figure 3.26 (b)), these curves lie slightly lower than those measured before the addition of DNA to the buffer solution. After two hours (11 repeats of the reflectivity curve), more DNA (“ $3 \times C^*$ ”) was added and the sample was displaced laterally (with realignment) to expose a fresh patch of substrate. The measurement was repeated for one hour (5 orange traces as drawn on figure 3.26) with no change in the measured reflectivity curves. More DNA (“ $10 \times C^*$ ”) was added (in the same manner as previously) and the sample again displaced, with still no change in the reflectivity curves (dark-green traces). After almost three hours following the third introduction of increasing quantity of DNA (6 hours after the initial introduction of DNA), a **sudden change** in the reflectivity curve was recorded (blue traces in figure 3.26). This new reflectivity curve remained stable, unchanging over about $1\frac{1}{2}$ hours, as measured over two different patches of the sample surface.

According to the first Fick’s law [Fick, 1855], the amount of substance crossing a given area is proportional to the spatial gradient of concentration and the diffusion coefficient D . The mean square distance moved by molecules in a time t is $6Dt$. Of course, to be adsorbed, the DNA must diffuse over the buffer of thickness ($h = 1.7 \text{ cm}^3 / 7.2 \text{ cm}^2 = 0.24 \text{ cm}$) to be adsorbed. The diffusion coefficient for 294-bp dsDNA is estimated to be $D \approx 3 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. The time to diffuse from the air/water to the water/Si interface is therefore estimated to be $\langle h^2 \rangle / 6D = (0.24 \text{ cm})^2 / (3 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \cdot 6) = 3.2 \times 10^4 \text{ s} = 9 \text{ hours}$. Finally, additional DNA was added (“ $60 \times C^*$ ”) and the sample displaced. The recorded reflectivity curve remained reproducible (cyan traces in figure 3.26). Over 12 hours

elapsed since the initial introduction of DNA in the sample cell, that is the same order of magnitude as the diffusion time

The change in the reflectivity curve observed after adsorption of DNA on the amine-terminated monolayer is qualitatively different from the evolution observed for the acid-terminated sample with time under synchrotron beam degradation. An apparent shift of the fringe to slightly lower values of wavevector transfer might indicate a thickening of the interfacial layer in real-space. However, this is misleading and an analysis of the reflectivity leads to the model for the density profiles drawn in the insert to figure 3.26 -(a) (blue curve) : The overall layer thickness is not modified, yet the region of increased density of the amine head-groups of the functionalized layer is enlarged, with additional (electron) density filling-in the region previously occupied by the alkyl-chains. The increased integrated surface density is $(1.8877 \pm 0.0091) \times 10^{-7}$ g/cm². The change in mass density $(0.35 \pm 0.16) \times 10^{-7}$ g/cm², multiplied by the projected area per base-pair of an adsorbed DNA molecule (0.68×10^{-14} cm²) and by N_A is 143 ± 65 g/mole (22% of the molar mass of a base-pair of DNA).

Attempts to place the additional electron density **above** the organic monolayer could not describe the measured data, nor did we succeed with a model displaying an oxidation of the silicon surface. We conclude that the adsorption of DNA molecules distorts the grafted monolayer. The “roughness” of the amine-head region of the density profile increases, the (electron) density of the chain region increases, but the average thickness of the monolayer is unmodified.

The observed change in the measured reflectivity curves following the first introduction of double-stranded DNA in the solution are difficult to describe quantitatively through a unique density profile model, unlike as described in the previous paragraph. Qualitatively, it appears as if the contrast with the silicon mirror is somewhat reduced (overall shift of the curve) near the surface (no shift in the critical angle), but diffusely.

We questioned that the observed change in the reflectivity curves observed after a longer adsorption time and for higher bulk concentration indeed corresponds to the adsorption of double-stranded DNA. Several tests were performed :

- The addition of salt might lead to a desorption of the DNA. 10, 50, 100, 300 and 500 mM of NaCl was added to the sample cell and reflectivity curves measured. The adsorption of DNA appeared irreversible and the reflectivity curves remained unchanged.
- Many different zones of the sample were measured, with very reproducible results.
- The previously studied acid-terminated surface was re-examined after several

days under buffer solution (ageing of the monolayer) and the reflectivity curves obtained without damaging the surface were reproducible : the monolayer doesn't age in the solution.

The adsorption of double-stranded DNA on a positively charged functionalized, atomically-flat silicon surface is observed, not through an increase in the thickness of the surface layer or added electron density above the organic monolayer as might be expected, rather through a deformation of the (soft) surface functionalized layer and the incorporation of additional electron density in the layer. A naïve model of the adsorption is drawn in figure 3.29.

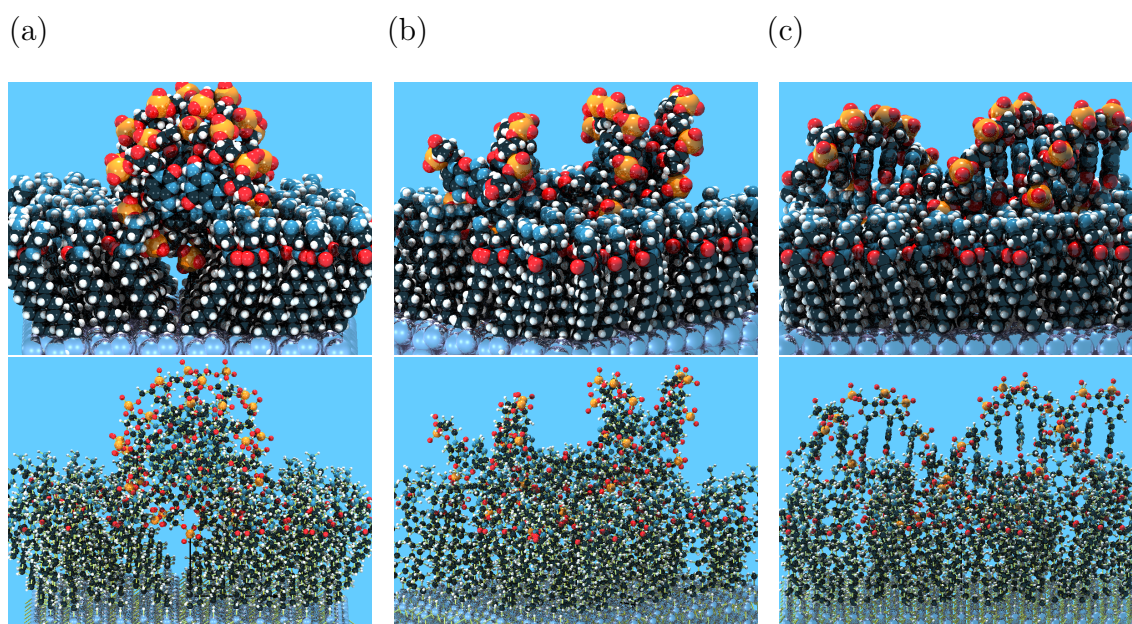


FIG. 3.29 – *Cartoon* of double-stranded DNA adsorbed on the positively charged, amine functionalized surface (a) viewed from $[\bar{1}10]$, (b) rotated about $[111]$ by 45° , (c) viewed from $[11\bar{2}]$ (top : space-filling ; bottom : “balls and sticks” model). Whereas the surface coverage must be rather dense, only one 14-base pair segment of base-stacked, B-DNA is shown.

An electrostatic attraction between the positively charged amine groups of the monolayer ($\leq 3.1^+/\text{nm}^2$ which is an upper limit on the surface charge density, assuming that the amine groups are fully charged) and the negatively charged phosphate groups of the nucleic acid ($2^-/0.68 \text{ nm}^2 = 2.9^-/\text{nm}^2$) would “pull” the DNA molecule into the monolayer in order to maximize contact with the negative

charges distributed helically around the perimeter of the rigid cylinder, displacing the mobile counter-ions. We have no solid evidence for this model other than the coherence with the measured reflectivity curves density profiles. The adsorption under moderate ionic strength (1 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2) is found to be irreversible even at much higher added salt concentrations (up to 500 mM NaCl). We conclude that the adsorption on the organic monolayer leads to a partial dehydration of the DNA molecule. Further information might be obtainable through grazing-incidence diffuse scattering analysis and grazing-incidence surface diffraction measurements, but these experiments would require considerable time and effort to optimize.

2.7.2 Single-stranded DNA

A second amine-terminated monolayer coated silicon substrate was studied, according to the same procedure as the first. The results, shown in figure 3.30, yield the same density profiles as for the previous sample (figure 3.26), demonstrating the reproducibility of the surface chemistry as well as the reflectivity measurements.

A single-stranded oligonucleotide, 146 bases long (44669.25 g/mole)⁶, was prepared by chemical synthesis (Eurogentec SA). Single-stranded DNA differs radically from the renatures double-stranded helix in its properties : it is a highly flexible polymer (persistence length on the order of less than 1 nm), with its bases exposed to the solvent. In this case, it is difficult to present a simple model of a rigid cylinder that can be adsorbed on a functionalized surface, rather one should consider a 2D radius of gyration of the flexible polymer with excluded volume. However, to a first approximation with the aim of later studying the hybridization with the complimentary single-strand, we naively consider that the adsorbed single-stranded DNA would occupy half the area of the equivalent double-stranded DNA. The area per adsorbed molecule is therefore estimated to be : $146 \cdot 0.34 \text{ nm} \cdot 2 \text{ nm} / 2 = 49.64 \text{ nm}^2$ and total coverage of the surface is therefore estimated for $(44669.25 \text{ g/mole} / N_A) \cdot (7.2 \times 10^{14} \text{ nm}^2 / 49.64 \text{ nm}^2) = 1.08 \text{ } \mu\text{g}$ of ssDNA. The concentration C^* is taken to be $1.08 \text{ } \mu\text{g} / 1.7 \text{ cm}^3 = 0.63 \text{ } \mu\text{g/cm}^3$.

Measurements were repeated as for the first amine-terminated sample after addition of increasing quantities of DNA. The results are also plotted in figure 3.30 using the same color-coding as in figure 3.26. There appears to be a similar,

⁶146 base single-stranded DNA :

5'-AAGCTTGTATGATCACTCGTCGATCCACATCAGTATGATCACTCGTCGAT-
CCATATACATCAGTATGATCACTCGTCGATCCATATACATCAGTATGATC-
ACTCGTCGATCCATATACATATGATCACTCGTCGATCGAATTCCAT-3'

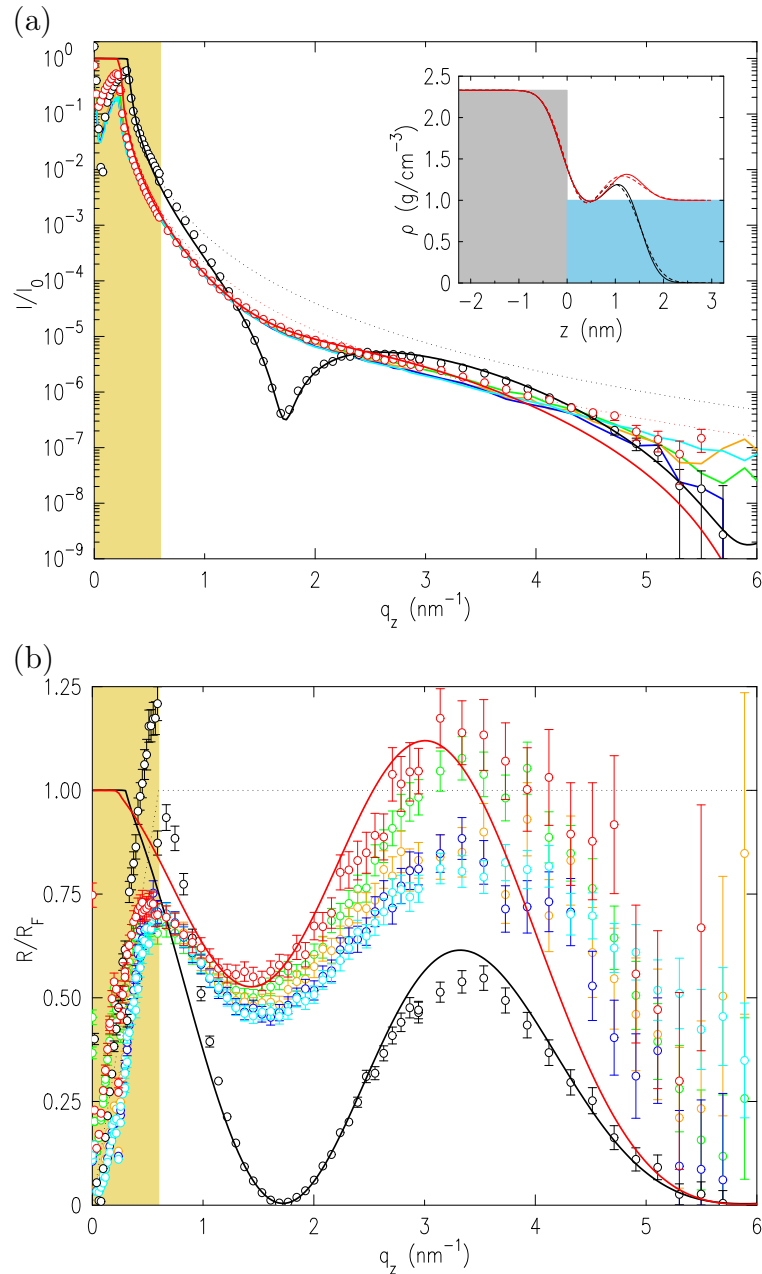


FIG. 3.30 – Single-stranded DNA on an amine-terminated functionalized silicon surface. (a) Reflectivity; (b) Normalized to the Fresnel step reflectivity. The open symbols are direct reflectivity scans and the filled symbols are the results of rocking curves recorded for each angle of incidence and the. The insert shows the real-space density profiles used to model the data, the broken lines being the profiles from figure 3.26 (black : in air ; red : under buffer solution). The green, orange, cyan and blue symbols parallel those of figure 3.26.

although much smaller shift in the reflectivity curves, the blue and cyan curves at higher concentration of DNA being lower than the red, green and orange curves at lower concentration. However, it is difficult to quantify this data. Unlike for the first sample studied, no rocking-curves were recorded for this second sample and there is therefore an ambiguity as to the real curvature of the silicon substrate. In the data presented here, we use the same curvature correction for this second sample as measured for the first, in the absence of any better estimation. This leads to some uncertainty as can be seen by the poor overlap of the curves at very grazing angles of incidence (in particular, in the Fresnel-normalized representation of figure 3.30) and by the somewhat lower quality of the fit of the simple model density profiles to the measured reflectivity curves. We have less confidence in these measurements than for the previous sample. Nevertheless, the very same correction was applied systematically to all the data shown in figure 3.30, so the qualitative tendencies should be of value.

Single-stranded DNA may be adsorbed on the positively charged aminated surface but does not lead to a distortion of the organic monolayer and is not unambiguously detected.

3 Conclusions

The DNA adsorption in a low ionic strength buffer was characterized on crystalline silicon by X-ray reflectivity. The functionalized single-crystal silicon surfaces were chemically controlled : oxide-free, densely and homogeneously covered by organic molecules. The molecular monolayer was terminated by positively charged amine groups yielding a strong electrostatic interaction with the negatively charged DNA.

It was found that the adsorption of double-stranded DNA leads to a distortion of the organic monolayer. The double-stranded DNA penetrates into the organic monolayer and, as this adsorption is irreversible by adding salt in the solution, we conclude that DNA chains are partially dehydrated. The additional mass-density of the adsorbed DNA that is deduced in the surface layer corresponds to about one quarter of that expected for a densely-packed adsorbed layer of DNA molecules lying flat on the surface. The DNA partially penetrates the soft surface layer. We did not observe such an important effect by adsorbing single-stranded DNA.

In the present work, we have shown that a solid surface, functionalized by a near perfect, thin organic monolayer must not be viewed as an inert, solid support. The densely-packed organic monolayer is soft and deformable, as seen through the adsorption of double-stranded DNA molecules. This understanding should be of great importance in the development of DNA biochip and lab-on-chip technologies.

Résumé des principales conclusions du chapitre 3

Dans ce chapitre nous nous sommes efforcés de déposer de l'ADN sur des surfaces de silicium fonctionnalisées. Dans un premier temps, nous avons souhaité caractériser les interactions aromatiques entre l'ADN et une surface greffée de molécules de phénol. Après avoir déposé une solution contenant de l'ADN radioactif, la radioactivité mesurée sur les surfaces n'est pas significative d'une adsorption. Dans ce cas, nous n'avons pas détecté d'adsorption sur la surface.

En revanche, en forçant l'adsorption de l'ADN par interaction électrostatique sur une surface de mica chargée positivement, nous avons pu observer un effet du phénol sur la conformation des molécules d'ADN par microscopie AFM. Alors que l'ADN forme de gros agrégats sur la surface sans phénol dans la solution de dépôt, ces agrégats sont cassés en présence de 4% de phénol dans la solution. Le phénol a un effet significatif sur la conformation des agrégats.

Nous avons ensuite caractérisé, par réflectivité de rayons X, l'adsorption de molécules d'ADN sur des surfaces de silicium fonctionnalisées par des molécules amines chargées positivement. Ces mesures ont été faites à l'interface solide/liquide. Les mesures de profil de densité suggèrent que l'ADN double brin est attiré dans la monocouche moléculaire, déplaçant les contre-ions de l'ADN. L'adsorption a lieu pour une faible force ionique. Le caractère irréversible de cette adsorption par ajout de sels dans la solution nous permet de conclure que l'ADN est partiellement déshydraté.

L'ADN simple brin a pu s'adsorber sur la surface chargée par des amines mais cette adsorption ne conduit pas à la déformation de la monocouche moléculaire. Nous n'avons pas pu détecter cette adsorption sans ambiguïté.

CHAPITRE 4

Aggregation and adsorption at the air-water interface of bacteriophage ϕ X174 single-stranded DNA

"C'est à l'endroit où l'eau est profonde qu'elle est la plus calme."

William Shakespeare

Sommaire

1	Introduction	130
2	Material and methods	135
2.1	Chemicals	135
2.2	Plasticware	135
2.3	DNA labeling	136
2.4	Studies of the solubility of ϕ X174 virion DNA by sedimentation	136
2.5	Studies of the solubility of ϕ X174 virion DNA combining autoradiography and sedimentation	137
3	Results	138
3.1	Sedimentation studies of DNA solubility	138
3.1.1	Salting out in the presence of NaCl	138
3.1.2	Condensation in the presence of Spd^{3+} and NaCl	139

3.1.3	General phase diagrams	141
3.2	Solubility studies combining autoradiography and sedimentation	144
3.2.1	Salting out	144
3.2.2	Solubility in the presence of Spd^{3+} and NaCl	145
4	Discussion	149
4.1	General shape of the phase diagrams	149
4.2	Decreased solubility of DNA in D_2O	150
4.3	Significance of the phase diagrams : A role for adsorption	151
4.4	Comparison with the works of Frommer and Miller and Eickbush and Moudrianakis	154
4.5	Mechanism of the adsorption and aggregation processes	154
4.6	Implications	157
	Résumé des principales conclusions du chapitre 4	158

1 Introduction

The physical chemistry and biochemistry of DNA can be studied using two lines of research. The first one focuses on the behavior of nucleic acids in the bulk of homogeneous aqueous solutions [Felsenfeld & Miles, 1967], [Bloomfield et al., 1974], [Record Jr et al., 1978], [Cantor & Schimmel, 1980], [Bloomfield et al., 2000]. In this approach, phase separations such as aggregation, precipitation or adsorption are carefully avoided; from a physical point of view, the interactions between the monomers of the double-stranded DNA chains are repulsive. This approach has been traditionally the main line of research followed by researchers in the field. In parallel, over the last decades, there has been a growing interest for the study of DNA in heterogeneous systems, in particular systems where DNA either undergo aggregation and precipitation or interact with surfaces.

The motivations of this second approach come from both fundamental and applied considerations :

1. A major issue is that of DNA condensation. Long DNA molecules exist *in vivo* in condensed states, and it is an important goal of molecular biology to understand the consequences of these dense conformations on the structure and

on the function of the genetic material. In *Escherichia Coli* for instance, the nucleoid consists of condensed chromosomal DNA, which is phase separated from the surrounding cytoplasmic proteins [Odijk, 1998]. Dense states of DNA can be obtained *in vitro* in simple systems using various condensing agents, such as multivalent cations or polyethylene glycol plus sodium chloride. Physically, the condensing agents act by introducing interactions that are effectively attractive between the monomers of the DNA chains, leading to the collapse of long chains in very dilute solutions and also to the aggregation and precipitation of the chains in less dilute systems (see [Bloomfield et al., 2000] and [Sikorav & Church, 1991] for reviews). This corresponds to poor solvent conditions. The study of the dense states of DNA found *in vivo* using *in vitro* systems requires therefore an understanding of its behavior in heterogeneous systems (where phase separations due to aggregation take place), in contrast with the traditional approach discussed above.

2. A second topic deals with the interactions between DNA and interfaces. In a general manner, interfaces have a key role in biological systems [Pollack, 2003]; biological membranes in particular play an essential structural and functional role in the cells. The importance of the interactions of DNA with membranes can be seen in the process of genetic transformation : DNA molecules have to cross membranes when they enter cells. As stated by Kahn and Smith, genetic transformation is therefore a problem of membrane biology [Kahn & Smith, 1984]. DNA-interface interactions occur also in many other physiological situations. A) DNA *in vivo* is not naked but usually associated with proteins and enzymes. This association can be modeled as an interaction with the surface of the associated proteins; this modeling is extremely useful in the study of DNA topology [White et al., 1988], [Bates & Maxwell, 1993]. DNA located at interfaces *in vitro* constitutes a simple model system, which can contribute to our understanding of the more complex nucleic acid-protein interactions. B) DNA *in vivo* does not have the available space they can find in the bulk of a dilute aqueous solution. On the contrary, both its structure and its motion is highly constrained due to their interaction with structural elements such as the inner face of a viral capsid, the outer or inner face of a bacterial membrane, the inner face of a nuclear envelope (through the nuclear lamina and the nuclear pores) and possibly the nuclear matrix in eukaryotic cells [Alberts et al., 2002]. Again the study of the interfacial properties of DNA in simple *in vitro* systems is expected to shed light on these more complex interactions.
3. A third reason motivating the study of nucleic acids in heterogeneous systems comes from the observation that such systems can in fact be more efficient than the conventional homogeneous systems [Goldar & Sikorav, 2004].

Indeed, the efficiency of DNA renaturation [Sikorav & Church, 1991], [Chaperon & Sikorav, 1998], [Goldar & Sikorav, 2004] and cyclization [Jary & Sikorav, 1999] is much higher in systems where the DNA chains undergo a phase separation coupled with the ongoing reaction. In these reactions, two types of phase separations are considered : A) a bulk phase separation due to the presence of DNA condensing agents, leading to an aggregation process concomitant with renaturation [Sikorav & Church, 1991], [Chaperon & Sikorav, 1998], or cyclization [Jary & Sikorav, 1999]; B) a transfer of the DNA chains from the bulk of an aqueous solution to a water-phenol interface concomitant with an interfacial renaturation [Goldar & Sikorav, 2004]. These findings highlight the limitations of the conventional, homogeneous approach of DNA physical chemistry and biochemistry. The study of heterogeneous systems also leads to a better understanding of the behavior of DNA. For example, the high rates of cyclization of λ DNA observed in the presence of condensing agents are fast enough to account for the cyclization of the chain observed after its injection in its bacterial host ; in contrast the rates measured in homogeneous systems are too slow to account for this process [Jary & Sikorav, 1999].

4. Besides its fundamental interest, the study of nucleic acids in heterogeneous systems is also of great importance from an applied point of view. We shall mention three examples of it : A) a number of separation techniques of nucleic acids rely on the use of heterogeneous systems (liquid-liquid extraction, precipitation, chromatographic techniques). B) Many hybridization technologies (Southern or Northern blots, hybridization on chips) involve nucleic acids immobilized on surfaces. Nanotechnologies have a growing impact on interfacial hybridization techniques. In microfluidics for instance, the surface to volume ratio is large and this requires an understanding of nucleic acids-substrate interaction. C) The visualization of nucleic acids by microscopy relies in an essential manner on the interaction of nucleic with surfaces, either in the standard techniques of electron microscopy [Bloomfield et al., 2000] or in the more recent approaches using scanning tunneling or atomic force microscopy [Rivetti et al., 1996], [Hansma, 2001], for instance in DNA combing [Bensimon et al., 1994], [Michalet et al., 1997]. A better understanding of the behavior of nucleic acids in heterogeneous systems could contribute to understand and improve these techniques.

In the present work, we investigate the phase separations occurring in very dilute aqueous solutions of single-stranded DNA in the presence of mono and multivalent cations. Two previous works prompted us to undertake this investigation. The first one is a careful study of the adsorption of DNA at the air-water interface by Frommer and Miller [Frommer & Miller, 1968]. These authors used tritiated

DNA to measure directly the adsorption of *Escherichia Coli* DNA at the air-water interface. They worked with both native (double-stranded) and denatured (mostly single-stranded) DNA. They observed an adsorption of double-stranded DNA at the air-water interface, which (at a constant DNA concentration of $26 \mu\text{g.ml}^{-1}$) increased with the concentration of NaCl between 1 mM and 1 M. The amount of adsorbed double-stranded DNA at 1 M NaCl increased with DNA concentration, reaching a plateau above $75 \mu\text{g.ml}^{-1}$ of about 1.8 mg.m^{-2} which corresponds to an area of about 0.31 nm^2 per nucleotide, the value expected for a monolayer of densely packed DNA double helices. Fibers could easily be drawn from the adsorbed DNA layer. Surprisingly, the adsorption of the DNA chains did not lead to a change in the surface tension or the surface potential. They also studied denatured DNA (immersed in boiling water for 10-15 min, and then cooled in a water-ice mixture), and also found that it adsorbs at 1 M NaCl, albeit in a less efficient manner. One can conclude from these studies that both double- and single-stranded DNA can adsorb at the air-water interface, under conditions where no aggregation process is expected to take place in the bulk of the solution. In a later work, Eickbush and Moudrianakis [Eickbush & Moudrianakis, 1977] studied the adsorption at the air-water interface of double-stranded DNA molecules (10-kilobase long DNA chains of the phage PM2) in the presence of a variety of chemical compounds. The adsorption was assayed by touching the solution surface with an electron microscope grid, and by counting the number of DNA chains found on the grid. These authors used more dilute DNA solutions (with typical concentrations in the range of $0.1\text{--}0.5 \mu\text{g.ml}^{-1}$). They also observed an adsorption in the presence of monovalent salts, which increased with the salt concentration (between 10 mM to 1 M), in qualitative agreement with the observations of Frommer and Miller [Frommer & Miller, 1968]. In addition they studied the effect of a trivalent cation, spermidine, a natural polyamine which promotes the condensation of nucleic acids and made two observations :

1. that spermidine also led to an adsorption of the DNA at the air-water interface which increased with spermidine concentration,
2. that the concentration range over which this adsorption could be observed was very narrow, since a bulk precipitation of the chains soon occurred soon after the onset of the adsorption.

Thus it appears that in this latter case, the adsorption process could take place at the same time as a precipitation. This latter finding is puzzling, since it raises the possibility previous experimental studies devoted to the condensation of nucleic acids could have overlooked a concomitant adsorption at the air-water interface.

To investigate this issue, we have performed a series of experiments in order to probe both DNA aggregation and precipitation and DNA adsorption at the air-water interface. We report here the results obtained for single-stranded DNA molecules (prepared from the bacteriophage ϕX174 [Sinsheimer, 1959]). We have decided to work with very dilute solutions ($5\text{--}15 \text{ ng.ml}^{-1}$) in order to favor the

detection of surface effects over bulk effects. We have chosen to use two types of salts to promote DNA aggregation : sodium chloride and the trivalent cation spermidine. Sodium chloride is known to induce the aggregation of single-stranded nucleic acids at high concentrations (typically one molar and above). This type of aggregation is called a salting out. The best example of it is the aggregation of polyriboadenylic acid (polyA) by sodium chloride studied by Eisenberg and Felsenfeld [Eisenberg & Felsenfeld, 1967]. Multivalent cations also induce an aggregation, to which we will specifically refer from now on as a condensation ¹. A detailed knowledge of the corresponding phase diagrams for DNA condensation is available, both for double-stranded [Pelta et al., 1996], [Raspaud et al., 1998] and single-stranded DNA [Chaperon & Sikorav, 1998], [Chaperon, 1999], [Raspaud et al., 1999]. Both in DNA salting out and DNA condensation, electrostatic interactions play an essential role, the addition of salts decreasing the electrostatic repulsion between the chain monomers. At the same time, it is well known that nonelectrostatic factors have a role both in salting out and condensation since, for instance, the nature of the cations and not solely their charge influence the aggregation. The high salt concentrations required for the salting-out leads to a decrease in the water activity [Edsall & Wyman, 1958], an effect which is less pronounced in the aggregation in the presence of multivalent cations. Nevertheless DNA hydration is also implied in the condensation process [Parsegian et al., 1995]. In order to further explore the relative contributions of electrostatic and hydration factors in DNA aggregation and adsorption, we have obtained experimental results both in water (H₂O) and heavy water (D₂O).

¹As stated before, the term of nucleic acids condensation is a generic term for collapse and aggregation, which includes condensation by multivalent cations and by other agents such as polyethylene glycol plus sodium chloride. The salting out of nucleic acids by monovalent cations is in this generic sense a particular type of condensation. For clarity however we restrict its use in the rest of the text specifically to describe the action of multivalent cations, the action of monovalent cations being only referred to as a salting out.

2 Material and methods

2.1 Chemicals

Deionized water obtained with a Milli-Q filtration system (Millipore, Molsheim, France) was used in all studies. Spermidine 3HCl (molecular biology grade) and sodium chloride and deuterium oxide (D_2O) were obtained from Sigma-Aldrich.

ϕ X174 virion DNA :

Circular form : The circular single-stranded ϕ X174 virion DNA (MW = 1.7×10^6 Da, 5386 bases) was purchased from New England Biolabs.

Linear form : An 18-base long oligodeoxynucleotide (5'-TAGTGGAG-GCCTCCAGCA-3') was purchased from MWG. This fragment contains the complementary sequence of nucleotides 4481 to 4497 of ϕ X174 virion DNA, which includes the sequence of the recognition site of the restriction endonuclease enzyme StuI (at nucleotide 4486). The 18-base long fragment was annealed with the circular single stranded ϕ X174 virion DNA in the following manner : the annealing process was carried out in a $1 \times$ NEB2 buffer (New England Biolabs) using a molar ratio of 1000 :1 for the 18-base long fragment over the ϕ X174 virion DNA chains (for a typical reaction we use $40 \mu\text{g}$ of ϕ X174 virion). The solution was heated to 98°C for 3 minutes in order to remove all the secondary structures of ϕ X174 virion DNA. The solution was then left to cool down at room temperature overnight. We added 80 units of restriction enzyme StuI to the cooled solution. After 2 hours of incubation at 37°C , the digested DNA was analyzed by agarose gel electrophoresis, which showed that the circular DNA present initially in the solution had been fully linearized.

2.2 Plasticware

The radioactive detection experiments described in this work were performed at extremely low single-stranded DNA concentrations (with chain concentration in the picomolar range). Low DNA concentrations together with high salt concentrations can lead to a significant adsorption on the walls of the tube used (either Eppendorf or Falcon) if no precautions are taken. To prevent this effect, all experiments were carried out in tubes coated with a methyl brush as follows : the tubes were filled with a solution of 2% dimethyldichlorosilane in (1,1,1)-trichloroethane (BDH). After

at least 6 hours of incubation, the silane solution was removed and the tubes were thoroughly rinsed with a TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA).

2.3 DNA labeling

The 5'-end phosphate group of the linearized ϕ X174 virion DNA was removed using the calf alkaline phosphatase enzyme (New England Biolabs). After 1 hour of reaction at 37°C, the solution was purified using a Sigma PCR Clean Kit. The product of the reaction was 5'-end labeled with T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) using ^{32}P -ATP ($\geq 6000 \text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$, GE Healthcare Life Sciences). The labeled single-stranded DNA was separated from the the unincorporated ^{32}P -ATP using a Sigma PCR Clean Kit and equilibrated in a TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA). The amount of unincorporated ^{32}P -ATP still present in the solution of labeled single-stranded DNA after purification was determined by an autoradiography of a sample submitted to a separation by gel electrophoresis. The unincorporated ^{32}P -ATP accounted for 1% or less of the total radioactivity present in the solution of labeled single-stranded DNA. None of the protocols used above involved surfactants, in order to avoid a contamination of the DNA samples with surface active agents.

2.4 Studies of the solubility of ϕ X174 virion DNA by sedimentation

These experiments were performed using 1.5 ml Eppendorf tubes as follows. The labeled single-stranded DNA (200 μl containing the labeled single-stranded DNA at a concentration of 4.2 pg/ μ in a TE buffer (deuterated or hydrogenated), with various concentrations of NaCl and/or spermidine) was added in an Eppendorf tube. After vortexing, the tube was left for at least 12 hours to equilibrate. The tubes were then centrifuged at $15000 \times g$ for 5 min. After centrifugation, 100 μl of the solution was collected in a separate tube. Thin cones were used to avoid extensive contact with the air-water interface during the pipetting. The amount of radioactivity was measured in both the collected 100 μl ($\text{count}_{\text{solution}}$) and the remaining 100 μl ($\text{count}_{\text{remaining}}$) solution using a Beckmann scintillation counter in Cerenkov mode. The fraction of soluble DNA (that is remaining in the bulk of the solution after centrifugation) was determined using the formula :

$$\text{Soluble DNA} = 2 \times \frac{\text{count}_{\text{solution}}}{\text{count}_{\text{remaining}} + \text{count}_{\text{solution}}}. \quad (4.1)$$

The concentration of salts corresponding to changes of regimes of solubility were obtained by drawing tangents to the experimental curves and determining the in-

tersections of these tangents, as illustrated in figure 4.2.

2.5 Studies of the solubility of ϕ X174 virion DNA combining autoradiography and sedimentation

These experiments were performed using 15 ml conical centrifuge Falcon tubes as follows. 10 ml of a TE buffer solution (deuterated or hydrogenated, with various concentrations of NaCl and/or spermidine) containing the radioactive labelled ϕ X174 virion DNA at a concentration of 15.3 pg/ μ l in a TE buffer was mixed in a Falcon tube. After vortexing the tube was left to stand for at least 12 hours. The tubes were first exposed to a storage phosphor autoradiography plate (Molecular Dynamics) for 12 to 16 hours. The plate was scanned using a Phosphor Imager (Molecular Dynamics). The tubes were then centrifuged at $4500 \times g$ for 20 min. After centrifugation, the tubes were again exposed for at least 12 hours to a fresh autoradiography plate. This exposed plate was then scanned as described above. The variation of the number of counts as a function of the height of the tube was measured using the ImageQuant software (GE Healthcare). After background subtraction and normalization of the area under the curve (which corresponds to the total amount of radioactivity in tube) the fraction of counts was plotted as a function of the height of the tube. We did not measure an absolute number of counts but a relative value. In some cases, the quality of our image plates has been a limiting factor, leading to experimental artifacts, such as a glitch in figure 4.7 (at 2.5×10^{-4} M Spd³⁺), and the presence of minor peaks in figure 4.8 (at 4 M NaCl). Because of the quality of our image plates, these peaks are not reliable, and will not be discussed.

3 Results

3.1 Sedimentation studies of DNA solubility

In a first series of experiments, we have measured the amount of DNA remaining in the supernatant of centrifuged Eppendorf tubes, for various concentrations of Na^+ and Spd^{3+} (spermidine 3+). We refer to this material as "soluble DNA". The material depleted from the supernatant can be either incorporated in a precipitated pellet or adsorbed at the air-water interface. The distinction between these two possibilities as well as a better description of the "soluble DNA" will be made later using autoradiography studies.

3.1.1 Salting out in the presence of NaCl

Figure 4.1 shows the effect of increasing amounts of NaCl on the solubility of ϕX174 DNA in H_2O and in D_2O .

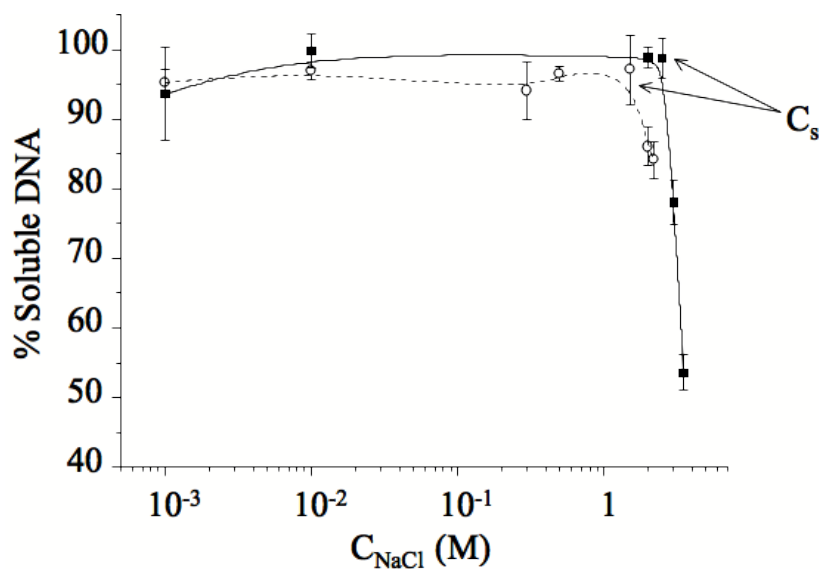


FIG. 4.1 – Percentage of soluble single-stranded DNA as a function of NaCl concentration in D_2O (*open circles*) and H_2O (*full squares*). The concentrations C_S at which the solubility starts to decrease are indicated by arrows (1.5 M NaCl in D_2O and at 2.5 M NaCl in H_2O). The solid and dashed black lines are guide for the eyes.

At high salt concentration, the solubility is reduced. We refer to this decrease as

a "salting out" and label C_S the value of the concentration at which the onset of the salting out takes place. C_S is equal to 1.5 M for D_2O and 2.5 M for H_2O . $\phi X174$ DNA is therefore less soluble in D_2O than in H_2O .

3.1.2 Condensation in the presence of Spd^{3+} and NaCl

Figure 4.2 shows the change in solubility of $\phi X174$ DNA as a function of Spd^{3+} concentration at a fixed NaCl concentration (10^{-2} M, both for D_2O and H_2O).

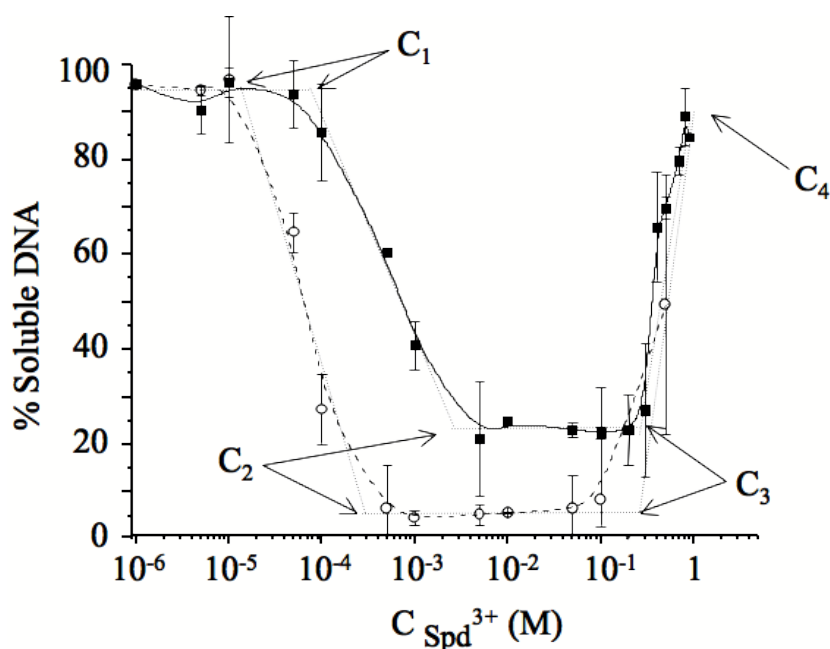


FIG. 4.2 – Percentage of soluble single-stranded DNA as a function of spermidine (Spd^{3+}) concentration at 10^{-2} M NaCl in D_2O (*open circles*) and H_2O (*full squares*). The Spd^{3+} concentrations C_1 , C_2 , C_3 and C_4 correspond to the onset of the solubility decrease, the onset of the minimum of solubility, the end of the minimum, and the end of the solubility decrease respectively; they are indicated by arrows. The concentrations C_1 , C_2 et C_3 are obtained by drawing tangents (thin dotted lines) to the experimental curves and determining the intersections of these tangents. The solid and dashed black lines are guides for the eyes.

In both cases, the DNA is fully soluble at low Spd^{3+} concentration. The solubility starts to decrease at a concentration C_1 and then reaches a plateau of low solubility at a concentration C_2 . This plateau ends at a concentration C_3 . For H_2O only, a further increase in Spd^{3+} concentration leads to a full resolubilization of the DNA

at a concentration C_4 . Due to a lower spermidine solubility in D_2O , it is not possible to increase the concentration up to this value in D_2O . A comparison of the results obtained in D_2O and H_2O shows that :

1. The concentrations of the onset in decreased solubility, C_1 , and of the beginning of the plateau of minimal solubility, C_2 , are lower in D_2O than in H_2O , with almost a ten-fold difference between the two solvents.
2. The concentration C_3 at which the plateau of minimal solubility ends is similar for the two solvents.
3. The value for the plateau of minimal solubility is smaller for D_2O (0–10%) than for H_2O (10–30%).

We conclude that in this experiment, $\phi X174$ DNA is less soluble in D_2O than in H_2O : 1) Less Spd^{3+} is needed to decrease the solubility in D_2O than in H_2O , 2) The plateau of minimal solubility is broader in D_2O and has a smaller value than in H_2O . However, the concentration C_3 is independent of the solvent.

Figure 4.3 shows the change in solubility of $\phi X174$ DNA as a function of NaCl concentration at a fixed Spd^{3+} concentration (10 mM), both for D_2O and H_2O .

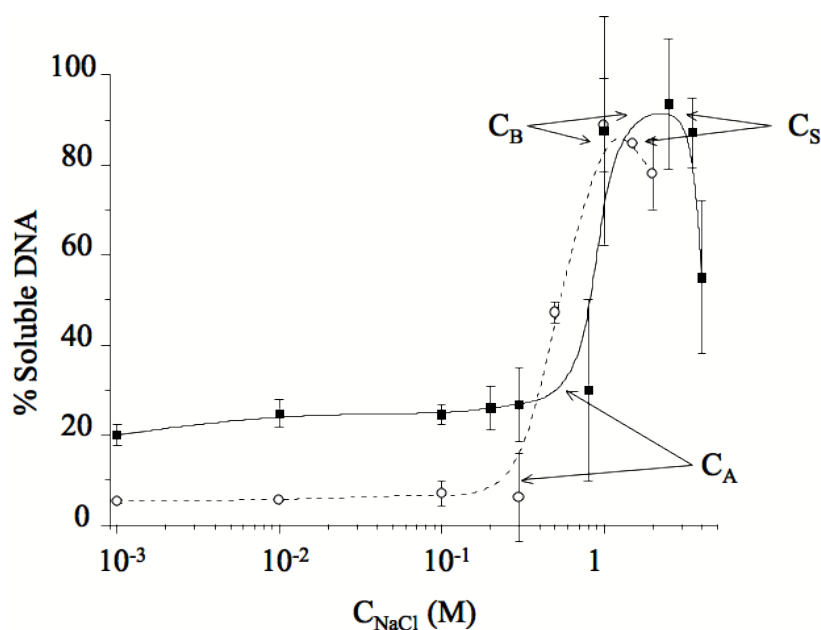


FIG. 4.3 – Percentage of soluble single-stranded DNA as a function of NaCl concentration at 10^{-2} M Spd^{3+} in D_2O (*open circles*) and H_2O (*full squares*). The NaCl concentrations C_A , C_B and C_S correspond to the end of the minimum of solubility, to the end of the solubility decrease and to the reappearance of the solubility decrease respectively; they are indicated by arrows. The solid and dashed black lines are guides for the eyes.

In both cases, the DNA is in the region of minimal solubility at low NaCl concentration. This first region ends at a concentration C_A above which the solubility increases. The second region ends at a concentration C_B where the DNA is again fully soluble. Finally, the solubility starts to decrease again at 1.5 M NaCl for D₂O and 2.5 M NaCl for H₂O. These two concentrations are identical to the concentrations C_S measured for the salting out in the absence of Spd³⁺ above and are also denoted C_S . The values measured for the plateau of minimal solubility (D₂O (0–10%), H₂O (10–30%)) are those found in the experiments described above. At 10 mM Spd³⁺, a greater amount of NaCl is required to resolubilize DNA in H₂O than in D₂O.

3.1.3 General phase diagrams

We have repeated the experiments described above for various concentrations of NaCl and Spd³⁺ and used the combined results to plot the solubility behavior of ϕ X174 in the plane of coordinates ([NaCl], [Spd³⁺]), both for H₂O (figure 4.4) and for D₂O (figure 4.5). Figure 4.4 shows the phase diagram obtained in H₂O.

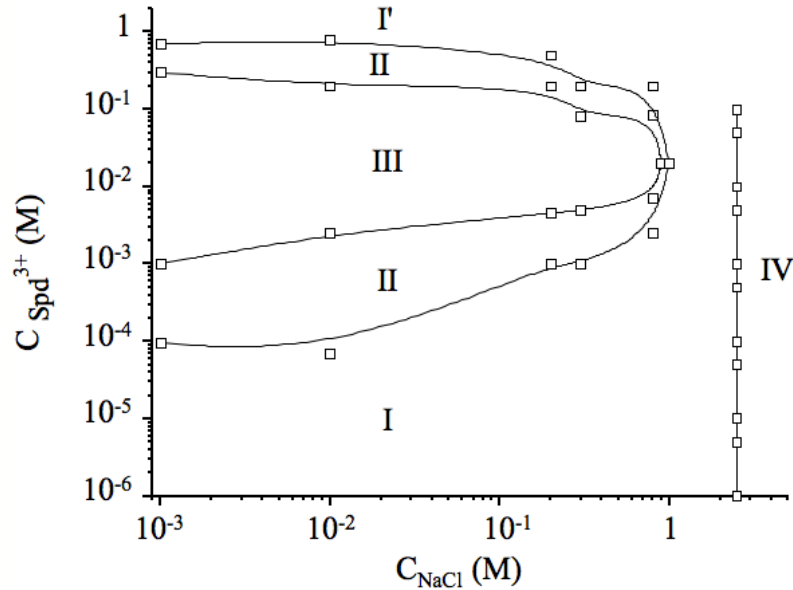


FIG. 4.4 – Plot of the concentrations C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_A , C_B and C_S in the plane of coordinates ([NaCl], [Spd³⁺]) in H₂O. Five distinct regions are observed. Region I : The first soluble phase; Region II : A region where the solubility of DNA in the presence of Spd³⁺ varies; Region III : A region where solubility of DNA in the presence of Spd³⁺ is constant and minimal; Region IV : A region above which the DNA is salted out by NaCl, separated from region I by a solid vertical line at 2.5 M NaCl. Region I' : The second soluble phase.

Broadly speaking there are two regions of decreased solubility, separated by a region of full solubility denoted region I. The first region of decreased solubility corresponds to DNA condensation, and is made of three subregions : II, III and I'.

The second region of decreased solubility corresponds to the salting-out region and is denoted region IV. Regions I and IV are separated by a vertical line of fixed NaCl concentration. In other words, the concentrations C_S is independent of the presence of Spd^{3+} .

DNA condensation regions II , III and I' are observed at lower NaCl concentrations (0.8 M and below). Region III corresponds to the plateau of minimal solubility and region II is a region where the solubility varies. Region II corresponds to a narrow strip, surrounding region III. In region I', the DNA is fully resolubilized. However, experiments described below show that this region differs from region I. At high Spd^{3+} concentrations we do not know the boundary between regions I' and I, nor between regions I and IV.

The general shape of the regions III and II are triangular, with a rounded-tip at high NaCl concentration. At lower spermidine concentrations, the boundaries between regions I and II and between II and III depend on the NaCl concentration, increasing with an increasing NaCl concentration between 1 mM and 200 mM. In contrast, at high spermidine concentrations, the boundaries between regions III and II and between II and I' are independent of the NaCl concentration, in the range from 1 mM to 200 mM.

Figure 4.5 shows the phase diagram observed in D_2O . We observe again two regions of decreased DNA solubility separated by a region of full solubility. The general shape of the phase diagram is conserved. We can again define five regions : region I, II, III and IV that have the same meaning as in the H_2O phase diagram, and a region II'. Because of the lower solubilities of NaCl and Spd^{3+} in D_2O , we could not study the regions of simultaneous high concentrations of NaCl and Spd^{3+} (upper right corner of 4.5). As a result, the boundaries between the five regions are less well defined. Region I is the region where DNA is fully soluble. It is bounded at high NaCl concentrations by a vertical line at 1.5 M, up to 10 mM of Spd^{3+} . At higher NaCl concentrations, region IV corresponds to the salting out region. Again the concentration of salting out C_S is observed to be independent of the presence of spermidine. Region III corresponds to the plateau of minimal solubility. Regions II and II' are regions where the solubility varies. In contrast with the previous phase diagram, we do not know if these two regions are connected. The shape of region III is still triangular. The boundary between regions I and II between 1 mM and 100 mM NaCl appears at much lower Spd^{3+} concentrations.

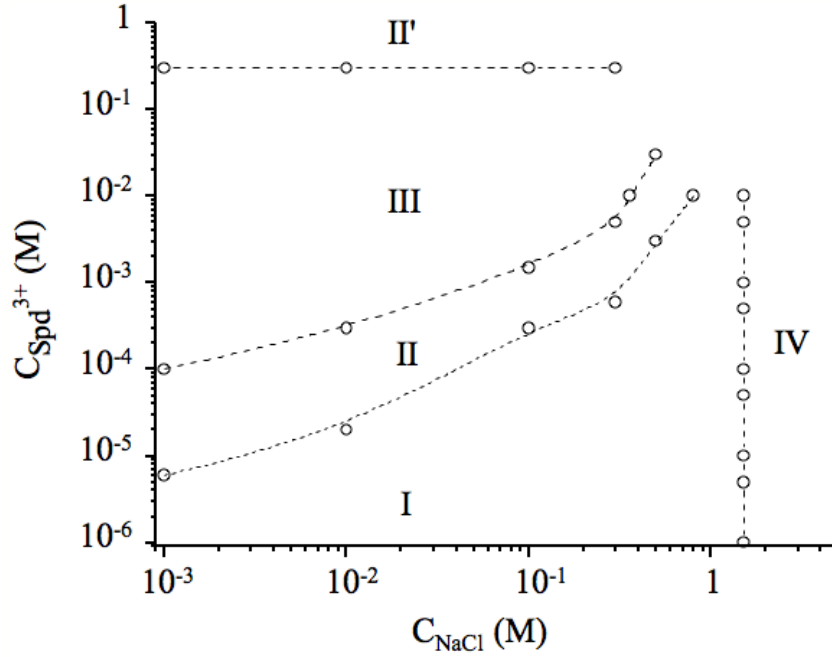


FIG. 4.5 – Plot of the concentrations C_1 , C_2 , C_3 , C_A , C_B and C_S in the plane of coordinates ($[\text{NaCl}]$, $[\text{Spd}^{3+}]$) in D_2O . Five distinct regions are observed. The regions I, II, III and II' are delimited by dashed lines which are guides for the eyes. Region I : the soluble phase ; Regions II and II' : regions where the solubility of DNA in the presence of Spd^{3+} varies ; Region III : a region where solubility of DNA in the presence of Spd^{3+} is constant and minimal ; Region IV : a region above which the DNA is salted out by NaCl, separated from region I by a dashed vertical line at 1.5 M NaCl.

The extension of region I is globally much smaller in D_2O than in H_2O , indicating a general decrease of DNA solubility with the exception of the region defined by : $0.25 \text{ M} \leq [\text{NaCl}] \leq 0.8 \text{ M}$ and $10^{-3} \text{ M} \leq [\text{Spd}^{3+}] \leq 0.1 \text{ M}$, where the opposite trend is observed. The decrease in the DNA solubility in D_2O compared to H_2O results from a translation of the boundaries between regions I and II and regions II and III towards lower Spd^{3+} concentrations in the phase diagram obtained in D_2O . These two boundaries depend on the NaCl concentration as in the case of H_2O . The boundary between regions III and II' is independent of the NaCl concentration, in the range from 1 mM to 300 mM as in the case of H_2O . In addition this boundary is identical in H_2O and D_2O , and therefore does not depend on the solvent.

3.2 Solubility studies combining autoradiography and sedimentation

In these experiments, we have determined by autoradiography the DNA concentration profiles in various regions of the phase diagram obtained for H₂O. In figures 4.6 to 4.8, the black and the grey curves show the DNA concentration profiles obtained before and after centrifugation respectively.

3.2.1 Salting out

Figure 4.6 -(a) shows the DNA concentration profile (expressed per unit length) obtained in the presence of 1 M NaCl (no added Spd³⁺), corresponding to region I (full solubility) of the phase diagram determined for H₂O (Figure 4.4). The black and the grey curves can be superimposed.

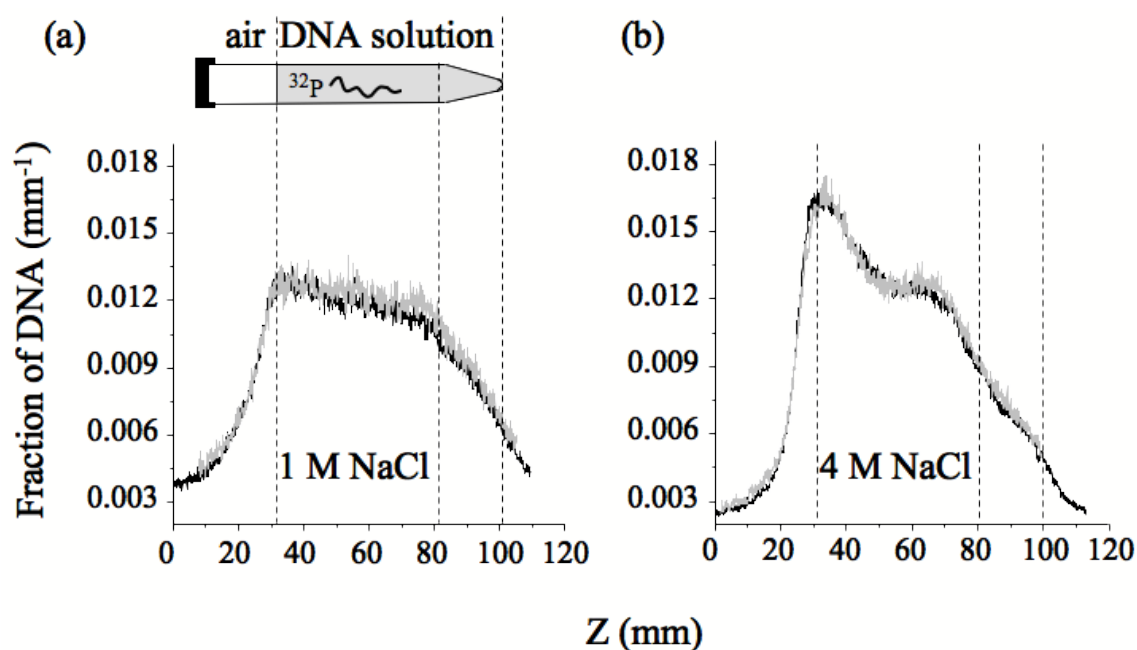


FIG. 4.6 – DNA concentration profiles (per unit length) along the height of the tube. Black lines : concentration profiles before centrifugation ; grey lines : concentration profiles after centrifugation. The dashed vertical lines indicate (from left to right) : 1) the position of the air-water interface, 2) the end of the cylindrical section of the tube and 3) the end of the conical section of the tube. (a) 1 M NaCl. A drawing of the Falcon tube is shown on the top of the figure. (b) 4 M NaCl.

These two curves have three parts. The central flat part corresponds to the cylindrical section of the tube. Its flatness indicates that the DNA concentration is homogeneous in the tube. In the left part, the concentration decays over a length of about 2 cm. The decay starts at the air-water interface. It corresponds to β -particles emitted in the air from the DNA in the aqueous solution. In the right part, we can also observe a decrease in the DNA concentration. This decrease starts at the end of the cylindrical section of the tube, and finishes after the end of the conical portion.

Figure 4.6 -(b) shows the profiles obtained in the presence of 4 M NaCl (again, in the absence of Spd^{3+}), corresponding to the salting-out region IV of the phase diagram. Prior to centrifugation, there is a peak at the position of the air-water interface, indicating an adsorption at this interface, followed by a decreasing gradient of concentration. After centrifugation, the concentration profile shows no modification.

3.2.2 Solubility in the presence of Spd^{3+} and NaCl

Figure 4.7 shows the profiles obtained with increasing Spd^{3+} concentrations at fixed Na^+ concentration (10 mM) :

At 10^{-6} M Spd^{3+} , we are in region I of the phase diagram. The concentration profile is flat before centrifugation indicating an homogeneous solution. After centrifugation, a weak peak at the air-water interface is visible, but the concentration profile remains essentially flat as before.

At 2.5×10^{-4} M Spd^{3+} , we are in the middle of region II. There is a peak at the air-water interface, before and after centrifugation. There is no evidence for a precipitate (the minimum visible at 60 mm in the concentration profile corresponds to a glitch on the image plate). The peak is clearly lowered by centrifugation : this implies the transfer of some material to the rest of the tube, but we do not see the appearance of a pellet at the bottom of the tube.

At 5×10^{-2} M Spd^{3+} , we are in the middle of region III. Before centrifugation, there is a peak at the air-water interface, followed by a regularly decreasing gradient of concentration before centrifugation. After centrifugation, the peak has essentially disappeared and is replaced by a strong peak at the bottom of the tube, corresponding to a precipitated pellet.

At 1 M Spd^{3+} , we are in region I' where the DNA is fully resolubilized according to the sedimentation studies described above. Before centrifugation, unexpectedly, we observe a broad peak at the air-water interface, followed by a decreasing gradient of DNA concentration. After centrifugation, the DNA

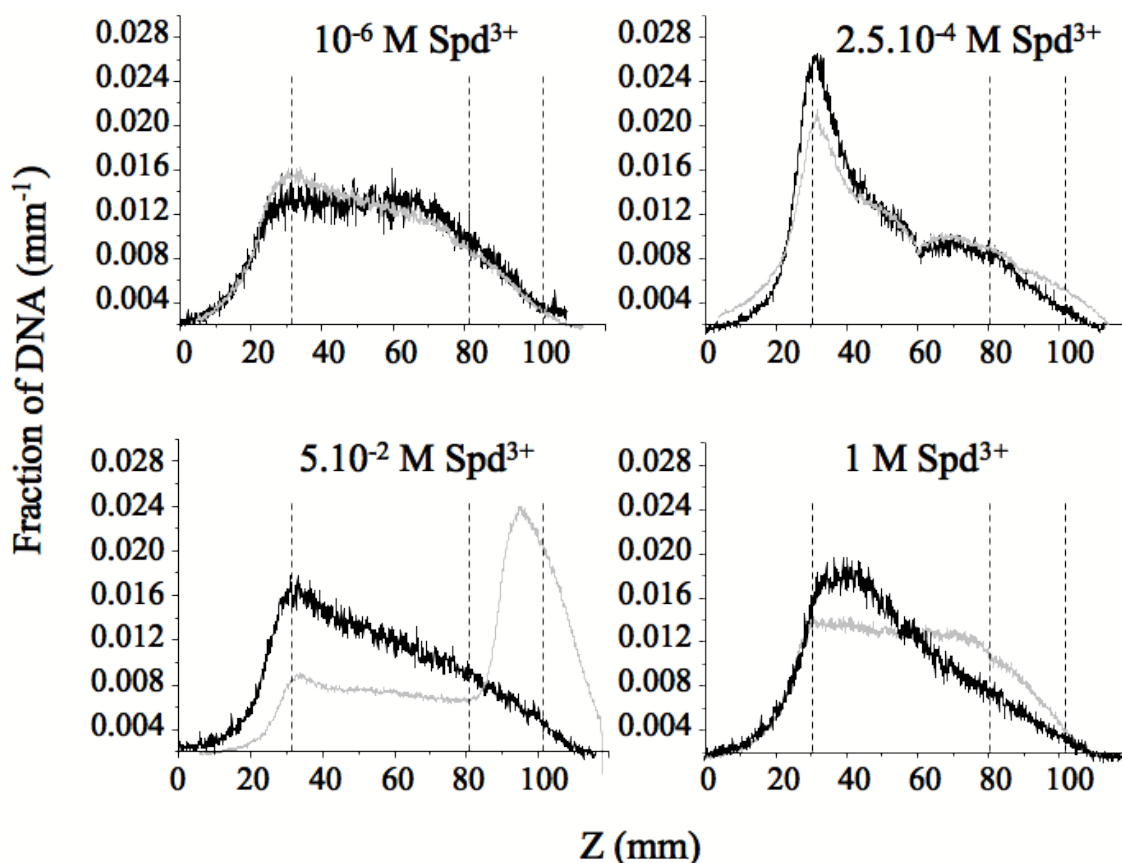


FIG. 4.7 – DNA concentration profiles along the height of the tube at 10^{-2} M NaCl for four Spd^{3+} concentrations. Black lines : concentration profiles before centrifugation ; grey lines : concentration profiles after centrifugation. The dashed vertical lines indicate (from left to right) : 1) the position of the air-water interface, 2) the end of the cylindrical section of the tube and 3) the end of the conical section of the tube.

profile is flat, indicating an homogeneous distribution of the radiolabeled material in the tube, in agreement with the results of the sedimentation studies described above.

Figure 4.8 shows the profiles obtained with increasing NaCl concentrations at fixed Spd^{3+} concentration (10 mM) :

Without added NaCl (labeled 0 M NaCl), we are in the middle of region III.

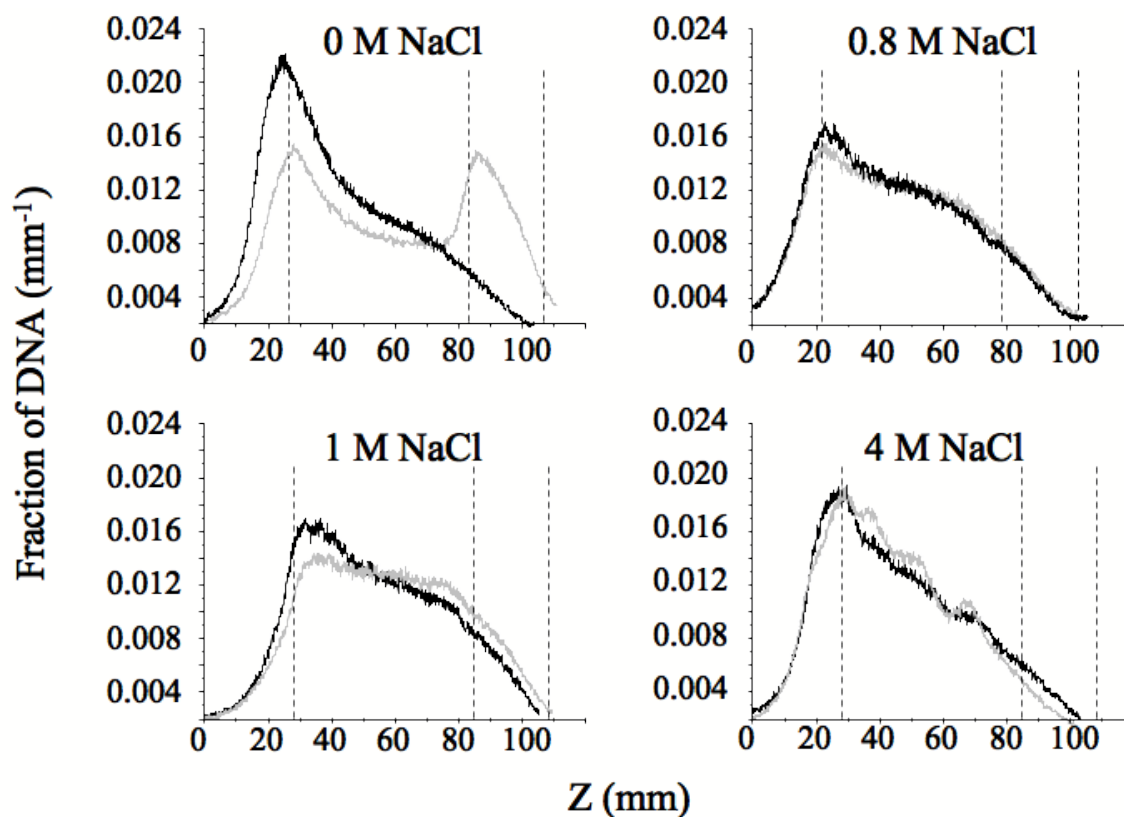


FIG. 4.8 – DNA concentration profiles along the height of the tube at 10^{-2} M Spd^{3+} for four NaCl concentrations. Black lines : concentration profiles before centrifugation ; grey lines : concentration profiles after centrifugation. The dashed vertical lines indicate (from left to right) : 1) the position of the air-water interface, 2) the end of the cylindrical section of the tube and 3) the end of the conical section of the tube.

Before centrifugation, there is a peak at the air-water interface, followed by a decreasing gradient of concentration. After centrifugation, there are two peaks of equal intensities, at the air-water interface and at the bottom of the tube, indicating the presence of a pellet.

At 0.8 M NaCl, we are in region II, close to full resolubilization. There is a peak at the air-water interface, followed by a weakly decreasing gradient of DNA concentration. This profile is only weakly perturbed after centrifugation, with a small decrease of the peak at the air-water interface and

a small transfer of material to the rest of the tube, and without a visible pellet.

At 1 M NaCl, the DNA is fully soluble according to the sedimentation studies described above. Unexpectedly, the profile prior to centrifugation reveals a peak at the air-water interface followed by a decreasing gradient of DNA concentration. After centrifugation, the DNA profile is flat, indicating an homogeneous distribution of DNA in the tube, in agreement with the result of the sedimentation studies described above.

At 4 M NaCl, we are in region IV. There is a strong peak at the air-water interface before centrifugation which remains unchanged after centrifugation.

4 Discussion

4.1 General shape of the phase diagrams

We have studied the decrease of solubility of single-stranded DNA in the presence of monovalent (sodium) and multivalent cations (spermidine), and obtained two phase diagrams (figures 4.4 and 4.5) in H_2O and in D_2O . We shall first compare these phase diagrams with those described in the literature, generally at higher DNA concentrations. At high DNA concentrations, NaCl and spermidine are known to promote two types of aggregation/precipitation. High concentrations of monovalent cations aggregate DNA and other polyelectrolytes by a phenomenon called "salting-out", also referred to as an H type precipitation (for High critical salt concentration) [Ikegami & Imai, 1962], [von Hippel & Schleich, 1969], [de la Cruz et al., 1995], [Pelta et al., 1996]. In this type of precipitation, the critical salt concentration required to promote aggregation is basically independent of the concentration of DNA. The second type of aggregation is promoted by multivalent cations and is generally referred to DNA condensation [Bloomfield et al., 2000]. In contrast with monovalent salts the critical amount of multivalent cations required to promote aggregation is known to depend in a complex manner on the polyelectrolyte concentrations [Raspaud et al., 1998], [Raspaud et al., 1999], [Burak et al., 2003]. However, at very low concentrations of single-stranded DNA, the critical multivalent concentration is independent of the single-stranded DNA concentrations (up to $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) [Raspaud et al., 1998], [Chaperon, 1999] and this is our experimental situation. Both phenomena of salting out and condensation are studied here under conditions where the results obtained are expected to be independent of the single-stranded DNA concentration. This allows us to compare our diagrams with those obtained previously at low DNA concentrations. In addition, we are able to compare the results obtained with the Eppendorf and the Falcon tubes, even though the single-stranded DNA concentration differs by a factor three in the two experiments.

The phase diagrams reported here (figures 4.4 and 4.5) allow us to visualize the two phenomena of salting out and condensation on the same graph. The phase diagrams obtained both for H_2O and D_2O define broadly two regions of phase separation in the plane of coordinates ($[\text{NaCl}]$, $[\text{Spd}^{3+}]$). The first region (IV) corresponds to the salting out regime, while the second (regions II and III in H_2O ; II, III and II' in D_2O) corresponds to the condensation regime requiring the presence of multivalent cations.

The general shape of these phase diagrams is in accordance with the results obtained previously for single-, double- and triple-stranded DNA, and other polyelectrolytes at low polymer concentrations [de la Cruz et al., 1995], [Pelta et al., 1996], [Raspaud et al., 1998], [Raspaud et al., 1999], [Saminathan et al., 1999], [Chaperon, 1999]. The triangular shape of the condensation regime in the presence of Spd^{3+} is well established. The independence of the salting out concentration C_S on the concentration of Spd^{3+} (leading to the vertical lines in the phase diagrams) is expected, given the relative concentrations of the two salts in the system (above 1 M for NaCl and below 0.1 M for Spd^{3+}).

4.2 Decreased solubility of DNA in D_2O

A new result is the overall decreased solubility of ϕX174 DNA in D_2O compared to H_2O . This decrease is characterized by two features :

1. Region I is globally shrunk in the D_2O phase diagram
2. DNA solubility in the presence of spermidine on the plateau of minimal solubility (region III) is smaller for D_2O ($5 \pm 5\%$) than for H_2O ($20 \pm 10\%$).

However, a closer look reveals a more complex situation :

- The shrinking of region I is due to the greater efficiency of both spermidine and sodium chloride as phase separating agents.
- This greater efficiency for spermidine is only true at low concentrations : indeed, at high concentrations (above 0.1 M spermidine), identical amounts of spermidine are required to leave the plateau of minimal solubility in H_2O and in D_2O . In this case, neither the solvent nor NaCl concentration appear to play a role in this phenomenon. Redissolution depends solely on Spd^{3+} concentration.
- Lastly, there is a region in the plane of coordinates ($[\text{NaCl}]$, $[\text{Spd}^{3+}]$) ($0.25 \text{ M} \leq [\text{NaCl}] \leq 0.8 \text{ M}$ and $10^{-3} \text{ M} \leq [\text{Spd}^{3+}] \leq 0.1 \text{ M}$) where DNA is not soluble in H_2O but is soluble in D_2O .

The observation of a decreased solubility in D_2O is well established for proteins (see for instance [Larsson, 1988] and references therein). To our knowledge, it has not been reported for nucleic acids. This result could have been anticipated for the following reason : von Hippel and Schleich have observed that there is a general correlation between solubility and stability of biopolymers [von Hippel & Schleich, 1969]. Those compounds that stabilize the folded, helical form of biopolymers are also those that decrease their solubility. D_2O has been shown to increase the melting temperature of double-stranded DNA [Izzo et al., 1975], and therefore was expected

to decrease the solubility of nucleic acids.

The origin of this decreased solubility of nucleic acids is complex. It is well known that simple salts (such as NaCl) are generally less soluble in D₂O, and that the ionization constants of acids and bases are weaker in D₂O. As a result, differences in charge state account partially for the decreased solubility of proteins in D₂O [Larsson, 1988]. Here a similar reasoning can be applied to the negative charges carried by the phosphate groups. Since D₂O and H₂O have very close dielectric constants, the observed differences in solubility cannot result from electrostatic interactions alone and the other major force involved in the attraction between DNA molecules is namely the hydration force [Rau & Parsegian, 1992] [Parsegian et al., 1995]. The overall decrease in the DNA solubility in D₂O provides a direct evidence for a role of hydration in the two phenomena.

4.3 Significance of the phase diagrams : A role for adsorption

What is the significance of these phase diagrams? According to the literature, the phase separation regions correspond to areas where a bulk aggregation occurs, leading to the formation of a sedimentation pellet after centrifugation. A bulk aggregation of nucleic acids is indeed observed in the literature, but this does not rule out a concomitant adsorption at the air-water interface. In order to investigate this issue, we have performed additional studies combining autoradiography without or with sedimentation.

We discuss first the main features of our approach. We have used ³²P to label DNA. This radioisotope produces high-energy β -particles, which allow us to work with very dilute solutions, and to obtain DNA concentration profiles for the whole tube. At the same time, these particles have a depth of penetration close to 1 cm in water, and this limits the spatial resolution of our experiments. DNA adsorbed at the water-phenol interface for instance produces a peak with a width of about 1 cm in these conditions [Goldar & Sikorav, 2004], and this is the typical spatial resolution of our system. This has led us to use long tubes (7 cm between the air-water interface and the bottom of the tube).

The observation of a flat concentration profile indicates the existence of a homogeneous DNA distribution in tube, and this is observed in region I of the phase diagram (figure 4.6 -(a) and figure 4.7 at 10⁻⁶ M Spd³⁺). Outside of this region, and before centrifugation, we always observe two main phenomena. The first one is the existence of a peak of DNA at the air-water interface, and the second one is the presence of a decreasing gradient of DNA concentration.

The presence of a peak located at the air-water interface could result from the flotation of the DNA chain in a solvent with a greater density, in particular at high NaCl concentrations. However, the literature shows that the density of double-stranded DNA is greater than that of NaCl solutions between 0 and 4 M [Cohen & Eisenberg, 1968], and that the density of single-stranded DNA exceeds that of double-stranded DNA [Bloomfield et al., 1974]. Thus, the flotation hypothesis can be ruled out : the presence of a peak at the air-water interface indicates an adsorption at this interface.

The existence of the concentration gradient is not trivial. It is easy to estimate with the Einstein relation the mean distance $\sqrt{\langle r^2 \rangle}$ that the DNA chains can explore by diffusion during the duration t of the experience (12-16 hours), knowing their radius of gyration R_G (about 40 nm at 0.1 M NaCl [Sinsheimer, 1959] and less than ten times smaller in a compact, globular state) :

$$\langle r^2 \rangle = 2t \frac{k_B T}{6\pi\eta R_G}. \quad (4.2)$$

where k_B is the Boltzmann constant, T the room temperature and η the viscosity of the solution (taken equal to that of water). One finds a distance of about 1-2 mm (for coil and globular states respectively). Assuming that a diffusing chain becomes irreversibly adsorbed once it reaches the air-water interface, one would expect after 12-16 hours the presence of an adsorption peak with a width of about one centimeter (the spatial resolution of our technique), followed by a flat concentration profile. The existence of concentration gradients extending over several centimeters indicates that the system is not in equilibrium, and than diffusion alone does not account for our results. In addition, the experiment is more complex, since an ongoing aggregation is taking place in the solution. In view of these theoretical and experimental limitations, we shall not try to explain the detailed shapes of the concentration profiles (in particular the sharpness of the peaks observed at the air-water interface, the steepness of the concentration gradients, or the nature of minor peaks). Rather, we shall focus on the following phenomena : presence or absence of a peak at the air-water interface, decrease of this peak after centrifugation, presence or absence of a pellet at the bottom of the tubes.

An analysis of the results obtained leads to the following findings :

1. In our very dilute solution, the decrease in solubility is **always** associated with an adsorption at the air-water interface.
2. In presence of spermidine, our centrifugation experiments lead to a simple understanding of the structure of the adsorbed material : it consists of

aggregates that are large enough to migrate at low speed centrifugation, either going back to the bulk of the solution, or forming a true pellet.

3. In the salting out case, there is no evidence for a bulk aggregation after centrifugation. We have apparently an adsorption of either isolated DNA chains or of multi-molecular aggregates that are too small to sediment. We know that at higher DNA concentrations, the same salt concentrations lead to the formation of a pellet after centrifugation. Therefore, we conclude that we are in poor solvent conditions here. The individual single-stranded DNA chains are not expected to be in a random coil state in the bulk of the solution, but to have a globular structure. The state of the chains at the air-water interface is unknown. They could remain as isolated globules or form small aggregates with other globules.
4. Finally, regions where the DNA is "soluble" just after centrifugation can in reality correspond to regions where an extensive adsorption takes place. This corresponds to a region called I' , observed at 10 mM NaCl and 1 M Spd³⁺ (figure 4.7), and 10 mM Spd³⁺ and 1 M NaCl (figure 4.8). In both cases, the transfer of the adsorbed DNA to the bulk of the solution after centrifugation implies the existence of DNA aggregates. Indeed, isolated chains are not expected to sediment efficiently under the mild centrifugation conditions employed. The aggregates can be large enough to sediment, but they are too small to form a pellet. The presence of these aggregates strongly argues against a charge-reversal of the chains (a charged-reversed DNA is subject to electrostatic repulsion and will not aggregate); spermidine salts are not fully dissociated at high concentrations, and this provides a simpler explanation for their decreased efficiency as aggregating agents [Yang & Rau, 2005].

We conclude that in our experiments, the decrease in solubility is always associated with an adsorption. Furthermore, the adsorption is strictly coupled with the appearance of attractive interactions in the bulk of the solution, induced by monovalent salts at high concentrations or multivalent salts at lower concentrations. These attractive interactions also lead to an aggregation, which may or may not lead to the sedimentation of the aggregates during centrifugation. The fields of DNA salting out and condensation must therefore take into consideration this air-water adsorption, especially for very low DNA concentrations where this effect may dominate.

4.4 Comparison with the works of Frommer and Miller and Eickbush and Moudrianakis

The previous work of Frommer and Miller [Frommer & Miller, 1968] showed that the adsorption of double-stranded and denatured DNA at the air-water interface can occur in the presence of monovalent salts at concentrations where the interaction between DNA monomers are repulsive. Similar results have been reported for double-stranded DNA in the presence of mono- and divalent salts by Eickbush and Moudrianakis [Eickbush & Moudrianakis, 1977]. For denatured DNA, the adsorption is weak in the results of Frommer and Miller. In our case, we only observe adsorption in poor solvent conditions. The greatly differing DNA concentrations used by Frommer and Miller and us (about 1000 times less) as well as the differences between ϕ X174 single-stranded DNA and denatured DNA probably explain why we do not detect adsorption at lower sodium chloride concentrations.

The experiments reported by Eickbush and Moudrianakis for double-stranded DNA in the presence of Spd^{3+} are qualitatively in agreement with our results obtained for single-stranded DNA. The only difference is that they observe a bulk precipitation in the absence of centrifugation, and we do not, but this can be understood by the much lower DNA concentration used in our experiments (about 20 times less).

4.5 Mechanism of the adsorption and aggregation processes

A description of the mechanisms of the adsorption process, of the aggregation process, and of their relationship is delicate in view of the complexity of the system. The screening of electrostatic interactions is clearly involved, in the bulk and at the air-water interface. Beyond this factor, we shall discuss here the role of van der Waals forces and of the quality of the solvent at the air-water interface.

A role for van der Waals interactions in adsorption and aggregation

In our experiments, DNA adsorption is concomitant with a bulk aggregation : in the bulk of the solution, the DNA is in a dense state (condensed or salted out), and the formation of these dense states is known to be accompanied by a quasi-disappearance of the negative charges of the polyelectrolyte, as indicated for instance by electrophoretic mobility measurements

[Raspud et al., 1999] [Yamasaki et al., 2001] and calorimetry [Matulis et al., 2000]. We are therefore dealing with large, quasi-neutral particles of radius R . Katsura et al. [Katsura et al., 1998] have shown that dense (globular) states of DNA can be trapped by optical tweezers. This finding implies that the refractive index of the dense states of DNA is higher than that of the surrounding aqueous buffer [Ashkin, 1970]. Thus, there are three components in our system : the air, the buffer and the DNA dense particles, with refractive index n_{air} , n_{buffer} and $n_{aggregate}$ respectively, and the indexes are ordered in the sequence :

$$n_{aggregate} \geq n_{buffer} \geq n_{air} \quad (4.3)$$

Assuming that the shape of an aggregate is spherical, the van der Waals interaction potential between this macroscopic particle and the air/water interface is given by [Israelachvili, 1974] :

$$W(l) = -\frac{A R}{6 l} \quad \text{for } l \ll R \quad (4.4)$$

$$W(l) = -\frac{2A R^3}{9 l^3} \quad \text{for } l \gg R \quad (4.5)$$

where A is the Hamaker's constant, l is the distance between the interface and R the radius of the aggregate. Using the formula obtained by Hamaker [Hamaker, 1937] we can explicitly write the constant A as :

$$A \approx \frac{3k_B T}{2} \left[\frac{\sqrt{n_{air}} - \sqrt{n_{buffer}}}{\sqrt{n_{air}} + \sqrt{n_{buffer}}} \times \frac{\sqrt{n_{aggregate}} - \sqrt{n_{buffer}}}{\sqrt{n_{aggregate}} + \sqrt{n_{buffer}}} \right] \quad (4.6)$$

According to equations 4.3 and 4.6, the sign of A is negative. Thus, according to the equations 4.4 and 4.5, this leads to the appearance of attractive van der Waals forces bringing the DNA aggregate near the air-water interface [Israelachvili, 1992].

The reasoning developed here leads also to a simple explanation of the late stages of the bulk aggregation process. The large, quasi-neutral particles with a refractive index $n_{aggregate}$ will attract one another in a buffer of refractive index n_{buffer} through van der Waals interactions [Israelachvili, 1992].

A role for the quality of the solvent at the air-water interface

In addition to the role of van der Waals interactions, it is also important to consider the local structure of the solvent near the interface. We are dealing with a polymer adsorption process taking place in an extremely dilute system, and in a poor solvent. This type of situation has been considered from a theoretical point of view by Johner and Joanny [Johner & Joanny, 1991]. These authors have predicted the existence of different regimes of adsorption, which may involve partial or complete wetting of the interface by the polymer, depending on the length and the concentration of the polymer and the strength of the interaction with the interface. At very low bulk concentrations the adsorbed chains could form a two-dimensional dilute polymer solution, which is either in a poor solvent, or in a good solvent. To our knowledge, these predictions have not been investigated experimentally.

In our experiments in the presence of spermidine, the adsorbed chains can be transferred to the bulk of the solution with a mild centrifugation, and this indicates that the adsorbed chains always belong to large aggregates, excluding an interfacial good solvent scheme. Such a scheme cannot be ruled out in the salting out case.

At low to moderate salt concentrations, one expects the existence of a depletion region for the small ions (sodium chloride, spermidine) near the air-water interface, because of the charge image effect [Onsager & Samaras, 1934]. The width of this region is of about 10 Å. If the bulk of the solution is a poor solvent for the single-stranded DNA chains, the region close to the interface is then a better solvent for them. This would induce a transfer of segments of the DNA chains from the bulk to this region. This would be a weak adsorption, which does not involve hydrophobic interactions : those would have a visible effect on the surface tension, and this is not observed by Frommer and Miller. Indeed, these authors show that DNA adsorption does not alter the surface tension and surface potential, and this rules out a role for hydrophobic interactions. The situation in the presence of high concentrations of NaCl is even more delicate, since the salt concentration profile in this case is still debated [Garrett, 2004]. To sum up, we think that single-stranded DNA is only weakly adsorbed at the air-water interface. A similar analysis has been made in the case of polystyrene sulfonate in the presence of KCl [Yim et al., 2002]. The authors show that the adsorption layer is not well defined, and suggest that only a few monomers are actually anchored at the air water interface. This picture is consistent with ours. In the case of polystyrene sulfonate, a bulk aggregation has also been observed in the same experimental conditions, but a rigorous investigation of the coupling between adsorption and aggregation remains to be performed.

4.6 Implications

Our results have implications for the interpretation of phase diagrams of DNA and salts. We have seen that a decreased solubility cannot be simply equated with an aggregation. The field of DNA condensation, in particular experiments using very dilute DNA solutions, must take into consideration these results. For instance, the DNA concentration range used here is the one where the monomolecular collapse of long double-stranded DNA chains can be observed [Post & Zimm, 1982], [Widom & Baldwin, 1983]. It is also the concentration range where DNA condensing agents have been shown to increase the rate of DNA renaturation or of DNA cyclization [Sikorav & Church, 1991], [Chaperon, 1999], [Jary & Sikorav, 1999]. The role of an adsorption in these experiments should be investigated.

Finally, processes leading to high local concentrations of nucleic acids are expected to be extremely relevant to prebiotic chemistry, in the perspective of an RNA world. Phase separation processes are among these and include aggregation and adsorption on solid surfaces such as clays, or liquid-liquid interfaces (see [Goldar & Sikorav, 2004] and further reference therein). The adsorption at the air-water interface is yet another process that should be taken into consideration. Single-stranded DNA, a single-stranded polynucleotide, has common features with RNA and the data obtained here are also of interest in this perspective.

Résumé des principales conclusions du chapitre 4

Dans ce chapitre nous nous sommes consacrés à l'étude de la solubilité de l'ADN de phage ϕ X174 virion dans des solutions très diluées. La solubilité a été étudiée en présence de sels monovalents (NaCl) et trivalents (Spd³⁺), à la fois dans l'eau (H₂O) et dans l'eau deutérée (D₂O). Le comportement de l'ADN dépend de la nature des sels, de leur concentration et de la nature du solvant.

Nous avons observé deux types de processus d'agrégation à la fois dans l'eau et dans l'eau lourde :

- une condensation de l'ADN induite par la présence de cations trivalents (spermidine)
- un salting out de l'ADN à haute concentration en sels monovalents (chlorure de sodium)

La comparaison des diagrammes de phases dans l'eau et dans l'eau lourde montre que la solubilité du simple brin est plus faible dans D₂O que dans H₂O. Cela suggère que dans le cas des séparations de phases observées, l'hydratation des molécules joue un rôle important en plus des facteurs électrostatiques.

Nous avons observé par des expériences d'autoradiographie l'agrégation des molécules d'ADN. Par cette technique, nous avons mis en évidence que l'apparition d'interactions attractives entre monomères de la chaîne d'ADN, engendrées par la présence de spermidine, est strictement corrélée à une adsorption des acides nucléiques à l'interface eau/air.

Nous avons pu également observer une adsorption à l'interface eau/air dans la région du salting out du diagramme de phases. Cette adsorption n'est pas altérée par la centrifugation. Cela suggère que les chaînes d'ADN ne sont pas dans une conformation d'agrégats de grosses tailles. En régime plus concentré, il serait certainement possible d'observer une agrégation des chaînes.

Ces expériences permettent l'amélioration de l'interprétation des diagrammes de phases qui décrivent la solubilité du simple brin d'ADN. Ceci montre qu'une déplétion de la solution peut être due à un processus d'adsorption en plus d'une agrégation.

Conclusion

"Je ne vis une vraie aventure que si je ne sais pas comment cela va se terminer. Tenter l'aventure signifie explorer l'inconnu, peut-être l'impossible."

Reinhold Messner

L'ADN est la molécule qui contient le patrimoine génétique de chaque être vivant. Elle est constituée d'un squelette phosphatique négativement chargé et de bases aromatiques capables de former des liaisons hydrogène.

Le fonctionnement de l'ADN est régi par des interactions avec son environnement. Ces interactions sont de différentes natures : elles peuvent être électrostatiques (avec les histones, les protéines, les membranes,...), elles peuvent être polaires (tyrosine de certaines protéines, liaisons hydrogène) ou bien encore d'ordre topologique (face intérieure d'une membrane, surface d'une protéine,...). Ce sont ces interactions qui permettent à l'ADN de se répliquer, de se transcrire, d'exprimer des gènes (pour l'ARN), de se réparer,...

Cette molécule largement étudiée depuis sa découverte, reste pour autant extrêmement complexe du point de vue de son fonctionnement *in vivo*. Pour comprendre les mécanismes d'interaction avec son environnement, une stratégie consiste à élaborer des systèmes modèles qui permettent de les appréhender de façon plus simple. C'est ce que nous avons essayé de faire dans ce travail de thèse.

L'interface liquide/air d'une solution d'ADN en régime très dilué a fait l'objet d'une étude dans ce travail de thèse. Nous avons vu que l'ADN en mauvais solvant peut se condenser pour former des agrégats. Cela arrive en présence d'ions multivalents dans la solution ou bien à haute concentration en monovalents. Nous avons établi les diagrammes de phases de l'ADN ϕ X174 virion en présence de spermidine et de chlorure de sodium dans D₂O et dans H₂O. Les différences de diagrammes de phases dans ces deux cas suggèrent que dans le cas des séparations

de phases observées, l'hydratation des molécules joue un rôle important en plus des facteurs électrostatiques. Des expériences d'autoradiographie ont montré que l'agrégation due aux multivalents dans la solution est strictement liée à une adsorption à l'interface eau/air. D'autre part, en condition de salting out, les expériences montrent que l'ADN est adsorbé à l'interface et que cet état n'est pas sensible à la centrifugation. Les chaînes ne forment donc pas d'agrégats de grosses tailles. L'expérience qui consiste à observer l'adsorption de l'ADN à l'interface, en condition de salting out, en faisant varier la concentration en ADN permettrait certainement de comprendre comment varie la taille des agrégats à l'interface.

Pour comprendre quels sont les mécanismes d'interaction entre l'ADN et une interface, nous avons également mis au point une chimie de surface du silicium qui permet d'obtenir des monocouches de molécules organiques avec une fonctionnalité chimique choisie. Ce travail consiste à greffer une première couche de molécules d'ester la plus dense possible pour éviter une oxydation ultérieure. Pour cela, il convient de diluer l'ester au milieu de molécules plus courtes telles que l'octène. La stoechiométrie de la solution est respectée sur la surface. Il existe une relation linéaire entre la densité de chaînes greffées et la proportion d'octène dans la solution de greffage. Une succession d'étapes chimiques optimisées pour ne pas altérer la monocouche permet d'obtenir *in fine* une fonctionnalité chimique choisie.

Nous avons ensuite porté nos efforts sur l'adsorption de molécules d'ADN simple brin et double brin sur ces substrats. Dans un premier temps, nous avons cherché à observer une interaction aromatique entre l'ADN et une surface greffée de molécule phénol. Pour différentes concentrations en sels et dans une solution de dépôt contenant du phénol ou non, nous n'avons pas pu mettre en évidence une interaction spécifique de l'ADN simple brin ou double brin avec ces surfaces.

Pour autant, des observations AFM de molécules forcées à être adsorbées sur une surface de mica par interaction coulombienne nous ont permis de constater que le phénol peut avoir des conséquences importantes sur la conformation des chaînes d'ADN. Sans phénol dans la solution de dépôt, les molécules forment des agrégats sur la surface qui sont brisés en présence de phénol.

L'interaction électrostatique entre une surface chargée positivement et une molécule d'ADN permet d'adsorber les molécules. À l'aide de nos substrats dont la densité de chaînes greffées est contrôlable, nous avons cherché à comprendre les mécanismes de cette interaction. Pour cela, nous avons effectué des mesures de réflectivité de rayons X afin d'utiliser une technique non invasive. L'analyse fine des spectres de réflectivité suggère que l'ADN double brin s'adsorbe sur la surface en pénétrant dans la couche moléculaire. Ceci est obtenu à partir des profils de densité. Cette adsorption se fait à très faible force ionique. Elle est irréversible par l'ajout

de sels dans la solution. Cela suggère que l'ADN double brin est partiellement déshydraté. Nous n'avons pas pu établir de façon catégorique que l'ADN simple brin s'adsorbe de la même manière car il ne déforme pas la couche moléculaire. L'étape suivante pourrait consister à ajouter le brin complémentaire pour observer la déformation de la monocouche moléculaire en fonction de la renaturation de l'ADN. Ceci permettrait de détecter l'hybridation sur une interface solide/liquide d'ADN simple brin.

ANNEXE A

La microscopie à force atomique : AFM

Après avoir inventé le microscope à effet tunnel, Binnig et Rohrer mirent au point le microscope à force atomique (AFM pour l'acronyme anglais de Atomic Force Microscopy) en 1986 [Binnig et al., 1986].

Cette technique de microscopie permet de visualiser une surface de plusieurs microns voire plusieurs dizaines de microns carrés avec une résolution verticale de seulement quelques angströms. Le principe consiste à balayer à l'aide d'une pointe d'une résolution submicronique, une surface pour en étudier la topographie. L'imagerie en mode contact et à force constante est la technique qui a été la plus utilisée lors de ce travail de thèse, permettant de contrôler la qualité des surfaces.

La figure A1 schématise le principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique. L'échantillon est posé sur une céramique piézoélectrique : son déplacement par rapport à une position d'équilibre dépend de la tension qui est appliquée à la céramique. Ce principe autorise ainsi un déplacement latéral de l'échantillon (selon les axes \hat{x} et \hat{y}). Ceci permet à la pointe de balayer l'échantillon sur une surface bornée par l'extension maximale du piézoélectrique. L'extension maximale des piézoélectriques utilisés pour ce travail est typiquement de 6, 10 et 50 microns environ. Le piézoélectrique se déplace aussi verticalement par rapport à la pointe du microscope (selon l'axe \hat{z}).

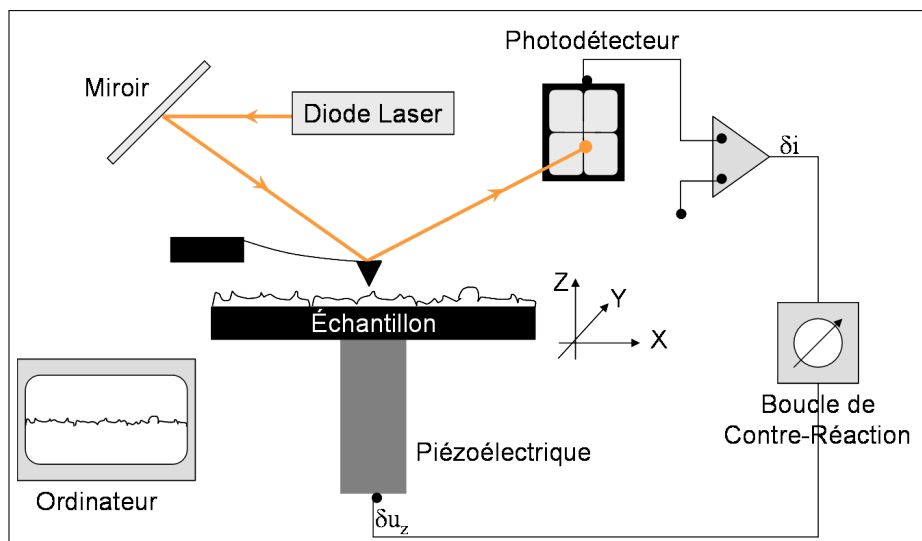


FIG. A1 – Schéma de principe d'un microscope AFM.

La pointe du microscope est en nitrure de silicium (Si_3N_4), son rayon de courbure est d'environ 10 nm. La pointe est accrochée sur un cantilever : levier en nitrure de silicium (Si_3N_4) également et dont la constante de raideur est d'environ 0,1 nm/m. Une diode laser qui émet dans le rouge permet d'envoyer un faisceau (qui n'est pas focalisé) sur la face arrière de la pointe qui a été traitée pour être réfléchissante.

Lorsque la pointe n'est pas en contact avec la surface, le faisceau laser réfléchi par la pointe arrive exactement sur le centre du photodétecteur. Le déplacement vertical de l'échantillon vers la pointe entraîne l'application d'une force entre la pointe et la surface : le cantilever se courbe et le faisceau laser est défléchi verticalement.

Le photodétecteur possède 2 ou 4 quadrants. La différence de signal entre les quadrants du haut et ceux du bas permet de mesurer la déflexion verticale du faisceau laser, ce qui est traduit par le photodétecteur en variation de courant δi ; ceci est scématisé sur la figure A1. La différence de signal entre les quadrants de gauche et ceux de droite permet de mesurer « la friction » : la façon dont la pointe se penche latéralement en balayant la surface.

La friction peut donner dans certains cas des indications sur la nature chimique de la surface mais la variation de cette grandeur reste difficile à interpréter, nous l'utilisons très peu lors de ce travail.

La pointe se trouve en « contact » avec la surface pour une certaine courbure (c'est à dire une certaine déflexion du laser par rapport au centre du photodétecteur) prédéfinie avant l'approche. Cette valeur de consigne est δi_0 . Lorsque la pointe balaye la surface, la rugosité de la surface entraîne des variations dans la déflexion du laser. La boucle de contre-réaction compare en continu la valeur δi donnée par le photodétecteur avec la valeur de consigne.

Dès lors que la différence $\delta i - \delta i_0$ est non nulle, la boucle de contre-réaction applique une tension δu_z au piézoélectrique pour réajuster cette différence à 0. La déflexion du cantilever est donc constante, en d'autres termes : la force entre la pointe et la surface est constante.

La force qui existe entre la pointe et la surface varie en fonction de la distance entre l'une et l'autre. D'autre part, la courbe de force en fonction de la distance n'est pas la même lors de l'approche de la pointe vers la surface et lors du retrait. La figure A2 représente une courbe de force d'une pointe AFM en fonction de sa distance avec la surface.

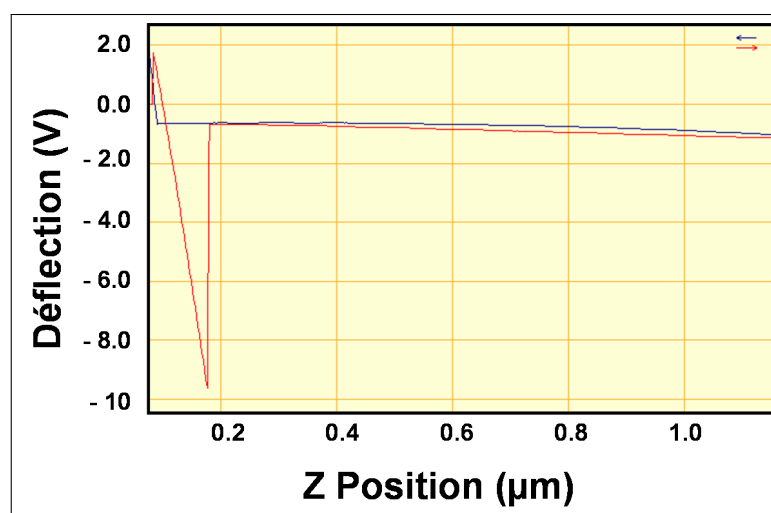


FIG. A2 – Courbe de force exercée entre la pointe et la surface en fonction de la distance de l'une par rapport à l'autre. La courbe bleue représente l'approche de la pointe sur la surface. La courbe rouge représente le retrait de la pointe par rapport à la surface.

Lors de l'approche (courbe bleue sur la figure A2), tant que la pointe n'est pas en contact, le signal est constant sur le photodétecteur. Puis lorsque la distance est suffisamment faible pour que la pointe se colle sur la surface par des interactions de Van der Waals, la force augmente linéairement en fonction de la distance.

Lors du retrait de la pointe (courbe rouge sur la figure A2), des interactions attractives entre la pointe et la surface (ménisque de la couche d'eau physisorbée) leur permettent de rester en contact sur une distance plus grande que celle à laquelle la pointe s'est collée lors de l'approche. Ceci est décrit par une hystérésis sur la courbe de force en fonction de la distance.

Une fois la force appliquée par la pointe sur la surface déterminée, une zone carrée de la surface est balayée ligne par ligne à une fréquence de 1 Hz (une ligne par seconde). Les images enregistrées ont une taille de 512 par 512 pixels et leur résolution dépend de la taille du carré balayé et du rayon de courbure de la pointe. Plusieurs données concernant une image peuvent être enregistrées simultanément : la topographie, la déflexion (le signal d'erreur) ou encore la friction.

Les images sont ensuite traitées à l'aide d'un logiciel de traitement d'images tel que SPIP (Scanning Probe Image Processor) de Image Metrology ApS. Un polynôme du second degré est retranché à l'image afin de corriger plusieurs facteurs d'erreurs. Un des facteurs est la différence entre le plan de balayage et le plan de la surface de l'échantillon qui engendre un angle d'inclinaison sur l'image. L'autre facteur est une courbure due au mouvement relatif en arc de cercle de la pointe (du piézoélectrique) par rapport à la surface lors du balayage. Cette courbure est d'autant plus prononcée que la taille de la zone scannée approche l'extension maximale du piézoélectrique.

ANNEXE B

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier : FTIR

B.1 Le principe expérimental

Chaque liaison interatomique possède des fréquences de vibrations et de rotations qui lui sont propres et qui peuvent varier en fonction de l'environnement de la liaison. Typiquement, ces fréquences se situent dans la gamme infrarouge (entre 0 et 4000 cm^{-1}).

Le principe de base de la spectroscopie infrarouge vibrationnelle repose sur l'excitation des liaisons interatomiques par une onde électromagnétique polychromatique dans le domaine infrarouge. L'absorption du rayonnement par les molécules à des fréquences précises conduit à une diminution de l'intensité du signal mesuré. Nous travaillerons dans le domaine de l'infrarouge moyen de $2,5$ à $25\text{ }\mu\text{m}$ (4000 à 400 cm^{-1}).

Le principe des spectromètres à transformées de Fourier consiste à envoyer sur l'échantillon un faisceau modulé par un interféromètre de Michelson. Après avoir traversé l'échantillon mesuré, le faisceau atteint un détecteur qui enregistre l'interférogramme en fonction de la position du miroir mobile de l'interféromètre. La transformée de Fourier de ce signal fournit le spectre infrarouge en fonction du nombre d'onde.

Le spectromètre utilisé lors de ce travail est un modèle Equinox 55 de chez Bruker. La présence de fenêtres et d'une séparatrice en KBr impose une coupure à 400 cm^{-1} . Ceci permet une analyse sur une gamme de nombres d'onde comprise entre 400 et 4000 cm^{-1} .

Le spectromètre comporte un détecteur DTGS pour travailler en transmission. Pour éviter l'absorption venant des molécules d'eau atmosphériques, le compartiment est purgé à l'azote. Comme le détecteur peut travailler à température ambiante, cela présente l'avantage de pouvoir prendre des mesures sur une large gamme de temps. Ce détecteur n'a pas de coupure et les mesures s'effectuent réellement entre 400 et 4000 cm^{-1} . L'échantillon est placé à 45° par rapport à la direction du faisceau incident afin de pouvoir mesurer les liaisons perpendiculaires à la surface (voir figure B1 -(a)). Le faisceau traverse l'échantillon pour être ensuite mesuré par le détecteur situé à l'arrière.

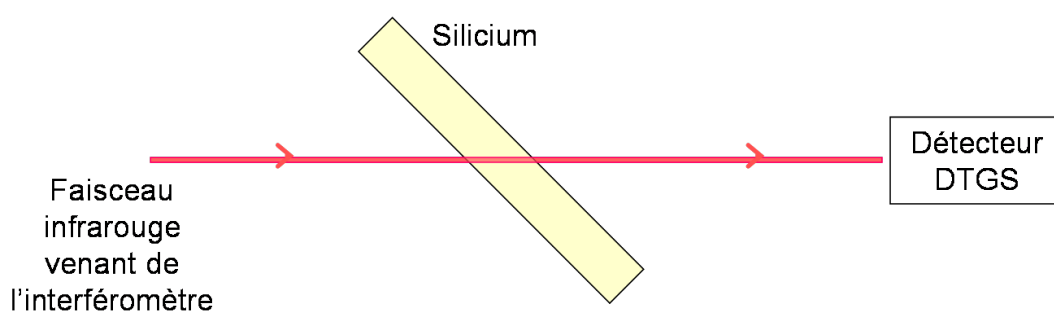
Le spectromètre a ensuite été modifié pour utiliser la géométrie en réflexions internes multiples : la réflexion totale atténuée ATR (Attenuated Total Reflexion). Cette technique présente l'avantage d'augmenter la sensibilité.

Le principe consiste à propager le faisceau infrarouge à l'intérieur du silicium dont l'indice est plus élevé que le milieu adjacent, par différentes réflexions sur les parois internes du cristal (voir figure B1 -(b)).

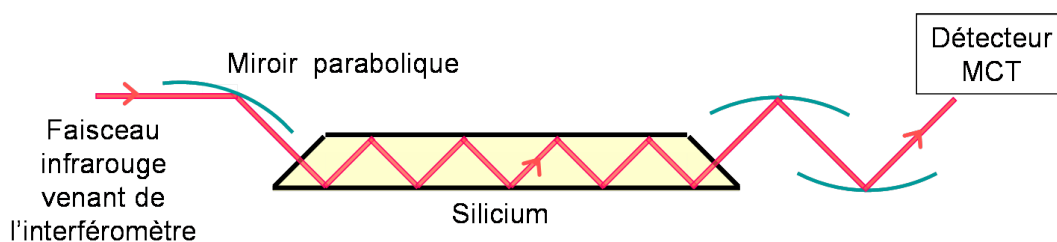
Les échantillons de silicium utilisés pour cette géométrie sont biseautés à 45° sur les deux bords par un polissage manuel. Un premier miroir parabolique permet de focaliser le faisceau provenant de l'interféromètre sur un des bords biseautés de l'échantillon. Après différentes réflexions internes, le faisceau infrarouge qui ressort du prisme de silicium est focalisé par deux autres miroirs paraboliques sur le détecteur.

Le nombre de réflexions à l'intérieur du prisme est donné par : $n = \frac{L}{e \tan \varphi}$, où L est la longueur du prisme, φ est l'angle d'incidence du faisceau par rapport au plan de la surface, e est l'épaisseur de l'échantillon de silicium. Ce nombre de réflexions dépend de l'angle du biseau (φ') par lequel entre le faisceau : on a $\varphi = \frac{\pi}{2} - \varphi'$. L'angle de chaque prisme est mesuré à l'aide d'un laser après leur polissage.

Dans le cas d'une mesure en géométrie ATR, le détecteur utilisé est un détecteur MCT (Mercure Cadmium Tellurure). Ce détecteur est une jonction p-n faite à base d'un semiconducteur à petit gap qu'il convient de refroidir à l'azote liquide avant utilisation. Le compartiment contenant le détecteur, les miroirs paraboliques ainsi que l'échantillon est purgé à l'azote pour éviter l'absorption des molécules d'eau atmosphériques.



(a) Géométrie en transmission



(b) Géométrie en ATR

FIG. B1 – Schémas des échantillons de silicium pour les mesures en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. (a) Schéma des mesures FTIR en transmission. (b) Schéma des mesures FTIR en géométrie ATR.

L'azote qui refroidit le détecteur doit être renouvelé périodiquement, ceci impose de purger à nouveau le compartiment. Il n'est donc pas possible de faire des mesures successives sur une large gamme temporelle (pas plus de 12 heures sans renouveler l'azote). D'autre part, le détecteur MCT présente une coupure autour de 800 cm^{-1} et le silicium coupe vers $900\text{-}950\text{ cm}^{-1}$, les spectres infrarouges sont donc analysables sur une gamme de nombres d'onde comprise entre 950 et 4000 cm^{-1} .

Les échantillons de silicium d'une épaisseur de $500\text{ }\mu\text{m}$ sont polis et fonctionnalisés sur les deux faces. Le silicium utilisé est de type FZ ("Float Zone") ce qui permet de n'avoir qu'une faible quantité d'oxygène dans le silicium et de ne pas être gêné par une vibration autour de 1100 cm^{-1} correspondant à l'absorption des défauts d'oxygène interstitiel dans le silicium.

Un spectre est obtenu par une accumulation d'environ 300 scans de l'interféromètre avec une résolution de 4 cm^{-1} et qui sont ensuite moyennés. Lorsque les mesures sont effectuées en polarisation, un polariseur placé avant l'échantillon est alternativement positionné en polarisation s et p. En polarisation s, le champ électrique de l'onde est dans le plan de la surface. Cela permet de sonder les composantes des dipôles parallèles à la surface. En polarisation p, le champ électrique de l'onde est dans le plan d'incidence. Cela permet de sonder les composantes des dipôles parallèles et perpendiculaires à la surface.

Les principales vibrations observées sur les spectres infrarouges lors de ce travail sont :

- de 1000 à 1650 cm^{-1} : les vibrations de déformation des liaisons C-H, N-H, O-H et les vibrations d'élongation des liaisons C-N, C-O, C-C et Si-O,
- de 1600 à 1850 cm^{-1} : les vibrations d'élongation des liaisons C=O et C=C,
- de 2070 à 2250 cm^{-1} : les vibrations d'élongation de la liaison Si-H,
- de 2500 à 3700 cm^{-1} : les vibrations d'élongation des groupements O-H, C-H et N-H.

Cette technique de géométrie ATR en polarisation s et p permet l'étude quantitative de la densité surfacique de molécules greffées.

B.2 Calibration de la mesure

Pour connaître la densité de molécules greffées sur la surface, il convient avant tout de connaître l'adsorption infrarouge par molécule. Le principe consiste à mesurer l'intensité de l'absorption infrarouge d'une solution contenant une quantité de molécules connue. Ensuite, en analysant l'intégrale des pics d'absorption sur le spectre d'une surface, on peut connaître la densité de molécules greffées [Faucheux et al., 2006].

La géométrie de l'expérience est celle décrite par la figure B2.

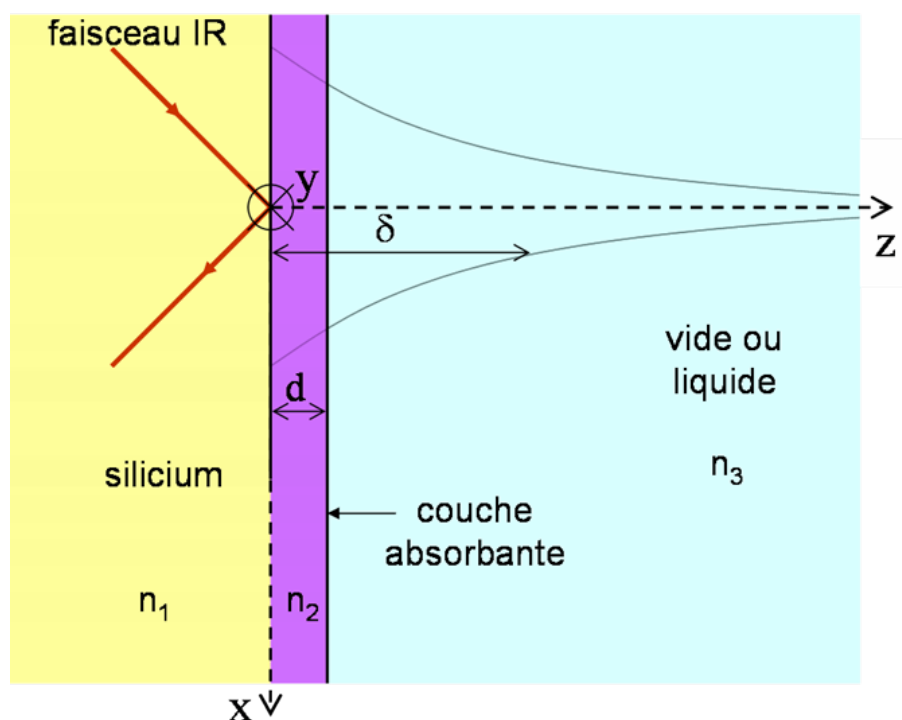


FIG. B2 – Schéma de l'expérience en géométrie ATR : le faisceau infrarouge se propage dans le silicium d'indice de réfraction $n_1 = 3,42$. L'onde évanescente qui est formée à l'interface ne produit aucune perte d'intensité du faisceau sauf si le milieu au sein duquel elle se forme est absorbant. C'est le cas en présence d'une couche moléculaire d'épaisseur d et dont la fonction diélectrique est n_2 . Dans ce cas, le milieu adjacent d'indice de réfraction n_3 est supposé non absorbant. Lors des expériences de calibration, il n'y a pas de couche interfaciale ($d = 0$), mais le milieu adjacent (d'indice complexe $n_3 - ik_3$) est absorbant.

La calibration des groupements CH_2 est effectuée dans une solution de dodécane $[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3]$ pour laquelle la concentration en groupements méthylènes CH_2 vaut $2,65 \cdot 10^{22} \text{ cm}^{-3}$. Les groupements esters sont calibrés avec une solution d'undécanoate d'éthyle $[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3]$ dilué à 1% dans du dodécane. La concentration en groupements esters est de $2,407 \cdot 10^{19} \text{ cm}^{-3}$. L'indice de réfraction du milieu liquide considéré est celui du dodécane, $n_3 = 1,42$.

Cas d'une surface greffée

Dans l'hypothèse où l'épaisseur d de la couche absorbante de surface est bien inférieure aux autres longueurs caractéristiques du problème, on peut linéariser les expressions de la réflectivité. L'absorption de la couche est donnée par [Chabal, 1988] :

$$abs_s = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{1}{n_1 \cos \varphi} I_y(\epsilon''_y d) \quad (\text{B1})$$

$$abs_p = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{1}{n_1 \cos \varphi} \left[I_x(\epsilon''_x d) + I_z \frac{n_3^4}{\epsilon''_z{}^2 + \epsilon''_z{}^2} (\epsilon''_z d) \right] \quad (\text{B2})$$

où ϵ' et ϵ'' sont respectivement les parties réelle et imaginaire de la fonction diélectrique n_2 , φ est l'angle d'incidence du faisceau infrarouge, n_1 est l'indice du silicium et n_3 est l'indice du milieu adjacent. I_x , I_y et I_z sont des coefficients sans dimension qui caractérisent l'intensité du champ électrique à la surface dans les trois directions x, y et z. Ils sont donnés par :

$$I_x = \frac{4n_1^2 \cos^2 \varphi (n_1^2 \sin^2 \varphi - n_3^2)}{n_3^4 \cos^2 \varphi + n_1^4 \sin^2 \varphi - n_1^2 n_3^2} \quad (\text{B3})$$

$$I_y = \frac{4n_1^2 \cos^2 \varphi}{n_1^2 - n_3^2} \quad (\text{B4})$$

$$I_z = \frac{4n_1^4 \sin^2 \varphi \cos^2 \varphi}{n_3^4 \cos^2 \varphi + n_1^4 \sin^2 \varphi - n_1^2 n_3^2} \quad (\text{B5})$$

Dans la plupart de nos mesures d'une couche greffée sur du silicium, l'angle d'incidence mesuré du faisceau infrarouge φ est de 47° (pour une valeur nominale de 45°). L'indice n_1 du silicium est de 3,42 et l'indice n_3 du milieu adjacent est de 1. On obtient alors les coefficients suivants :

$$I_x = 1,85$$

$$I_y = 2,03$$

$$I_z = 2,20$$

Cas de la mesure du liquide

La mesure de calibration permet de déterminer l'absorption du liquide, définie par la perte d'intensité réfléchie (pour une réflexion) par rapport à la réflexion totale (sans absorption). Dans ce cas, la configuration de l'interface est plus simple que dans la figure B2 car il n'y a pas de couche interfaciale. En revanche, le milieu adjacent est absorbant et son indice \tilde{n}_3 est complexe ($\tilde{n}_3 = n_3 - ik_3$). Dans le cas où k_3 est suffisamment faible ($k_3 \leq 0,1$), la profondeur de pénétration (δ) du champ électrique est peu affectée par l'adsorption. La valeur de δ est alors :

$$\delta = \frac{\lambda}{2\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \varphi - n_2^2}} \quad (\text{B6})$$

où λ est la longueur d'onde d'absorption du mode vibrationnel considéré. Dans notre cas, les modes calibrés sont les modes d'élongation symétriques des CH_2 autour de 2850 cm^{-1} ou les modes d'élongations symétriques des C=O des esters autour de 1740 cm^{-1} . On obtient alors les longueurs :

$$\begin{aligned} \delta &= 2,708 \cdot 10^{-5} \text{ cm} \quad \text{autour de } 2854 \text{ cm}^{-1} \\ \delta &= 4,433 \cdot 10^{-5} \text{ cm} \quad \text{autour de } 1743 \text{ cm}^{-1} \end{aligned}$$

Dans ce cas, les coefficients qui caractérisent l'intensité du champ à l'interface sont différents que dans le cas d'une surface greffée. On note I_x^0 , I_y^0 et I_z^0 dans le cas de l'interface silicium/dodécane. L'undécanoate d'éthyle est fortement dilué dans le dodécane, l'indice de la solution varie donc très peu par rapport à celui d'une solution de dodécane pur. Les indices I_x^0 , I_y^0 et I_z^0 sont donc les mêmes pour les deux solutions. Avec un angle φ de 47° , l'indice n_1 du silicium égal à 3,42 et l'indice n_3 de la solution égal à 1,42, on obtient les coefficients :

$$\begin{aligned} I_x^0 &= 1,80 \\ I_y^0 &= 2,25 \\ I_z^0 &= 2,64 \end{aligned}$$

Pour un milieu adjacent semi-infini, l'absorption du liquide en polarisation s et p est donnée par :

$$abs_s^0 = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{1}{n_1 \cos \varphi} I_y^0 2n_3 k_3 \frac{\delta}{2} \quad (\text{B7})$$

$$abs_p^0 = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{1}{n_1 \cos \varphi} (I_x^0 + I_z^0) 2n_3 k_3 \frac{\delta}{2} \quad (\text{B8})$$

Relation entre la mesure du liquide et la surface greffée

Pour caractériser l'orientation des dipôles dynamiques par rapport à la surface, on peut définir deux populations : N_{\perp} et N_{\parallel} . N_{\parallel} (respectivement N_{\perp}) est le nombre équivalent d'oscillateurs correspondant à la projection de tous les dipôles dynamiques dans le plan de la surface (respectivement sur la normale à la surface). Si N est le nombre total de vibreurs par unités de surface, comme l'absorption infrarouge est proportionnelle au carré du dipôle dynamique, on a : $N = N_{\parallel} + N_{\perp}$. Pour un milieu isotrope, on a la relation : $N_{\perp} = \frac{N_{\parallel}}{2} = \frac{N}{3}$.

À ce stade, nous devons supposer deux hypothèses :

- le coefficient d'absorption du mode considéré est proportionnel à la concentration volumique (C) des vibreurs dans la couche greffée comme dans le liquide. Le coefficient de proportionnalité est le même dans la couche greffée et dans la solution.
- la réponse diélectrique réelle de la couche greffée est isotrope et identique à celle du liquide ($\sqrt{\epsilon'_x} \approx \sqrt{\epsilon'_y} \approx \sqrt{\epsilon'_z} \approx n_3$)

Dans ces conditions, on peut alors écrire que :

$$\frac{N_{\perp}/d}{C/3} = \frac{\epsilon''_z}{\sqrt{\epsilon'_z}} \frac{1}{2k_3} \quad (\text{B9})$$

$$\frac{N_{\parallel}/2d}{C/3} = \frac{\epsilon''_{x,y}}{\sqrt{\epsilon'_{x,y}}} \frac{1}{2k_3} \quad (\text{B10})$$

En remplaçant l'expression B9 dans l'équation B1, on obtient l'expression de l'absorption en polarisation s :

$$abs_s = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{1}{n_1 \cos \varphi} \frac{6n_3 k_3}{C} I_y \frac{N_{\parallel}}{2} \quad (\text{B11})$$

En faisant le rapport membre à membre des équations B11 et B7, on obtient :

$$\frac{abs_s}{abs_s^0} = \frac{I_y}{I_y^0} \frac{3}{C} \frac{N_{\parallel}}{\delta} \quad (\text{B12})$$

d'où :

$$N_{\parallel} = \frac{abs_s I_y^0 C}{abs_s^0 I_y} \frac{C}{3} \delta \quad (\text{B13})$$

Nous avons évalué expérimentalement l'aire des pics associés aux vibreurs en polarisation s et en polarisation p. Nous définissons alors :

$$Abs = \int abs(\nu) d\nu$$

L'expression B13 devient alors :

$$N_{\parallel} = \frac{Abs_s I_y^0 C}{Abs_s^0 I_y} \frac{C}{3} \delta \quad (\text{B14})$$

Par un calcul similaire, il est possible d'obtenir N_{\perp} :

$$N_{\perp} = \frac{C}{3} \frac{\delta}{2} \frac{I_y^0}{I_y} \frac{I_y Abs_p - I_x Abs_s}{Abs_s^0 (I_z \frac{1}{\epsilon_z^2})} \quad (\text{B15})$$

On détermine $Abs_s^0(\text{CH}_2)=1,549 \text{ cm}^{-1}$ et $Abs_s^0(\text{C=O})=0,036 \text{ cm}^{-1}$ expérimentalement (pour une solution à 1% d'undécanoate d'éthyle dans du dodécane). On en déduit alors :

$$N_{\parallel} = 1,1.10^{16}.Abs_s \quad (\text{B16})$$

$$N_{\perp} = 1,0.10^{16}.(2,03.Abs_p - 1,85.Abs_s), \text{ pour les C=O} \quad (\text{B17})$$

et :

$$N_{\parallel} = 1,7.10^{17}.Abs_s \quad (\text{B18})$$

$$N_{\perp} = 1,6.10^{17}.(2,03.Abs_p - 1,85.Abs_s), \text{ pour les CH}_2 \quad (\text{B19})$$

ANNEXE C

Silanisation des tubes

La plupart des expériences de biochimie effectuées lors de ce travail ont été faites dans des conditions très diluées en molécules d'ADN et spécialement en ADN simple brin.

D'autre part, l'ADN est souvent manipulé dans des solutions riches en sels et une partie de ce travail porte sur l'étude de l'ADN dans des solutions à grande concentration en sels (monovalents, divalents ou trivalents).

Ces deux paramètres combinés conduisent de façon significative à l'adsorption de façon non spécifique de l'ADN sur les parois des tubes. Les tubes utilisés sont pourtant déjà traités pour éviter cette adsorption (tubes Eppendorf de qualité "low binding"). Il convient tout de même de silaniser tous les tubes servant à la manipulation d'ADN (tubes Eppendorf et Falcon).

Une solution de 2% diméthylchlorosilane dans (1,1,1)-trichloroéthane (BDH) est disposée dans chaque tube. Les tubes sont ensuite laissés à incuber pendant au moins 6 heures. La solution de silane est ensuite enlevée. Les tubes sont rincés à l'aide d'une solution tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) à pH 7,5, et laissés à sécher.

ANNEXE D

Marquage radioactif au ^{32}P Phosphore

Lors de ce travail, nous avons utilisé différents types de molécules d'ADN marquées radioactivement :

- de l'ADN simple brin de 118 bases synthétisé par MWG,
- de l'ADN double brin de 300 paires de bases obtenu par amplification PCR (voir paragraphe E),
- de l'ADN ϕX174 virion de 5386 bases, circulaire obtenu chez New England Biolabs.

Le marquage radioactif tel que nous l'avons pratiqué consiste à incorporer un isotope du phosphore (^{32}P) à l'extrémité 5' de chaque molécule d'ADN. Il convient pour cela d'utiliser un ADN linéaire dont le phosphate 5' est accessible. Pour l'ADN ϕX174 virion qui n'est pas linéaire, il est nécessaire dans un premier temps de le linéariser.

D.1 Linéarisation du ϕX174 virion

Certaines enzymes de restriction sont capables de reconnaître une séquence spécifique de double brin d'ADN et de couper la molécule au niveau de cette séquence. Pour linéariser l'ADN ϕX174 , nous avons choisi une enzyme de restriction (StuI) pour laquelle un site unique existe dans la séquence de la molécule. Cette enzyme a un bon rendement et coupe de façon nette la séquence d'ADN (extrémités non cohésives).

Un oligodeoxynucléotide synthétique d'une longueur de 18 bases (5'-TAGTGGAGGCCTCCAGCA-3') et qui englobe la séquence reconnue par *StuI* est obtenu chez MWG. Ce fragment d'ADN correspond à la séquence complémentaire des nucléotides 4480 à 4497 de l'ADN simple brin du phage ϕX174 (la position du site de restriction est 4488).

Le fragment d'ADN de 18 bases est renaturé avec l'ADN circulaire du ϕX174 . Pour cela, une solution de 50 μl d'ADN ϕX174 et de fragments est préparée dans du tampon 1x NEB 2 (New England Biolabs) dans une proportion d'environ 1000 fragments pour une chaîne de ϕX174 . La solution est constituée de :

- 40 μl de ϕX174 ($4,4 \cdot 10^{-15}$ moles de chaînes)
- 1 μl de fragments de 18 bases ($5,5 \cdot 10^{-12}$ moles de chaînes)
- 5 μl de tampon NEB 2
- 4 μl d'eau

La solution est ensuite chauffée à 98°C pendant 3 minutes pour éliminer les éventuelles structures secondaires de l'ADN simple brin du ϕX174 . Elle est ensuite laissée à refroidir pendant 12 à 16 heures.

Une fois que les fragments de 18 bases ont pu se renaturer avec l'ADN simple brin ϕX174 , 80 unités de l'enzyme de restriction *StuI* sont ajoutées pour obtenir une solution de 200 μl . La solution est constituée de :

- 50 μl de ϕX174 renaturé avec les fragments
- 8 μl d'enzymes *StuI* (80 unités)
- 15 μl de tampon NEB 2
- 127 μl d'eau

Après 2 heures d'incubation à 37°C, l'ADN digéré est analysé par électrophorèse sur un gel d'agarose.

La figure D1 montre un gel d'électrophorèse d'ADN simple brin ϕX174 avant et après linéarisation. Le gel est un gel d'agarose à 1,2% en masse. L'ADN a migré à 150 V pendant 2h30 à une température de 4°C. L'ADN contenu dans le gel est ensuite coloré au bromure d'éthyldium.

Sur le gel d'agarose représenté sur la figure D1, le puits de gauche correspond à une solution d'ADN ϕX174 virion avant toute manipulation. Le fournisseur stipule que plus de 85% de l'ADN est circulaire. Une partie des chaînes est donc déjà linéaire, cela correspond à la bande du bas. La bande du haut correspond à l'ADN ϕX174 virion circulaire.

Le puits de droite correspond à une solution d'ADN ϕX174 virion après 2 heures de digestion par l'enzyme *StuI*. On remarque que la bande correspondant à l'ADN

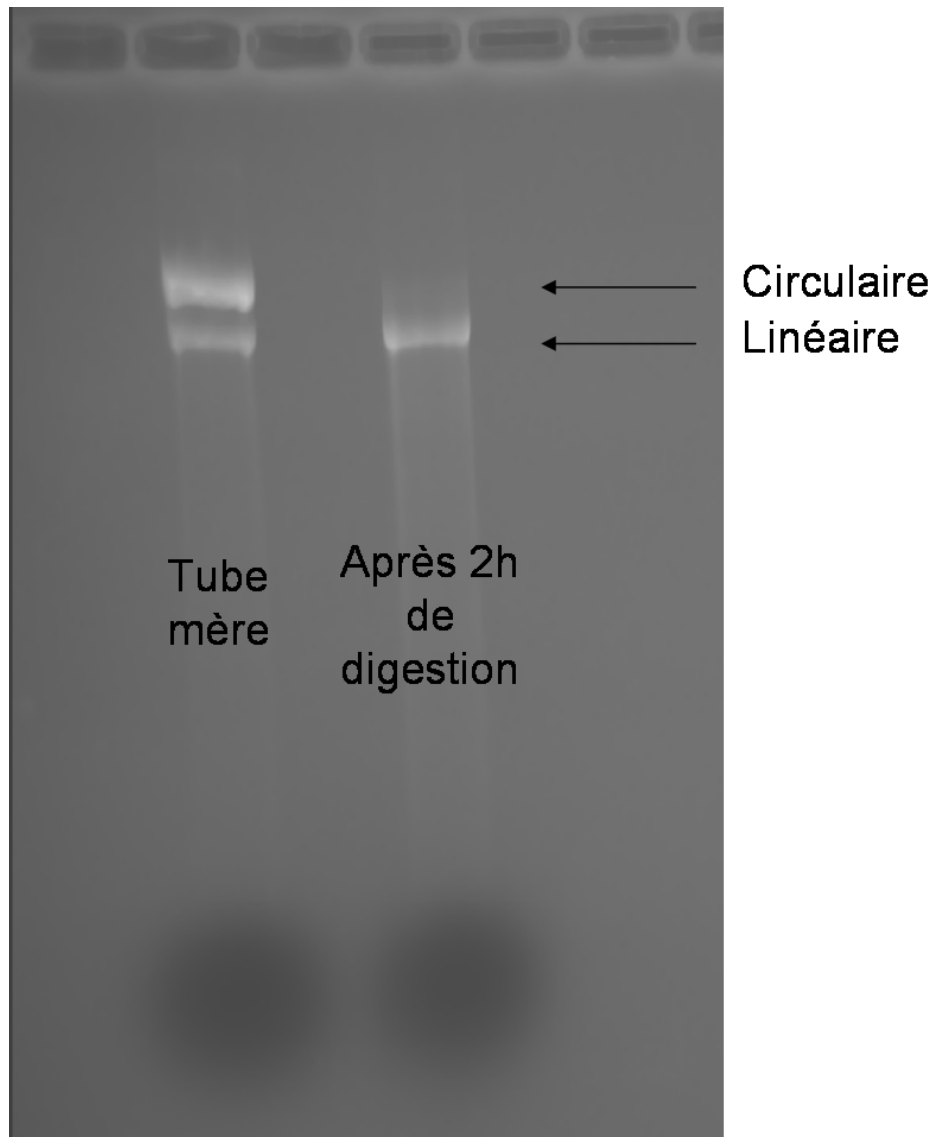


FIG. D1 – ADN ϕ X174 virion sur un gel d'agarose. Le puits de gauche correspond à une solution d'ADN ϕ X174 virion avant la linéarisation. Le puits de droite correspond à une solution d'ADN ϕ X174 virion après 2 heures de digestion.

ϕ X174 virion circulaire (la bande la plus haute) n'est plus visible. L'analyse du gel de la figure D1 montre que l'ADN simple brin ϕ X174 virion initialement circulaire à plus de 85% a été complètement linéarisé.

D.2 Marquage au ^{32}P

Il convient dans un premier temps d'enlever le groupement phosphate 5'-terminal des molécules d'ADN à marquer (mis à part pour l'ADN de synthèse : le 5'-terminal n'existe pas sur l'ADN simple brin de 118 bases). Cette étape de déphosphorylation s'effectue à l'aide de l'enzyme CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) fournie par New England Biolabs. Une solution d'ADN en présence de CIP est incubé à 37°C pendant 1 heure. La solution est ensuite purifiée à l'aide d'un kit de purification de PCR provenant de chez Sigma (Sigma PCR Clean Kit), de façon à séparer l'ADN des enzymes présentes dans la solution.

L'ADN dont le phosphate 5'-terminal a été enlevé est ensuite marqué par kination en présence de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. L'enzyme qui permet la kination est la kinase T4 fournie par New England Biolabs (NEB). Cette étape consiste à incorporer un phosphate radioactif présent dans la solution au bout de la chaîne d'ADN. Pour cela, la solution d'ADN est incubée pendant 1 heure à 37°C dans le tampon fourni par NEB, en présence de la kinase T4 et du $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP ($>5000 \text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$) fourni par Amersham Pharmacia Biotech. La solution est ensuite purifiée à l'aide d'un kit de purification de PCR provenant de chez Sigma (Sigma PCR Clean Kit), de façon à séparer le $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP et les enzymes des molécules d'ADN.

Le rendement du marquage radioactif

Le marquage radioactif tel que nous le pratiquons permet d'incorporer un seul $\gamma^{32}\text{P}$ par extrémité 5'. Cela correspond à 2 phosphates par chaîne d'ADN double brin et un seul par chaîne d'ADN simple brin. Si le taux d'incorporation est de 100%, toutes les molécules sont marquées. En pratique, le taux d'incorporation n'est jamais de 100% mais en revanche, on peut le calculer.

Soit V le volume total de la solution d'ADN fraîchement marqué. La concentration en chaînes de cette solution en ADN est notée C . Le nombre total de moles de chaînes n contenu dans la solution est : $n = C \times V$.

L'activité du $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP donnée par le fournisseur est de $6000 \text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$. Si toutes les chaînes avaient été marquées, l'activité (en Ci) contenue dans le tube serait de : $A_{totale} = 6000 \times n \times 10^{-3}$.

On prélève $2 \mu\text{l}$ de la solution marquée dont on compte l'activité radioactive par effet Cerenkov. On obtient un nombre de coups par minute noté C_p . On rapporte cette activité au volume total du tube : $C_{p_{total}} = C_p \times V/2$, que l'on convertit ensuite en Ci ($1 \text{ Ci} = 2,22 \cdot 10^{-12} \text{ cpm}$). On obtient ainsi l'activité réelle contenue dans le tube, notée $A_{réelle}$.

Le rapport $A_{réelle}/A_{totale}$ correspond au taux d'incorporation.

ANNEXE E

Protocole de l'amplification par PCR

E.1 Le principe de l'amplification par PCR

La technique d'amplification d'ADN par PCR (PCR est sigle anglais de Polymerase Chain Reaction) permet d'obtenir du matériel génétique en grande quantité à partir d'une séquence d'ADN choisie (matrice). Le principe est montré sur la figure E1.

L'amplification par PCR consiste à imposer à une solution contenant l'ADN double brin à amplifier, des amorces, des enzymes et des dNTPs nucléotides A, T, G et C, une série de cycles de variations de température.

La première étape d'un cycle consiste à chauffer la solution à 98°C pour dénaturer complètement l'ADN double brin à amplifier, afin de n'avoir que de l'ADN simple brin en solution (étape 1 sur la figure E1).

La deuxième étape consiste à descendre la température de la solution jusqu'à la température d'appariement des amorces sur l'ADN. Les amorces sont des courtes séquences d'ADN simple brin correspondant à la séquence complémentaire des extrémités 3' de l'ADN à amplifier (étape 2 sur la figure E1).

La troisième étape consiste à polymériser les dNTPs en solution le long de la chaîne d'ADN à l'aide d'une enzyme polymérase (étape 3 sur la figure E1). Cette enzyme qui travaille à 72°C, reconnaît l'extrémité 3' de l'amorce appairée et

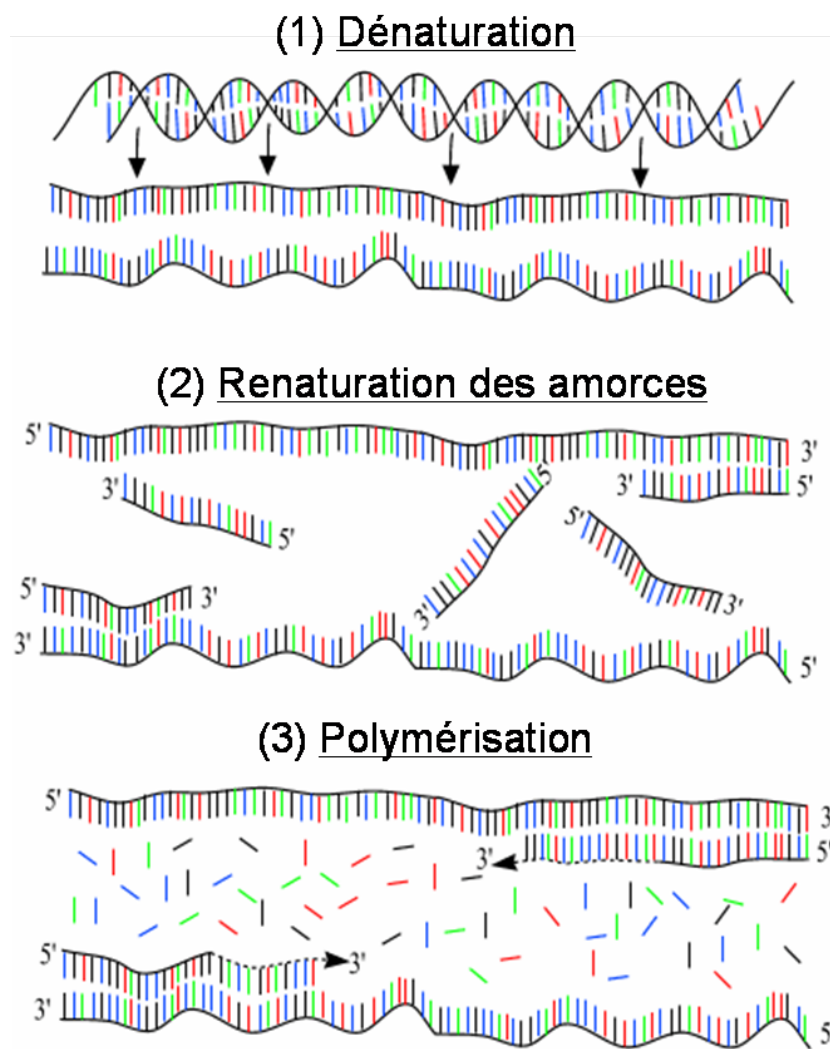


FIG. E1 – Schéma du principe d'un cycle d'amplification d'ADN par PCR.

permet d'y polymériser les dNTPs.

L'amplification du nombre de molécules dans la solution est exponentielle ($[ADN]_{finale} = 2^n \times [ADN]_{initiale}$ où n est le nombre de cycles) tant que les amorces, les enzymes et les dNTPs sont en excès par rapport à la matrice. Dans ce cas, ce qui limite la quantité d'ADN produit est le nombre de cycles. Ce nombre est limité par la durée de vie de l'enzyme polymérase qui se détériore au fur et à mesure des changements de température.

E.2 Amplification d'une séquence de 300 paires de bases

L'ADN que nous avons utilisé comme matrice est le ϕ X174 RFI provenant de chez New England Biolabs. La séquence amplifiée correspond aux nucléotides 176 à 469 du ϕ X174¹.

Les amorces que nous utilisons sont des molécules de synthèse (MWG) d'une trentaine de bases et dont la séquence est complémentaire des 30 bases des extrémités de la séquence à amplifier sur la matrice. La température d'appariement de ces amorces avec la matrice est de l'ordre de 65°C. L'enzyme utilisée est la Taq polymérase fournie avec sa solution tampon par New England Biolabs.

Le protocole de l'amplification consiste à :

- 2 minutes à 98°C pour tout dénaturer
- 30 cycles
- 10 minutes à 72°C pour finir de polymériser les chaînes partiellement complètes
- 1h30 à 4°C pour arrêter la polymérisation.

Chaque cycle correspond à :

- 30 secondes à 96°C
- 30 secondes à 60°C pour renaturer les amorces
- 1 minute à 72°C pour polymériser.

¹5'-ACTTTGCGACCTTTCGCCATCAACTAACGATTCTGTCAAAAAC TG-
ACGCGTTGGATGAGGAGAAGTGGCTTAATATGCTTGGCACGTTTCGTCAAG-
GACTGGTTTAGATATGAGTCACATTTTGTTTCATGGTAGAGATTCTCTTGT-
TGACATTTTAAAAGAGCGTGGATTACTATCTGAGTCCGATGCTGTTCAAC-
CACTAATAGGTAAGAAATCATGAGTCAAGTTACTGAACAATCCGTACGTT-
TCCAGACCGCTTGGCCTCTATTAAGCTCATTCAGGCTTCTGCCGTTTT-3'

Bibliographie

- [Abelès, 1948] Abelès, F. (1948). Sur la propagation des ondes électromagnétiques dans les milieux stratifiés. *Annales de Physique*, 3, 504–520.
- [Adam & Delbrück, 1968] Adam, G. & Delbrück, M. (1968). Reduction of dimensionality in biological diffusion processes. In A. Rich & D. N. (Eds.), *Structural Chemistry and Molecular Biology* (pp. 198–215). Freeman, W. H. & Company, San Francisco.
- [Adam, 1941] Adam, N. K. (1941). *The Physics and Chemistry of Surfaces*. London : Oxford University Press, 3 edition.
- [Alberts et al., 2002] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York : Garland Science Publishing, fourth edition.
- [Allongue et al., 2003] Allongue, P., Henry de Villeneuve, C., Cherouvrier, G., Cortes, R., & Bernard, M. C. (2003). Phenyl layers on H-Si(111) by electrochemical reduction of diazonium salts : Monolayer versus multilayer formation. *J. Electroanal. Chem.*, 550, 161–174.
- [Allongue et al., 1998] Allongue, P., Henry de Villeneuve, C., Pinson, J., Ozanam, F., Chazalviel, J.-N., & Wallart, X. (1998). Organic monolayers on Si(111) by electrochemical method. *Electrochim. Acta*, 43(19-20), 2791–2798.
- [Allongue et al., 1995] Allongue, P., Kieling, V., & Gerischer, H. (1995). Etching mechanism and atomic-structure of H-Si(111) surfaces prepared in NH_4F . *Electrochim. Acta*, 40(10), 1353–1360.
- [Ashkin, 1970] Ashkin, A. (1970). Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys. Rev. Lett.*, 24, 156–159.
- [Bansal & Lewis, 1998] Bansal, A. & Lewis, N. S. (1998). Stabilization of Si photoanodes in aqueous electrolytes through surface alkylation. *J. Phys. Chem. B*, 102(21), 4058–4060.
- [Bansal et al., 1996] Bansal, A., Li, X. L., Lauermann, I., Lewis, N. S., Yi, S. I., & Weinberg, W. H. (1996). Alkylation of Si surfaces using a two-step halogenation Grignard route. *J. Am. Chem. Soc.*, 118(30), 7225–7226.
- [Bateman et al., 1998] Bateman, J. E., Eagling, R. D., Worrall, D. R., Horrocks, B. R., & Houlton, A. (1998). Alkylation of porous silicon by direct reaction with alkenes and alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37(19), 2683–2685.

- [Bates & Maxwell, 1993] Bates, A. D. & Maxwell, A. (1993). *DNA Topology*. Oxford : Oxford University Press.
- [Beckmann & Spizzichino, 1963] Beckmann, P. & Spizzichino, A. (1963). *The Scattering of Electromagnetic Waves from Rough Surfaces*. MacMillan.
- [Bensimon et al., 1994] Bensimon, A., Simon, A., Chiffaudel, A., Croquette, V., Heslot, F., & Bensimon, D. (1994). Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science*, 265(5181), 2096–2098.
- [Binnig et al., 1986] Binnig, G., Quate, C. F., & Gerber, C. (1986). Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 56(9), 930–933.
- [Bloomfield, 1997] Bloomfield, V. A. (1997). DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers*, 44(3), 269–282.
- [Bloomfield et al., 1974] Bloomfield, V. A., Crothers, D. M., & Tinoco Jr, I. (1974). *Physical Chemistry of Nucleic Acids*. New York : Harper and Row.
- [Bloomfield et al., 2000] Bloomfield, V. A., Crothers, D. M., & Tinoco Jr, I. (2000). *Nucleic Acids. Structure, Properties and Functions*. Sausalito : University Science Books.
- [Bodanszky, 1985] Bodanszky, M. (1985). In search of new methods in peptide-synthesis a review of the last 3 decades. *Int J Pept Protein Res*, 25(5), 449–474.
- [Borochoy & Eisenberg, 1984] Borochoy, N. & Eisenberg, H. (1984). Conformation of LiDNA in solutions of LiCl. *Biopolymers*, 23(9), 1757–1769.
- [Boukherroub, 2005] Boukherroub, R. (2005). Chemical reactivity of hydrogen-terminated crystalline silicon surfaces. *Current Opinion In Solid State & Materials Science*, 9(1-2), 66–72.
- [Boukherroub et al., 1999] Boukherroub, R., Morin, S., Bensebaa, F., & Wayner, D. D. M. (1999). New synthetic routes to alkyl monolayers on the Si(111) surface. *Langmuir*, 15(11), 3831–3835.
- [Boukherroub & Wayner, 1999] Boukherroub, R. & Wayner, D. D. M. (1999). Controlled functionalization and multistep chemical manipulation of covalently modified Si(111) surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, 121(49), 11513–11515.
- [Braslau et al., 1988] Braslau, A., Pershan, P. S., Swislow, G., Ocko, B., & Als-Nielsen, J. (1988). Capillary waves on the surface of simple liquids measured by X-ray reflectivity. *Phys. Rev. A*, 38(5), 2457–2470.
- [Burak et al., 2003] Burak, Y., Ariel, G., & Andelman, D. (2003). Onset of DNA aggregation in presence of monovalent and multivalent counterions. *Biophys. J.*, 85(4), 2100–2110.
- [Buriak, 2002] Buriak, J. M. (2002). Organometallic chemistry on silicon and germanium surfaces. *Chem. Rev.*, 102 (5), 1271.

- [Buriak & Allen, 1998] Buriak, J. M. & Allen, M. J. (1998). Lewis acid mediated functionalization of porous silicon with substituted alkenes and alkynes. *J. Am. Chem. Soc.*, 120(6), 1339–1340.
- [Buriak et al., 1999] Buriak, J. M., Stewart, M. P., Geders, T. W., Allen, M. J., Choi, H. C., Smith, J., Raftery, D., & Canham, L. T. (1999). Lewis acid mediated hydrosilylation on porous silicon surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, 121(49), 11491–11502.
- [Burrows et al., 1988] Burrows, V. A., Chabal, Y. J., Higashi, G. S., Raghavachari, K., & Christman, S. B. (1988). Infrared-spectroscopy of Si(111) surfaces after HF treatment hydrogen termination and surface-morphology. *Appl. Phys. Lett.*, 53(11), 998–1000.
- [Cantor & Schimmel, 1980] Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980). *Biophysical Chemistry. Part III. The Behavior of Biological Macromolecules*. New York : W. H. Freeman and Company.
- [Caruso et al., 1997] Caruso, F., Rodda, E., Furlong, D. F., Niikura, K., & Okahata, Y. (1997). Quartz crystal microbalance study of DNA immobilization and hybridization for nucleic acid sensor development. *Anal. Chem.*, 69(11), 2043–2049.
- [Chabal, 1988] Chabal, y. j. (1988). Surface infrared-spectroscopy. *Surf. Sci. Rep.*, 8(5-7), 211–357.
- [Chabal et al., 1989] Chabal, Y. J., Higashi, G. S., Raghavachari, K., & Burrows, V. A. (1989). Infrared-spectroscopy of Si(111) and Si(100) surfaces after HF treatment hydrogen termination and surface-morphology. *J. Vac. Sci. Technol. A*, 7(3), 2104–2109.
- [Chaperon, 1999] Chaperon, I. (1999). *Étude de la condensation et de la renaturation de l'ADN*. PhD thesis, Université Paris-Sud.
- [Chaperon & Sikorav, 1998] Chaperon, I. & Sikorav, J. L. (1998). Renaturation of condensed DNA studied through a decoupling scheme. *Biopolymers*, 46(4), 195–200.
- [Cicero et al., 2000] Cicero, R. L., Linford, M. R., & Chidsey, C. E. D. (2000). Photoreactivity of unsaturated compounds with hydrogen-terminated silicon(111). *Langmuir*, 16(13), 5688–5695.
- [Cohen & Eisenberg, 1968] Cohen, G. & Eisenberg, H. (1968). Deoxyribonucleate solutions : Sedimentation in a density gradient, partial specific volumes, density and refractive index increments, and preferential interactions. *Biopolymers*, 6(8), 1077–1100.
- [CXRO, 2007] CXRO (2007). <http://www-cxro.lbl.gov/>.
- [daFonseca et al., 1996] daFonseca, C., Ozanam, F., & Chazalviel, J.-N. (1996). In situ infrared characterisation of the interfacial oxide during the anodic dissolution of a silicon electrode in fluoride electrolytes. *Surf. Sci.*, 365(1), 1–14.

- [Daillant et al., 2005] Daillant, J., Bellet-Amalric, E., Braslau, A., Charitat, T., Fragneto, G., Graner, F., Mora, S., Rieutord, F., & Stidder, B. (2005). Structure and fluctuations of a single floating lipid bilayer. *PNAS*, 102(33), 11639–11644.
- [de Gennes, 1979] de Gennes, P. G. (1979). *Scaling concepts in polymer physics*. Cornell University Press.
- [de la Cruz et al., 1995] de la Cruz, M. O., Belloni, L., Delsanti, M., Dalbiez, J. P., Spalla, O., & Drifford, M. (1995). Precipitation of highly-charged polyelectrolyte solutions in the presence of multivalent salts. *J. Chem. Phys.*, 103(13), 5781–5791.
- [Dubois et al., 1997] Dubois, T., Ozanam, F., & Chazalviel, J.-N. (1997). Stabilization of the porous silicon surface by grafting of organic groups : Direct electrochemical methylation. *Electrochem. Soc. Proc.*, 97, 296.
- [Edsall & Wyman, 1958] Edsall, J. T. & Wyman, J. (1958). *Biophysical Chemistry*. Academic Press, New York.
- [Effenberger et al., 1998] Effenberger, F., Gotz, G., Bidlingmaier, B., & Wezstein, M. (1998). Photoactivated preparation and patterning of self-assembled monolayers with 1-alkenes and aldehydes on silicon hydride surfaces. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37(18), 2462–2464.
- [Eickbush & Moudrianakis, 1977] Eickbush, T. H. & Moudrianakis, E. N. (1977). Mechanism for entrapment of DNA at an air-water-interface. *Biophys. J.*, 18(3), 275–288.
- [Eisenberg & Felsenfeld, 1967] Eisenberg, H. & Felsenfeld, G. (1967). Studies of temperature-dependent conformation and phase separation of polyriboadenylic acid solutions at neutral pH. *J. Mol. Biol.*, 30(1), 17.
- [Faucheux, 2005] Faucheux, A. (2005). *Nouvelles fonctionnalités de l'interface silicium/diélectrique pour la microscopie*. PhD thesis, Ecole Polytechnique.
- [Faucheux et al., 2006] Faucheux, A., Gouget-Laemmel, A. C., Henry de Villeneuve, C., Boukherroub, R., Ozanam, F., Allongue, P., & Chazalviel, J.-N. (2006). Well-defined carboxyl-terminated alkyl monolayers grafted onto H-Si(111) : Packing density from a combined AFM and quantitative IR study. *Langmuir*, 22(1), 153–162.
- [Felici, 1995] Felici, R. (1995). On the use of energy dispersive X-ray reflection to study the electronic density profile at surfaces and interfaces. *The Rigaku Journal*, 12(1), 11–17.
- [Felsenfeld & Miles, 1967] Felsenfeld, G. & Miles, H. T. (1967). Physical and chemical properties of nucleic acids. *Annu. Rev. Biochem.*, 36, 407.
- [Fick, 1855] Fick, A. (1855). Über diffusion. *Poggendorff's Annalen der Physik und Chemie*, 94, 59–86.
- [Fidélis et al., 2000] Fidélis, A., Ozanam, F., & Chazalviel, J.-N. (2000). Fully methylated, atomically flat (111) silicon surface. *Surf. Sci.*, 444(1-3), L7–L10.

- [Flidr et al., 1998] Flidr, J., Huang, Y. C., Newton, T. A., & Hines, M. A. (1998). Extracting site-specific reaction rates from steady surface morphologies : Kinetic monte carlo simulations of aqueous Si(111) etching. *J. Chem. Phys.*, 108(13), 5542–5553.
- [Frommer & Miller, 1968] Frommer, M. A. & Miller, I. R. (1968). Adsorption of DNA at air-water interface. *Journal of Physical Chemistry*, 72(8), 2862–2866.
- [Frontali et al., 1979] Frontali, C., Dore, E., Ferrauto, A., Gratton, E., Bettini, A., Pozzan, M. R., & Valdevit, E. (1979). An absolute method for the determination of the persistence length of native DNA from electron micrographs. *Biopolymers*, 18, 1353–1373.
- [Fukidome & Matsumura, 2000] Fukidome, H. & Matsumura, M. (2000). Effect of dissolved oxygen on etching process of Si(111) in 2.5% NH₃ solution. *Surf. Sci.*, 463(3), L649–L653.
- [Garrett, 2004] Garrett, B. C. (2004). Ions at air/water interface. *Science*, 303, 1146–1147.
- [Goldar & Sikorav, 2004] Goldar, A. & Sikorav, J. L. (2004). DNA renaturation at the water-phenol interface. *European Physical Journal E*, 14(3), 211–239.
- [Grabarek & Gergely, 1990] Grabarek, Z. & Gergely, J. (1990). Zero-length cross-linking procedure with the use of active esters. *Anal. Biochem.*, 185(1), 131–135.
- [Hamaker, 1937] Hamaker, H. C. (1937). The london-van der waals attraction between spherical particles. *Physica 4*, 10, 1058–172.
- [Hansma, 2001] Hansma, H. G. (2001). Surface biology of DNA by atomic force microscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 52, 71–92.
- [Hansma & Laney, 1996] Hansma, H. G. & Laney, D. E. (1996). DNA binding to mica correlates with cationic radius : Assay by atomic force microscopy. *Biophys. J.*, 70(4), 1933–1939.
- [Harrick & Beckmann, 1974] Harrick, N. J. & Beckmann, K. H. (1974). *Characterization of Solid Surfaces*. Plenum, New-York, klane,p. f. and larrabee, g. r. edition.
- [Henke et al., 1993] Henke, B. L., Gullikson, E. M., & Davis, J. C. (1993). X-ray interactions : Photoabsorption, scattering, transmission, and reflection at E=50-30000 Ev, Z=1-92. *Atomic Data and Nuclear Data Tables*, 54(2), 181–342.
- [Henry de Villeneuve et al., 1997] Henry de Villeneuve, C., Pinson, J., Bernard, M. C., & Allongue, P. (1997). Electrochemical formation of close-packed phenyl layers on Si(111). *J. Phys. Chem. B*, 101(14), 2415–2420.
- [Higashi et al., 1990] Higashi, G. S., Chabal, Y. J., Trucks, G. W., & Raghavachari, K. (1990). Ideal hydrogen termination of the si-(111) surface. *Appl. Phys. Lett.*, 56(7), 656–658.

- [Hodgman, 1957] Hodgman, C., Ed. (1957). *Handbook Of Chemistry And Physics*. Chemical Rubber Publishing co., thirty-ninth edition edition.
- [Holland et al., 1999] Holland, J. M., Stewart, M. P., Allen, M. J., & Buriak, J. M. (1999). Metal mediated reactions on porous silicon surfaces. *J. Solid State Chem.*, 147(1), 251–258.
- [ID10B, 2007] ID10B (2007). <http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Experiments-/SCMatter/ID10B/>.
- [Ikegami & Imai, 1962] Ikegami, A. & Imai, N. (1962). Precipitation of polyelectrolytes by salts. *Journal of Polymer Science*, 56(163), 133.
- [Israelachvili, 1974] Israelachvili, J. N. (1974). Van der waals forces in biological-systems. *Q. Rev. Biophys.*, 6(4), 341–387.
- [Israelachvili, 1992] Israelachvili, J. N. (1992). *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, London.
- [Izzo et al., 1975] Izzo, V. S., Forili, S., & L., C. (1975). Thermal denaturation of b-subtilis dna in h₂o and d₂o observed by electron-microscopy. *Nucleic Acids Res.*, 2, 1805–1810.
- [Jakob & Chabal, 1991] Jakob, P. & Chabal, Y. J. (1991). Chemical etching of vicinal Si(111) dependence of the surface-structure and the hydrogen termination on the pH of the etching solutions. *J. Chem. Phys.*, 95(4), 2897–2909.
- [Jakob et al., 1992] Jakob, P., Chabal, Y. J., Raghavachari, K., Becker, R. S., & Becker, A. J. (1992). Kinetic-model of the chemical etching of Si(111) surfaces by buffered HF solutions. *Surf. Sci.*, 275(3), 407–413.
- [Jary & Sikorav, 1999] Jary, D. & Sikorav, J. L. (1999). Cyclization of globular DNA. Implications for DNA-DNA interactions in vivo. *Biochemistry*, 38(11), 3223–3227.
- [Joanicot & Revet, 1987] Joanicot, M. & Revet, B. (1987). Dna conformational studies from electron microscopy. i. excluded volume effect and structure dimensionality. *Biopolymers*, 26(2), 315–326.
- [Johner & Joanny, 1991] Johner, A. & Joanny, J. F. (1991). Polymer adsorption in a poor solvent. *Journal de Physique II*, 1(2), 181–194.
- [Kaganer et al., 1999] Kaganer, V. M., Mohwald, H., & Dutta, P. (1999). Structure and phase transitions in langmuir monolayers. *Reviews of Modern Physics*, 71(3), 779–819.
- [Kahn & Smith, 1984] Kahn, M. E. & Smith, H. O. (1984). Transformation in hemophilus - a problem in membrane biology. *J. Membr. Biol.*, 81(2), 89–103.
- [Kasparian et al., 1997] Kasparian, J., Elwenspoek, M., & Allongue, P. (1997). Digital computation and in situ STM approach of silicon anisotropic etching. *Surf. Sci.*, 388(1-3), 50–62.

- [Katsura et al., 1998] Katsura, S., Hirano, K., Matsuzawa, Y., Yoshikawa, K., & Mizuno, A. (1998). Direct laser trapping of single dna molecules in the globular state. *Nucleic Acids Res.*, 26, 4943–4945.
- [Kiessig, 1931a] Kiessig, H. (1931a). Interferenz von röntgenstrahlen an dünnen schichten. *Annalen der Physik*, 402(6), 769–788.
- [Kiessig, 1931b] Kiessig, H. (1931b). Untersuchungen zur totalreflexion von röntgenstrahlen. *Annalen der Physik*, 402(6), 715–768.
- [Kohne et al., 1977] Kohne, D. E., Levison, S. A., & Byers, M. J. (1977). Room temperature method for increasing the rate of DNA reassociation by many thousandfold : the phenol emulsion reassociation technique. *Biochemistry*, 16(24), 5329–5341.
- [Kornberg & Baker, 1992] Kornberg, A. & Baker, T. A. (1992). *DNA Replication*. New York : W. H. Freeman and Co, second edition.
- [Larsson, 1988] Larsson, U. (1988). Polymerization and gelation of fibrinogen in d₂o. *Eur. J. Biochem.*, 174, 139–144.
- [Lin-Vien et al., 1991] Lin-Vien, D., Colthup, N. B., Fateley, W. G., & Grasselli, J. G. (1991). *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. Academic Press.
- [Linford & Chidsey, 1993] Linford, M. R. & Chidsey, C. E. D. (1993). Alkyl monolayers covalently bonded to silicon surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, 115(26), 12631–12632.
- [Linford et al., 1995] Linford, M. R., Fenter, P., Eisenberger, P. M., & Chidsey, C. E. D. (1995). Alkyl monolayers on silicon prepared from 1-alkenes and hydrogen-terminated silicon. *J. Am. Chem. Soc.*, 117(11), 3145–3155.
- [Liu et al., 2004] Liu, Y. J., Navasero, N. M., & Yu, H. Z. (2004). Structure and reactivity of mixed co-carboxyalkyl/alkyl monolayers on silicon : ATR-FTIR spectroscopy and contact angle titration. *Langmuir*, 20(10), 4039–4050.
- [MacGillavry & Rieck, 1983] MacGillavry, C. H. & Rieck, G. D., Eds. (1983). *International Tables for X-ray Crystallography*, volume III. D. Reidel Publishing Company, 2 edition.
- [Matulis et al., 2000] Matulis, D., Rouzina, I., & A., B. V. (2000). Thermodynamics of dna binding and condensation : Isothermal titration calorimetry and electrostatic mechanism. *J. Mol. Biol.*, 296, 1053–1063.
- [Michalet et al., 1997] Michalet, X., Ekong, R., Fougereuse, F., Rousseaux, S., Schurra, C., Hornigold, N., vanSlegtenhorst, M., Wolfe, J., Povey, S., Beckmann, J. S., & Bensimon, A. (1997). Dynamic molecular combing : stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science*, 277(5331), 1518–1523.
- [Moolenaar et al., 2001] Moolenaar, G. F., Hoglund, L., & Goosen, N. (2001). Clue to damage recognition by UvrB : residues in the beta-hairpin structure prevent binding to non-damaged DNA. *EMBO J.*, 20(21), 6140–6149.

- [Müller, 1928] Müller, A. (1928). A further x-ray investigation of long chain compounds (n-hydrocarbons). *Proc. Roy. Soc. A*, 120, 437–459.
- [Munford et al., 2001] Munford, M. L., Cortes, R., & Allongue, P. (2001). The preparation of ideally ordered flat H-Si(111) surfaces. *Sensor Mater*, 13(5), 259–269.
- [Nakajima & Ikada, 1995] Nakajima, N. & Ikada, Y. (1995). Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous-media. *Bioconjugate Chem.*, 6(1), 123–130.
- [Nevot & Croce, 1980] Nevot, L. & Croce, P. (1980). Characterization of surfaces by grazing X-ray reflection - application to study of polishing of some silicate-glasses. *Revue de Physique Appliquée*, 15, 761–779.
- [Odijk, 1998] Odijk, T. (1998). Osmotic compaction of supercoiled DNA into a bacterial nucleoid. *Biophys. Chem.*, 73, 23–29.
- [Onsager & Samaras, 1934] Onsager, L. & Samaras, T. N. (1934). The surface tension of debye-huckel electrolytes. *J. Chem. Phys.*, 2, 528–536.
- [Ozanam et al., 1998] Ozanam, F., Vieillard, C., Warntjes, M., Dubois, T., Pauly, M., & Chazalviel, J. N. (1998). Electrochemical grafting of molecules to a silicon surface. *Can. J. Chem. Eng.*, 76(6), 1020–1026.
- [Parsegian et al., 1995] Parsegian, V. A., Rand, R. P., & Rau, D. C. (1995). Macromolecules and water : probing with osmotic stress. *Methods Enzymol.*, 259, 43–94.
- [Pelta et al., 1996] Pelta, J., Livolant, F., & Sikorav, J. L. (1996). DNA aggregation induced by polyamines and cobalthexamine. *J. Biol. Chem.*, 271(10), 5656–5662.
- [Pershan et al., 1987] Pershan, P. S., Braslau, A., Weiss, A. H., & Als-Nielsen, J. (1987). Smectic layering at the free surface of liquid crystals in the nematic phase : X-ray reflectivity. *Phys. Rev. A*, 35(11), 4800–4813.
- [Pollack, 2003] Pollack, G. H. (2003). The role of aqueous interfaces in the cell. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 103(2), 173–196.
- [Post & Zimm, 1982] Post, C. B. & Zimm, B. H. (1982). Light-scattering study of DNA condensation - competition between collapse and aggregation. *Biopolymers*, 21(11), 2139–2160.
- [Raspaud et al., 1999] Raspaud, E., Chaperon, I., Leforestier, A., & Livolant, F. (1999). Spermine-induced aggregation of DNA, nucleosome, and chromatin. *Biophys. J.*, 77(3), 1547–1555.
- [Raspaud et al., 1998] Raspaud, E., de la Cruz, M. O., Sikorav, J. L., & Livolant, F. (1998). Precipitation of DNA by polyamines : A polyelectrolyte behavior. *Biophys. J.*, 74(1), 381–393.
- [Rau & Parsegian, 1992] Rau, D. C. & Parsegian, V. A. (1992). Direct measurement of the intermolecular forces between counterions-condensed dna double helices - evidence for long-range attractive hydration forces. *Biophys. J.*, 61, 246–259.

- [Record Jr et al., 1978] Record Jr, M. T., Anderson, C. F., & Lohman, T. M. (1978). Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids : the roles of ion association or release, screening and ion effects on water activity. *Q. Rev. Biophys.*, 11(2), 103–178.
- [Rivetti et al., 1996] Rivetti, C., Guthold, M., & Bustamante, C. (1996). Scanning force microscopy of DNA deposited onto mica : equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis. *J. Mol. Biol.*, 264, 919–932.
- [Saenger et al., 1986] Saenger, W., Hunter, W., & Kennard, O. (1986). DNA conformation is determined by economics in the hydration of phosphate groups. *Nature*, 324, 385–388.
- [Sambrook et al., 1989] Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, second edition.
- [Saminathan et al., 1999] Saminathan, M., Antony, T., Shirahata, A., Sigal, L. H., Thomas, T., & Thomas, T. J. (1999). Ionic and structural specificity effects of natural and synthetic polyamines on the aggregation and resolubilization of single-, double-, and triple-stranded DNA. *Biochemistry*, 38(12), 3821–3830.
- [Seneci, 2000] Seneci, P. (2000). *Solid-Phase Synthesis and combinatorial Techniques*. John Wiley & Sons.
- [Shamoo et al., 1995] Shamoo, Y., Friedman, A. M., Parsons, M. R., Konigsberg, W. H., & Steitz, T. A. (1995). Crystal structure of a replication fork single-stranded DNA binding protein (t4 gp32) complexed to DNA. *Nature*, 376, 362–366.
- [Sheehan & Hlavka, 1956] Sheehan, J. C. & Hlavka, J. J. (1956). The use of water-soluble and basic carbodiimides in peptide synthesis. *J. Org. Chem.*, 21(4), 439–441.
- [Sieval et al., 1998] Sieval, A. B., Demirel, A. L., Nissink, J. W. M., Linford, M. R., van der Maas, J. H., de Jeu, W. H., Zuilhof, H., & Sudhölter, E. J. R. (1998). Highly stable Si-C linked functionalized monolayers on the silicon (100) surface. *Langmuir*, 14(7), 1759–1768.
- [Sieval et al., 2000a] Sieval, A. B., Linke, R., Zuilhof, H., & Sudhölter, E. J. R. (2000a). High-quality alkyl monolayers on silicon surfaces. *Adv. Mat.*, 12(19), 1457–1460.
- [Sieval et al., 2000b] Sieval, A. B., Opitz, R., Maas, H. P. A., Schoeman, M. G., Meijer, G., Vergeldt, F. J., Zuilhof, H., & Sudhölter, E. J. R. (2000b). Monolayers of 1-alkynes on the H-terminated Si(100) surface. *Langmuir*, 16(26), 10359–10368.
- [Sieval et al., 2001] Sieval, A. B., van den Hout, B., Zuilhof, H., & Sudhölter, E. J. R. (2001). Molecular modeling of covalently attached alkyl monolayers on the hydrogen-terminated Si(111) surface. *Langmuir*, 17, 2172–2181.

- [Sieval et al., 1999] Sieval, A. B., Vleeming, V., Zuilhof, H., & Sudhölter, E. J. R. (1999). An improved method for the preparation of organic monolayers of 1-alkenes on hydrogen-terminated silicon surfaces. *Langmuir*, 15(23), 8288–8291.
- [Sikorav & Church, 1991] Sikorav, J. L. & Church, G. M. (1991). Complementary recognition in condensed DNA - accelerated DNA renaturation. *Journal of Molecular Biology*, 222(4), 1085–1108.
- [Sinsheimer, 1959] Sinsheimer, R. L. (1959). Single-stranded deoxyribonucleic acid from bacteriophage ϕ X174. *J. Mol. Biol.*, 1(1), 43–53.
- [Skorvaga et al., 2004] Skorvaga, M., DellaVecchia, M. J., Croteau, D. L., Theis, K., Truglio, J. J., Mandavilli, B. S., Kisker, C., & Van Houten, B. (2004). Identification of residues within UvrB that are important for efficient DNA binding and damage processing. *J. Biol. Chem.*, 279(49), 51574–51580.
- [Stewart & Buriak, 2001] Stewart, M. P. & Buriak, J. M. (2001). Exciton-mediated hydrosilylation on photoluminescent nanocrystalline silicon. *J. Am. Chem. Soc.*, 123(32), 7821–7830.
- [Strother et al., 2000a] Strother, T., Cai, W., Zhao, X. S., Hamers, R. J., & Smith, L. M. (2000a). Synthesis and characterization of DNA-modified silicon (111) surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, 122(6), 1205–1209.
- [Strother et al., 2000b] Strother, T., Hamers, R. J., & Smith, L. M. (2000b). Covalent attachment of oligodeoxyribonucleotides to amine-modified Si(001) surfaces. *Nucleic Acids Res.*, 28(18), 3535–3541.
- [Tardella & Chazalviel, 1985] Tardella, A. & Chazalviel, J. N. (1985). In situ chemical information at the semiconductor electrolyte interface from infrared vibrational spectroscopy. *Appl. Phys. Lett.*, 47(3), 334–336.
- [Terry et al., 1997a] Terry, J., Linford, M. R., Wigren, C., Cao, R. Y., Pianetta, P., & Chidsey, C. E. D. (1997a). Determination of the bonding of alkyl monolayers to the Si(111) surface using chemical-shift, scanned-energy photoelectron diffraction. *Appl. Phys. Lett.*, 71(8), 1056–1058.
- [Terry et al., 1999] Terry, J., Linford, M. R., Wigren, C., Cao, R. Y., Pianetta, P., & Chidsey, C. E. D. (1999). Alkyl-terminated Si(111) surfaces : A high-resolution, core level photoelectron spectroscopy study. *J. Appl. Phys.*, 85(1), 213–221.
- [Terry et al., 1997b] Terry, J., Mo, R., Wigren, C., Cao, R. Y., Mount, G., Pianetta, P., Linford, M. R., & Chidsey, C. E. D. (1997b). Reactivity of the H-Si(111) surface. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-Beam Interactions With Materials And Atoms*, 133(1-4), 94–101.
- [Timkovich, 1977] Timkovich, R. (1977). Detection of stable addition of carbodiimide to proteins. *Anal. Biochem.*, 79(1-2), 135–143.
- [Tinland et al., 1997] Tinland, B., Pluen, A., Sturm, J., & Weill, G. (1997). Persistence length of single-stranded DNA. *Macromolecules*, 30(19), 5763–5765.

- [Trucks et al., 1990] Trucks, G. W., Raghavachari, K., Higashi, G. S., & Chabal, Y. J. (1990). Mechanism of HF etching of silicon surfaces: a theoretical understanding of hydrogen passivation. *Phys. Rev. Lett.*, 65(4), 504–507.
- [Ubara et al., 1984] Ubara, H., Imura, T., & Hiraki, A. (1984). Formation of Si-H bonds on the surface of microcrystalline silicon covered with SiO_x by HF treatment. *Solid State Commun.*, 50(7), 673–675.
- [Victoreen, 1943] Victoreen, J. A. (1943). Probable X-ray mass absorption coefficients for wave-lengths shorter than the K critical absorption wave-length. *J. Appl. Phys.*, 14, 95–102.
- [Victoreen, 1948] Victoreen, J. A. (1948). The absorption of incident quanta by atoms as defined by the mass photoelectric absorption coefficient and the mass scattering coefficient. *J. Appl. Phys.*, 19, 855–860.
- [Victoreen, 1949] Victoreen, J. A. (1949). The calculation of X-ray mass absorption coefficients. *J. Appl. Phys.*, 20, 1141–1147.
- [Vieillard et al., 1996] Vieillard, C., Warntjes, M., Ozanam, F., & Chazalviel, J.-N. (1996). Stabilization of the porous silicon surface by chemically grafted organic groups. *Electrochem. Soc. Proc.*, 95, 250.
- [Vollhardt & Schore, 1999] Vollhardt, K. P. C. & Schore, N. E. (1999). *Organic Chemistry : Structure and Function*. W. H. Freeman and Company, de boeck university edition.
- [von Hippel & Schleich, 1969] von Hippel, P. H. & Schleich, T. (1969). The effects of neutral salts on the structure and conformational stability of macromolecules in solution. In S. N. Timasheff & G. D. Fasman (Eds.), *Structure and Stability of Biological Macromolecules* chapter 6, (pp. 417–574). New York : Marcel Dekker, Inc.
- [Wade & Chidsey, 1997] Wade, C. P. & Chidsey, C. E. D. (1997). Etch-pit initiation by dissolved oxygen on terraces of H-Si(111). *Appl. Phys. Lett.*, 71(12), 1679–1681.
- [Wagner et al., 1997] Wagner, P., Nock, S., Spudich, J. A., Volkmuth, W. D., Chu, S., Cicero, R. L., Wade, C. P., Linford, M. R., & Chidsey, C. E. D. (1997). Bio-reactive self-assembled monolayers on hydrogen-passivated Si(111) as a new class of atomically flat substrates for biological scanning probe microscopy. *J Struct Biol*, 119(2), 189–201.
- [Ward et al., 1994] Ward, R. N., Duffy, D. C., Davies, P. B., & Bain, C. D. (1994). Sum-frequency spectroscopy of surfactants adsorbed at a flat hydrophobic surface. *J. Phys. Chem.*, 98(34), 8536–8542.
- [Warren, 1933] Warren, B. E. (1933). X-ray diffraction in long chain liquids. *Phys. Rev.*, 44, 969–973.
- [Wayner & Wolkow, 2002] Wayner, D. D. M. & Wolkow, R. A. (2002). Organic modification of hydrogen terminated silicon surfaces. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2(1), 23–34.

- [Westhof, 1988] Westhof, E. (1988). Water : an integral part of nucleic acid structure. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 17, 125–144.
- [White et al., 1988] White, J. H., Cozzarelli, N. R., & Bauer, W. R. (1988). Helical repeat and linking number of surface-wrapped DNA. *Science*, 241, 323–327.
- [Widom & Baldwin, 1983] Widom, J. & Baldwin, R. L. (1983). Monomolecular condensation of lambda-DNA induced by cobalt hexamine. *Biopolymers*, 22(6), 1595–1620.
- [Winter et al., 1981] Winter, R. B., Berg, O. G., & von Hippel, P. H. (1981). Diffusion-driven mechanism of protein translocation on nucleic acids. 3. the escherichia coli lac repressor interaction : kinetic measurements and conclusions. *Biochemistry*, 20, 6961–6977.
- [Wojtyk et al., 2002] Wojtyk, J. T. C., Morin, K. A., Boukherroub, R., & Wayner, D. D. M. (2002). Modification of porous silicon surfaces with activated ester monolayers. *Langmuir*, 18(16), 6081–6087.
- [Wu & Webb, 1973] Wu, E. S. & Webb, W. W. (1973). Critical liquid-vapor interface in SF₆. I. thickness of the diffuse transition layer. *Phys. Rev. A*, 8(4), 2065–2076.
- [Yablonovitch et al., 1986] Yablonovitch, E., Allara, D. L., Chang, C. C., Gmitter, T., & Bright, T. B. (1986). Unusually low surface-recombination velocity on silicon and germanium surfaces. *Phys. Rev. Lett.*, 57(2), 249–252.
- [Yamasaki et al., 2001] Yamasaki, Y., Teramoto, Y., & Yoshikawa, K. (2001). Disappearance of the negative charge in giant DNA with a folding transition. *Biophys. J.*, 80, 2823–2832.
- [Yang & Rau, 2005] Yang, J. & Rau, D. C. (2005). Incomplete ion dissociation underlies the weakened attraction between DNA helices at high spermidine concentrations. *Biophysical Journal*, 89(3), 1932–1940.
- [Yim et al., 2002] Yim, H., Kent, M. S., Matheson, A., Stevens, M. J., Ivkov, R., Satija, S., Majewski, J., & Smith, G. S. (2002). Adsorption of sodium poly(styrenesulfonate) to the air surface of water by neutron and X-ray reflectivity and surface tension measurements : Polymer concentration dependence. *Macromolecules*, 35(26), 9737–9747.
- [Yin et al., 2004] Yin, H. B., Brown, T., Greef, R., Wilkinson, J. S., & Melvin, T. (2004). Chemical modification and micropatterning of Si(100) with oligonucleotides. *Microelectron. Eng.*, 73-74, 830–836.
- [Yoneda, 1963] Yoneda, Y. (1963). Anomalous surface reflection of x rays. *Phys. Rev.*, 131, 2010–2013.
- [Zhang et al., 1989] Zhang, X. G., Collins, S. D., & Smith, R. L. (1989). Porous silicon formation and electropolishing of silicon by anodic polarization in HF solution. *J. Electrochem. Soc.*, 136(5), 1561–1565.

Résumé

Les interactions acides nucléiques - interfaces jouent un rôle important à la fois dans de nombreux phénomènes biologiques et dans les biotechnologies. Ce travail de thèse est consacré à l'étude de l'adsorption de l'ADN sur deux types d'interfaces : (i) des surfaces solides de silicium fonctionnalisées et (ii) l'interface eau/air. L'étude de ces systèmes simples a été entreprise afin de mieux comprendre les interactions existant *in vivo* et de faire progresser les biotechnologies impliquant des surfaces.

(i) Un protocole de fonctionnalisation chimique du silicium(111) a été élaboré, permettant d'obtenir des surfaces atomiquement planes, sans oxyde, et qui possèdent une fonctionnalité chimique choisie. La caractérisation des molécules greffées (nature chimique, densité, homogénéité) a été faite par spectroscopie infrarouge et par microscopie AFM. Cette technique de greffage moléculaire a alors été optimisée afin d'obtenir des monocouches denses de molécules organiques. Nous avons alors étudié par différentes techniques les interactions moléculaires entre les acides nucléiques simple brin et double brin et différents types de surfaces : a) des surfaces greffées de composés aromatiques (phénols) par microscopie AFM et b) des surfaces chargées positivement (par greffage de groupements amines) par réflectivité de rayons X.

ii) L'adsorption de l'ADN simple brin à l'interface eau/air a été étudiée par une technique d'autoradiographie. Nous avons montré que cette adsorption est directement corrélée à une agrégation de l'ADN, soit en présence d'ions multivalents, soit à haute concentration en sels monovalents.

Abstract

Nucleic acids - interfaces interactions play an important role both in numerous biological phenomena and in biotechnologies. This work consists in studying DNA adsorption at two types of interfaces : (i) at solid functionalized silicon surfaces and (ii) at the air/water interface. Studying these simple model systems would allow a better understanding of more complex interactions existing *in vivo* and would certainly lead in some progress in biotechnologies.

(i) A multi-step chemical process of silicon(111) functionalization has been established to obtain atomically flat surfaces, oxide free and terminated with a chosen chemical function. The characterization of functionalized molecular monolayers (chemical nature, density, homogeneity) was carried out by infrared spectroscopy and by atomic force microscopy. This process was then optimized in order to obtain dense organic molecular monolayers. We studied molecular interactions between single-stranded and double-stranded DNA and different types of surfaces using two techniques : a) surfaces grafted with aromatic groups (phenols) by AFM and b) positively charged surfaces (obtained by grafting of amine groups) by X-ray reflectivity. (ii) The single-stranded DNA adsorption at the air/water interface was studied by autoradiography techniques. We showed that this adsorption is directly correlated with a DNA aggregation, either in presence of multivalent cations or at high monovalent salt concentrations.

