

## Détection de brins d'ADN et modes résonants d'ondes de ménisque

Cyril Picard & Laurent Davoust

LEGI - BP 53 - Grenoble Cedex 9  
cyril.picard@hmg.inpg.fr

### Résumé :

*Le concept récent de biopuce fluide, destiné à la détection de biomolécules capturées à une interface fluide, offre la possibilité d'utiliser comme diagnostic micromécanique, les changements de rhéologie interfaciale induits par l'hybridation entre molécules cibles et molécules sondes. Un réseau d'ondes capillaires de ménisque est engendré à la surface d'une sous-phase aqueuse contenue dans un récipient cylindrique agité verticalement. La mesure, par interférométrie, du déplacement vertical du centre de l'interface, permet d'identifier les fréquences et les amplitudes de résonance au cours de l'immobilisation des brins d'ADN à l'interface fluide. Ces deux paramètres présentent une sensibilité différente à la présence de brins hybridés ou non hybridés.*

### Abstract :

*The recent idea of a fluid biochip, which relies on the capture of target molecules at a functionalized liquid interface, allows in particular the use of the rheological interfacial properties as a micromechanical diagnostic: a change in the surface rheology can be induced by the hybridization between probe and target molecules. A meniscus capillary wave net is promoted at the surface of a water sub-phase contained in cylindrical cell submitted to vertical vibration. The elevation at the surface centre is characterized by interferometry. The waves amplitude and the resonance frequencies depend on the fact the DNA is single-stranded or double-stranded.*

### Mots-clefs :

**biopuce à ADN ; interférométrie ; ondes de ménisque**

### Introduction

Quel que soit le contexte biotechnologique ou biomoléculaire, les biopuces se sont rapidement imposées comme système de détection de molécules biologiques. De taille millimétrique, les biopuces comportent de nombreuses zones sensibles fonctionnalisées chacune par une molécule sonde particulière présentant une affinité spécifique pour une molécule cible recherchée. L'appariement entre cible et sonde est généralement détecté par l'intermédiaire d'un marqueur luminescent préalablement fixé sur l'une des molécules. Actuellement les biopuces reposent toutes sur la fonctionnalisation d'un substrat solide. Le concept récent de biopuce fluide, qui consiste à capturer les molécules d'intérêt à une interface fluide, offre de nouvelles perspectives. En particulier, il est possible d'utiliser les changements de rhéologie interfaciale induits par l'hybridation des cibles avec les sondes comme diagnostic non plus optique mais micromécanique permettant ainsi de s'affranchir d'un quelconque marquage fluorescent.

Afin de vérifier la faisabilité d'un tel moyen de détection pour des séquences d'ADN, une technique de mesure non intrusive est envisagée. Un réseau d'ondes capillaires axisymétriques est créé à la surface d'une solution contenue dans un récipient cylindrique agité verticalement. Le réseau d'onde présente à la fois une sensibilité à la tension de surface et aux propriétés rhéologiques interfaciales susceptibles d'évoluer conjointement au cours de l'adsorption de molécules à l'interface. Deux techniques optiques sont développées afin de suivre l'évolution de la géométrie de l'interface en fonction de sa composition. Une méthode réfractométrique permet,

par une mesure de pente, de reconstruire précisément l'intégralité de la géométrie de l'interface et d'identifier, en régime chimique stationnaire, le nombre d'onde complexe utilisé pour quantifier la tension de surface et les propriétés rhéologiques de l'interface (Picard & Davoust, 2006). La seconde technique mise en oeuvre, qui fait l'objet de cet article, permet d'identifier en temps réel, par interférométrie, l'élévation de l'interface en son centre. Les spectres fréquentiels ainsi obtenus présentent une amplitude et des fréquences de résonance fortement dépendantes du contenu de l'interface.

## 1 Ondes de surface en géométrie confinée

### 1.1 Excitation paramétrique

Les ondes paramétriques d'intérêt dans ce papier sont excitées par la perturbation de l'accélération de la gravité par agitation verticale de la cellule de mesure. Les ondes de Faraday (1831), largement étudiées, sont décrites par les solutions instables d'une équation de Mathieu (Edwards & Fauve, 1994). Si l'interface au repos présente un ménisque à sa périphérie, un second type d'ondes paramétriquement excitées, appelées ondes de ménisque, est susceptible d'apparaître. En conditions statiques, la courbure du ménisque provient de l'équilibre entre forces capillaires et gravitaires. Ainsi, la perturbation de la gravité provoque une oscillation du ménisque, qui se traduit par l'émission d'ondes harmoniques à partir de la couche limite capillaire située le long de la paroi. Notons que le front d'onde est nécessairement parallèle à la ligne de contact de l'interface. Pour un récipient cylindrique, les ondes de ménisque sont donc axisymétriques.

### 1.2 Fréquence de résonance

Les ondes de surface dans une cellule de dimensions finies apparaissent théoriquement comme un problème aux limites présentant des valeurs ou des fréquences propres. L'amplitude des ondes varie en fonction de la fréquence d'agitation. Le spectre d'amplitude fait ainsi apparaître une succession de pics correspondant aux fréquences de résonance du système.

### 1.3 Atténuation temporelle et atténuation radiale

La dissipation d'énergie, à l'interface agitée, le long des parois de la cellule et au sein du volume fluide, conduit, dans le cas général, à une atténuation spatiale et temporelle des ondes prise en compte respectivement par les parties imaginaires du nombre d'onde  $k$  et de la pulsation d'agitation  $\omega$ . Néanmoins, on considère habituellement des configurations où seul un des deux nombres est complexe.

Le régime transitoire observé consécutivement à l'arrêt de l'excitation d'ondes de Faraday, a été largement étudié (Henderson & Miles, 1994). Les ondes de Faraday, sollicitées par un forçage uniformément réparti à l'interface, sont complètement stationnaires et possèdent donc un nombre d'onde réel.

Les ondes de ménisques, considérées ici, sont sollicitées en régime linéaire stationnaire. Elles présentent une pulsation réelle. En revanche, en conséquence du forçage localisé dans la couche limite périphérique, l'atténuation radiale  $\beta$  est non nulle. Le réseau d'onde, quasi-stationnaire, possède un nombre d'onde spatial complexe.

## 2 Matériel et méthode

Les ondes en régime stationnaire, sollicitées à une fréquence ajustable, sont particulièrement adaptées à l'étude de la cinétique du vieillissement interfacial provoqué par l'adsorption de tensioactif à la surface fluide eau-air.

Le dispositif expérimental, qui met en oeuvre un réseau d'ondes de ménisque, est destiné à vérifier la faisabilité d'une détection micromécanique de l'hybridation de brins d'ADN. Pour atteindre cet objectif nous avons choisi de travailler avec un système macroscopique pour des raisons pratiques. Néanmoins, la région d'intérêt est l'interface fluide soumise à des déformations micrométriques, avec des longueurs d'onde millimétriques pour des fréquences d'agitation modérées (typiquement 50 Hz). Ainsi le dispositif peut être miniaturisé jusqu'à des dimensions voisines de la longueur d'onde, qui peut être réduite en augmentant sensiblement la fréquence d'excitation.

### 2.1 Dispositif expérimental et traitement des données

Le dispositif expérimental, comprend une cellule cylindrique de verre de diamètre 50 mm, montée au centre d'un disque de plexiglas supporté par huit ressorts répartis à sa périphérie. Trois dispositifs électrodynamiques, disposés axisymétriquement autour de la cellule, permettent de l'agiter verticalement. Les fréquences de vibration sont choisies dans une gamme rhéologique (20 - 100 Hz) et amplitudes sont micrométriques.

Pour les mesures d'interférométrie, un rayon laser HeNe vertical de polarisation plane est focalisé au centre de l'interface. Les rayons réfléchis à l'interface eau-air et sur le fond de la cellule, sont envoyés vers une photodiode à avalanche (APD). L'APD délivre un signal proportionnel à la puissance lumineuse résultant de la superposition des deux rayons réfléchis. Cette puissance  $I$  dépend du déphasage entre les deux rayons et donc du déplacement de l'interface fluide dans le référentiel de la cellule :

$$I = E_1^2 + E_2^2 + 2E_1E_2 \sin\left(4\pi \frac{n\zeta_o}{\lambda_l} \sin \omega t\right), \quad (1)$$

où  $E_1, E_2, n, \lambda_l$  et  $\zeta_o$ , représentent respectivement l'amplitude du champ électrique de l'onde réfléchie à l'interface, l'amplitude du champ électrique de l'onde réfléchie sur le fond de la cellule, l'indice optique de l'eau, la longueur d'onde du laser, et l'amplitude des déplacements verticaux au centre de l'interface. A partir de la mesure de  $I$  délivrée par l'APD, il est possible d'identifier la valeur de  $\zeta_o$ . L'incertitude sur une dizaine de périodes d'oscillation est inférieure à 10%.

### 2.2 Physico-chimie

Afin d'estimer l'influence de la courbure de l'interface sur l'émission des ondes de ménisque, une première série d'expériences est réalisée avec de l'eau ultra pure de résistivité  $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$  délivrée par un système de filtration Millipore.

La sous-phase est ensuite enrichie en brins d'ADN, afin d'étudier l'évolution du spectre d'amplitude au cours du vieillissement interfacial. Les brins, une fois solubilisés, sont capturés par une monocouche de DiOctadécylamidoGlycylSpermine (DOGS, pureté de 98%, Promega) déposée à l'interface. Ce lipide cationique synthétique présente en effet une forte affinité pour les molécules nucléotidiques qui ne sont pas spontanément amphiphiles (Thomas, 2005). Deux compositions de sous-phase, enrichies en oligonucléotides (ODN) de 22 bases de thymine (dT)<sub>22</sub> ou d'adénine (dA)<sub>22</sub> de chez Eurogentec, sont envisagées :

- la première sous-phase comprend à la fois du  $(dT)_{22}$  et du  $(dA)_{22}$  à la concentration  $3,9 \cdot 10^{-8}$  M. Afin de laisser le temps à ces brins complémentaires de s'hybrider, la sous-phase est préparée 24 h à l'avance.
- la seconde sous-phase est suppléée deux fois en  $(dT)_{22}$  se comportant *de facto* comme des brins non complémentaires. La concentration en  $(dT)_{22}$  est donc de  $7,8 \cdot 10^{-8}$  M

### 3 Résultats

#### 3.1 Influence de la courbure du ménisque statique

La figure 1 montre l'évolution du spectre d'amplitude autour d'une fréquence de résonance particulière d'environ 50 Hz, en fonction de l'angle de contact, pour une interface d'eau pure. L'augmentation de l'angle de contact relatif (mesuré par rapport à un plan horizontal) engendre une forte augmentation de l'amplitude et une légère décroissance de la fréquence de résonance. Pour un angle de contact relatif de  $-36^\circ$ , les valeurs d'amplitude obtenues par interférométrie sont comparées à celles obtenues par réfractométrie. Le très bon accord entre les deux techniques, conforte la validité des mesures d'interférométrie.

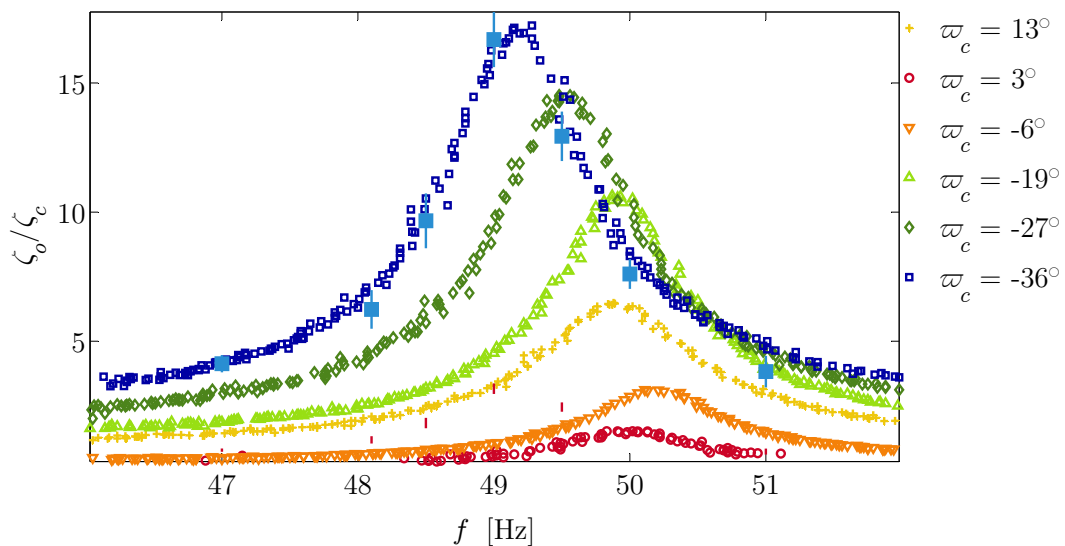


FIG. 1 – Amplitude de déplacement vertical du centre de l'interface en fonction de la fréquence et de l'angle de contact autour d'une fréquence naturelle de l'ordre de 50 Hz pour une sous-phase et une interface d'eau pure à  $20^\circ\text{C}$ . Les symboles vides correspondent à des mesures interférométriques tandis que les symboles pleins correspondent à des mesures de réfractométrie.

#### 3.2 Influence de la composition du système sur le spectre d'amplitude

La figure 2 montre que la composition de la sous-phase a un impact important sur la forme du spectre d'amplitude mesuré après une heure d'incubation consécutive au dépôt de DOGS. La présence d'ODN dans la sous-phase conduit à l'apparition de pics de résonance supplémentaires, ainsi qu'à une diminution globale de leur amplitude. De plus, on note une sensibilité distincte en fonction du contenu de la sous-phase. En présence d'ADN non-hybridé on observe simultanément une amplitude plus faible et un nombre de pics de résonance plus important qu'en présence d'ADN hybridé.

Afin de suivre l'évolution du spectre d'amplitude en fonction de la cinétique d'immobili-

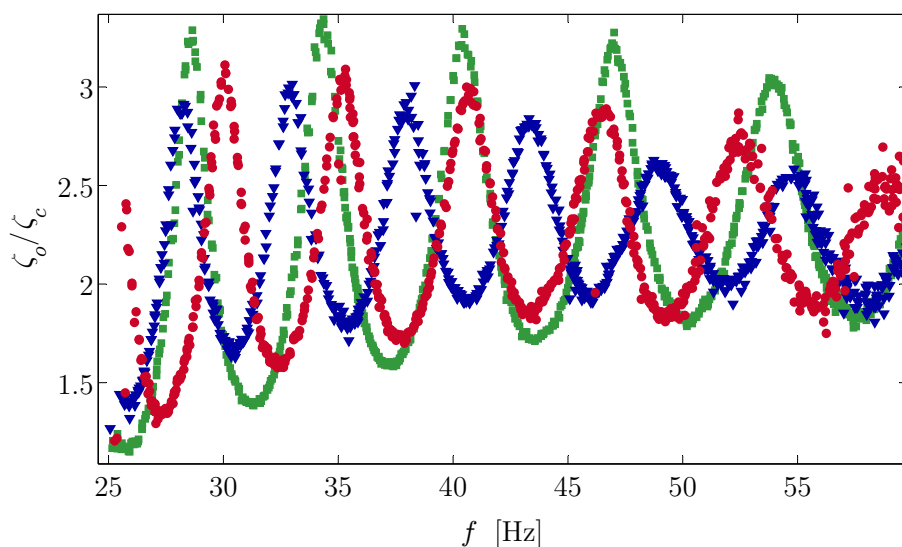


FIG. 2 – Comparaison entre les spectres obtenus après une heure d’incubation dans le cas d’une sous-phase enrichie en  $(dT)_{22}-(dA)_{22}$  à la concentration de 3,9 M ( $\circ$ ) et dans le cas d’une sous-phase enrichie en  $(dT)_{22}$  à la concentration double de 7,8 M ( $\nabla$ ) ainsi que pour une sous-phase d’eau pure ( $\square$ ) lorsque la surface est couverte par une monocouche de DOGS de concentration  $\Gamma = 1,38$  molécules  $\text{nm}^{-2}$ .

sation des brins d’ADN à l’interface, des mesures d’interférométrie sont réalisées en continu sur une fenêtre de fréquence de taille limitée comprise entre 45 et 55 Hz encadrant une fréquence de résonance pour une surface d’eau pure. Pendant le transitoire chimique, la fenêtre de fréquence est balayée en continu simultanément aux acquisitions d’interférométrie. Il est ainsi possible d’obtenir la dépendance des fréquences de résonance de différents modes, pour différentes compositions comme le montre la figure 3.

Pour une surface d’eau pure, une seule fréquence de résonance de 50,1 Hz est observée : cette fréquence est remarquablement stable. Les déviations mesurées sur une heure d’acquisition sont inférieures à 0,1 Hz. Lorsqu’une monocouche de DOGS est déposée à la surface, les fréquences de résonance subissent un décalage instantané suivi par un régime transitoire peu marqué d’une durée d’environ 50 min.

Considérons maintenant une sous-phase enrichie en brins oligonucléotides. Immédiatement après le dépôt de DOGS à l’interface, les fréquences de résonance subissent un décalage identique à celui mesuré pour une sous-phase d’eau pure. Au bout de 10 min environ, le régime transitoire se démarque cependant de celui observé en l’absence d’oligonucléotides. Les fréquences de résonance subissent une décroissance rapide qui se traduit par l’apparition et la disparition de plusieurs modes résonants dans la fenêtre de mesure. Ces modes peuvent résonner à la même fréquence mais à des instants différents qui dépendent de la cinétique de capture des oligonucléotides à l’interface. En présence de  $(dT)_{22}-(dA)_{22}$ , trois modes résonants apparaissent dans la fenêtre de fréquence. Pour une sous-phase enrichie en  $(dT)_{22}$ , la cinétique d’adsorption se révèle plus rapide. Quatre modes résonants apparaissent successivement dans la fenêtre de mesure. L’impact de la courbure du ménisque statique sur les fréquences de résonance est négligeable comparé à celui mesuré au cours de l’adsorption des oligonucléotides.

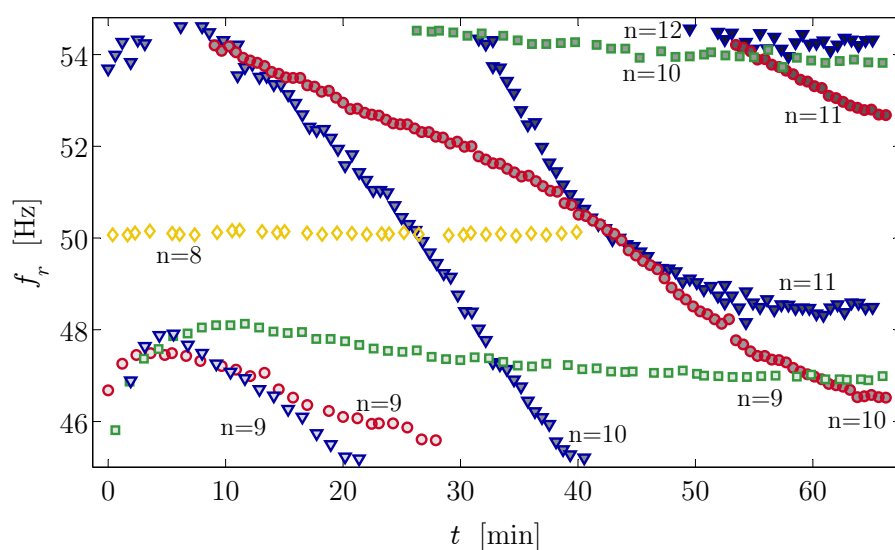


FIG. 3 – Evolution des fréquences de résonance en fonction du temps au cours du transitoire chimique pour différentes compositions.  $\diamond$  eau pure,  $\square$  sous-phase d'eau pure couverte d'une monocouche de DOGS à  $1,38 \text{ molécule nm}^{-2}$ ,  $\circ$  solution de  $(dT)_{22}$ - $(dA)_{22}$  à  $3,9 \cdot 10^{-8} \text{ M}$  couverte d'une monocouche de DOGS à  $1,38 \text{ molécule nm}^{-2}$ ,  $\nabla$  solution de  $(dT)_{22}$  à  $7,8 \cdot 10^{-8} \text{ M}$  couverte d'une monocouche de DOGS à  $1,38 \text{ molécule nm}^{-2}$ . L'intensité de la couleur des marqueurs indique le mode résonant, dont la valeur figure aussi à côté de chaque courbe. Cette valeur représente le nombre approximatif de ventres entre le centre et le bord de l'interface.

## 4 Conclusions

Des mesures d'interférométrie sont utilisées afin de mettre en évidence l'évolution de l'amplitude et des fréquences de résonance d'ondes de ménisque au cours de l'adsorption de brins d'ADN à une interface fluide fonctionnalisée par un film lipidique cationique. La méthodologie employée permet de distinguer la nature des brins d'ADN solubilisés. En particulier la cinétique d'immobilisation des brins évolue différemment selon qu'ils sont hybridés ou non-hybridés.

## Références

- Edwards, W. S. & Fauve, S. 1994, Patterns and quasi-patterns in the Faraday experiment. *J. Fluid Mech.*, 278, 123–148.
- Faraday, M. 1831, On a peculiar class of acoustical figures; and on certain forms assumed by groups of particles upon vibrating elastic surfaces. *Phil. Trans. Roy. Soc., London*, 121, 299–318.
- Henderson, D. & Miles, J. 1994, Surface-wave damping in a circular cylinder with a fixed contact line. *J. Fluid. Mech.*, 275, 285–299.
- Picard, C. & Davoust, L. 2006, Dilational rheology of an air-water interface functionalized by biomolecules : the role of surface diffusion. *Rheologica Acta*, 45, 497–504.
- Thomas, D. 2005, *Développement de couches lipidiques fonctionnalisées pour la détection spécifique de brins d'ADN à l'interface air-eau*. Thèse de doctorat, Université Claude bernard, Lyon 1.