



**HAL**  
open science

# Interactions intra et inter moléculaires, conformation des polymères adsorbés, transition de phase sous étirement : que peut-on apprendre des mesures de force

Raphaël Levy

## ► To cite this version:

Raphaël Levy. Interactions intra et inter moléculaires, conformation des polymères adsorbés, transition de phase sous étirement : que peut-on apprendre des mesures de force. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Louis Pasteur - Strasbourg I, 2002. Français. NNT: . tel-00001565v1

**HAL Id: tel-00001565**

**<https://theses.hal.science/tel-00001565v1>**

Submitted on 22 Oct 2002 (v1), last revised 1 Nov 2002 (v2)

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

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



Thèse présentée pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université Louis Pasteur  
Strasbourg 1

Discipline : Physique

Par Raphaël Lévy

Interactions intra et intermoléculaires,  
conformation des polymères adsorbés,  
transitions de phases sous étirement :

Que peut-on apprendre des mesures de force ?

Soutenue publiquement le 27 septembre 2002

**Membres du jury**

Directeur de thèse : Mounir Maaloum, HDR, Strasbourg

Rapporteur interne : Jorg Baschnagel, professeur, Strasbourg

Rapporteur externe : Liliane Léger, professeur, Paris

Rapporteur externe : Diethelm Johannsmann, professeur, Clausthal

Examineur : Jean-François Joanny, professeur, Paris

Examineur invité : Udo Seifert, professeur, Stuttgart

Interactions intra et intermoléculaires,  
conformation des polymères adsorbés,  
transitions de phases sous étirement :

Que peut-on apprendre des mesures de force ?

À Violaine et Garance

*Force so far as it is conceived as the cause of motion, is nothing but an abstruse product of the irresistible tendency to personification which is impressed upon us; a rhetorical device, as it were, of our brain, which snatches at a figurative term, because it is destitute of any conception clear enough to be literally expressed...*

Emil DuBois-Reymond, On animal electricity: being an abstract, 1852

Cité par Max Jammer (Jammer 1999).

## Préambule

Les quelques pages qui suivent racontent une aventure qui s'est déroulée entre le mois de septembre 1999 et le mois de septembre 2002. Avant de commencer la lecture de ce récit, laissez moi vous présenter les principaux acteurs. Il y a bien sûr le narrateur, mais je le connais trop bien pour pouvoir vous en parler. Il y a ensuite Mounir Maaloum qui a dirigé les opérations. Il m'a laissé vadrouiller sur certains chemins où je voulais aller, mais il m'a aussi parfois rappelé qu'à courir trop de lièvres à la fois, on risquait de ne pas en attraper. En plus de diriger les opérations, Mounir a bien souvent pris part à l'action avec son incroyable talent d'expérimentateur expérimenté et son optimisme indescriptible qui lui permet de voir ce que personne n'aurait vu. Il a supporté mon incrédulité, mes doutes et mes mauvaises humeurs. Mieux, il est toujours resté calme et souriant ! Je le remercie pour ces trois années qu'il a fortement contribué à me rendre agréables.

L'Institut Charles Sadron est le principal cadre du récit. Le lieu n'est peut-être pas totalement idyllique (encore que la cantine y soit bonne et le parc de l'Orangerie tout proche), mais la majeure partie de ses habitants est charmante. J'y ai bénéficié d'excellentes conditions pour mener à bien mes projets grâce à l'ensemble des personnels de l'atelier à la loge, de l'informatique au secrétariat en passant par les rayons X et sans oublier Serge et Marcel qui sont un peu partout à la fois. Parmi les chercheurs de l'institut, certains ont pris une part active à cette histoire : Jean-Marie Catala (le chimiste, l'homme des copolymères), Pierre Muller (l'éternel compagnon des pauses café et autres pique-niques, toujours de bon conseil pour la science et pour les bugs informatiques), Georges Debregeas (qui m'a aidé pour l'analyse d'image), Michel Rawiso (le rayonnant, l'homme des polyélectrolytes) et Thierry Charitat (l'homme des quadricouches qui flottent dans la flotte).

Certains événements se sont produits dans d'autres lieux, à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, j'ai essayé de combattre des plasmons de surface, mais ce sont eux qui ont gagné malgré l'aide précieuse de Danièle Altschuh et Laurence Choulier. Au centre de neurochimie, Jean de Barry m'a initié aux mystères de la fluorescence. A l'Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, j'ai fait quelques tentatives de dichroïsme circulaire sous les auspices du gourou Yves Nominé. Enfin, à la faculté de pharmacie, avec Charles Mioskowski,

Luc Lebeau et Patrick Schultz, nous avons échafaudé avec enthousiasme plusieurs plans audacieux qui ont malheureusement en grande partie échoué.

Au cours de cette aventure, je me suis aventuré dans des terres inconnues et biologiques. Yves et Violaine, plus experts en la matière, m'ont souvent bien aidé pour y trouver quelques repères.

Enfin, il me reste à remercier les critiques, celle et ceux qui ont accepté de lire et de juger ce travail : Liliane Léger, Diethelm Johannsmann, Jorg Baschnagel, Jean-François Joanny et Udo Seifert.

# Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| <b><u>Introduction générale</u></b>  | <b>11</b> |
| <b><u>1. Le microscope à force atomique</u></b>  | <b>14</b> |
| <u>1.1</u> Introduction  | 15        |
| <u>1.2</u> Instrumentation   | 17        |
| <u>1.3</u> Calibration de la cale piézoélectrique                                      | 17        |
| <u>1.4</u> Raideur du ressort AFM  | 18        |
| <u>1.5</u> Courbes de force  | 24        |
| <u>1.6</u> Analyse des courbes de force  | 26        |
| 1.6.1 Les phases de l'analyse  | 26        |
| 1.6.2 Les paramètres pertinents : survol de la littérature                             | 27        |
| 1.6.3 Algorithme de détection des ruptures   | 30        |
| <b><u>2. Interactions spécifiques</u></b>  | <b>31</b> |
| <u>2.1</u> Introduction  | 33        |
| 2.1.1 Interactions spécifiques   | 33        |
| 2.1.1.1 <i>Un concept fondamental de la biologie moléculaire</i>                       | 33        |
| 2.1.1.2 <i>Survol de quelques techniques disponibles</i>                               | 33        |
| 2.1.1.3 <i>Mesures sur molécules uniques : force de rupture et énergie potentielle</i> | 34        |
| 2.1.1.4 <i>Applications possibles à des problèmes actuels de la biologie</i>           | 35        |
| 2.1.1.5 <i>Fonctionnalisation de la pointe</i>   | 36        |
| 2.1.2 L'interaction Nickel-Histidine   | 37        |
| 2.1.2.1 <i>Purification de protéines</i>   | 37        |
| 2.1.2.2 <i>L'acide nitriloacétique(NTA) et le complexe Ni-NTA</i>                      | 40        |
| 2.1.2.3 <i>Propriétés de l'acide aminé histidine</i>                                   | 40        |
| 2.1.2.4 <i>Autres utilisations de l'interaction nickel-histidine</i>                   | 41        |
| 2.1.3 AFM et interactions nickel-histidine   | 43        |
| <u>2.2</u> Démarche expérimentale et principales difficultés rencontrées               | 46        |
| 2.2.1 Projet initial   | 46        |
| 2.2.2 Préparation, fonctionnalisation et caractérisation des surfaces                  | 47        |
| 2.2.3 Adsorption et solubilité du polymère   | 48        |
| 2.2.4 Configuration retenue pour les mesures de force par AFM                          | 49        |

## Table des matières

|   |   |            |
|---|---|------------|
| <a href="#">2.3</a>                               | Propriétés de la polyhistidine en solution                        | 50         |
| 2.3.1   | Résultats qualitatifs   | 50         |
| 2.3.2   | Dichroïsme circulaire   | 51         |
| 2.3.3   | Diffraction des rayons X  | 53         |
| 2.3.4   | Conclusion  | 54         |
| <a href="#">2.4</a>                               | Adsorption de la polyhistidine sur l'or                           | 55         |
| 2.4.1   | Microbalance à quartz (QCM)                                       | 55         |
| 2.4.2   | Mesures de forces par AFM   | 57         |
| 2.4.3   | Conclusion  | 60         |
| <a href="#">2.5</a>                               | Mesures de force nickel-histidine : coopérativité et fluctuations | 61         |
| 2.5.1   | Article soumis  | 62         |
| 2.5.2   | Résultats complémentaires   | 71         |
| <b><a href="#">3.</a></b>                         | <b>Polymères adsorbés</b>   | <b>73</b>  |
| <a href="#">3.1</a>                               | Introduction  | 74         |
| <a href="#">3.2</a>                               | Copolymères modèles   | 76         |
| 3.2.1   | Préparation des surfaces  | 77         |
| 3.2.2   | Résultats   | 78         |
| 3.2.3   | Conclusions et perspectives                                       | 81         |
| <a href="#">3.3</a>                               | Polylysine  | 81         |
| 3.3.1   | Introduction  | 81         |
| 3.3.2   | Résultats   | 83         |
| 3.3.2.1   | <i>Géométrie</i>  | 83         |
| 3.3.2.2   | <i>Raideur</i>  | 84         |
| 3.3.2.3   | <i>Corrélation entre ruptures successives</i>                     | 86         |
| 3.3.3   | Interprétation qualitative  | 87         |
| <a href="#">3.4</a>                               | Polymères adsorbés : conclusion et perspectives                   | 88         |
| <b><a href="#">Conclusion et perspectives</a></b> |   | <b>90</b>  |
|   | Principaux résultats  | 91         |
|   | Perspectives, travail en cours                                    | 93         |
|   | Perspectives à plus long terme                                    | 96         |
| <b><a href="#">Bibliographie</a></b>              |   | <b>98</b>  |
| <b><a href="#">Annexe</a></b>                     | <b>: acquisition et analyse des courbes de forces</b>             | <b>105</b> |

# Table des figures

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Le microscope à force atomique</b>   | <b>14</b> |
| <a href="#">Figure 1.1:</a> The Topographiner   | 15        |
| <a href="#">Figure 1.2:</a> Atomic force microscope with optical lever detection  | 16        |
| <a href="#">Figure 1.3:</a> Piezoelectric calibration   | 18        |
| <a href="#">Figure 1.4:</a> Force curve deflection <i>versus</i> displacement   | 24        |
| <a href="#">Figure 1.5:</a> Force curve properties  | 25        |
| <a href="#">Figure 1.6:</a> From deflection <i>versus</i> displacement to force <i>versus</i> distance                            | 26        |
| <a href="#">Figure 1.7:</a> Relevant parameters in force curve analysis   | 27        |
| <a href="#">Figure 1.8:</a> Automatic detection of ruptures in force curves   | 30        |
| <b>2. Interactions spécifiques</b>  | <b>32</b> |
| <a href="#">Figure 2.1:</a> Expression and purification of recombinant proteins   | 38        |
| <a href="#">Figure 2.2:</a> Nickel-nitrilotriacetic acid chelating two water molecules (A) or two histidines (B)                  | 40        |
| <a href="#">Figure 2.3:</a> titration curve for histidine   | 41        |
| <a href="#">Figure 2.4:</a> Comparison of experimental conditions and results   | 45        |
| <a href="#">Figure 2.5:</a> First project   | 46        |
| <a href="#">Figure 2.6:</a> Polyhistidine non specific adsorption on NTA surfaces   | 48        |
| <a href="#">Figure 2.7:</a> configuration used in our histidine Ni-NTA force measurements   | 49        |
| <a href="#">Figure 2.8:</a> Circular dichroism spectra and schematic representations of ...                                       | 52        |
| <a href="#">Figure 2.9:</a> Circular dichroism spectra of "pure" secondary structures (A) and polyhistidine (B)                   | 52        |
| <a href="#">Figure 2.10:</a> X-ray scattering of polyhistidine (without added salt)   | 54        |
| <a href="#">Figure 2.11:</a> Histidine adsorption on gold surfaces (QCM)  | 56        |
| <a href="#">Figure 2.12:</a> Histidine adsorption on gold surfaces (AFM typical force curves)                                     | 58        |
| <a href="#">Figure 2.13:</a> Histidine adsorption on gold surfaces (density map of rupture events)                                | 59        |
| <a href="#">Figure 2.14:</a> Schematic of our histidine Ni-NTA force measurements   | 65        |
| <a href="#">Figure 2.15:</a> Time profile of the frequency shift due to the adsorption of polyhistidine on the gold surface (QCM) | 66        |
| <a href="#">Figure 2.16:</a> A typical AFM force curve between polyhistidine and Ni-NTA with four rupture events                  | 67        |
| <a href="#">Figure 2.17:</a> Density maps presenting all the rupture events for each retraction speed                             | 68        |
| <a href="#">Figure 2.18:</a> The variation of the mean distribution events with pulling velocity                                  | 69        |

## Table des figures

|   |            |
|---|------------|
| <a href="#">Figure 2.19</a> : The number of survival bonds, normalised by the total number of ruptures, versus time     | 70         |
| <a href="#">Figure 2.20</a> : Effect of imidazole on rupture probability  | 71         |
| <a href="#">Figure 2.21</a> : In depth analysis of successive ruptures  | 72         |
| <b>3 Polymères adsorbés</b>   | <b>74</b>  |
| <a href="#">Figure 3.1</a> : Interpretation of rupture distances in AFM experiments                                     | 76         |
| <a href="#">Figure 3.2</a> : Model adsorption and stretching of copolymers  | 77         |
| <a href="#">Figure 3.3</a> : Copolymer at the solid-liquid interface  | 77         |
| <a href="#">Figure 3.4</a> : Compression isotherms of POE homopolymer and copolymer at the air-water interface          | 78         |
| <a href="#">Figure 3.5</a> : Force curves with a copolymer (N=136) on a silanised surface                               | 79         |
| <a href="#">Figure 3.6</a> : Distance distribution of the last rupture  | 79         |
| <a href="#">Figure 3.7</a> : Evolution of the last rupture distance with time   | 79         |
| <a href="#">Figure 3.8</a> : Schematic of polymer pulling   | 80         |
| <a href="#">Figure 3.9</a> : Distribution of the distance between consecutive ruptures                                  | 80         |
| <a href="#">Figure 3.10</a> : Polylysine  | 82         |
| <a href="#">Figure 3.11</a> : Force curve between adsorbed polylysine on glass in water                                 | 83         |
| <a href="#">Figure 3.12</a> : The effect of probe geometry on rupture distribution                                      | 84         |
| <a href="#">Figure 3.13</a> : The effect of probe stiffness on rupture distribution                                     | 85         |
| <a href="#">Figure 3.14</a> : The effect of the probe stiffness on the mean rupture force                               | 86         |
| <a href="#">Figure 3.15</a> : Correlation between consecutive ruptures  | 87         |
| <a href="#">Figure 3.16</a> : Interpretation of rupture distribution in AFM experiments                                 | 89         |
| <b>Conclusion et perspectives</b>   | <b>91</b>  |
| <a href="#">Figure C</a> : Helix-coil transition of polylysine : effect of pH and retraction speed on the force profile | 95         |
| <b>Annexe : acquisition et analyse des courbes de forces</b>  | <b>106</b> |
| <a href="#">Figure A.1</a> : CF2002, User interface   | 108        |
| <a href="#">Figure A.2</a> : CF2002, Diagram  | 108        |
| <a href="#">Figure A.3</a> : Fitcf-fullauto2.vi, Diagram  | 110        |
| <a href="#">Figure A.4</a> : Fitcf-fullauto2.vi, User interface   | 110        |
| <a href="#">Figure A.5</a> : Fitcf-fullauto2.vi, Diagram  | 117        |
| <a href="#">Figure A.6</a> : Fitcf-fullauto2.vi, User interface   | 117        |

## **Introduction générale**

## *Introduction générale*

Le nanomètre est une unité de longueur... et un domaine de la recherche scientifique. Un nanomètre est un million de fois plus petit qu'un millimètre, la plus petite division de nos règles de bureau. Les découvertes de ces trente dernières années en physique, mais aussi en chimie et en biologie ont révolutionné notre vision du monde à l'échelle nanométrique. En particulier, nous accédons à une description précise de la manière dont les macromolécules se fixent sur des surfaces. Nous connaissons aussi en détail le fonctionnement de certaines de ces véritables machines moléculaires naturelles que sont les protéines. Les chimistes construisent des assemblages d'un petit nombre de molécules capables d'accomplir un travail sous l'action d'un stimulus. Parallèlement, de nouvelles techniques expérimentales permettent de visualiser et de manipuler ces objets.

Cette thèse est axée sur la manipulation de molécules à l'aide de l'une de ces techniques : la microscopie à force atomique (AFM). Elle se divise en quatre parties. La première présente la méthode de mesure de force. L'élément principal du microscope est un ressort de dimension micrométrique sur lequel est fixée une pointe nanométrique. Afin d'obtenir des résultats quantitatifs, plusieurs calibrations sont nécessaires dont la mesure de la constante de raideur du ressort. Nous démontrons que l'étude de ses fluctuations thermiques permet de déduire cette grandeur. Nous comparons cette méthode à d'autres méthodes. Ces résultats font l'objet d'une publication qui est insérée dans la thèse.

La littérature présente de nombreux exemples d'utilisation de l'AFM pour manipuler des molécules et mesurer des forces entre des molécules ou entre des surfaces. La méthode consiste à approcher puis à éloigner la pointe d'une surface tout en enregistrant l'extension du ressort, c'est-à-dire la force entre le ressort et la surface. Le signal enregistré est appelé « courbe de force ». Nous survolons cette littérature pour illustrer les différentes méthodes d'analyse des courbes de force. Puis nous exposons un algorithme que nous avons optimisé pour un type particulier d'analyse qui consiste à détecter les accélérations brutales du ressort. Ces accélérations sont attribuées à la rupture de ponts moléculaires entre la pointe et la surface.

La deuxième partie aborde les interactions spécifiques entre molécules. Nous définissons ce concept puis nous discutons les résultats des premières études AFM dans ce domaine, les questions qui restent en suspens, les perspectives et les limitations de la technique.

## *Introduction générale*

Nous nous intéressons ensuite à un système particulier : la reconnaissance de l'acide aminé histidine par l'ion nickel. Ses nombreuses applications dans le domaine de la biochimie et des biotechnologies et ses applications potentielles dans le domaine des mesures de force motivent notre étude. Notre stratégie repose sur l'adsorption de la polyhistidine sur la pointe de l'AFM. Nous caractérisons grossièrement le comportement de ce polymère en solution et à l'interface solide-liquide. Puis nous utilisons la pointe modifiée pour mesurer la force nécessaire pour briser le complexe nickel-histidine.

Nous adoptons une démarche originale pour l'analyse et la représentation des résultats et nous mettons en évidence un comportement étonnant de la force en fonction de la vitesse de rétraction de la pointe. Ces résultats font l'objet d'un article qui est inséré dans le chapitre.

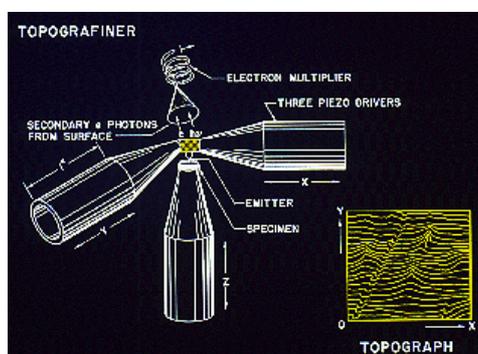
La troisième partie traite de l'adsorption de polymères. Ce travail, complémentaire de plusieurs études antérieures (notamment de celles menées au laboratoire dans l'équipe de Jean-Marc di Meglio), vise à améliorer l'interprétation des distances de rupture qui se produisent dans les courbes de forces entre une pointe et une couche de polymères adsorbés. A travers l'étude de l'adsorption de la polylysine et celle d'un copolymère hydrophobe/hydrophile, nous montrons que la relation entre distribution des distances de ruptures et conformation du polymère adsorbé est en général complexe. L'énergie d'adsorption par monomère et la dynamique du polymère sont des paramètres pertinents de cette relation. Dans le but de faire apparaître des comportements universels, nous faisons varier les paramètres expérimentaux et nous considérons différentes représentations des résultats.

La dernière partie résume les l'ensemble des résultats et indique les perspectives de ce travail. L'une d'entre elles est la poursuite d'un projet que nous avons commencé en décembre 2000 : l'étude de la transition hélice-pelote de la polylysine sous l'action d'une force

## **Première partie : le microscope à force atomique**

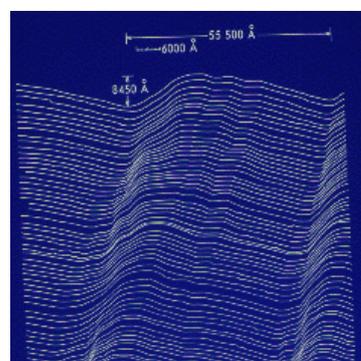
## 1.1 Introduction

Entre 1966 et 1972, Russel D. Young du National Institute of Standards and Technology (Etats-Unis) développe le « Topografiner », un nouvel instrument d'étude de surface (Young 1966, Young et al 1971, Young et al 1972). Son principe de fonctionnement est schématisé sur la figure 1.1 : une pointe fine balaye une surface sans la toucher, l'instrument collecte les électrons qui arrivent à franchir la distance séparant la pointe de la surface (courant tunnel). La valeur de ce courant dépend fortement de la distance. Cette mesure permet de reconstituer une image de la topographie d'une surface conductrice. Suite à ces travaux précurseurs, en 1982, Gerd Binnig et Heinrich Rohrer (Binnig et al 1982) inventent le microscope à effet tunnel (STM pour scanning tunneling microscope). Ces deux chercheurs du laboratoire IBM de Zürich ont obtenu le prix Nobel de physique en 1986 pour avoir atteint la résolution atomique en microscopie à effet tunnel. Ce microscope fut le précurseur d'une nouvelle famille de microscopes qui ont révolutionné notre connaissance de la matière : les microscopes à sonde locale qui reposent sur la détection d'une interaction entre une pointe de dimension nanométrique et une surface.



PRINCIPLE OF THE TOPOGRAFINER

The left (y) and right (x) piezo drivers scan the tip over and slightly above the specimen surface. The centre (z) piezo is controlled by a servo system to maintain a constant voltage, and hence a constant vertical separation between the tip and the surface. An electron multiplier detects the tiny fraction of the tunnelling current which is scattered by the specimen surface.



FIRST SCANNING PROBE IMAGE

Topographic map of a 180-line-per-mm diffraction-grating replica, obtained with the Topografiner, a noncontacting field-emission probe developed at National Bureau of Standards (currently NIST).

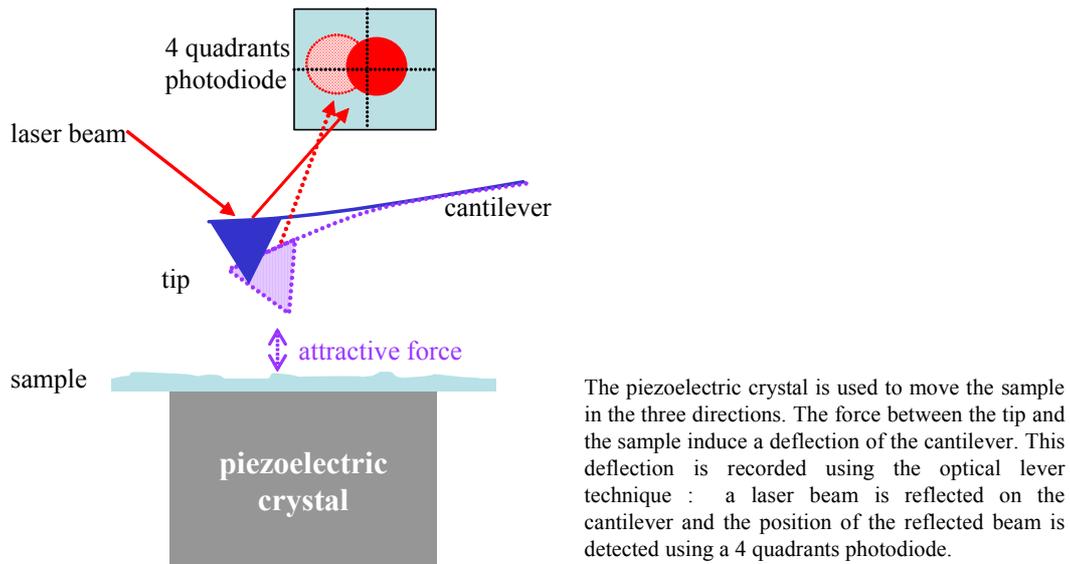
### Figure 1.1: The Topografiner

From the NIST website : <http://www.physics.nist.gov/GenInt/STM/text.html>

Le plus utilisé de ces microscopes est le microscope à force atomique (AFM pour atomic force microscope) inventé par Gerd Binnig, Calvin Quate, et Christopher Gerber en 1986

## Microscope à force atomique

(Binnig et al 1986). La pointe est fixée à un ressort dont on détecte la déflexion. Le principe de détection de la déflexion utilisé initialement par Binnig et col. en 1986 était fortement inspiré du STM. L'invention d'une nouvelle méthode de détection basée sur un bras de levier optique a permis d'accélérer fortement le développement de l'AFM (Martin et al 1987, McLelland et al 1987). Cette méthode a l'avantage d'être simple à mettre en œuvre et de n'exercer qu'une très faible perturbation sur le ressort.



**Figure 1.2: Atomic force microscope with optical lever detection**

La figure 1.2 schématise le fonctionnement de l'AFM. Un cristal piézoélectrique permet de commander le déplacement de la surface dans les trois directions de l'espace. La déflexion du ressort (cantilever) est mesurée par la méthode du levier optique : un faisceau laser est envoyé sur le ressort et la position du faisceau réfléchi est détectée grâce à un photodétecteur à quatre quadrants. Lorsque le faisceau réfléchi est dévié, l'intensité reçue par chacun des cadrans du détecteur change. Pour des faibles déflexions, il y a une relation linéaire entre le déplacement du ressort et la différence entre les intensités reçues par les quadrants de droite et les quadrants de gauche.

Depuis son invention, parallèlement à l'imagerie de la topographie des surfaces à l'échelle nanométrique, l'AFM s'est imposé comme un instrument de mesure de forces entre deux surfaces. Dans ce travail de thèse, c'est ce deuxième usage de l'AFM qui nous a intéressé.

La suite de ce chapitre détaille les calibrations nécessaires afin d'obtenir des résultats quantitatifs (cale piézoélectrique et ressort AFM), le principe des mesures de force, puis les méthodes d'analyse des courbes dans les différents domaines où elles sont utilisées.

## **1.2 Instrumentation**

Nous disposons de deux AFM au laboratoire. Le premier est le « Nanoscope 3 », un appareil commercial vendu par Digital Instrument. Le second a été monté au laboratoire par Mounir Maaloum. Les mesures de force présentées dans cette thèse ont été réalisées à l'aide de ce deuxième appareil. Le principe de fonctionnement est exactement celui décrit précédemment (figure 1.2). Ce deuxième AFM possède une meilleure résolution en force notamment grâce à une meilleure focalisation du laser. L'autre avantage de cet instrument est qu'il est facilement modifiable.

Au cours de ma thèse, nous avons réalisé plusieurs développements sur cet appareil :

- Interfaçage avec un ordinateur pour la visualisation et l'acquisition des courbes de force (annexe).
- Module de contrôle de la température (en cours).
- Modifications de la cellule pour faciliter les mesures dans les liquides.

## **1.3 Calibration de la cale piézoélectrique**

Lorsque l'on réalise une mesure de force, on envoie un signal triangulaire (tension) sur la cale piézoélectrique pour obtenir un déplacement vertical de notre échantillon. Le but de cette calibration est de savoir précisément de combien se déplace l'échantillon pour une tension donnée.

Pour cela, nous avons monté un interféromètre de type Michelson décrit sur la figure 1.3. L'un des miroirs est fixé sur la cale piézoélectrique. Lorsque l'on envoie le signal triangulaire sur la cale, le trajet du faisceau lumineux dans ce bras de l'interféromètre varie. Les bandes de la figure d'interférence (figure 1.3, insert) se déplacent. La figure d'interférence est enregistrée au moyen d'une camera CCD, le déplacement des franges est mesuré à l'aide d'un programme d'analyse d'image (programme écrit par Georges Debregeas).

Pour la cale que nous avons utilisée, nous avons trouvé une valeur de  $(5.29 \pm 0.25)$  nm/V pour le facteur de calibration.

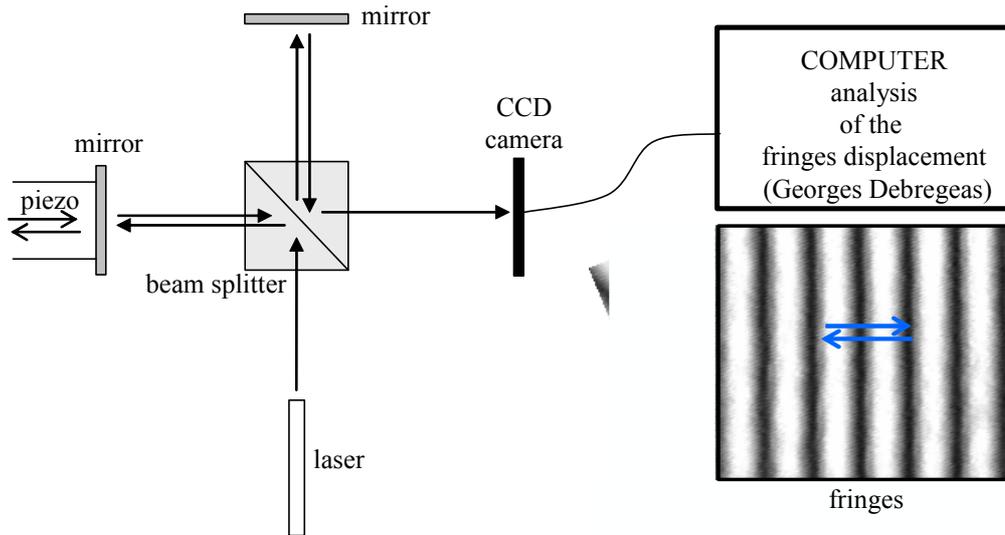


Figure 1.3: Piezoelectric calibration

#### 1.4 Raideur du ressort AFM

L'AFM est utilisé pour mesurer des forces depuis une quinzaine d'années. Pourtant, à l'heure actuelle, aucune méthode de calibration des ressorts ne s'est imposée dans la communauté des microscopistes. A tel point que lors du congrès « Scanning Probe Microscopy 2001 » à Weingarten, Nancy Burnham a affirmé dans une conférence plénière que l'utilisation de la méthode du bruit thermique, largement utilisée, était une erreur et elle a montré un tableau comportant des résultats contradictoires issus de différentes méthodes de calibration. Ces résultats ne sont, pour l'instant, pas publiés.

Nous avons souhaité contribuer à clarifier la situation en testant les modèles décrivant les fluctuations thermiques du ressort et en comparant différentes méthodes de calibration. Ces travaux font l'objet de la publication insérée ci-après. Nous trouvons un bon accord avec la méthode de Sader et nous vérifions des prédictions théoriques concernant la forme des modes de vibration. Notre principale conclusion est que la méthode du bruit thermique est valide à condition de prendre en compte par un facteur correctif les faits suivants :

- La méthode du levier optique mesure l'angle de déflexion plutôt que le déplacement et la relation *angle vs déplacement* n'est pas la même suivant les modes de vibrations.
- Expérimentalement, on n'a accès qu'aux premiers modes de vibration du ressort.

## *Microscope à force atomique*

### 1.5 Courbes de force

L'AFM permet de mesurer l'interaction entre un échantillon et la pointe. Pour cela, on effectue des cycles d'approche puis de retrait de l'échantillon et on mesure la déflexion du ressort en fonction du déplacement du piézoélectrique. La déflexion du ressort est mesurée par une tension proportionnelle au déplacement du faisceau sur la photodiode (cette tension est construite à partir des intensités reçues par les différents quadrants de la photodiode). La figure 1.4 montre deux exemples de courbe de force. La déflexion est tracée en fonction du déplacement du piézoélectrique. Sur la courbe de gauche, on distingue trois zones :

- Pour des valeurs du déplacement supérieures à +50 nm, la déflexion est constante : la pointe et la surface sont très éloignées l'une de l'autre et la force est nulle, cette zone définit la ligne de base (tension correspondant à une force nulle).
- Pour des valeurs du déplacement inférieures à -10 nm, la déflexion diminue linéairement avec le déplacement : la pointe et la surface sont en contact, le déplacement de la pointe est imposé par celui du piézoélectrique. La pente de la zone de contact (V/nm) permet de transformer la déflexion mesurée en V en un véritable déplacement de la pointe (nm).
- La zone intermédiaire entre -10 nm et +50 nm est celle qui contient les informations sur l'interaction entre les deux surfaces. Dans ce cas, on observe une interaction répulsive à courte portée sans force d'adhésion (les courbes d'approche et de retrait se superposent).

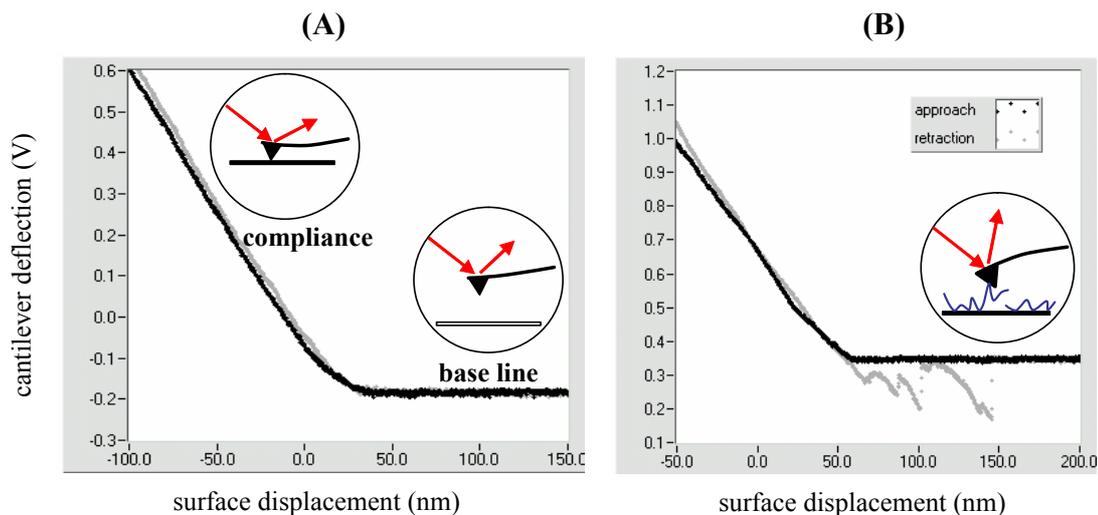
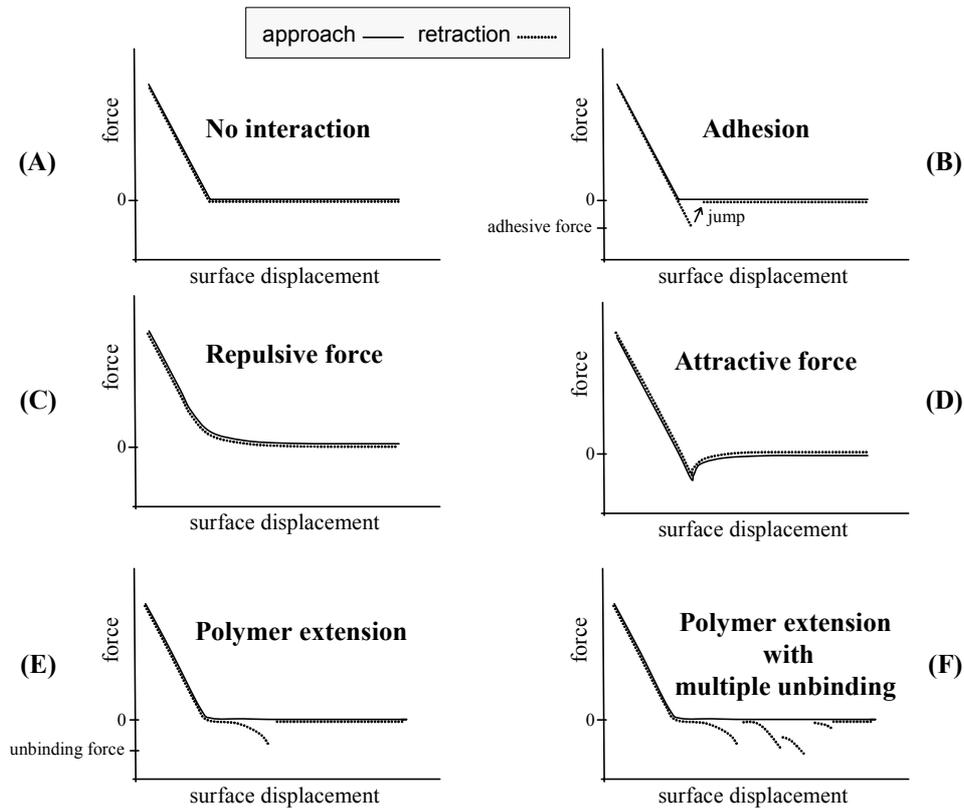


Figure 1.4: Force curve deflection *versus* displacement

## Microscope à force atomique

Suivant le système étudié, la force peut être attractive ou répulsive, à courte ou à longue portée, avec ou sans force d'adhésion (figure 1.5). En présence de boucles de polymères effectuant des ponts entre la pointe et la surface, la morphologie des courbes devient beaucoup plus complexe. Lors de la rétraction, la pointe se détache de la surface en plusieurs étapes correspondant à la rupture des différents ponts (figures 1.4B, 1.5E, 1.5F et 1.6).



**Figure 1.5: Force curve properties**

Expérimentalement, réaliser une courbe de force consiste à appliquer une tension triangulaire sur le piézoélectrique et à enregistrer une tension proportionnelle à la déflexion. Pour connaître le déplacement de la surface correspondant à la tension appliquée, on utilise le facteur de calibration du piézoélectrique (voir &1.2). La figure 1.6 montre le passage de la courbe *déflexion versus déplacement* à la *courbe force versus distance*. Ce passage nécessite une mesure précise de la constante de raideur du ressort.

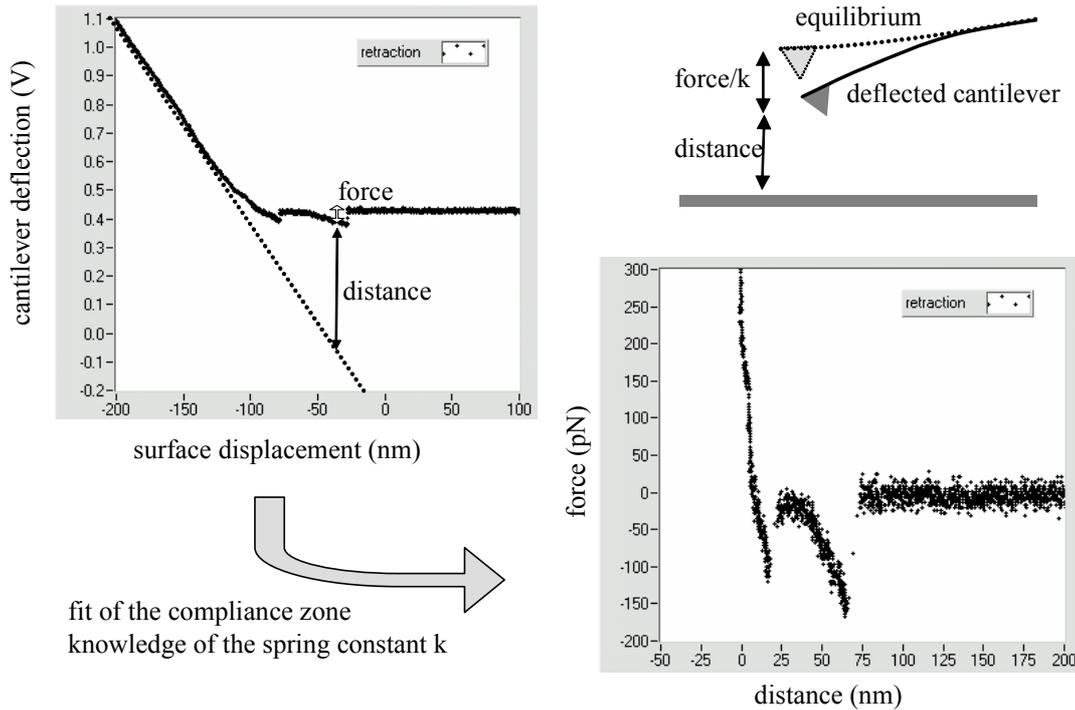


Figure 1.6: From deflection *versus* displacement to force *versus* distance

## 1.6 Analyse des courbes de force

### 1.6.1 Les phases de l'analyse

L'analyse des courbes est un exercice doublement complexe : chaque courbe raconte l'histoire souvent mouvementée d'un cycle approche - rétraction ; et chaque histoire est différente. Le but de l'analyse est de déduire des propriétés générales à partir de l'ensemble de ces histoires singulières.

On peut donc distinguer trois phases dans l'analyse :

- La définition des paramètres pertinents pour décrire une courbe
- La mesure de ces paramètres sur un grand nombre de courbes
- Le choix d'un mode de représentation de l'ensemble des données

### 1.6.2 Les paramètres pertinents : survol de la littérature

Les paramètres pertinents pour décrire une courbe de force vont dépendre du système étudié (figure 1.7).

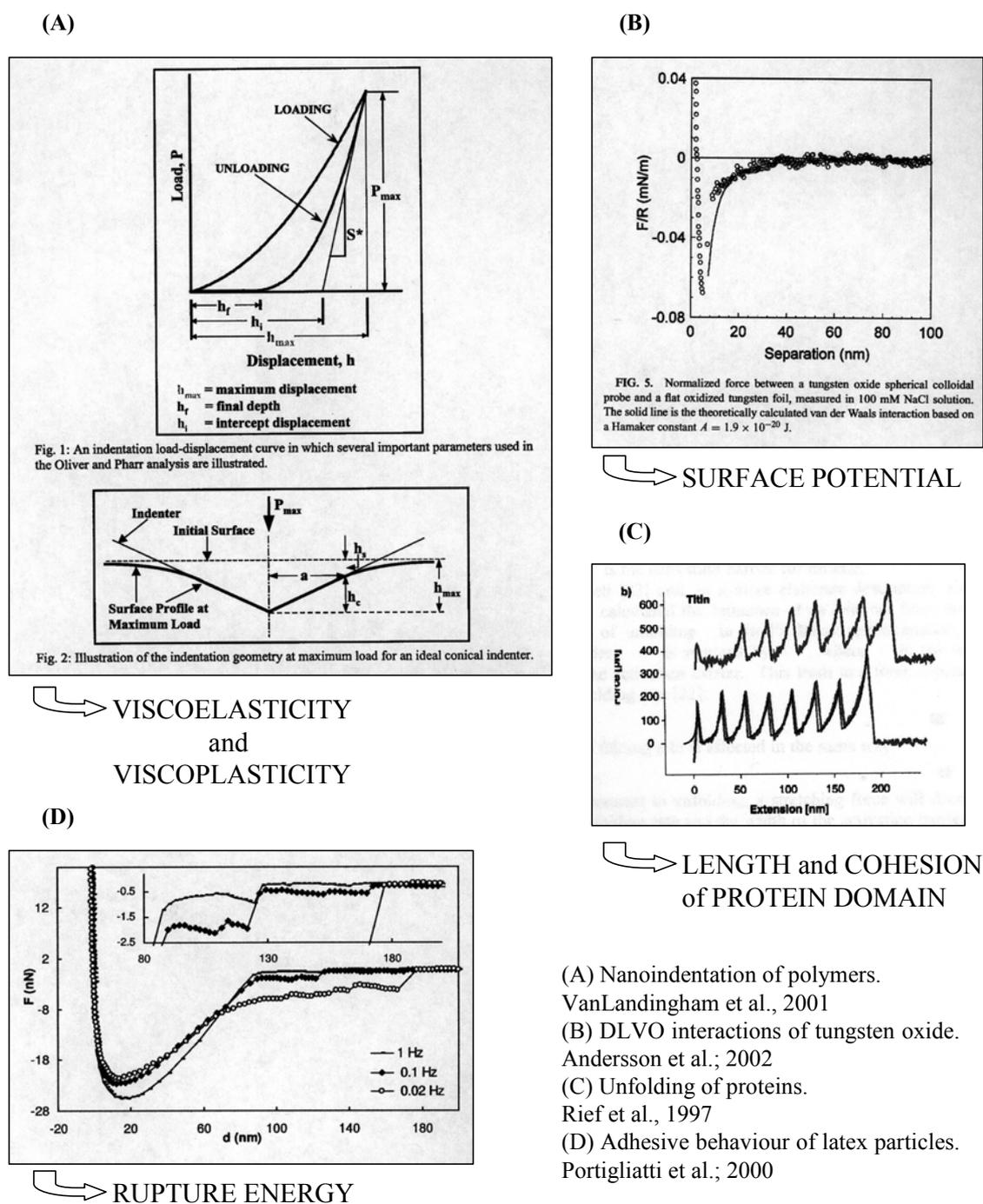


Figure 1.7: Relevant parameters in force curve analysis

## *Microscope à force atomique*

Les propriétés des films minces de polymères ont été étudiées par nanoindentation. Dans ce cas, **la zone de compliance** nous renseigne sur l'élasticité du film, alors que l'**hystérèse** dépend plutôt de sa viscoélasticité et de sa viscoplasticité (VanLandingham et al 2001) (figure 1.7A). Le même type d'étude a été réalisé sur des cellules (Bowen et al 2000, Goldmann 2000) (globules rouges, fibroblastes, astrocytes) pour déterminer leurs propriétés mécaniques et les changements de ces propriétés sous l'action de drogues (Rotsch & Radmacher 2000, Walch et al 2000). Des courbes de forces réalisées en différents points de la cellule permettent de visualiser les structures situées sous la membrane (Nowakowski & Luckham 2002).

Les forces à longue portée en milieu liquide (DLVO (Andersson & Bergstrom 2002) (Doppenschmidt & Butt 1999)) ou dans l'air (électrostatiques, capillaires, etc.(Burnham et al 1993)) ont été mesurées par AFM. Dans ces études, les auteurs analysent **le profil de la zone d'interaction** et le comparent avec des prédictions théoriques (figure 1.7B).

La pointe de l'AFM a aussi été utilisée pour attraper puis étirer des chaînes de polymères (Maaloum & Courvoisier 1999, Oesterhelt et al 2000, Ortiz & Hadziioannou 1999) ou débobiner des protéines (Rief et al 1997a, Rief et al 1997b) (figure 1.7C). Dans ces expériences, **le profil de la zone d'extension du polymère** est enregistré et comparé à un modèle (théorie des polymères ou simulation numérique des molécules).

L'adhésion cellulaire est un phénomène complexe mettant en jeu de nombreuses liaisons. A l'aide de l'AFM, ce champ de recherche a été abordé à des échelles allant de la molécule à la cellule. L'adhésion de cellules embryonnaires (fixées sur la pointe) contre des cellules du placenta a été mesurée dans le but de mieux comprendre cette phase cruciale du développement embryonnaire (Thie et al 1998). Dans le domaine des biomatériaux, les auteurs ont mesuré l'adhésion entre des bactéries et divers matériaux afin de trouver des surfaces qui ne soient pas propices à la croissance des bactéries (Ong et al 1999, Razatos et al 1998). Dans ces études, la grandeur mesurée est la force d'adhésion lors de la rétraction.

Maude Portigliatti et col. ont étudié le comportement adhésif de particules de latex (Portigliatti et al 2000). Dans ce travail, en s'inspirant des tests macroscopiques d'adhésion, les auteurs caractérisent les interactions par deux paramètres tirés des courbes de forces : la force minimale lors de la rétraction et l'énergie totale de séparation mesurée par l'aire comprise entre la courbe de force et la ligne de base (figure 1.7D).

## *Microscope à force atomique*

Depuis 1994, l'AFM a été utilisé pour mesurer des interactions spécifiques entre molécules biologiques (Florin et al 1994, Moy et al 1994). Pour s'affranchir de la force d'adhésion entre les surfaces macroscopiques (pointe et surface) et pour permettre une liberté d'orientation aux groupements étudiés, ceux-ci sont liés aux surfaces par l'intermédiaire de liens flexibles. Dans ces expériences, lors de la rétraction, il y a d'abord extension des liens polymères puis rupture des liaisons. Dans ce cas, l'énergie totale de séparation n'est pas un paramètre pertinent car il dépend fortement de la nature et de la longueur du lien polymère. Les auteurs mesurent la force de rupture et observent dans un certain nombre de cas une quantification plus ou moins nette de cette force. Les forces mesurées sont comparées à des résultats de simulation numérique prenant en compte la structure des molécules (Grubmüller et al 1996). La distribution des forces dépend de la vitesse de rétraction. En effet, si l'on regarde un grand nombre de molécules en solution à l'équilibre thermodynamique, elles se lient et se dissocient spontanément en l'absence de forces appliquées. Si l'on observe l'une de ces molécules, on peut définir un temps typique de vie d'une liaison. Si on tire sur cette liaison pendant un temps plus court que ce temps de vie, la liaison résistera avant de rompre (Evans 2001). A l'inverse, en tirant infiniment lentement, la liaison rompra pour une force indétectable.

Le procédé de rupture est associé à un itinéraire dans l'espace des états accessibles au complexe formé par les deux molécules ; le long de cet itinéraire se trouvent des barrières d'énergie et la force mesurée dépend de la hauteur de ces barrières et de la longueur de l'itinéraire à parcourir (il s'agit d'un processus diffusif). Pour franchir ces barrières, le système bénéficie des fluctuations thermiques. La distribution des forces de ruptures est le fruit d'un paysage énergétique compliqué, brouillé par les fluctuations thermiques et, éventuellement, par la présence de plusieurs liaisons parallèles. On comprend donc que des statistiques sur un grand nombre d'évènements soient nécessaires pour arriver à des distributions significatives.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à trois systèmes différents. L'étude de la transition pelote – hélice de la polylysine présentée succinctement à la fin de cette thèse repose sur l'analyse des profils d'extension du polymère. Dans nos travaux sur les interactions poly histidine/Ni-NTA (chapitre 2) et sur l'adsorption des polymères multiblocs (chapitre 3), nous avons étudié les distributions des forces et des distances de ruptures. Afin de réaliser un grand nombre d'expériences, nous avons automatisé la détection des ruptures.

### 1.6.3 Algorithme de détection des ruptures

L'algorithme choisi consiste à calculer l'écart quadratique moyen dans une fenêtre test (comprenant quelques points expérimentaux) qui se déplace le long de la courbe. Une rupture correspond à un pic de cet écart quadratique (figure 1.8). L'algorithme détecte les pics dont la hauteur et la largeur dépassent des seuils fixés par l'utilisateur. Plusieurs critères sont définis pour éliminer des « faux positifs ». L'algorithme et le programme écrit à l'aide du langage *Labview* sont décrits en détails dans l'annexe.

L'utilisation d'un programme pour la détection automatique des ruptures est un progrès majeur pour deux raisons. D'une part, cette détection constitue un gain de temps très important ce qui permet de multiplier les expériences. D'autre part, l'analyse automatique élimine les biais de mesure liés aux choix subjectifs de la personne qui effectue l'analyse. L'écriture d'un programme d'analyse nécessite une définition précise et opérationnelle de ce qu'est une rupture à partir des points expérimentaux. D'autres procédures ont été décrites dans la littérature (Baumgartner et al 2000b, Gergely et al 2001)

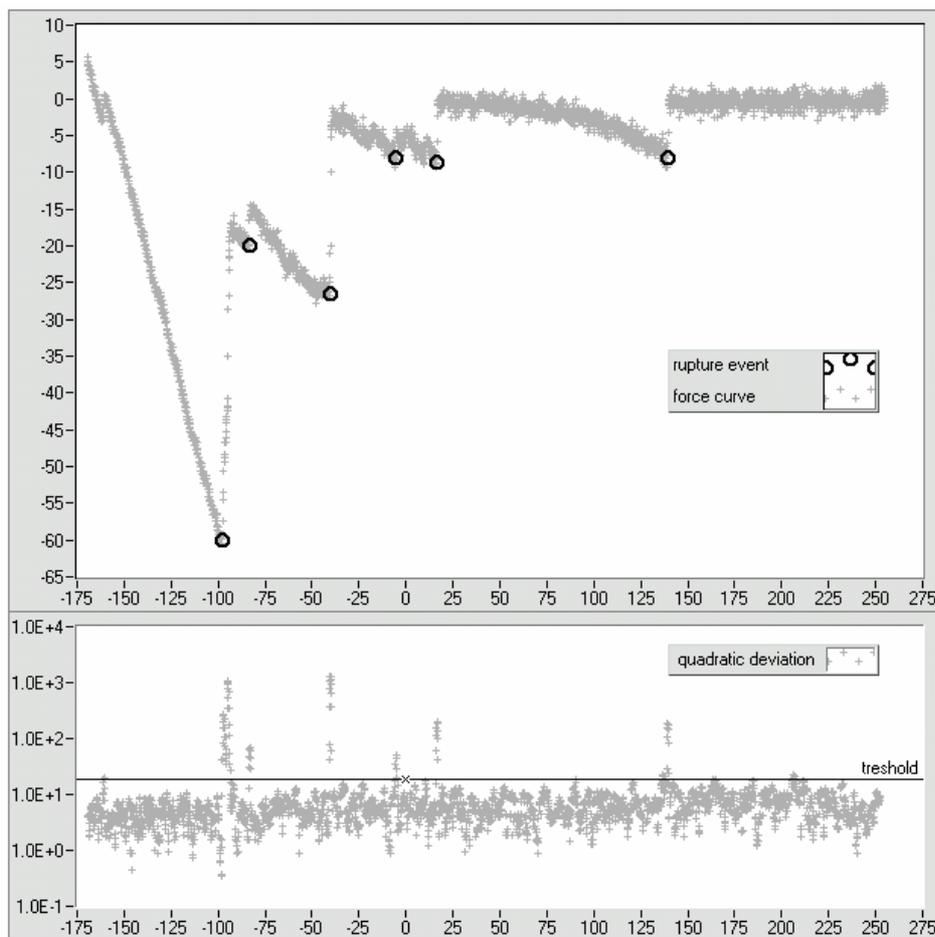


Figure 1.8: Automatic detection of ruptures in force curves

## **Deuxième partie : interactions spécifiques**

*C'est grâce à leur capacité de former, avec d'autres molécules, des complexes stéréospécifiques et non covalents, que les protéines exercent leurs fonctions « démoniaques ».*

Jacques Monod, *Le hasard et la nécessité*

Note : « démoniaque » est une référence aux démons de Maxwell

## **2.1 Introduction**

Nous introduisons d'abord le concept d'interaction spécifique, les techniques disponibles et ce que peut ou pourrait apporter l'AFM. Nous présentons dans la suite de cette introduction un système particulier de reconnaissance moléculaire (le système Ni-NTA/histidine) ainsi que les premiers articles publiés concernant des mesures de forces de dissociation de ce complexe.

### **2.1.1 Interactions spécifiques**

#### **2.1.1.1 Un concept fondamental de la biologie moléculaire**

En 1970, alors que seules une quinzaine de structures protéiques sont connues, Jacques Monod, dans son célèbre livre intitulé *Le hasard et la nécessité*, explique l'importance cruciale de la stéréospécificité et des interactions non covalentes dans le fonctionnement des êtres vivants (Monod 1970). Les protéines constituent de véritables machines microscopiques hautement spécialisées dans une tâche précise. Leur efficacité repose sur la formation de complexes stéréospécifiques. C'est grâce au positionnement très précis des molécules impliquées qu'un enzyme particulier catalyse une unique réaction chimique. La spécificité est ici double : l'enzyme reconnaît uniquement les molécules qu'il doit faire réagir parmi les milliers d'espèces chimiques présentes dans la cellule et il catalyse une réaction bien précise. Le fait que ces complexes soient stabilisés par des interactions non covalentes est tout aussi essentiel : les complexes doivent pouvoir se former et se dissocier sans consommation excessive d'énergie.

Notre compréhension du fonctionnement des cellules dépend donc en grande partie de notre capacité à mettre en évidence ces complexes, leurs rôles respectifs, leurs formations et leurs dissociations.

#### **2.1.1.2 Survol de quelques techniques disponibles**

Présenter l'ensemble des outils dont dispose le biologiste moléculaire est très au-delà du but de cette thèse. Pour situer ce que pourraient apporter les techniques de mesures de force, nous donnons ici une liste non exhaustive de techniques qui permettent d'appréhender le fonctionnement de la cellule et ses réponses à des stimuli. On peut distinguer des techniques structurales et des techniques analytiques.

## *Interactions spécifiques*

La résonance magnétique nucléaire (RMN) en solution et la cristallographie suivie de l'analyse par diffraction des rayons X sont les deux principales techniques structurales. Ces techniques sont très lourdes dans le sens où la réalisation d'échantillons RMN ou de cristaux peut nécessiter plusieurs années de travail parfois en vain, mais elles donnent accès à la conformation de la protéine avec une précision qui peut atteindre l'angström. Les informations structurales permettent ensuite de comprendre la formation des complexes et éventuellement de synthétiser des molécules dirigées contre le site actif.

Les techniques analytiques détectent l'évènement de reconnaissance moléculaire (Biosensors). Elles peuvent être utilisées pour l'analyse du phénomène de reconnaissance lui-même (savoir si telle molécule interagit avec telle autre, détermination des constantes d'association et de dissociation) ou pour la mesure de la concentration d'une protéine cible. Dans tous les cas, le système de reconnaissance qui est en général une protéine (anticorp, enzyme, récepteur) doit être couplé à un transducteur électrochimique ou physique (Scheller et al 2001). A titre d'exemples, on peut citer comme transducteurs des mesures de fluorescence ou de quantité adsorbée à l'interface solide liquide (résonance de plasmons de surface, microbalance à quartz, conductivité). En dehors des protéines, deux pistes nouvelles et fascinantes de systèmes de reconnaissance spécifique sont en cours de développement : les polymères imprimés (MIP pour molecularly imprinted polymer) qui ont été réticulés en présence de la molécule à reconnaître et les aptamères, molécules d'ADN ou d'ARN qui ont été sélectionnées puis optimisées à partir de bibliothèques contenant des milliards de molécules (O'Sullivan 2002, Piletsky & Turner 2002).

### **2.1.1.3 Mesures sur molécules uniques : force de rupture et énergie potentielle**

Depuis le début des années 1990, le développement de l'AFM et d'autres techniques expérimentales (pinces optiques ou magnétiques, déformation de membranes ou de fibres de verre) ont rendu possible les mesures de forces entre molécules. Plus d'une centaine d'articles relatent des expériences de mesures de forces entre molécules biologiques, essentiellement entre ligands et récepteurs ou entre antigènes et anticorps (pour une revue de la littérature, (Zlatanova et al 2000), (Clausen-Schaumann et al 2000)).

Au-delà de la prouesse technologique qui consiste à manipuler deux molécules et à mesurer des forces entre elles, il se pose la question de la signification physique des résultats expérimentaux. Peut-on déduire des paramètres thermodynamiques des forces mesurées ? De quelle manière et quels paramètres ? Un pas important a été franchi avec la publication de deux articles de l'équipe d'Evans et Ritchie (Evans & Ritchie 1997, Merkel et al 1999) et

## *Interactions spécifiques*

d'un article de Shillcock et Seifert (Shillcock & Seifert 1998) qui montrent que la force de rupture doit dépendre de la forme du potentiel et de la vitesse à laquelle la force est augmentée (taux de charge). Ces auteurs prédisent une variation logarithmique de la force en fonction du taux de charge avec un préfacteur qui dépend de la forme du potentiel. Pour un potentiel caractérisé par plusieurs barrières, les auteurs prévoient une variation du préfacteur reflétant l'existence de ces barrières successives. Cette approche s'est révélée particulièrement fructueuse pour l'interprétation des résultats obtenus sur le système modèle le plus étudié : le couple biotine/streptavidine.

Si la dépendance logarithmique semble bien établie, l'existence de plusieurs régimes et la possibilité de déduire la forme du potentiel à partir du spectre des forces en fonction de la vitesse sont encore l'objet de débats et de recherches. Schwesinger et al observent une simple croissance logarithmique de la force sur une série de neuf couples antigène/anticorps (Schwesinger et al 2000). A partir de cette loi, ces auteurs déterminent une longueur caractéristique et déduisent la constante de dissociation à partir du comportement extrapolé à force nulle. De plus, ils montrent que cette constante est en très bon accord avec celle mesurée par des techniques macroscopiques. Ils concluent que l'AFM est un moyen de mesurer les constantes de dissociation, et que par contre, l'interprétation de la longueur caractéristique en terme de géométrie du potentiel d'interaction est peut-être fausse. A l'opposé, l'étude de Heymann et Grubmüller présente une théorie générale visant à reconstruire le profil de l'énergie potentielle à partir du spectre des forces de ruptures en fonction de la vitesse de rétraction (Heymann & Grubmüller 2000). Ils concluent que les expériences de mesures de force devraient permettre de caractériser le potentiel d'interaction au cours de la rupture avec une résolution spatiale d'une simple liaison hydrogène.

### **2.1.1.4 Applications possibles à des problèmes actuels de la biologie**

Le temps de dissociation est une grandeur pertinente d'un point de vue biologique pour caractériser un complexe. Si l'AFM peut mesurer simplement cette constante, il devient un candidat sérieux pour constituer une nouvelle technique analytique (biosensor). L'un des atouts de l'AFM est la possibilité de parallélisme massif en utilisant des réseaux de pointes ou en utilisant des surfaces microstructurées présentant des banques de molécules. L'approche consistant à sonder un très grand nombre de molécules est de plus en plus utilisée notamment dans la recherche pharmaceutique : lorsqu'une protéine cible a été identifiée, on tente de trouver une molécule chimique qui va se lier à celle-ci, puis, on optimise cette molécule.

## *Interactions spécifiques*

D'un point de vue plus fondamental, plusieurs équipes abordent désormais le problème de l'adhésion cellulaire à l'aide des techniques de mesures de force (Benoit et al 2000, Prechtel et al 2002). La régulation de l'adhésion cellulaire est impliquée dans le développement embryonnaire, mais aussi dans les processus d'inflammation et dans la propagation des cellules cancéreuses. En combinant les mesures de forces avec des outils de biologie moléculaire (mutations des protéines d'adhésions par exemple) ou en utilisant des systèmes modèles (vésicules décorées ou membranes supportées), ces techniques devraient apporter des informations sur les molécules impliquées dans ces phénomènes et sur la manière dont elles coopèrent.

Le concept fondamental de reconnaissance spécifique à travers des surfaces complémentaires (modèle clé-serrure) est en train d'évoluer. En effet, il a été montré que dans de nombreux systèmes biologiques, une reconnaissance a lieu entre des domaines initialement flexibles qui sont stabilisés pendant le processus de reconnaissance (Demchenko 2001, Leulliot & Varani 2001). C'est apparemment de cette manière que les ARN reconnaissent des protéines. L'échelle de temps de ce type de reconnaissance pourrait être de l'ordre de la milliseconde ou même plus lente et peu de techniques sont capables d'apporter des informations sur ces paysages énergétiques (Châtellier et al 1998). L'AFM et les autres techniques de mesure de force semblent particulièrement adaptées à ce type d'étude en raison des échelles d'énergie et de temps impliquées.

### 2.1.1.5 Fonctionnalisation de la pointe

La nécessaire fonctionnalisation de la pointe et de la surface constitue l'une des principales limitations de l'AFM. En raison de ses applications possibles pour décorer des surfaces avec des protéines, nous nous intéressons dans la suite de cette introduction à une interaction spécifique particulière : l'interaction entre le nickel et l'acide aminé histidine.

## 2.1.2 L'interaction Nickel-Histidine

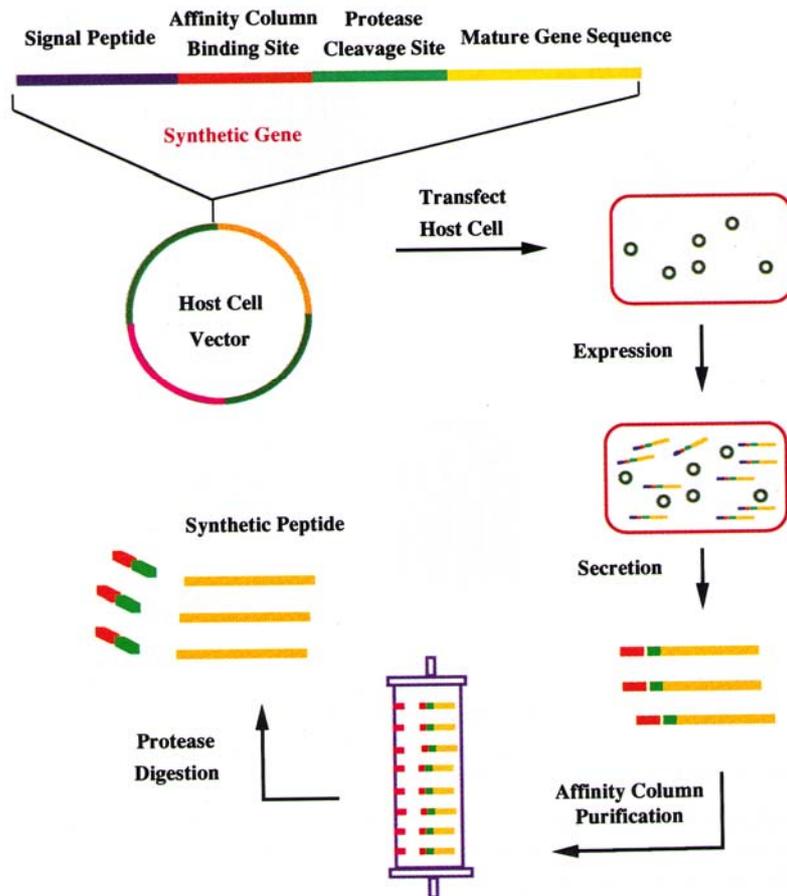
Le rôle du nickel dans des processus métaboliques a été établi en 1965 par l'expérience de Bartha et Ordal qui a montré que cet élément était indispensable à la croissance de certaines bactéries anaérobies. L'ion  $Ni^{2+}$  a ensuite été identifié dans différentes structures de protéines catalytiques (Fontecilla-Camps 1998). Ces structures ont révélé la présence de l'acide aminé histidine coordonné à l'ion métallique. Par la suite, de nombreuses études ont confirmé l'existence d'une forte complexation entre l'histidine et le nickel (Sundberg & Martin 1974).

### 2.1.2.1 Purification de protéines

En 1967, Porath invente une méthode de couplage des protéines à des gels d'agarose et démontre que la chymotripsine (enzyme estherolytique) fixée sur ce gel conserve son activité (Porath et al 1967). Ces travaux ouvrent la voie de la chromatographie d'affinité qui consiste à immobiliser une molécule sur un gel afin d'isoler une autre molécule qui présente une forte affinité pour la molécule immobilisée. En 1974, Everson et Parker utilisent pour la première fois l'immobilisation du zinc sur un gel d'agarose pour retenir des protéines qui possèdent un site de coordination (métalloprotéines). Le processus de séparation repose sur la formation de complexes ternaires complexant/ion métallique/métalloprotéine (Everson & Parker 1974). Les travaux de Porath et Sulkowski posent les fondations de ce qui va devenir quelques années plus tard une méthode de routine dans les laboratoires de biologie moléculaire (Porath et al 1975, Sulkowski 1985). Dans ces premiers développements, cette chromatographie d'affinité (IMAC pour immobilized-metal affinity chromatography) a permis de purifier des protéines ou des peptides (séquences de quelques acides aminés) contenant naturellement des histidines en surface.

En 1987, Hochuli introduit une nouvelle molécule, l'acide nitriloacétique (NTA), pour réaliser l'immobilisation du nickel sur les matrices de chromatographie (Hochuli et al 1987). En 1988, le même auteur combine cette méthode de chromatographie et les progrès de la biologie moléculaire pour construire un nouvel outil très puissant : la purification de protéines recombinantes possédant une séquence d'acides aminés ajoutés, riche en histidines (Hochuli et al 1988). Depuis 1987, la technique s'est généralisée dans les laboratoires de recherche au point qu'il est impossible de dire combien de protéines ont été étudiées à l'aide de ce système. Les matrices Nickel-NTA et les outils de biologie moléculaire permettant d'ajouter les séquences oligohistidines sont disponibles auprès de plusieurs distributeurs.

## *Interactions spécifiques*



Design scheme for expression and one-step purification of a synthetic peptide or protein. The top of the Figure shows a gene construct that encodes for a protein with several functional domains. These domains include a target mature protein or peptide, a site for cleavage by protease, a specific binding domain, and a signal peptide that directs secretion from the host organism. Host cells transfected with an expression vector containing this gene will express and secrete the multi-domain protein into the media with concomitant cleavage and loss of the signal peptide. The protein is directly affinity purified from the media by utilizing the specific binding domain. The binding domain is removed from the target protein by cleavage with protease digestion.

**Figure 2.1: Expression and purification of recombinant proteins**

From (Wrede & Schneider 1994)

La technologie de production et de purification des protéines recombinantes est présentée sur la figure 2.1. Un gène modifié est introduit dans des cellules hôtes. Ce gène contient la séquence codant pour la protéine d'intérêt, une séquence de clivage, une séquence oligohistidine et une séquence codant pour un peptide de signalisation qui provoque l'externalisation de la protéine. Les cellules vont produire puis rejeter la protéine modifiée dans le milieu de culture ; la protéine est ensuite purifiée sur les colonnes d'affinité à partir du milieu de culture (pour une introduction aux concepts et enjeux de la synthèse de protéines modifiées : (Wrede & Schneider 1994)). Le peptide de signalisation n'est pas indispensable :

## *Interactions spécifiques*

dans beaucoup de cas, la protéine est récupérée à partir du milieu intracellulaire après avoir endommagé les membranes extérieures des cellules.

L'un des avantages de cette technique consiste en la possibilité de réaliser la séparation dans des conditions où les protéines sont dénaturées. En effet, lorsque les protéines sont produites dans la bactérie *E. Coli*, elles ségrègent souvent dans des corps d'inclusion ou elles ne sont plus dans leur état fonctionnel. La plupart des chromatographies d'affinité reposent sur l'interaction entre un ligand et son récepteur qui a été préalablement fusionné à la protéine d'intérêt (maltose/maltose binding protein ou biotine/streptavidine). Ces chromatographies échouent lorsque la protéine d'intérêt est dénaturée puisque le récepteur n'est pas dans son état fonctionnel. Le complexe Ni-NTA reconnaît une séquence d'histidine (et non un site actif de la protéine) et permet donc de purifier la protéine même lorsque celle-ci n'est pas bien repliée.

La récupération des protéines fixées sur les colonnes peut se faire de deux manières :

- en ajoutant de l'imidazole qui vient prendre la place des acides aminés histidines (l'imidazole est la partie complexante de l'histidine).
- en baissant le pH, l'histidine se protonne (base faible) et ne peut plus avoir de liaison de coordination avec le Ni-NTA.

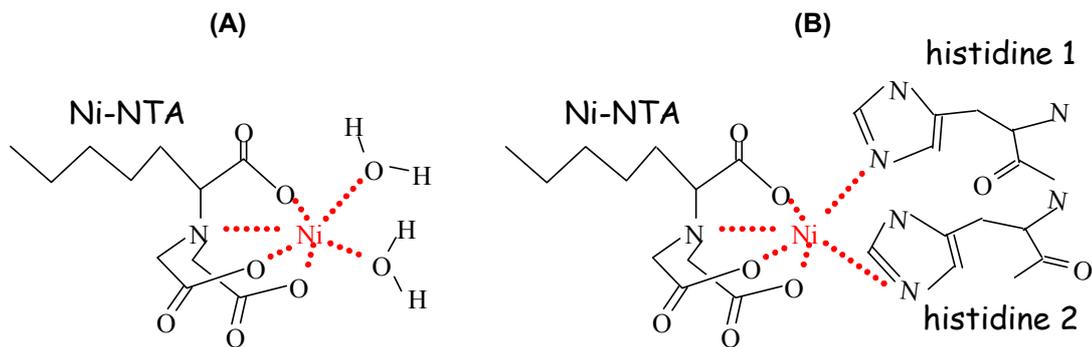
Enfin, les séquences oligohistidines sont supprimées à l'aide d'enzymes (protéases) qui reconnaissent la séquence de clivage et coupent la protéine à cet endroit.

A l'heure actuelle, la production par ces méthodes de protéines à grande échelle pour des usages thérapeutiques (interférons, vaccins, et anticorps) reste problématique pour des raisons de niveau de pureté, de la présence de traces de nickel et de la nécessité de supprimer la séquence oligohistidine (ce qui est parfois délicat). Les essais les plus prometteurs concernent des protéines candidates pour être des vaccins contre la malaria.

Dans la suite, nous présentons les propriétés physicochimiques de l'acide aminé histidine et du Ni-NTA indispensables à la compréhension de notre étude, puis les autres applications de ce système.

### 2.1.2.2 L'acide nitriloacétique(NTA) et le complexe Ni-NTA

L'acide nitriloacétique(NTA) est un complexant quadridentate, c'est-à-dire qu'il forme 4 liaisons. Il complexe fortement le cuivre et le nickel qui sont de valence 6. Ces ions, une fois complexés, gardent 2 sites accessibles qui peuvent être occupés soit par des molécules d'eau soit par d'autres molécules (figure 2.2). Chargées avec du Ni<sup>2+</sup>, les résines Ni-NTA lient de manière très spécifique les protéines ou polypeptides présentant plusieurs histidines consécutives en surface.



**Figure 2.2: Nickel-nitrilotriacetic acid chelating two water molecules (A) or two histidines (B)**

### 2.1.2.3 Propriétés de l'acide aminé histidine

L'acide aminé histidine est une base faible. Sa chaîne latérale est un cycle imidazole (figure 2.3). La figure 2.3 présente la courbe de titration de l'histidine avec les différentes formes correspondantes. Le pKa de la chaîne latérale vaut 6, ce qui signifie qu'à pH neutre, l'acide aminé n'est, en général, pas chargé lorsqu'il est présent dans une chaîne polypeptidique.

Dans la classification des acides aminés, l'histidine occupe une place singulière en raison de son pKa proche de 7 qui lui donne un caractère partiellement hydrophobe et lui permet d'exister sous une forme ionique ou non ionique à pH neutre en fonction de son microenvironnement (Durliat 1997). Une autre propriété singulière de l'histidine que nous avons déjà abordée est sa capacité à lier les ions métalliques. La nature utilise ces propriétés dans la plupart des centres actifs des enzymes ou l'histidine sert soit de donneur, soit d'accepteur de proton, soit de ligand pour des ions métalliques.

## Interactions spécifiques

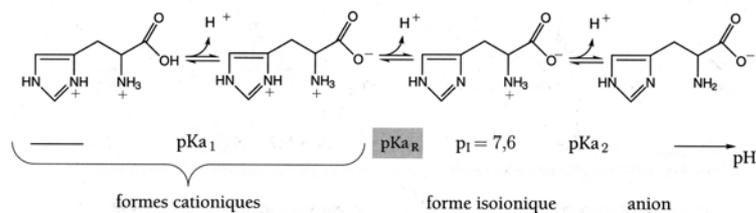
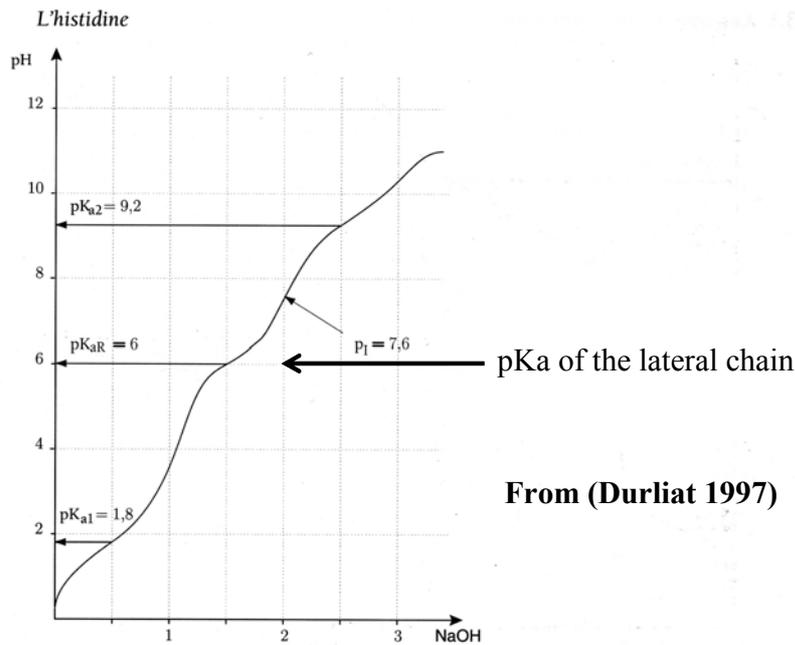


Fig. 1.18: Equilibres entre les différentes formes ioniques de l'histidine.

Figure 2.3: Titration curve for histidine

### 2.1.2.4 Autres utilisations de l'interaction nickel-histidine

L'existence de ces protéines munies d'une étiquette histidine a suscité une grande motivation pour développer de nouveaux outils d'étude structurale ou analytique basés sur l'interaction nickel-histidine. Des lipides décorés avec un groupement NTA ont été synthétisés pour servir à la cristallisation à deux dimensions de protéines à l'interface eau-air (Kubalek et al 1994, Lebeau et al 2001). Des puits de faibles contenances (25  $\mu$ l) décorés de Ni-NTA sont vendus par Qiagen pour des immobilisations suivies d'études analytiques (dosages, fluorescence, etc). Des surfaces décorées ont été réalisées pour des mesures d'interaction en SPR (Scanning Plasmon Resonance, cette technique permet de suivre en temps réel l'adsorption de molécules sur une surface, elle est très utilisée pour mesurer des interactions entre protéines) (Gershon & Khilko 1995, Sigal et al 1996). Biacore, le principal fournisseur de SPR pour les sciences de la vie, commercialise une surface fonctionnalisée avec du Ni-NTA. Des nanoparticules d'or

## *Interactions spécifiques*

décorées de Ni-NTA ont été synthétisées pour la détection de protéines étiquetées histidine. Des membranes supportées ont été formées à partir de la fusion de vésicules contenant des lipides NTA sur des surfaces décorées avec des groupements polyhistidine (Radler et al 2000).

La tâche qui consiste à caractériser la fonction et les mécanismes d'action des protéines (et notamment des protéines membranaires) est immense. De nouveaux outils sont indispensables et le système Ni-NTA histidine constitue une piste de recherche très active pour le développement de ces outils.

### 2.1.3 AFM et interactions nickel-histidine

L'idée de décorer la pointe de l'AFM avec du Ni-NTA pour ensuite pouvoir fixer des protéines et mesurer des interactions avec d'autres partenaires attachés sur une surface a suscité des travaux dans plusieurs groupes de recherche. Cette idée est très séduisante puisqu'elle agrandirait brutalement le champ d'investigation des expériences de mesure de force AFM à l'ensemble des protéines munies d'une étiquette histidine. On peut cependant noter que les conditions requises pour la chromatographie d'affinité sont différentes de celles requises pour une fonctionnalisation de la pointe AFM. Une étiquette idéale pour la chromatographie ne présente pas une affinité trop forte de manière à permettre une élution dans des conditions non destructives pour les protéines. Pour utiliser ce système en AFM, au contraire, une immobilisation irréversible des protéines est indispensable. Le premier pas à franchir dans cette direction était donc de caractériser les forces entre le Ni-NTA et l'histidine en fonction de la vitesse de rétraction. En septembre 1999, au tout début de ma thèse, à la suite d'une présentation de Charles Mioskowski du laboratoire de chimie bioorganique (Strasbourg, ULP) lors des journées scientifiques de l'ICS, nous avons décidé de nous lancer sur ce projet.

Jeffrey G. Forbes, dans un abstract soumis en mars 1998 pour le meeting de la société américaine de physique, affirme avoir mesuré par AFM la force de rupture histidine/Ni-NTA mais ces résultats n'ont pas été publiés (en revanche, l'abstract est disponible sur internet). L'abstract mentionne une force de rupture de 30 pN qui n'est pas supprimée par l'ajout d'imidazole.

En janvier 2000, Matteo Conti et al publient les premiers résultats d'AFM sur le sujet (Conti et al 2000). Les auteurs ont utilisé une pointe fonctionnalisée avec des séquences de deux ou six histidines et une surface fonctionnalisée avec du dextran (polysaccharides) modifié présentant des groupes Ni-NTA (surfaces Biacore). Ils trouvent dans les deux cas une distribution large de force de ruptures présentant respectivement un maximum à 300 et 500 pN. Ils ne mentionnent pas d'expérience de contrôle avec l'imidazole. Un contrôle en l'absence de nickel montre la disparition des ruptures et confirme donc l'interprétation des ruptures observées comme étant la signature de l'interaction nickel-histidine.

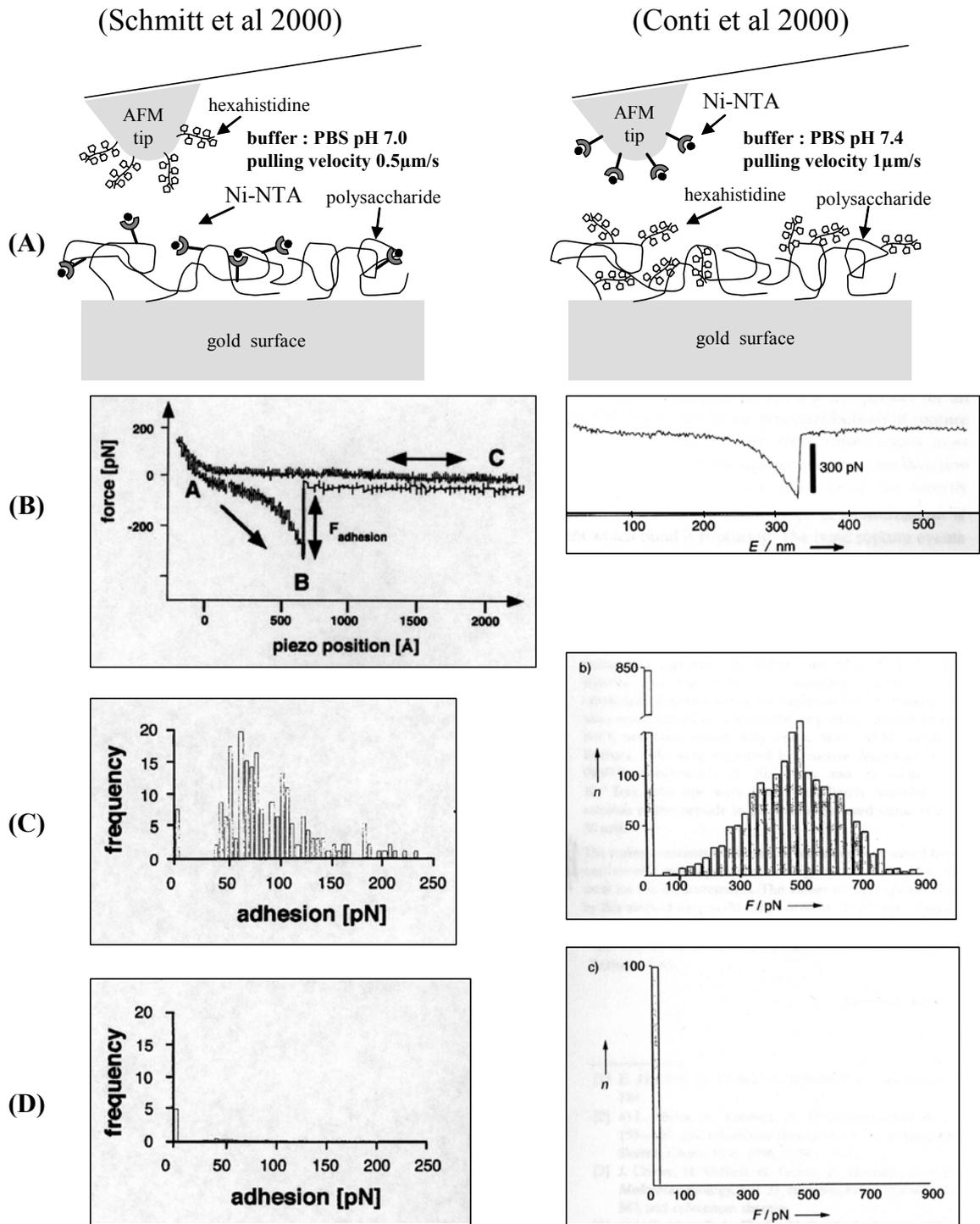
En juin 2000, Lutz Schmitt et al. publient des résultats obtenus avec une pointe décorée avec du NTA et une surface fonctionnalisée avec du dextran modifié présentant des séquences de 6

## *Interactions spécifiques*

histidines (surfaces Biacore, (Schmitt et al 2000)). Les auteurs trouvent des distributions de forces qui dépendent de l'ion métallique complexé par le NTA (cobalt, cuivre, nickel et zinc). L'ajout d'EDTA (fort complexant des ions métalliques) ou d'imidazole supprime l'interaction. Pour le nickel, les auteurs affirment obtenir une distribution présentant une périodicité de 38 pN. Les statistiques présentées sont peu convaincantes (faible nombre de courbes étudiées) en ce qui concerne la périodicité mais il en ressort clairement que les forces mesurées sont nettement inférieures à celles obtenues par Matteo Conti et al. Malheureusement, le deuxième article ne mentionne pas l'existence du premier. La figure 2.4 présente une comparaison des principaux résultats et des conditions expérimentales de ces deux études.

Le désaccord sur l'ordre de grandeur des forces entre ces deux articles nous a incité à poursuivre notre projet pour mieux comprendre ce système et ses potentialités pour des applications de fonctionnalisation de la pointe AFM. Un troisième article sur le même sujet est paru en mars 2000 (c'est-à-dire entre les deux articles mentionnés ci-dessus) dans le premier numéro du journal *Single Molecule* (Kienberger et al 2000). Malheureusement, ce journal est mal référencé et nous n'avons pris connaissance qu'en juillet 2002 de l'existence de cet article. L'étude est plus approfondie que dans les deux articles discutés ci-dessus avec notamment une variation de la vitesse de rétraction. La chimie de couplage est assez différente : des séquences de 6 histidines sont liées à la pointe par l'intermédiaire d'un polymère flexible (polyéthylène glycol). La surface est décorée par une monocouche comprenant 5% de groupements NTA. Les mesures sont réalisées en présence de nickel (100 $\mu$ M). Les forces mesurées sont comprises entre 150 et 200 pN et la probabilité de liaison décroît fortement en présence d'imidazole.

## Interactions spécifiques



**Figure 2.4: Comparison of experimental conditions and results**

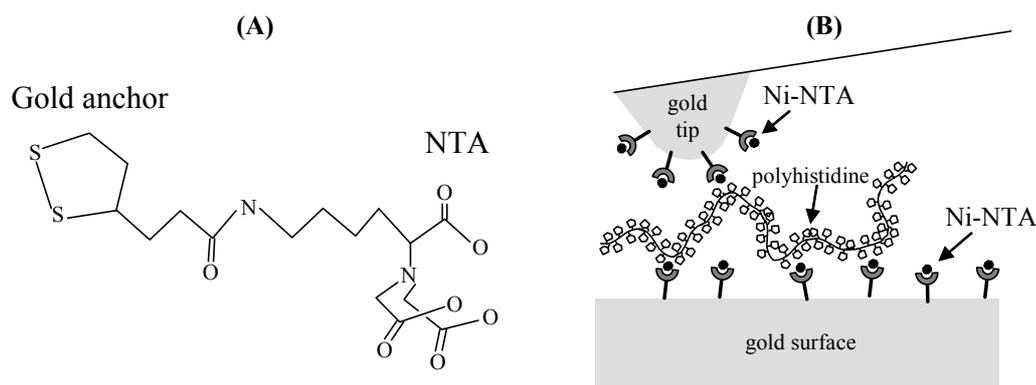
The left column show the results of Schmitt et al. The right column show the results of Conti et al.

- (A) Experimental conditions
- (B) Typical force curve from the papers
- (C) Histogram of rupture forces
- (D) Histogram of rupture forces after depletion of nickel ions

## 2.2 Démarche expérimentale et principales difficultés rencontrées

### 2.2.1 Projet initial

Le projet initial consistait à mesurer la force nécessaire pour rompre le complexe histidine-Ni-NTA dans des conditions expérimentales similaires à celles qu'il est souhaitable d'utiliser pour étudier des molécules biologiques (concentration en sel, pH). Nous disposions d'une molécule bifonctionnelle (fournie par Charles Mioskowski et Cyrille Richard, CEA-Saclay) dessinée sur la figure 2.5, A. Cette molécule possède à une extrémité le groupe NTA et à l'autre extrémité un cycle contenant deux atomes de soufre (elle sera nommée NTA-thiol dans la suite). Au contact avec une surface d'or, le cycle s'ouvre pour former deux ponts avec la surface. Grâce à cette molécule, nous pensions pouvoir nous affranchir du gel de polysaccharides (dextran) utilisé dans les études précédentes. L'idée, schématisée sur la figure 2.5, B, était de fonctionnaliser la pointe et la surface avec le Ni-NTA et d'adsorber de la polyhistidine sur la surface, puis de venir pêcher les boucles formées par le polymère.



**Figure 2.5: First project**

- (A) Bifunctional molecule with a Ni-NTA group and a gold anchor group.
- (B) Our first idea to measure histidine-Ni-NTA ruptures

Dans nos tentatives pour mener à bien ce projet, nous avons rencontré des obstacles expérimentaux (préparation, fonctionnalisation et caractérisation des surfaces) et fondamentaux (propriétés de la polyhistidine en solution). Ces difficultés sont résumées dans les paragraphes 2.2.2 et 2.2.3. La configuration que nous avons finalement retenue pour effectuer nos mesures est présentée dans le paragraphe 2.2.4.

### 2.2.2 Préparation, fonctionnalisation et caractérisation des surfaces

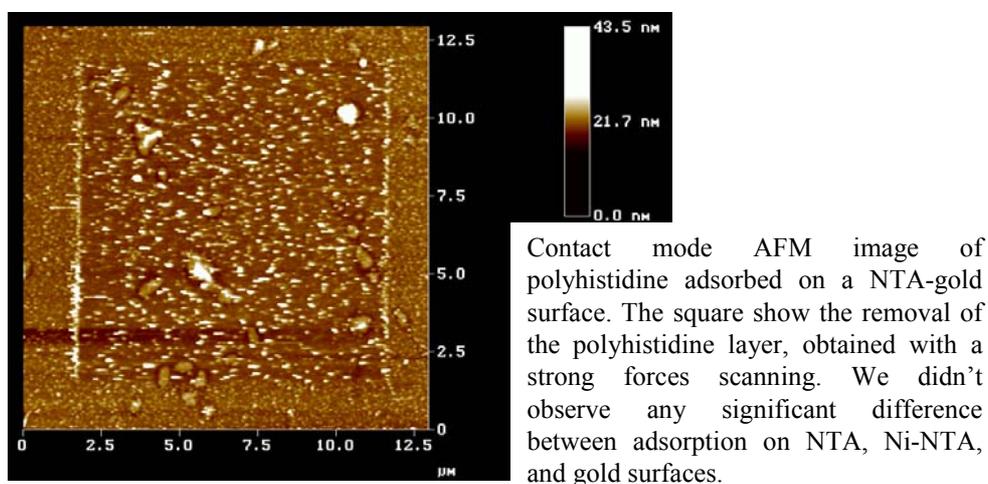
Le protocole de préparation des surfaces est simple en principe. Une couche de chrome (5 nm), puis une couche d'or (50 nm) sont déposées sur les ressorts et les surfaces grâce à un évaporateur. Les surfaces sont ensuite plongées pendant 24h dans une solution de concentration 1mM de molécules NTA-thiol dans de l'éthanol. Ce protocole est classique pour la fonctionnalisation des surfaces d'or. L'étape suivante consiste à traiter la surface de manière à complexer l'ion Nickel dans les groupements NTA. Plusieurs protocoles décrits dans la littérature ont été testés.

Il faut ensuite contrôler les différentes étapes de fonctionnalisation. L'idéal aurait été de faire des mesures de spectroscopies électroniques (*XPS* ou ESCA) qui permettent d'obtenir des informations sur les éléments chimiques présents en surface. Après plusieurs mois au cours desquels nous étions sur liste d'attente, l'instrument strasbourgeois a subi des avaries et n'a pas été réparé. *L'ellipsométrie* sur ce genre de surface est une technique peu fiable en raison d'une part de leur rugosité importante, et d'autre part de l'interaction de la lumière avec les plasmons de surface. Nos tentatives de mesures par ellipsométrie n'ont pas été concluantes. La rugosité des surfaces d'or rend difficile les études en *AFM*.

Plusieurs équipes ont essayé de mettre au point des protocoles permettant d'obtenir des surfaces d'or planes (Höpfner et al 1999). Nous avons testé deux méthodes. La première consiste à réaliser des recuits à la flamme. Après quelques tentatives, nous avons renoncé à cette technique de recuit difficilement reproductible et où l'on obtient quelques terrasses planes à l'échelle atomique mais une surface très chaotique à une échelle de quelques microns. La deuxième méthode consiste à déposer une mince couche d'or (5 ou 6 nm) sur une surface très plane de silicium oxydé fonctionnalisée avec une molécule présentant d'un côté un groupement silane pour la fixation sur la surface et de l'autre un groupement thiol pour favoriser le mouillage de l'or (Goss et al 1991). Malheureusement, après plusieurs essais, ce protocole ne nous a pas non plus permis d'obtenir des surfaces homogènes.

Les mesures d'angle de contact constituent en général un test très simple de l'état d'une surface. Pour les surfaces d'or, ces mesures sont pourtant délicates. En effet, il a été montré que l'or est très mouillant à condition de travailler dans des conditions extrêmes (dépôt de l'or sous ultra-vide puis passage direct de l'ultra-vide à une atmosphère contrôlée de gaz inerte) (Smith 1980). Dans l'air ambiant du laboratoire, quelques minutes après avoir sorti les surfaces de l'évaporateur, l'angle de contact se stabilise à 81°. Les surfaces traitées avec la molécule thiol-NTA présentent un angle de contact de 64°. Après les traitements au nickel,

l'angle de contact est toujours de 64°. La polyhistidine semble s'adsorber de la même manière sur la surface NTA, sur la surface traitée au nickel, ou sur la surface d'or (mesures d'angle de contact, images AFM – figure 2.6, microbalance à quartz).



**Figure 2.6 : Polyhistidine non specific adsorption on NTA surfaces**

Après beaucoup d'efforts infructueux, nous n'avons pas réussi à fonctionnaliser nos surfaces avec la molécule thiol-NTA de manière à obtenir une interaction spécifique avec la polyhistidine. Au cours de cette période, nous avons réalisé de nombreuses tentatives de mesures AFM que nous avons finalement renoncé à exploiter en raison de conditions expérimentales insuffisamment maîtrisées et d'une reproductibilité insuffisante.

L'adsorption de la polyhistidine sur les surfaces d'or est un résultat inattendu de ces expériences. Nous avons choisi de mieux caractériser cette adsorption afin de pouvoir l'utiliser pour décorer la pointe de l'AFM avec de la polyhistidine (&2.3).

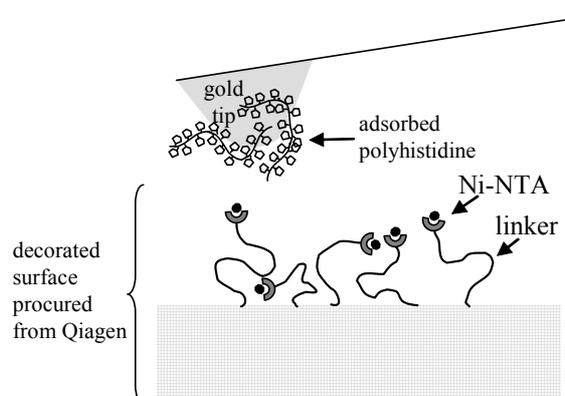
### 2.2.3 Adsorption et solubilité du polymère

La polyhistidine est une polybase. La chaîne latérale de l'histidine ayant un pKa de 6.0, à pH neutre le polymère n'est pas chargé et il forme des agrégats. Pour adsorber le polymère, il faut se placer à un pH où le polymère est soluble, c'est-à-dire un pH acide où les cycles imidazoles des chaînes latérales sont protonés. Mais il est bien connu que lorsque l'histidine est protonée, elle ne peut former de complexe avec le Ni-NTA. Baisser le pH est l'une des méthodes de récupérations des protéines étiquetées histidine en chromatographie d'affinité (Schmitt et al 1993).

Ces deux contraintes contradictoires rendaient pratiquement impossible la réalisation du schéma initialement envisagé (figure 2.5).

## 2.2.4 Configuration retenue pour les mesures de force par AFM

En raison des différents obstacles rencontrés, nous avons adopté une autre stratégie visant à mesurer les forces nécessaires pour rompre le complexe histidine-Ni-NTA. Plusieurs surfaces présentant des groupes Ni-NTA sont vendues pour permettre l'immobilisation de protéines étiquetées histidine. Nous avons acheté des surfaces Qiagen décorées par des groupements Ni-NTA. La stratégie retenue est présentée sur la figure 2.7. La pointe de l'AFM est dorée puis recouverte d'une couche de polyhistidine par simple adsorption. Malgré nos demandes insistantes auprès de Qiagen, nous n'avons pu obtenir d'informations précises sur la nature du lien entre la surface et le groupement Ni-NTA.



**Figure 2.7: configuration used in our histidine Ni-NTA force measurements**

## **2.3 Propriétés de la polyhistidine en solution**

Les homopolymères d'acides aminés ont été synthétisés à partir du début des années 1950 (Katchalski-Katzir 1997). Certains de ces homopolymères présentaient des transitions structurales en solution qui ont suscité des études approfondies de leur comportement, tant au niveau théorique qu'expérimental (polylysine, poly-L-acide glutamique). La polyhistidine a fait l'objet de plusieurs études au début des années 1970 (Peggion et al 1971, Terbojevich et al 1972). Malheureusement, celles-ci sont incomplètes et en partie contradictoires. Il semblerait tout de même qu'elles mettent en évidence une transition d'un état désordonné à bas pH (polymère chargé) à un état ordonné en feuillet à pH plus élevé (polymère neutre). Cependant, l'interprétation des résultats est rendue difficile en raison de l'agrégation qui se produit à pH élevé et des propriétés optiques particulières de ce polymère (voir &2.3.2).

L'étude complète des propriétés en solution de la polyhistidine n'était pas le sujet de cette thèse et aurait probablement nécessité un très fort investissement tant ce polymère réagit de manière complexe. Notre étude s'est donc limitée à quelques expériences visant à comprendre globalement l'influence du tampon, du pH et de la concentration en sel sur l'état du polymère en solution. Nous avons ensuite réalisé quelques mesures de dichroïsme circulaire pour voir si le polymère formait des hélices lorsqu'il s'approche du pH neutre et quelques mesures de rayons X pour détecter la formation éventuelle d'agrégats dans la solution.

### **2.3.1 Résultats qualitatifs**

Le polymère, acheté chez *SIGMA*, est une polyhistidine hydrochlorure. Ceci signifie qu'il est solidifié en présence d'acide chlorhydrique. Lorsqu'on dissout ce polymère dans l'eau, on obtient une solution limpide de pH acide. Toutes les expériences décrites dans cette partie ont été réalisées à des concentrations de l'ordre de 1mg/ml. Si l'on augmente le pH, le taux de charge du polymère diminue et à partir d'un pH<sub>critique</sub> proche du pKa de la chaîne latérale (6.0, voir figure 2.3), la solution devient laiteuse, puis, si on la laisse reposer quelques heures, on obtient deux phases de pH différents (pH<sub>phase laiteuse</sub> > pH<sub>phase limpide</sub>).

Le pH<sub>critique</sub> dépend légèrement du tampon utilisé, de la taille du polymère et surtout, de la concentration en sel. Augmenter la concentration en sel permet d'augmenter la valeur du pH critique. Ce comportement peut sembler surprenant. La polyhistidine est un polyélectrolyte. Notre première intuition était que l'ajout de sel écrante les interactions électrostatiques

## *Interactions spécifiques*

répulsives entre les monomères chargés et favorise donc l'association. Deux phénomènes peuvent cependant venir compenser cet effet. D'une part, si les charges sont écrantées, le polymère peut être plus chargé puisque l'énergie correspondant à la présence de deux charges proches le long de la chaîne sera inférieure. D'autre part, lorsque l'on s'approche de la transition, une interaction attractive de type dipolaire entre monomères non chargés pourrait devenir prépondérante, l'écrantage de cette interaction pourrait expliquer l'augmentation du pH critique avec la concentration en sel. Ces deux éléments sont des pistes de réflexion pour comprendre le comportement de ce polymère.

Nous avons réalisé des mesures de temps de passage dans un viscosimètre capillaire en fonction du pH. Le temps de passage reste constant jusqu'à la transition *limpide* → *laiteux*, ce qui semble indiquer que l'association des chaînes se produit de manière brutale. D'autres manipulations sur ce polymère nous ont permis de voir que son état en solution dépend fortement de la manière dont il a été préparé.

Nous avons aussi augmenté la température d'une solution trouble et observé que la solution restait trouble sur tout le domaine testé (jusqu'à 100°C). L'ajout de chlorure de guanidinium ne permet pas non plus de resolubiliser les agrégats ce qui semble indiquer que ce ne sont pas des interactions hydrophobes qui sont responsables de l'agrégation. En effet, le chlorure de guanidinium est connu pour ces propriétés de dénaturation des protéines. Il agit en favorisant l'exposition au solvant des résidus hydrophobes (Haschemeyer & Haschemeyer).

### 2.3.2 Dichroïsme circulaire

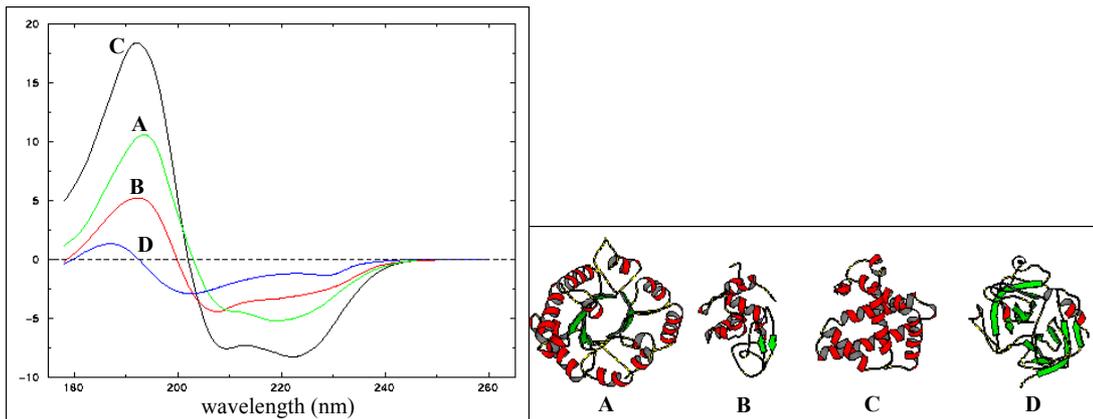
Le dichroïsme circulaire (CD) est une propriété très sensible à la structure secondaire des protéines, des peptides et des homopolypeptides. La spectroscopie CD est un type de spectroscopie d'absorption qui mesure la différence d'absorption entre de la lumière polarisée circulairement droite et de la lumière polarisée circulairement gauche. Il a été montré que l'analyse des spectres CD pour des longueurs d'onde entre 180 et 260 nm permettait de déterminer la part des différentes structures secondaires dans la structure globale d'une protéine (figure 2.8).

Nous avons effectué des mesures de CD dans différentes solutions tampons et à différents pH. Ces mesures réalisées à l'ESBS (école supérieure de biotechnologie de Strasbourg) n'ont pas mis en évidence de changement de structure secondaire de la polyhistidine : le polymère ne présente pas d'ordre local dans l'ensemble des conditions testées. La figure 2.9 montre un

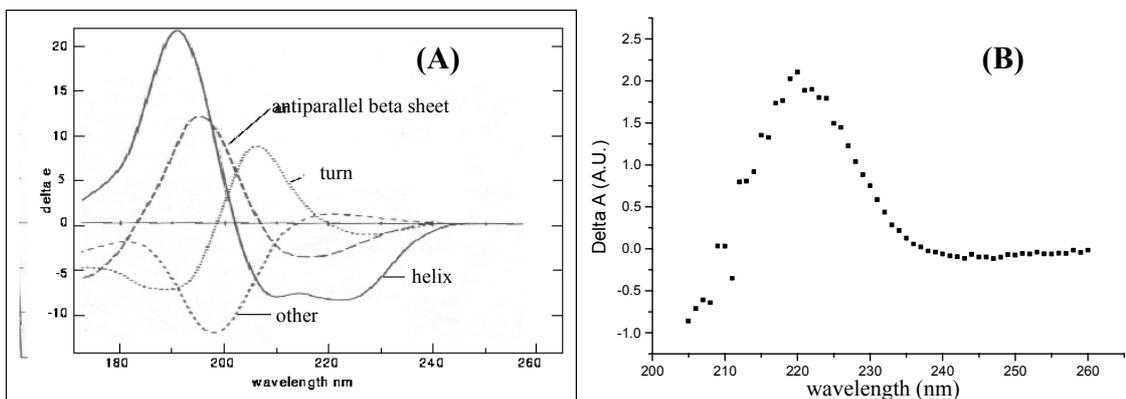
## Interactions spécifiques

spectre typique que nous avons obtenu pour la polyhistidine ainsi que les spectres typiques correspondant aux différents éléments de structure secondaire des protéines.

Il faut cependant noter que le cycle imidazole se comporte comme un chromophore autour de 220 nm. Il n'est donc pas sûr qu'il soit légitime de comparer le spectre de la polyhistidine aux spectres typiques de la figure 2.8.



**Figure 2.8: Circular dichroism spectra and schematic representations of triosephosphate isomerase (A), hen egg lysozyme (B), myoglobin (C), and chymotrypsin (D).** *From the web pages of the Karolinska Institute (Sweden)*



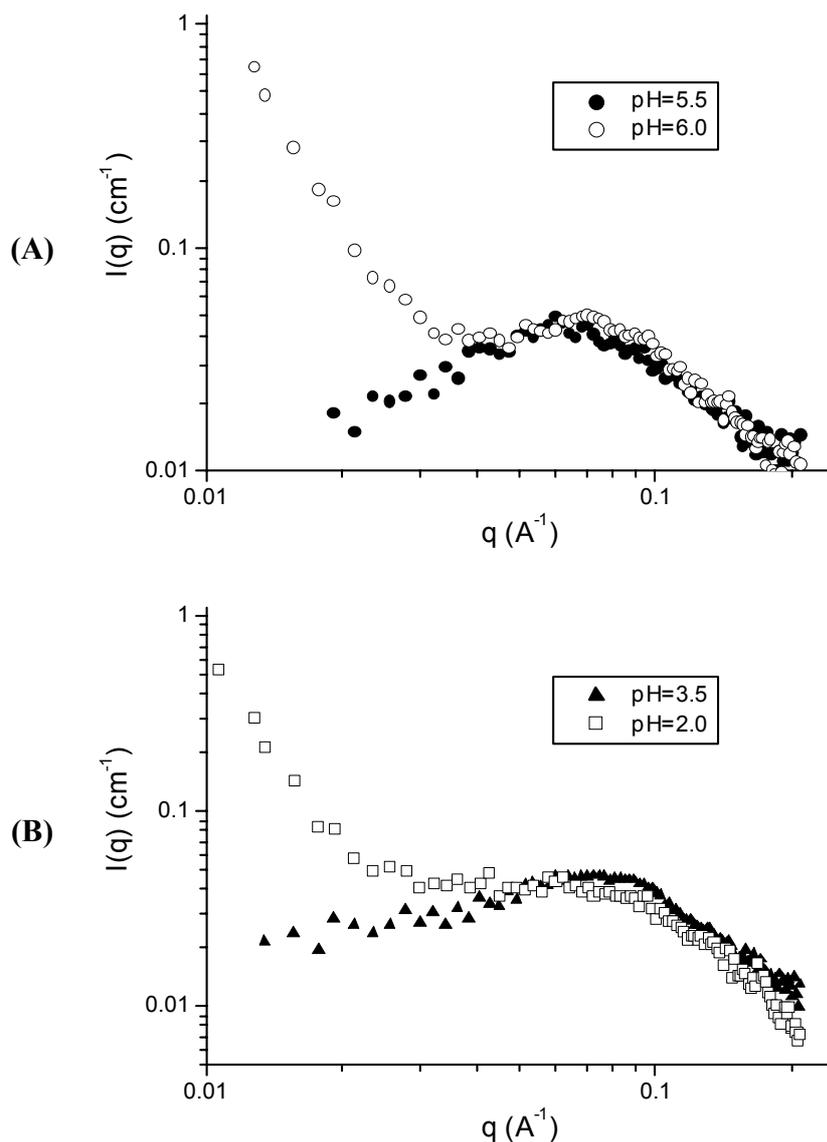
**Figure 2.9: Circular dichroism spectra of "pure" secondary structures (A) [From the web pages of the Karolinska Institute (Sweden)], and polyhistidine (B).**

### 2.3.3 Diffusion de rayons X

Nous avons mesuré les spectres de diffusion de rayons X aux petits angles d'une série de six solutions de polyhistidine de pH allant de deux à six (en absence de sel ajouté). Pour des pH compris entre 3.5 et 5.5, ils sont caractéristiques de solutions de polyélectrolytes flexibles. Ils présentent en effet un maximum large qui s'interprète comme un trou de corrélation, c'est-à-dire comme une distance minimale séparant deux chaînes (de Gennes et al 1976, Dobrynin et al 1995, Hayter et al 1980, Pfeuty 1978).

La figure 2.10.A présente les spectres obtenus à pH 5.5 et à pH 6.0. Dans les deux cas, on observe la bosse des polyélectrolytes. Toutefois à pH 6.0, on observe aussi une remontée aux petits angles indiquant une démixtion de la solution. Celle-ci se manifeste aussi visuellement : la solution devient trouble.

Pour des pH inférieurs à 3.5, il semble qu'une autre transition se produise. En particulier, à pH 2.0, la bosse des polyélectrolytes tend à disparaître et on observe corrélativement une remontée aux petits angles qui cette fois n'est pas liée à une observation visuelle (figure 2.10.B, pas de démixtion visible à l'œil). Pour le moment, nous n'avons pas d'interprétation de cette transition à bas pH. Il est toutefois étonnant que pour des pH où le polymère est le plus chargé, la bosse des polyélectrolytes disparaisse. Des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour reproduire et comprendre ce comportement.



**Figure 2.10: X-ray scattering of polyhistidine (without added salt)**

### 2.3.4 Conclusion

Cet ensemble d'expérience consacré à l'étude de la polyhistidine en solution indique que le polymère ne présente ni agrégation ni structure secondaire à pH 5.5. Les molécules sont dispersées dans l'eau et on peut donc espérer obtenir une couche adsorbée homogène.

Nous n'avons pas cherché à décrire l'ensemble du diagramme de phase du polymère en fonction de la concentration en sel, de la concentration en polymère et du pH. Une telle étude permettrait de mieux comprendre les propriétés de ce polymère.

## **2.4 Adsorption de la polyhistidine sur l'or**

Initialement, l'adsorption de la polyhistidine sur l'or aurait dû être un contrôle négatif visant à démontrer la spécificité de l'interaction sur nos surfaces modifiées. Mais nous avons observé que, sous certaines conditions de pH, la polyhistidine s'adsorbe sur l'or. Nous avons choisi de mieux caractériser cette adsorption afin de l'utiliser comme moyen de fonctionnaliser la pointe de l'AFM avec de la polyhistidine.

### **2.4.1 Microbalance à quartz (QCM)**

La technique de microbalance à quartz est bien connue depuis plusieurs dizaines d'années. Le composant principal de l'appareil est un fin disque de quartz dont les deux faces sont couvertes par des électrodes métalliques. Comme le cristal de quartz est piézoélectrique, une tension alternative imposée entre les deux électrodes provoque un déplacement de cisaillement du disque. Cette oscillation est extrêmement sensible à tout changement se produisant à la surface du cristal. En 1959, Sauerbrey démontre que la fréquence de résonance varie linéairement lorsque l'on dépose une masse sur la surface. Il devient alors possible de mesurer la quantité de matière déposée lors d'une évaporation sous vide avec une précision inférieure au nanogramme. Les applications à des études d'adsorption de polymères ou de protéines en solution ont commencé au début des années 1980, après la mise au point de circuits oscillants à hauts gains capables de surmonter l'amortissement de l'oscillation dû à la viscosité du liquide.

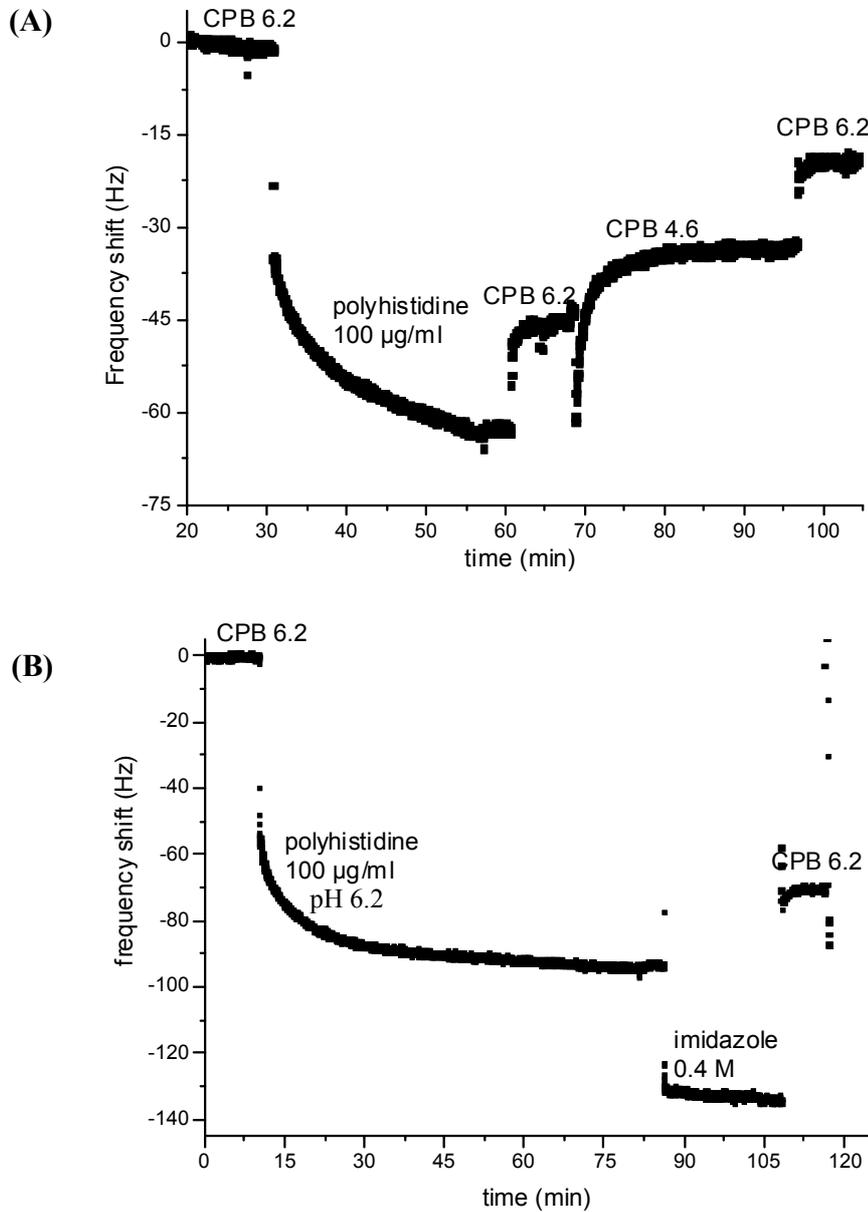
La physique permettant de décrire les oscillations, à plusieurs mégahertz, d'une surface rugueuse et molle dans un fluide complexe est encore mal comprise. Malgré cela, la technique s'est rapidement développée pour des études d'hybridation d'ADN et d'ARN, d'adsorption de protéines ou de cellules sur des surfaces fonctionnalisées ou sur des membranes supportées (pour revue : (Janshoff et al 2000a)) ou de l'adsorption séquentielle de polyélectrolytes.

Parallèlement au QCM, d'autres techniques basées sur la détection d'ondes évanescentes ont été mises au point pour la mesure de quantités adsorbées à des interfaces solide-liquide (résonance de plasmon de surface, miroir résonant, réflexion interne totale avec excitation de molécules fluorescentes ; pour revue : (Garland 1996)).

Ces techniques ont suscité une active recherche dans le domaine de la fonctionnalisation. En effet, leur application à l'étude de l'interaction entre deux molécules nécessite l'immobilisation de l'une des molécules. Dans nos travaux, le QCM a été utilisé pour

## Interactions spécifiques

caractériser l'adsorption de la polyhistidine sur l'or. La surface du quartz est couverte d'une fine couche d'or et on observe l'adsorption de molécules en solution sur la surface.



**Figure 2.11: Histidine adsorption on gold surfaces (QCM)**

Frequency shift of the third harmonic of the QCM is plotted as a function of time.

(A) : Adsorption of polyhistidine on gold surface and desorption at pH 4.6.

(B) : Adsorption of polyhistidine on gold surface. The layer is not desorbed by the addition of imidazole.

CPB 6.2 is an abbreviation for citrate phosphate buffer pH = 6.2

La figure 2.11 présente le décalage de la fréquence de résonance (troisième harmonique,  $F = 15$  Mhz) en fonction du temps. Les injections des différents analytes sont visibles par des sauts de la fréquence de résonance correspondant au changement de milieu en volume. La

cinétique d'adsorption de la polyhistidine sur l'or est clairement visible sur la figure. La figure 2.11 A montre que la couche adsorbée se désorbe partiellement lorsque l'on passe à un pH acide (pH = 4.6). D'autres expériences indiquent que si le polymère est solubilisé à pH 4.6, la quantité de polymère adsorbée est extrêmement faible. Ces résultats ne sont pas surprenants si l'on prend en compte les propriétés de solubilité de la polyhistidine. A mesure que l'on augmente le pH, la polyhistidine devient de moins en moins soluble et s'adsorbe de plus en plus fortement sur la surface d'or.

La figure 2.11 B prouve que la couche de polyhistidine n'est pas désorbée lorsqu'on ajoute de l'imidazole. Ce résultat était attendu, mais il s'agit d'un contrôle important puisque l'ajout d'imidazole sera utilisé dans la suite pour démontrer la spécificité des interactions Ni-NTA-histidine.

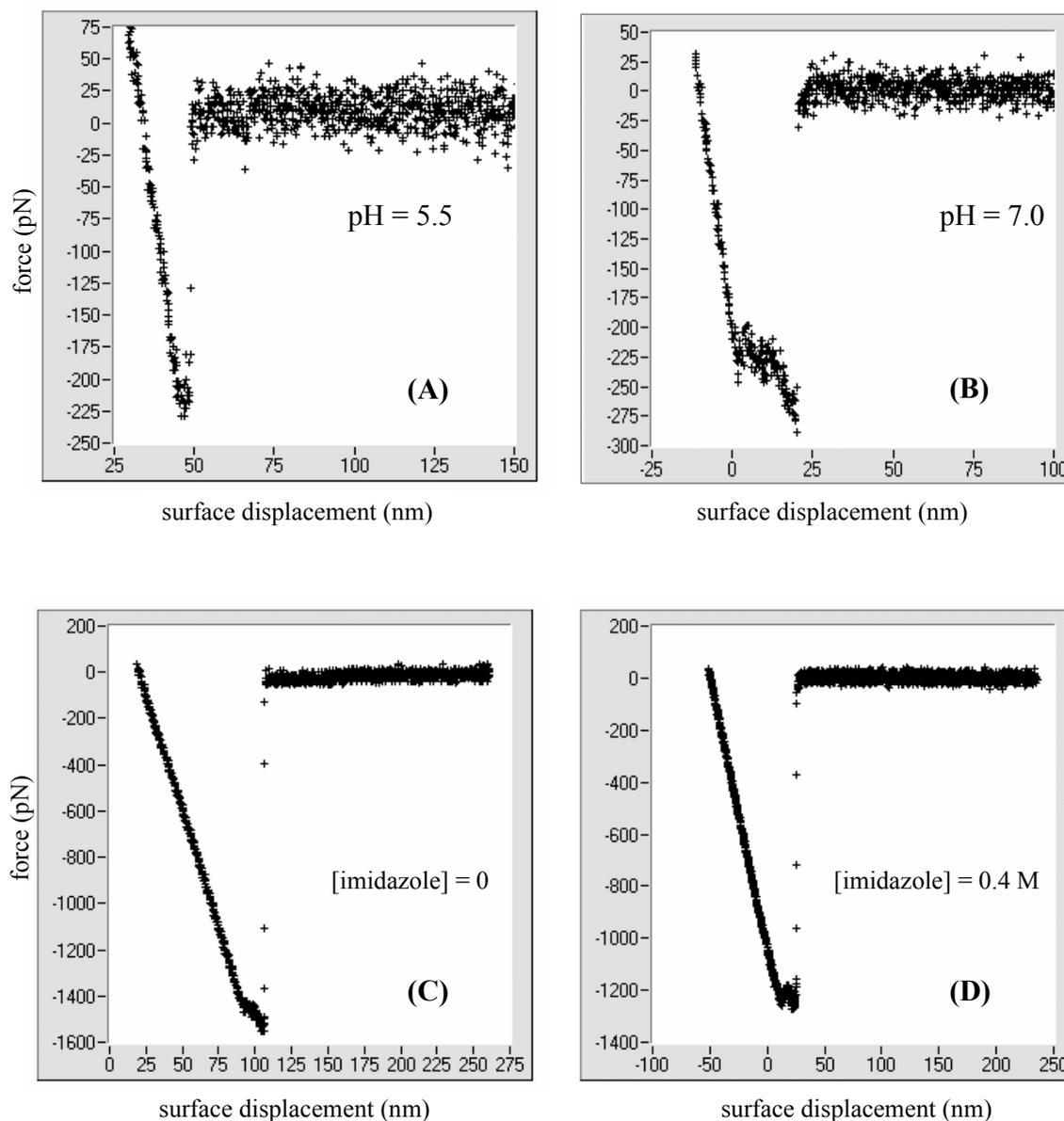
### **2.4.2 Mesures de forces par AFM**

Nous avons réalisé une série de mesures de force par AFM en adsorbant le polymère soit sur la surface, soit sur la pointe, et en faisant varier le pH de la solution.

Le protocole d'adsorption a été conservé dans toutes les expériences ; il consiste à incuber la surface d'or dans une solution tampon de pH égal à 5.5 (citrate phosphate) contenant 100  $\mu\text{g}$  de polyhistidine par millilitre. La solution est ensuite progressivement remplacée par une solution tampon identique sans polymère, puis par la solution dans laquelle auront lieu les mesures de force. Ce protocole sera aussi celui utilisé pour décorer la pointe pour les mesures nickel-histidine (&2.5).

## Interactions spécifiques

La figure 2.12 présente quelques courbes de force typiques. L'augmentation du pH de 5.5 à 7.0 entraîne une forte augmentation de la force d'adhésion (figure 2.12 A et B) alors que l'ajout d'imidazole à forte concentration ne la modifie pas (figure 2.12 C et D). Il faut noter que lorsque la polyhistidine est adsorbée sur la pointe, on peut effectuer plusieurs centaines de cycles d'approche-retrait à pH 7.0, sans que le polymère ne se désorbe.



**Figure 2.12: Histidine adsorption on gold surfaces (AFM typical force curves)**

(A) and (B) : AFM force curves between a gold tip and a gold surface with polyhistidine adsorbed as a function of pH.

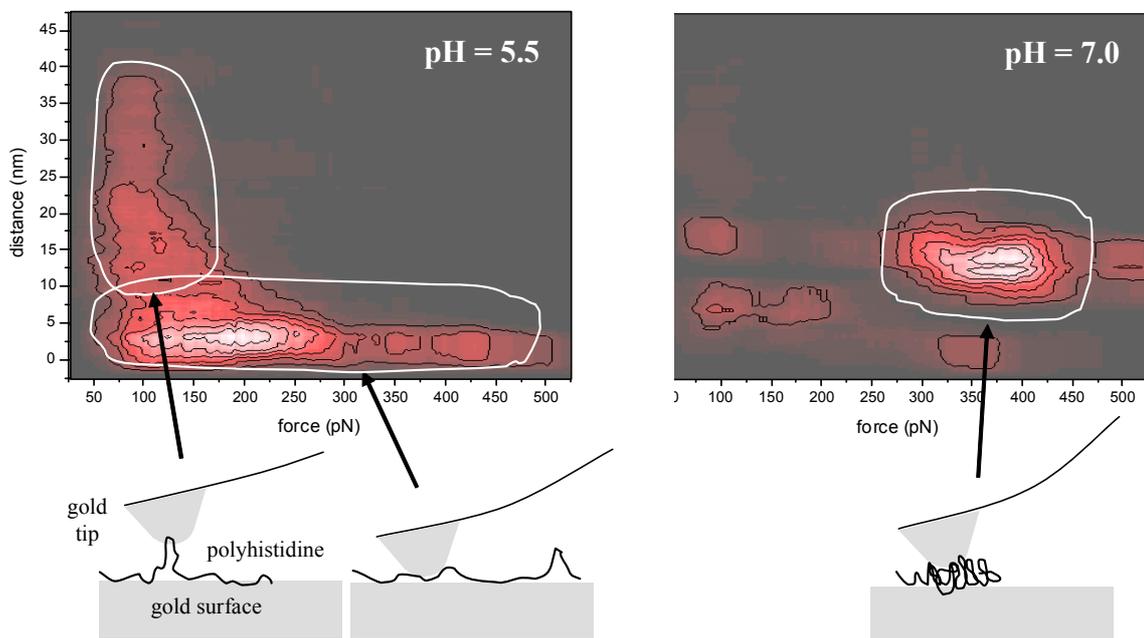
(C) and (D) : AFM force curves between a gold tip with adsorbed polyhistidine and a gold surface as a function of imidazole concentration

## Interactions spécifiques

La figure 2.13 présente sous la forme de cartes de densité l'ensemble des ruptures observées dans deux séries de 1500 courbes de force réalisées à pH 5.5 et 7.0. On observe un changement radical de la distribution des ruptures. A pH 5.5, la distribution se caractérise par deux bras. Le premier correspond à des très faibles distances (inférieures à 5 nm) avec des forces comprises entre 70 et 300 pN et un maximum net vers 200 pN. Ces événements correspondent probablement à la rupture de multiples liens en parallèle formés par le polymère confiné entre les deux surfaces très proches. Le second correspond à des faibles forces (inférieures à 120 pN) et à des distances comprises entre 10 et 40 nm. Ces ruptures, plus rares, sont consécutives à l'étirement d'une boucle de polymère qui forme un lien entre la pointe et la surface.

A pH 7.0, la distribution est centrée autour d'une force typique (380 pN) et d'une distance typique (12 nm). On interprète cette distribution comme l'étirement des polymères effondrés adsorbés sur la surface.

Cette série d'expériences montre que la présentation des résultats sous forme de carte de densité permet de corrélérer l'état du polymère (effondré et insoluble à pH 7.0 et plutôt étalé avec quelques boucles à pH 5.5) et les forces d'interaction.



**Figure 2.13: Histidine adsorption on gold surfaces (density map of rupture events)**

Condensed view of several hundreds of ruptures between a gold tip and a polyhistidine coated gold surface, at pH 5.5 (left) and pH 7.0 (right). Schema show our interpretation of the density maps.

### 2.4.3 Conclusion

Nous avons démontré que l'adsorption de la polyhistidine sur l'or fournissait un moyen de décorer la pointe d'AFM pour des expériences réalisées à pH neutre. L'imidazole n'a pas d'influence sur cette adsorption. Lorsque l'on adsorbe le polymère sur une pointe de grand rayon de courbure, on mesure des forces d'adhésion supérieures à 1 nN et le polymère reste sur la pointe pendant plusieurs centaines de cycles.

## **2.5 Mesures de force nickel-histidine : coopérativité et fluctuations**

Nous avons utilisé l'adsorption de la polyhistidine sur l'or pour décorer une pointe d'AFM. L'interaction entre la polyhistidine et des fonctions Ni-NTA liées à une surface par l'intermédiaire d'un lien flexible (surfaces Qiagen) a ensuite été mesurée par AFM. Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article ci-dessous. Quelques résultats complémentaires sont discutés à la suite de l'article.

Une nouvelle approche de l'analyse des ruptures nous a permis de mettre en évidence des effets de coopérativité des liaisons multiples et de reformation des liaisons par les fluctuations du lien polymère.

2.5.1 Article soumis

**Impact of linker fluctuations and cooperative nature  
of multiple bonds as revealed by in depth analysis of  
AFM data**

R. Lévy and M. Maaloum

Institut Charles Sadron - Université Louis Pasteur  
6 rue Boussingault 67083 Strasbourg cedex, France

***Abstract***

Interactions involving multiple bonds occur throughout biology, and have distinct properties that are fundamentally different from those present in single bond systems. The experimental studies of these interactions under dynamic loading, by in depth analysis of atomic force microscopy force measurements, permits an extraction of simple laws from a large number of complicated force profiles. These results provide evidence of an important phenomenon which can be implicated in the mechanism of a specific molecular interaction: the effect of rebinding via linker fluctuations.

## *Interactions spécifiques*

Specific molecular interactions play important roles in governing numerous biological events and processes. Attempts to investigate the forces that characterise these interactions have been limited by the lack of suitable techniques to measure the forces between individual molecules. Atomic force microscopy (AFM) is not only an excellent tool for recording the surface topography of a sample, but it has also been shown to be a good means of performing the local measurement of specific molecular interactions between the AFM tip and the sample. Several authors have shown that it is possible to directly measure such specific binding forces between individual molecules on the sample and the corresponding binding partner attached to the tip (Dammer et al 1996, Dammer et al 1995, Florin et al 1994, Lee et al 1994, Moy et al 1994). Such binding forces help shed new light on the molecular recognition process.

However, interactions involving multiple bonds have become a new focus of study (Mammen et al 1998). The ability to understand these interactions is important and relevant because on one hand, multiple bonds have distinct properties and can provide the basis for mechanisms of biological interactions that are fundamentally different from those present in single bond systems. On the other hand, many biological systems interact through not just single but multiple molecular bonds.

Most authors who use the AFM to measure the interaction forces between molecules, measure the rupture force and observe, in a specific number of cases, a more or less clear quantization of this force. However, the distribution of the rupture forces is the result of a complicated energy landscape, corrupted by thermal fluctuations, and possibly by the presence of several parallel bindings (Evans 2001, Merkel et al 1999). Consequently, the interpretation of measured unbinding forces is more complicated than was generally believed. Therefore statistics over a very large number of events are necessary in order to obtain a significant distribution. Nevertheless, after these are obtained, methods for performing quantitative and systematic analyses of the experimental data relating to these complexes are still crucial in so far as these would add a new dimension to our understanding of biological processes in molecular terms. However, several questions remain to be answered. How should the statistics be represented? How can the relevant information be extracted from these statistics in order to characterise the phenomena? How can physical phenomena be observed by a simple analysis of the force curve profiles?

The present study addresses these questions by making the dynamic force measurements ranging from a single bond to a system involving several bonds of the same type.

We have used a home-made AFM to measure the interaction forces between polyhistidine and nitrilotriacetic acid (NTA) loaded with a metal ion, nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ ). Histidine is an amino acid

## *Interactions spécifiques*

capable of binding to an ionic nickel. This complex is currently used in molecular biology, in immobilised-metal affinity chromatography (IMAC), to purify proteins that have previously been modified genetically by the addition of several histidine amino acids (Gaberc-Porekar & Menart 2001, Hochuli et al 1987). Elution of the target protein is achieved either by protonation using buffers with lower pH, or with imidazole. This latter is used, at nearly neutral pH, in order to block the binding site of the Ni-NTA on the surface. Numerous interesting proteins from a biological point of view are thus available possessing this histidine label.

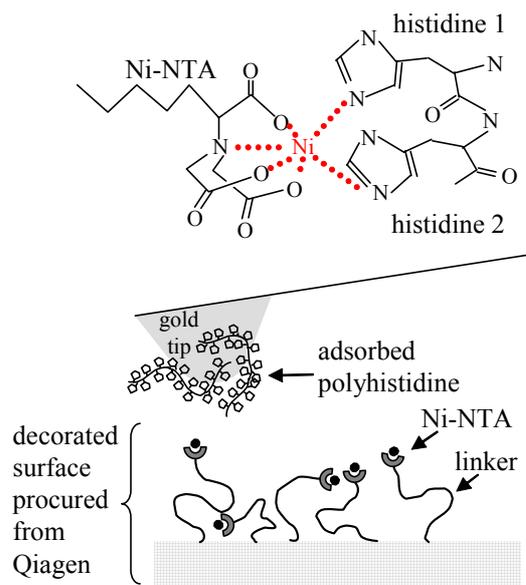
Two other groups have evaluated the interaction force between histidine and Ni-NTA at one particular loading rate, using exactly the same experimental method, and have obtained strongly contradictory results (Conti et al 2000, Schmitt et al 2000). The difference between the values estimated by the authors is more than a factor of 10 (500 pN for the first group and 38 pN for the second). This reflects on one hand, the difficulties of measuring interactions involving multiple bonds and on the other hand, it shows the pitfalls of the AFM method for studying binding processes.

The principle of a force measurement by AFM is simple: a surface is repeatedly extended towards and retracted away from a sharp tip (fixed to a cantilever) and the position of the tip is recorded as a function of the surface displacement. To achieve accurate quantitative results, it is imperative to measure as precisely as possible the spring constant of the cantilever. The thermal fluctuation method has been shown to be a good method when the shape of the mode and the repartition of the energy between the vibration modes are taken into account (Lévy & Maaloum 2002b). The spring constant of the cantilever used in our experiments is equal to  $32 \pm 3$  mN/m.

In order to obtain significant results, it is generally necessary to perform a large number of approach-retraction cycles, followed by statistical evaluation of the position and the amplitude of the ruptures. We have developed a program which allows us to automatically detect these ruptures (Lévy & Maaloum 2002a). The algorithm is based on an analysis of the standard deviation in a sliding window along the length of the force curve. This program constitutes an important step forward because the time required to analysis the curves is significantly reduced, thus allowing the user to perform multiple experiments.

We have adsorbed polyhistidine (Sigma) on a gold-coated tip and then measured the interaction forces with a functionalised surface (Qiagen) (figure 2.14).

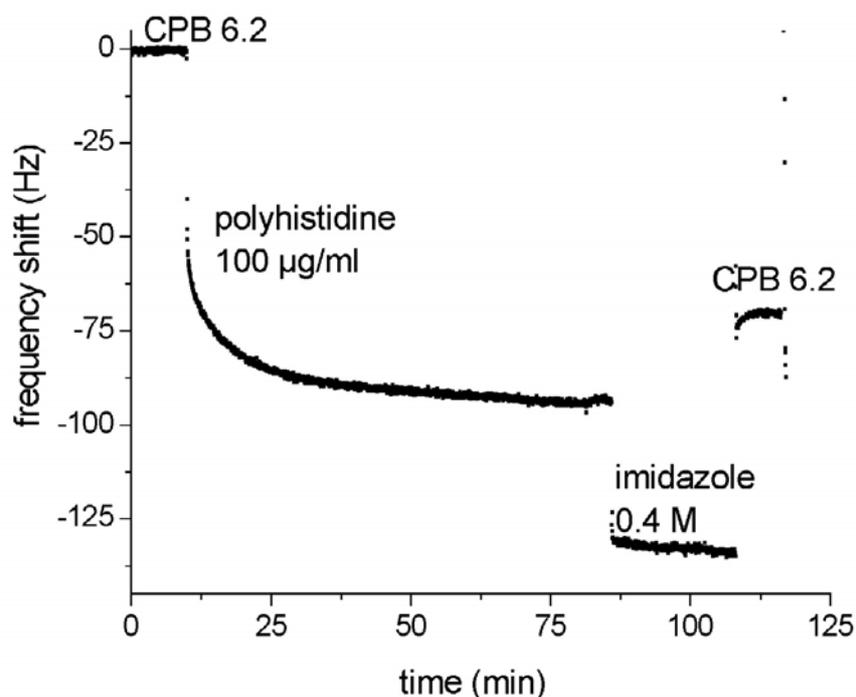
## Interactions spécifiques



**Figure 2.14: Schematic of our histidine Ni-NTA force measurements.**

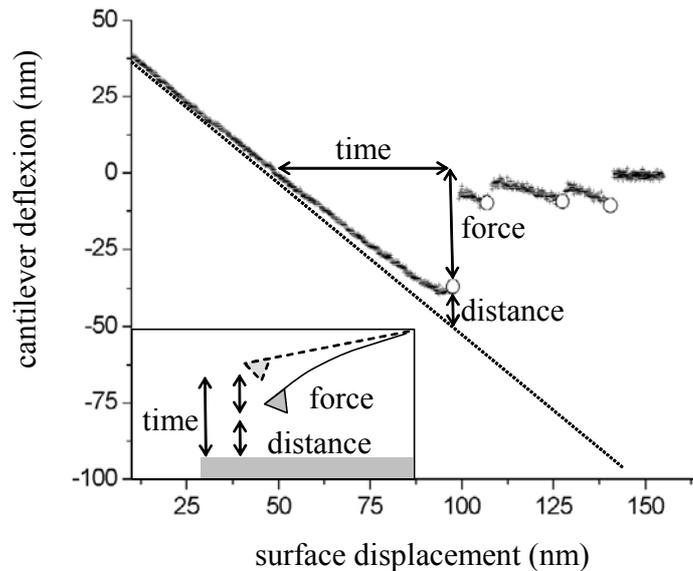
The affinity of polyhistidine to the gold surface has been demonstrated using the quartz crystal microbalance (QCM). Recently, this technique has been shown to be a sensitive tool for the kinetic study of protein and cell adsorption (Janshoff et al 2000a). The QCM is based on the piezoelectric nature of quartz crystal. The change of mass on the QCM is electrically detected as a shift in resonant frequency with sensitivity in the  $\text{ng}/\text{cm}^2$  regime.

The change in frequency as a function of time during adsorption of polyhistidine at pH 6,2 on the gold surface is shown in Fig. 2.15. Upon addition of the polyhistidine solution ( $t=0$ ), a rapid frequency decrease (mass increase) was followed by a slower decrease indicating that the adsorption of polyhistidine was taking place on the gold surface. The exposure of the quartz crystal by the polyhistidine solution was interrupted by replacing it by an imidazole solution and then by a pure buffer solution, which resulted in a small instantaneous change in the frequency. These results show that the adsorption of polyhistidine on the gold surface is irreversible and also that the adsorption is not disturbed by the imidazole. This is an indispensable control, since the imidazole is used to show the specificity of the Ni-NTA/histidine interactions in the AFM experiments.



**Figure 2.15: Time profile of the frequency shift due to the adsorption of polyhistidine on the gold surface (QCM).** The layer is not desorbed by the addition of imidazole. CPB 6.2 is an abbreviation for citrate phosphate buffer pH=6.2.

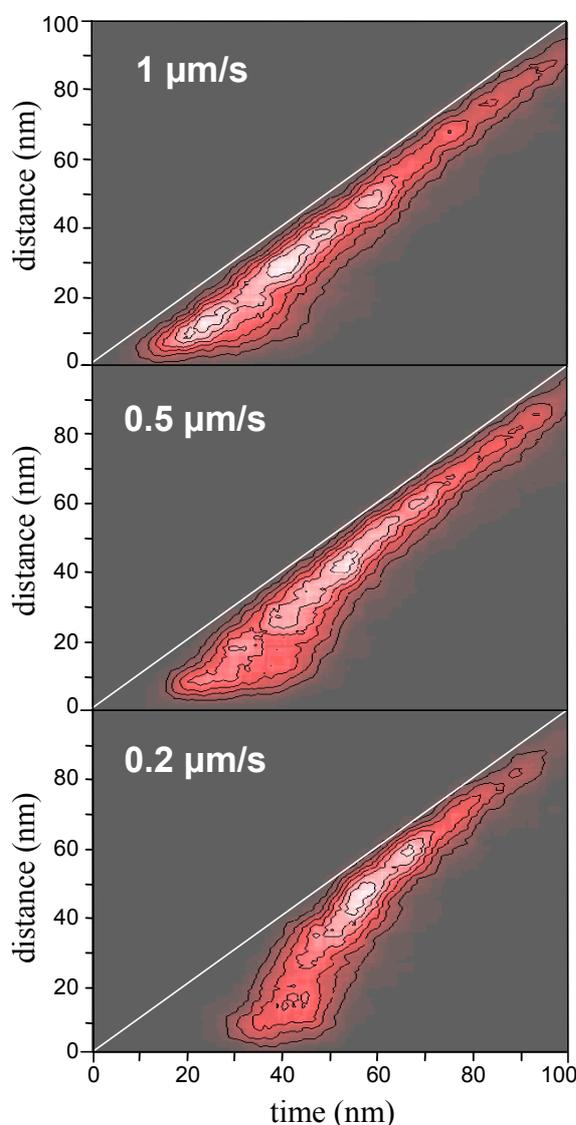
Fig. 2.16 shows a characteristic shape of the force versus extension unbinding traces associated with the rupture of the coordination bond between polyhistidine and Ni-NTA in citrate phosphate buffer solution at pH 7.5. If the contact involves the formation of a bridge between the tip and the surface, the retraction of this latter exerts a force which involves an increasing flexion of the cantilever, up to a rupture point. Events were recognized by unbinding traces with single or multiple saw tooth patterns. Each tooth consists of a part with a rising deflection followed by a sudden jump. The rising part corresponds to the stretching of the molecular bridge; the jump reflects the break bond and provides an estimate of the rupture force, the time needed to break the bond and the distance between the tip and the surface. To validate the biological specificity of the Ni-NTA/histidine interaction, imidazole was added to the solution to block the binding site of the Ni-NTA on the surface. After addition of imidazole the probability of rupturing decreased strongly. Note that the adhesion force between the gold surface and polyhistidine is of the order of 1.6 nN and is not modified by the presence of the imidazole. These results show clearly that the bond ruptures observed in Fig. 2.16 can be assigned to the Ni-NTA/histidine.



**Figure 2.16: A typical AFM force curve between polyhistidine and Ni-NTA with four rupture events.** The force curve is recorded at pH 7.5 with a retraction speed of 0.5  $\mu\text{m/s}$ . The open circles are the rupture events detected by our program. Arrows show the force, the distance between the tip and the surface, and the rupture time of the first rupture. The time in seconds is obtained by dividing by the retraction speed. The force in pN is obtained by multiplying by the spring constant of the cantilever (32  $\text{mN/m}$ ).

The dependence of the rupture force, the time needed to break the bonds and the distance between the tip and the surface on the pulling velocity, in density map form, is represented in Fig. 2.17. The diagonal line corresponds to the ruptures that would be produced at zero force. The area above the diagonal corresponds to positive force. As can be deduced from the density map no quantization in force is observed. A quantization in force would correspond to periodicities parallel to the diagonal, which is not the case here. The distribution of the force is identical beyond 45 nm in distance (60 nm in time) in the range of 0,2 - 1  $\mu\text{m/s}$  of retraction velocity. In contrast, a strong dependence on the speed of the retraction is observed below this distance (45 nm). The variation of the mean distribution events with pulling velocity is shown in Fig. 2.18. As can be deduced from Fig. 2.18, beyond 45 nm in distance, the mean binding force in the Ni-NTA/histidine system is independent of the retraction speed and has a value equal to  $240 \pm 25$  pN. Beyond 45 nm few bonds bridge between the tip and the surface. The probability of rebinding, beyond this distance, is very small. This force is attributed to the interaction Ni-NTA/histidine at the single molecule level. Compared with other AFM experiments, 240 pN is of the same order of magnitude as the interaction of biotin/streptavidin. The mean force associated with this rupture is independent of the speed retraction in the range of 0.2 - 1  $\mu\text{m/s}$ . In this range of retraction speed, a small variation of the force as a function of speed pulling is expected. In the case of cadherin (Baumgartner et al

2000a) and biotin/avidin (Merkel et al 1999) interactions probed by AFM, a variation of the order of 20 pN, in the range of 0.1 – 1  $\mu\text{m/s}$ , was obtained, which is within the error bars of the measurements.

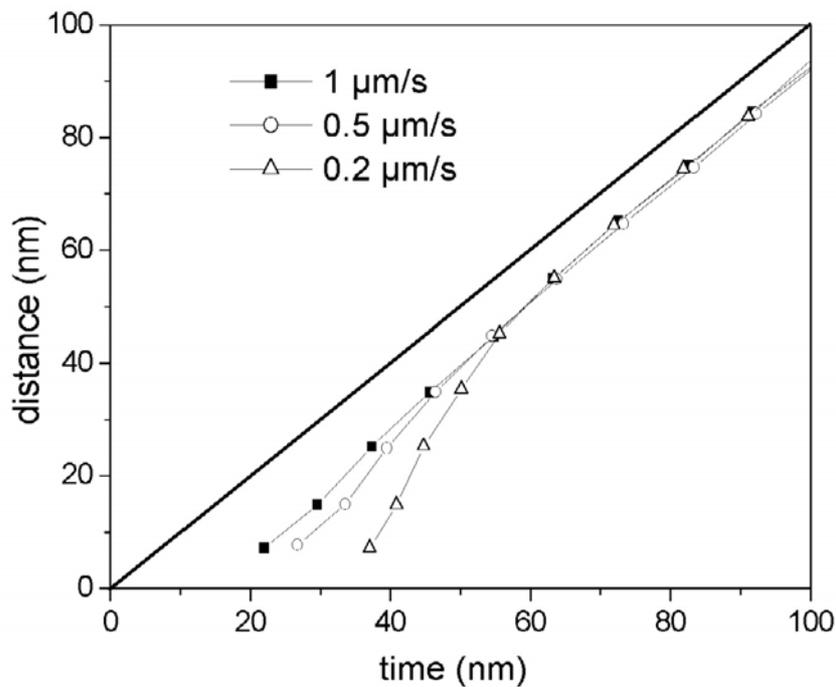


**Figure 2.17: Density maps presenting all the rupture events for each retraction speed.**

For each point in the plane time/distance, the density is calculated from the number of ruptures occurring within a 10 nm x 10nm square. Each figure is obtained from analysis of 800 approach/retraction cycles presenting more than 2000 rupture events.

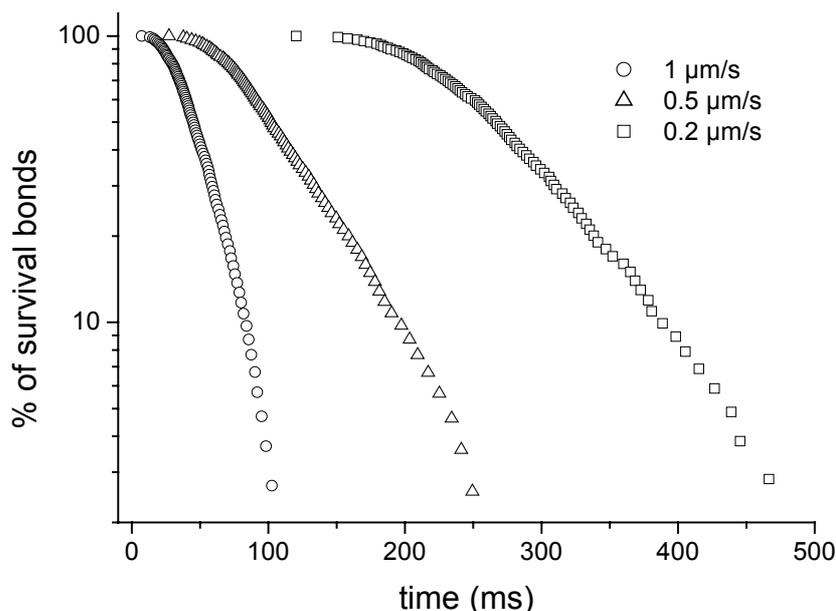
The most distinctive regime is the behaviour of the mean force below 45 nm. The mean binding forces increase with decreasing pulling velocity. Such behaviour is different from the dependence of the loading rate for single rupture bonds or bonds in series (Evans & Ludwig 2000, Strunz et al 1999). This dependence has not been found in the first theoretical work regarding parallel bonds, probably due to the dynamic of the linker which has not been taken into account (Seifert 2000, Seifert 2002). At short time, when the speed retraction is

decreased, the force increases because more time is available to the molecule Ni-NTA groups to bind and rebind to polyhistidine, particularly when the linker is used. This phenomenon is very favourable in the case where the sites are dense, which is true in our system, since each monomer of the polyhistidine is susceptible to complex itself with the nickel. This is the first time that such behaviour has been observed using AFM. Most authors who use the AFM to measure the interaction forces between molecules, because of the complexities of the force curves, analyse the last rupture and/or choose the experimental conditions to minimize the number of bonds. The observed behaviour of the multiple parallel bonds, at short time, is taken to be a signature of rebinding effect via linker fluctuations.



**Figure 2.18: The variation of the mean distribution events with pulling velocity.**  
The mean force distribution can be deduced by taking the horizontal difference between the diagonal line and the data.

Fig. 2.19 presents the curve of the number of survival bonds  $N$  versus time. This is the first time that the data from AFM force measurements have been investigated in this manner. Up to a certain time, the increasing force does not affect the number of bonds. The time  $\tau$  is equal to 190 ms, 60 ms and 23 ms corresponding to the speed retractions 0,2  $\mu\text{m/s}$ , 0,5  $\mu\text{m/s}$  and 1  $\mu\text{m/s}$  respectively ( $\tau$  is estimated at  $N = 90\%$ ). For a given loading rate, this time corresponds to the time required to cause the first rupture. Note that  $\tau_{0,2 \mu\text{m/s}}$  is more than five times  $\tau_{1 \mu\text{m/s}}$  indicating again the rebinding effect at short time. After this time,  $N$  decreases exponentially with a time decay characteristic of the following ruptures.



**Figure 2.19: The number of survival bonds, normalised by the total number of ruptures, versus time.** For each time, the number of survival bonds is calculated from the number of ruptures detected after this time. Note that the expression “survival bonds” is used here in an abusive manner, since some ruptures may correspond to the breakage of several bonds.

As can be seen from Fig.2.19, this way of analysing the force curve measurements, by investigating the dependence of survival bonds on time, allows us to extract a simple law from a large number of complicated force profiles.

The most important conclusions that we reach through this set of studies are:

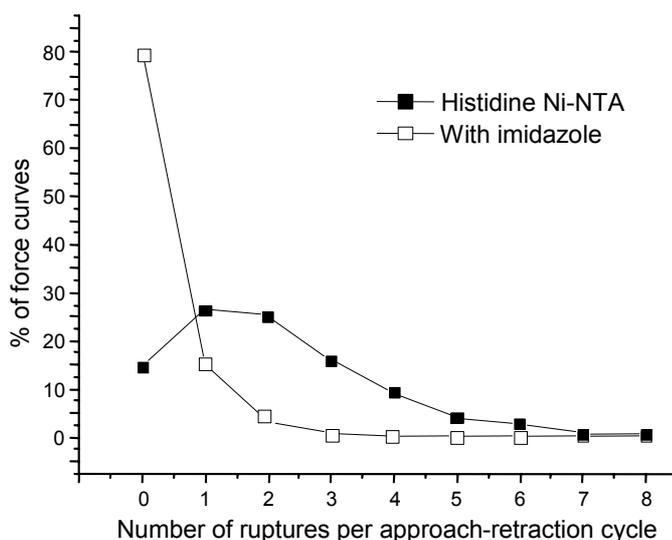
We have developed a new way to analyze statistically the AFM force measurements in order to extract relevant information and to characterise the interactions involving multiple bonds.

Our study reveals a physical phenomenon playing an important role in the systems involving multiple parallel bonds: rebinding via the fluctuation of the linker.

In addition, the experimental study of the multiple parallel bonds Ni-NTA/histidine under dynamic loading serves to illustrate some of the distinct and interesting properties of multiple interactions. It sheds new light on our understanding of a bond that forms the basis for important tools for molecular biology and shows that the AFM measurements can be adapted to the detection of biomolecular interactions in systems containing multiple molecular components.

### 2.5.2 Résultats complémentaires

La figure 2.20 montre l'effet de l'imidazole sur le nombre de ruptures par cycle. Comme nous l'avons indiqué dans l'article, on observe que la probabilité qu'une ou plusieurs ruptures se produisent décroît fortement en présence d'imidazole. L'imidazole, en bloquant les sites Ni-NTA sur la surface, supprime presque complètement l'interaction entre la pointe et la surface. Ce contrôle démontre que les interactions mesurées en l'absence d'imidazole sont bien dues à la formation d'un complexe Ni-NTA-histidine.



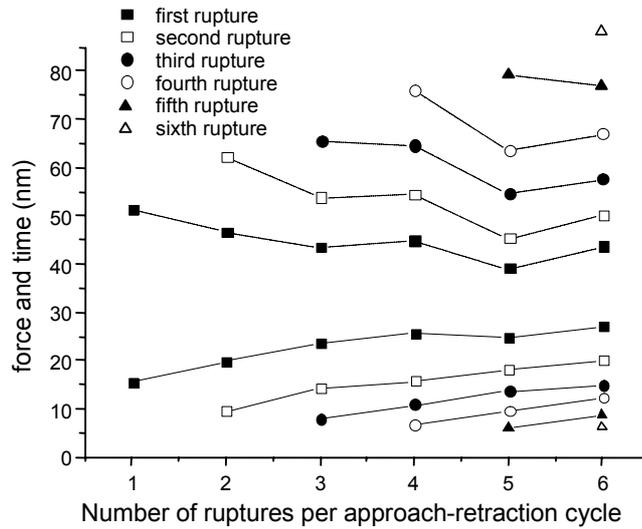
**Figure 2.20: Effect of imidazole on rupture probability**

Dans l'article, nous avons considéré l'ensemble des ruptures sans tenir compte de leur ordre d'apparition lors de la rétraction. La figure 2.21 présente une analyse plus détaillée. La force et le temps moyens des ruptures successives sont tracés en fonction du nombre de ruptures par courbe. La principale limitation de ce type d'approche est la nécessité de travailler sur un très grand nombre de mesures : en subdivisant les résultats en sous-classes de résultats, on est amené à calculer des moyennes sur des échantillons très petits. Des comportements généraux se dégagent de la figure.

Lorsque le nombre de ruptures par courbe augmente, les ruptures se produisent plus tôt et pour des forces plus importantes. Ceci montre que les forces correspondant à la rupture d'un lien sont affectées par l'existence des autres liens. On peut regarder ce graphique différemment : si l'on regarde la dernière rupture (la sixième lorsqu'il y a six ruptures, la cinquième lorsqu'il y en a cinq, etc.), on constate qu'elle se produit plus tard et pour des

## Interactions spécifiques

forces plus faibles lorsque le nombre de ruptures par courbe augmente. La dernière rupture correspond à la destruction du ou des derniers ponts qui lient la pointe à la surface. Cette décroissance de la force moyenne indique donc que, probablement, lorsqu'il y a peu de ruptures par courbe, celles-ci correspondent à la rupture de plusieurs liens.



**Figure 2.21: In depth analysis of successive ruptures**  
Dashed line corresponds to mean time and solid line to mean force

## **Troisième partie : polymères adsorbés**

### **3.1 Introduction**

Les macromolécules interagissent en général fortement avec les surfaces. En effet, même si le gain d'énergie par monomère est faible, lorsqu'un monomère est adsorbé, il y a une forte probabilité que d'autres monomères s'adsorbent. Ce gain d'énergie doit être comparé à la perte d'entropie de la chaîne pour prédire sa conformation (Andelman & Joanny 2000, Daoud 2000, de Gennes 1979). Cette propriété des polymères est utilisée dans de très nombreuses applications : stabilisation de suspensions colloïdales (industries pharmaceutique, agroalimentaire) ou au contraire floculation pour le traitement des eaux, contrôle des propriétés adhésives ou de la biocompatibilité des surfaces, etc. La compréhension des phénomènes d'adsorption de polymères a donc suscité un important effort théorique. D'un point de vue expérimental, les grandeurs mesurées sont soit des propriétés moyennes de la couche adsorbée (épaisseur à l'aide du QCM ou de l'ellipsomètre, topographie par images AFM, profil de concentration par diffusion de neutrons ou de rayons X) soit des propriétés qui dépendent de l'adsorption (diffusion de la lumière et viscosité de solutions colloïdales).

Dans ce contexte, les mesures de force constituent un outil original qui permet de sonder la matière de l'échelle de la molécule unique à celle de la couche dense de polymère. Depuis le milieu des années 1995, la physique de la molécule unique est devenue un domaine de recherche très actif. A travers leur profil d'étirement pour des faibles forces, on accède à l'élasticité entropique des chaînes (Maaloum & Courvoisier 1999, Ortiz & Hadziioannou 1999). Pour des forces plus importantes, les courbes révèlent l'existence de transitions structurales dans les polysaccharides (Rief et al 1997b), le polyéthylène-glycol (Oesterhelt et al 1999), ou l'ADN (Cluzel et al 1996). Enfin, pour des forces encore plus importantes, on atteint un autre régime élastique lié à la déformation du squelette de la chaîne complètement étirée (élasticité enthalpique). L'existence de plateaux dans les courbes de force a été observée pour des polyélectrolytes (Châtelier et al 1998, Hugel et al 2001) et pour des polymères en mauvais solvant (Al-Maawali et al 2001, Haupt et al 2002). Dans ce dernier cas, les interprétations du plateau diffèrent suivant les auteurs. Dans le premier article, les auteurs invoquent une instabilité de type Rayleigh où une chaîne est extraite d'un globule de polymères effondrés. Dans le deuxième, les auteurs interprètent le plateau par le glissement du polymère le long de la surface.

Avec les études sur les polyélectrolytes, on passe d'une recherche centrée sur les propriétés de la molécule en solution à une recherche qui doit prendre en compte l'interaction du polymère

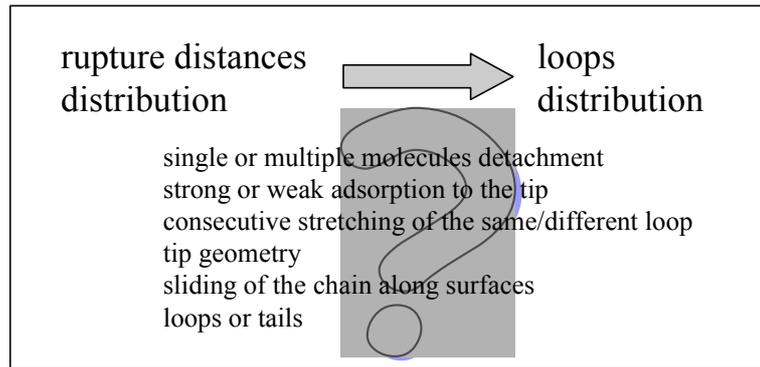
## *Polymères adsorbés*

avec la surface. Plusieurs études théoriques prédisent toute une série de comportements en fonction du taux de charge du polymère et de la surface, de la longueur d'écrantage de la solution et de la qualité du solvant (Châtellier & Joanny 1998, Tamashiro & Schiessel 2000, Vilgis et al 2000).

En 1998, Senden et al publient des résultats sur le système polydiméthylsiloxane/heptane/silice et suggèrent une méthode pour déterminer la distribution de boucles d'un polymère adsorbé en l'identifiant à la distribution des distances de ruptures (Senden et al 1998). Les mêmes auteurs déterminent de cette manière la conformation de dérivés du polyacrylamide sur des surfaces de mica dans l'eau (Senden et al 2000). La même démarche a été suivie au laboratoire par Florian Ozon pour caractériser l'adsorption de polyampholites sur des surfaces chargées (Ozon 2001). Le concept de distribution de boucles est issu des études théoriques de l'adsorption de polymères. Il semble raisonnable de penser que les distances de ruptures sont corrélées avec la taille des boucles. Cependant, l'identification du concept théorique avec la distribution des distances de ruptures repose sur des hypothèses très fortes. Elle suppose notamment que la distribution de boucles n'est pas affectée par la compression de la couche de polymère par la pointe AFM, elle ne prend en compte ni une éventuelle convolution de la distribution de boucles avec la géométrie de la pointe, ni le fait que les ruptures ne se produisent pas forcément lorsqu'une chaîne est complètement tendue (Haupt et al 1999). D'un point de vue expérimental, plusieurs questions restent en suspens : les sauts observés dans les courbes de force sont-ils causés par la destruction de liens polymère/pointe ou polymère/surface ? Étire-t-on une seule chaîne ? Étire-t-on un brin ou une boucle ? Les polymères peuvent-ils relâcher de la contrainte en glissant sur les surfaces ?

L'interprétation des résultats de mesures de force par AFM sur des polymères adsorbés dépend des réponses que l'on donne à ces questions (figure 3.1). A titre d'exemple, dans un article publié en 2001, à partir du même type de mesures que celles publiées par Senden et al, mais en faisant des hypothèses différentes (débobinage des boucles par glissement de la chaîne le long des surfaces puis extension à partir d'un seuil de friction), Al-Maawali et al déterminent la polydispersité de chaînes de poly(diméthylsiloxane), c'est-à-dire la longueur des chaînes plutôt que la longueur des boucles (Al-Maawali et al 2001).

Deux revues récentes de la littérature résument l'essentiel des résultats obtenus dans le domaine de l'extension des polymères par AFM (Hugel & Seitz 2001, Janshoff et al 2000b).

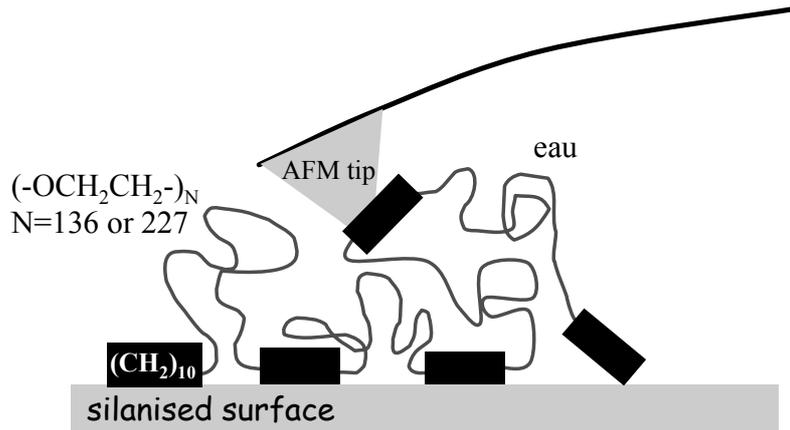


**Figure 3.1: Interpretation of rupture distances in AFM experiments**

Pour approcher ces questions, nous avons réalisé des expériences avec des copolymères modèles synthétisés par Jean-Marie Catala (Institut Charles Sadron). L'idée de départ était d'imposer la distribution de boucles du polymère en utilisant un polymère présentant des séquences hydrophiles de longueurs déterminées séparées par des séquences hydrophobes devant servir d'ancre sur la surface et sur la pointe. Cet ensemble d'expériences n'est pas entièrement satisfaisant car le protocole d'adsorption du polymère n'est pas bien contrôlé et les propriétés du copolymère en solution n'ont pas été étudiées. Cependant, les résultats obtenus montrent des propriétés remarquables et inattendues. Afin de mieux comprendre ces résultats, nous avons poursuivi cette étude par des expériences avec de la polylysine. Ce polyélectrolyte s'adsorbe fortement sur le verre et sur le nitrure de silicium (pointe de l'AFM) permettant ainsi de réaliser très facilement des courbes de forces présentant de nombreux décrochages.

### **3.2 Copolymères modèles**

Les deux copolymères modèles utilisés dans nos expériences sont décrits sur la figure 3.2. Il s'agit d'une succession régulière de blocs hydrophobes  $(CH_2)_{10}$  et de blocs de POE (polyoxyéthylène). Les deux copolymères diffèrent uniquement par la longueur du segment de POE qui peut être de 136 ou de 227 monomères. Par la suite, on nommera POE136 le copolymère dont le bloc de POE comprend 136 monomères et POE227 celui dont le bloc de POE est constitué de 227 monomères. La longueur totale du polymère est mal caractérisée contrairement à la taille des segments qui est monodisperse.

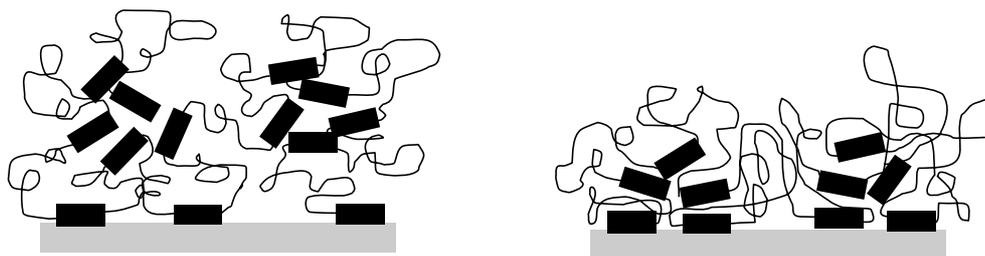


**Figure 3.2: Model adsorption and stretching of copolymers**

In this model, the size of the loops is directly deduced from the length of the POE block ( $N=136$  or  $227$ ).

### 3.2.1 Préparation des surfaces

Dans les expériences présentées, la couche de polymère est obtenue par simple évaporation d'une solution de copolymère à 0.17g/l dans du méthanol déposée sur une surface de silicium qui a été silanisée au préalable. Après évaporation, une goutte d'eau est déposée sur la surface et les mesures de force sont réalisées dans l'eau. Ce protocole n'est pas satisfaisant, les couches obtenues ne sont pas homogènes (des agrégats de plusieurs dizaines de microns sont visibles en microscopie optique) et il est très peu probable que la conformation initiale des polymères attrapés par la pointe AFM soit celle décrite dans la figure 3.2. On peut notamment s'attendre à la formation de micelles ou d'hémimicelles de copolymères connectées à la surface, et éventuellement interconnectées (figure 3.3).

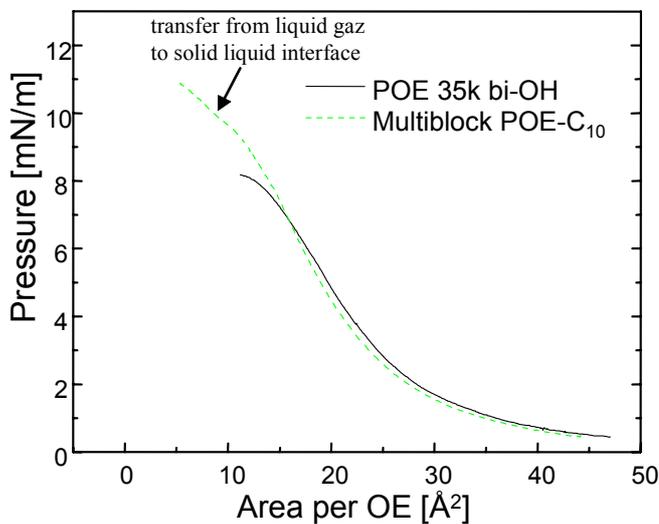


**Figure 3.3: Copolymer at the solid-liquid interface**

The figure presents two possible conformations of the copolymer at the solid-liquid interface. Further studies would be necessary to characterize the real conformation.

D'autres tentatives de préparation des surfaces dans des conditions plus contrôlées ont été effectuées sans résultat probant. Nous avons essayé de préparer les surfaces par transfert à partir de polymères déposés à l'interface eau-air. La figure 3.4 présente une isotherme de

compression de la couche de polymère. Malheureusement, aucune extension de polymère n'a été détectée dans les mesures AFM effectuées sur ces surfaces indiquant, soit que le transfert ne s'est pas effectué, soit que la couche transférée n'est pas stable. Le POE a une affinité pour l'interface eau-air (Barentin 1999). La présence d'une majorité de monomères de POE à l'interface lors du transfert pourrait expliquer l'absence de transfert ou l'instabilité. Cette explication est confortée par les isothermes de compression du POE et des copolymères modèles (figure 3.4). Les monomères hydrophobes stabilisent le POE à l'interface : le plateau à 8 mN/m disparaît. Mais la similitude entre les deux courbes indique que seule une très faible fraction du POE plonge dans l'eau. De plus, il est possible qu'au lieu de former des boucles, on forme des micelles qui quittent complètement l'interface.

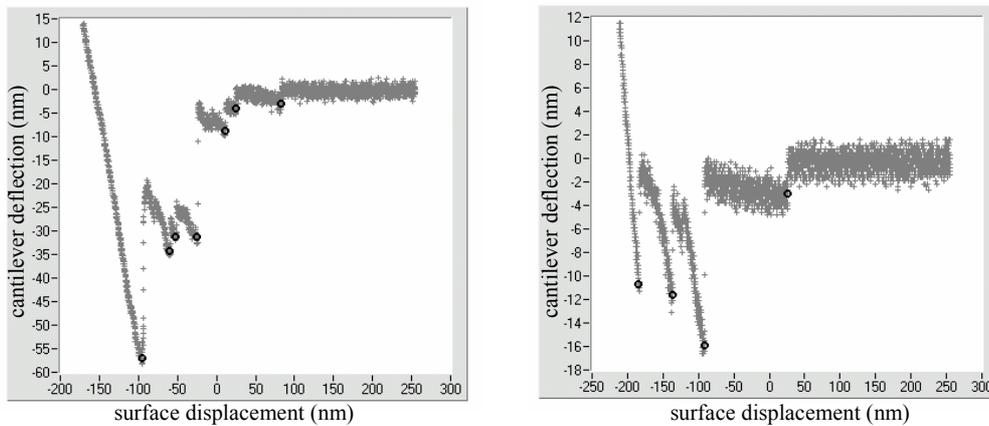


**Figure 3.4:**  
**Compression isotherms of POE**  
**homopolymer and copolymer at**  
**the air-water interface**

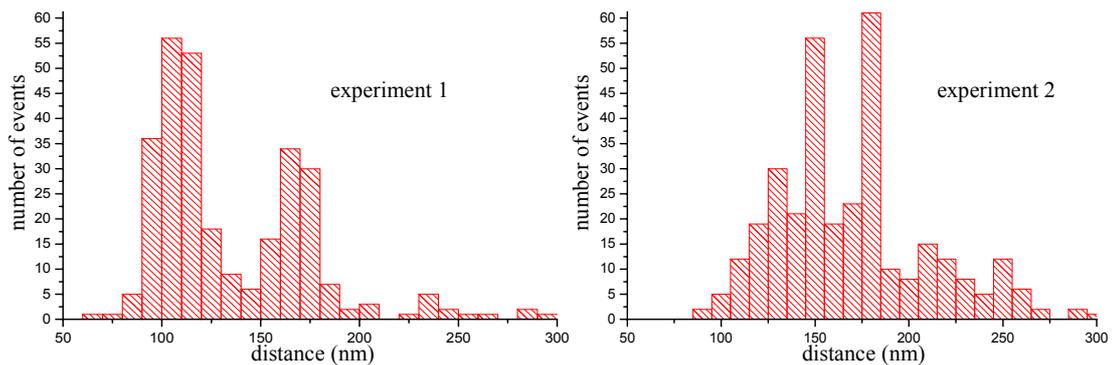
### 3.2.2 Résultats

La figure 3.5 montre deux exemples de courbe de force enregistrés en présence de copolymère. Pour chaque courbe, on détecte les différentes ruptures. On nommera « dernier saut » celui qui se produit à la plus grande distance de la surface. La figure 3.6 présente les distributions de distance des derniers sauts obtenus dans deux expériences indépendantes, réalisées dans les mêmes conditions (POE136, préparation des surfaces décrites ci-dessus, mesures de forces dans l'eau). On note d'abord que les deux histogrammes sont très différents. Dans les deux cas, des distances privilégiées apparaissent nettement (110 et 170 nm pour la première expérience ; 150 et 180 nm pour la deuxième). Ces distances ne semblent pas corrélées avec la longueur de contour du bloc de POE (environ 50 nm pour le POE136). L'évolution de la distance du dernier saut au cours de l'expérience montre clairement que ces distances privilégiées sont associées à un moment de l'expérience (figure 3.7). Pendant

l'expérience 1, la distance du dernier saut reste constante à 170 nm pendant un grand nombre de cycles, puis, brutalement, elle passe à 100 nm et y reste pendant plus d'une centaine de cycles. Pendant l'expérience 2, on observe une oscillation, pendant 150 cycles entre deux distances privilégiées (150 et 180 nm).

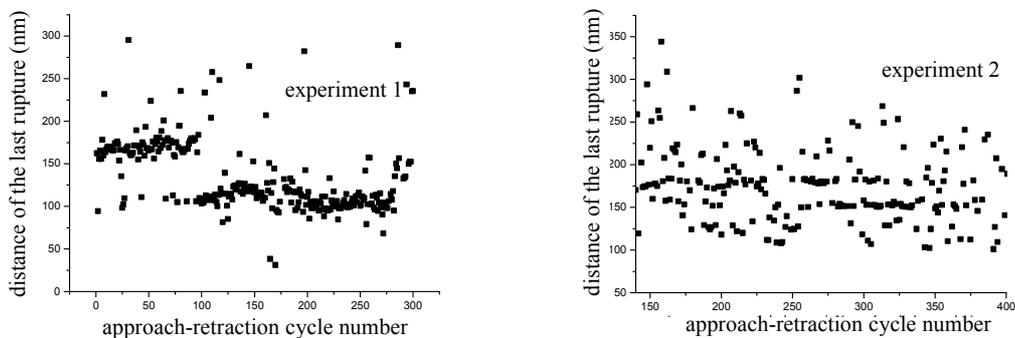


**Figure 3.5: Force curves with a copolymer (N=136) on a silanised surface**



**Figure 3.6: distance distribution of the last rupture**

Left and right histograms show the results of two independent experiments in the same conditions. For each experiment, more than 600 approach retraction cycles were analysed.

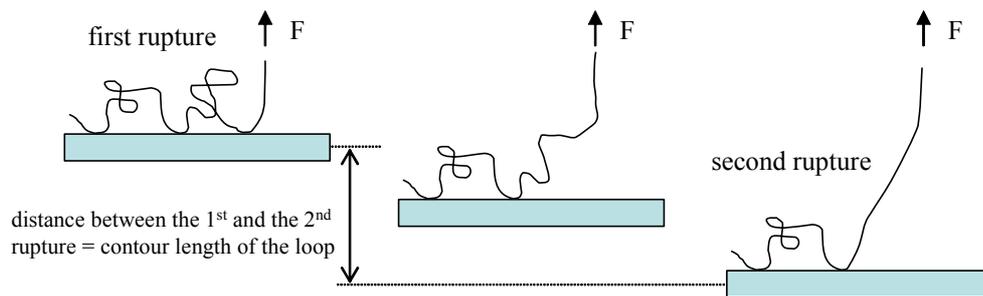


**Figure 3.7: Evolution of the last rupture distance with time**

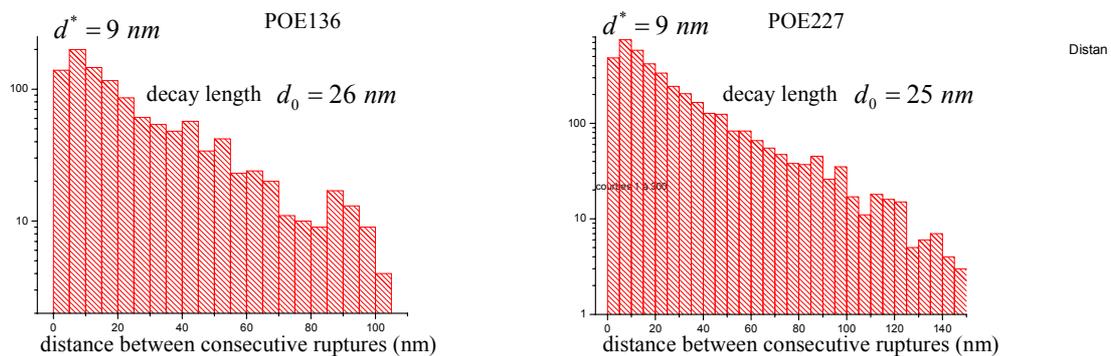
Les expériences réalisées avec le POE227 présentent exactement les mêmes caractéristiques. Des distances typiques non reproductibles d'une expérience à l'autre apparaissent. Celles-ci

sont du même ordre de grandeur que celles mesurées avec le POE136 et elles sont associées à un moment de l'expérience.

L'image la plus simple d'une expérience d'étirement d'une chaîne est dessinée sur la figure 3.8. On tire le polymère par un bout, lorsque la chaîne est tendue entre le point d'exercice de la force et le premier point d'ancrage sur la surface, une première rupture se produit ; la surface s'éloigne et lorsque la chaîne est à nouveau tendue, une deuxième rupture se produit. Dans cette vision simpliste, la distance entre deux sauts consécutifs est une mesure directe de la taille des boucles.



**Figure 3.8: Schematic of polymer pulling**



**Figure 3.9: Distribution of the distance between consecutive ruptures**

La figure 3.9 donne, en échelle semi logarithmique, la distribution des distances entre ruptures consécutives pour deux expériences réalisées respectivement avec le POE136 et avec le POE227. Si la conformation du polymère était la conformation idéalisée décrite sur la figure 3.2 et la distance entre rupture une mesure de la distribution de boucles, on s'attendrait à des distributions centrées autour de 50 nm pour le POE136 et de 80nm pour le POE227. On voit nettement que les résultats expérimentaux sont en total désaccord avec ces hypothèses. Au lieu d'une distribution centrée sur une valeur caractéristique, on observe une décroissance exponentielle sur presque deux décades à partir d'une distance  $d^*$  (maximum de la distribution,  $d^* \approx 9nm$ ). Le taux de décroissance  $d_0$  de cette exponentielle est le même pour les deux expériences et est reproductible sur l'ensemble de ces expériences ( $d_0 = 25nm$ ).

### 3.2.3 Conclusions et perspectives

Ces travaux sur l'adsorption des copolymères illustrent la difficulté d'interpréter les mesures de force et notamment la distribution des distances de ruptures. Le système lui-même nécessiterait de meilleures caractérisations en solution et à l'interface pour pouvoir être qualifié de « système modèle ». Une meilleure connaissance du comportement de ces copolymères permettrait peut-être de comprendre la similitude entre les résultats obtenus avec le POE136 et avec le POE227.

La corrélation forte entre les distances mesurées dans des cycles successifs d'approche-retrait montre que l'on sonde une même configuration de l'interface. Ceci va clairement contre l'idée que l'on puisse déterminer une distribution de boucles en faisant des cycles au même endroit de la surface. Pour ce système, la moyenne temporelle sur des cycles successifs n'est pas du tout équivalente à une moyenne sur l'ensemble de la surface. L'analyse des cycles successifs pourrait par contre se révéler comme un moyen d'étude des dynamiques lentes des couches de polymères.

La décroissance exponentielle de la distribution des interdistances est le deuxième résultat marquant de cette série d'expériences. De manière très étonnante, cette forme de distribution est parfaitement reproductible sur l'ensemble des expériences réalisées avec les deux copolymères et la longueur de décroissance est elle aussi conservée (entre 22 et 26nm sur 5 expériences indépendantes). En analysant de la même manière des séries d'expériences réalisées avec d'autres polymères, nous avons retrouvé ce comportement qui n'est donc pas lié à la nature chimique de ce copolymère.

Afin de comprendre cette loi, nous avons réalisé des expériences sur un système plus simple, en tout cas du point de vue expérimental : la polylysine adsorbée sur le verre.

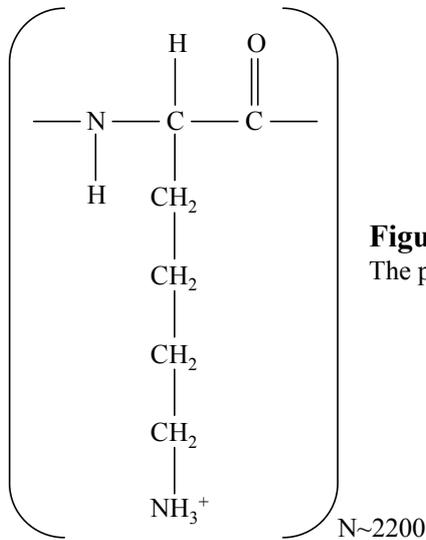
## **3.3 Polylysine**

### 3.3.1 Introduction

La polylysine est un polypeptide synthétique très utilisé en culture cellulaire. En effet, ce polymère possède la propriété de s'adsorber fortement sur le verre et de favoriser l'accrochage et la survie des cellules. Ce polymère est une polybase chargée positivement à pH neutre puisque le pKa de sa chaîne latérale est égal à 10,2. La figure 3.10 montre la

## Polymères adsorbés

formule chimique du monomère. Au voisinage de son pKa, la polylysine présente une transition structurale (voir conclusion et perspectives de la thèse).

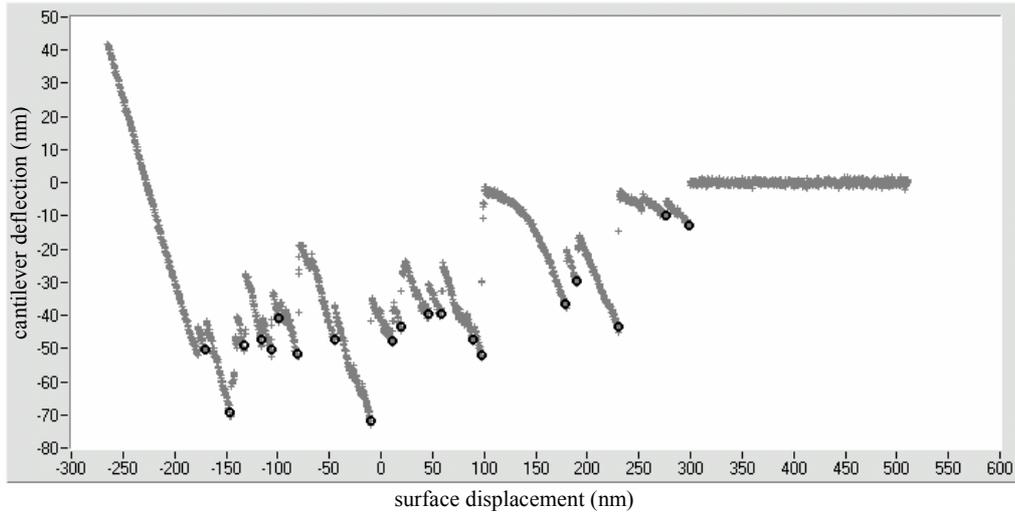


**Figure 3.10: Polylysine**

The polymer was procured from Sigma,  $M_w = 280\,000\text{ g.mol}^{-1}$

La polylysine adhère aussi aux pointes d'AFM non modifiée. Cette adhésion est mise en évidence par les nombreux évènements détectés dans les courbes de forces entre une pointe non modifiée et une couche de polylysine adsorbée sur du verre (figure 3.11). L'analyse des distances entre sauts a révélé une loi de décroissance exponentielle similaire à celle observée pour les expériences sur les copolymères. Le but de cette étude est de comprendre la signification physique de la longueur de décroissance, ainsi que l'origine de cette loi. D'un point de vue plus général, ces expériences visent à mieux comprendre quelles sont les informations que l'on peut extraire des manipulations de molécules par AFM. Dans cette optique, nous avons fait varier les paramètres expérimentaux pour voir leur influence sur les résultats et notamment sur la longueur de décroissance.

Dans la suite de cette partie, nous présentons l'ensemble des résultats (§3.3.2) puis une interprétation qualitative de ces données (§3.3.3).



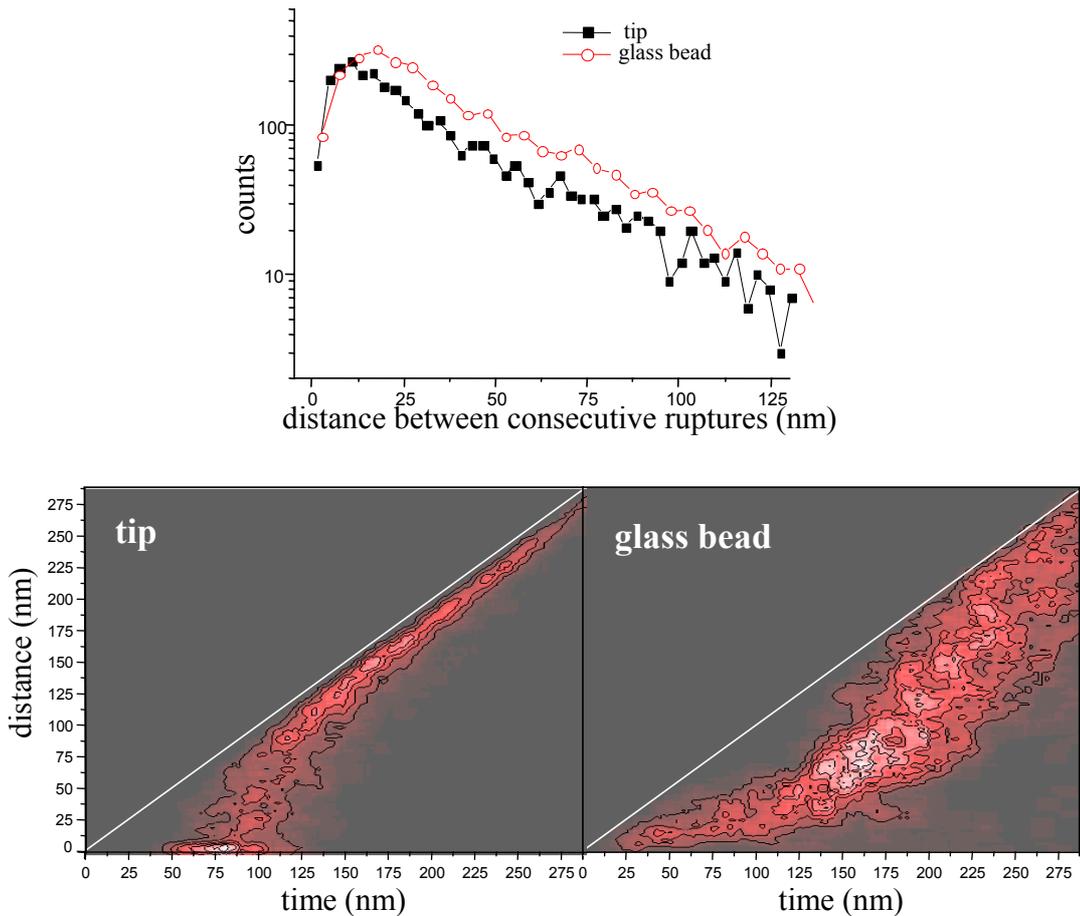
**Figure 3.11: Force curve between adsorbed polylysine on glass in water**

### 3.3.2 Résultats

Dans une expérience AFM, trois paramètres expérimentaux sont totalement indépendants du système étudié au sens où leur modification ne l'affecte en rien. Ces trois paramètres sont le rayon de courbure de la pointe  $R$ , la raideur du ressort  $k$  et la vitesse de rétraction  $v$ . On étudiera successivement l'influence des deux premiers paramètres, puis on simulera des résultats expérimentaux pour faire apparaître l'éventuelle corrélation entre ruptures successives.

#### 3.3.2.1 Géométrie

Une manière simple de varier la géométrie du contact est de coller une bille de verre sur la pointe d'AFM de manière à changer radicalement le rayon de courbure de la sonde. Dans notre cas, on passe d'un rayon de courbure d'une cinquantaine de nanomètres à un rayon de courbure d'une quinzaine de microns. De manière extrêmement surprenante, on retrouve la même longueur de décroissance ( $d_0 = 25nm$ ) dans deux expériences menées sur la même couche de polymère avec une pointe ou avec une bille de verre (figure 3.12, haut). La longueur  $d^*$  augmente significativement puisqu'elle passe de 10 à 17 nanomètres. Le nombre de ruptures par courbe n'est pas significativement modifié, mais les ruptures se produisent plus tard et pour des forces plus importantes (figure 3.12, bas).

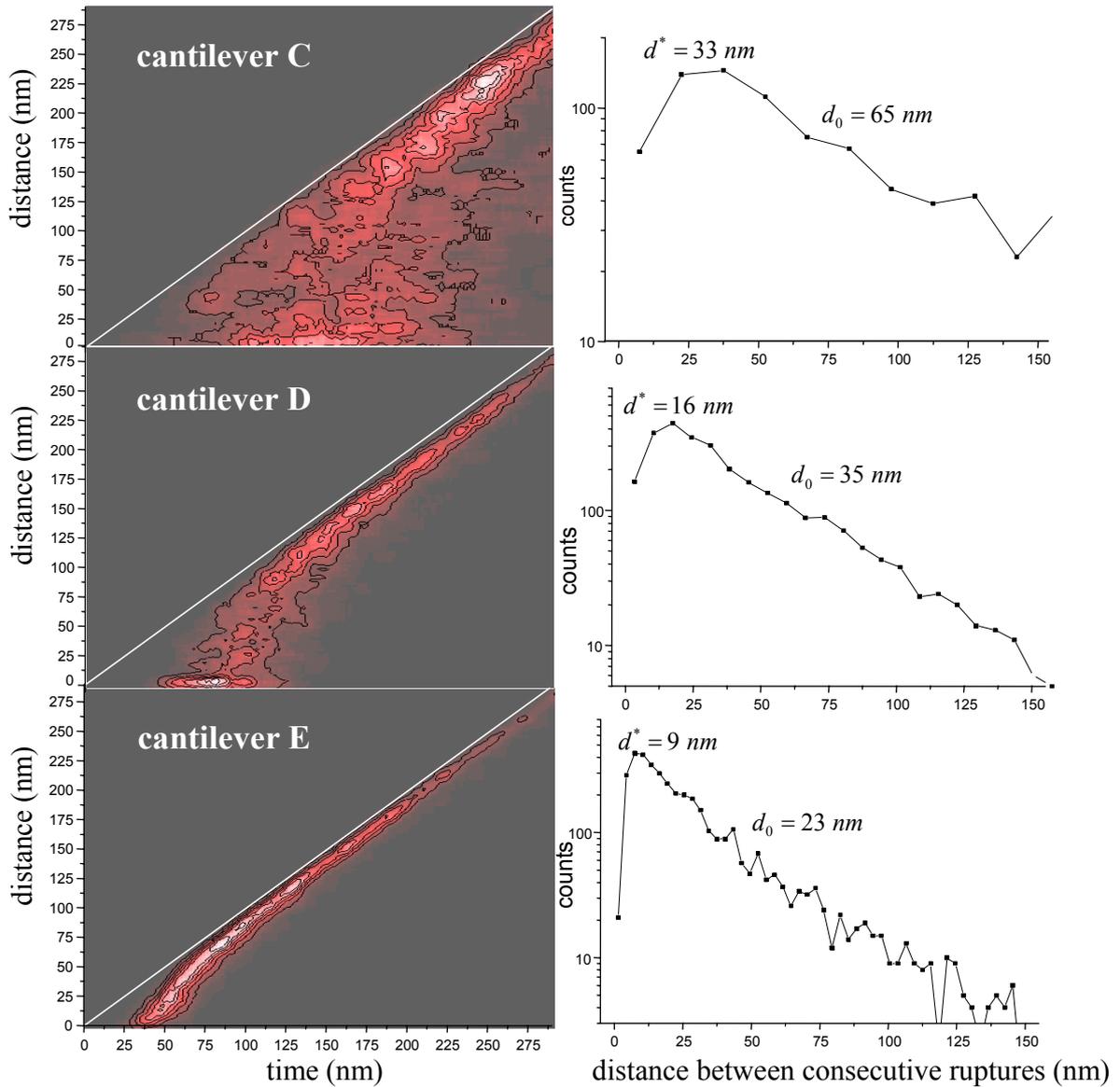


**Figure 3.12: The effect of probe geometry on rupture distribution**

Experiments with an unmodified tip and with a glass bead (radius  $\sim 15 \mu\text{m}$ ) glued on the tip show similar decay of the distance between consecutive ruptures (upper graph) but different rupture distribution (bottom graphs).

### 3.3.2.2 Raideur

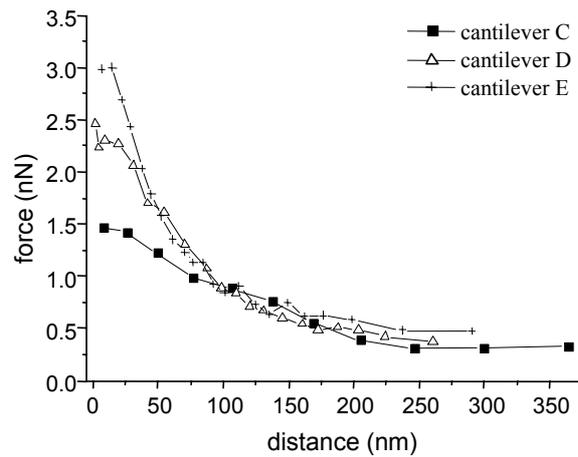
La figure 3.13 montre l'effet d'un changement de raideur du ressort sur la longueur de décroissance et sur les distributions de ruptures. La raideur du ressort passe de 10 à 30 puis 90 mN/m. Cette expérience met en évidence une diminution des longueurs  $d_0$  et  $d^*$  lorsque l'on augmente la raideur du ressort.  $d^*$  passe de 33 à 16 puis 9 nanomètres pendant que  $d_0$  passe de 65 à 35 puis 23 nanomètres. La distribution des ruptures dans le plan temps/distance est profondément modifiée : avec un ressort mou, la pointe reste longtemps en contact avec la couche de polymère avant que les ruptures ne se produisent et, en moyenne, les ruptures se produisent à des distances de la surface beaucoup plus importantes qu'avec un ressort raide.



**Figure 3.13: The effect of probe stiffness on rupture distribution**

Experiment with three cantilevers of different spring constant ( $k_C=10\text{mN/m}$ ,  $k_D=30\text{mN/m}$  and  $k_E=90\text{mN/m}$ ) on the same polymer layer.  $d^*$  is the most probable distance and  $d_0$  is decay length.

La présentation en carte de densité dans le plan temps/distance ne permet pas d'appréhender la variation des forces en fonction de la raideur. La figure 3.14 montre une diminution de la force moyenne en fonction de la distance pour les trois ressorts. La force moyenne pour des distances courtes augmente avec la raideur du ressort. Pour des distances plus importantes, la force moyenne dépend faiblement de la raideur du ressort.



**Figure 3.14: The effect of the probe stiffness on the mean rupture force**

Experiment with three cantilevers of different spring constant ( $k_C=10\text{mN/m}$ ,  $k_D=30\text{mN/m}$  and  $k_E=90\text{mN/m}$ ) on the same polymer layer (same experiment as in fig. 3.13).

### 3.3.2.3 Corrélation entre ruptures successives

Dans le modèle simple d'extension d'une chaîne de la figure 3.8, la distance entre ruptures successives est une grandeur pertinente qui mesure la taille d'une boucle. Ce modèle simple est un cas limite où les ruptures successives sont corrélées les unes aux autres. L'autre cas limite consiste à dire qu'au moment du contact, un certain nombre de ponts de différentes tailles se forment entre la pointe et la surface, puis rompent lors de l'extension. Dans ce deuxième cas, la distribution de distance entre ruptures est une simple conséquence de la distribution de la taille des ponts formés initialement : les ruptures successives ne sont pas corrélées.

Il est clair que ces modèles ne peuvent rendre compte de la complexité des résultats présentés dans les paragraphes précédents. La question de savoir si les ruptures successives sont corrélées se pose néanmoins. Une manière de reformuler cette question, en relation directe avec les résultats expérimentaux, est de demander si l'on peut déduire la distribution des distances entre ruptures à partir de la distribution des distances de ruptures et de la distribution du nombre de ruptures par cycle d'approche-retrait.

Pour effectuer cette déduction, nous avons généré numériquement des distances de ruptures suivant une loi de probabilité tirée d'une expérience (figure 3.15.A). Ces distances ont ensuite été regroupées dans des petits ensembles pour simuler des courbes de forces. Le nombre de ruptures dans chaque ensemble a été choisi en utilisant comme loi de probabilité la distribution du nombre de ruptures par cycle d'approche retrait tirée de la même expérience (figure 3.15.B). La figure 3.15.C compare les distributions de distances entre ruptures

déduites de cette simulation avec celle déduite des résultats expérimentaux. On obtient une décroissance exponentielle identique des deux distributions (distance de décroissance  $d_0 = 32 \text{ nm}$ ). Pour des distances courtes, la simulation suit la loi exponentielle alors que la distribution expérimentale présente un maximum pour une distance  $d^* = 16 \text{ nm}$ .

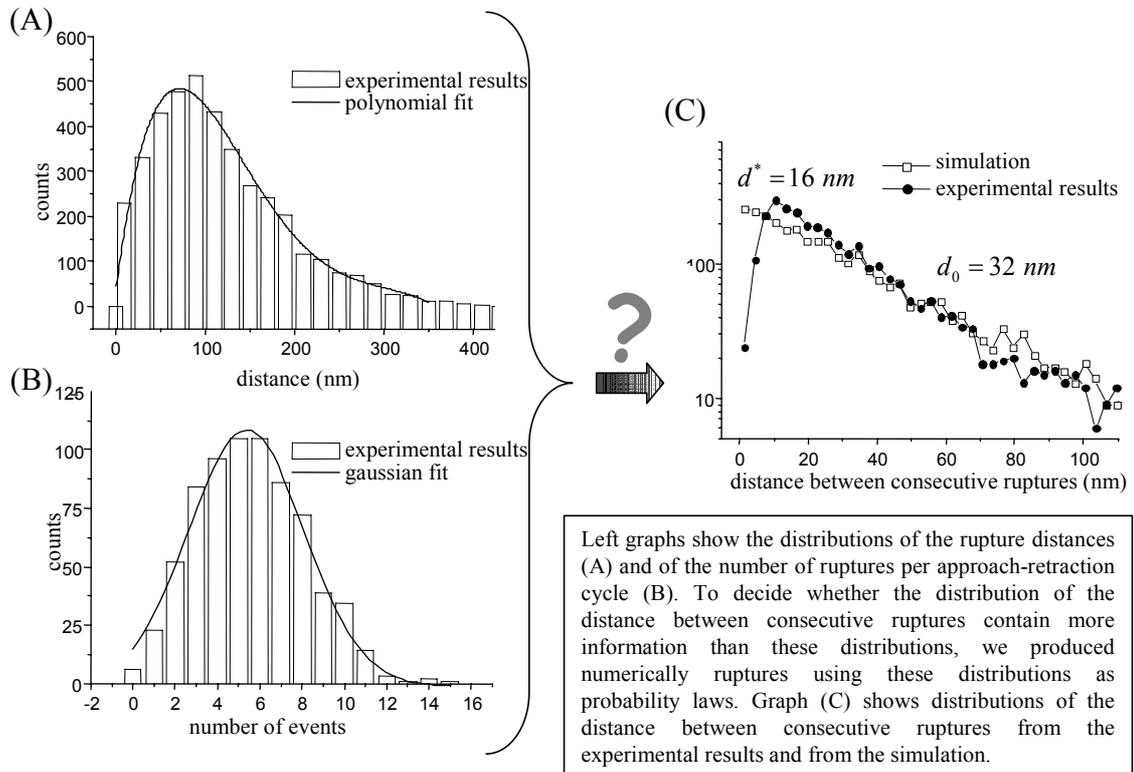


Figure 3.15: Correlation between consecutive ruptures

### 3.3.3 Interprétation qualitative

La simulation présentée dans le paragraphe précédent permet de comprendre la signification des longueurs  $d_0$  et  $d^*$ .

La décroissance exponentielle est une conséquence mathématique de la forme des distributions de ruptures et du nombre de ruptures par courbe. La longueur  $d_0$  n'a pas de signification physique précise. Cette longueur est corrélée à la largeur de la distribution des distances de ruptures (plus les ruptures sont étalées sur une grande plage de distance plus  $d_0$  sera grande) et au nombre moyen de ruptures par courbe (plus le nombre de ruptures par courbe est grand, plus cette longueur de décroissance sera petite).

Les distributions simulées ne présentent pas de maximum. La distance  $d^*$  apparaît dans les distributions expérimentales parce que pour des courtes séparations entre ruptures

consécutives, on observe moins d'événements que ce qui est prédit par la simulation. Comme la simulation correspond à l'absence de corrélation, on peut dire que  $d^*$  est une longueur d'anticorrélation : lorsqu'une rupture se produit, il est peu probable qu'une autre rupture se produise avant la distance  $d^*$ .

Cette interprétation de  $d^*$  est confortée par l'analyse des résultats en fonction de la raideur du ressort.  $d^*$  augmente lorsque l'on diminue la raideur du ressort. Plus un ressort est mou, plus sa relaxation (même incomplète) après la rupture d'un lien impliquera un grand déplacement de la pointe. La rupture suivante se produira nécessairement pour une distance supérieure à cette distance de relaxation.

Comme on l'a vu précédemment, l'effet d'un changement de raideur du ressort ne se limite pas à cette variation de la longueur d'anticorrélation. La distribution des ruptures est profondément modifiée (figures 3.13 et 3.14). Plus le ressort est mou, plus les ruptures se produisent sur une gamme étendue de distance après que la pointe soit restée un temps long à des faibles distances de la surface. Nous sommes donc amené à proposer un modèle dans lequel une réorganisation des liens se produit pendant la rétraction. Avec un ressort raide, lors de la rétraction, la pointe quitte rapidement la couche de polymère. Avec un ressort mou, au contraire, la force augmente lentement, les ponts entre la pointe et la surface se réorganisent, donnant naissance à des ponts plus longs. Cette réorganisation est guidée par la balance entre l'énergie d'adsorption et l'énergie d'étirement du polymère.

### **3.4 Polymères adsorbés : conclusion et perspectives**

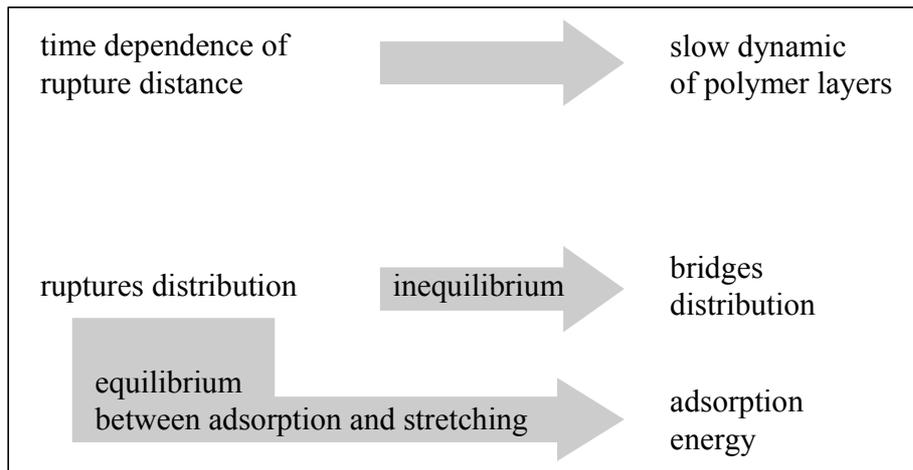
Nous avons réalisé des expériences consistant à étirer des polymères adsorbés à l'aide de la pointe de l'AFM. Ces expériences, simples dans le principe, révèlent la complexité des facteurs intervenant dans le phénomène de désorption.

Nous avons mis en évidence une longueur d'anticorrélation entre ruptures successives qui dépend de la raideur du ressort. Les expériences sur les polymères multiblocs ont montré l'existence de corrélations entre cycles successifs pendant des temps très longs. L'étude de ces corrélations pourrait être un moyen d'étudier les dynamiques lentes des couches de polymères adsorbés.

Enfin, l'effet spectaculaire du changement de raideur du ressort sur les distances et les temps auxquels se produisent les ruptures montre qu'il est nécessaire de prendre en compte la dynamique du polymère et la dynamique de l'adsorption pour rendre compte des résultats

## *Polymères adsorbés*

expérimentaux (surtout dans le cas où de multiples ponts lient la pointe et la surface). En jouant sur la vitesse de rétraction et la raideur du ressort, il serait peut être possible de passer d'une situation où l'on sonde la conformation des chaînes (situation hors d'équilibre où l'élasticité des chaînes prédomine) à une situation où l'on mesure plutôt une énergie d'adsorption (Jimenez et al 2000). Ces conclusions sont résumées sur la figure 3.16.



**Figure 3.16: Interpretation of rupture distribution in AFM experiments**

## **Conclusion et perspectives**

## *Conclusion et perspectives*

Nous présentons ci-dessous un résumé des principaux résultats de cette thèse. Nous discutons ensuite les points qui nécessiteraient des études complémentaires puis les perspectives à plus long terme de la thèse.

### **Principaux résultats**

#### Calibration du ressort

Pour réaliser des mesures de force quantitatives, il est nécessaire de connaître la raideur du ressort. Or, il n'existe pas de consensus sur une bonne méthode de calibration. Nous avons établi la validité de l'approche basée sur l'étude des fluctuations thermiques du ressort en comparant la forme des modes de vibrations du ressort à celle prédite par la théorie. Nous avons aussi comparé plusieurs méthodes de calibration et trouvé un bon accord entre ces méthodes.

Cette étude illustre un point fondamental souvent ignoré des mesures AFM. La quantité mesurée par la méthode du levier optique utilisée dans les AFM récents n'est pas le déplacement du ressort mais sa déflexion (angle). Cette subtilité a une importance considérable dans les problèmes de calibration puisque la relation angle *versus* déplacement dépend du mode de vibration étudié et ne peut être déduite des courbes de force. Elle est négligée dans les mesures de force où l'on s'intéresse à la déflexion « statique » du ressort.

#### Analyse des courbes de force

Nous avons mis au point un programme de détection des ruptures basé sur l'analyse de l'écart type dans une fenêtre qui glisse le long de la courbe. Les ruptures correspondent à un pic de l'écart type. La détection est entièrement automatisée et l'interface permet d'optimiser facilement les paramètres. Nous avons utilisé ce programme pour nos études sur les interactions nickel-histidine et sur l'adsorption de polymères. Des améliorations successives ont été réalisées au cours de ces utilisations.

### **Représentation des distributions de ruptures**

Une rupture dans une courbe de force est caractérisée par un couple de paramètres choisis parmi les trois grandeurs suivantes : le temps, la distance et la force de rupture. Nous représentons les distributions de ruptures sous forme de carte de densité dans un plan où les deux axes correspondent au couple choisi. L'intérêt majeur de ce type de représentation est qu'il permet de visualiser sur un seul graphique l'ensemble des ruptures et les corrélations entre distance et force par exemple. Par contre, il est difficile de caractériser quantitativement les données à partir de ces représentations. Nous proposons donc d'autres représentations sous forme de courbes plus faciles à confronter à des modèles : la décroissance du nombre de liens en fonction du temps ou la force moyenne en fonction de la distance.

### **Interactions spécifiques**

Notre étude des interactions Ni-NTA/histidine nous donne accès à la force nécessaire pour détruire un complexe. Il faut noter que nous arrivons à cette force à partir d'une représentation originale des distributions de ruptures qui met en évidence une force moyenne constante à grande distance.

Pour les distances plus courtes, nous observons une augmentation de la force moyenne lorsque l'on diminue la vitesse de rétraction. Ce comportement n'avait été ni observé dans les études préalables sur les interactions spécifiques ni prédit par les modèles théoriques. Nous l'interprétons comme une conséquence de la reformation des liaisons lors de la rétraction par l'intermédiaire des fluctuations du lien polymère.

### **Polymères adsorbés**

Dans la partie consacrée aux polymères adsorbés, nous nous sommes intéressés à l'interprétation des ruptures dans les courbes de force. La motivation initiale était de tester la validité des hypothèses qui sous-tendent l'identification de la distribution des ruptures et de la distribution de boucles du polymère adsorbé. Sur les deux systèmes que nous avons étudiés, ces hypothèses ne sont pas valides. Des phénomènes plus complexes se produisent.

A partir des résultats expérimentaux, nous définissons une longueur d'anticorrélation correspondant à la distance minimale séparant deux ruptures. Cette longueur est liée à la relaxation du ressort.

## *Conclusion et perspectives*

Dans le cas des copolymères, nous avons mis en évidence des corrélations sur des temps très longs des distances des ruptures observées.

L'étude sur la polylysine a montré l'influence non triviale de la raideur du ressort sur les distances mesurées. Cet effet ne peut se comprendre que par de profondes modifications de la conformation des polymères lors de la rétraction. On serait alors plus proche d'une conformation résultant d'un équilibre entre l'énergie d'adsorption par monomère et l'énergie élastique du ressort.

### ***Perspectives, travail en cours***

#### **Polymères en solution**

Pour mieux comprendre les propriétés de nos polymères à l'interface, il serait utile de bien connaître les comportements des polymères en solution. Nous avons réalisé une étude partielle de la polyhistidine en solution qui a révélé une partie du diagramme de phase. Il faudrait compléter cette étude par d'autres spectres de rayons X en variant la concentration en chaîne, la concentration en sel et le pH. Des courbes de titration précises permettraient de déterminer le taux de charge à partir du pH.

Jean-Marie Catala a mesuré des spectres de diffusion de lumière des copolymères dans différents solvants. L'étude de leur comportement dans l'eau par diffusion de lumière, RX, et viscosité permettrait notamment de connaître la concentration micellaire critique.

#### **Transition structurale et profil d'étirement**

En mars 2000, puis en janvier 2001 paraissent deux articles théoriques consacrés à l'effet d'une force extérieure sur la transition hélice-pelote des homopolypeptides (Buhot & Halperin 2000, Tamashiro & Pincus 2001). Ces auteurs prévoient un profil caractéristique lors de l'extension. Lorsque la chaîne est dans un état désordonné, mais proche de la transition, l'application d'une force provoque la transition. La transition permet au polymère de compenser la perte d'entropie imposée par l'extension en formant des liaisons hydrogènes (hélice).

Nous avons tenté de tester les prédictions théoriques en mesurant des courbes d'extension de la polylysine. Ce polymère est l'un des polymères modèles pour l'étude de cette transition

## *Conclusion et perspectives*

(Ciferri et al 1968). Les spectres de dichroïsme circulaire mettent en évidence la transition entre pH 10.0 et 10.5 (figure C $\alpha$ ). Les mesures de force par AFM montrent une forte influence du pH sur le profil d'extension (figure C $\beta$ ). En raison de la forte affinité de la polylysine pour la pointe, il s'est avéré très délicat d'obtenir des profils simples comme ceux de la figure C $\beta$ . Pour s'assurer que ces profils correspondent bien à une molécule unique, nous avons superposé des courbes. Cette procédure nous a permis d'obtenir un profil type pour les pH 9.5 et 10.5. Pour les pH intermédiaires, nous avons observé des plateaux mais dont les longueurs sont variables.

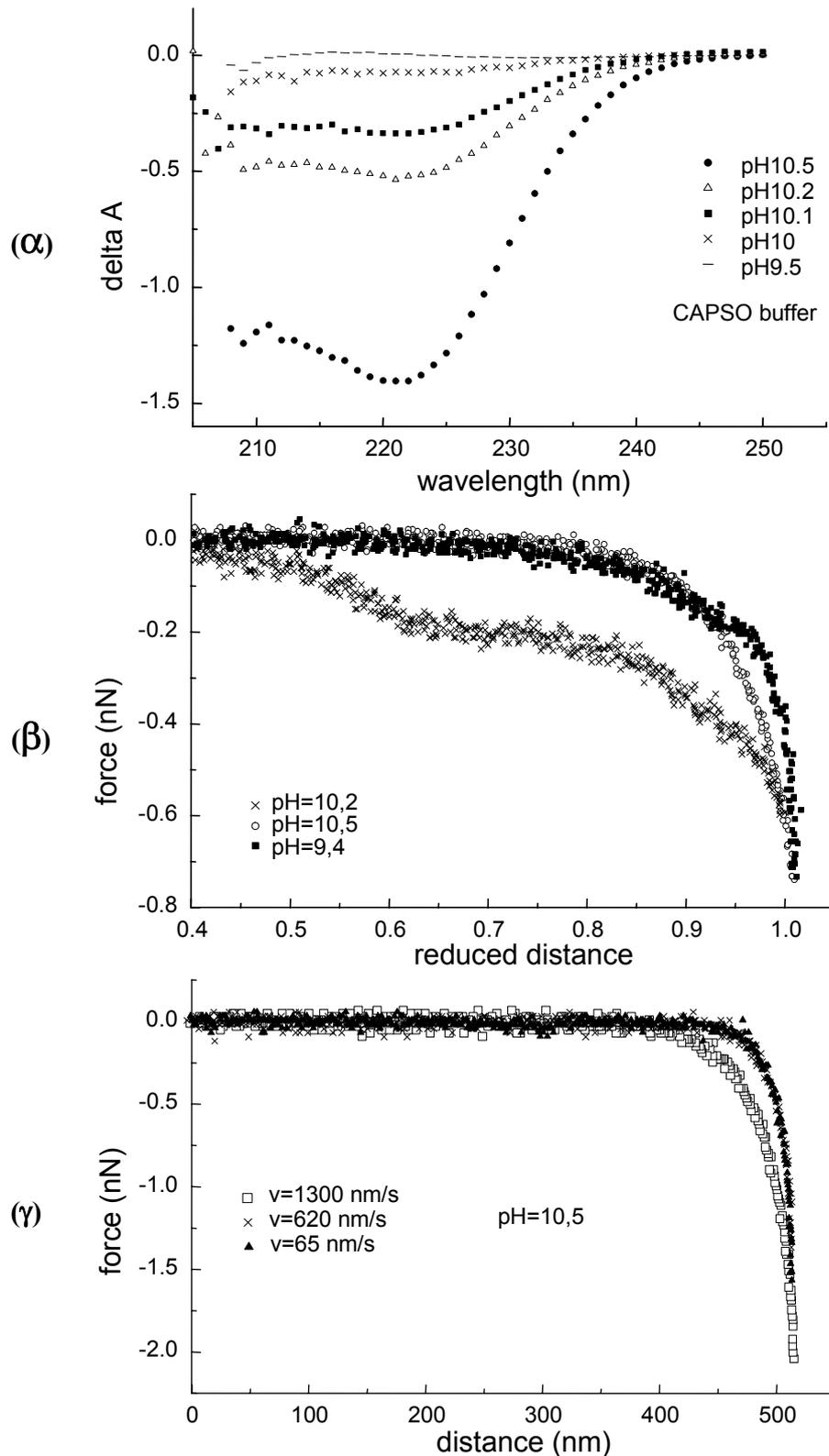
Nous avons aussi observé un effet de la vitesse sur le profil de force (figure C $\gamma$ ).

Ces résultats sont très étonnants et appellent une étude plus complète. On s'attendrait à une grande différence entre les profils dans l'état hélice et dans l'état pelote, or on observe une grande similitude. A pH 9.4 et 10.2, on observe un épaulement aux grandes extensions dont nous ignorons totalement l'origine (transition conformationnelle ?). On observe des plateaux à pH 10.2, mais les caractéristiques de ce plateau ne semblent pas reproductibles.

On peut imaginer de nombreuses expériences pour compléter cette étude et arriver à une compréhension des phénomènes impliqués. Des expériences avec de la poly-DL-lysine (polymère identique à celui utilisé précédemment mais contenant une succession aléatoire de monomères L et de monomères D) permettraient de différencier ce qui provient vraiment de la transition hélice-pelote puisque ce polymère ne peut former d'hélice.

Une autre piste consiste à modifier l'interaction avec la surface en utilisant un polymère greffé sur une surface pour laquelle il ne possède pas d'affinité. Enfin, on peut envisager d'utiliser un autre polymère modèle, par exemple la polyalanine, qui exhibe une transition du même type lorsque l'on fait varier la température. La différence majeure avec la polylysine est que la polyalanine est un polymère neutre.

*Conclusion et perspectives*



**Figure C**

**Helix-coil transition of polylysine: effect of pH and retraction speed on the force profile**

(α) Polylysine circular dichroism spectra showing the transition in solution; (β) Typical force profile at three different pH corresponding to the helical state (10,5), the coil state (9,4) and the transition (10,2); (γ) Consecutive extensions of the same polymer at three different retraction speed.

## **Perspectives à plus long terme**

### **Analyse des courbes de force**

Ce travail de thèse participe à une réflexion générale sur les informations que l'on peut extraire des mesures AFM. Nous avons choisi de nous limiter à l'étude des courbes de force, et nous avons développé des outils d'analyse et de représentations des données. Dans le même but, d'autres outils restent à construire ou simplement à tester. Il serait par exemple utile de définir une fonction de corrélation qui mesure la similitude entre courbes successives. Une autre piste suggérée par Udo Seifert consiste à réaliser la moyenne d'un ensemble de courbes de force (Seifert 2002).

On peut noter que d'autres auteurs développent des nouveaux instruments qui permettent par exemple de mesurer en même temps la force et les fluctuations ou la force et la raideur du « contact » (Gelbert et al 2000, Humphris et al 2002). Ces techniques, en amenant des informations supplémentaires, constituent une autre voie pour progresser dans l'analyse des courbes de force.

### **De la molécule unique au test d'adhésion**

Entre les tests d'adhésion impliquant un très grand nombre de chaînes et l'étirement d'une chaîne unique, on s'attend à une variation importante des phénomènes mis en jeu avec l'apparition des enchevêtrements, l'influence des propriétés des surfaces, etc. Peu d'études expérimentales ont abordé cette problématique notamment à cause de la complexité des courbes de retrait.

Les systèmes étudiés dans cette thèse sont des candidats pour sonder cette transition mais on peut imaginer d'autres polymères et d'autres copolymères. La variation de la vitesse de rétraction et de la raideur du ressort permettra de définir les échelles de temps et d'énergie le long de la transition.

En plus de ses applications au problème de l'adhésion des matériaux polymères, ce type de recherche a des implications pour la compréhension des phénomènes d'adhésion cellulaires.

### **Molécule unique et biologie**

Quelques systèmes modèles ont été étudiés mais de nombreuses questions fondamentales de physique et de biologie restent posées.

Certaines font l'objet de débats : quels sont les liens entre force de rupture et potentiel d'interaction ? Peut-on mesurer la constante de dissociation des complexes à partir des forces de ruptures ?

D'autres sont encore vierges comme la reconnaissance moléculaire entre des domaines initialement flexibles. Ce phénomène joue un rôle majeur en biologie et est pour l'instant mal compris. Il intervient dans la formation de pratiquement tous les complexes ARN-protéine, mais aussi dans l'agrégation des protéines mal repliées à l'origine des maladies de la vache folle et d'Alzheimer. Les interrogations concernent les échelles de temps et d'énergie et le nombre d'étapes qui permettent d'aboutir à la formation d'un complexe stable et spécifique.

Peu de techniques sont susceptibles d'apporter des informations pertinentes. L'AFM permettra-t-il de mieux comprendre ce type de reconnaissance moléculaire ?

## **Bibliographie**

## Bibliographie

- Al-Maawali S, Bemis JE, Akhremitchev BB, Leecharoen R, Janesko BG, Walker GC. **2001**. Study of the polydispersity of grafted poly(dimethylsiloxane) surfaces using single-molecule atomic force microscopy. *Journal of Physical Chemistry B* 105: 3965-71
- Andelman D, Joanny JF. **2000**. Polyelectrolyte adsorption. *C. R. Acad. Sci. Paris, Série IV* 1: 1153-62
- Andersson KM, Bergstrom L. **2002**. DLVO interactions of tungsten oxide and cobalt oxide surfaces measured with the colloidal probe technique. *Journal of Colloid and Interface Science* 246: 309-15
- Barentin C. **1999**. *Monocouches de polymères à l'interface eau-air*. Université Louis Pasteur, Strasbourg
- Baumgartner W, Hinterdorfer P, Ness W, Raab A, Vestweber D, et al. **2000a**. Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4005-10.
- Baumgartner W, Hinterdorfer P, Schindler H. **2000b**. Data analysis of interaction forces measured with the atomic force microscope. *Ultramicroscopy* 82: 85-95.
- Benoit M, Gabriel D, Gerisch G, Gaub HE. **2000**. Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. *Nat Cell Biol* 2: 313-7.
- Binnig G, Quate CF, Gerber C. **1986**. Atomic force microscope. *Physical Review Letters* 56: 930-3.
- Binnig G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E. **1982**. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Physical Review Letters* 49: 57-61
- Bowen WR, Lovitt RW, Wright CJ. **2000**. Application of atomic force microscopy to the study of micromechanical properties of biological materials. *Biotechnology Letters* 22: 893-903
- Buhot A, Halperin A. **2000**. Extension of rod-coil multiblock copolymers and the effect of the helix-coil transition. *Physical Review Letters* 84: 2160-3.
- Burnham NA, Colton RJ, Pollock HM. **1993**. Interpretation of force curves in force microscopy. *Nanotechnology* 4: 64-80
- Châtellier X, Joanny JF. **1998**. Pull-off of a polyelectrolyte chain from an oppositely charged surface. *Physical Review. E. Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics* 57: 6923-35
- Châtellier X, Senden TJ, Joanny JF, di Meglio J-M. **1998**. Detachment of a single polyelectrolyte chain adsorbed on a charged surface. *Europhysics Letters* 41: 303-8
- Ciferri A, Puett D, Rajagh L, Jan Hermans J. **1968**. Potentiometric titrations and the helix-coil transition of poly-(L-glutamic acid) and poly-L-lysine in aqueous salt solutions. *Biopolymers* 6: 1019-36
- Clausen-Schaumann H, Seitz M, Krautbauer R, Gaub HE. **2000**. Force spectroscopy with single bio-molecules. *Current Opinion in Chemical Biology* 4: 524-30
- Cluzel P, Lebrun A, Heller C, Lavery R, Viovy JL, et al. **1996**. *Science* 271: 792
- Conti M, Falini G, Samori B. **2000**. How Strong Is the Coordination Bond between a Histidine Tag and Ni - Nitritriacetate? An Experiment of Mechanochemistry on Single Molecules. *Angewandte Chemie International Edition* 39: 215-8.
- Dammer U, Hegner M, Anselmetti D, Wagner P, Dreier D, et al. **1996**. Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy. *Biophysical Journal* 70: 2437-41
- Dammer U, Popescu O, Wagner P, Anselmetti D, Guntherodt H-J, Misevic GN. **1995**. Binding strength between cell adhesion proteoglycans measured by atomic force microscopy. *Science* 267: 1173-5
- Daoud M. **2000**. Polymer adsorption. *C. R. Acad. Sci. Paris, Série IV* 1: 1125-33
- de Gennes P-G. **1979**. *Scaling concepts in polymer physics*: Cornell University Press

## Bibliographie

- de Gennes P-G, Pincus P, Velasco RM, Brochard F. **1976**. Remarks on polyelectrolyte conformation. *Journal de physique* 37: 1461
- Demchenko AP. **2001**. Recognition between flexible protein molecules: induced and assisted folding. *Journal of molecular recognition* 14: 42-61
- Dobrynin AV, Colby RH, Rubinstein M. **1995**. Scaling theory of polyelectrolyte solutions. *Macromolecules* 28: 1859-71
- Doppenschmidt A, Butt HJ. **1999**. Measuring electrostatic double-layer forces on HOPG at high surface potentials. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 149: 145-50
- Durliat G. **1997**. *Biochimie structurale*: Diderot Editeur, Bibliothèque des sciences
- Evans E. **2001**. Probing the relation between force - lifetime - and chemistry in single molecular bonds. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 30: 105-28
- Evans E, Ludwig F. **2000**. Dynamic strengths of molecular anchoring and material cohesion in fluid biomembranes. *J. Phys. Condens. Matter* 12: A315-20
- Evans E, Ritchie K. **1997**. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophysical Journal* 72: 1541-45
- Everson RJ, Parker HE. **1974**. Zinc binding and synthesis eighth-hydroxy-quinoline-agarose. *Bioinorg. Chem.* 4: 15-20
- Florin E-L, Moy VT, Gaub HE. **1994**. Adhesive forces between ligand and receptors measured by AFM. *Science* 264: 415-7
- Fontecilla-Camps JC. **1998**. Biological Nickel. *Structure and Bonding* 91
- Gaberc-Porekar V, Menart V. **2001**. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 49: 335-60.
- Garland PB. **1996**. Optical evanescent wave methods for the study of biomolecular interactions. *Quarterly Reviews of Biophysics* 29: 91-117
- Gelbert M, Biesalski M, Ruhe J, Johannsmann D. **2000**. Collapse of polyelectrolyte brushes probed by noise analysis of a scanning force microscope cantilever. *Langmuir* 16: 5774-84
- Gergely C, Senger B, Voegel JC, Horber JK, Schaaf P, Hemmerle J. **2001**. Semi-automatized processing of AFM force-spectroscopy data. *Ultramicroscopy* 87: 67-78.
- Gershon PD, Khilko S. **1995**. Stable chelating linkage for reversible immobilization of oligohistidine tagged proteins in the BIAcore surface plasmon resonance detector. *J Immunol Methods* 183: 65-76.
- Goldmann WH. **2000**. Mechanical manipulation of animal cells: cell indentation. *Biotechnology Letters* 22: 431-5
- Goss CA, Charych DH, Majda M. **1991**. Application of (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane as a molecular adhesive in the fabrication of vapor-deposited gold electrodes on glass substrates. *Analytical Chemistry* 63: 85-8
- Grubmüller H, Heymann B, Tavan P. **1996**. Ligand binding : molecular mechanics calculation of the streptavidin-biotin rupture force. *Science* 271: 997-9
- Haschemeyer RH, Haschemeyer AEV. **1973**. *Proteins : a guide to study by physical and chemical methods*: WILEY-INTERSCIENCE
- Haupt BJ, Ennis J, Sevick EM. **1999**. The detachment of a polymer chain from a weakly adsorbing surface using an AFM tip. *Langmuir* 15: 3886-92
- Haupt BJ, Senden TJ, Sevick EM. **2002**. AFM evidence of Rayleigh instability in single polymer chains. *Langmuir* 18: 2174-82
- Hayter J, Janninck G, Brochard-Wyart F, de Gennes P-G. **1980**. Correlations and dynamics of polyelectrolyte solutions. *Journal de physique* 41: L-451

## Bibliographie

- Heymann B, Grubmüller H. **2000**. Dynamic force spectroscopy of molecular adhesion bonds. *Physical Review Letters* 84: 6126
- Hochuli E, Bannwarth W, Doebeli H, Gentz R, Stueber D. **1988**. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Bio/Technology*: 1321-5
- Hochuli E, Doebeli H, Schacher A. **1987**. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr* 411: 177-84
- Höpfner U, Hehl H, Brehmer L. **1999**. Preparation of ordered thin gold films. *Applied Surface Science* 152: 259-65
- Hugel T, Grosholz M, Clausen-Schaumann H, Pfau A, Gaub H, Seitz M. **2001**. Elasticity of single polyelectrolyte chains and their desorption from solid supports studied by AFM based single molecule force spectroscopy. *Macromolecules* 34: 1039-47
- Hugel T, Seitz M. **2001**. The study of molecular interactions by AFM force spectroscopy. *Macromolecular Rapid Communications* 22: 989-1016
- Humphris ADL, Antognozzi M, McMaster TJ, Miles MJ. **2002**. Transverse dynamic force spectroscopy: A novel approach to determining the complex stiffness of a single molecule. *Langmuir* 18: 1729-33
- Jammer M. **1999**. *Concepts of force*: Dover Publications
- Janshoff A, Galla HJ, Steinem C. **2000a**. Piezoelectric mass sensing devices as biosensors - An alternative to optical biosensors ? *Angewandte Chemie International Edition* 39: 4004-32
- Janshoff A, Neitzert M, Oberdorfer Y, Fuchs H. **2000b**. Force spectroscopy of molecular systems - Single molecule spectroscopy of polymers and biomolecules. *Angewandte Chemie International Edition* 39: 3213-37
- Jimenez J, de Joannis J, Bitsanis I, Rajagopalan R. **2000**. Bridging of an isolated polymer chain. *Macromolecules* 33: 7157-64
- Katchalski-Katzir E. **1997**. Synthesis, structure and function of poly-alpha-amino acids - the simplest of protein models. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences* 53: 780-9
- Kienberger F, Kada G, Gruber HJ, Pastushenko VP, Schindler H, Hinterdorfer P. **2000**. Recognition force spectroscopy studies of the NTA-His6 Bond. *Single Molecule* 1: 59-65
- Kubalek EW, Le Grice SF, Brown PO. **1994**. Two-dimensional crystallization of histidine-tagged, HIV-1 reverse transcriptase promoted by a novel nickel-chelating lipid. *J Struct Biol* 113: 117-23.
- Lebeau L, Lach F, Venien-Bryan C, Renault A, Dietrich J, et al. **2001**. Two-dimensional crystallization of a membrane protein on a detergent-resistant lipid monolayer. *J Mol Biol* 308: 639-47.
- Lee GU, Kidwell DA, Colton RJ. **1994**. Sensing discrete streptavidin-biotin interactions with AFM. *Langmuir* 10: 354-61
- Leulliot N, Varani G. **2001**. Current topics in RNA-protein recognition: control of specificity and biological function through induced fit and conformational capture. *Biochemistry* 40: 7947-56
- Lévy R, Maaloum M. **2002a**. automatic detection of rupture events. *to be published*
- Lévy R, Maaloum M. **2002b**. Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers : thermal fluctuations and other methods. *Nanotechnology* 13: 33-7
- Maaloum M, Courvoisier A. **1999**. Elasticity of Single Polymer Chains. *Macromolecules* 32: 4989-92
- Mammen M, Choi S-K, Whitesides GM. **1998**. Polyvalent interactions in biological systems : implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* 37: 2754-94

## Bibliographie

- Martin Y, Williams CC, Wickramasinghe HK. **1987**. Atomic force microscope - force mapping and profiling on a sub 100 angström scale. *J. Appl. Phys.* 61: 4723
- McLelland GM, Erlandsson R, Chiang S. **1987**. Atomic force microscopy : General principles and a new implementation. *Review of progress in quantitative nondestructive evaluation* 6B: 307
- Merkel R, Nassoy P, Leung A, Ritchie K, Evans E. **1999**. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature* 397: 50-3.
- Monod J. **1970**. *Le hasard et la nécessité, essai sur la philosophie naturelle de la biologie moderne*. Paris: Editions du Seuil
- Moy VT, Florin E-L, Gaub HE. **1994**. Intermolecular forces and energies between ligand and receptors. *Science* 266: 257-9
- Nowakowski R, Luckham P. **2002**. Imaging the surface details of red blood cells with atomic force microscopy. *Surface and Interface Analysis* 33: 118-21
- Oesterhelt F, Oesterhelt D, Pfeiffer M, Engel A, Gaub HE, Muller DJ. **2000**. Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins. *Science* 288: 143-6.
- Oesterhelt F, Rief M, Gaub HE. **1999**. Single molecule force spectroscopy by AFM indicates helical structure of poly(ethylene-glycol) in water. *New Journal of Physics* 1
- Ong YL, Razatos A, Georgiou G, Sharma MM. **1999**. Adhesion forces between E-coli bacteria and biomaterial surfaces. *Langmuir* 15: 2719-25
- Ortiz C, Hadziioannou G. **1999**. Entropic elasticity of single polymer chains of poly(methacrylic acid) measured by atomic force microscopy. *Macromolecules* 32: 780-7
- O'Sullivan CK. **2002**. Aptasensors - the future of biosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 372: 44-8
- Ozon F. **2001**. *Adsorption de polyampholites sur des surfaces chargées*. Université Louis Pasteur, Strasbourg
- Peggion E, Cosani A, Terbojevich M, Scoffone E. **1971**. Solution properties of synthetic polypeptides. Circular dichroism studies on poly-L-histidine and on random copolymers of L-histidine and L-lysine in aqueous solution. *Macromolecules* 4: 725-31
- Pfeuty P. **1978**. Conformations des polyélectrolytes - Ordre dans les solutions de polyélectrolytes. *Journal de physique* 39: 149-59
- Piletsky SA, Turner APF. **2002**. Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers. *Electroanalysis* 14: 317-23
- Porath J, Axen R, Ernback S. **1967**. Chemical coupling of proteins to agarose. *Nature* 215: 1491-2
- Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. **1975**. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258: 598-9
- Portigliatti M, Hervet H, Leger L. **2000**. Nanotack test: adhesive behavior of single latex particles. *C. R. Acad. Sci. Paris, Série IV* 1: 1187-96
- Prechtel K, Bausch AR, Marchi-Artzner V, Kantlehner M, Kessler H, Merkel R. **2002**. Dynamic force spectroscopy to probe adhesion strength of living cells. *Physical Review Letters* 89: 028101
- Radler U, Mack J, Persike N, Jung G, Tampe R. **2000**. Design of supported membranes tethered via metal-affinity ligand-receptor pairs. *Biophysical Journal* 79: 3144-52.
- Razatos A, Ong YL, Sharma MM, Georgiou G. **1998**. Evaluating the interaction of bacteria with biomaterials using atomic force microscopy. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* 9: 1361-73
- Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, Fernandez JM, Gaub HE. **1997a**. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* 276: 1109-12.

## Bibliographie

- Rief M, Oesterhelt F, Heymann B, Gaub HE. **1997b**. Single Molecule Force Spectroscopy on Polysaccharides by Atomic Force Microscopy. *Science* 275: 1295-7.
- Rotsch C, Radmacher M. **2000**. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: An atomic force microscopy study. *Biophysical Journal* 78: 520-35
- Scheller FW, Wollenberg U, Warsinke A, Lisdat F. **2001**. Research and development in biosensors. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 35-40
- Schmitt J, Hess H, Stunnenberg HG. **1993**. Affinity purification histidine tagged proteins. *Molecular biology reports* 18: 223-30
- Schmitt L, Ludwig M, Gaub HE, Tampe R. **2000**. A metal-chelating microscopy tip as a new toolbox for single-molecule experiments by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* 78: 3275-85.
- Schwesinger F, Ros R, Strunz T, Anselmetti D, Guntherodt HJ, et al. **2000**. Unbinding forces of single antibody-antigen complexes correlate with their thermal dissociation rates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9972-7.
- Seifert U. **2000**. Rupture of multiple parallel molecular bonds under dynamic loading. *Physical Review Letters* 84: 2750-3.
- Seifert U. **2002**. Dynamic strength of adhesion molecules: Role of rebinding and self-consistent rates. *Europhysics Letters* 58: 792-8
- Senden TJ, di Meglio J-M, Auroy P. **1998**. Anomalous adhesion in adsorbed polymer layers. *The European Physical Journal B* 3: 211-6
- Senden TJ, di Meglio J-M, Silberzan I. **2000**. The conformation of adsorbed polyacrylamide and derived polymers. *C. R. Acad. Sci. Paris, Série IV* 1: 1143-52
- Shillcock J, Seifert U. **1998**. Escape from a metastable well under a time-ramped force. *Physical Review E* 57: 7301-4
- Sigal GB, Bamdad C, Barberis A, Strominger J, Whitesides GM. **1996**. A self-assembled monolayer for the binding and study of histidine-tagged proteins by surface plasmon resonance. *Analytical Chemistry* 68: 490-7.
- Smith T. **1980**. The hydrophilic nature of a clean gold surface. *Journal of Colloid and Interface Science* 75: 51-5
- Strunz T, Oroszlan K, Schafer R, Guntherodt HJ. **1999**. Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11277-82.
- Sulkowski E. **1985**. Purification of Proteins by IMAC. *Trends Biotechnol* 3: 1-7
- Sundberg RJ, Martin RB. **1974**. Interactions of histidine and other imidazole derivatives with transition metal ions in chemical and biological systems. *Chemical Reviews* 74: 471-517
- Tamashiro MN, Pincus P. **2001**. Helix-coil transition in homopolypeptides under stretching. *Physical Review. E, Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics* 63: 021909
- Tamashiro MN, Schiessel H. **2000**. Stepwise unwinding of polyelectrolytes under stretching. *Macromolecules* 33: 5263-72
- Terbojevich M, Cosani A, Peggion E, Quadrifoglio F, Crescenzi V. **1972**. Potentiometric and microcalorimetric determination of the thermodynamic parameters of the order-disorder transition of poly(L-histidine) in aqueous solution. *Macromolecules* 5: 622-7
- Thie M, Rospel R, Dettmann W, Benoit M, Ludwig M, et al. **1998**. Interactions between trophoblast and uterine epithelium: monitoring of adhesive forces. *Hum Reprod* 13: 3211-9.
- VanLandingham MR, Villarrubia JS, Guthrie WF, Meyers GF. **2001**. Nanoindentation of polymers: An overview. *Macromolecular Symposia* 167: 15-43

## Bibliographie

- Vilgis TA, Johner A, Joanny JF. **2000**. Stretching necklaces. *European Physical Journal E* 2: 289-300
- Walch M, Ziegler U, Groscurth P. **2000**. Effect of streptolysin O on the microelasticity of human platelets analyzed by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 82: 259-67
- Wrede P, Schneider G, eds. **1994**. *Concepts in protein engineering and design : an introduction*. Berlin ; New York: de Gruyter
- Young RD. **1966**. *Rev. Sci. Instrum.* 37: 275
- Young RD, Ward J, Scire F. **1971**. Observation of Metal-Vacuum-Metal tunneling, field emission, and the transition region. *Physical Review Letters* 27: 922
- Young RD, Ward J, Scire F. **1972**. *Rev. Sci. Instrum.* 43: 999
- Zlatanova J, Lindsay SM, Leuba SH. **2000**. Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 74: 37-61

**Annexe :**

**acquisition et analyse des courbes de forces**

### ***Introduction : Labview***

Les programmes d'acquisition et d'analyse des courbes de force ont été réalisés à l'aide du langage Labview. Ce langage, vendu par National Instrument, diffère des langages plus traditionnels car il ne se base pas sur l'écriture d'un texte (suite d'instructions) mais sur le dessin d'un diagramme constitué de blocs reliés entre eux par des fils. Chaque bloc correspond à une opération plus ou moins complexe. L'ordre dans lequel s'effectuent les opérations est déterminé par la circulation des informations dans le diagramme. Une information qui entre dans un bloc est un « contrôle » et une information qui en sort est un « indicateur ».

Le programme comprend le diagramme (programme) et l'interface.

Ce langage de programmation a été optimisé pour l'acquisition de données.

### ***Pourquoi décrire en détail ces programmes ?***

Une description détaillée des programmes se justifie pour deux raisons. D'une part, cette description est l'occasion de définir précisément ce que l'on appelle « rupture » en partant des points expérimentaux. D'autre part, l'utilisation et la modification ultérieure de ces programmes par de futurs utilisateurs nécessitent une documentation précise du travail déjà réalisé.

### **Description générale du programme d'acquisition «CF2002»**

Le programme *CF2002* réalise, en temps réel, l'acquisition (carte PCI-MOI-16E-4), la visualisation des courbes de force et leur sauvegarde éventuelle. *CF2002* a été construit à partir d'un programme d'acquisition de la bibliothèque de programmes de Labview. Le programme initial (bibliothèque de Labview) permettait d'acquérir et de visualiser en temps réel des données en continu, à partir d'un moment fixé par le franchissement d'un seuil. Pour cela, l'ordinateur utilise une mémoire intermédiaire (buffer) dans laquelle il place les données au cours de l'acquisition et dans laquelle il lit les données pour les afficher.

Plusieurs modifications étaient nécessaires :

1. ajout d'un système de sauvegarde des courbes
2. ajout d'une boucle de contrôle pour assurer un bon découpage des courbes de forces
3. affichage de la courbe de force et amélioration de l'interface utilisateur

Le système de sauvegarde permet à l'utilisateur d'enregistrer les courbes sous le nom de son choix. Le format de sauvegarde est « name numéro .dat ». Le numéro est incrémenté automatiquement pour chaque courbe enregistrée. Un contrôle permet à l'utilisateur de réinitialiser le numéro à la valeur de son choix. La sauvegarde d'une courbe a lieu au moment de l'affichage de la courbe suivante. La sauvegarde est gérée par le sous-programme *save.vi*.

La boucle de contrôle sert à garantir que le premier point du fichier sauvegardé correspond au début du cycle approche - rétraction. Lors du démarrage du programme cette condition est assurée par le déclenchement par seuil. Si les horloges de l'ordinateur et du générateur de fonction ne sont pas bien synchrones, ou si l'utilisateur change, en cours d'expérience, les paramètres du générateur de fonctions, un décalage peut se produire. La boucle de contrôle relance alors l'acquisition de manière à supprimer ce décalage. La condition de relance de l'acquisition est testée par le sous-programme *trigcond.vi*.

Le sous-programme *transform.vi* transforme le fichier de points pour que le déplacement du piezo soit en nanomètre et pour que les données soient dans un format adapté à l'affichage.

Les figures A.1 et A.2 présentent l'interface utilisateur et le diagramme correspondant.

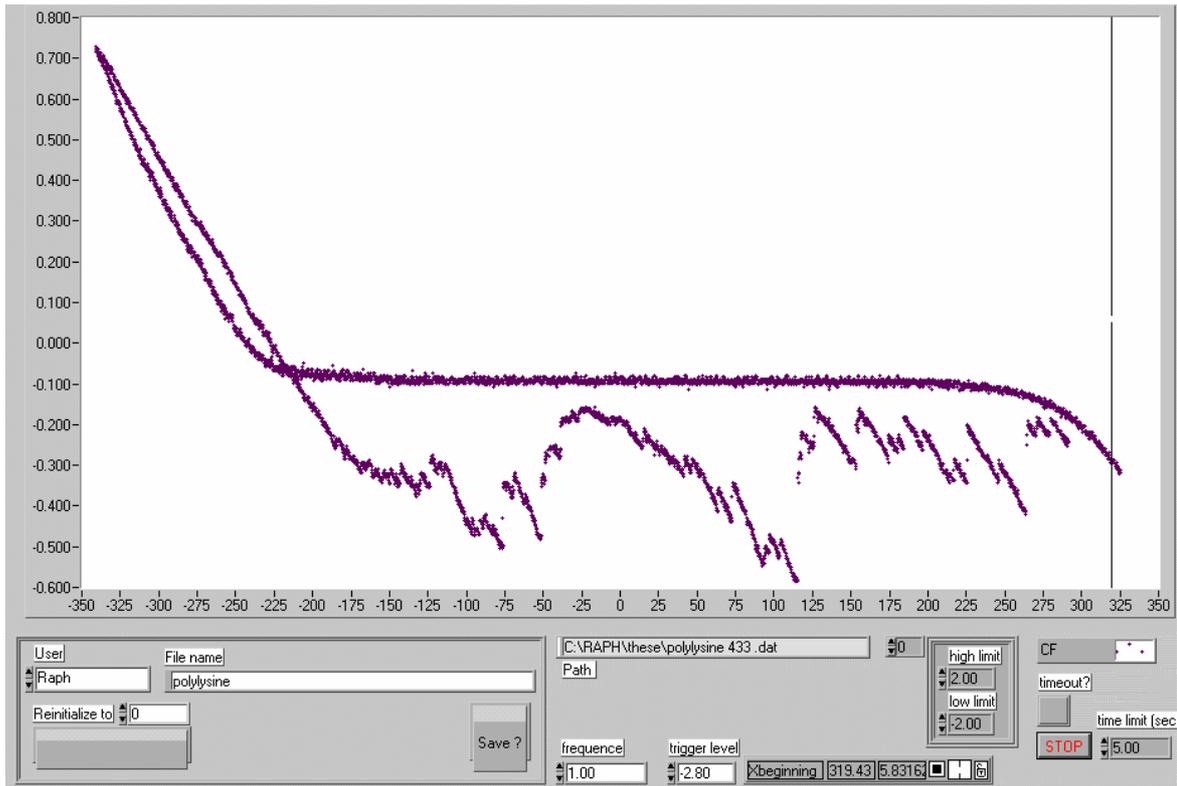


Figure A.1: CF2002, User interface

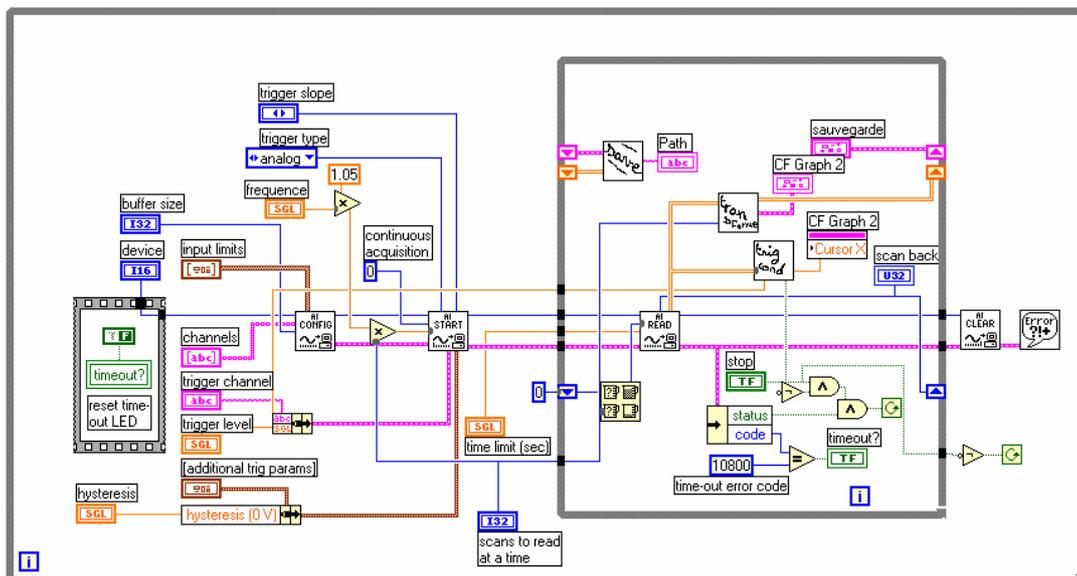


Figure A.2: CF2002.vi, Diagram

### **Description générale du programme d'analyse « fitcf-fullauto2 »**

Le programme *fitcf-fullauto2* est le dernier d'une série de programmes de plus en plus élaborés que nous avons mis au point pour accélérer et automatiser la détection des ruptures dans les courbes de force. La figure A.3 montre l'interface destinée à l'utilisateur du programme. La figure A.4 montre le diagramme correspondant.

Une boucle permet de réaliser sur chaque courbe comprise entre une valeur initiale et une valeur finale fixées par l'utilisateur les opérations suivantes :

- affichage des courbes de forces
- calcul de la ligne de base à partir des 100 derniers points de la courbe
- détection (0.1V au-dessus de la ligne de base) et ajustement linéaire de la zone de contact
- calcul de l'écart quadratique dans une fenêtre (de quelques points) qui se déplace le long de la courbe de rétraction
- affichage de cet écart quadratique en fonction du déplacement du piezo
- détermination et affichage d'un seuil automatique
- détection des pics d'écart quadratique supérieur au seuil
- autour de chaque pic, recherche du point de force minimale (force moyenne sur la fenêtre)
- élimination des éventuels "faux positifs" suivant les critères décrits plus loin
- enregistrement pour chaque courbe, dans une ligne d'un tableau dans l'ordre : de son numéro, du nombre de ruptures, de l'ordonnée à l'origine et de la pente de la zone de compliance, de la valeur de la tension sur la ligne de base, et des distances et des forces de chaque rupture.

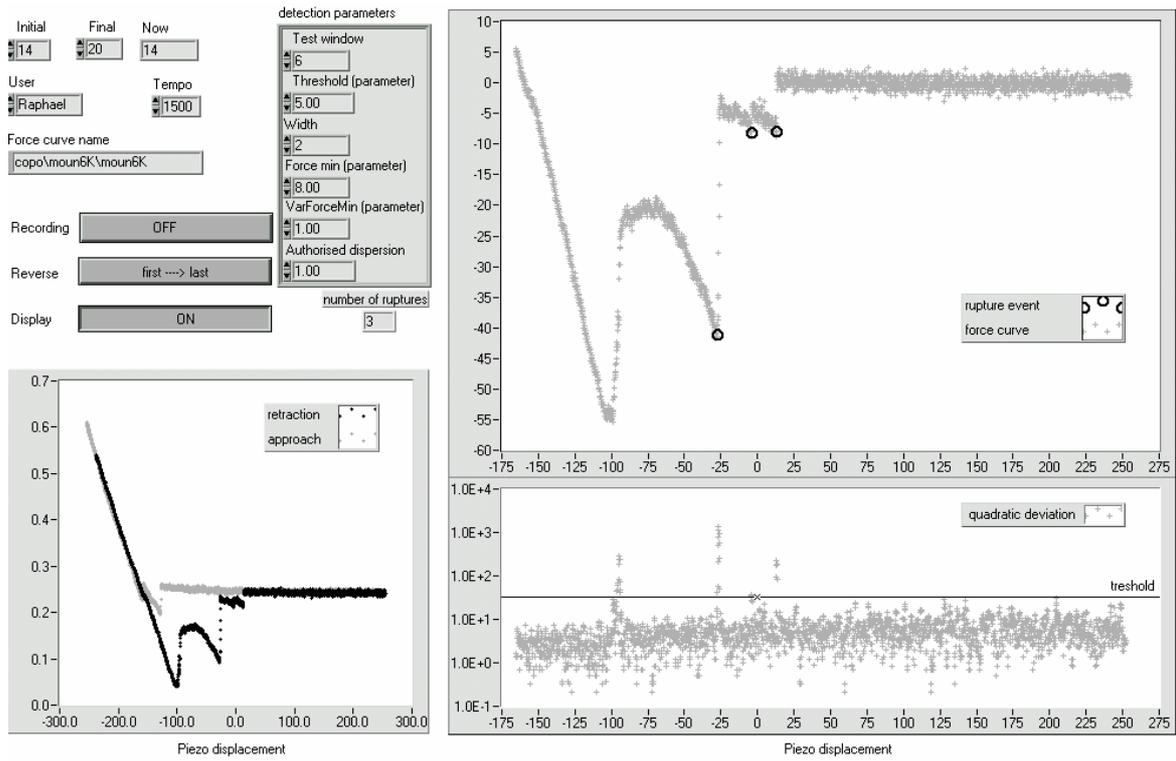


Figure A.3: Fitcf-fullauto2.vi, User interface

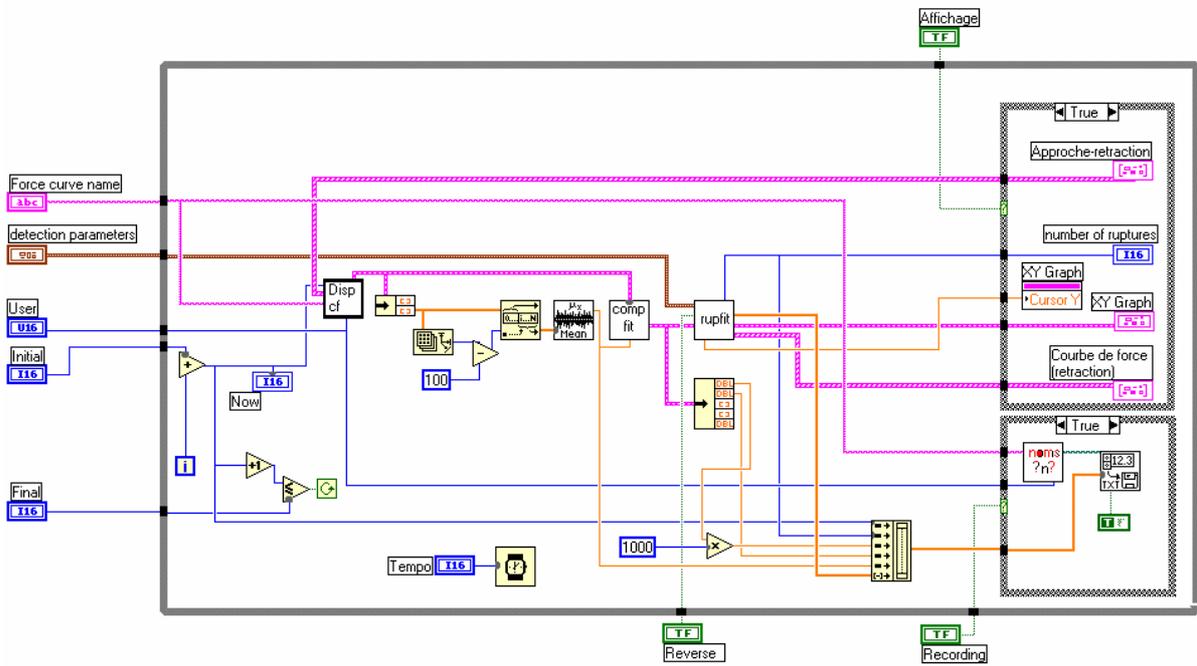


Figure A.4: Fitcf-fullauto2.vi, Diagram

## Description de l'interface utilisateur :

L'interface présente **treize contrôles**, c'est-à-dire treize entrées modifiables par l'utilisateur. Ces contrôles sont de quatre types : numériques (8), booléens (3), textuels (1) ou menu déroulant (1).

### Contrôles numériques :

Initial  
 Numéro de la première courbe à traiter

Final  
 Numéro de la dernière courbe à traiter

Tempo  
 Temps (ms) d'affichage de chaque courbe

Test window  
 Nombre de points expérimentaux dans la fenêtre de test

Threshold (parameter)  
 Paramètre de seuillage. Le seuil réel est calculé à partir de ce paramètre, de la moyenne et de l'écart quadratique des écarts quadratiques. Plus la valeur de ce paramètre est élevée, plus le seuil sera élevé.

Width  
 Il s'agit de la largeur minimale (nombre de points dépassant le seuil) pour qu'un pic soit détecté.

Force min (parameter)  
 Ce paramètre sert à définir une force minimale pour retenir les ruptures.

VarForceMin (parameter)  
 Ce paramètre sert à définir une variation minimale de force pour définir les ruptures.

Authorised dispersion  
 Ce paramètre sert à définir une dispersion maximale pour les points définissant la force de rupture. La force de rupture est calculée par une moyenne sur plusieurs points (le même nombre que dans la fenêtre test). Si ces points sont trop dispersés, la rupture sera écartée.

### Contrôles booléens :

Recording  Permet de ne sauver le tableau de valeur que lorsque l'on a optimisé les paramètres de détection.

Reverse  Définit le classement des ruptures dans le tableau de résultats.

Display

Permet de ne plus faire défiler les courbes (et donc d'accélérer le déroulement du programme) lorsque, satisfait des paramètres d'analyse, l'utilisateur procède à l'enregistrement des données.

### Menu déroulant :

User

Permet de choisir l'utilisateur et donc le dossier où le programme va chercher les fichiers à ouvrir.

### Contrôle textuel :

Force curve name

Ce dernier contrôle permet à l'utilisateur d'indiquer le nom et l'adresse exacte des fichiers à traiter (le début de l'adresse est fixé par le choix de l'utilisateur et n'a pas besoin d'être retapé ici).

L'interface présente **trois indicateurs** graphiques (figure A.3) :

- la courbe de force approche rétraction (en bas à droite)
- la courbe de force (rétraction, sans la zone de contact) avec les ruptures détectées par le programme (en haut à gauche) en fonction de la position du piezo
- la courbe présentant les écarts quadratiques calculés dans la fenêtre de test en fonction de la position du piezo avec le seuil utilisé pour la détection des pics (en bas à droite)

et deux indicateurs numériques :

number of ruptures

Nombre de ruptures détectées par le programme.

Now

Numéro de la courbe de force traitée en ce moment par le programme.

### Description du diagramme :

Les contrôles et les indicateurs sont représentés sur le diagramme par des petits rectangles. Le code couleur indique le type de données. En plus des contrôles et des indicateurs, on peut voir sur le diagramme des fils, des blocs (sous-programmes) et des structures. Les structures apparaissent sous la forme de rectangles. Sur ce diagramme, on peut voir deux types de structures :

- Le grand rectangle qui englobe presque tout le programme est une boucle « tant que » qui permet de faire tourner le programme jusqu'à ce que la dernière courbe soit traitée.

- Deux plus petits rectangles (situés à droite) sont des structures de type « cas », c'est-à-dire que l'action effectuée à l'intérieur dépend de la valeur d'une variable booléenne.

Le programme principal gère l'affichage (ou non) des courbes de force, l'enregistrement (ou non) des données, et le défilement des données avec la vitesse fixée par l'utilisateur.

Le format d'enregistrement des données est décrit ci-dessus. Il faut remarquer que le nombre de ruptures n'étant pas constant, la longueur des lignes du tableau n'est pas constante. Ceci peut poser des problèmes à certains programmes (notamment Origin) pour la lecture du tableau. Le tableur EXCEL permet de lire ces tableaux et de les réenregistrer.

### Description des sous programmes :

La figure A.5 montre la hiérarchie des vingt sous-programmes appelés par *fitcf-fullauto2*. La fonction de chacun de ces sous programmes est décrite ci-dessous.



*disp cf* *disp cf*.vi réalise la lecture du fichier, la transformation des données dans un format adapté à l'affichage, sépare la partie approche (4000 premiers points) de la partie rétraction de la courbe (4000 points suivants).



*comp fit* *comp fit*.vi découpe la courbe de rétraction en deux tronçons. Le premier, situé 0.1V au-dessus de la ligne de base, est la zone de contact. *Compfit2*.vi ajuste la zone de contact et transmet les paramètres de l'ajustement, le deuxième tronçon (partie intéressante de la courbe), et la moyenne sur la ligne de base.



*users*.vi définit les emplacements des dossiers des utilisateurs.



*noms ?n?* *nomsN*.vi crée le chemin de sauvegarde du fichier de résultats.



*noms ???* *noms*.vi crée le chemin de lecture des fichiers des courbes de force.



*tronçon*.vi : à partir de deux séries de nombres (X et Y), découpe les deux séries en trois tronçons. Les indices de coupure sont définis par des seuils agissant sur le premier vecteur (X). Le deuxième et le troisième tronçon sont accessibles en sortie.

 rupfit

*rupfit.vi* transforme la courbe de rétraction pour un affichage de la force en nanomètre avec une ligne de base à 0, sous-traite la détection des ruptures (*tempanalyse.vi*) et la transformation déplacement/distance (*Distsauts.vi*), gère l'ordre d'enregistrement des ruptures (premier au dernier ou dernier au premier).

 dist  
rupt

*distsauts.vi* transforme le déplacement du piezo auquel se produit la rupture en distance entre la pointe et la surface à l'aide des paramètres de la zone de contact.

 detec  
tion  
rupture

*tempanalyse.vi* détecte les ruptures, et élimine les faux positifs à l'aide des sous-programmes ci-dessous. La figure A.6 montre le diagramme.

 test  
windo  
scan

*testwindowscan.vi* fait glisser la fenêtre de test le long de la courbe de rétraction.

 decou  
plit

*decouplit.vi* calcule, pour chaque position de la fenêtre, la variance de la force, la moyenne de la force et du déplacement.

 seuil  
auto

*seuilautofit.vi* détermine le seuil automatique (voir ci-dessous).

 Threshold  
Peak  
Detector

*Threshold Peak Detector.vi* donne un tableau contenant les positions des pics. Ce sous-programme est contenu dans la bibliothèque Labview et a été utilisé sans modification.

 sub  
tableau

*subtableau.vi* construit un extrait d'un tableau 1D à partir de la collection des indices souhaités.

 rup  
scan

*rupscan.vi* construit un tableau 2D à partir d'un tableau 1D et d'une collection d'indices. Chaque ligne est constituée par 15 valeurs du tableau 1D situées autour d'un indice de référence (indice de la rupture).

 ref

*reference.vi* calcule trois grandeurs de référence à partir des cent derniers points de la courbe de rétraction (ligne de base). Ces trois grandeurs sont la dispersion maximale autorisée, la force maximale autorisée, et la variation minimale de force.

 crit  
1

*crit1* calcule la force minimale et élimine les ruptures correspondant à une trop faible variation de force ou à une augmentation de la force (élimine = remplace la valeur de la force par un zéro).

 crit  
2

*crit2* élimine les ruptures pas nettes.

**crit  
3**

*crit3* élimine les ruptures avec une distance inférieure ou égale à 0 nm (accident dans la zone de contact).

**supp  
ts les  
zeros**

*suptsleszeros.vi* supprime les zéros contenus dans un tableau en utilisant le programme ci-dessous.

**sup  
un  
0**

*sup1zero.vi*

### Paramètres importants :

Soit une courbe de force constituée des points  $(X_i, F_i)$  où  $X_i$  est le déplacement du piezo en nm et  $F_i$  la déflexion correspondante du ressort en nm ( $F_i$  est négative pour une force attractive).

Le seuillage s'effectue sur la courbe  $Var(i)$  définie par :

$$Var(i) = \frac{1}{N} \sum_{j=i}^{j=i+N} (F_j - \bar{F}_i)^2 \quad \text{avec} \quad \bar{F}_i = \frac{1}{N} \sum_{j=i}^{j=i+N} F_j$$

$N$  est le nombre de points dans la fenêtre de test.

Le seuil de détection est défini par :

$$Seuil = \overline{Var} + \alpha \sqrt{\frac{1}{50} \sum_{j=L-50}^{j=L} (Var(j) - \overline{Var})^2}$$

avec  $\overline{Var} = \frac{1}{50} \sum_{j=L-50}^{j=L} Var(\bar{X}_j)$ ,  $\bar{X}_i = \frac{1}{N} \sum_{j=i}^{j=i+N} X_j$ ,  $L$  le nombre total de points expérimentaux

dans la courbe de rétraction, et  $\alpha$  le paramètre de seuillage défini par l'utilisateur. Le seuil est donc estimé à partir des fluctuations sur la ligne de base (50 derniers points).

La force de rupture  $\bar{F}_R$  est définie comme le minimum des  $\bar{F}_i$  dans un voisinage précédent le pic détecté. La largeur de ce voisinage est identique à la largeur de la fenêtre de test. La rupture est éliminée si les points expérimentaux ne respectent pas les cinq conditions suivantes :

1. la rupture correspond à une diminution de la force (extension du polymère) :

$$\bar{F}_R < \bar{F}_V \quad \text{avec } V \text{ l'indice du premier point du voisinage défini ci-dessus.}$$

2. suivie d'une brusque augmentation de la force (rupture) :

$$\bar{F}_{R+N} - \bar{F}_R > \Delta \bar{F}_{\min}$$

3. la rupture est nette :

$$Var(\bar{X}_R) < Var_{\max}$$

4. elle ne se produit pas dans la ligne de base :

$$\bar{F}_R < \bar{F}_{\min}$$

5. la distance entre la pointe et la surface est supérieure à zéro.

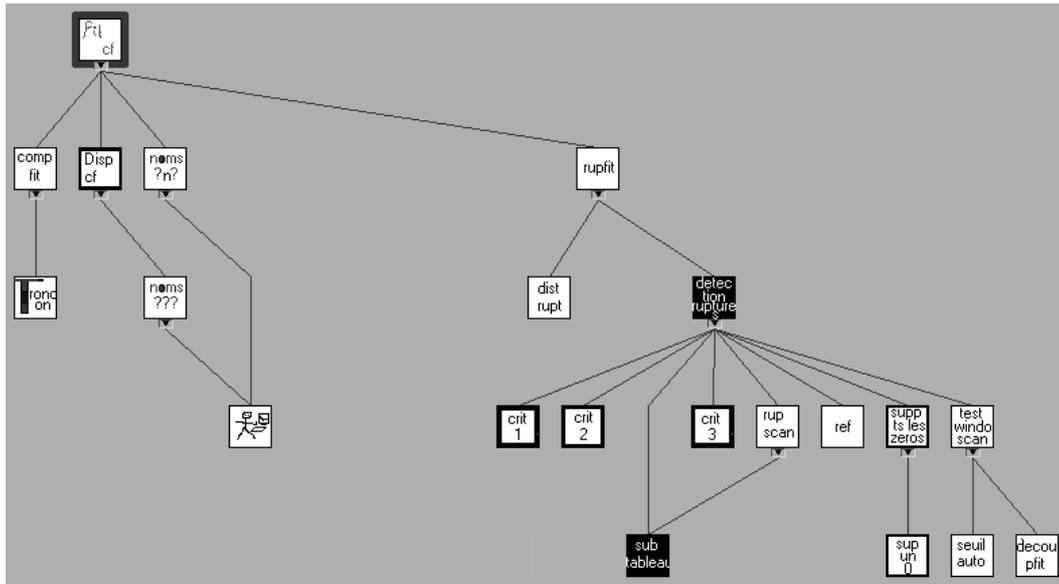


Figure A.5: Fitcf-fullauto2.vi, Sub vi hierachy

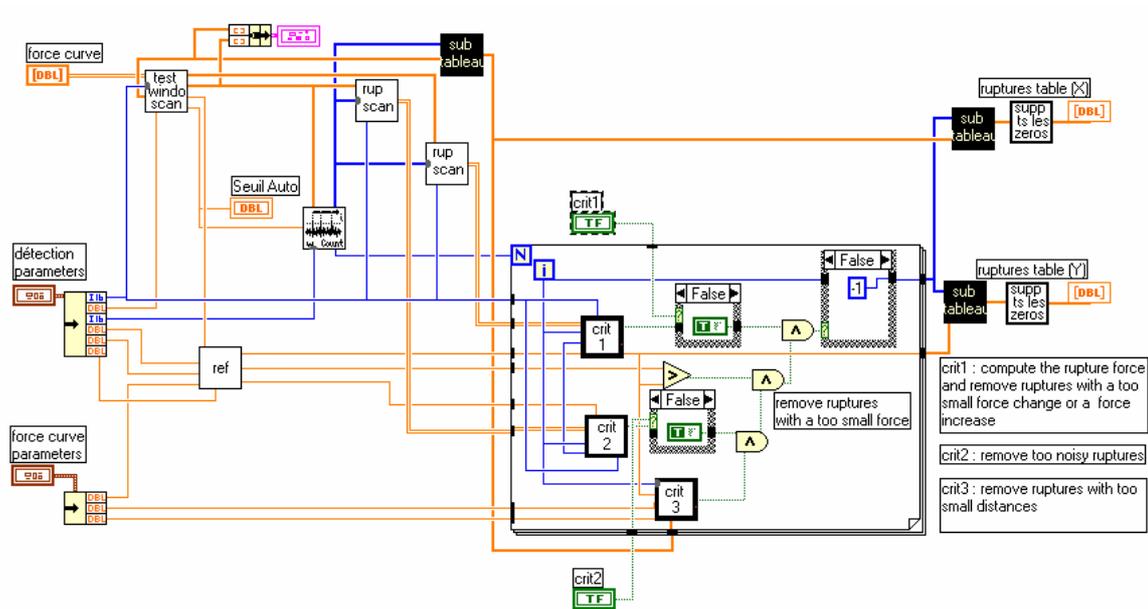


Figure A.6: Tempanalyse.vi, Diagram