



HAL
open science

Spectroscopies à l'échelle de la molécule individuelle : dynamique de force pour l'interaction d'oligopeptides sur or et diffusion Raman exaltée par effet de pointe sur rotaxanes

Marie Steffenhagen

► **To cite this version:**

Marie Steffenhagen. Spectroscopies à l'échelle de la molécule individuelle : dynamique de force pour l'interaction d'oligopeptides sur or et diffusion Raman exaltée par effet de pointe sur rotaxanes. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066746 . tel-02180603

HAL Id: tel-02180603

<https://theses.hal.science/tel-02180603>

Submitted on 11 Jul 2019

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 DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Chimie-Physique - Ecole doctorale 388

Présentée par

Marie STEFFENHAGEN

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

**Spectroscopies à l'échelle de la molécule individuelle : dynamique de force
pour l'interaction d'oligopeptides sur or et diffusion Raman exaltée par
effet de pointe sur rotaxanes**

Soutenue publiquement le 10 octobre 2016

Devant le jury composé de :

Pr. Emmanuel MAISONHAUTE	Université Pierre et Marie Curie	Directeur de thèse
Dr. Jessem LANDOULSI	Université Pierre et Marie Curie	Co-superviseur
Dr. Grégory FRANCIUS	CNRS - Université de Lorraine	Rapporteur
Dr. Vincent DUPRES	Institut Pasteur Lille	Rapporteur
Pr. Jean-François LAMBERT	Université Pierre et Marie Curie	Examineur
Pr. Marie ERARD	Université Paris Sud	Examineur

A ma famille.

Résumé : Au-delà de la simple imagerie, les techniques de champ proche permettent sonder des interactions moléculaires de manière contrôlée sur un nombre réduit de molécules, voire une seule. Dans ce sujet, deux techniques de spectroscopie à sonde locale ont été mises à profit. D'une part, la spectroscopie dynamique de force (AFM-DFS) appliquée à l'étude des interactions entre l'oligopeptide CK(AAAAK)₂C et une surface d'or a révélé plusieurs signatures s'échelonnant de 100 pN à plus de 300 pN, et plus rarement, quelques signatures supérieures à 1 nN. Pour interpréter cette réponse complexe, nous avons testé sur notre système une correspondance entre les modèles cinétiques de Bell-Evans et Friddle-DeYoreo appliqués dans les systèmes ligand-récepteur lorsque le taux de charge, c'est à dire la variation de la force par unité de temps varie. Plusieurs méthodes d'exploitation, en fonction de l'expression prise pour le taux de charge tenant compte ou non de la dynamique de dépliement de l'agent de couplage ont été testées. Un outil numérique a également été développé pour le traitement automatique des courbes de force. Les biais liés au sous-échantillonnage de données, à une sélection manuelle, ou au choix des critères de classement des variables sont limités par la mise en place d'outils automatisant ce processus. D'autre part, couplée à la microscopie à effet tunnel (STM), la spectroscopie Raman exaltée par effet de pointe (TERS) a été mise à profit pour l'observation de la signature vibrationnelle d'un rotaxane géant adsorbé sur une surface d'or. Les images STM ont de plus permis de caractériser en conditions ambiantes des rotaxanes individuels.

Mots clés : *spectroscopie dynamique de force ; AFM ; TERS ; rotaxane ; or ; peptide*

Abstract : Beyond simply imaging, near-field techniques allow to probe and control molecular interactions onto a reduced number of molecules, if not a single one. In this subject, we took advantage of two local-probe spectroscopies. On the one hand, dynamic force spectroscopy (AFM-DFS) was applied to measure interactions between the oligopeptide CK(AAAAK)2C and a gold surface. It revealed several signatures ranging from 100 to 300 pN and more rarely some signatures above 1 nN. In order to interpret this complex response, we tested the kinetic models of Bell-Evans and Friddle-De Yoreo generally applied in ligand-receptor systems onto our system when the loading rate, i.e. the variation of the applied force per unit of time, is varied. Several interpretation methods including or not the effect of the unfolding of the coupling agent into the loading rate expression were tested. A numeric tool was also developed for the automatic processing of the force curves. Biases related to under-sampling of data, due to manual selection, or due to variables classification and mis-representation were limited by the implementation of tools automating the whole process. On the other hand, coupled to Scanning Tunneling Microscopy (STM), tip enhanced Raman spectroscopy (TERS) allowed us to observe the vibrational signature of a giant rotaxane on a gold substrate. STM images performed in ambient conditions could moreover highlight domains with individual molecules.

Keywords : *dynamic force spectroscopy ; AFM ; TERS ; rotaxane ; gold ; peptide*

Remerciements

Je tiens avant tout à remercier le directeur de cette thèse, M. Emmanuel Maisonhaute, pour m'avoir permise de réaliser ce travail et de m'avoir soutenue tout le long de ces trois années jusqu'à l'aboutissement de ce projet. En dépit des connaissances sommaires que j'avais alors en chimie-physique en 2013, et des difficultés d'interprétations qu'amènent les domaines d'étude liés au champ proche et auxquelles nous avons été confronté, l'investissement sans faille et les conseils qui m'ont été apportés, associés à la liberté d'orientation des thématiques que nous avons explorées ont contribué à surmonter ces difficultés.

Je remercie également le co-superviseur de cette thèse, M. Jessem Landoulsi pour la confiance qu'il m'a accordée aussi bien que ses encouragements permanents et en toute épreuve, tout en me donnant une grande liberté sur ce projet qui nous ont permis d'explorer des problématiques dont j'espère avoir été à la hauteur.

Je remercie M. François Huet pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques, ainsi que Mme Claire-Marie Pradier et Mme Hélène Pernot la directrice actuelle du Laboratoire de Réactivité des Surfaces pour m'avoir permise d'effectuer une grande partie des réalisations expérimentales de ce projet dans les meilleures conditions.

Je remercie tous les membres du jury pour le temps et l'attention qu'ils accorderont à ce travail, ainsi que d'avoir accepté cette tâche, spécialement les rapporteurs de cette thèse à qui incombe la charge d'une lecture plus critique de ce manuscrit.

Mes remerciements vont ensuite aux membres de mes deux laboratoires d'accueil. A commencer par les secrétaires du LISE dont l'enthousiasme matinal n'a jamais fait défaut, mais également les membres permanents, particulièrement ceux qui ont partagé avec nous les pauses déjeuner, ainsi que quelques sorties et parfois même des voyages. Cette liste serait incomplète si je n'y ajoutais pas les non-permanents, les fidèles au poste de la pause café, les fidèles de la pause nicotine, les travailleurs clandestins du sous-sol, les guides suprêmes démocratiquement auto-proclamés, les bretons (auto-proclamés aussi), les vendéens, les iraniens, les sudistes midi-pyrénéens, les humoristes (auto-proclamés également), les anciens, les perdus-retrouvés, les petites en taille mais grandes par leur gentillesse (elles se reconnaîtront), les collègues de bureau festifs, et enfin tous ceux qui m'ont accompagné pendant toutes ces trois années et qui ont contribué à ce que cette longue route ne soit pas une traversée du désert, mais le boulevard de la Sunset Strip. Un grand merci donc à vous, Pierre, Florence, Lionel, Stéphane, Simon, Cyril, Francky, Thomas, Maroua, Jane, Sarah, Fatemeh, Carlos, Nour, Pierluca, Edgard, Larbi, j'en oublie certainement.... Un grand merci donc à tous ceux que j'aurais oublié (Nico, Mathieu). Je remercie Pierre particulièrement, un co-bureau inoubliable pour tout le soutien qu'il m'a apporté et le temps qu'il a consacré à me former en chimie. Un futur professeur pédagogique à souhait et surtout très patient ! Et à qui en chimie je dois beaucoup de ce que je sais aujourd'hui.

On le savait, c'est une chose étrange à la fin que la thèse, un jour je m'en irai sans en avoir tout dit ! M'a dit un jour un certain Fabrice en paraphrasant un vieux monsieur en chapeau à plume. Ou quelque chose comme ça. La thèse est un art majeur, dirait Gainsbarre. Et le manuscrit alors ? Rabelais aurait certainement une suggestion savoureuse là-dessus. Fabrice, depuis le début de nos études de physique, on n'a pas encore finit d'en rire. Merci d'être toujours là pour en rire encore après tant d'années. Et un grand merci spécial à Sarah, évidemment, dont l'amitié dépasse la décennie depuis quelques années maintenant.

Mes derniers remerciements vont à ma famille, les lorrains, mes tantes, mes oncles, et bien sûr tous mes cousins et même la petite dernière qui me fera l'honneur de venir étendre la famille peu avant ma soutenance, mais également Hubert et Christiane nos toulousains. Et enfin, un grand merci à mes parents. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout le soutien que vous m'avez accordé, avant et pendant cette thèse. Malgré les difficultés que j'y ai rencontré, cette réussite vous pouvez y prendre votre part très largement, car vous êtes les premiers à y avoir contribué.

Table des matières

Introduction	xx
I Techniques de champ proche	1
I.1 Principe de la spectroscopie de force	2
I.2 Forces d'interaction	4
I.3 Mesures de conductance	8
II Modèles associés au champ proche	11
II.1 Élongation de l'agent de couplage	11
II.2 Modèles dynamique de la rupture de liaison	14
II.3 Transport électronique en molécule unique	19
II.3.1 Régime diffusif : modèle de Drüde-Boltzman	19
II.3.2 Régime ballistique : modèle de Landauer - Büttiker	20
III Étude bibliographique	23
III.1 Liaison Soufre-Or	25
III.1.1 Une rupture controversée	25
III.1.2 Conductance	28
III.1.3 Force : un consensus probable à 1-1.5 nN	29
III.2 Liaison Azote-Or	31
III.2.1 Conductance	33
III.2.2 Force : une absence de consensus	33
III.3 Cas particulier des peptides	36
IV Méthodes expérimentales	39
IV.1 Choix du peptide	39

IV.2	Préparation des substrats	42
IV.3	Préparation des sondes	48
IV.3.1	Pointes STM/TERS	48
IV.3.2	Pointes C-AFM	49
IV.3.3	Pointes AFM fonctionnalisées	50
V	Méthodes statistiques et numériques	53
V.1	Traitement des courbes de force	54
V.1.1	Pré-traitement	55
V.1.2	Détection des ruptures	56
V.1.3	Classement	59
V.1.4	Représentation	60
V.1.5	Discussion	63
V.2	Traitement des courbes de conductance	64
V.2.1	Pré-traitement	65
V.2.2	Filtrage	66
V.2.3	Reconstruction des plateaux	67
VI	Caractérisation mécanique de l'interaction Peptide/Or	71
VI.1	Un problème de représentation	72
VI.1.1	Représentation par histogramme	72
VI.1.2	Représentation en cartographie Force-Distance	73
VI.1.3	Évaluation du seuil de discrimination spécifique/non-spécifique	73
VI.2	Forces de rupture	77
VI.2.1	Caractérisation des forces de rupture en milieu tamponné	77
VI.2.2	Discussion	86
VI.2.3	Caractérisation des forces de rupture en milieu promoteur d'hé- lice α	87
VI.2.4	Expériences de contrôle	89
VI.2.5	Discussion	100
VI.3	Caractérisation du spectre de force	102
VI.3.1	Spectre DFS de l'interaction Biotine/Streptavidine	104

VI.3.2	Spectre DFS de l'interaction Peptide/Or	107
VI.3.3	Discussion	116
VI.4	Caractérisation de l'élongation	118
VI.4.1	Biais liés à l'estimation de L_K	118
VI.4.2	Exemple sur PEG(18)-Biotine/Streptavidine	119
VI.4.3	Comparaison avec le système PEG(18)-Peptide	123
VI.5	Conclusion	125
VI.5.1	Forces de rupture en milieu tamponné	125
VI.5.2	Spectroscopie de force dynamique	126
VI.5.3	Ajustement des réponses en force	127
VII	Caractérisation électrique de l'interaction Peptide/Or	129
VII.1	Jonction Or-Or	130
VII.1.1	Configuration STM	130
VII.1.2	Configuration C-AFM	131
VII.2	Jonction Or-1,8-octanedithiol-Or	134
VII.3	Jonction Or-Peptide-Or	137
VII.3.1	Conductance	137
VII.3.2	Mesures couplées	138
VII.4	Conclusion	142
VIII	Mise en œuvre de la spectroscopie TERS sur rotaxanes	143
VIII.1	Signature vibrationnelle en champ proche	144
VIII.1.1	Approche photothermique : AFM-IR	144
VIII.1.2	Spectroscopie Raman locale : <i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i> (SERS)	145
VIII.1.3	Spectroscopie Raman locale : <i>Tip Enhanced Raman Spectroscopy</i> (TERS)	146
VIII.2	Mise en œuvre sur système de référence	147
VIII.3	Imagerie et spectroscopie TERS d'un rotaxane géant	150
VIII.3.1	Molécule étudiée	150
VIII.3.2	Imagerie STM	150

VIII.3.3	Obtention d'un spectre TERS	152
VIII.3.4	Conclusions et perspectives	155
Annexes		161
A	Caractérisations complémentaires	163
A.1	Spectre DRX	163
A.2	Pointes AFM	164
A.3	Pointes STM	165
B	Programmes Matlab	167
B.1	Traitement des courbes de force	167
B.1.1	Programme principal	167
B.1.2	Fonctions	189
B.2	Traitement des courbes de conductance	192

Table des figures

I.1	Principes des montages C-AFM (a) et STM (b) et cartographies de monocouches auto-assemblées obtenues avec chaque technique sur 1)-2) dodecanthiol et 3) rotaxane	2
I.2	Description schématique d'un cycle d'approche/retrait en spectroscopie de force.	3
I.3	Description schématique d'un cycle d'approche/retrait en STM/C-AFM.	9
II.1	Description des régimes d'élongation du polymère PEG en milieu aqueux [1].	13
II.2	Illustration de l'abaissement de la courbe de potentiel par application de la force F d'après [2].	15
II.3	Illustration de la barrière énergétique en fonction des coordonnées de réaction dans le modèle de Bell-Evans (a) et dans le modèle de Friddle-De Yoreo (b) d'après [3]. L'évolution de la force en fonction de la vitesse de charge est représentée dans les encarts.	16
III.1	Courbes de conductance couplées à la force obtenues d'après [5]. Les réarrangements successifs d'atomes d'or sont révélés par les discontinuités observées expérimentalement (a-b) et en simulation (c). . .	27
III.2	Illustration des configurations <i>top-hollow</i> et <i>top-top</i> correspondant respectivement aux des sets de conductance élevés (H) et faibles (L) [4].	28

III.3	Courbes de force réalisées sur adénosine et thymidine [6]. L'absence d'interaction de la thymidine avec le substrat a permis de conclure sur la spécificité des interactions amine primaire-or.	34
III.4	Histogrammes et plateaux de conductances obtenus sur une séquence H(EL) ₅ C à pH 2 (a), (b) et à pH 6.9 (c), (d) [7]	37
IV.1	Illustration du peptide de séquence CK(AAAAK) ₂ C choisi pour cette étude en structure hélicoïdale (a) et planaire (b).	41
IV.2	Spectre de dichroïsme circulaire réalisé sur la séquence CK(AAAAK) ₂ C à différents solvants.	42
IV.3	Image de topographie AFM en mode contact sur substrat d'or (a),(b) et topographie STM (c).	43
IV.4	Images de topographie AFM réalisées en mode contact sur substrat d'or fonctionnalisé par le peptide à 5x10 ⁻⁴ M (a) et 1.7x10 ⁻⁵ M (b) et coupes associées.	44
IV.5	Fractions molaires d'OT et ODT adsorbés en surface χ_{SAM} en fonction des fractions molaires en solution χ_{sol} d'après [8]	46
IV.6	Images de topographie C-AFM (mode tunnel) réalisées sur SAM d'alcanethiol et sur SAM binaire alcanthiol(10 ⁻³ M) /GSH (10 ⁻⁴ M)	46
IV.7	Spectres XPS de l'azote (1s) et du soufre (2p) sur SAM binaire DDT/GSH à concentration variable en GSH.	47
IV.8	Evolution des rapports de concentration atomique en fonction de la concentration de GSH en solution.	47
IV.9	Image SEM-FEG de pointes STM Au préparées par dissolution électrochimique.	49
IV.10	Image SEM-FEG de pointes AFM commerciales recouvertes d'or par pulvérisation cathodique.	50
IV.11	Spectre de fluorescence X sur leviers MLCT/DNP10 après dépôt d'or.	50
IV.12	Illustration des principales étapes du protocole de fonctionnalisation.	51

V.1	Courbs de force brute dont les zones 1 (a), correspondant à la zone 2 d'oscillation libre (b) et en représentation force-distance c). La déviation standard est ici à 3.7 pN.	55
V.2	Exemple sur une courbe présentant de multiples interactions. La ligne rouge présente un seuillage arbitraire.	58
V.3	Illustration de la méthode de sélection sur un agrandissement de la courbe précédente pour le septième pic.	58
V.4	Exemples de détections de ruptures sur plusieurs courbes de force. Le pic en rouge correspond à l'adhésion non-spécifique, en vert sont les ruptures multiples, en orange la dernière interaction.	60
V.5	Histogramme dressés à partir du même jeu de données à trois nombre de classes m différents.	61
V.6	Estimation de h selon le critère de validation croisée, et histogramme estimé.	62
V.7	Estimation par histogramme superposée à son estimation par la méthode des noyaux (KDE).	63
V.8	Cartographies force-distance réalisées sur 4 jeux de données pour l'interaction événement unique.	64
V.9	Courbe de conductance (a) et agrandissement de la zone 1 (b). La déviation standard est ici à 1.8 pA.	65
V.10	Exemple de courbe de conductance bruitée (a) et filtrée (b) sur jonction or-peptide-or en C-AFM. Lorsque l'ordre de grandeur des artefacts contribue dans le palier, ce signal doit être filtré.	66
V.11	Exemple de courbes de conductance obtenues sur jonction or-peptide-or à $V_{bias} = 0.1$ V. La courbe en bleu représente les données brutes, la courbe rouge sa reconstruction en paliers.	68
V.12	Histogrammes sans sélection sur jonction or-1,8 octanedithiol-or pour deux valeurs de classes (bin) et 11 746 courbes. Les histogrammes en rouge a),b) sont construits à partir des données brutes, en noirs c),d) à partir des paliers reconstruits.	69

VI.1	Événements sans tri : exemples de courbe de force (a),(c) et histogrammes associés (b),(d). Sur l'histogramme (b), la dé-corrélation des événements d'adhésion et de rupture est facilitée par la bimodalité de la distribution. Sur l'histogramme (d), le chevauchement des contributions ne permet pas de séparer les distributions en catégorie d'événements.	72
VI.2	Cartographie force-distance associé à l'histogramme figure VI.1 (d), et histogrammes projetés. La cartographie révèle que la dispersion apparente est liée aux événements adhésifs inférieurs à 5 nm.	74
VI.3	Estimation de la probabilité P et de F^* en fonction du seuil de sélection z_s et influence de ce seuil sur le tri des événements. La zone grisée correspond au seuil fixé dans la majorité des expériences.	75
VI.4	Cartographies force-distance associé à l'histogramme figure VI.1-a), et contribution la plus probable dans a) l'ensemble des interactions adhésives (sans dépliement), b) l'ensemble des interactions uniques, c) l'ensemble des interactions multiples, d) l'ensemble des dernières interactions de chaque courbe.	76
VI.5	Réponses en force obtenues sur le système linker(PEG)-peptide/or issus de multiples jeux de données comprenant a) aucune interaction, b) un événement adhésif, c) un événement adhésif de type plateau, d) un événement adhésif non-spécifique, e) une combinaison d'événements adhésif et plateau, f-g) des événements de rupture multiples, h-i) des événements de rupture unique.	78
VI.6	Interactions sans tri : distribution et cartographie associée de l'ensemble des interactions. La force la plus probable F^* est estimée à partir du maximum de la densité kde. Le pourcentage étant calculé à partir du nombre d'événements décomptés et rapporté au prorata de toutes les interactions, il est ici à 100%.	79
VI.7	Interactions non-spécifiques : les courbes de forces présentent des événements de type adhésif (a), et une combinaison d'adhésion/-rupture discriminé par le seuil en distance (b).	80

VI.8	Interactions spécifiques : les courbes de forces illustrent des ruptures multiples incluses dans cette catégorie dans le cas où les ruptures sont attribuables à plusieurs molécules avec b) et sans adhésion au contact c) et le cas où cette distinction n'est pas possible a).	82
VI.9	Ruptures uniques : courbes de force illustrant les cas où a)-b) les interactions sont de type adhésive et mettent en jeu une combinaison d'interaction Van der Waals et hydrogènes, et c)-d) lorsque l'ordre de grandeur des ruptures ne permet plus de les associer aux interactions adhésives.	84
VI.10	Rupture unique et dernier événement : distribution et cartographie associée.	85
VI.11	Histogramme des forces de rupture F^* pour les interactions non-spécifiques (a), uniques (b) et spécifiques (c) réalisé sur 37 jeux de données, et (d) histogramme réalisé sur l'ensemble des forces de ruptures spécifiques pour ces jeux, totalisant 14929 courbes.	86
VI.12	Cartographie (a) en milieu tamponné par le PBS (400 courbes) et (b) en solution aqueuse à 20% de TFE (707) pour l'ensemble des interactions (bleu) et les ruptures uniques (rouge).	88
VI.13	Contrôles : illustration du système de référence a) et des systèmes associés aux contrôles réalisés b) en l'absence du peptide et en passivant la surface en présence c) et en l'absence du peptide d). Le blocage de la surface est réalisé par une fonctionnalisation au peptide (c) ou au dodecanethiol (d).	90
VI.14	Contrôle 1 : Courbes de forces sur système PEG/or a)-b). Le pourcentage est calculé au prorata du nombre de courbes. La cartographie c) correspond à tous les événements.	91
VI.15	Contrôle 2 : Courbes de forces sur système PEG-peptide/or fonctionnalisé a),b),c). Le pourcentage est calculé au prorata du nombre de courbes. La cartographie d) correspond à tous les événements.	92

VI.16	Contrôle 3 : Courbes de forces sur système PEG/or fonctionnalisé a),b),c). Le pourcentage est calculé au prorata du nombre de courbes. La cartographie d) correspond à tous les événements.	93
VI.17	Contrôle : courbes d'approches réalisées à pH 4, 7 et 8 en solution aqueuse sur système PEG-peptide/or issus d'une même fonctionnalisation. Les forces subissent une transition d'interaction attractive de Van der Waals à des interactions répulsives de double couche avec le pH. Cette transition est décrite par le modèle DLVO.	95
VI.18	Contrôle : Comparaison à pH 8 des courbes d'approche et de retrait dans le cas d'une interaction pointe (modèle NPG-10, Bruker) or/peptide-linker(PEG) sur SiO ₂ fonctionnalisé vs non fonctionnalisée. La rupture marquée à 23.2 nm confirme la présence de la molécule au moment de l'interaction. La force de rupture subit une force additionnelle issue de la contribution de la double couche.	96
VI.19	Courbes de retrait sur système PEG-peptide présentant un événement de rupture superposé à une interaction répulsive. La répulsion expérimentée est issue de la formation d'une double couche d'ions de charges identiques au niveau de la pointe et du substrat qu'une diminution de la zone de compression rend apparente. Cette interaction pouvant mener à une estimation erronée de la force de rupture, une correction est appliquée à partir d'un ajustement suivant le modèle DLVO.	97
VI.20	Contrôle à pH 5 : (a) Exemple de courbe de force. La faible occurrence de ce type d'événement au profit d'interactions uniques non-spécifiques confirme l'extinction des groupements amines et acide carboxylique. (b) Histogramme réalisé sur les événements de rupture à pH acide. Les distributions présentent deux maxima à 481 pN et 1.45 nN.	98
VI.21	Contrôle à pH8 : Histogrammes et cartographies associées aux événements spécifiques et en molécule unique.	99

VI.22	Comparaison des pourcentages au prorata du nombre de courbe sur PEG-peptide/or en milieu PBS, sur le contrôle 1 (PEG/or), sur le contrôle 2 (PEG-peptide/or fonctionnalisé) sur le contrôle 3 (PEG/or fonctionnalisé), et sur le système PEG-peptide à deux pH. Un pourcentage $> 100\%$ indique la présence de ruptures multiples.	100
VI.23	Illustration du système biotine-streptavidine dans le cas d'une fonctionnalisation préalable au PEG. La biotine présentant son propre linker, cette étape supplémentaire de fonctionnalisation n'est pas un pré-requis. Les expériences qui suivent ont été réalisées dans des conditions avec et sans agent de couplage.	104
VI.24	Spectre de force modulé en vitesse de charge pour l'interaction biotine-streptavidine. L'ajustement conduit à une estimation de $x_\beta = 0.33$ nm et $k_{off} = 2.604$ s ⁻¹ . L'erreur est prise en σ/\sqrt{N} avec N le nombre de mesures.	105
VI.25	Convergence de l'ajustement pour (a) x_β et (b) k_{off} lorsque les conditions initiales sont variées.	108
VI.26	Résidu en fonction de la variable ajustée r.	108
VI.27	Spectre de force des interactions spécifiques et uniques pour le système peptide-or. Un élargissement de la zone [20-120] pN est montré en insert.	109
VI.28	Spectre de force ajustés avec le modèle BE pour les domaines (a) $F^*(r) < 150$ pN et (b) $F^*(r) > 150$ pN	110
VI.29	Spectre de force $F(r)$ regroupant 10578 courbes, et ajustements suivant le modèle BE à vitesse de charge élevée (a) ($r > 10^4$ pN/s) et à vitesse de charge faible (b) $r = [10^2 - 10^4]$ pN/s	112
VI.30	Spectre $F(r)$ et ajustement avec le modèle FDY. Les résultats de l'ajustement donnent $x_{beta} = 0.19$ Å et $k_{off} = 30.1$ s ⁻¹	113
VI.31	Spectre $F^*(R^*)$ et ajustement avec les modèles (a) FDY et (b) BE.le modèle FDY et.	114

VI.32	Courbes de force réalisées sur a) interaction biotine/streptaavidine sans dépliement du linker b), (b) pointe non-fonctionnalisée /streptaavidine (contrôle), c)interaction biotine/streptaavidine avec dépliement du linker et d) présentant dans cette configuration une élongation complète.	120
VI.33	Évolution de la fonction de Langevin sur les valeurs de force expérimentales et les valeurs de force reconstruites. Les dispersions observées sur la première courbe entre 0 et 200 pN sont imputables au bruit thermique.	121
VI.34	Cartographie de la somme résiduelle des carrés pour chaque couple $\Delta F, \Delta z$ et illustration de la convergence vers L_k pour quelques couples. Le minimum est obtenu à un offset de 7 pN et 3nm	122
VI.35	Réponse en force du système linker-biotine et ajustement correspondant au modèle d'élongation. La courbe de droite présente un agrandissement de la zone [0-100] pN où la valeur de L_K est modulée à $\pm 25\%$ de sa valeur. Résultats de l'ajustement : $N_s \approx 20$, $L_k = 1.16$ nm.	122
VI.36	Diagramme en boîte de Tukey représentant le résultat de l'ajustement suivant le modèle E-FJC pour la longueur de Kuhn L_k sur le système PEG(18)-biotine (9 courbes) et PEG(18)-peptide (7 courbes).123	
VII.1	Courbes de conductance sur jonction atomique or-or(a) et histogramme réalisé sur 10204 courbes en STM (b) ($V_{bias} = 0.1V$). . . .	131
VII.2	Courbes de conductance sur jonction atomique or-or(a) et histogramme réalisé sur 908 courbes en C-AFM (b) regroupant $k = 28$ N/m et 45 N/m. Le déclenchement est fixé sur la force d'appui. . .	132
VII.3	Histogramme réalisé sur 2160 courbes en C-AFM à $k = 45$ N/m. Le déclenchement est fixé sur le courant. Les pics secondaires correspondent au nombre d'atomes assurant encore la conduction.	133
VII.4	Courbes de conductance sur jonction atomique or-or(a) et histogramme réalisé sur 147 courbes en C-AFM (b) à $k = 5$ N/m.	134

VII.5	Courbes de conductance sur jonction atomique or-1,8-octanedithiol-or en C-AFM à $k = 24$ N/m (a) et histogramme réalisé sur 11 746 courbes reconstruites (b)	135
VII.6	Histogramme avec reconstruction des courbes (a) et sans reconstruction (b) sur jonction or-1,8 octanedithiol-or. Une contribution à 4 nA peut ainsi être observée.	136
VII.7	Courbes de conductance sur jonction moléculaire or-1,8-octanedithiol-or reconstruites.	136
VII.8	Histogramme sur jonction moléculaire or-peptide-or réalisé sur 707 courbes.	137
VII.9	Courbes de conductance sur jonction moléculaire or-peptide-or reconstruites illustrant la dispersion des plateaux.	138
VII.10	Courbes de conductance sur jonction moléculaire or-peptide-or reconstruites sur plateaux de faible conductance.	138
VII.11	Cartographies sur (a) surface d'or mixtes DDT/peptide (1506 courbes) et (b) surface d'or à faible taux de recouvrement en peptide (1126 courbes)	139
VII.12	Courant (a) et force (b) couplées sur surface à faible taux de recouvrement de peptide sur levier rigide (21 N/m) et (c) force collectée sur levier intermédiaire (0.3 N/m). La figure (c) présente une illustration du recouvrement progressif de la pointe au fil des acquisitions.	140
VIII.1	Principe de la spectroscopie AFM-IR. Lorsque le matériau absorbe le faisceau infrarouge, la dilatation entraîne une oscillation du levier qui est détectée.	144
VIII.2	Principe de la spectroscopie Raman (a) et illustration de l'exaltation du champ électromagnétique au voisinage d'une surface rugueuse (b).	145
VIII.3	Dérivé thiolé d'azobenzène (a) et rotaxane géant (b). Ces deux molécules ont été étudiées en TERS.	148
VIII.4	Focalisation du laser sur la pointe et (insert) définition du point chaud lors d'une cartographie d'objectif XY.	149

VIII.5	Spectre TERS obtenu en routine pour le dérivé thiolé d'azobenzène adsorbée sur une surface d'or.	149
VIII.6	Topographies STM de rotaxanes adsorbés sur Au[111] à (a) $V_{bias} = 1.8$ V, $I_p = 20$ pA et (b),(c) $V_{bias} = 0.1$ V, $I_p = 100$ pA.	151
VIII.7	Topographies STM de rotaxanes adsorbés sur Au[111] à (a),(b) $V_{bias} = 1$ V, $I_p = 20$ pA et (c) $V_{bias} = 0.8$ V, $I_p = 20$ pA.	151
VIII.8	Topographie STM de rotaxanes adsorbés sur une surface d'or à $V_{bias} = 1$ V, $I_p = 20$ pA et coupes transverses associées. Les lignes de profil correspondent à la direction indiquée sur l'image de topographie. . .	152
VIII.9	Spectres raman sur poudre de ferrocène (noir) et du rotaxane NT90 (rouge) collectés à 633 nm d'excitation, 1% de puissance laser, 1 seconde d'acquisition et 10 accumulations. Les figures numérotées correspondent à un élargissement d'échelle aux 3 zones indiquées du spectre complet	153
VIII.10	Spectre TERS de rotaxane adsorbés sur AU[111] obtenus à 60 s (a) et à 1s (b).	154
VIII.11	cartographie des trois bandes (a, b, c) obtenues par intégration des pics entre 287 et 350 cm-1 (a), 1098 et 1135 cm-1 (b)et 1549 et 1655 cm-1 (c). La ligne de base a été soustraite.	154
A.1	Spectres de DRX (diffraction de rayons X) du dépôt d'or réalisé sur mica pour une épaisseur de 80-100 nm, et référence (mica).	163
A.2	Images MEB de pointes AFM recouvertes par un dépôt d'or en pulvérisation cathodique.	164
A.3	Images MEB de pointes STM réalisées par dissolution électrochimique.	165

Introduction

La miniaturisation et le développement d'outils technologiques pour répondre au besoin grandissant de caractériser des structures aux échelles mésoscopiques a pris un essor considérable ce dernier quart de siècle. Depuis les premières observations de la structure cristalline du silicium en microscopie à effet tunnel (1981, réalisé à IBM) à celles de liaisons hydrogène entre molécules d'hydroxyquinolines révélées en microscopie atomique (2013, [9]), la complexité des systèmes observables en microscopie s'est accrue d'autant que les échelles de temps sur lesquelles ils sont sondés se sont réduites. Aujourd'hui, il est possible d'observer certains processus biologiques à l'échelle supra-moléculaire, en temps réel. Nous citerons l'exemple récent (2010, [10]) de l'imagerie dynamique à haute-vitesse qui a permis l'observation du déplacement d'une protéine de myosine le long d'un filament d'actine. A ces échelles, les techniques de champ proche présentent un véritable atout pour les caractérisations, et l'aspect spectroscopique peut sembler contingent au regard de l'utilisation intensive de l'imagerie qui en est fait. Pourtant, la spectroscopie de champ proche permet d'accéder à un plus grand nombre de propriétés du substrat, comme sa composition, son hydrophobie, son point isoélectrique par exemple, ce que la topographie seule ne permet pas de révéler. De manière assez surprenante, il s'agit même du mode pour lequel ces techniques avaient été développées. En effet, en 1986 lors du discours de réception du prix Nobel à Stockholm, Binnig et Rohrer le mentionnèrent explicitement [11] :

The original idea then was not to build a microscope but rather to perform spectroscopy locally on an area less than 100 Å in diameter.

La spectroscopie de champ proche couplée à la possibilité de manipuler des nano-objets uniques offre la possibilité de sonder des interactions dans des conditions de dilution

extrême et de manière contrôlée. En biologie, cela permet également de révéler des changements d'états non moyennés sur un ensemble de molécules, comme la dénaturation de protéines au contact d'une surface inorganique. Dans ce sujet, deux techniques de spectroscopie à sonde locale seront couplées à la microscopie à effet tunnel et mises à profit pour caractériser des interactions entre des molécules présentant un degré de complexité élevé de part leur dimension, et leur groupements : un oligopeptide, et un rotaxane géant.

L'interaction peptide/or en molécule individuelle : La conception de biomatériaux passe par un contrôle des interactions entre le support et la biomolécule (adhésion, régénération). Bien qu'ayant fait l'objet de nombreuses études, le phénomène d'adsorption et de mobilité des protéines sur des surfaces inorganiques est encore mal compris pour plusieurs raisons : les modalités d'interactions sont fortement dépendantes des propriétés de la biomolécule (conformation, charge) et de son couplage avec l'environnement (pH, température, force ionique, etc). A titre d'exemple, l'hétérogénéité d'une surface peut être à l'origine d'une modification de l'adsorption : une même surface d'oxydes peut présenter pour une protéine des sites dénaturant, et non-dénaturants. Egalement, un mécanisme de reconnaissance spécifique par lequel un peptide se greffe sur des sites d'or Au(111) reconstruits a été récemment observé [12] sur une catégorie de peptides génétiquement synthétisés ne possédant pourtant aucun groupement thiolé. Le cas des peptides "sulfur-free" GPB (*Gold Binding Peptides*) et leur capacité à s'auto-assembler n'est pas un cas particulier, et aujourd'hui les progrès en biologie combinatoire permettent d'isoler et de tester un grand nombre de séquences candidates pour les interactions biomolécule/surface [98]. Plusieurs techniques de caractérisation physico-chimiques existent comme la SPR (*Surface Plasmon Resonance*) ou les spectroscopies infrarouge et Raman, mais l'information résultante est celle d'un ensemble considéré comme « homogène », et ne reflète qu'une réponse moyenne sur un grand nombre de conformations, de sites d'adsorption... finalement un ensemble d'états.

Nous proposons donc dans ce sujet une première voie où seront sondées les interactions entre un oligopeptide à l'échelle individuelle et l'or, au moyen de deux tech-

niques : la spectroscopie de force, et la microscopie tunnel. Les interactions observées à pH neutre seront interprétées au moyen de modèles cinétiques appliqués à la rupture de liaison chimique sous contrainte mécanique, de façon à valider, ou invalider, l'hypothèse de formation d'un complexe temporaire entre le peptide et l'or. Dans un second temps nous bloquerons, par variation du pH, certains groupements qui présenteraient une interaction avec l'or. Une caractérisation supplémentaire sera effectuée, par des mesures de conductance, dont le couplage avec la spectroscopie de force était le coeur de ce projet. Nous présenterons également un outil numérique qui a été développé pour extraire à la fois le quantum de force et de conductance sur des jeux de données volumineux. Les considérations statistiques liées à l'extraction d'événements dépendant fortement de l'instrumentation et/ou du processus, ainsi que les limitations amenées par chacune des techniques seront discutées.

TERS et rotaxane en molécule individuelle : L'axe de recherche présenté se situe en complément des travaux effectués sur les interactions peptide/or et introduit une seconde technique de spectroscopie permettant la caractérisation en molécule individuelle. Le TERS (*Tip Enhanced Raman Spectroscopy*) résulte du couplage entre la spectroscopie Raman et la microscopie de champ proche. Dans l'exemple des rotaxanes géants, la possibilité de fonctionnaliser des électrodes offrira dans le futur la possibilité de suivre en spectroscopie TERS leur signature lorsqu'elles subissent des perturbations électrochimiques. De part leur conception, les rotaxanes géants permettent en effet de gérer les distances électrode/centre redox, et donc la vitesse et la directionnalité des transferts d'électrons. Une étude complémentaire où seront présentés les résultats du couplage de la spectroscopie Raman et de la microscopie tunnel qui ont été obtenus sur ce système sera présentée.

Nous concluons sur les apports de chacune de ces techniques dans l'étude d'objets uniques, les outils permettant d'extraire un comportement de leur analyse statistique, les limitations expérimentales, et finalement les améliorations que nous pouvons proposer.

Chapitre I

Techniques de champ proche

L'invention du microscope à effet tunnel (*scanning tunneling microscopy*, STM) précède celle du microscope à force atomique (*atomic force microscopy*, AFM) de quelques années seulement. Leur inventeur commun, Gerd Binnig, reçut le prix nobel de physique pour cette invention la même année (1986) qu'il présenta le premier AFM prototypé aux cotés de Quate et Gerber. Ce n'est évidemment pas un hasard si ces techniques furent développées quasi-simultanément, leur fonctionnement étant en de nombreux points similaire. Toutes deux fonctionnent sur le principe d'asservissement d'une grandeur dépendant de la distance sonde-substrat Z sur une valeur de consigne, ce qui permet en translatant la sonde dans le plan XY de construire une image. En AFM et C-AFM, cette grandeur est une force. Un faisceau laser est réfléchi à la surface d'un levier portant en son extrémité une pointe d'apex nanométrique. La déflexion de ce levier correspond quantitativement à l'interaction que la pointe subit avec la surface. Un scanner piezoélectrique (PZT) situé au niveau du bâti module la position de l'échantillon en X , Y et Z . En Z , la déflexion collectée à la photodiode est comparée à la force d'appui (en équivalent tension), et le PZT réajuste la position Z de sorte à maintenir cette force constante via un système électronique d'asservissement. Le réglage de la boucle de rétroaction se fait via des gains proportionnels et intégraux. Ces gains permettent de moduler le temps de réponse du système et sa sensibilité aux faibles écarts de hauteur. La différence entre la mesure et la consigne donne le signal d'erreur, et la correction ré-injectée pour maintenir l'asservissement du système donne le signal

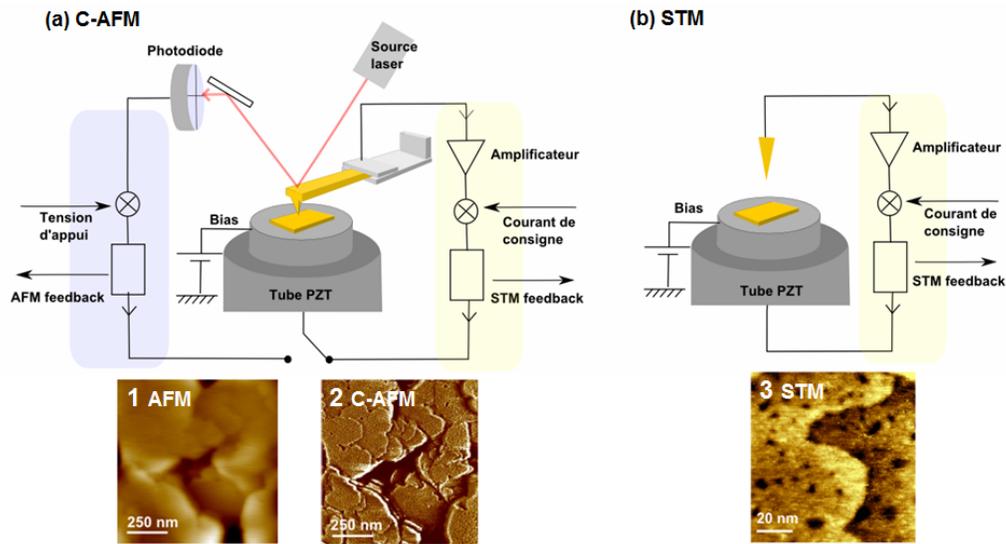


FIGURE I.1 – Principes des montages C-AFM (a) et STM (b) et cartographies de monocouches auto-assemblées obtenues avec chaque technique sur 1)-2) dodécylthiol et 3) rotaxane

de topographie. Dans le cas du STM, cette grandeur est un courant. Une différence de potentiel entre la sonde et le substrat est appliquée (tous deux non-isolants). Un courant tunnel dépendant exponentiellement de la distance sonde-substrat et des états de surface est collecté puis comparé au courant de consigne. La boucle d'asservissement active, une image correspondant au signal de régulation de l'asservissement en Z est obtenue, avec son signal d'erreur. L'imagerie est la fonction première de ces techniques dites de champ proche. Cependant, il en existe une autre sur un mode de spectroscopie, où la grandeur de force ou de courant est caractérisée non plus en fonction du déplacement XY, mais en fonction du déplacement en Z.

I.1 Principe de la spectroscopie de force

Il s'agit d'un mode particulier où la position en XY reste fixe, tandis qu'en Z, la boucle de rétroaction est momentanément ouverte le temps de collecte du signal. Ainsi, le piezoélectrique applique librement une modulation en Z, typiquement une rampe linéaire, durant laquelle la pointe peut explorer divers régimes d'interaction. Le signal résultant est formé de deux courbes de force/distance : une courbe d'approche

qui est liée la déflexion du levier au trajet aller du piézoélectrique, et une courbe de retrait qui est liée à la déflexion au trajet de retour.

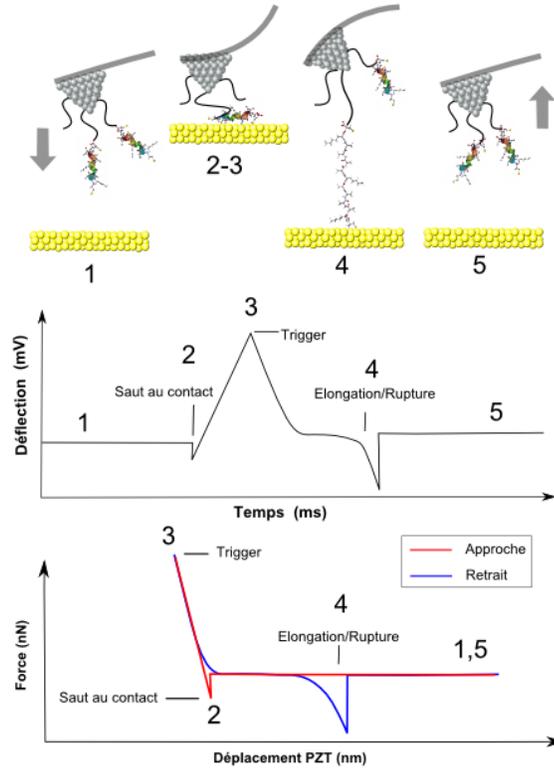


FIGURE I.2 – Description schématique d'un cycle d'approche/retrait en spectroscopie de force.

La figure I.2 illustre les différents régimes sondés durant ces phases. Lorsque la pointe est loin du substrat (1) aucune interaction n'est sondée. A son approche, un saut au contact peut être observé lorsque le gradient des forces excède la raideur de la pointe. Il est directement lié aux interactions attractives de Van der Waals, particulièrement marquées à l'air (2). Le levier suit la trajectoire imposée par le PZT dans un régime de contact dur jusqu'au seuil de déflexion maximal (3), au delà duquel la trajectoire est inversée après un temps de latence en surface (sur notre schéma égal à 0). Si durant le contact des interactions ont lieu entre la pointe et le substrat, des discontinuités interviennent (4) jusqu'à séparation de la pointe et du substrat(5).

En effectuant un quadrillage en XY sur l'échantillon, il devient alors possible de construire une image où à chaque pixel XY est associé une courbe de force, permettant ainsi de dresser des cartographies d'isoforce. Ce mode permet en particulier de discriminer localement des différences de rigidité ou d'élasticité dans le cas de structures complexes : cellules cancéreuses [13], [14], cellules musculaires, épithéliales [15], diatomées (micro-organisme marin unicellulaire) [16], levures [17], [18], et d'en déduire des propriétés structurales du matériau . Dans le cas des interactions molécule-or, nous distinguons deux types d'expériences utilisant ce mode qui permettent toutes deux de remonter à ces forces d'interaction. La première consiste à fonctionnaliser la surface par la molécule, et à effectuer ces cycles d'approche/retrait avec une pointe préalablement métallisée, formant ainsi des jonctions or-molécule-or . Il s'agit de la technique utilisée par les équipes couplant force et conductance [19],[20], [21]. Elle présente l'avantage de pouvoir former une jonction de faible dimension, impératif requis aux mesures de conductances, et de relier les mesures à la molécule par l'observation simultanée de deux observables. Du seul point de vue de la spectroscopie de force, cette technique présente l'inconvénient majeur de rendre indissociable l'interaction en molécule unique du reste des interactions. Généralement, ces expériences révèlent des courbes de force noyées dans une série d'interactions provoquées par un grand nombre de molécules, et seule la dernière interaction avant perte de contact électrique peut être attribuée à la rupture d'une liaison. Pour plusieurs raisons, le passage par une fonctionnalisation de la pointe par ajout d'un agent de coupage est préférable en vue d'une quantification plus fiable des interactions [22], [23].

I.2 Forces d'interaction

Les forces d'interaction sont de différentes nature et la classification dépend bien souvent du domaine d'étude (spécifique ou non-spécifique pour désigner des combinaisons d'interactions). Ne seront détaillées dans ce qui suit que celles que nous allons rencontrer dans nos expériences.

Van der Waals (F_{VdW}) : L'origine de ces forces provient de l'observation qu'un système polarisable peut interagir avec d'autres systèmes polarisables générant alors une attraction qui décroît en $1/z^6$ où z est la distance séparant les deux systèmes. En AFM leur expression se réduit généralement à $F_{VdW}(z) = -A_H R/6z^2$ dans le cas d'une interaction sphère-plan [24], avec A_H la constante d'Hamaker et R le rayon de courbure de la pointe. En pratique, ces interactions sont considérées comme non-spécifiques car elles sont observées dans un grand nombre de systèmes et de fonctionnalisations de surface. Au niveau des courbes de force, elles peuvent être responsables d'un saut au contact nettement marqué à l'air sur les courbes d'approche, signe que le gradient de force sur la distance pointe-substrat excède la rigidité du levier.

Capillarité (F_{cap}) : A l'air, la condensation de molécules d'eau physisorbées tant au niveau de la pointe que du substrat mène à la formation d'un film d'eau qui, au point de contact forme un ménisque. La force associée à la rupture de ce ménisque est bien souvent très élevée, et écrante les autres contributions. Tout comme les forces de Van der Waals, dont elles sont issues [25]), celles-ci sont attractives et dépendent fortement de la surface en contact, donc des dimensions de la pointe et de sa rugosité, mais non de la distance pointe-substrat. Un moyen de s'en affranchir est de se placer en milieu liquide.

Electrostatiques de double-couche (F_{dc}) : En milieu liquide, il n'est pas rare de voir apparaître une contribution répulsive issue des charges de surface. L'adsorption d'ions ou les processus de protonation/déprotonation induisent, fonction de leur différence de charge avec la charge du matériau, la formation d'une double-couche. La perturbation de cette double-couche par une surface comme une pointe AFM donne naissance à cette force. La grandeur qui la caractérise est connue sous le nom de longueur de Debye λ_D , et se retrouve dans son expression sous la forme $F_D(z) = CR\lambda_D \exp(-z/\lambda_D)$ avec C une constante dépendant des densités de charge surfaciques de la pointe et du substrat et R le rayon de courbure [26]. Notons que sa validité se limite aux cas où $z, R \gg \lambda_D$. Une manière de s'affranchir de cet effet est de se placer à un pH proche du potentiel de charge nulle (PZC) du matériau, ou du pKa des grou-

pements ionisables dans le cas où la surface serait fonctionnalisée. Notons également que les charges induites par une fonctionnalisation modulent ce PZC.

Répulsives d'hydratation : L'expression de la force électrostatique de double-couche n'est plus valable à des distances pointe-substrat inférieures à 1-3 nm où le milieu ne peut plus être considéré comme continu. L'origine de cette force est cependant toujours controversée. Dans les possibles origines, le recouvrement de couches de molécules d'eau structurées au niveau des surfaces[27], ou le piégeage électrostatique d'ions en présence d'eau au moment du contact [28] sont mentionnés. L'expression de cette force est de même forme que précédemment, $F_H = C_H \exp -z/\lambda_H$ [29], mais les valeurs de λ_H sont généralement plus faibles que λ_D , de 0.2 à 1.4 nm.

Les force de Van der Waals et électrostatiques de double-couche sont intégrées dans une même équation dans la théorie DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) mais ne tiennent pas compte des forces d'hydratation pourtant présentes dans de nombreux systèmes. Néanmoins, la difficulté d'extraction de chaque composante indépendamment des autres ne nous permettra pas de les dissocier. Nous traiterons donc ces interactions répulsives sous le formalisme de la double-couche, en retenant néanmoins qu'à plus faible distance, d'autres contributions peuvent émerger.

Electrostatiques (F_{el}) : Les deux précédentes forces rentrent dans la catégorie des forces électrostatiques et en sont les composantes majeures en milieu aqueux, mais nous considérons ici le cas où un champ est appliqué, ce qui sera une configuration rencontrée en C-AFM. La force entre deux particules chargées électriquement est décrite par la loi de Coulomb, et est en $1/z^2$. Dans le cas d'une interaction sphère-plan où un potentiel V est appliqué entre les armatures, cette force peut être approchée par : $F_{el}(z) = \pi\epsilon_0 R^2 V^2 / z(z + R)$. A un potentiel de 100 mV et un rayon de courbure à 20 nm, nous obtenons des forces variant de 50 pN à 0.4 pN entre 0.1 et 10 nm.

Elongations (F_{dep}) : Ces forces rencontrées lors du dépliements de macromolécules, tel que notre agent de couplage, sont dues principalement aux interactions inter-chaînes ou aux interactions hydrogènes avec le solvant qui maintiennent sa structure dans une

conformation minimisant son énergie interne. Issues de contributions entropiques et enthalpiques intervenant à divers régimes d'élongation, elles se conçoivent comme la force de restauration qu'oppose un polymère à la force appliquée. Les modèles force-distance qui les décrivent font l'étude de la section suivante.

Chimiques (F_{rup}) : Ces forces ont fait l'étude d'un grand nombre de travaux, particulièrement en biologie où la spectroscopie de force a permis de quantifier un grand nombre de systèmes complémentaires, comme les systèmes antigènes/anticorps. Néanmoins, dans de tels systèmes les forces font généralement intervenir des mécanismes de coopération entre liaisons non-covalentes (électrostatique, Van der Waals), et les liaisons covalentes restent peu étudiées. Ces forces dépendent de l'énergie de liaison, de la longueur de liaison dans les coordonnées de réaction, de son temps de vie, et peuvent être modulées en spectroscopie de force par la vitesse de charge. Ce point sera traité plus en détail dans la section suivante.

Adhésion : Les forces adhésives regroupent la contribution de l'ensemble des forces mesurées lors d'une discontinuité sur la courbe force-distance. Elles se décomposent comme [26] :

$$F_{adh}(z) = F_{VDW}(z) + F_{cap} + F_{el} + \delta(z - z_{rup})F_{rup} + F_{dc}(z)$$

Pour n'observer que la seule contribution de F_{rup} , les autres contributions doivent être négligeables. En se plaçant en milieu liquide, en introduisant une chaîne de polymère Poly(éthylène glycol) inerte avec notre substrat et en travaillant à des potentiels de 100 mV, cette condition est réalisée. Nous verrons dans les chapitres suivant que sur un grand nombre de mesures, peu d'événements peuvent en pratique être attribués à la rupture d'un groupement cible. Une distinction supplémentaire est donc faite entre les événements d'adhésion dits spécifiques, et les événements adhésifs non-spécifiques qui regroupent les interactions inconnues non-désirables. L'attribution de la spécificité à un événement n'est pas chose aisée. Elle nécessite un travail statistique sur un grand nombre d'événements, des expériences de contrôles, une connaissance préalable de sa valeur de force ou de son énergie de liaison et de sa longueur dans les coordonnées

de réaction. Rajoutons que l'action du levier au même titre que celle du linker (assimilables à des potentiels harmoniques) perturbant le potentiel de la liaison, la valeur de la rupture ne peut être obtenue qu'après extrapolation de sa valeur à l'équilibre thermodynamique par les modèles cinétiques.

I.3 Mesures de conductance

Les mesures de conductance peuvent être réalisées en C-AFM ou en STM. La première expérience en MC-BJ (*mechanically controlled break junction*) a été réalisée par Tour en 1997 [30] sur benzene-1,4-dithiol. En 2003, la technique du STM-BJ (*STM-break junction*) est proposée par Tao [31] pour la mesure de conductance sur alcanedithiols. Dans le cas de contacts atomiques en STM-BJ, une tension est appliquée entre les armature et une rampe linéaire est imposée au PZT jusqu'à ce qu'un contact électrique entre la pointe et le substrat soit établi. Souvent, une saturation du courant, noté I , est observée. Lorsque la valeur de seuil est atteinte (force d'appui en C-AFM ou distance maximale du PZT en STM), le PZT se rétracte, réduisant la surface en contact jusqu'à n'avoir plus que quelques atomes à la jonction électrique. Lorsque cette configuration est atteinte, des paliers de conductance correspondant à des multiples entier du quantum de conductance G_0 apparaissent, le dernier correspondant à la rupture entre deux atomes. Cette technique fonctionne quel que soit le métal. Cependant dans le cas de l'or, les réarrangements des atomes durant ce processus sont courants, et peuvent causer la formation d'un nanofil responsable d'un maintien de la conductance sur des distance supérieures à 0.1 nm. Cette propriété est à l'origine de son utilisation. Dans le cas de jonctions molécule/or, la surface est préalablement fonctionnalisée avec la molécule dont les groupements de part et d'autre assurent le contact. La figure I.3 illustre les différentes étapes pour un cycle d'approche/retrait en STM/C-AFM et la courbe de retrait $I(z)$ correspondant. Elle se décompose en trois parties :

1. $I \approx 0$: la pointe est en dehors du contact et le signal collecté à 0 nA ne comporte que le bruit électronique I.3(1,5),
2. $I = I_{sat}$: la pointe est en contact I.3 (2), et le courant collecté excède la plage de mesure du convertisseur dans la gamme choisie, la valeur correspond à l'équi-

valent courant de sa tension de saturation. La trajectoire est inversée au delà de 2-5 nm d'indentation (STM) ou à plusieurs nN d'appui (C-AFM).

3. $I =]I_{sat} ; 0]$: le courant chute, et la pointe peut soit sonder plusieurs régimes de conduction fonction du nombre de canaux créés par les molécules ou les atomes I.3 (3,4), ou simplement décroître dans un régime tunnel si aucune jonction n'est créée.

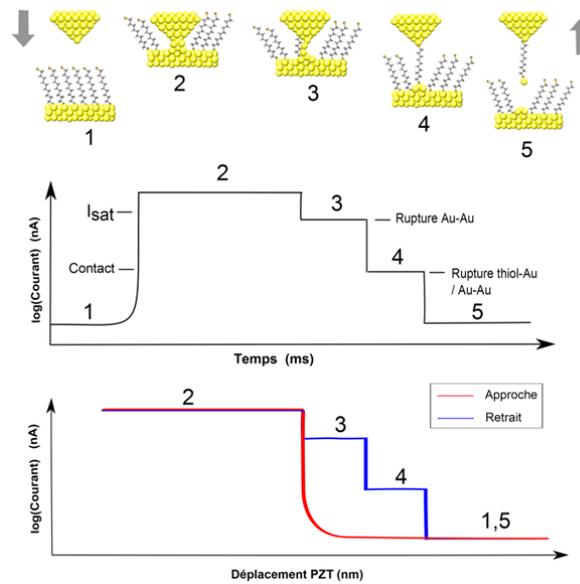


FIGURE I.3 – Description schématique d'un cycle d'approche/retrait en STM/C-AFM.

La valeur I_{sat} correspond au courant à saturation pour la gamme de mesure. Au contact, plusieurs molécules peuvent s'être simultanément greffées et durant la phase de retrait, de nouveaux paliers sont observés pour chaque rupture molécule/or. Moins conductrices qu'une jonction métallique, les multiples de G_0 sur ces jonctions sont faibles : de 10^{-2} jusqu'à $10^{-5} G_0$ et moins [32], [33], [34]. Les courants mesurés étant de l'ordre du nA, un amplificateur possédant plusieurs gammes de mesures est utilisé. Les jonctions métal/molécule et métal/métal n'intervenant pas aux mêmes ordres de grandeur, elles ne sont dans notre cas jamais mesurées simultanément. Par ailleurs, il existe d'autres techniques qui jouent à la fois sur la modulation de la rampe par les séquences d'arrêt/retrait différées et sur l'asservissement. Dans la méthode $I(s)$ proposée par Nichols [35], le contact atomique or-or n'est pas établi. Un gap de largeur

Δs est formé, et la pointe est rétractée à partir du courant de consigne en STM dont les courbes $d \ln(I)/ds$ permettent d'associer la réponse I en distance $s_0 + \Delta s$ (avec $I_0 = I(s_0)$ le point de contact or-or extrapolé). l'asservissement est maintenu en X,Y et Z sans réaliser de contact . Dans le mode I(t), aucun mouvement de pointe n'est effectué, et le courant est simplement collecté pendant que la boucle de rétroaction est ouverte. Ces méthodes nécessitent un faible taux de recouvrement en molécules. En réalité, ce sont les fluctuations thermiques qui induisent la formation d'une jonction, et une très bonne stabilité mécanique du montage est requise.

Chapitre II

Modèles associés au champ proche

II.1 Élongation de l'agent de couplage

En spectroscopie de force non couplée STM, le peptide sera relié à la pointe par un agent de couplage, un polymère Poly(éthylène-glycol) (PEG) d'une vingtaine de monomères, appelé ici linker et dont la fonction est triple. D'une part, il permet d'extraire la signature en force de la molécule du champ d'interaction non-spécifique entre le matériau de la pointe et la surface. Ceci permet de dégager un événement de rupture attribuable à la molécule via une élongation non-linéaire caractéristique. D'autre part, il permet un contrôle plus fin du greffage des molécules à la pointe en limitant suivant le protocole le nombre de points accessibles à la molécule lors de la fonctionnalisation, garantissant ainsi une augmentation d'une configuration de type molécule unique. En troisième lieu, il confère à la molécule des degrés de liberté supplémentaires qu'elle perdrait si elle se trouvait directement greffée sur la pointe. Dans cette configuration moins contrainte, le nombre de conformations accessibles est augmenté. En configuration antigène/anticorps où les interactions sont ciblées sur un récepteur de dimension finie, la longueur du linker est un paramètre qui requiert une certaine évaluation. En effet sa longueur confère à la molécule un volume de diffusion qui peut augmenter les chances de reconnaissance mais également induire des biais d'estimation lors du dé-

pliement non normal à l'axe pointe-substrat, suivant un angle arbitraire. La simplicité de notre système nous dégage de cette contrainte. Nous travaillerons avec un PEG 18 (18 monomères) dont la longueur de contour à 6.4 nm nous permettra d'assigner la signature à une élongation.

Déplier une chaîne polymérique a un coût en terme d'entropie, et la force associée à l'énergie libre doit nécessairement le contenir dans son expression : $F_{elong} = k_B T g(x)$ où $g(x)$ est une fonction dépendant des paramètres de la chaîne (nombre de monomères, longueur de contour) [36]. Cette signature sera ici ajustée à l'aide du modèle EFJC (*extensible freely-joint-chain*). Il s'agit du modèle le plus simple pour décrire le comportement d'une chaîne PEG. Dans ce modèle, le polymère est assimilé à une chaîne de N_s segments rigides, libres en rotation et de longueur L_K fixe. Ces segments sont distribués uniformément dans l'espace, suivant une description empruntée aux marches aléatoires à pas fixe. Au cours d'un processus d'élongation, deux forces de restauration vont s'opposer au dépliement [1].

Régimes d'élasticité : Aux faibles régimes d'élongation, l'agitation thermique $k_B T$ tend à augmenter le nombre de configurations accessibles au système, et se retrouve en compétition avec la force imposée qui tend à les diminuer. L'élongation force donc le système à diminuer son entropie auquel nous devons fournir une énergie équivalente à $T\Delta S$. Il s'agit du régime d'élasticité entropique.

A haut régime de force, l'entropie est réduite traduisant que le nombre de conformations que le polymère peut occuper se restreint. Le système se retrouve alors confronté à une seconde contribution compétitive provenant de l'étirement des angles de liaisons. La configuration interne de la molécule étant modifiée, cette contribution est associée à un régime de déformation enthalpique. Ces régimes sont décrits par la fonction de langevin suivant :

$$L(F) = N_s L_K \left[\coth \left(\frac{FL_K}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{FL_K} \right] + \frac{N_s F}{K_s} \quad (\text{II.1})$$

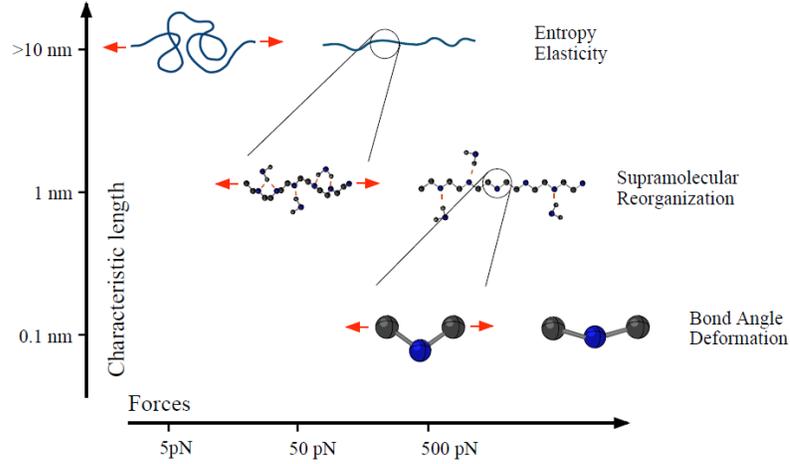


FIGURE II.1 – Description des régimes d'élongation du polymère PEG en milieu aqueux [1].

où L_K la longueur de Kuhn décrit l'élasticité aux régimes entropique, et K_s la constante de raideur d'un segment décrit l'élasticité aux régimes enthalpiques. Le produit FL_K gouverne le passage de ces régimes d'élongation. Au niveau de la courbe de déplieement, cela se traduit par l'existence de deux comportement linéaires. Lorsque $F \ll k_B T / L_K$, la fonction de Langevin $\coth x - 1/x$ tend vers $x/3$ soit :

$$L(F) \simeq N_s L_K \left(\frac{FL_K}{3k_B T} \right) \quad (\text{II.2})$$

Aux faibles force, l'élongation est donc décrite par une droite de pente $N_s L_k^2 / 3k_B T$. En pratique, ce régime est particulièrement critique dans l'estimation de L_K , le bruit thermique étant en compétition avec la force, une attention particulière doit y être portée lors des ajustements. Lorsque $F \gg k_B T / L_K$, $\coth x \rightarrow 1$ et l'élongation n'est plus décrite que par l'élasticité N_s / K_s amenée par les déformations d'angles de liaison. L'élongation est donc à nouveau décrit par une droite de pente N_s / K_s .

La figure II.1 illustre ces différents régimes et les ordres de grandeurs de force auxquels ils apparaissent. Nous n'avons pas encore évoqué l'influence du milieu de travail, qui joue un rôle aux régimes de force intermédiaires. En milieu aqueux, il a été montré que le polymère PEG stabilisait sa structure à l'aide de ponts hydrogènes.

Dans ces conditions, la conformation est la résultante d'une distribution statistique de domaines orientés en ttg (trans-trans-gauche) et ttt (trans-trans-trans), et peut se modéliser par un système markovien à deux états. La transition des domaines ttg \rightarrow ttt au cours de l'élongation fait intervenir une énergie ΔG associée aux réarrangements des liaisons hydrogène autour de la chaîne de l'ordre de $3k_B T$, et donne naissance à une contribution dans les régimes de force intermédiaires. Lors de nos ajustements, cette contribution ne sera néanmoins pas prise en compte pour la raison que l'introduction d'un paramètre d'ajustement supplémentaire ΔG n'est pas souhaitable, lorsque nous en comptons déjà deux : N_s et L_K . Ce modèle sera utilisé pour caractériser d'une part le linker, et d'autre part pour extraire des paramètres d'élasticité sur l'ensemble linker couplé au peptide.

II.2 Modèles dynamique de la rupture de liaison

En 1978, Bell [37] propose une interprétation pour expliquer une observation surprenante : la force requise pour séparer deux cellules est plus élevée que celle dérivant du potentiel qui assure leur cohésion. Il incrimine dans l'adhésion spécifique le comportement cinétique des systèmes antigènes/anticorps - principalement des liaisons faibles de type Van der Waals et électrostatique - présents en surface. Ces liaisons étant réversibles, elles peuvent se dissocier spontanément sans qu'aucune force n'ait agit pour les rompre, et une rupture peut être observée si l'on attend suffisamment longtemps. La stabilité provient ici du nombre de liaison impliqué dans la cohésion inter-cellulaire, et de la probabilité extrêmement faible que celles-ci soient simultanément rompues. Il formalise son observation en appliquant un modèle développé par Kramers faisant intervenir le temps. Sous l'effet de l'agitation thermique, une liaison isolée (infiniment diluée) possède une probabilité non-nulle de franchir spontanément la barrière d'activation thermique menant à sa dissociation à des temps d'observation supérieurs à son temps de vie intrinsèque. Ainsi, à des temps d'observation supérieurs à son temps de vie une liaison peut se dissocier spontanément sans force appliquée et par conséquent l'action d'une force peut diminuer son temps de vie. A partir de 1991, Evans raffine ce modèle [38], [39] en faisant intervenir une dépendance du temps de vie de la liaison

avec la charge de la force suivant un formalisme développé par Kramers. Ce formalisme a ouvert la voie à tout un champ d'investigation en spectroscopie de force, principalement parce qu'il permet de remonter aux paramètres cinétiques d'une grande variété de systèmes complémentaires. Nous décrivons dans ce qui suit les deux modèles qui ont été appliqués pour interpréter les spectres de force.

Modèles de barrière : L'application d'une force décroît continûment la stabilité d'une liaison pour l'amener vers son état dissocié [40]. Elle ajoute une contribution en $k_c x^2$, où k_c est la constante de raideur du levier, et x le chemin dans les coordonnées réactionnelles ($x \neq z$) réduisant la barrière énergétique et rendant accessible la dissociation, comme illustré sur la figure II.2.

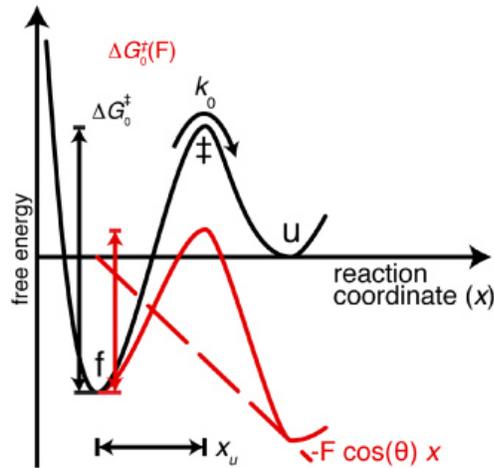


FIGURE II.2 – Illustration de l'abaissement de la courbe de potentiel par application de la force F d'après [2].

Dans cette illustration, une barrière de potentiel sépare les états f et u (*folded* et *unfolded*) dans le cas d'un dépliement de protéines trans-membranaires suivant un processus à deux étapes [2]. Dans notre cas, il s'agira d'états liés et non-liés. L'énergie d'activation ΔG_0^\ddagger sépare l'état initial f de l'état de transition (\ddagger) et la distance x_u (qui sera notée x_β dans ce manuscrit) dans les coordonnées réactionnelles correspond à la distance séparant l'état lié de l'état de transition. Cette barrière peut être franchie

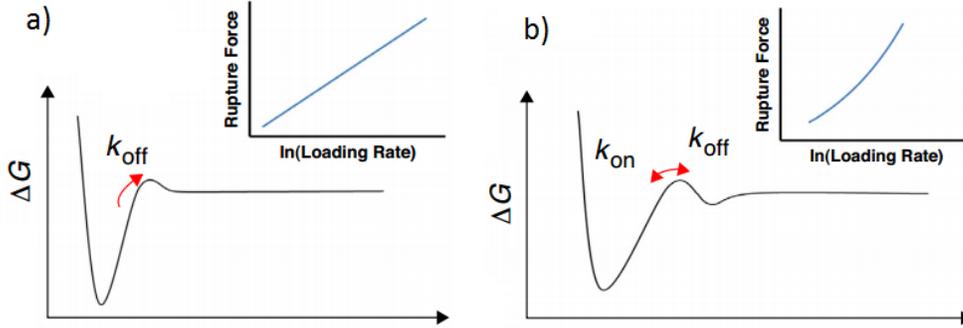


FIGURE II.3 – Illustration de la barrière énergétique en fonction des coordonnées de réaction dans le modèle de Bell-Evans (a) et dans le modèle de Friddle-De Yoreo (b) d'après [3]. L'évolution de la force en fonction de la vitesse de charge est représentée dans les encarts.

spontanément à un taux de transition k_0 qui dans notre cas sera exprimé comme la constante de taux de dissociation k_{off} . L'application d'une force ajoute une contribution en $-F \cos(\theta)$, qui jouant sur l'incurvation du potentiel appliqué agit en retour comme une sonde d'autant plus sensible que sa valeur est faible. L'application d'une force décroît donc continûment la barrière, de sorte que sa valeur à l'état de transition $\Delta G_0(F)^\ddagger$ devienne accessible.

Nous avons mentionné que ces expériences se déroulaient hors équilibre thermodynamique. Pour accéder aux paramètres cinétiques qui décrivent la réaction de dissociation à l'équilibre, des modèles faisant intervenir la vitesse de charge ont été développés. Ces modèles sont représentés sur la figure II.3. Dans le modèle de Bell-Evans, la hauteur de la barrière est diminuée par application de la force par $-Fx_\beta$. Cet abaissement impacte directement le taux de dissociation qui selon la théorie d'Eyring s'exprime comme :

$$\lambda = \nu \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{k_B T}\right) \quad (\text{II.3})$$

et devient selon la théorie de Kramers [41] :

$$\lambda(F) = \frac{\omega_{min}\omega_{max}}{2\pi\gamma} \exp\left(-\frac{(\Delta G^\ddagger - Fx_\beta)}{k_B T}\right) = k_{off} \exp\left(\frac{Fx_\beta}{k_B T}\right) \quad (\text{II.4})$$

avec ω_{min} et ω_{max} les fréquences de vibration de l'état lié et de transition dans le vide pondérées par un coefficient d'amortissement visqueux γ , x_β la largeur séparant l'état lié et l'état de transition, et $k_{off} = 1/\tau_{off}$ la constante de taux de dissociation. Cette grandeur ne doit pas être confondue avec la constante de dissociation $K_d = k_{off}/k_{on}$ où k_{on} est la constante de taux d'association. Le nombre de molécules se dissociant à un instant t est décrit par une décroissance du premier ordre :

$$\frac{dN_L}{dt} = -\lambda(t)N_L(t) \quad (\text{II.5})$$

Par intégration nous avons :

$$N_L(t) = \exp\left(-\int_0^t dt' \lambda(t')\right) \quad (\text{II.6})$$

On déduit le nombre de molécules ayant dissocié :

$$N_D(t) = 1 - N_L(t) = 1 - \exp\left(-\int_0^t dt' \lambda(t')\right) \quad (\text{II.7})$$

La probabilité qu'une molécule subisse une dissociation à un instant t est donnée par $p(t) = \dot{N}_D$. En supposant que l'évolution de la force est continue dans le temps, nous obtenons après changement de variable :

$$p(F) = \frac{\lambda(F)}{r} \exp\left(-\int_0^F dF' \frac{\lambda(F')}{r'}\right) \quad (\text{II.8})$$

avec $r = \dot{F}$. En substituant $\lambda(F)$ par son expression, nous obtenons :

$$p(F) = \frac{k_{off}}{r} \exp\left(\frac{Fx_\beta}{k_B T}\right) \exp\left(-k_{off} \int_0^F dF' \exp\left(\frac{F'x_\beta}{k_B T}\right) \frac{1}{r'}\right) \quad (\text{II.9})$$

Une relation liant F à dF/dt est obtenue à partir du maximum de la distribution F^* en $dp(F)/dF = 0$, et permet d'extraire simplement les paramètres cinétiques k_{off} et x_β :

$$F^*(r)_{BE} = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \left(\frac{r x_\beta}{k_{off} k_B T} \right) \quad (\text{II.10})$$

Concrètement, $p(F)$ représente la distribution de probabilité des ruptures en fonction de la force telle qu'observée dans les expériences de spectroscopie de force. F^* est le maximum de cette probabilité et $r = dF/dt$ est la vitesse à laquelle la force charge la liaison au moment de la rupture à sa valeur la plus probable, et qui s'exprime comme $r = k_c v_s$ avec v_s la vitesse de rétractation du piezoélectrique. Nous verrons au fil de nos exploitations que cette expression résulte d'une approximation, et que cette simplification ne permet pas toujours d'approcher \dot{F} . Le modèle que nous venons de décrire est le plus couramment utilisé en DFS (spectroscopie dynamique de force), et le premier à avoir été développé. Cependant, ce modèle représente une vision simplifiée de la dissociation, et n'inclut pas des processus de reformation de la liaison alors en compétition avec la dissociation à des temps supérieurs au temps de vie de la liaison. L'action de la vitesse de charge permettant de moduler ce temps de vie, des recombinaisons peuvent apparaître à faible vitesse de charge lorsqu'il devient possible de reformer la liaison. Le modèle proposé par Friddle-De Yoreo permet de prendre en compte ces recombinaisons en introduisant une dépendance exponentielle avec la charge dans les régimes proche équilibre [42] :

$$\langle F \rangle(r)_{FDY} = F_{eq} + \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \left(1 + \frac{\exp^{-\gamma} r x_\beta}{k_u k_B T} \right) \quad (\text{II.11})$$

où F_{eq} est la force à laquelle dissociations et ré-associations sont en équilibre et $\gamma = 0.577$ est la constante d'Euler. La constante appelée ici k_u par opposition à la constante de reformation de la liaison k_b sera par la suite désignée par k_{off} , pour conserver un parallèle entre les deux modèles. Dans ce modèle, la liaison oscille entre l'état lié et l'état non-lié. La probabilité de trouver le système dans l'un des deux états dépendant

du temps, elle dépend aussi de la force. Ce modèle introduit également la présence d'une force minimale F_{eq} requise pour que le système s'échappe de l'état lié, confiné par le potentiel harmonique du levier. La conséquence se traduit par l'existence d'une énergie ΔG définie à partir de $F_{eq} = \sqrt{2k_c \Delta G}$, et impliquant l'existence d'une force minimale requise à l'observation de la dissociation.

II.3 Transport électronique en molécule unique

Aux échelles macroscopiques, le transport électronique dans un conducteur métallique est décrit par la loi d'Ohm ($I = GV$). Elle fait apparaître la conductance G , inverse de la résistance traduisant la capacité du matériau à laisser circuler un courant. Un passage de l'expression locale de la densité de courant à son expression généralisée permet d'exprimer la conductance en fonction des dimensions du matériau via sa conductivité σ . Ainsi si S est sa section et L sa longueur, nous avons :

$$G = \sigma \frac{S}{L} \quad (\text{II.12})$$

Il apparaît que la résistance croît linéairement avec la longueur du conducteur. Suivant cette relation, est attendu qu'une diminution de L mène à un comportement limite de R vers zéro, et donc une divergence de la conductance. En 1988, Wees et al. mesurent pour la première fois le contact ponctuel dans un gaz d'électrons 2D au sein d'une hétérostructure de GaAs-AlGaAs. La conductance en fonction du potentiel de grille apparaît quantifiée en multiple de $2e^2/h$. Cette quantification est la conséquence de la réduction d'une dimension du conducteur, et traduit un changement de régime. De diffusif, c'est à dire comprenant un grand nombre d'événements de collisions aléatoires, le régime est devenu balistique.

II.3.1 Régime diffusif : modèle de Drüde-Boltzman

Dans ce modèle, les électrons de conduction sont assimilés à un gaz mobile et le métal à des ions fixes pour que la neutralité de l'ensemble soit conservée. Le formalisme

utilisé est semi-classique : le solide est traité de manière quantique et est donc décrit par sa structure de bande, tandis que les électrons sont traités classiquement, leur dynamique étant décrite par les relations classiques. Dans ce régime, le mouvement des électrons est brownien. La conductance peut donc se comprendre comme le produit de multiples collisions entre les électrons et de conduction et les nœuds du réseau cristallin (collisions électron/phonon) ou avec des impuretés. La conductivité σ prend pour forme $\sigma = e^2 n \tau / m$ où τ est l'intervalle de temps entre deux collisions. Ce régime s'installe lorsque la longueur de cohérence, grandeur dépendant de τ , est petite devant la dimension caractéristique du conducteur. Cette longueur correspond à la distance parcourue entre deux collisions inélastiques, et peut se comprendre comme le libre parcours moyen de l'électron dans la structure pendant lequel il conserve sa phase.

II.3.2 Régime ballistique : modèle de Landauer - Büttiker

Lorsque la dimension du conducteur est inférieure à la longueur de cohérence, l'électron peut ne subir aucune collision et traverser la structure sans perte d'énergie en conservant sa phase. Le système devient assimilable à un nombre fini de N canaux de conduction. Si μ_1 et μ_2 sont les potentiels chimiques des deux électrodes tels que $\mu_1 - \mu_2 = eV$ avec V le potentiel appliqué à la jonction, alors le courant la traversant peut s'écrire [43] :

$$I = e \int_{\mu_2}^{\mu_1} v(E) D(E) dE \quad (\text{II.13})$$

où $D(E)$ est la densité d'états en énergie E , $v(E)$ la vitesse de groupe et k le vecteur d'onde. En substituant par leur expression à 1 D :

$$D(E) = \frac{N}{\pi} \frac{\partial k}{\partial E} \quad v(E) = \frac{1}{\hbar} \frac{\partial E}{\partial k} \quad k = \sqrt{\frac{2mE}{\hbar^2}} \quad (\text{II.14})$$

nous obtenons simplement que :

$$I = \frac{2eN}{h} (\mu_1 - \mu_2) \quad (\text{II.15})$$

Avec $G = I/V$, on obtient une nouvelle expression de la conductance qui ne dépend alors plus des dimensions du conducteur mais du nombre de canaux N assurant la jonction :

$$G = \frac{2e^2}{h}N = NG_0 \quad (\text{II.16})$$

La quantité $G_0 = \frac{2e^2}{h}$ définit le quantum de conductance. L'introduction d'une molécule dans la jonction introduit des états d'énergie discrets qui se répartissent au niveau des bandes de valence et de conduction. Le conducteur n'est alors plus idéal, et sa conduction à travers le canal i dépend d'un facteur de transmission T_i tenant compte de la la probabilité de passage au travers de l'élément. La conductance s'exprime alors :

$$G = \sum_{i=1}^N T_i G_0 \quad (\text{II.17})$$

Chapitre III

Étude bibliographique

La section suivante fait état de la littérature sur les forces de rupture des liaisons soufre-or et azote-or en molécule unique, interactions qui seront rencontrées sur notre système. Cette étude constitue une première réflexion quant à l'attribution des forces aux groupements de notre peptide sur la base de nos histogrammes. Elle regroupe deux types d'expériences : (i) les expériences purement de spectroscopie de force avec passage par une fonctionnalisation ou réalisées sur molécules de large dimension (polysaccharides), (ii) les expériences couplant mesure de force AFM et mesure de conductance résolues sur la même molécule mais sans passage par une fonctionnalisation. Dans un premier temps, nous serions tentés de prendre pour référence les valeurs fournies dans les expériences couplées car d'une part deux observables simultanés garantissent l'attribution de la force à la molécule, et d'autre part, la statistique est généralement très supérieure aux expériences de spectroscopie de force (de 5000 à 10 000 courbes contre 100-500 si passage par fonctionnalisation). Cependant, plusieurs paramètres sont à considérer.

Constantes de raideur des leviers : Les valeurs de constantes de raideurs des leviers dans les expériences couplées force-conductance sont étonnamment élevées (de 10 N/m à 50 N/m), et peu de précisions nous sont fournies quant à leur calibration. Dans la référence [44], des valeurs de rupture allant de 1.48 nN à 0.85 nN (nombre de mesures : 4118 et 7763 respectivement) sont fournies avec une erreur de 10 pN (vraisemblablement prise en σ/\sqrt{N}). L'auteur indique en complément des constantes

de raideur autour de 50 N/m sans préciser l'erreur associée à la calibration et se réfère à la méthode de la mesure du bruit thermique pour cette mesure, s'appuyant sur les travaux de Bechhoefer [45]. Dans son article, Bechhoefer illustre sa méthode sur des leviers de 0.05 N/m, précisant que dans ce cas des fluctuations de 0.3 nm sont obtenues et suffisantes à la mesure du bruit thermique. Dans le cas de leviers à constante élevée, ces fluctuations sont faibles, de l'ordre de 0.01 nm pour 40 N/m, bien souvent comprises dans la limite de détection et des erreurs d'estimation de la constante peuvent apparaître par une sous-estimation de l'aire de la puissance dissipée à résonance (rapport signal à bruit trop faible). Une lecture des travaux de thèse de l'auteur indique néanmoins une amélioration du système optique classiquement utilisé réduisant ainsi le bruit d'interférence optique du laser. Le rapport signal à bruit obtenu à résonance au niveau des densités spectrales de puissance est de 20, soit sensiblement la même sensibilité que notre système pour des leviers souples. La calibration des leviers ne peut donc être mise en cause par la méthode utilisée. La différence de rigidité se répercute néanmoins sur un second paramètre majeur en spectroscopie de force : la vitesse de charge. Etant directement proportionnelle à cette constante, les vitesses de charge sondées sont généralement supérieures de 1 à 2 ordres de grandeur avec celles obtenues en pointe souple. Si une dépendance de la force avec la charge est avérée, alors une différence notable doit être observée entre C-AFM et AFM-FS. Nous verrons dans ce qui suit que la littérature peine à trancher sur ce point.

Effet du solvant : L'impératif d'un solvant non-conducteur cantonne les expériences couplées à l'utilisation de solvants organiques aprotiques (absence de conductivité induite par le solvant), contrairement aux expériences de spectroscopie de force ou ces expériences peuvent se dérouler en milieu aqueux. Or le solvant influence la charge des groupements. En milieu aqueux, le pH influence cette charge selon la valeur du pKa du groupement, tandis qu'en milieu organique aprotique, la charge de la molécule est souvent neutre. La littérature en spectroscopie de force fournit des éléments de réponse quant à cette réactivité.

III.1 Liaison Soufre-Or

Le tableau III.1 regroupe les valeurs de force obtenues dans la littérature sur la liaison soufre-or pour diverses molécules, la technique avec laquelle ces forces sont mesurées, la vitesse de charge, et le nom de l'équipe. Une colonne est également réservée aux valeurs de conductances lorsque celles-ci ont pu être simultanément mesurées. Les expériences sont pour la majorité réalisées en milieu liquide (solvant aqueux ou organique non-conducteur) et à température ambiante.

III.1.1 Une rupture controversée

Avant tout, nous rappelons que s'il est établi depuis 1983 [52] que les thiols s'auto-assemblent sur l'or via la formation d'une liaison covalente soufre-or par déprotonation du groupement thiol, le point de rupture en revanche a longtemps été sujet à controverse. Dans cette jonction, la rupture peut intervenir soit au niveau de la liaison soufre-or, soit or-or. Ce point a été pour la première fois soulevé dans des simulations type DFT [53], ayant mené à l'observation qu'un processus d'élongation sur jonction soufre-or s'accompagnait de la formation temporaire d'un cluster d'or localisé, et étiré le long de l'axe de la liaison S-Au. Ces clusters intermédiaires suggéraient l'existence de processus de réorganisation, observés sur des courbes de forces simulées en forme de "dents de scie" marquées par des ruptures à des forces très variables, et furent liés à une série de réactions d'isomérisation visant à stabiliser ces intermédiaires durant l'élongation, jusqu'à la fragmentation du cluster [5].

Des expériences STM couplées AFM réalisées sous ultra haut vide à basse température (4.2 K) [5] ont confirmé cette hypothèse. La création d'un nanofil d'or, responsable d'une nano-élasticité pouvant induire un déplacement jusqu'à 1.2 nm, pour une valeur moyenne située autour de 0.4 nm entraînait un maintien de la conductance à G_0 sur un plateau courant-distance. Les courbes de force à une vitesse de charge de 190 nN/s présentaient une forme similaire à celles observées dans les simulations, et avait donc été attribuée aux réarrangements atomiques intervenant durant l'élongation élastique, hypothèse confirmée par l'adaptation simultanée de la conductance à ces sauts. Les valeurs de saut les plus élevées, toujours attribuables au même fil d'or

Technique	Equipe	Charge	Molécule	Force (nN)	Conductance (G_0)
CS-AFM	Wandlowski [21]	125 nN/s		1.2 ± 0.6 (H) 0.3 ± 0.2 (L)	5×10^{-3} (H) 3×10^{-4} (L)
CS-AFM	Wandlowski [21]	125 nN/s		1.2 ± 0.5 (H) 0.8 ± 0.4 (L)	1.6×10^{-3} (H) 2.5×10^{-4} (L)
AFM	Gaub [47]	10 nN/s	Polysaccharide-SH	1.4 ± 0.3	-
AFM	McElfresh [48]	12-14 nN/s		0.96 ± 0.22	-
AFM	McElfresh [48]	12-14 nN/s		1.05 ± 0.29	-
AFM	McElfresh [48]	12-14 nN/s		0.31 ± 0.13	-
CS-AFM MC-BJ [4]	Tao [49],[19],[4]	218 nN/s [49] 1722 nN/s [49] 1440 nN/s [19]		1.1 ± 0.26 [49] 1.6 ± 0.1 [49] 1.5 ± 0.2 [19],[4]	2.6×10^{-4} [49] 2.5×10^{-4} [19] 0.52×10^{-4} [4]
CS-AFM	Venkataraman [20]	18 nm/s k_t non indiqué		0.9	$10^{-2} - 10^{-3}$
CS-AFM	Venkataraman [20]	18 nm/s k_t non indiqué		0.84	10^{-3}
AFM	Frisbie [50]	Non indiqué		0.1	-
AFM	Zhang [51]	20-30 nN/s	HS-PEG-COOH	1.09 ± 0.39 0.46 ± 0.21	-

Table III.1 – Liaison soufre-or : forces de rupture et conductances. Les configurations top-hollow et top-top correspondent respectivement aux des sets de conductance élevés (noté H) et faibles (noté L) [4].

par la présence du plateau de conductance, étaient attribuées à l'incorporation d'un atome supplémentaire responsable d'une augmentation de la force de rupture. Cette rupture avait été estimée à 1.5 ± 0.3 nN. L'auteur soulignait néanmoins que cette valeur était étonnement élevée. La comparaison avec des calculs DFT avaient mené à l'estimation de 0.71 nN lorsque l'atome extrait était inclut dans le plan cristallin, et 1.6 nN lorsqu'il se situait en addatom. De cette observation il en avait été déduit que

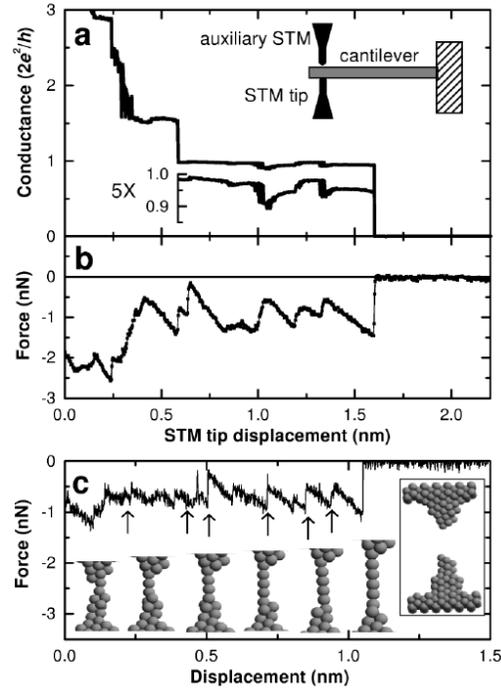


FIGURE III.1 – Courbes de conductance couplées à la force obtenues d’après [5]. Les réarrangements successifs d’atomes d’or sont révélés par les discontinuités observées expérimentalement (a-b) et en simulation (c).

le degré de coordination de l’atome influençait grandement la valeur de rupture. Cette hypothèse se trouve à nouveau confirmée par de récents de résultats de Wandlowski [21] (2015) où des sauts consécutifs en force et conductance couplées avec une approche de modélisation montre l’existence de ces intermédiaires transitoires consécutifs au réarrangement d’atomes d’or. Des simulations comparées sur jonction or-or et jonction soufre-or avaient également montré que les forces obtenues dans les deux cas étaient similaires (1.5 ± 0.3 nN sur système Au-Au et 1.4 ± 0.3 nN sur système S-Au-Au) suggérant que la rupture interviendrait au niveau des atomes d’or. Dans des conditions ambiantes, cette hypothèse a été également vérifiée, notamment par l’observation sur mesures AFM-STM couplées sur alcanedithiols de paliers de conductance, révélant que la force de rupture soufre-or doit être nécessairement supérieure à la force de rupture or-or pour permettre la formation de clusters de pré-rupture. Un maintien de la liaison allant jusqu’à 2 nm [19] est rapporté.

III.1.2 Conductance

Nous observons que les valeurs rapportées pour la conductance dans le tableau III.1 présentent pour une même molécule plusieurs valeurs. L'origine provient du fait que la conductance est sensible à l'organisation locale des atomes d'or autour du soufre. Dans la littérature, deux sets de conductance sont quelquefois présents : au sein d'un même set, les conductances sont des multiples d'une même valeur, tandis qu'entre deux sets cette relation disparaît. L'interprétation proposée à ces deux modes a été de considérer que chacun d'eux reflète une géométrie de contact S-Au différente [4]. Le mode *top-top* correspond à une configuration où le soufre est lié à un atome d'or situé en dehors du plan dans une géométrie pyramidale. Ce mode n'apparaît jamais avant un palier élevé (H) et correspond à un étirement supplémentaire de la jonction, il est donc attribué aux faibles valeurs de conductance (L). Le mode *top-hollow* correspond à une configuration où le soufre est stabilisé par trois atomes d'or, et correspond aux multiples élevés de conductance (H). La force mesurée dans les deux cas était identique (1.5 nN) suggérant que la rupture a toujours lieu à l'extrémité en *top* de la jonction où l'extraction de l'atome d'or est possible. Ceci explique l'absence de contribution de type *hollow-hollow*, peu favorable à la rupture.

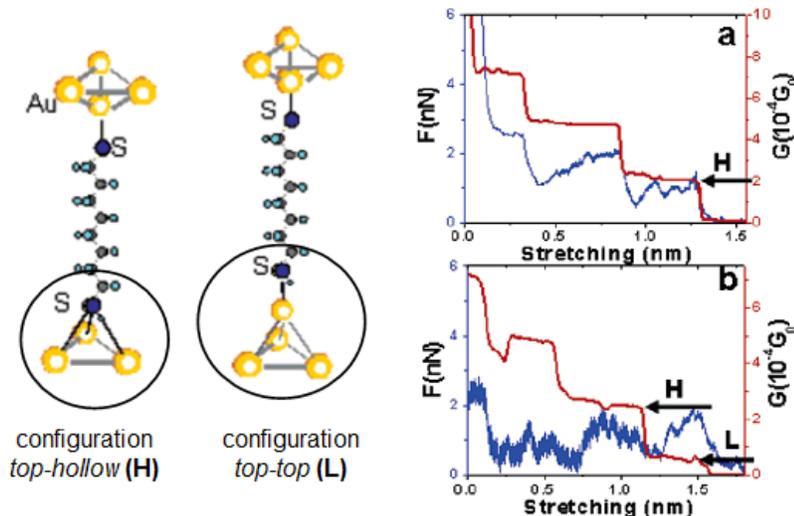


FIGURE III.2 – Illustration des configurations *top-hollow* et *top-top* correspondant respectivement aux des sets de conductance élevés (H) et faibles (L) [4].

III.1.3 Force : un consensus probable à 1-1.5 nN

Dans le tableau III.1, il est frappant de constater que la littérature faisant l'étude de cette liaison en spectroscopie de force est aussi peu représentée. La comparaison des 1.2 nN obtenus par Wandlowski sur le 4,4'-ethyne-1,2-diylidibenzenethiol avec les 1.1 nN obtenus par Tao [49] sur octanedithiol à une vitesse de charge comparable semble indiquer une indépendance de la force aux groupements précédant le thiol. Les valeurs de rupture rapportées par McElfresh [48] sur cysteamine et acide thioctique montrent une diminution de la stabilité de la liaison avec le nombre de ponts S-Au, indiquant 1.05 nN sur thiolate pour 0.31 nN sur dithiolate. Néanmoins, les expériences de Frisbie [50] sur l'acide 11-Thio-undecyl-phosphonique montrent une force moyenne pour S-Au de 0.2 nN, ainsi qu'une périodicité sur plusieurs histogrammes à 0.1 nN, observée également sur la jonction OH-Au qu'ils attribuent à un quantum de force de rupture d'une liaison chimique individuelle. L'expérience de Gaub [47], pionnier de la spectroscopie de force, et réalisée sur polysaccharides nous indique que la valeur doit être proche de 1.4 nN à 10 nN/s. L'ordre de grandeur de cette rupture est confirmé par une série d'équipes [21],[19],[49], dont les mesures couplées aux valeurs de conductances déjà connues sur ces molécules garantit la fiabilité (deux observables ayant simultanément été observées).

Impact de la vitesse de charge : Tao [49] précise qu'il existe une évolution de la rupture S-Au avec la vitesse de charge, évolution dont le tableau montre les deux valeurs extrémales à 1.1 nN (218 nN/s) et 1.6 nN (1722 nN/s). Dans le fil de leur exploitation, un modèle de type Bell-Evans est appliqué. La comparaison des 1.5 nN obtenus à 1440 nN/s par Tao avec les 1.4 nN obtenus à 10 nN/s par Gaub, soit à deux ordres de grandeurs en vitesse de charge inférieur, invaliderait a priori ce type de modèle pour S-Au dans des régimes de vitesse de charge aussi élevés. Dans notre étude, la plage de vitesses de charge sondées couvre 1 nN/s - 100nN/s, et nous permettra d'invalider ou non la transposition du modèle Bell-Evans dans ce type de jonction sur cette plage de vitesse de charge. Des vitesses de charge différentes ne seraient donc a priori pas le bon facteur expliquant cette variabilité. La raison nous provient d'une hypothèse vérifiée notamment sur les fluctuations de conductance, et évoquée précédemment sur

l'hypothèse aujourd'hui quasi-confirmée de la rupture Au-Au : la stabilité de la jonction et par extension le degré de coordination de l'atome d'or qui sera responsable de la rupture conditionne la valeur de force.

Implication du solvant : La correspondance des valeurs de Gaub obtenues à pH 7.4 avec celles de Wandlowski, dans une solution de decane contenant 0.2 mM de molécules, ou encore celle de Vieira [5] réalisées sur or sous ultra haut vide semblent nous indiquer une indépendance de la force de rupture avec le milieu. En effet si la rupture intervient au niveau des liaisons métalliques Au-Au, il n'est pas surprenant qu'aucun effet de solvant ne soit visible au moment de la rupture, bien qu'il le soit peut-être au moment de l'adsorption S-Au pour des valeurs de pH supérieures au pKa du groupement thiol. Une équipe fait état de ce cas de figure en comparant en spectroscopie de force la stabilité de la liaison S-Au à divers pH (5, 7.4, 8), et selon l'oxydation de la surface [51]. Les traitements de nettoyage comme l'ozonolyse (UV/O₃) ou les solutions piranha (H₂O₂ :H₂SO₄) sont connus pour être des oxydants puissants, pouvant mener à la formation d'une couche d'Au₂O₃ [55] (selon ces auteurs). Notons que l'oxyde d'or se décomposant à 160 ° C, un simple recuit suffit à le réduire. Leur résultats montrent une dépendance de la rupture or-or à son état d'oxydation, allant de 1.09 ± 0.39 nN sur surface oxydée à 0.62 ± 0.18 nN sur surface réduite qu'ils expliquent par une contribution des réarrangements des atomes voisins différente dans chacun des cas durant le processus d'accroche, une façon d'incriminer la coordination. Ils observent également que le passage d'un pH 5 à pH 8 s'accompagne d'une augmentation de la force de 0.60 ± 0.12 nN à 1.09 ± 0.39 nN sur or oxydé, et de 0.50 ± 0.11 nN à 0.62 ± 0.18 nN sur or réduit. Sous une forme thiolate (les pKa des groupements SH se situent à des valeurs allant de 8 à 13), nous comprenons que l'adsorption soit modifiée, mais son impact sur la dissociation est assez surprenante. Une seconde série d'expérience où la fonctionnalisation est initiée in situ sur une surface d'or préalablement fonctionnalisée à la cystéamine semble également montrer une diminution de la force (jusqu'à 0.57 ± 0.17 nN sur AuO et 0.46 ± 0.21 nN sur Au) en configuration auto-assemblée. Sans mettre en doute un protocole dont nous ne sommes pas familier, nous notons néanmoins une légère incohérence sur ce dernier point entre l'unicité de la mesure (chaque pointe ayant

réagit extrait une cysteamine de la surface et ne peut être utilisée que pour une seule mesure) et la statistique que requiert l'estimation d'une force de rupture. Ce point reste à éclaircir.

Conclusion : Nous concluons de cette première étude que la rupture d'une jonction soufre-or/or-or est observable, et que sa rupture se situe à haut régime de force tant en milieu PBS (pH 7.4) qu'en milieu organique aprotique. Cette rupture s'accompagnerait de réarrangements atomiques transitoires induisant un point de rupture au niveau d'un cluster d'or, dont le degré de coordination conditionnerait la valeur de force. A priori, même extraits de la surface, les clusters greffés seraient encore réactifs, suffisamment pour une étude statistique équivalente à celle de Gaub et Zhang. Nous situons cette force autour de 1 nN, valeur qu'a priori le pH du milieu pourrait également moduler par une meilleure stabilité de la liaison lorsque les groupements thiols sont en proportion plus réduits. Concernant les constantes de raideur, la majorité des équipes fait état de constantes élevées visiblement nécessaires à l'établissement d'une jonction conductrice et reproductible sur une statistique élevée, à l'exception de Gaub qui ne mentionne pas de constantes de raideur. Néanmoins la faible valeur de charge (10 nN/s) couplée à l'observation d'une elongation non-linéaire typique d'une signature sur levier souple permet de la situer inférieure à 1 N/m. Par ailleurs l'équipe de Zhang mentionne des constantes de raideur 0.02-0.03 N/m. Nous concluons que cette rupture est a priori observable sur une large gamme de leviers [0.02-50] N/m pour des ordres de grandeur de forces comparables. Pour finir, l'activation de la rupture basée sur un modèle à une barrière de type Bell-Evans a été observé, mais ces résultats contredisent ceux obtenus à vitesse de charge inférieure de deux ordres de grandeur. Nous concluons que ce point reste à éclaircir.

III.2 Liaison Azote-Or

Un second tableau III.2 regroupe les valeurs de force obtenues dans la littérature sur jonction azote-or sur le même traitement que précédemment.

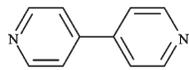
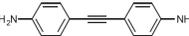
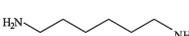
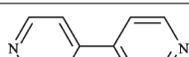
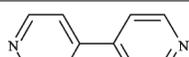
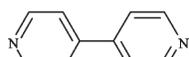
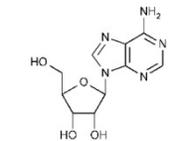
Technique	Equipe	Charge	Molécule	Force (nN)	Conductance (G_0)
CS-AFM	Wandlowski [21]	125 nN/s		1.8 ± 0.7 (H) 1.1 ± 0.5 (M) 0.8 ± 0.4 (L)	5×10^{-4} (H) 4×10^{-5} (M) 5×10^{-6} (L)
CS-AFM	Wandlowski [21]	125 nN/s		0.6 ± 0.3 (H) 0.6 ± 0.3 (L)	$\approx 10^{-3}$ (H) 1.8×10^{-5} (L)
CS-AFM	Wandlowski [21]	125 nN/s		0.5 ± 0.2 (H)	8×10^{-5} (H)
CS-AFM	Venkataraman [56]	18 nm/s k_t non indiqué		0.53 ± 0.09	6.2×10^{-3}
CS-AFM	Venkataraman [56]	18 nm/s k_t non indiqué		0.69 ± 0.06	9×10^{-4}
CS-AFM	Venkataraman [56]	18 nm/s k_t non indiqué		0.62 ± 0.09	1.1×10^{-4}
CS-AFM	Venkataraman [56]	18 nm/s k_t non indiqué		0.8 ± 0.08	1×10^{-4}
CS-AFM	Venkataraman [44]	900 nN/s		1.48 ± 0.01 (H) 0.85 ± 0.01 (L)	$\approx 10^{-3}$ (H) $\approx 1 \times 10^{-4}$ (L)
CS-AFM	Tao [19]	1440 nN/s		0.8 ± 0.2	1×10^{-2}
AFM	Gaub [57],[6]	1500 nm/s k_t non indiqué		0.17 ± 0.05 [57] 0.145 ± 0.083 [6]	-

Table III.2 – Liaison azote-or : forces de rupture et conductances.

III.2.1 Conductance

Les valeurs rapportées pour la conductance dans le tableau III.2 présentent une évolution cohérente : une diminution de la valeur avec une augmentation de la longueur de chaîne, ainsi qu'une dépendance de la conductance avec la géométrie du contact sur un modèle similaire à la rupture S-Au. En conductance les plateaux sont généralement plus réguliers. N'étant pas de nature covalente mais donneur-accepteur, son énergie de liaison ($E_b=0.92$ eV) est significativement plus faible que son homologue soufre-or ($E_b=1.76$ eV). Cette différence d'énergie lui confère une mobilité supplémentaire au niveau du point de contact, suffisante pour ponter sur des atomes d'or successifs sans néanmoins forcer la formation de clusters transitoires. Elle apparaît donc plus stable en conductance. Les expériences réalisées par Scheer [58] confirment cette hypothèse par une comparaison des longueurs de plateaux de conductance sur octanediamine (ODA) et octanedithiol (ODT) sur un montage MC-BJ sous ultra haut vide à 4.2 K. Leur mesures rapportent une différence de longueur de quasi 2 nm, passant de 3 ± 0.11 nm sur ODT à 1.1 ± 0.3 nm sur ODA. Ils observent également une contribution notable de fluctuation de la conductance sur ODT dans 45 % des courbes qui apparaît plus rarement sur ODA (15 %) indiquant que la rupture de liaison N-Au ne s'accompagne pas de déformations mécaniques durant la mesure. De nombreuses équipes font également état de ce constat.

III.2.2 Force : une absence de consensus

Il semble établi dans la littérature C-AFM que la rupture azote-or se situe entre 0.5 et 0.7 nN pour des amines primaires, et que cette valeur est susceptible d'augmenter lorsque l'azote est inclus dans un cycle (bipyridine) jusqu'à un facteur 3. Sa mobilité entraîne une dépendance de la force avec le degré de coordination de l'atome d'or ainsi que sa géométrie au moment de la rupture, induisant différents canaux de conductance d'élevée (H) pour une force comprise entre 1.5 et 1.8 nN, à faible (L) à 0.8 nN. De façon assez troublante, l'article de Gaub révèle dans des expériences de contrôles réalisées sur PEG couplé à l'adénosine (nucléotide représenté dans le tableau, fonctionnalisation à l'EDC - 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) et couplé à la thymidine

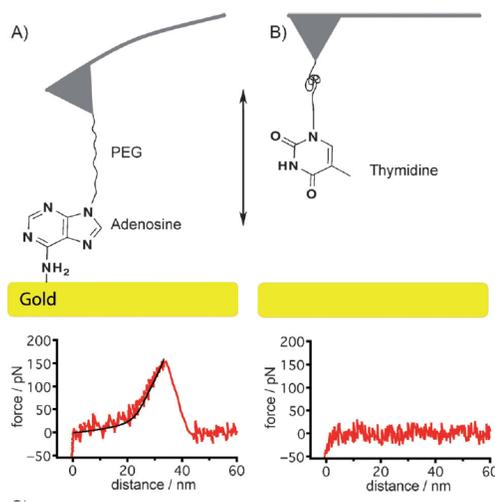


FIGURE III.3 – Courbes de force réalisées sur adénosine et thymidine [6]. L'absence d'interaction de la thymidine avec le substrat a permis de conclure sur la spécificité des interactions amine primaire-or.

(nucléotide ne présentant aucune amine primaire) que seule l'amine primaire de l'adénosine interagit avec l'or, interaction qu'il quantifie à 170 pN [57]. D'une part, la liaison N-Au pour les amines primaires rompt à une valeur qui diffère de plus d'un facteur 4 avec les valeurs avancées en C-AFM. D'autre part, lorsqu'inclus dans un cycle, leur expérience semble montrer que l'azote ne présente aucune interaction, ce qui contredit à nouveau les valeurs avancées en C-AFM sur la bipyridine.

Implication du solvant : Un raffinement supplémentaire est apporté par la même équipe [6] où une valeur de force à 145 pN est avancée à pH 8. Une étude en fonction du pH est également conduite [57] et montre une sensibilité de la liaison N-Au à la protonation de l'amine primaire. Le pKa d'une amine primaire se situant autour de 8-9, ces auteurs ne rapportent aucune interaction à pH 5.5 où la forme NH_3^+ ne présentant pas de paire d'électrons disponible ne peut former de liaison un atome d'or, et une augmentation des interactions à pH 8.5. L'auteur précise que cette valeur de force est cohérente avec de précédentes calculs DFT estimant l'énergie de la liaison Au-N à 32-42 kJ/mol pour une distance de liaison de 0.3 nm, ce qui correspond à une force d'environ 185 pN [59], [60]. A nouveau, l'absence de contribution des azotes inclus

dans le cycles au niveau de l'adénosine (au nombre de trois) est assez troublant en regard des forces, parfois supérieures à 1.5 nN, obtenues sur la bipyridine (BPY) dans les expériences C-AFM, et confirmées par trois équipes ayant elles-mêmes observé des forces de rupture à 1.5 nN sur les jonctions S-Au. A notre connaissance, aucune étude ne fait état d'une estimation par spectroscopie de force d'une ou plusieurs barrière(s) d'activation énergétique par variation de la vitesse de charge.

Conclusion : Les valeurs de cette étude montrent qu'aucun consensus au niveau de la rupture N-Au n'est établi. Sa valeur dans le cas d'une amine primaire est inférieure à la rupture Au-Au, car la liaison est de nature donneur-accepteur et est de fait moins robuste que la liaison partiellement électrostatique/covalente S-Au, ou métallique Au-Au. Des paramètres tels que les constantes de raideurs peuvent être écartés dès lors que les études sur jonction S-Au ont déjà montré une stabilité de la liaison sur une large gamme de leviers. De même, les vitesses de charge sondées semblent indiquer une indépendance de la mesure à ce facteur. La contribution du solvant est en revanche à prendre en compte. La capacité de l'amine primaire à former de faibles liaisons hydrogènes en milieu aqueux, inexistantes en solvant organique aprotique pourrait suggérer une sensibilité de la force de rupture au solvant. L'hypothèse d'un réarrangement de la cage d'eau à proximité des groupements amines au moment de la rupture est à considérer. Cette hypothèse serait également en accord avec les résultats pour la jonction S-Au sur laquelle a priori, le passage solvant protique/aprotique n'avait que peu d'impact sur la valeur de force. Des expériences réalisées à la fois en milieu protique et aprotique, avec variation de pH devraient nous permettre de vérifier l'implication du solvant et la reproductibilité de ces valeurs. A notre connaissance, aucune étude ne fait état d'une estimation par spectroscopie de force d'une ou plusieurs barrière(s) d'activation énergétique par variation de la vitesse de charge.

Implication du groupement carboxylique : L'acide carboxylique est un des groupements terminal du peptide. La seule référence répertoriant cette interaction avec l'or en C-AFM [46] rapporte une force de rupture à 0.6 ± 0.1 nN pour une conductance à $\approx 10^{-3}G_0$ dans le tétradécane. Cette étude constitue la seule sur cette liaison à notre

connaissance.

III.3 Cas particulier des peptides

Dans les phénomènes de transport en régime tunnel cohérent et hors-résonance, il a été montré que la résistance R d'une jonction dépend exponentiellement de sa dimension selon l'axe de transport, autrement dit de la longueur de chaîne pour une jonction moléculaire, selon [61] :

$$R = R_0 \exp(\beta S) \quad (\text{III.1})$$

où R_0 est une résistance de contact effective contenant les informations sur la nature du contact électrode-molécule formé, β est le facteur de structure ($\beta = 0.85 \text{ \AA}^{-1}$ sur alcanedithiol [4]), dépendant du type de liaisons dans la molécule et des groupements fonctionnels et S la longueur de la molécule. La dépendance de la conductance avec les dimensions de la molécule étant établie, les jonctions de dithiols ou diamines comprenant plus de 8 carbones sont rarement étudiées, car les courants mesurés sont alors très faible. Néanmoins, nous rapportons dans des mesures réalisées sur decanedithiol ayant donné une conductance de $G = 5.7 \cdot 10^{-6} G_0$, soit pour une tension de 0.1 V avec $G_0 = 77.5 \mu \text{ S}$ un courant de 44.2 pA [19]. Le niveau de bruit électronique de notre installation en C-AFM sur la gamme de mesure [0-10] nA est inférieur 10 pN, et sur le STM à 15 pA pour un gain de 10^9 . Pour les jonctions soufre-or, 10 carbones suffisent à s'extraire de bruit électronique d'un facteur ≈ 4 . Cela correspond pour le decanedithiol à une longueur soufre à soufre de 1.49 nm. Ces longueurs de transport sont atteintes pour un polypeptide de 4 acides aminés, ce qui contraint notre étude.

Cependant, des études ont pourtant révélé qu'il était possible de mesurer la conductance d'un polypeptide de 12 acides aminés sur une séquence H(EL)₅C (H : histidine, E : acide glutamique, L : lysine, C : cystéine) [7]. Ces plateaux de conductance, observés à 1.7 nS sur la figure III.4, un ordre de grandeur comparable à celui de l'heptanedithiol, à un pH de 2, n'étaient plus présent à pH neutre. Les mesures de dichroïsme

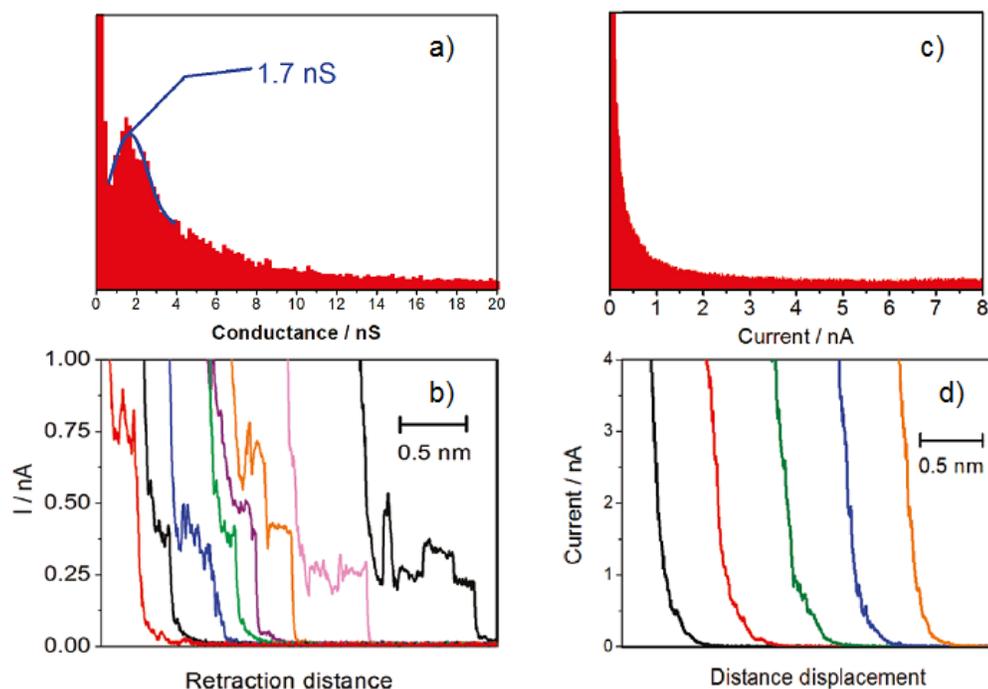


FIGURE III.4 – Histogrammes et plateaux de conductances obtenus sur une séquence $H(EL)_5C$ à pH 2 (a), (b) et à pH 6.9 (c), (d) [7]

circulaire ont permis d'apporter une explication à ce constat : à pH 2, le polypeptide présentait une structure alpha-hélicoïdale tandis qu'à pH neutre, la structure était majoritairement en enroulement aléatoire partiellement déplié. En hélice α , la dimension du peptide se réduit à 2.2 nm. Il a été donc suggéré que la structure avait une influence sur le mode de transport, et qu'en configuration hélicoïdale, le transfert électronique s'opérait via des mécanismes de saut d'électron (*hopping*) par l'intermédiaire des groupements amides. Ainsi, des dimensions de peptide supérieures à 2 nm sont caractérisables à condition qu'une structure favorisant le transport à plus courte échelle puisse avoir lieu.

Chapitre IV

Méthodes expérimentales

Nous présentons dans ce chapitre les caractérisations préliminaires aux expériences de spectroscopie de force, de mesure conductance, et de spectroscopie TERS. Les techniques de champ proche sont sensibles à l'organisation de la dernière couche en surface : la structure cristalline, l'auto-organisation des molécules adsorbées, la présence de contaminants, sont autant de facteurs qui doivent être contrôlés en amont pour garantir la reproductibilité de la mesure. Une attention particulière est donc portée à la préparation des substrats mais également des sondes. La conception des pointes STM et TERS, quelques étapes clés de la fonctionnalisation des pointes AFM et la préparation des pointes conductrice en C-AFM seront exposées. Une section est également réservée à la justification des choix d'étude concernant le peptide. Nous discuterons des contraintes liées au couplage des techniques AFM et STM résolues sur la même molécule en terme de choix de séquence et de milieu d'étude.

IV.1 Choix du peptide

Hélicité : L'hélice alpha est une catégorie de structure secondaire, une conformation thermodynamiquement stable que peuvent adopter localement certaines protéines dans leur environnement. Elle est favorisée par la formation périodique de ponts hydrogène entre deux amides ($\text{NH}_i - \text{O}_{i+4}$ avec i la position de l'acide aminé). Les valeurs données pour un pas d'hélice vont de 0.52 à 0.55 nm. Sur un polypeptide, un pas d'hélice correspond environ à 3.6 résidus (acides aminés) par tour. Tous les acides aminés ne

favorisent pas la formation d'un enroulement. Les résidus promoteurs sont : la leucine, la methionine, la lysine, le glutamate et l'alanine. Plusieurs études rapportent que les motifs en poly-alanine mènent à une formation stable en hélice sur de courtes séquences [62], [63], [64]. La propension de ce résidu à réduire les interactions inter-chaînes non désirables en fait un candidat idéal (simple méthyle en chaîne latérale). L'insertion régulière de lysine suivant le motif AAAAK lui confère une structure tout en garantissant son hydrosolubilité (l'alanine étant hydrophobe), condition nécessaire compte tenu du protocole de fonctionnalisation de pointe.

Groupements C,N-terminaux : De part les chaînes latérales de la lysine, plusieurs groupements amines seront accessibles lors de la jonction or-peptide-or, ce qui devrait permettre d'avantager la statistique de nos mesures. Néanmoins, la conductance étant sensible aux dimensions de la jonction, il est préférable de favoriser une configuration où la même distance de transport sera parcourue pour chaque palier de conductance. Pour cette raison, nous choisissons de placer une cystéine en C-terminal et en N-terminal de notre séquence, qui garantiront un plateau constant d'une mesure à l'autre. La séquence choisie est donc : CK(AAAAK)₂C (C : cystéine, K : lysine, A : alanine). Il s'agit d'une séquence déjà présente dans la littérature sous une forme polymérisée [CK(AAAAK)₂C]_n en AFM-DFS, et dont la réponse en élongation a pu être caractérisée [65]. La figure IV.1 illustre ce peptide avec ses dimensions en structure hélicoïdale (a) et planaire (b).

Caractérisation de la structure : La séquence ne gouverne pas seule la conformation du peptide, des facteurs comme la température ou la nature du solvant jouent également un rôle. De simples considérations thermodynamiques permettent de le comprendre. La grandeur associée à un changement de conformation est donnée par l'énergie de Gibbs : $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. Le passage d'une forme dénaturée maintenue par la sphère d'hydratation et augmentant le nombre de configurations accessibles au peptide (l'entropie d'un système est décrite par $S = k_B T \ln \Omega$ où Ω correspond au nombre de micro-états), à une forme structurée où ce nombre de micro-états est considérablement réduit se traduit par une pénalité entropique pour le peptide. Une telle forme

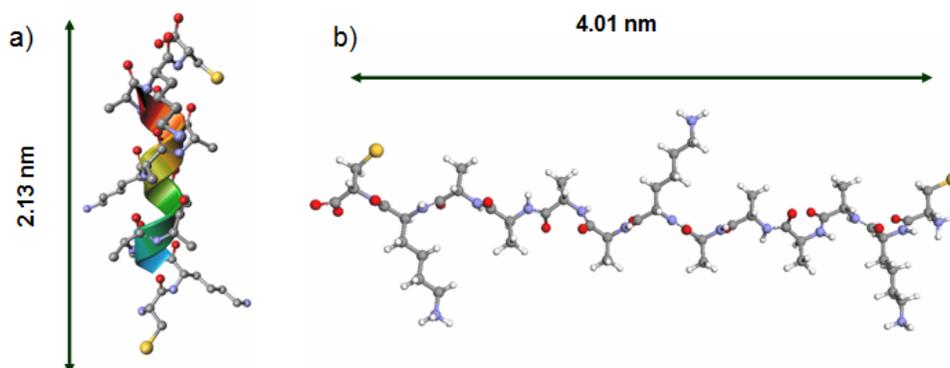


FIGURE IV.1 – Illustration du peptide de séquence $CK(AAAAK)_2C$ choisi pour cette étude en structure hélicoïdale (a) et plane (b).

n'est donc pas favorable. Néanmoins, la diminution du volume d'hydratation lors du repliement par éjection de molécules d'eau mène à une augmentation de l'entropie du système peptide/eau, le nombre de micro-états accessibles à l'eau étant augmenté. L'entropie globale du système est donc augmentée. La diminution de ce volume d'hydratation peut être obtenue de plusieurs manières, notamment par l'utilisation d'un solvant défavorisant les liaisons hydrogènes entre le peptide et sa cage de solvation. Le trifluoroéthanol (TFE) en co-solvant est un agent promoteur d'hélicité connu pour favoriser ces liaisons intra-chaînes [66].

La figure IV.2 présente trois spectres d'absorbance réalisés en dichroïsme circulaire collectés dans de l'eau milliQ, en milieu PBS tamponné à pH 7.4, et en solution aqueuse à 20% de H_2O/TFE (v/v) (spectres réalisés au Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris, LCMCP). Lorsque la molécule présente un degré d'hélicité, elle induit un déphasage entre la polarisation droite, et gauche du faisceau incident polarisé circulairement. Ce retard d'absorption à l'origine du signal observé est lié au pouvoir rotatoire de la structure. Nous observons en solution H_2O/TFE la présence de deux bandes d'absorption UV à 222 nm et 208 nm caractéristiques d'une structure en hélice α [64], [67]. Ces bandes sont considérablement atténuées dans le tampon PBS et l'eau milliQ. La configuration du peptide dans ces milieux sera donc essentiellement en enroulement aléatoire. Notons que nous ne pouvons nous baser sur ces seuls spectres pour donner un pourcentage quantitatif sur la proportion hélicoïdale/enroulement aléatoire.

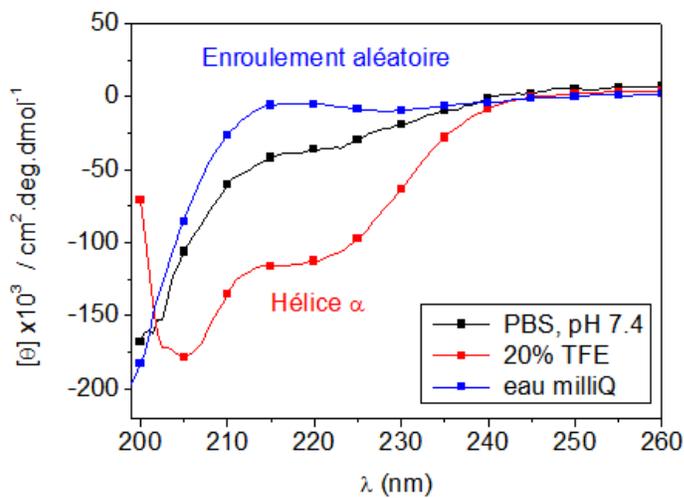


FIGURE IV.2 – Spectre de dichroïsme circulaire réalisé sur la séquence $CK(AAAAK)_2C$ à différents solvants.

Un étalonnage est pour cela nécessaire, et est obtenu par variation de température, de sorte à observer la transition de structure d'hélicoïdale à dénaturée.

Solvant : Les mesures de conductance nécessitent un solvant non-conducteur. Dans la littérature STM, le toluène est souvent employé. Nous choisissons le tétradécane pour sa faible toxicité et son faible taux d'évaporation. Le peptide n'étant pas soluble dans ce solvant la caractérisation en spectroscopie-CD n'a pu être conduite. Les mesures en AFM-DFS seront conduite en milieu PBS et dans une solution aqueuse à 20% de TFE (H_2O/TFE (v/v)).

IV.2 Préparation des substrats

Les surfaces sont préparées par dépôt thermique d'or (99.999 % de pureté) sur des feuillets de mica clivés, dans un évaporateur sous un vide secondaire (PFEIFFER PLS 500). Des épaisseurs de dépôt de $100 \text{ nm} \pm 15$ peuvent être ainsi obtenues à une vitesse dépôt de 1 \AA/s et une pression de $P = 2.10^{-6}$ à 9.10^{-6} mbar durant le dépôt. L'épaisseur est contrôlée par une microbalance à quartz Maxtek (TM- 400). L'avantage du mica est multiple : des surfaces planes peuvent être obtenues par simple

clivage des feuillets de mica, et le dépôt d'or pouvant croître dans la continuité du plan du mica, il ne nécessite pas une couche intermédiaire de chrome. Les surfaces subissant un traitement thermique lors de leur nettoyage, l'absence de chrome empêche une contamination de la couche d'or par diffusion de chrome dans celle-ci. Avant l'étape de fonctionnalisation, les échantillons sont nettoyés par ozonolyse (UV/O₃), rincés à l'éthanol absolu, séchés sous jet d'azote, puis recuits à la flamme. Cette dernière étape permet d'élargir les domaines d'or (111) par réarrangement des plans atomiques et réduction des défauts de surface.

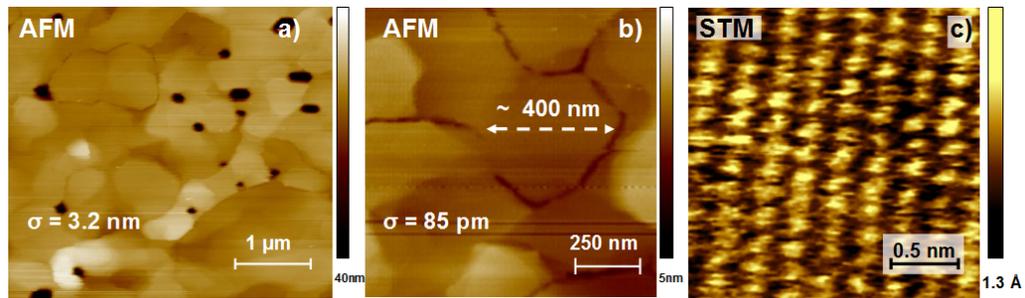


FIGURE IV.3 – Image de topographie AFM en mode contact sur substrat d'or (a), (b) et topographie STM (c).

Contrôle de la topographie : La figure IV.3 présente sur (a) et (b) des images de topographie AFM (mode contact) des surfaces obtenues après cette étape. Sur l'image en (a) nous observons la présence de plusieurs domaines délimités par des joints de grains. La présence de cavités générées par le recuit mène à une rugosité de 3.2 nm. En réalité sur un mono-domaine, les variations de hauteurs sont inférieures à 0.1 nm, et à la limite du détection du levier. L'image de topographie (b) montre sur une coupe que ces domaines peuvent s'étendre jusqu'à plusieurs centaines de nm. L'image STM en (c) illustre un cas où une reconstruction du plan cristallin (100) a été observée. Bien que présentes, ces reconstructions restent en principe largement minoritaires. Des spectres réalisés en DRX (diffraction de rayons X) fournis en annexe montrent que les plans (111) contribuent pour la majorité.

Pour les mesures de conductance en C-AFM, les surfaces sont fonctionnalisées. Elles sont plongées dans une solution de peptide (10^{-3} M- 10^{-6} M, allant de 20 min à 2h),

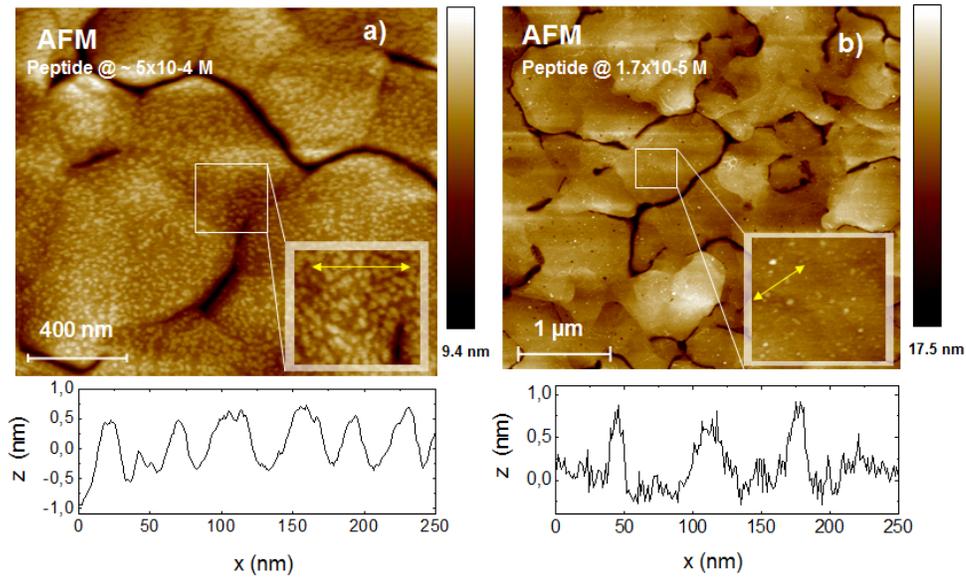


FIGURE IV.4 – Images de topographie AFM réalisées en mode contact sur substrat d’or fonctionnalisé par le peptide à 5×10^{-4} M (a) et 1.7×10^{-5} M (b) et coupes associées.

et subissent 3 cycles de rinçage dans de l’eau milliQ de 20 minutes. La concentration module le taux de recouvrement comme le montrent les images de topographie IV.4 réalisée à 5×10^{-4} M (a) et 1.7×10^{-5} M (b). Les coupes associées présentent quelques exemples de hauteurs qui s’échelonnent entre 0.7 et 1 nm. Bien que la résolution latérale soit limitée et sur-estime probablement les distance sur l’axe du scanner, nous observons sur ces coupes que la réduction en concentration permet de descendre à des densités de surface suffisamment faibles pour n’obtenir plus que quelques agrégats espacés de plus de 50 nm.

Contrôle de l’adsorption : Les mesures C-AFM nécessitent de travailler sur des surfaces peu denses. Cette configuration peut être obtenue par diverses méthodes. La première consiste à travailler sur des substrats non fonctionnalisés, et à effectuer les mesures en milieu liquide dans une solution faiblement concentrée en molécules. Le peptide étant insoluble dans le tétradecane, cette méthode ne peut être utilisée. La seconde consiste à travailler sur des surfaces préparées à faible concentration (10^{-5} - 10^{-6} M). C’est la méthode que nous avons choisie pour effectuer les mesures de conductance.

Néanmoins, en vue d'un couplage force-conductance, il est préférable de se placer dans une configuration où les forces d'interaction entre les surfaces d'or nu (pointe et substrat) seront minimisées. Le champ proche d'une surface non fonctionnalisée pose en spectroscopie de force le problème de l'impossible discrimination des interactions liées à la molécule de celles liées au substrat si celui-ci n'est pas inerte. Nous avons donc testé une troisième méthode où la surface fonctionnalisée est mixte (binaire), avec une proportion peptide/molécule *template* contrôlée par spectroscopie de photoélectrons X (XPS).

L'expérience consiste à réaliser une matrice d'alcanethiols, ici du dodecanethiol (DDT), à l'intérieur de laquelle viendront se greffer quelques peptides dont la concentration sera quantifiée par XPS. Ces expériences préliminaires ont été réalisées sur le tripeptide glutathion (Glu(E)-Cys(C)-Gly(G), nommé GSH). Deux méthodes existent : la co-adsorption et l'adsorption séquentielle. Dans la co-adsorption, les deux molécules sont présentes en solution à des concentrations variables, et viennent s'adsorber simultanément. Les cinétiques d'adsorption diffèrent d'une molécule à l'autre, et la relation liant la concentration du peptide en solution et celle en surface ne sont pas linéaires. Des études réalisées sur la co-adsorption d'octanethiol (OT) et octanedithiol (ODT) [8] ont montré qu'un mélange binaire thiol/dithiol résulte en une adsorption quasiment exclusive en dithiols et ce même à de très faibles concentrations, d'après la figure IV.5.

Nous avons par conséquent choisi la méthode d'adsorption séquentielle. Les surfaces sont préalablement fonctionnalisées au DDT à une concentration de 10^{-3} M pendant 2 heures, puis elles sont plongées après rinçage dans des solutions aqueuses de GSH à des concentrations variables, allant de 10^{-4} M jusqu'à 10^{-8} M. Il est attendu qu'un processus d'échange substitue localement le DDT au profit du GSH.

La figure IV.6 compare deux images de topographie C-AFM (mode tunnel) sur SAM (monocouche auto assemblée) de dodecanethiol, et SAM mixte de DDT(10^{-3} M) /GSH (10^{-4} M) réalisées à l'air. Nous observons localement sur SAM binaire la présence d'agrégats conducteurs, non présents sur la surface simplement reconstruite par les alcanthiols. Ces agrégats peuvent provenir de GSH adsorbée en surface du DDT. Pour vérifier si un processus d'échange a lieu, nous contrôlons l'évolution de l'adsorption en

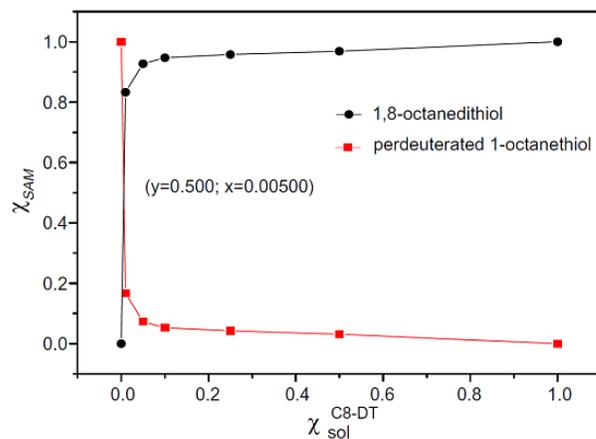


FIGURE IV.5 – Fractions molaires d’OT et ODT adsorbés en surface χ_{SAM} en fonction des fractions molaires en solution χ_{sol} d’après [8]

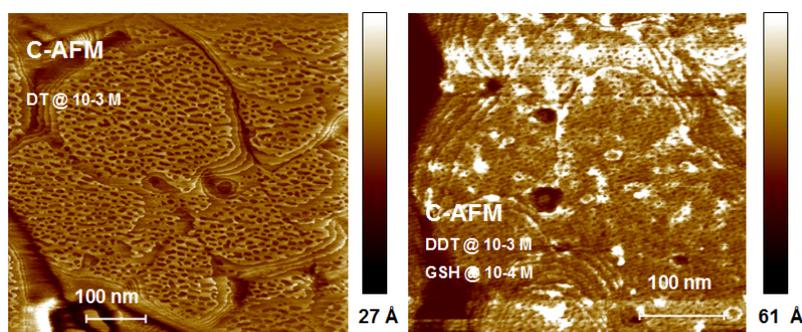


FIGURE IV.6 – Images de topographie C-AFM (mode tunnel) réalisées sur SAM d’alcanethiol et sur SAM binaire alcanthiol(10^{-3} M) /GSH (10^{-4} M)

fonction de la concentration en GSH par XPS.

Les analyses sont effectuées sur un spectromètre ESCA+(Omicron GmbH) sous un vide de 1×10^{-10} mbar. La spectroscopie de photoélectrons fonctionne sur le principe d’excitation d’atomes sur des orbitales de coeur par absorption d’un rayonnement X, dont l’une des voies de désexcitation mène à l’émission d’un photoélectron. Les niveaux électroniques de l’atome étant modifiés par les liaisons chimiques, son environnement direct peut ainsi être sondé. Les spectres XPS présentés sur la figure IV.7 montrent l’évolution de l’orbitale 1s de l’azote 1s et de la 2p du soufre. L’azote et le soufre n’étant pas présents sur or nu, nous pouvons les utiliser comme marqueurs du tripeptide GSH. Le spectre de l’azote présente deux contributions corrélables aux groupements amine

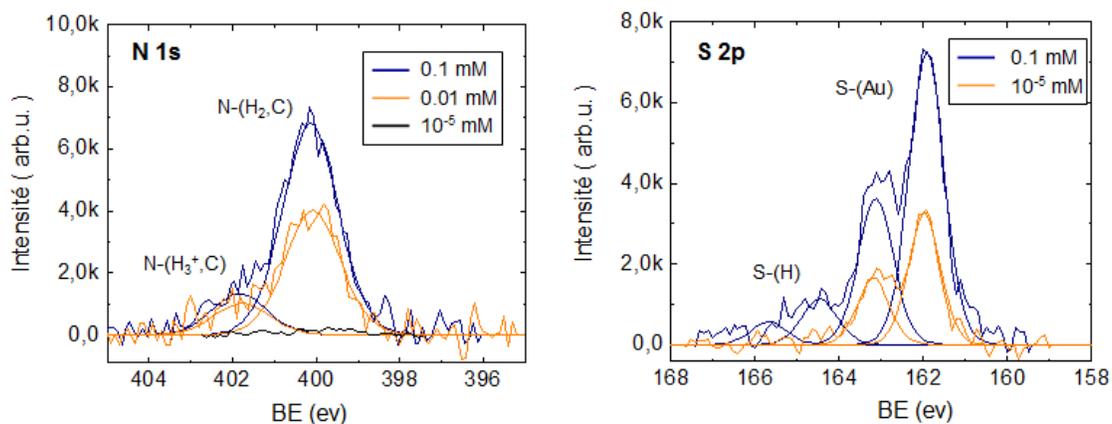


FIGURE IV.7 – Spectres XPS de l'azote (1s) et du soufre (2p) sur SAM binaire DDT/GSH à concentration variable en GSH.

et amide. La première correspond à la forme NH₂, la seconde à sa forme protonnée NH₃⁺. L'existence de ces deux formes provient de la forme zwitterionique du GSH déjà observée dans la littérature [68].

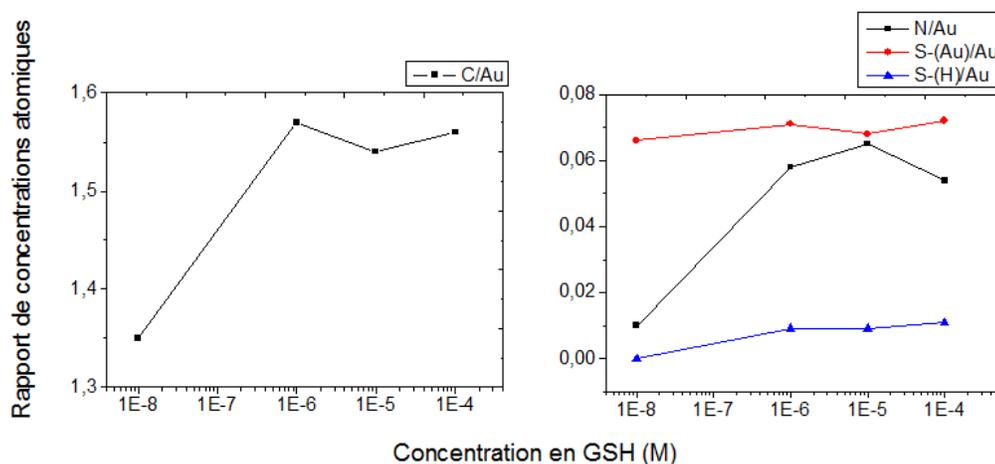


FIGURE IV.8 – Evolution des rapports de concentration atomique en fonction de la concentration de GSH en solution.

Sur la figure IV.8 l'évolution des concentrations atomiques du carbone, du soufre et de l'azote normalisées par la concentration atomique en or (Au 4f) pour chaque échantillon est analysée. Le ratio C/Au est de 1.43 sur surface fonctionnalisée au DDT sans GSH, et de 0.85 sur or pur (correspondant au carbone de contamination). L'enri-

chissement en GSH de la couche est marqué par une augmentation de la concentrations en azote jusqu'à 10^{-5} M. La concentration en soufre lié est constante tandis que celle en soufre non-lié diminue. Néanmoins, ces variations, tout comme celles observées pour le carbone n'interviennent pas sur un ordre de grandeur suffisant pour conclure sur un processus d'addition de GSH ou de substitution. Nous pouvons néanmoins conclure qu'à des concentrations de l'ordre de 10^{-8} M, la proportion de GSH en surface n'est plus détectable.

IV.3 Préparation des sondes

IV.3.1 Pointes STM/TERS

En STM-BJ, les dimensions de l'apex conditionnent en grande partie la reproductibilité du contact atomique. De faibles rayons de courbure sont préférables. Néanmoins par commodité, les pointes sont généralement conçues par clivage manuel, et travaillées jusqu'à ce que des plateaux à G_0 reproductibles soient obtenus. Pour les mesures de topographie STM et TERS en revanche, un contrôle fin de l'apex est nécessaire. En STM de faibles rayons de courbure garantissent une meilleure résolution. En TERS, la pointe doit permettre l'exaltation du champ électrique local par la création d'un plasmon de surface polarisé.

Pour ce type d'expérience, les pointes sont conçues par dissolution électrochimique sur un montage à deux électrodes. Un fil d'or de 0.25 mm de diamètre est plongé dans une solution 50 :50 de HCl à 37 % et d'éthanol absolu. Dans ces proportions, une faible rugosité de surface au niveau de l'apex est attendue [69], [70]. Un anneau de platine cerclant la pointe est placé à l'interface air/liquide, de sorte à ce que la dissolution se produise au niveau du ménisque capillaire formé par la solution autour du fil. Des potentiels compris entre 1.5 et 2.4 V produisent des pointes de rayon de courbure inférieurs à 100 nm [69]. Le courant mesuré décroît au fil de la dissolution jusqu'à chuter à zéro. Les temps de coupure obtenus, généralement autour de 500 secondes, sont un premier indicateur de la qualité de la pointe.

L'apex est mesuré à partir d'images obtenues en SEM-FEG (*field emission gun*

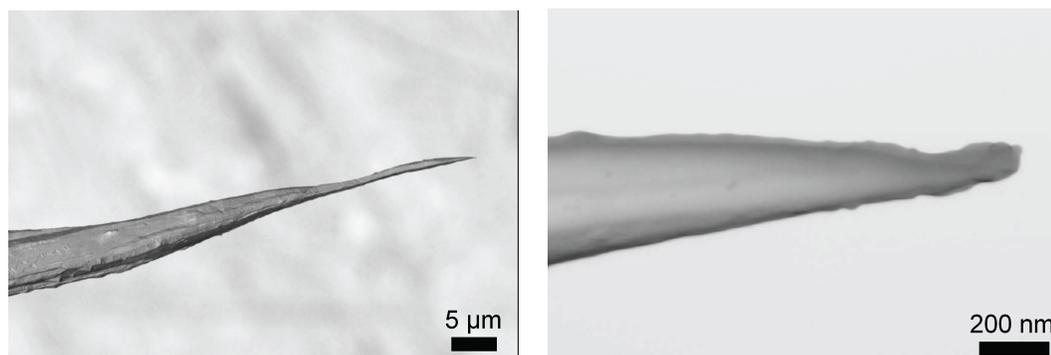


FIGURE IV.9 – Image SEM-FEG de pointes STM Au préparées par dissolution électrochimique.

scanning electron microscope), sont la figure IV.9 montre un exemple avec l'agrandissement correspondant. Le rayon de courbure est ici estimé à 63 nm.

IV.3.2 Pointes C-AFM

Les pointes AFM utilisées sont des pointes commerciales multi-levier en nitrure de silicium composées de 4 leviers triangulaires et une poutre pour les MLCT/MSCT, et deux leviers triangulaires pour les DNP10. De sorte à réaliser une jonction électrique en C-AFM, elles sont ensuite métallisées par pulvérisation cathodique (Pfeiffer, PLS 500). Une première couche adhésive de chrome est déposée par évaporation thermique à 0.3 \AA/s , soit une épaisseur entre 7 et 15 nm ($P=2.10^{-6}$ - 9.10^{-6} mbar). L'or est ensuite déposé par pulvérisation à un taux de 7-8 nm/min jusqu'à 60 nm/min pour les dépôts plus importants. Des épaisseurs de 30 nm sont obtenues. L'épaisseur de dépôt d'or a été choisit pour permettre un recouvrement optimal de toute la surface sans néanmoins modifier drastiquement la constante de raideur des leviers par une variation trop importante de masse.

La difficulté d'établir un contact électrique reproductible nous a également mené à travailler sur des épaisseurs de dépôt plus importantes (60, 80, 100 jusqu'à 200 nm). La continuité du contact électrique sur l'ensemble du levier jusqu'au support de pointe n'est contrôlé qu'au moment de la mesure. Egalement, étant donné la faible surface des leviers, la composition de la surface ne peut être contrôlée par XPS. Elle est donc obtenue par l'analyseur X de notre SEM-FEG.

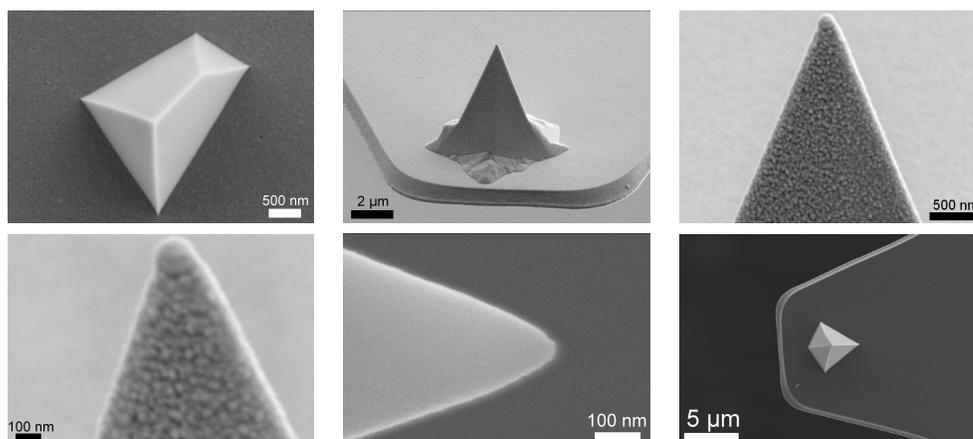


FIGURE IV.10 – Image SEM-FEG de pointes AFM commerciales recouvertes d'or par pulvérisation cathodique.

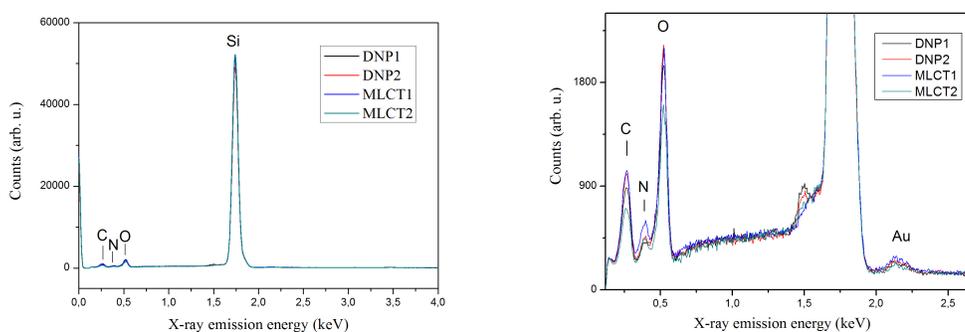


FIGURE IV.11 – Spectre de fluorescence X sur leviers MLCT/DNP10 après dépôt d'or.

Les pointes ne pouvant subir de traitement thermique de part la fragilité des leviers, elles sont nettoyées par ozonolyse, rincées à l'éthanol et séchées sous un flux continu d'azote à faible pression.

IV.3.3 Pointes AFM fonctionnalisées

Nous utilisons des leviers commerciaux (MSCT, Bruker) fonctionnalisés suivant un protocole développé par l'équipe d'Hermann Gruber (*Institute of Biophysics, Johannes Kepler University Linz, Autriche*) [71],[72], [73]. D'autres protocoles existent, dont certains sont également largement utilisés comme la méthode APTES. Dans

cette méthode, la surface de la pointe subit une silanisation qui la recouvre de (3-aminopropyl)-triéthoxysilane. Cette méthode présente l'avantage de rendre fonctionnalisable un grand nombre de surfaces présentant des oxydes. Néanmoins, le réseau de silanes sur lequel est fixé l'agent de couplage peut parfois polymériser et induire une élasticité additionnelle. Ce phénomène est rapporté dans la littérature [74], [75]. La figure IV.12 illustre 3 des étapes principales de ce protocole.

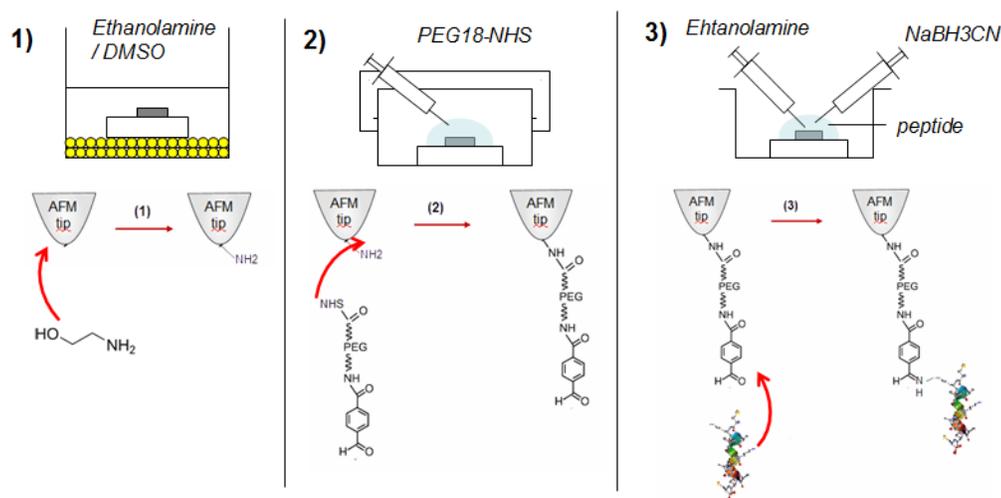


FIGURE IV.12 – Illustration des principales étapes du protocole de fonctionnalisation.

Aminofonctionnalisation : A l'étape 1), les leviers oxydés en surface ($\text{Si}_3\text{N}_4 \rightarrow \text{SiOH}$ sur la dernière couche de nitrure de silicium) sont plongés dans un bain d'éthanolamine/DMSO préalablement dégazé sous dessiccateur, pendant 12 heures à température ambiante de sorte à assurer un recouvrement par les amines.

Pegylation : A l'étape 2), l'attachement de l'agent de couplage, l'acétal PEG(18)-NHS (ici présenté en terminal aldéhyde) est réalisé par réaction des groupements maléimide (NHS) du linker sur les amines dans une solution de chloroforme/triéthylamine.

Greffage du peptide : A l'étape 3), les groupements acétal sont activés (réaction acétal/aldéhyde) et mis en présence d'une solution aqueuse de peptide à $2 \times 10^{-6} \text{M}$. Une solution basique (0.1 M NaOH) de sodium cyanoborohydrique initie le greffage

par liaison covalente entre le peptide via l'une de ses amines, et l'aldéhyde en bout de linker. En fin de réaction, quelques μL d'éthanolamine sont ajoutés de sorte à ramener le pH à des valeurs plus faibles limitant la dégradation du peptide à cette étape. L'étape de couplage du peptide ne peut être contrôlé qu'en spectroscopie de force.

Chapitre V

Méthodes statistiques et numériques

L'interprétation d'un processus possédant sa propre statistique pose le problème d'une représentation adaptée. Les volumes de données sur lesquels nous travaillons sont conséquents. Une expérience de spectroscopie de force fournit en moyenne des jeux de quelques centaines à plus de mille courbes. Sur chaque courbe, seuls les points associables à une rupture sont pertinents pour l'exploitation. Il faut donc dans un premier temps pouvoir extraire ces points de façon automatique. Dans les configurations ligand-récepteur, la surface est fonctionnalisée avec le récepteur, et la pointe avec le ligand. Deux cas de figure s'offrent alors :

1. la courbe ne présente aucune rupture : il n'y a pas eu de reconnaissance, la courbe est décomptée dans la catégorie des non-événements. Ce cas de figure représente dans ces configurations 90 % des contributions [76].
2. la courbe présente une rupture : une reconnaissance a probablement eue lieu, et peut potentiellement être attribuée à l'interaction.

Sur ces 10 % restant, des biais peuvent intervenir. La faible densité de molécules, optimisée de sorte à maximiser les interactions en molécule unique, la conformation du ligand au contact de son récepteur présentant ou non son site d'accroche ou encore la présence de contaminants sont autant de facteurs qui peuvent induire des événements non-attribuables à l'interaction ciblée. Le succès de la fonctionnalisation n'étant

garanti qu'au moment de la mesure et après observation sur un grand nombre d'événements, de fonctionnalisations et de contrôles, un raffinement est alors nécessaire. Ce raffinement est obtenu par un classement visant à dissocier les événements spécifiques attribuables à l'interaction cible, des événements non-spécifiques non-attribuables à cette interaction. Dans notre cas, la surface n'est fonctionnalisée avec aucun récepteur. La probabilité de ne détecter aucun événement est donc diminuée, au profit d'une augmentation des événements spécifiques mais également non-spécifiques. Nous devons donc veiller dans un second temps à n'exclure de la spécificité que les événements qui a priori doivent effectivement l'être.

En conductance, le nombre d'interactions possède une statistique relativement favorable. Il n'est limité que par la dégradation de la pointe, et est reproductible dans plus de 40-50 % des cas lorsqu'une bonne stabilité mécanique est obtenue [34]. Nous verrons qu'en pratique, ce pourcentage est dans notre cas largement sur-estimé, et le nombre de courbes présentant un plateau de conductance corrélable à un contact électrique par le jonction or-molécule-or est comparable aux expériences de spectroscopie de force. Un traitement reconstruisant les courbes présentant une jonction au profit de celles n'en présentant pas doit donc également être développé pour permettre l'estimation des canaux de conductance les plus probables. Les sections suivantes présentent les méthodes numériques qui ont été développées pour répondre à cette problématique.

Notons que des programmes existent [77], ainsi que des algorithmes de détection [78], [79], mais à notre connaissance aucun n'inclut la correspondance avec la conductance simultanée qui était le cœur de ce projet. Également, quelques équipes mentionnent l'utilisation de routines développées sous IgorPro 6 [80] mais utilisées en interne et non fournies. Finalement, la majorité des équipes font ce traitement manuellement, ce qui pose le problème du biais possible introduit par l'utilisateur. Ce problème est particulièrement critique lorsque le processus est sous-échantillonné.

V.1 Traitement des courbes de force

Les fichiers de courbe de force présentent deux types de données : la déflexion du levier D (nm), la déflexion du levier convertie en force F (pN). Sans calibration préa-

lable, la déflexion du levier lors de l'acquisition se présente en Volt, qui est la mesure directe en sortie de photodiode. La mesure du facteur de sensibilité, correspondant à la pente de la partie répulsive dans son domaine linéaire permet d'obtenir la conversion V/nm. Par la détermination de la fréquence de résonance du levier via la mesure du bruit thermique (énergie dissipée du levier oscillant dans le milieu en fonction de la fréquence des oscillations) la constante de raideur du levier en N/m est obtenue. La déflexion en nm peut alors être convertie en pN.

V.1.1 Pré-traitement

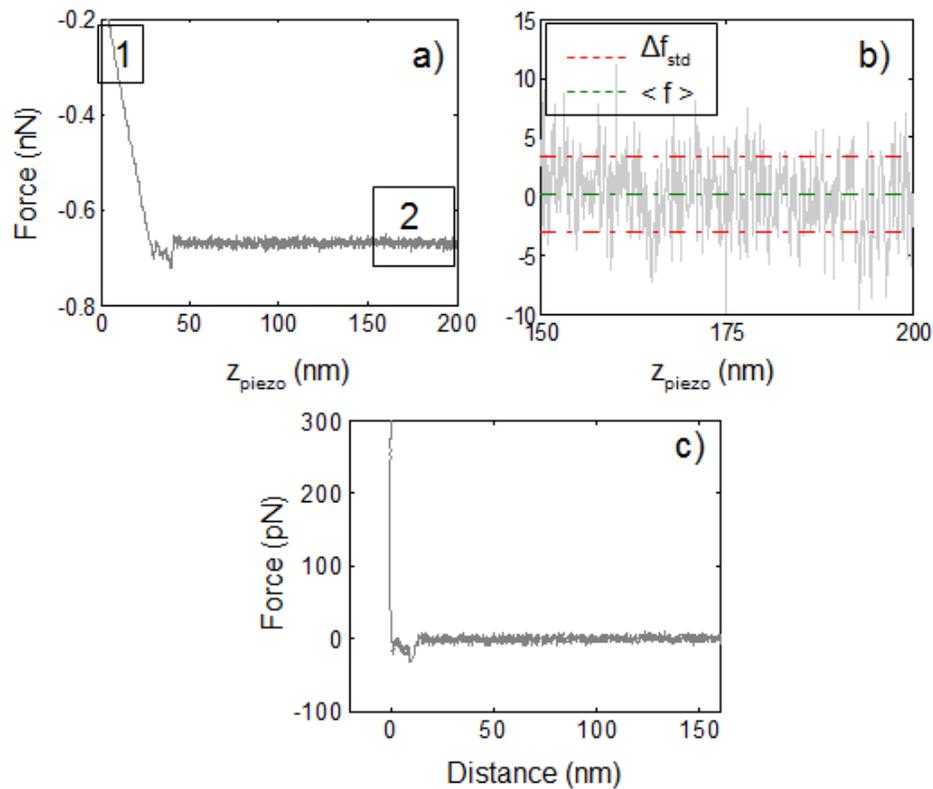


FIGURE V.1 – Courbs de force brute dont les zones 1 (a), correspondant à la zone 2 d'oscillation libre (b) et en représentation force-distance c). La déviation standard est ici à 3.7 pN.

Ligne de base : Les forces se présentent sur une échelle relative, comme illustré sur la figure V.1 a). Les courbes sont donc ré-ajustées par une simple régression linéaire de sorte à fixer le 0 pN sur la partie où le levier oscille librement (zone 2 sur la figure a). La portion ajustée est généralement fixée au premier quart de la courbe. Sur les N_1 premiers points ($N_1 = [10^2-10^3]$ dépendant de la résolution), la déviation standard du bruit d'oscillation libre Δf_{std} est calculée. Le coefficient directeur de la ligne de base a est comparé à Δf_{std} . Si $a > \Delta f_{std}$, un pic était présent sur cette portion et la courbe est exclue, $a \leq \Delta f_{std}$ la courbe est acceptée.

Représentation force-distance : La rampe est ensuite construite. Elle correspond à la trajectoire du piézoélectrique z_{piezo} (nm) et est indépendante de la calibration du levier. La distance pointe-substrat est obtenue selon : $z = D + z_{piezo}$ (avec D la déflexion en nm) [26]. En représentation force-distance, la force appliquée au delà du point de contact correspond à une distance nulle V.1 a) (zone 1 sur la figure a)). Néanmoins un offset en distance Δz_{std} est parfois présent dans cette zone. Sur cette portion, la moyenne des N_2 premiers points est utilisée pour re-calibrer la courbe ($N_2 = [50-500]$ dépendant de la résolution). Les courbes sont ensuite envoyées vers un algorithme de détection des événements de rupture. La détection n'utilise pas de critère sur la distance, contrairement au classement. Réaliser cette étape sur $F(z_{piezo})$ ou sur $F(z)$ ne modifie pas l'exploitation.

V.1.2 Détection des ruptures

Un événement de rupture se caractérise par une discontinuité dans la courbe de force. Lorsqu'un agent de couplage est introduit, ce processus se décompose en deux temps : 1) une première phase d'élongation où la courbe $F(z)$ suit un chemin continu décrit dans le cas du linker PEG par le modèle EFJC, 2) une seconde phase immédiate où le décrochage induit un saut au niveau du levier qui peut soit revenir à la ligne de base, soit décrire d'autres chemins d'élongation. Plusieurs critères apparaissent ici, et nous permettent de traduire numériquement cette discontinuité :

1. elle est supérieure au seuil de détection : condition sur la force,

2. elle correspond à un changement abrupt de force : condition sur la dérivée de la force,
3. elle réalise un minimum local : condition sur la distance en équivalent nombre de points.

A partir de ces trois critères, nous pouvons construire l'algorithme.

Détection des discontinuités : Cette étape est réalisée à partir du calcul de la variance glissante de la courbe, outil particulièrement adapté à ce type de processus. Quelques travaux rapportent son utilisation dans la détection de ruptures [81], [82], mais également dans des domaines plus variés comme l'analyse financière [83] pour évaluer les variations d'indicateurs dans des séries temporelles. Utilisant la propriété suivante :

$$\text{Var}(aX + b) = a^2 \text{Var}(X) \quad (\text{V.1})$$

la variance glissante σ_j^2 est calculée sur l'ensemble des j points de la courbe comme suit :

$$\sigma_j^2(n) = \frac{1}{n-1} \sum_{i=0}^{n-1} (f_{j-i} - \mu_j(n))^2 \quad (\text{V.2})$$

où n correspond à la taille de la fenêtre glissante prise entre 5 et 10 points en fonction la résolution de la courbe, f_{j-i} est la valeur de la force au point $j-i$ et $\mu_j(n)$ est la moyenne de la force dans l'intervalle n . Par un choix de fenêtrage judicieux, chaque saut de force est caractérisé par un maximum de la variance dont les bases constituent les bornes de recherche du minimum local. Les figures V.3 et V.4 illustrent cette méthode. Les changements de signe obtenus par :

$$D(\text{Var}) = \frac{d\sigma_j^2(n)}{df_j} \quad (\text{V.3})$$

donnent la fenêtre de recherche. La force est déduite du minimum dans cette fenêtre. L'exemple présenté sur la figure V.4 illustre la nécessité de seuillages explicites.

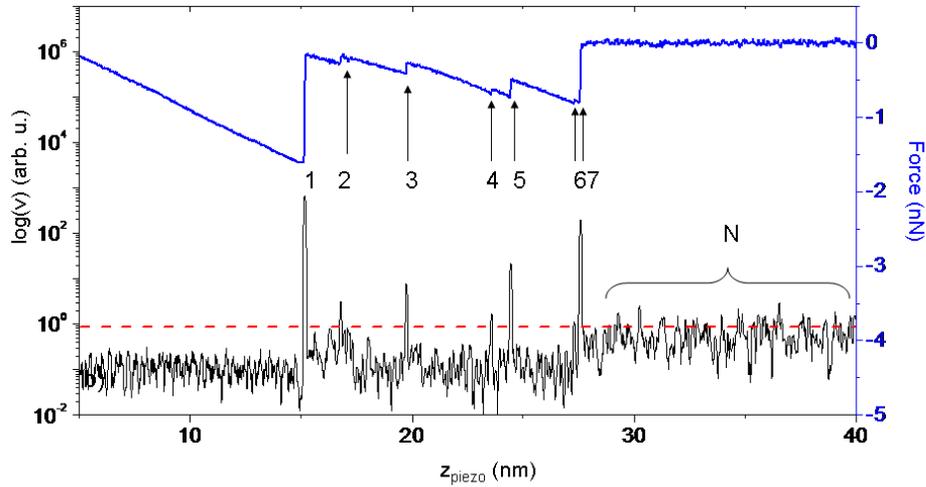


FIGURE V.2 – Exemple sur une courbe présentant de multiples interactions. La ligne rouge présente un seuillage arbitraire.

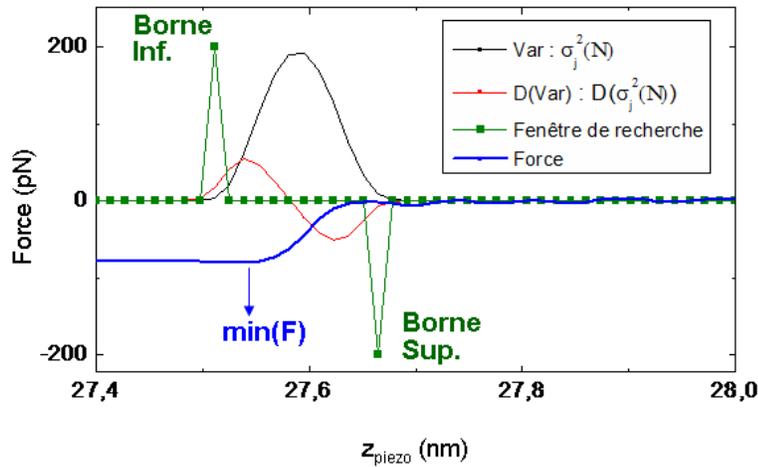


FIGURE V.3 – Illustration de la méthode de sélection sur un agrandissement de la courbe précédente pour le septième pic.

Six pics sont visibles sur la courbe. Nous observons qu'en fixant un premier seuillage grossier sur la variance, l'ensemble des contributions peuvent être dégagées dans un même set. Néanmoins, ce seuillage inclut également des contributions émanant du bruit (notées N sur la figure) et qui devront être filtrées à partir de conditions sur la force.

Seuil de détection absolu $|f|$: La portion utilisée pour effectuer la correction sur la ligne de base est remise à profit pour déterminer ce seuil. Un multiple de la déviation standard Δf_{std} est choisi. Généralement, Δf_{std} fluctue autour de 2-15 pN, et fixer ce multiple à 5-10 suffit à se dégager du bruit d'environ 50 pN.

Seuil de détection relatif $|\Delta f|$: Lorsque de multiples ruptures sont expérimentées, les élongations sont indissociables, et l'écart en force entre deux discontinuités est considérablement réduit. De sorte à ce que ces ruptures soient prises en compte, un second seuillage inférieur à $|f|$ est fixé, généralement pris à 20 pN.

V.1.3 Classement

L'extraction de F^* dépend de l'ensemble dans lequel elle est prélevée. Le classement qui suit est justifié dans la section résultats. Si N est le nombre de ruptures détectées dans la courbe, et Δz_N la distance pointe-substrat à laquelle elles interviennent, leur forces seront classées suivant :

$N = 0$	-	-	-
$N = 1$	$\Delta z < [2-5]$ nm	non-spécifique	-
$N = 1$	$\Delta z > [2-5]$ nm	spécifique	unique
$N = 2$	$\Delta z_1 < [2-5]$ nm $\Delta z_2 > [2-5]$ nm	non-spécifique spécifique	- unique
$N = 2$	$\Delta z_1 > [2-5]$ nm $\Delta z_2 > [2-5]$ nm	spécifique	multiple
$N > 2$	$\Delta z_1 < [2-5]$ nm $\Delta z_{N>1} > [2-5]$ nm	non-spécifique spécifique	- multiple
$N > 2$	$\Delta z_N > [2-5]$ nm	spécifique	multiple

Le cas particulier $N = 0$ correspond au cas où aucun pic n'est détecté. Il est également décompté dans une catégorie d'événements, mais n'est pas comptabilisé dans le non-spécifique qui représente chez nous un type d'interaction. Egalement, le dernier à $\Delta z > [2-5]$ nm sera regardé et comparé à la contribution du pic unique.

La figure V.4 présente quelques exemples de courbes de forces telles qu'obtenues dans le programme. Le code couleur suit le classement indiqué.

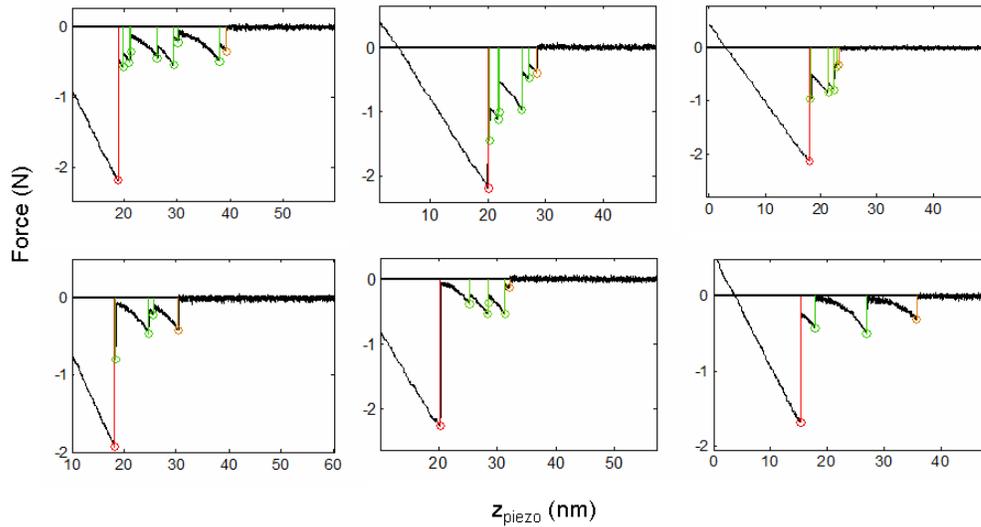


FIGURE V.4 – Exemples de détections de ruptures sur plusieurs courbes de force. Le pic en rouge correspond à l’adhésion non-spécifique, en vert sont les ruptures multiples, en orange la dernière interaction.

V.1.4 Représentation

Le classement permet de décompter les forces dans des catégories séparées. Extraire les modes de rupture les plus fréquents F^* , revient à extraire les maxima locaux d’une densité de probabilité dont les variables indépendantes, les mesures de force, constituent les observations. La seconde étape du traitement consiste à construire cette densité de probabilité $p(F)$. Par commodité, $p(F)$ est souvent estimée par un histogramme. Il présente l’avantage d’être simple d’utilisation, tous les points sont affectés par la même pondération (il ne présuppose aucune connaissance de loi probabiliste régissant le phénomène échantillonné), et permet une visualisation graphique appréciable. Il présente néanmoins le problème de dépendre de la largeur de classe h et d’être discontinu.

Largeur de classes : Si $p(f)$ est la distribution, et $\hat{p}(f)$ son estimation, nous avons pour $f \in F_k$ où F_k est l’ensemble des réalisations dans la k -ième classe la représentation

par histogramme suivante :

$$\hat{p}_h(f) = \frac{1}{nh} \sum_{i=1}^n \mathbf{1}\{f_i \in F_k\} \quad (\text{V.4})$$

où n est le nombre de réalisations, h la largeur de classe et $\mathbf{1}$ la fonction indicatrice. Nous voyons que cette estimation est modulée par le produit nh .

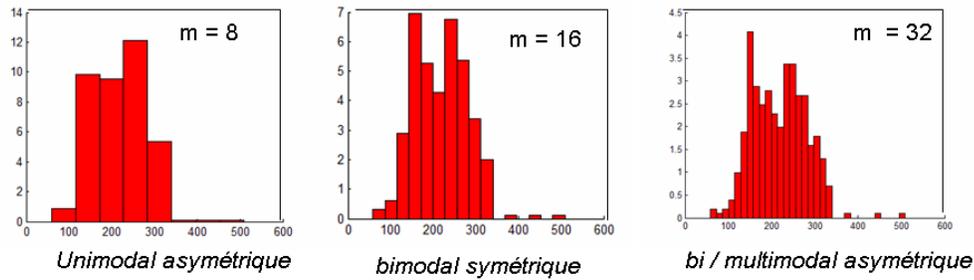


FIGURE V.5 – Histogramme dressés à partir du même jeu de données à trois nombre de classes m différents.

Nous voyons sur l'exemple V.5 que la largeur de classe permet de varier la modalité de l'histogramme arbitrairement. En réalité, la représentation par histogramme n'est fidèle à la distribution du phénomène que lorsque la condition $d_{sup}(\hat{p}, p) \xrightarrow[n \rightarrow +\infty]{} 0$ où n est le nombre de réalisations. En pratique, la rupture unique est un événement rare et les histogrammes sur lesquels nous travaillerons seront souvent sous-échantillonnés. Plusieurs critères existent pour déterminer h en fonction de l'échantillonnage des données (MSE, MISE, AMISE) mais font intervenir la densité de probabilité qui sera dans notre cas une inconnue. Nous choisissons d'utiliser le critère de validation croisée (CV, *cross-validation criterion*) qui ne dépend pas de $p(f)$:

$$CV(h) = \frac{2}{h(n-1)} - \frac{n+1}{h(n-1)} \sum_{k=1}^m \frac{n_k^2}{n^2} \quad (\text{V.5})$$

avec n le nombre de réalisations, m le nombre de classes et n_k le nombre de réalisations dans la k -ième classe parmi les m .

En reprenant l'exemple précédant, nous observons que la fonction $CV(h)$ passe par un minimum à la largeur de classe optimale, qui est obtenu pour cet échantillonnage

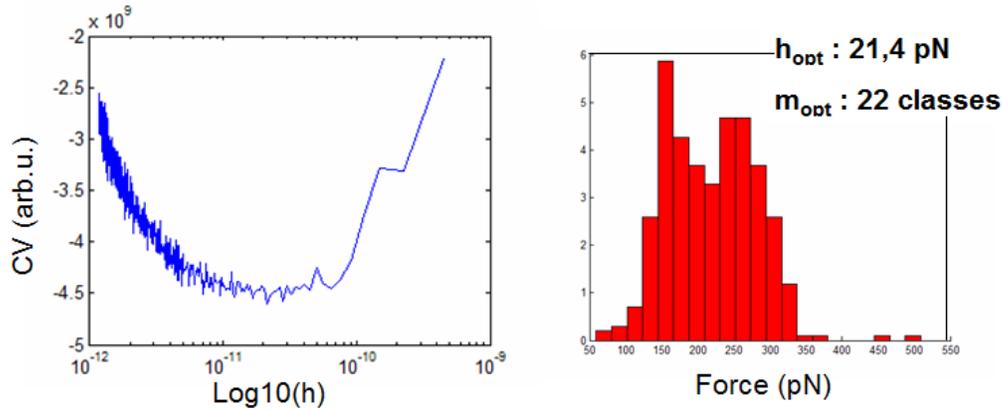


FIGURE V.6 – Estimation de h selon le critère de validation croisée, et histogramme estimé.

à 21.4 pN.

Densité de noyaux : Cette méthode généralise la représentation par histogramme. L'estimation par histogrammes est la plus fréquemment utilisée en spectroscopie de force, mais ce n'est pas la seule permettant d'estimer $p(f)$. Dans la méthode de densité de noyaux (kde, *kernel density estimation*), chaque réalisation est pondérée par une distribution, le noyau, dont la fonction représente la distribution. La représentation par histogramme est retrouvée lorsque cette distribution est uniforme. Dans notre cas, cette distribution sera une gaussienne dont la largeur à mi-hauteur sera prise égale au bruit d'oscillation libre du levier.

L'exemple V.7 présente l'estimation par noyaux superposée à l'historgramme précédemment obtenu. L'enveloppe permet dans le cas de distributions multimodales d'extraire de façon automatique les forces réalisant les maxima F^* associés aux distributions $p(f)$. Cette méthode présente l'avantage considérable de rendre continue et dérivable une fonction qui, représentée par histogramme ne l'est que par morceaux. Dans cette configuration, il pourrait être possible d'ajuster directement la barrière énergétique par sa fonction $p(F)$ suivant une méthode proposée par Gaub et déjà discutée dans la section modèles.

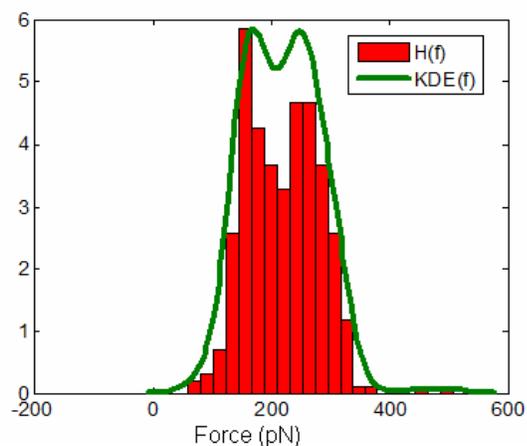


FIGURE V.7 – Estimation par histogramme superposée à son estimation par la méthode des noyaux (KDE).

Cartographie force-distance : Nous voyons à présent la dernière représentation dont nous avons tiré parti pour contrôler la distribution des interactions. Lorsque la molécule est reliée à la pointe par un agent de couplage, la distance devient un critère permettant de clarifier si le maximum F^* est effectivement corrélable à l’extension d’une chaîne de polymère, au delà du simple critère en distance Δz . Une méthode rigoureuse consisterait à ajuster par un modèle d’extension chaque trajet non-linéaire décrit par la courbe d’élongation. Les grandeurs associés à ces modèles (nous pensons à L_K) permettent de déterminer si cette élongation correspond effectivement à celle d’une chaîne unique. N’ayant pas développé cet axe en routine, nous choisissons d’observer conjointement la distance de rupture à sa force. Nous précisons également que cette représentation est à l’origine du classement en distance dont nous avons fait usage.

La figure V.8 montre 4 exemples de cartographies réalisées sur la distribution force-distance des événements de rupture unique.

V.1.5 Discussion

En conclusion, les maxima F^* sont extraits à partir de la densité KDE superposée à leur représentation par histogramme (qui reste la représentation de référence en AFM-DFS). La distribution de ces maxima est contrôlée sur la cartographie force-distance, de sorte à valider l’attribution de la signature à un dépliement, et sa reproductibilité

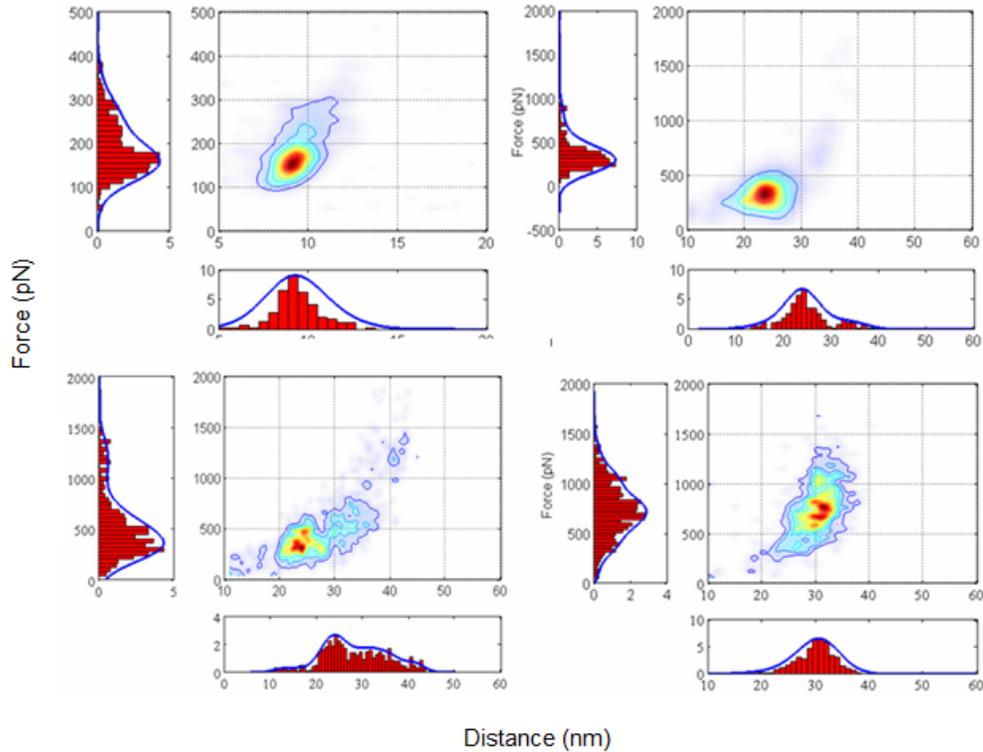


FIGURE V.8 – Cartographies force-distance réalisées sur 4 jeux de données pour l'interaction événement unique.

dans le jeu de donnée.

V.2 Traitement des courbes de conductance

La signature en conductance d'une jonction moléculaire est marquée par un plateau de courant constant. Parfois, la longueur du plateau (>0.1 nm) associée à une statistique favorable (1 courbe sur 2) suffisent à fournir un nombre de points suffisants pour contribuer dans un histogramme, ce qui dispense d'un traitement numérique de sélection. Nous avons constaté dans nos expériences que cette occurrence était faible, et la grande majorité des courbes ne présente aucun plateau. La nature des courbes et leur origine sera discutée dans la section résultats.

Pour le STM dédié aux mesures de contact atomique/moléculaire, un programme labview ainsi que son extension matlab développée lors de précédents travaux permettent

de sélectionner manuellement les courbes présentant des plateaux de conductance. L'histogramme est construit à partir de cette sélection. Pour les mesures en C-AFM, le logiciel Nanoscope ne dispose d'aucune routine intégrée. Un programme a donc été développé et est présenté dans ce qui suit.

V.2.1 Pré-traitement

Les fichiers bruts sont exprimés en volt, qui est le signal en sortie du convertisseur courant-tension, et sont convertis avec un facteur de sensibilité issu de l'amplificateur de courant.

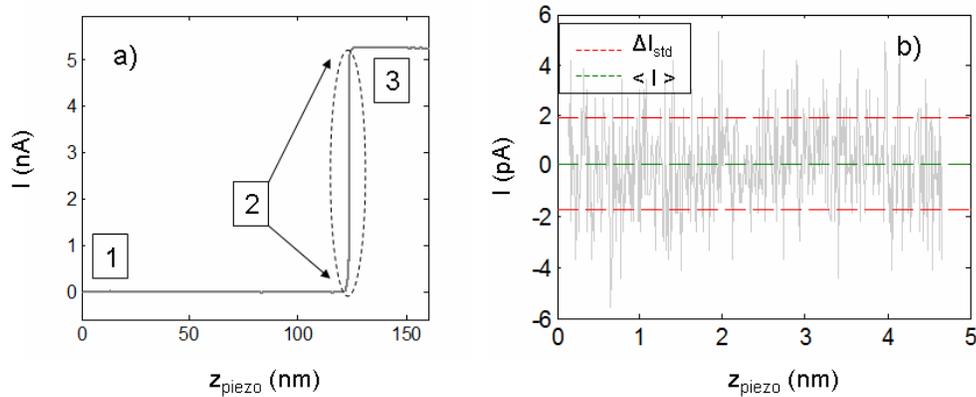


FIGURE V.9 – Courbe de conductance (a) et agrandissement de la zone 1 (b). La déviation standard est ici à 1.8 pA.

La courbe $I(z)$ peut se décomposer en 3 parties comme présenté sur la figure V.9. La première partie ne comporte que le bruit électronique qui a priori ne contribue pas dans les mêmes ordres de grandeur que les paliers. Si une contribution intervient, elle sera filtrée. La troisième partie correspond à la zone de saturation. Elle garantit l'établissement du contact mais n'est pas utile à l'exploitation. La seconde partie est la partie utile. Sur un échantillonnage à 10.000 points, elle est représentée quelques centaines de points. Les courbes présentent généralement un offset < 1 pA induit par l'amplificateur et corrigé par une moyenne sur les 100 premiers points de la courbe.

V.2.2 Filtrage

Plusieurs signaux parasites peuvent apparaître dans les mesures de courant et générer des artéfacts dans l’histogramme. Ces signaux peuvent provenir de l’extérieur ou être générés directement par la chaîne de mesure, peuvent être aléatoires (bruit blanc) ou présenter une périodicité. Des filtres en fréquence ou de techniques d’isolation sont généralement utilisés pour les éliminer. Le bruit à 50 Hz provenant des alimentations par exemple est réduit expérimentalement en isolant le système à l’aide d’une cage de Faraday. En C-AFM, les mesures en milieu non-conducteur se font avec une cellule liquide, dont les dimensions ont nécessité une modification de la cage. Les premières courbes que nous avons acquises avant cet ajout peuvent alors présenter une contribution à 50 Hz que nous avons filtré numériquement.

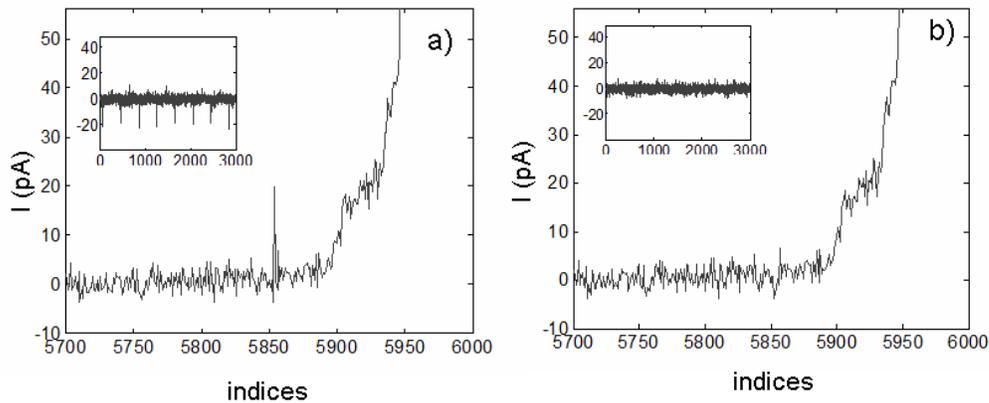


FIGURE V.10 – Exemple de courbe de conductance bruitée (a) et filtrée (b) sur jonction or-peptide-or en C-AFM. Lorsque l’ordre de grandeur des artéfacts contribue dans le palier, ce signal doit être filtré.

Les pics associés à ce bruit visible sur la figure V.10 sont périodiques, mais les indices auxquels il apparaissent dans le courbe peuvent différer de quelques unités d’un pic à l’autre, par conséquent un filtrage basé sur le motif de répétition ne peut pas être appliqué. Le bruit électronique STD est déterminé sur les 100 premiers points de la courbe. Sur une gamme d’amplification à 1 nA/V, ce bruit est de $\Delta I_{std} = 1.8$ pA. La portion du signal supérieure à $2\Delta I_{std}$ est évaluée. Lorsqu’une valeur d’intensité

I_n est séparée de plus d'un indice de la suivante I_{n+1} , c'est que le signal est discontinu sous ce seuil, et correspond au bruit. Une nouvelle valeur est attribuée : la moyenne des $n+1$ et $n-1$ indices encadrant I .

V.2.3 Reconstruction des plateaux

Pour qu'un plateau de conductance participe significativement dans l'histogramme, il faut qu'un nombre conséquent de points y contribuent et que sa dispersion soit minimale. Plusieurs facteurs peuvent élargir sa pondération dans l'histogramme : le bruit électronique, une contribution tunnel ou sa faible occurrence sur l'ensemble des courbes par exemple. Les fluctuations liées à un réarrangement atomique/moléculaire n'entrent pas cette catégorie puisqu'ils forment un mode de transport.

Un saut en conductance étant marqué par une discontinuité, une méthode similaire au traitement des courbes de force peut être appliquée. La variance glissante σ^2 , est déterminée sur l'ensemble de la courbe. Entre chaque maximum de σ^2 , la courbe est évaluée en fonction du nombre de points N_{test} et de leur dispersion. Deux seuils sont fixés : la distance minimale en nombre de points N_p contribuant au palier et la dispersion maximale tolérée en multiples du bruit électronique $N_b * \Delta I_{std}$. Trois cas de figure se présentent :

1. la déviation du palier est supérieure au seuil de bruit fixé
 $\Delta I_{std,test} > N_b * \Delta I_{std}$: le palier est ignoré,
2. la longueur du palier est supérieure au seuil utilisateur $N_{test} \geq N_p$ et la condition $\Delta I_{std,test} < N_b * \Delta I_{std}$ est réalisée : un palier est effectivement présent, et peut être reconstruit,
3. la longueur du palier est inférieure au seuil utilisateur $N_{test} < N_p$ mais la condition $\Delta I_{std,test} < N_b * \Delta I_{std}$ est toujours réalisée : le palier est soit inexistant, soit présent mais une discontinuité imputable à un réarrangement ou au bruit a contribué dans la variance, il doit alors être évalué.

Cette évaluation se fait sur la distance. Tant que $\Delta I_{std,test} < N_b * \Delta I_{std}$, le nombre de points dans le palier N_{test} est augmenté. Dès que $\Delta I_{std,test} > N_b * \Delta I_{std}$, l'itération

est arrêtée et la longueur du palier est à nouveau évaluée :

1. si $N_{test} \geq N_p$, alors le palier est reconstruit
2. si $N_{test} < N_p$, il est ignoré.

La figure V.11 présente quelques exemples de courbes de conductance reconstruites en fixant N_p à 50 points ($\approx 0.2-1$ nm selon l'échantillonnage de la courbe) et $N_b = 20$ (40 pA de déviation STD tolérée).

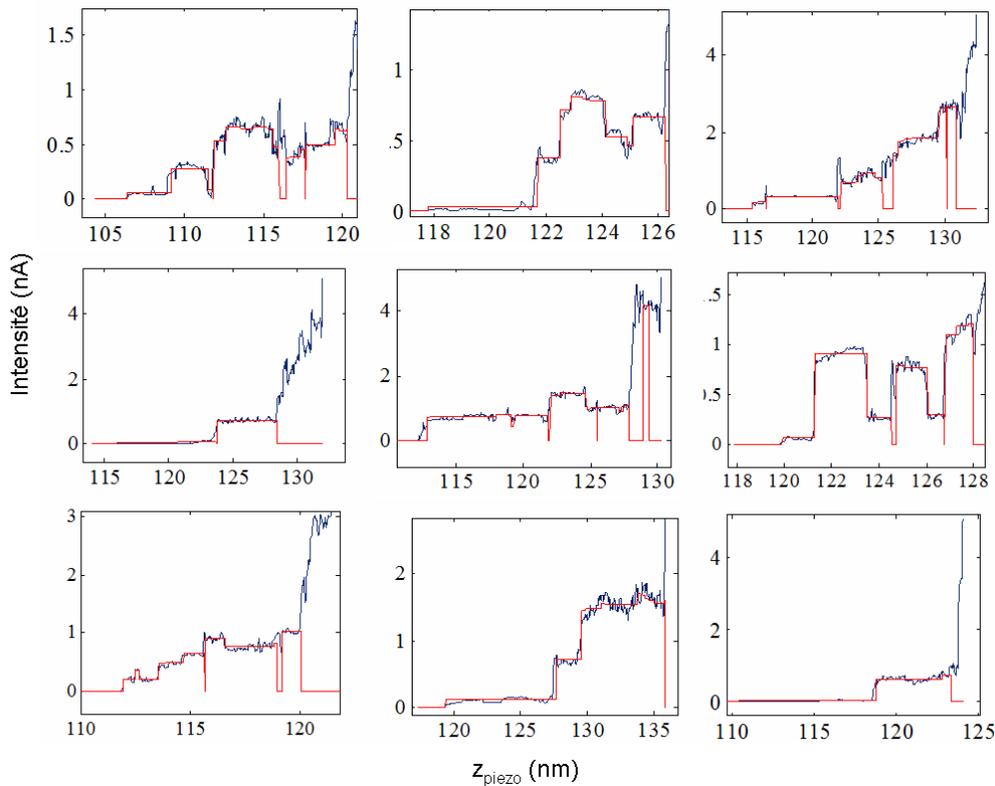


FIGURE V.11 – Exemple de courbes de conductance obtenues sur jonction or-peptide-or à $V_{bias} = 0.1$ V. La courbe en bleu représente les données brutes, la courbe rouge sa reconstruction en paliers.

Les courbes reconstruites (rouge) montrent que localement, le signal peut être forcé à zéro lorsque la partie de la courbe n'est pas suffisamment définie pour extrapoler un palier. Dans les portions reconstruites, le signal est donné par l'intensité moyenne entre les bornes. La figure V.12 montre l'application de cette routine sur un jeu de données comprenant 11 746 courbes de conductances non triées et réalisées sur jonction molé-

culaire or-1,8 octanedithiol-or. Les histogrammes en rouge correspondent aux données brutes, et sont donnés pour deux valeurs de classe : 20 pA a) et 230 pA b). Sans reconstruction, aucune contribution n'est visible. Les histogrammes réalisés sur courbes reconstruites en revanche montrent une contribution à 4 nA, ce qui à une tension de 92 mV correspond à 43.4 nS, soit $5.6 \times 10^{-4} G_0$, ce qui correspond à la conductance de deux molécules d'ODT.

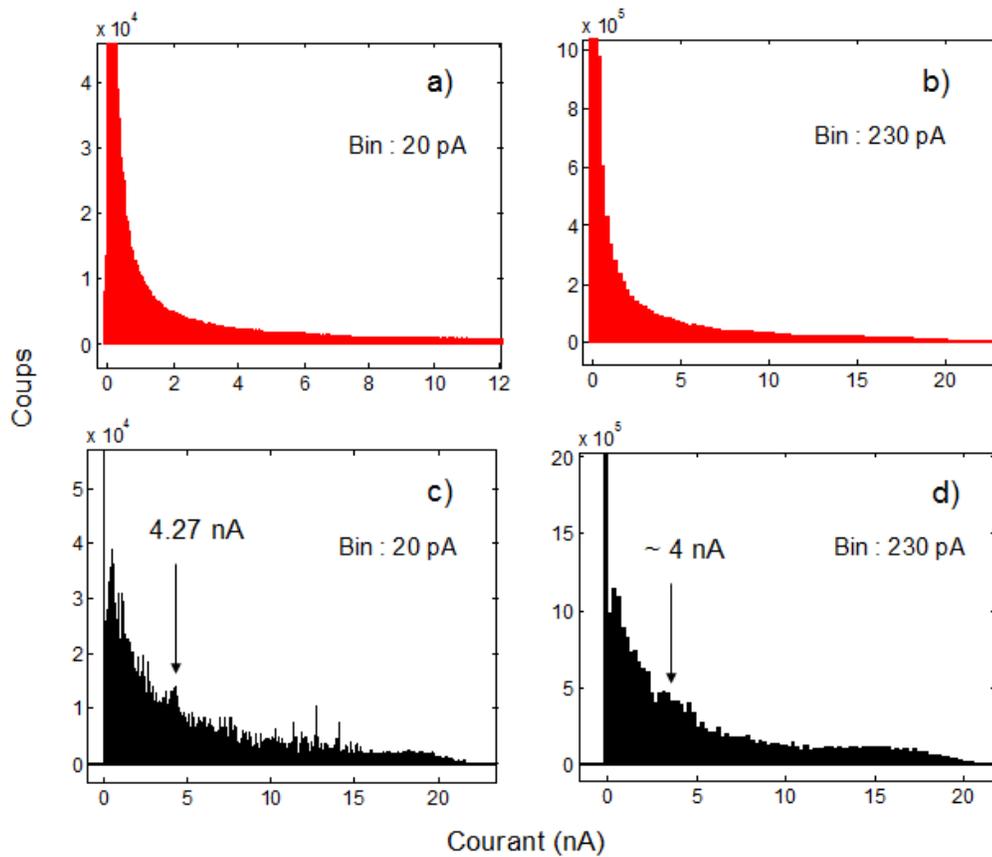


FIGURE V.12 – Histogrammes sans sélection sur jonction or-1,8 octanedithiol-or pour deux valeurs de classes (bin) et 11 746 courbes. Les histogrammes en rouge a), b) sont construits à partir des données brutes, en noirs c), d) à partir des paliers reconstruits.

Chapitre VI

Caractérisation mécanique de l'interaction Peptide/Or

Au cours de ce chapitre seront exposés les résultats en spectroscopie de force caractérisant l'interaction peptide/or, ainsi que les contrôles qui nous ont permis d'attribuer les signatures à notre système. La majorité de ces expériences ont été conduites dans un milieu tamponné au PBS (*phosphate buffered saline*) où la conformation est majoritairement en enroulement aléatoire. Une caractérisation complémentaire est donc également présentée en milieu promoteur d'hélice α . Les forces de ruptures sont extraites à partir d'une routine développée sous Matlab faisant l'objet du chapitre 5. Les critères du classement en interaction spécifique/non-spécifique sont discutés plus en détail dans la section suivante. La comparaison des forces extraites avec les expériences de contrôle permet de valider la spécificité de l'interaction. La comparaison de ces mêmes valeurs avec celles rapportées dans la littérature permet leur attribution aux groupements amines et thiol du peptide. Ces expériences ayant été conduites à plusieurs vitesses de charge, une correspondance avec des modèles dynamiques (Bell-Evans et Friddle-De Yoreo) pourra également être testée à la fois sur notre système, et sur un système ligand/récepteur de référence (biotine/streptavine) Nous discuterons de la pertinence de l'application de ces modèles à notre système. Enfin, une dernière section sera consacrée à la caractérisation de l'élongation, et la mise en place d'une méthode limitant les biais d'estimation lors de l'ajustement de l'agent de couplage.

VI.1 Un problème de représentation

VI.1.1 Représentation par histogramme

La caractérisation d'une interaction n'a de sens qu'après étude de l'influence de la vitesse de charge. L'obtention du spectre de force étant conditionnée par l'extraction du mode d'interaction le plus probable, l'estimation de la force au maximum de probabilité F^* est requise. La représentation par histogramme permet cette estimation. Sur la figure VI.1 (a) et (c), nous donnons quelques exemples de réponses en force à partir desquels les histogrammes en (b) et (d) sont construits.

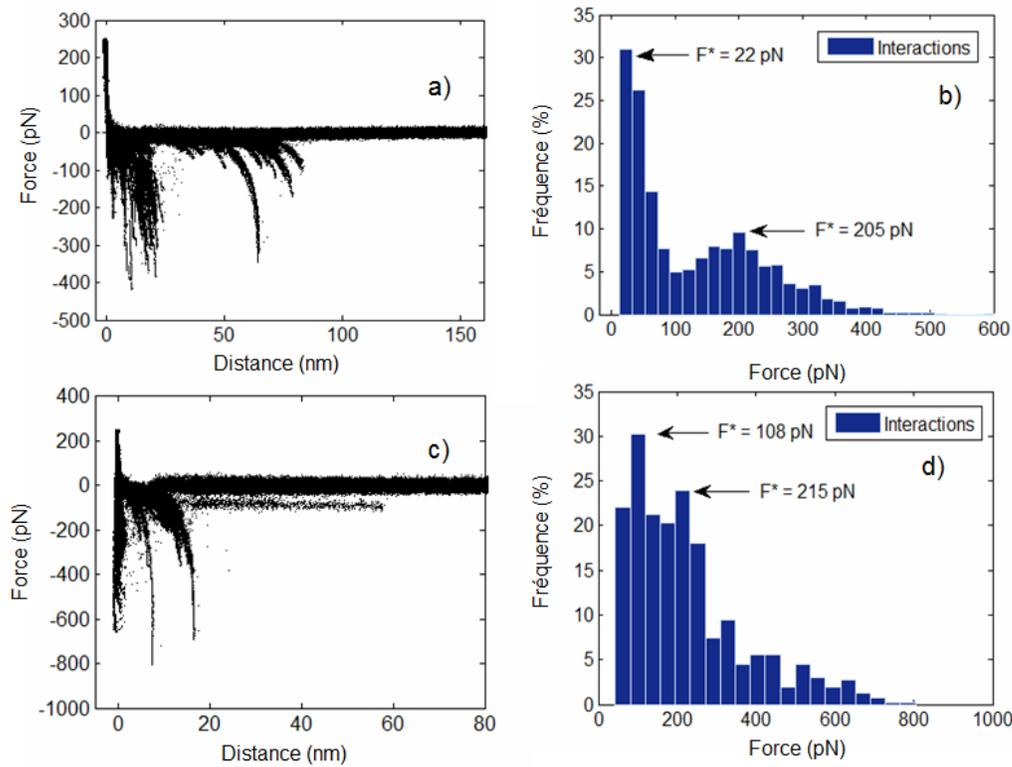


FIGURE VI.1 – Événements sans tri : exemples de courbe de force (a),(c) et histogrammes associés (b),(d). Sur l'histogramme (b), la dé-corrélation des événements d'adhésion et de rupture est facilitée par la bi-modalité de la distribution. Sur l'histogramme (d), le chevauchement des contributions ne permet pas de séparer les distributions en catégorie d'événements.

Nous observons que dans les deux cas, l'histogramme présente une première contribution F^* repoussée vers les faibles interactions. Si aucune condition n'est fixée, ce

pic apparaît toujours comme majoritaire. Sa valeur ne permet pas de le relier à une interaction chimique de type covalente ou donneur-accepteur, mais à des événements adhésifs. Dans l'histogramme présenté sur la figure VI.1 (b), ce premier pic intervient à 22 pN. Un second pic intervenant à 205 pN semble corrélable à une interaction peptide/or. Néanmoins cette interprétation n'est permise que par le caractère bi-modal de la distribution. Dans l'histogramme présenté à la figure VI.1 (d), nous voyons que la plage de forces que couvrent les interactions rend difficile l'interprétation de la distribution sans informations supplémentaires. Les courbes de force associées montrent pourtant des contributions à force plus élevée avec élongation mais écrantées par des contributions adhésives dont l'histogramme révèle la forte dispersion.

VI.1.2 Représentation en cartographie Force-Distance

Le critère de force la plus probable dépend en réalité de l'ensemble dans lequel il est prélevé. En reprenant l'histogramme VI.1 (d) couplé à la distance de rupture présenté sur la figure VI.2, nous remarquons que de nouvelles distributions apparaissent et dépendent de l'intervalle en distance dans lequel elles sont prélevées.

En effectuant un découpage des forces tenant compte de critères sur le nombre d'interactions et la distance à laquelle elles interviennent, il devient possible d'extraire une force d'interaction reproductible d'un jeu de données à l'autre, et potentiellement attribuable au peptide.

VI.1.3 Évaluation du seuil de discrimination spécifique/non-spécifique

L'attribution d'une force d'interaction au peptide se fera suivant une distinction entre les événements spécifiques et les événements non-spécifiques. L'événement non-spécifique comprend l'ensemble des interactions qui ne peuvent être attribuées à une interaction cible et donc connue. Il s'agit d'un terme emprunté aux expériences de spectroscopie de force dans les systèmes ligand-récepteur où une distinction devait être faite entre les interactions correspondant à une reconnaissance des deux fragments, des interactions où cette reconnaissance n'avait pas eu lieu (fragment non accessible ou bloqué, interaction avec le substrat ou un contaminant). Dans notre cas, la non-spécificité fait référence aux interactions non marquées par la présence d'un dépliement

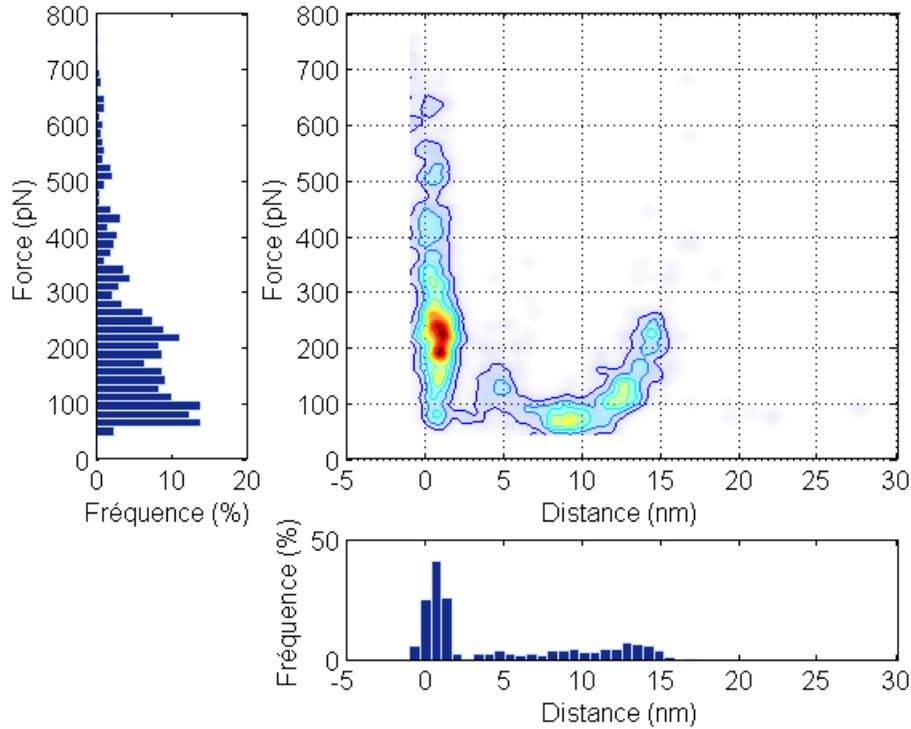


FIGURE VI.2 – Cartographie force-distance associé à l'histogramme figure VI.1 (d), et histogrammes projetés. La cartographie révèle que la dispersion apparente est liée aux événements adhésifs inférieurs à 5 nm.

du linker PEG. Cette distinction permet l'exclusion d'événements sur deux critères : une force et une distance minimale d'interaction. Le critère sur la force minimale dépend directement du bruit d'oscillation libre. Il est fixé à $f_{min} = N\Delta_{std}f_b$ pN, où $\Delta_{std}f_b$ est la largeur à mi-hauteur du bruit mesurée à chaque cycle, et N correspond à un entier, pris généralement à 5. Les valeurs obtenues pour f_{min} sont de l'ordre de la dizaine de pN. Le seuil de discrimination en distance en revanche nécessite une évaluation.

La figure VI.3 présente l'évolution des distributions de probabilité et l'impact sur l'évaluation de F^* à mesure que ce seuil, noté z_s , est augmenté. La zone grisée correspond à la plage de seuil (2-5 nm) généralement utilisée. A cette distance, nous estimons qu'une majorité des interactions adhésives non-spécifiques est exclue, sans néanmoins écranter artificiellement un trop grand nombre d'interactions multiples. Dans l'exemple l'estimation de F^* sur ruptures uniques ainsi que sur le dernier pic est insensible sur

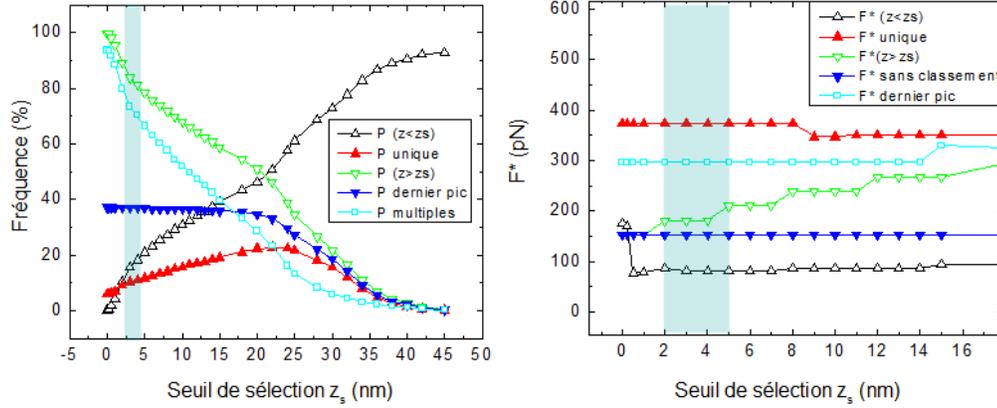


FIGURE VI.3 – Estimation de la probabilité P et de F^* en fonction du seuil de sélection z_s et influence de ce seuil sur le tri des événements. La zone grisée correspond au seuil fixé dans la majorité des expériences.

de larges distances, et seules les ruptures multiples (comprises dans $F^*(z > z_s)$) sont affectées. Nous observons qu'également, les pourcentages obtenus pour les interactions uniques sont cohérents avec la statistique obtenue dans la littérature pour ce type d'expérience ($\approx 10\%$, [24]). Ces longueurs sont de plus corrélables aux dimensions du linker. Afin d'automatiser l'extraction de F^* , nous choisissons de tirer partie des couples force-distance en classant les événements de rupture comme suit :

Spécifique	$z > [2-5] \text{ nm} , f > 5x\Delta_{std}f_n \text{ pN}$
Non-spécifique	$z < [2-5] \text{ nm} , f > 5x\Delta_{std}f_n \text{ pN}$
Non-attribuable	$f < 5x\Delta_{std}f_n \text{ pN}$

La figure VI.4 présente une application de ce découpage. Lorsque toutes les interactions sont considérées, les contributions proviennent majoritairement d'interactions proche de la surface, à une distance inférieure à 5 nm qui ne permet pas de confirmer la présence du linker ou de son dépliement. Leur distribution présentée sur a) donne une force de 190 pN à 0.6 nm. Sur b) et d) figurent les ruptures uniques et le dernier pic attribuables aux signatures en molécule unique. Leur maximum à F^* à 155 pN se situe à une élongation de 9 nm sur les deux cartographies, ce qui confirme l'attribution de l'interaction à la molécule. Le filtre en distance, ici fixé à 2 nm se révèle efficace dans l'automatisation de l'extraction de F^* et devrait permettre sur les jeux de données plus

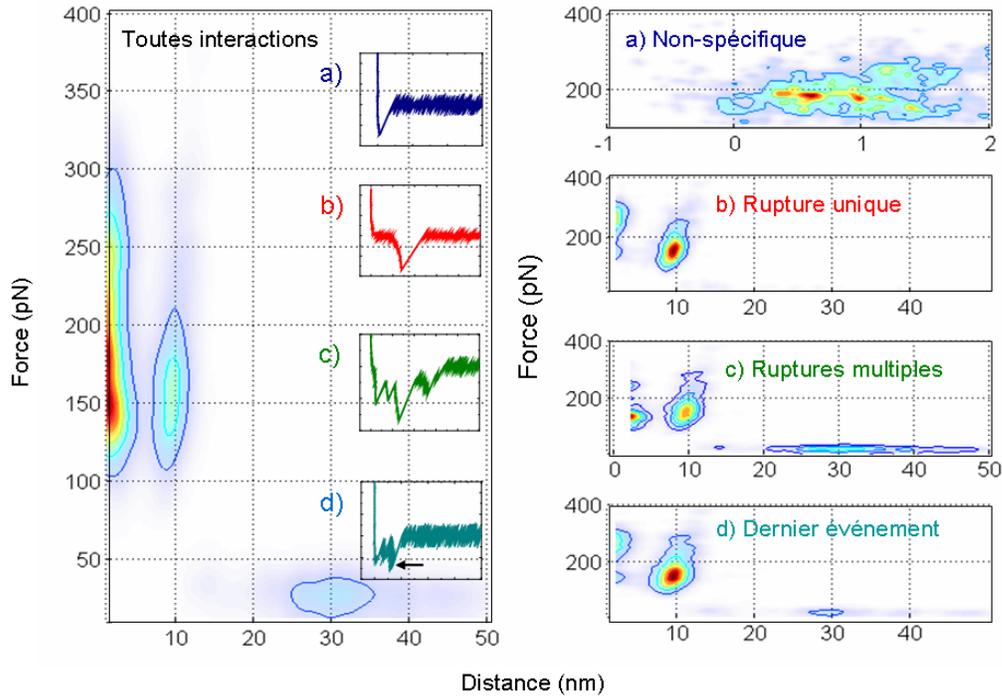


FIGURE VI.4 – Cartographies force-distance associée à l'histogramme figure VI.1-a), et contribution la plus probable dans a) l'ensemble des interactions adhésives (sans déplie-ment), b) l'ensemble des interactions uniques, c) l'ensemble des interactions multiples, d) l'ensemble des dernières interactions de chaque courbe.

critique comme ceux présentés figure VI.2 de sélectionner F^* dans le bon ensemble. Nous proposons d'utiliser cette distance d'interaction, couplée au seuil en force apparaissant comme 5 fois la contribution du bruit d'oscillation libre f_n , pour discriminer interactions spécifiques et non-spécifiques. Dans les interprétations qui suivent, chacune des distributions sera estimée par un histogramme superposé à son estimation par la méthode des noyaux. Une représentation alternative dans l'ensemble force-distance sera proposée.

VI.2 Forces de rupture

VI.2.1 Caractérisation des forces de rupture en milieu tamponné

Le tampon phosphate a été choisi comme milieu à la fois pour le stockage des pointes et comme milieu d'étude pour ses propriétés de maintien du pH à 7.4, limitant une dégradation de la fonctionnalisation. Deux types de pointes commerciales multi-levier ont été utilisées, et préparées selon le protocole décrit au chapitre 4 (modèles DNP-10 et MSCT, Bruker). Les histogrammes et cartographies présentés ici sont issues d'une même série d'expérience réalisée à une vitesse de charge de 1000 nm/s sur pointe MSCT de levier $k = 0.016$ N/m pour une statistique de 1159 courbes. Les courbes de force présentées en exemple proviennent de plusieurs jeux de données, de sorte à représenter la diversité de réponses. Pour chaque série d'expérience, les courbes sont acquises à vitesse de charge v_s , force d'appui maximale F_{max} , taille de rampe D_s , et temps de latence à la surface τ_s fixes. Les plages de ces paramètres couvrent : $v_s = [30 - 2060]$ nm/s, $F_{max} = [500 - 1 \times 10^3]$ pN, $D_s = [100 - 500]$ nm et $\tau_s = [0 - 500]$ ms. Seules les positions en x et y à la surface sont variées à chaque acquisition, de sorte à :

1. obtenir une distribution qui ne dépende pas uniquement du degré de coordination des atomes d'or en surface,
2. éviter les erreurs d'estimation de la force de rupture qui pourraient être liés à une contamination locale de la surface.

La distance entre deux points successifs est fixée à 10 nm, réalisant ainsi un pavage de 100x100 nm à 1x1 μ m. La calibration en constante de raideur des pointes précède l'acquisition des courbes. Lorsque la calibration n'est pas garantie, comme ce peut être le cas pour les leviers souples dont les fréquences propres décalées en milieu liquide sont à la limite de détection du logiciel de calibration, une post-calibration est effectuée à l'air.

Lors de ces expériences, un large panel de forces, d'élongation, de nombre d'événements par courbe a été observé, dont la figure VI.5 présente un échantillon non exhaustif. Dans cet exemple, nous distinguons quatre types de signatures caractéristiques.

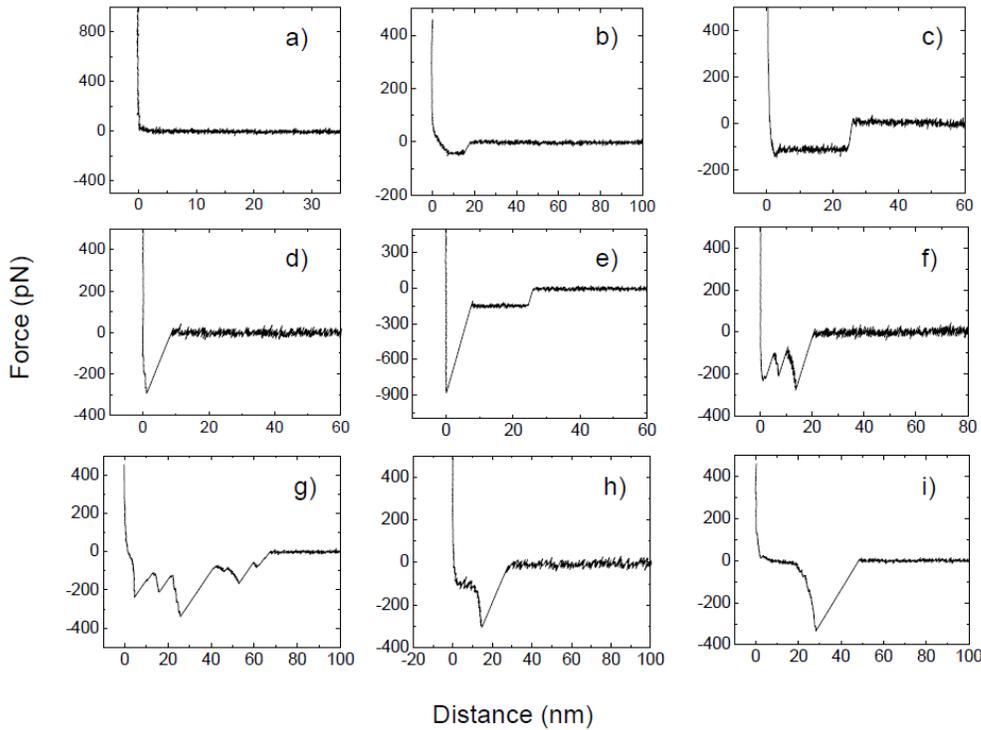


FIGURE VI.5 – Réponses en force obtenues sur le système linker(PEG)-peptide/or issus de multiples jeux de données comprenant a) aucune interaction, b) un événement adhésif, c) un événement adhésif de type plateau, d) un événement adhésif non-spécifique, e) une combinaison d'événements adhésif et plateau, f-g) des événements de rupture multiples, h-i) des événements de rupture unique.

La première catégorie VI.5-a) ne comporte aucune interaction. Il s'agit d'une contribution majoritaire sur certains jeux de données, garantissant la qualité de la fonctionnalisation. La seconde catégorie VI.5-b),c),e) regroupe des événements adhésifs attribuables à la fonctionnalisation. Ces courbes ne s'accompagnent pas d'une élongation du linker PEG, mais d'un plateau de force constante de longueur variable, attribuable à la désorption de l'ensemble PEG-peptide. Ces événements ont rarement été observés en présence de pics de rupture pour une même pointe, et constituent un mode d'interaction propre à une fonctionnalisation donnée. Bien qu'observés dans la littérature, ces événements ne seront ici pas exploités. La troisième catégorie VI.5-d),e) comprend les événements adhésifs qui se distinguent par une interaction marquée à faible distance (saut immédiat en dehors du contact du substrat) à des forces très va-

riables. Bien souvent, ils se composent d'interactions Van der Waals et hydrogènes et dépendent fortement de l'aire en contact avec le substrat ainsi que de sa rugosité. Car ils sont rencontrés dans une grande variété de systèmes, ils ne peuvent pas être corrélés à la fonctionnalisation. La quatrième catégorie d'événements VI.5-f-i) rassemble les événements de type rupture. Ils présentent une signature d'élongation caractéristique qui permet de relier leur signature à la présence du linker, et ne comprennent pas de plateau de désorption. Le peptide sur lequel nous travaillons n'est pas composé de modules, et est de faible dimensions ($<4\text{nm}$). Une distinction sera donc faite entre les élongations multiples signe de l'interaction de multiples molécules VI.5-f),g), et les interactions en molécule unique VI.5-h),i). Il apparaît également qu'un pic d'adhésion puisse intervenir avant les ruptures, que le tri en distance permettra d'éliminer.

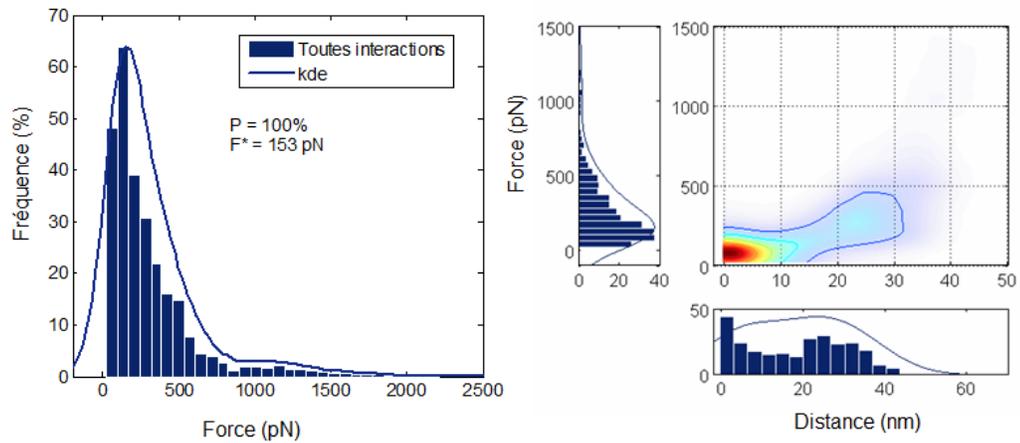


FIGURE VI.6 – Interactions sans tri : distribution et cartographie associée de l'ensemble des interactions. La force la plus probable F^* est estimée à partir du maximum de la densité kde. Le pourcentage étant calculé à partir du nombre d'événements décomptés et rapporté au prorata de toutes les interactions, il est ici à 100%.

La figure VI.6 présente l'ensemble des interactions. La différence apparente de distribution des histogrammes de force s'explique par une différence de largeur de classe (109.42 pN et 43.7 pN), illustrant ici la nécessité d'une seconde estimation indépendante de ce facteur. La force F^* estimée à partir de la densité de noyaux (kde) est de 153 pN. Sur la cartographie, nous observons que cette distribution présente des maxima locaux, écrantés en grande partie par des contributions à plus faible force.

Interactions non spécifiques

Nous observons sur la distribution figure VI.7 (c) que les événements non spécifiques représentent près de 24% des événements. Ce chiffre est calculé au prorata de l'ensemble des événements détectés ($P = 100\%$ pour toutes les interactions), et peut se traduire comme : un quart des interactions ont lieu à une distance qui ne permet pas de les distinguer des interactions non-spécifiques. Ce pourcentage, pouvant varier de moins de 1% jusqu'à plus de 83%, dépend de la qualité de la fonctionnalisation, mais est également directement, comme expliqué précédemment, modulé par le seuil en distance de tri.

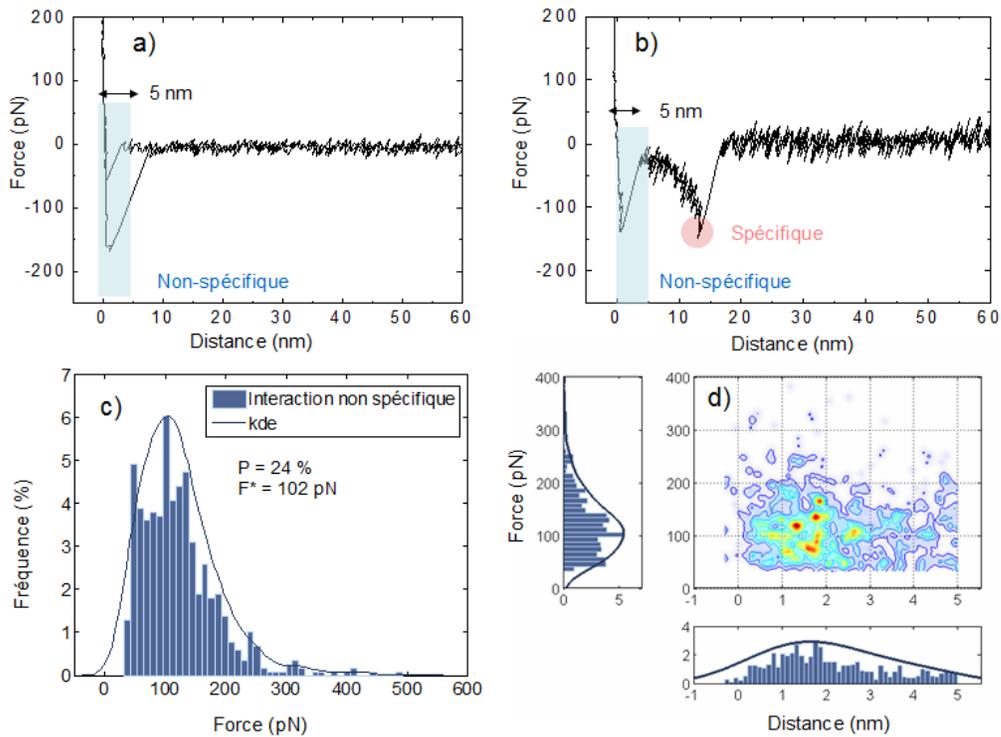


FIGURE VI.7 – Interactions non-spécifiques : les courbes de forces présentent des événements de type adhésif (a), et une combinaison d'adhésion/rupture discriminé par le seuil en distance (b).

La cartographie figure VI.7 (d) révèle que les distances correspondantes se situent majoritairement dans la fourchette 1-3 nm. Si ces interactions ne comportaient que des événements de type adhésion avec saut immédiat en dehors du contact, nous devrions

en toute rigueur observer un étalement des forces sur l'axe 0 nm. Ce n'est pas le cas pour deux raisons. La première est que certains événements adhésifs présentent un plateau de quelques nm suffisant à étaler la rupture sur la gamme 0-5 nm. La seconde est que le facteur de sensibilité à une calibration de pointe donnée n'est réellement fidèle au réglage utilisateur qu'en condition de contact pointe-plan dur. Or, cette condition n'est remplie qu'à haut régime de déflexion, donc dans des régimes de force susceptibles de dégrader la fonctionnalisation. Nous avons donc une première incertitude sur ce facteur de sensibilité à laquelle s'ajoutent des fluctuations intervenant en cours d'expérience. Si le programme corrige l'offset en distance des courbes, il ne ré-ajuste pas cette calibration pour maintenir une force d'appui normale. Notons que ces fluctuations restent néanmoins négligeables, et que le seuil en distance permet ici de les éliminer.

Interactions spécifiques

La figure VI.8 comprend l'ensemble des événements spécifiques, événements multiples et uniques inclus.

Si le cas des ruptures uniques peut, mais pas exclusivement, représenter une faible proportion des courbes obtenues, de l'ordre de 5-10% sur F^* dépendant du nombre de classes choisies pour l'histogramme allant jusqu'à 20% de la totalité des interactions, les interactions multiples comptent généralement pour la majorité des événements. La cartographie comparée à celle obtenue pour l'ensemble des interactions le confirme également. Ces ruptures multiples présentées sur les courbes de force figure VI.8a)-c) s'expliquent par la présence de multiples groupements accessibles en fin de fonctionnalisation. L'interprétation de ces contributions requiert une certaine prudence. Le système que nous sondons est assimilable à un système à trois ressorts couplés en série ayant leur propre constante de raideur : celle du levier, celle du linker, et celle du peptide. La force exercée sur le linker est donc la même qui s'exerce sur le peptide qui est la même qui s'exerce sur le groupement lié à la surface. En rupture unique, la force exercée au décrochage correspond bien à la force de rupture de la liaison peptide-or. Lorsque plusieurs molécules sont sondées quasi-simultanément, comme l'illustre la courbe de force VI.8a), le système devient assimilable à N ressorts en parallèle couplés en série avec le levier. La force exercée sur chaque ressort couplé linker et peptide, et donc sur

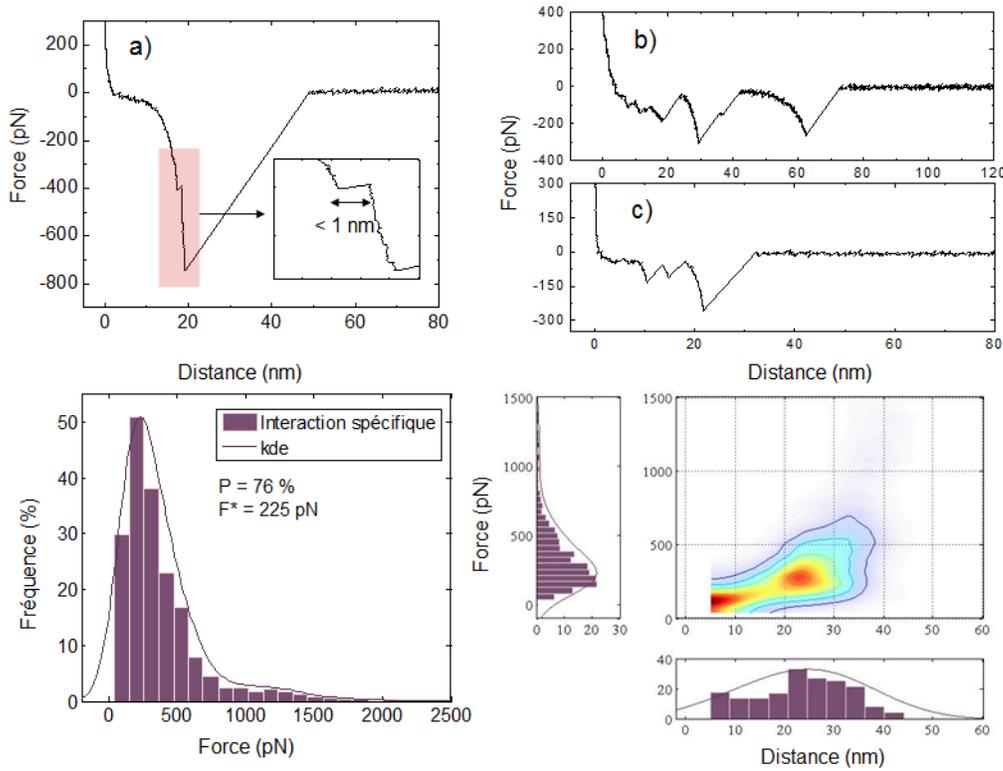


FIGURE VI.8 – Interactions spécifiques : les courbes de forces illustrent des ruptures multiples incluses dans cette catégorie dans le cas où les ruptures sont attribuables à plusieurs molécules avec b) et sans adhésion au contact c) et le cas où cette distinction n'est pas possible a).

chaque groupement, est donc en théorie divisée par leur nombre, menant à une force de rupture apparente N fois supérieure à la force de rupture d'un seul groupement lorsque ces ruptures ont lieu simultanément. Le classement dans les événements multiples ne fait pas de distinction entre les ruptures issues d'élongations différentes et provenant de deux molécules simultanément sondées de celles séparées de quelques nm comme illustré sur a) et provenant hypothétiquement de deux groupements issus d'une même molécule. Notons qu'un traitement par ajustement des courbes d'élongation pourrait permettre cette distinction. En pratique, les ruptures simultanées sont assez rares et il est probable que dans notre cas ces événements comprennent une combinaison de ruptures incluant des interactions adhésives avec la surface, comme le révèle la cartographie où elles interviennent à des distances < 10 nm. La force la plus probable dans

cet exemple se situe à 225 pN, une valeur nous le verrons nettement inférieure à celle obtenue en molécule unique.

Événement unique et dernière interaction

Les ruptures uniques et la dernière interaction sont les seuls événements attribuables à une force d'interaction en molécule unique et sont traités séparément. La figure VI.9 présente un set de ruptures uniques divisées en catégories, fonction de l'ordre de grandeur dans lequel elles interviennent. Nous observons que les distances de ruptures sont supérieures à la somme de la longueur de contour du linker (6.8 nm) et de celle du peptide (4.02 nm). Cette distance n'est pas directement corrélable aux dimensions caractéristiques des molécules que nous utilisons, à moins de supposer qu'un effet de polymérisation soit intervenu au niveau des chaînes PEG. Il s'agit d'une hypothèse confirmée par le fournisseur de nos linkers (H. Grüber). Sur les courbes a), l'interaction est de type adhésive spécifique, attribuable à un étirement de PEG. Les courbes b) ne présentent pas d'élongation mais l'unicité du pic au delà du seuil de discrimination en distance les place également dans les événements uniques. Ces deux catégories d'interactions interviennent à un ordre de grandeur qui ne permet pas de les attribuer à une rupture chimique. Les courbes c) et d) interviennent à des forces de rupture se situant au delà de 300 pN, dans un ordre de grandeur qui les discrimine des interactions de type van der Waals (de l'ordre de plusieurs dizaines de pN), et les place dans la catégorie des interactions de type covalente ou donneur-accepteur (de l'ordre de plusieurs centaines de pN jusqu'au nN).

Les distributions figure VI.10 reproduisent tant sur l'histogramme que sur l'estimation par noyaux une bi-modalité observée sur interactions supérieures à 100 pN dans plusieurs jeux de données. Comme expliqué précédemment, les multi-modalités de distribution peuvent provenir d'une rupture simultanée de plusieurs molécules en parallèles, voire de groupements identiques en parallèle sur la même molécule. Dans notre cas, le premier pic F^* en rupture unique se situe à 380 pN, le second à 1200 pN, ce qui supposerait trois ruptures simultanées. Il s'agit d'une configuration hautement improbable. De plus, si le maximum à 380 pN est corrélable à des distances inférieures à 30 nm, les contributions supérieures à 1 nN interviennent à des distances nettement

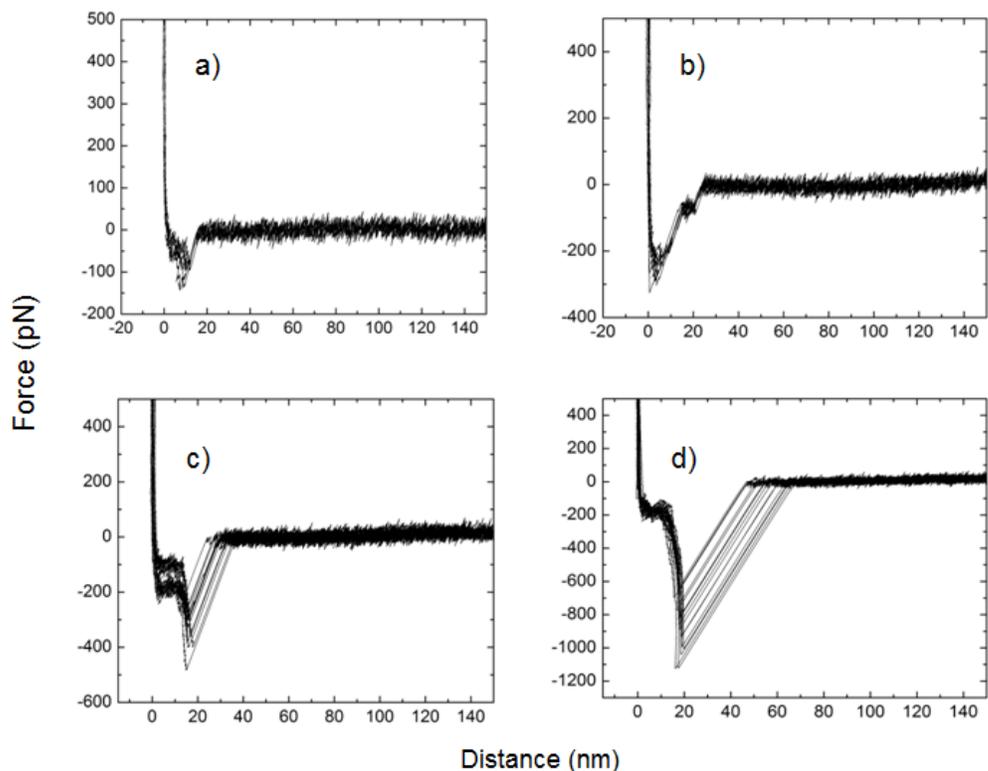


FIGURE VI.9 – Ruptures uniques : courbes de force illustrant les cas où a)-b) les interactions sont de type adhésive et mettent en jeu une combinaison d'interaction Van der Waals et hydrogènes, et c)-d) lorsque l'ordre de grandeur des ruptures ne permet plus de les associer aux interactions adhésives.

supérieures, jusqu'à plus de 40 nm, ce qui écarte la probabilité que l'interaction provienne de ruptures parallèles simultanées. Les événements en rupture unique, et ceux en dernière interaction présentent un écart de ≈ 70 pN sur F^* . La cartographie des dernières interactions révèle que l'origine de ce déplacement est liée à une dispersion des valeurs sur deux maxima : 225 pN - 360 pN, soient sensiblement les valeurs obtenues pour les interactions multiples et uniques. Le traitement du dernier pic n'apporte donc aucune information supplémentaire et ne nécessite pas une prise en compte à part.

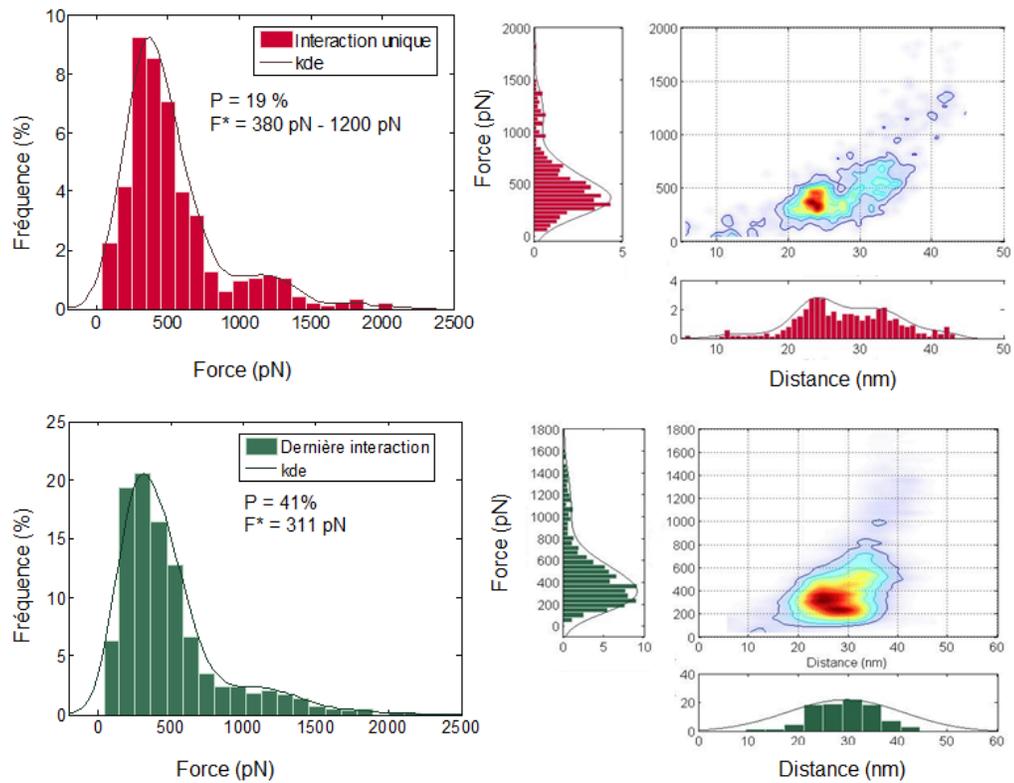


FIGURE VI.10 – Rupture unique et dernier événement : distribution et cartographie associée.

VI.2.2 Discussion

Nous avons présenté l'application d'un traitement complet sur un jeu de données où une bi-modalité a pu être observée, incluant des événements à des forces de ruptures élevées ($> 1\text{nN}$) qui se distinguent nettement dans les distributions, et qui peuvent probablement être corrélables à l'interaction thiol/or. Cependant, il s'agit d'une signature qui sur l'ensemble de nos résultats reste marginale. En effet, nous avons constaté que sur la majorité des interactions, un pourcentage très faible contribue à des forces supérieures à 500 pN, souvent d'ailleurs en début d'expérience, et ne permet pas l'estimation d'une contribution $F^* > 1\text{nN}$. La figure VI.11 regroupe l'ensemble des résultats obtenus dans le PBS sur 37 jeux de données.

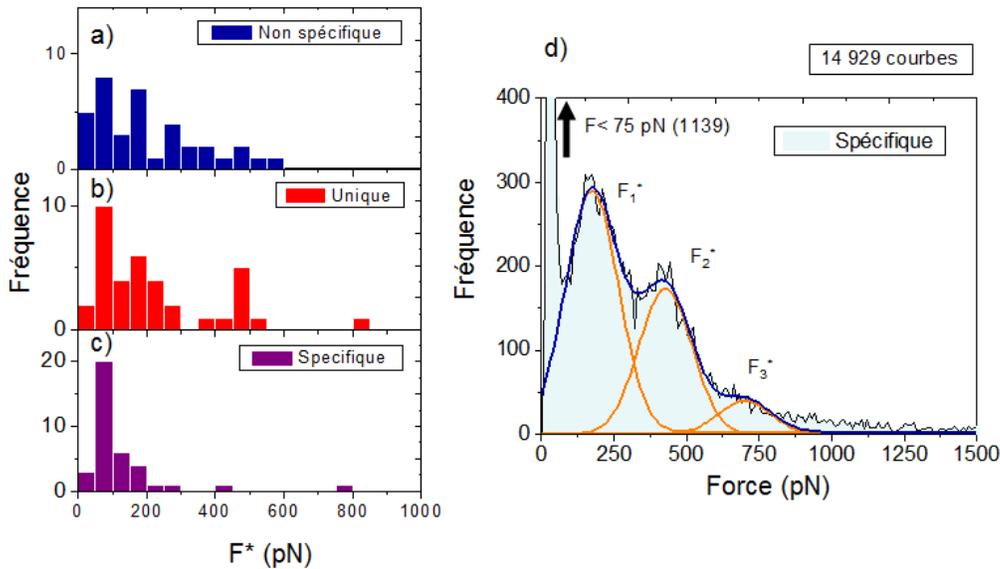


FIGURE VI.11 – Histogramme des forces de rupture F^* pour les interactions non-spécifiques (a), uniques (b) et spécifiques (c) réalisé sur 37 jeux de données, et (d) histogramme réalisé sur l'ensemble des forces de ruptures spécifiques pour ces jeux, totalisant 14929 courbes.

La distribution des ruptures uniques F^* sur (b) indique trois maximum à 75 pN, 175 pN et 475 pN. Sur les ruptures spécifiques en (c), la contribution à 75 pN est majoritaire. Sur la figure VI.11 (d), l'ensemble des interactions spécifiques sont représentées. Nous observons que cette signature $F < 75\text{ pN}$ est majoritaire, et constitue le premier mode d'interaction de l'ensemble linker(PEG)-Peptide. Compte tenu de sa valeur, nous

l'attribuons aux interactions non-covalentes. Les contrôles qui feront l'objet de la section suivante nous permettront de déterminer si cette signature peut être attribuée à l'agent de couplage sans le peptide. Nous observons également la contribution de trois pics, mis en évidence par l'ajustement. Leurs valeurs se situent à 177.6 pN, 431.03 pN et 704.8 pN pour une largeur FWHM de 129 pN prise égale dans les trois ajustements. Sur cette base et à l'aide de l'étude bibliographique, nous proposons l'attribution aux groupements amines les interactions :

1. $F_{1*} = 178 \text{ pN} \pm 65 \text{ pN}$

2. $F_{2*} = 431 \text{ pN} \pm 65 \text{ pN}$

3. $F_{3*} = 705 \text{ pN} \pm 65 \text{ pN}$

La signature attribuable aux groupements thiols a été observée à $1.17 \text{ nN} \pm 0.2 \text{ nN}$, mais son poids statistique ne permet pas de la considérer comme représentative. Cette attribution et l'influence de la structure sur ces valeurs est confrontée aux expériences de contrôle dans les section suivantes.

VI.2.3 Caractérisation des forces de rupture en milieu promoteur d'hélice α

Ces expériences ont été conduites dans une solution aqueuse à 20 % v/v de trifluoroéthanol (TFE), agent promoteur d'hélice α . D'après les spectres réalisés en dichroïsme circulaire et présentés dans le chapitre 4, la structure de notre peptide en milieu tamponné par le PBS est majoritairement en enroulement aléatoire. Nous nous plaçons ici dans des conditions où cette structure sera α héliodoidale. Les leviers fonctionnalisés sont stockés dans une solution de PBS. Avant utilisation, ils sont donc préalablement rincés dans deux bains d'eau milliQ pendant quelques minutes. Le troisième bain contient la solution de 20% H₂O/TFE (v/v), qui sera également leur milieu de travail une fois les leviers montés sur la cellule liquide. A chaque changement de milieu de travail, cette étape de rinçage est répétée.

Dans l'expérience représentée sur la cartographie VI.12, le même levier a été utilisé pour caractériser les interactions en milieu tamponné et en solution aqueuse de TFE,

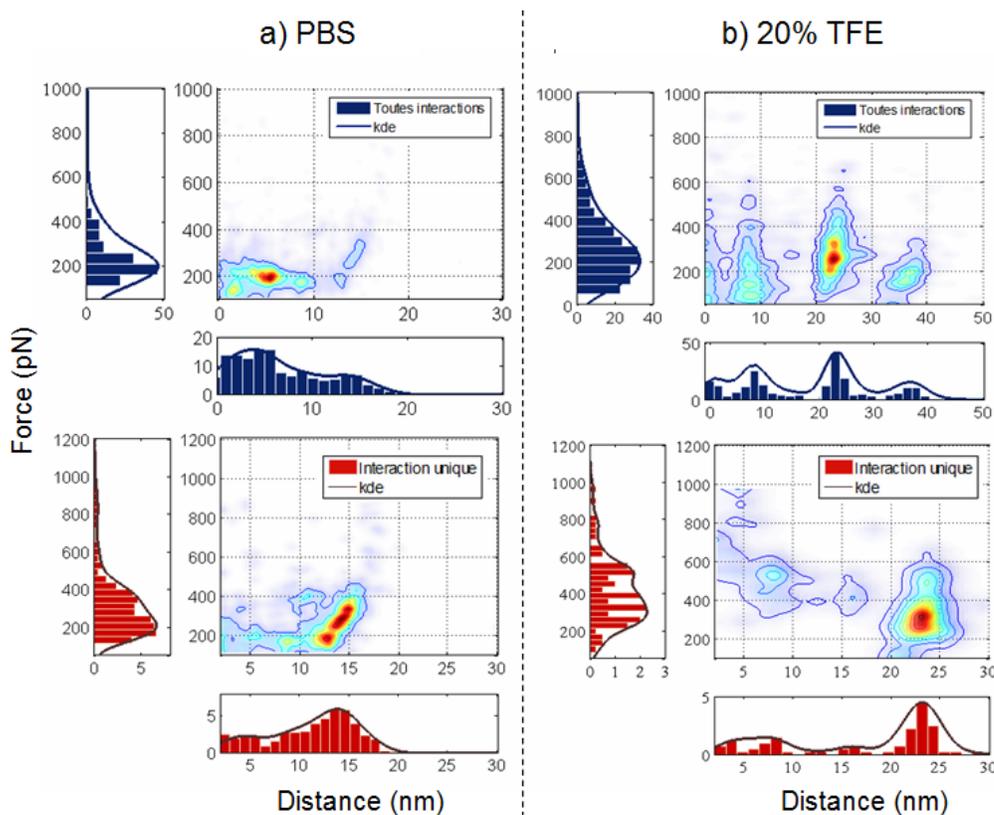


FIGURE VI.12 – Cartographie (a) en milieu tamponné par le PBS (400 courbes) et (b) en solution aqueuse à 20% de TFE (707) pour l'ensemble des interactions (bleu) et les ruptures uniques (rouge).

dans cet ordre. Bien souvent, les étapes intermédiaires de rinçage et de repositionnement du levier dégradent la fonctionnalisation et un tel suivi est difficilement réalisable. La caractérisation préalable en milieu tamponné présente une signature fréquemment rencontrée en milieu PBS et déjà caractérisée : une large plage de ruptures dont le maximum sur la cartographie des ruptures uniques se situe à 310 pN, comprenant plusieurs minima locaux. Cette signature nous garanti la présence du peptide sur ce levier.

Le passage en solution aqueuse de TFE est marqué par une nette augmentation du nombre d'événements spécifiques et non-spécifiques. Au prorata du nombre de courbes, nous passons de 113% événements (soit en moyenne 1.1 pic par courbe) en PBS à 216% événements (soit plus de deux pics par courbes). La cartographie de l'ensemble des in-

teractions révèle que cette augmentation est liée à l'élongation de plusieurs molécules différant par leur distance de rupture. Néanmoins, la fréquence de la signature en rupture unique reste dans l'ordre de grandeur obtenu sur l'ensemble des mesures réalisées en milieu tamponné, et est ici à 18 % (contre 22 % pour le contrôle PBS ci-présent). Egalement, la cartographie en rupture unique donne un maximum à 317 pN dans le cas du TFE. Le changement de structure n'induit donc pas de changement sur les forces d'interaction. Ce résultat confirme que sur de faibles dimensions (nous rappelons que l'oligopeptide ne possède que deux pas d'hélice), la structure n'est pas un facteur déterminant des interactions aux interface.

Il serait également intéressant de caractériser une signature associée au dépliement de l'hélice, mais compte tenu des dimensions de notre peptide conditionnées par les mesures de conductance, il est peu probable que nous puissions l'observer.

VI.2.4 Expériences de contrôle

Cinq catégories d'expérience ont été choisies pour garantir la spécificité de l'interaction peptide/or. Au travers de ces différentes configurations, nous tâcherons d'isoler tour à tour les interactions dans des systèmes où les groupements amines, carboxyliques et thiolés sont soit inaccessibles à l'or, soit absents. Ces systèmes tests sont présentés sur la figure VI.13. Le contrôle 1 b) permet d'isoler l'interaction du linker PEG/or en l'absence du peptide. Dans les contrôles 2 c) et 3 d), la configuration obtenue par simple fonctionnalisation d'une surface d'or (au dodecanethiol ou au peptide) confère au système une situation analogue au blocage du récepteur par des ligands libres dans les expériences type reconnaissance ligand-récepteur.

La dernière série de tests consiste à suivre l'interaction PEG-peptide/or à pH basique, et pH acide. L'intérêt de la variation du pH réside dans la protonation/déprotonation des sites aminés et carboxyliques, de sorte à discriminer les interactions de ces deux groupements. La comparaison des distributions en force dans chacun de ces cas de figure avec les résultats précédents nous permettra également de valider l'attribution des pics aux divers groupements, déduite pour le moment des seuls ordres de grandeurs dans lesquels les forces de rupture interviennent.

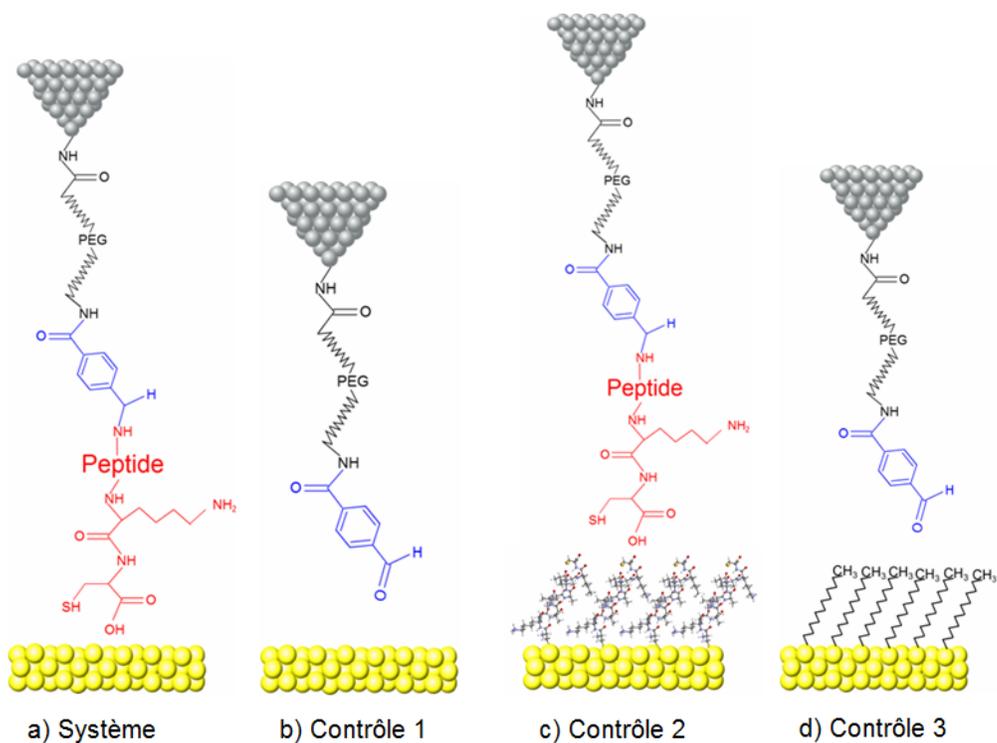


FIGURE VI.13 – Contrôles : illustration du système de référence a) et des systèmes associés aux contrôles réalisés b) en l'absence du peptide et en passivant la surface en présence c) et en l'absence du peptide d). Le blocage de la surface est réalisé par une fonctionnalisation au peptide (c) ou au dodecanethiol (d).

Interaction PEG/Or (contrôle 1) : La fonctionnalisation a ici été stoppée à l'étape de fonctionnalisation de la pointe avec le linker et ne comprend donc pas la phase d'accroche de peptide. Dans cette configuration, les seules interactions possibles sont de type Van der Waals issues du motif $-\text{[CH}_2\text{-CH}_2\text{-O]}-$ de polymérisation, ou issues du groupement aldéhyde terminal. En l'absence du peptide, nous observons qu'une écrasante majorité des courbes de force ne présente aucune interaction. En effet, en maintenant un seuil de sélection en force identique à celui utilisé pour les traitements précédents, 93% des courbes ne présentent aucune interaction. Les 7% restants se décomposent sur un spectre d'interactions allant de l'adhésion jusqu'à l'élongation caractéristique du linker comme présenté sur la figure VI.14 (b). Les probabilités sont ici calculées au prorata du nombre de cycles approche/retrait. La cartographies révèlent qu'en majorité, ces 7 % d'événements interviennent néanmoins sur l'axe 0 nm.

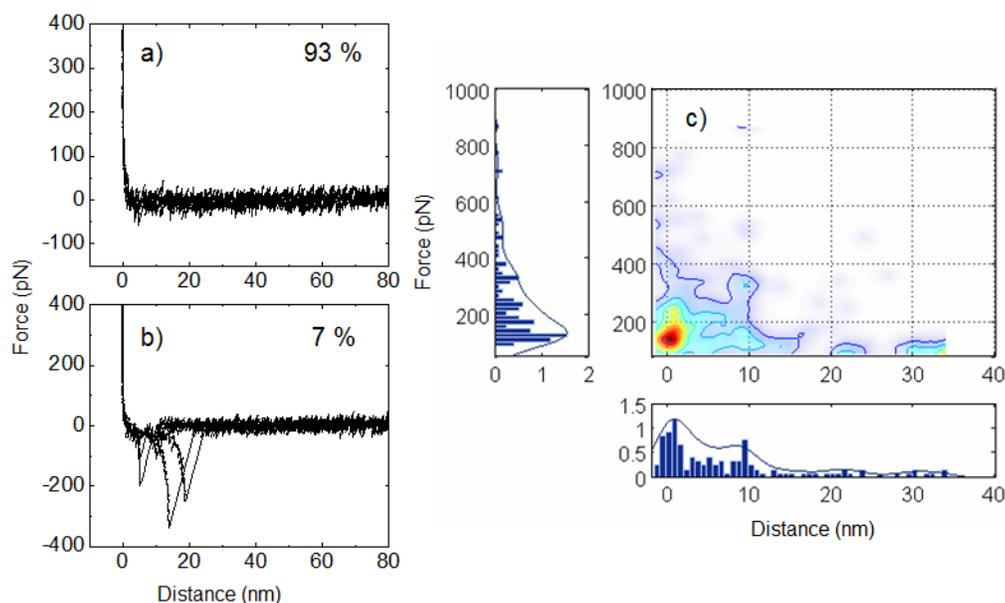


FIGURE VI.14 – Contrôle 1 : Courbes de forces sur système PEG/or a)-b). Le pourcentage est calculé au prorata du nombre de courbes. La cartographie c) correspond à tous les événements.

Interaction PEG-peptide/Or fonctionnalisé (contrôle 2) : Dans ce contrôle, les surfaces sont préparées dans une solution de peptide à 10^{-3} M pendant 2 heures de sorte à obtenir une couche auto-assemblée complète. Nous observons que 90.2 % des réponses en force ne présentent aucune interaction comme présenté sur la figure VI.15 en a). Ce nombre est calculé au prorata du nombre de courbe, et non d'événements. Les 9.8 % (96/983) restant se décomposent sur de l'adhésion de type saut-hors-contact VI.15 b), visibles sur la cartographie par une contribution marquée autour de 0 nm à des forces inférieures à 100 pN, ainsi que quelques cas de courbe plateau responsables de l'étalement en distance allant jusqu'à 40 nm VI.15 c). Notons qu'un même contrôle sur or fonctionnalisé au dodecanethiol a été également réalisé, mais la contribution adhésive de type saut-hors-contact étant présente sur toutes les courbes, nous mettons en doute le succès de la fonctionnalisation (données non présentées).

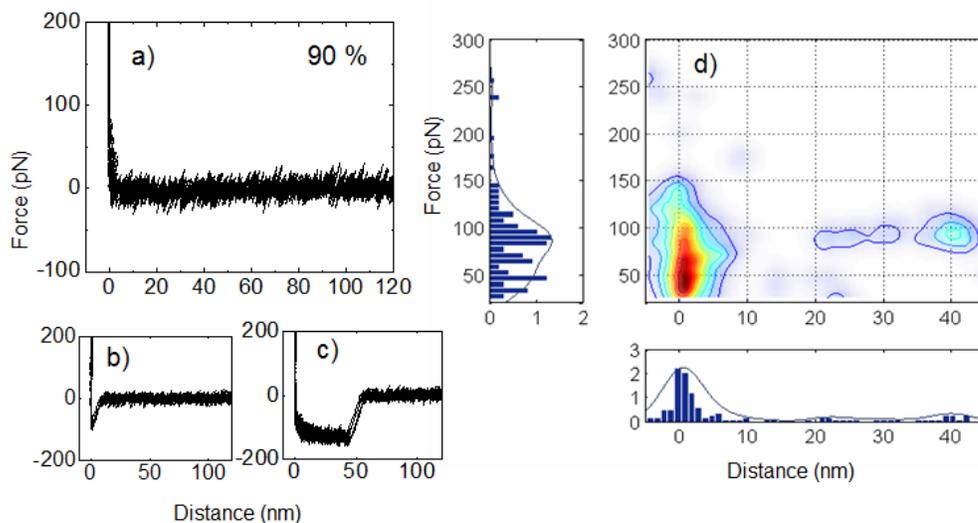


FIGURE VI.15 – Contrôle 2 : Courbes de forces sur système PEG-peptide/or fonctionnalisé a), b), c). Le pourcentage est calculé au prorata du nombre de courbes. La cartographie d) correspond à tous les événements.

Interaction PEG/Or fonctionnalisé (contrôle 3) : Dans ce contrôle, des résultats similaires au système PEG-or ont été obtenus. A 95 % les courbes ne présentent aucune interaction. Les 5% (15/300 courbes) d'interaction détectées apparaissent également à des distances inférieures à 5 nm, à des forces inférieures à 80 pN et ne correspondent qu'à de l'adhésion.

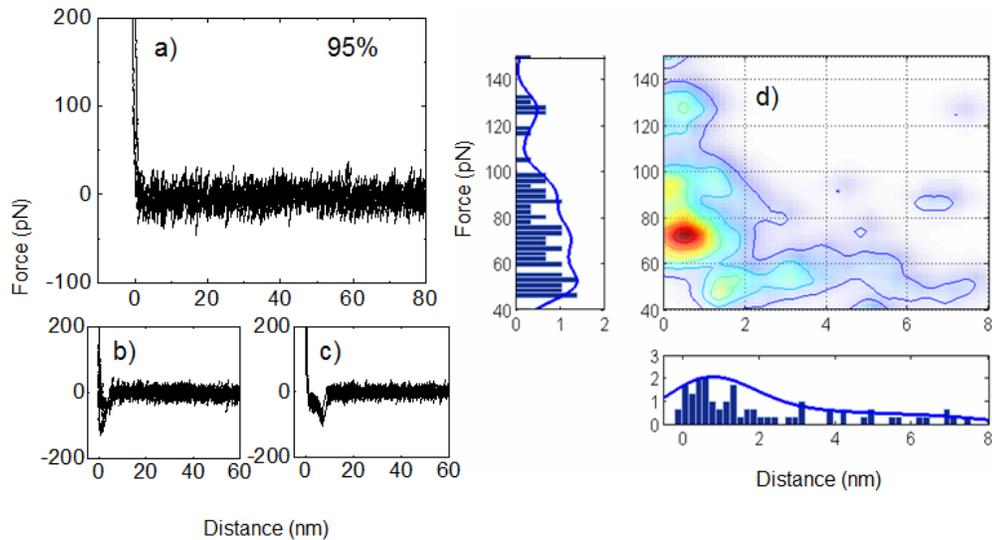


FIGURE VI.16 – Contrôle 3 : Courbes de forces sur système PEG/or fonctionnalisé (a), b), c). Le pourcentage est calculé au prorata du nombre de courbes. La cartographie d) correspond à tous les événements.

Influence du pH

L'interaction des groupements amines, acide carboxylique et thiol avec l'or est modulée par deux facteurs :

1. l'accessibilité du groupement à la surface d'or : ce facteur est gouverné par la structure du peptide et sa conformation,
2. le degré de protonation, les formes déprotonées des groupements amines, carboxyliques et thiolés étant plus favorables pour une interaction avec l'or que leur formes protonées.

La modification du pH coordonne ces deux facteurs simultanément. Leur différences de pKa sont ici mises à profit en vue d'une discrimination entre ces groupements, le pH assurant ce contrôle en bloquant sélectivement leur interaction. Des valeurs de pKa pour chaque groupement selon l'acide aminé et la position terminale ou latérale du groupement existent. Il est toutefois déconseillé de les utiliser pour plus que leur ordre de grandeur car elles ne tiennent compte ni des formes mésomériques modifiant les délocalisations de charge, ni des liaisons hydrogène intramoléculaires responsables de la structure secondaire. Egaleme nt, rappelons que le pKa étant une grandeur définie pour des populations de molécules de l'ordre de N_a , en configuration de molécule unique où la notion de concentration n'est plus applicable, son utilisation ne peut être employée qu'à titre indicatif. Les pKa des amines en N-terminal et en chaîne latérales sont pour la cystéine et la lysine compris entre 10 et 11, celui de l'acide carboxylique en C-terminal autour de 2 et celui de groupement thiol de la cystéine autour de 8. Nous nous attendons donc à une diminution du nombre d'interactions possibles pour l'ensemble des groupements dans les pH acides, et une augmentation du nombre d'interactions possibles pour le thiol et les amines en pH basique. Les solutions à pH acides ont été préparées par ajout d'acide chlorhydrique dans de l'eau milliQ jusqu'à obtention d'un pH compris entre 4 et 5. Celles à pH basique ont été préparées de façon similaires par ajout de soude jusqu'à obtention d'un pH compris entre 8 et 9. Etant donné qu'il ne s'agit pas de solutions tamponnées, une nouvelle solution est préparée à chaque début d'expérience.

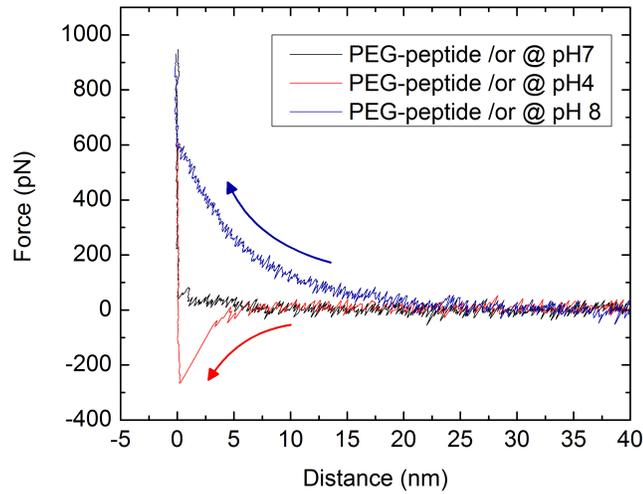


FIGURE VI.17 – Contrôle : courbes d’approches réalisées à pH 4, 7 et 8 en solution aqueuse sur système PEG-peptide/or issus d’une même fonctionnalisation. Les forces subissent une transition d’interaction attractive de Van der Waals à des interactions répulsives de double couche avec le pH. Cette transition est décrite par le modèle DLVO.

PZC et formation d’une double-couche : Une contrainte supplémentaire vient s’ajouter lorsque des mesures sont effectuées à pH variable. La figure VI.17 présente trois courbes d’approches réalisées à pH 4 , pH 7 et pH 8. Nous observons que ces courbes présentent une interaction de type attractive à pH 4 et répulsive pH 8. Cette interaction provient directement de la différence de charge qu’expérimentent la pointe et le substrat. Il a été montré que pour deux matériaux de Si_3N_4 , les forces expérimentées sont toujours répulsives en milieu aqueux à l’exception de valeurs de pH proches de 6.5, signifiant qu’en dehors de cette gamme de pH, les charges portées en surface par les matériaux, et plus précisément leur couche d’oxydes en surface, sont de même signe. Cette valeur particulière de pH pour laquelle il y a compensation des charge s’appelle le point de charge nulle (PZC pour Point of Zero Charge). Dans le cas d’oxydes de surface où le milieu ne fait pas intervenir d’autres ions que H^+ et OH^- , ce point de charge nulle coïncide avec le point isoélectrique. Nous comprenons que dès lors que deux matériaux présentent une charge en surface, la compensation va dépendre du pH dans lequel se situe la mesure. A titre d’exemple, le mica chargé négativement quel que soit le pH

présente avec le Si_3N_4 une zone attractive jusqu'à pH 6, mais répulsive au delà de pH 8 [26]. En présence de matériaux différents dont l'un présente une fonctionnalisation, le cas peut s'avérer complexe.

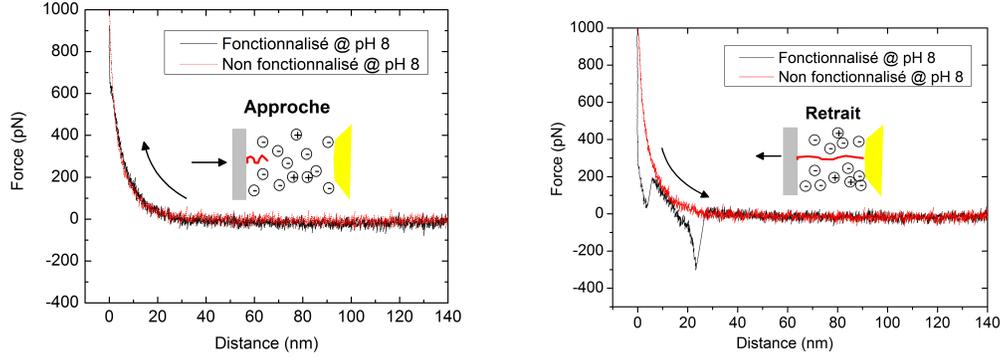


FIGURE VI.18 – Contrôle : Comparaison à pH 8 des courbes d'approche et de retrait dans le cas d'une interaction pointe (modèle NPG-10, Bruker) or/peptide-linker(PEG) sur SiO_2 fonctionnalisé vs non fonctionnalisé. La rupture marquée à 23.2 nm confirme la présence de la molécule au moment de l'interaction. La force de rupture subit une force additionnelle issue de la contribution de la double couche.

La figure VI.18 présente deux courbes d'approches et leur retrait réalisées à pH 8 dans une configuration où la pointe est en or, et la substrat et en SiO_2 , fonctionnalisé au linker - peptide dans un cas, et non fonctionnalisé dans l'autre. La courbe de retrait garantit ici la présence de la molécule au moment de l'interaction pointe/surface. Nous observons que la fonctionnalisation ne modifie pas la charge de surface du matériau sur lequel elle est réalisée, et que l'interaction répulsive est attribuable à un phénomène de compression de couches d'ions OH^- . La distribution inhomogène à proximité de la surface qu'entraîne une telle compression mène à la formation d'une double-couche (diffusive puis compacte à mesure que diminue la distance), que nous pouvons approcher par le modèle de type DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) [84], [85], [86] :

1. $F(z) = F_c \exp\left(-\frac{z}{\lambda_D}\right)$ pour $z > 0$ nm,
2. $F(z) = F_c \sinon,$

où z représente la distance pointe/substrat, F_c la force au contact et λ_D la lon-

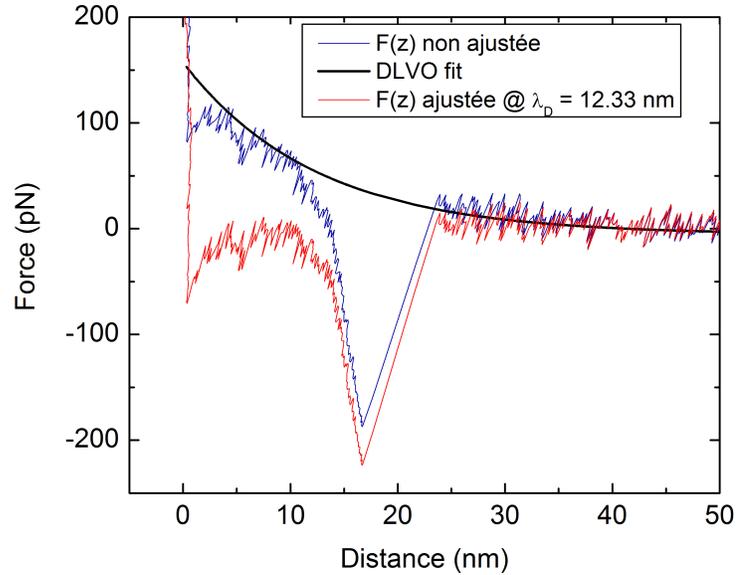


FIGURE VI.19 – Courbes de retrait sur système PEG-peptide présentant un événement de rupture superposé à une interaction répulsive. La répulsion expérimentée est issue de la formation d’une double couche d’ions de charges identiques au niveau de la pointe et du substrat qu’une diminution de la zone de compression rend apparente. Cette interaction pouvant mener à une estimation erronée de la force de rupture, une correction est appliquée à partir d’un ajustement suivant le modèle DLVO.

gueur d’écrantage de Debye représentant en pratique l’épaisseur de la double-couche. La condition $F(z) = F_c$ en $z \approx 0$ est ajoutée de sorte à éliminer les problèmes de discontinuités lorsque, en représentation force-distance, la zone de contact pointe-piezoelectrique oscille autour de 0 nm. La figure VI.19 montre la courbe de force obtenue avant et après correction par le modèle pour une longueur de Debye de 12.33 nm. Au cours des expériences réalisées en pH basique, nous avons obtenu des longueurs de Debye variant de 9 à 13 nm dépendant du pH de travail. Il s’agit d’un ordre de grandeur raisonnable compte tenu des valeurs couramment trouvées de 10 nm [87],[88]. Des études réalisées sur surface d’or mise en contact avec une pointe AFM sur laquelle avait été greffée une bille de silice de ($6\mu\text{m}$ de diamètre) ont permis de révéler que cette double-couche variait sur une large gamme de pH (de 2 à 11 nm sur un pH de 3.5 à 11) et de potentiels [88]. A partir du diagramme potentiel/pH une valeur pour l’IEP

(point isoélectrique) de l'or est déduite à pH 4.95. Cette dépendance avait été attribuée l'adsorption/désorption de protons au niveau d'oxydes en surface de l'or. Notons qu'à pH 4 l'interaction attractive que subit la pointe intervient à des distances inférieures à 5 nm et pourraient être majoritairement dues aux interactions Van der Waals. Ces courbes ne nécessitent donc aucune correction.

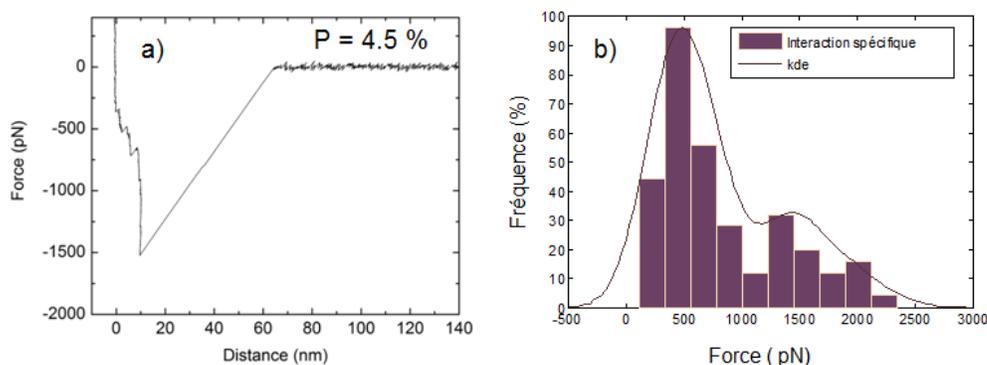


FIGURE VI.20 – Contrôle à pH 5 : (a) Exemple de courbe de force. La faible occurrence de ce type d'événement au profit d'interactions uniques non-spécifiques confirme l'extinction des groupements amines et acide carboxylique. (b) Histogramme réalisé sur les événements de rupture à pH acide. Les distributions présentent deux maxima à 481 pN et 1.45 nN.

Réponse en force : Nous avons constaté que la très grande majorité des courbes, à une occurrence supérieure à 95.4 %, présente une forte adhésion. Dans de très rares cas, un processus d'élongation avec rupture a pu être observé, parfois consécutif à un pic d'adhésion. La figure VI.20 présente un exemple de courbe de force. La distribution associée présente une bimodalité caractéristique à 404 pN et 1.45 nN, comparable au système PEG-peptide en milieu PBS. La diminution du nombre d'interactions nous permet d'attribuer les ruptures majoritairement observées en milieu PBS à ces groupements. Notons qu'il a été observé dans certains cas des interactions de type plateau mais dont les distances d'élongation (60-80 nm) ne permettent de dissocier la signature d'un événement spécifique lié à une polymérisation d'un artéfact intervenu à la fonctionnalisation.

Sur la figure VI.21 à pH 8, La contribution la plus probable apparaît à 306 pN, soit à un écart de force de 81 pN avec celles trouvées dans le PBS (225 pN). Dans le détail

des interactions, celles en molécule unique (événement spécifique unique et dernier événement spécifique des interactions multiples) font apparaître une distribution où le maximum des forces est à 407 pN.(332 pN) , soit un écart de 75 pN.

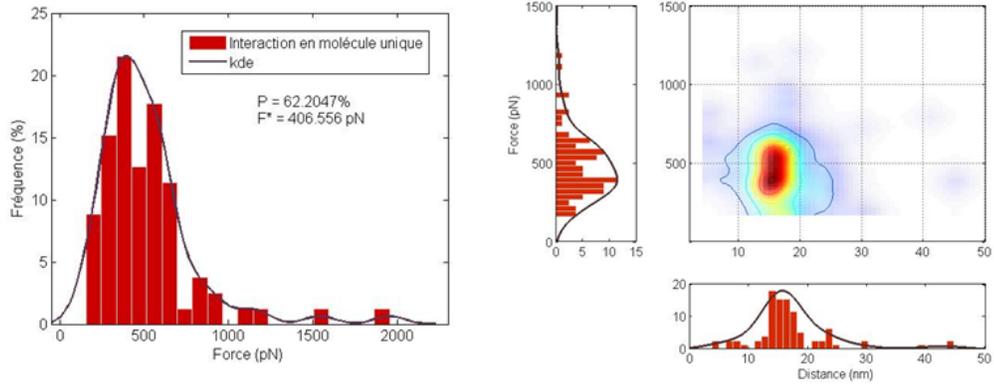


FIGURE VI.21 – Contrôle à pH8 : Histogrammes et cartographies associées aux événements spécifiques et en molécule unique.

VI.2.5 Discussion

La figure VI.22 synthétise les conclusions amenées par l'étude des forces d'interaction peptide-or. Nous avons dans notre première conclusion proposé l'attribution des forces observées à 178 pN, 431 pN et 705 pN aux groupements amines.

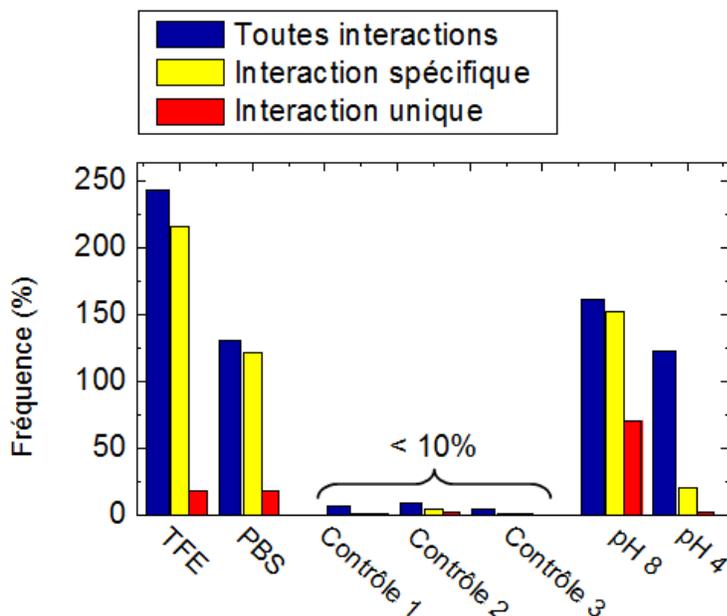


FIGURE VI.22 – Comparaison des pourcentages au prorata du nombre de courbe sur PEG-peptide/or en milieu PBS, sur le contrôle 1 (PEG/or), sur le contrôle 2 (PEG-peptide/or fonctionnalisé) sur le contrôle 3 (PEG/or fonctionnalisé), et sur le système PEG-peptide à deux pH. Un pourcentage > 100 % indique la présence de ruptures multiples.

La comparaison des probabilités dans les différents contrôles garantit que ces signatures sont associables au peptide : en l'absence du peptide, peu d'interactions sont sondées et l'augmentation du pH mène à une augmentation de cette probabilité, indiquant une modulation des interactions avec le ratio $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$. Une statistique plus conséquente devrait permettre de comparer l'évolution de chacune des forces F^* proposées. Nous n'avons pas encore mentionné l'impact de la vitesse de charge sur ces mesures. Dans l'histogramme que nous avons traité à la première conclusion VI.11 (d), plusieurs vitesses de charge ont été sondées. La dispersion apparente de ces forces,

particulièrement visible pour celles supérieures à 500 pN pourrait indiquer qu'une évolution dynamique des ces ruptures à plages de vitesses est observable. Nous proposons de tester cette hypothèse dans la section suivante.

VI.3 Caractérisation du spectre de force

Nous présentons dans cette section une exploitation où les interactions sont caractérisées en fonction de la vitesse de charge : dF/dt . Son influence permet de situer les valeurs de force dans un régime cinétique de dissociation, et par application de modèles, d'en déduire des grandeurs caractéristiques de l'interaction.

Dans les expériences de spectroscopie dynamique de force, le temps de dissociation est varié continûment avec la force $F(t)$. Or les grandeurs caractérisant la barrière d'activation qui sépare un état lié d'un état de transition sont définies à l'équilibre, et l'application d'une force peut placer la dissociation dans un régime hors-équilibre. Ces grandeurs comprennent le temps de dissociation t_{off} et x_β la distance en coordonnées réactionnelles entre ces deux états. Nous avons vu que des modèles cinétiques permettent d'extrapoler ces paramètres à partir d'expressions liant la force de rupture la plus fréquente F^* à la vitesse de charge. Ainsi, en modulant dF/dt sur un large panel de vitesses, la rupture peut être sondée à des temps supérieurs à son temps de vie en régime de dissociation à l'équilibre ($t > t_{off}$ à faible dF/dt) jusqu'à atteindre des temps inférieurs à son temps de vie en régime de dissociation hors-équilibre ($t < t_{off}$ à dF/dt élevé). En extrayant la force F^* pour chacune de ces vitesses selon un traitement utilisé au chapitre précédent, nous pouvons extrapoler les grandeurs t_{off} et x_β à l'équilibre.

La grandeur t_{off} peut s'interpréter comme le temps de vie de l'interaction, et dans les systèmes protéine/ligand, il donne des informations sur sa spécificité. Plus le temps de vie est élevé, plus la spécificité de l'interaction est grande. Typiquement des temps de vie de l'ordre de la ms sont caractéristiques d'interactions non-spécifiques tandis que des systèmes ligand/récepteur comme la biotine/straptavidine peuvent présenter des temps allant de quelques heures à plusieurs semaines [89]. L'affinité, autre concept clé dans l'étude des interactions est liée à la spécificité mais ne doit pas être confondue avec elle. L'affinité d'une interaction est estimée à partir de la constante de dissociation K_D , et nécessite la connaissance de k_{on} qui dans notre système reste une inconnue. Les modèles qui seront utilisés ont été testés pour un grand nombre de systèmes complémentaires qui mettent essentiellement en jeu des liaisons non-covalentes (hydrogènes, Van der Waals, électrostatiques, hydrophobes,...). En conséquence, la va-

lité de ces modèles pour quantifier la spécificité d'une interaction covalente (S-Au) ou donneur/accepteur (N-Au) reste à notre connaissance une hypothèse encore ouverte.

Une première étude est faite sur le système de référence biotine-streptavidine. Le modèle Bell-Evans à simple barrière est appliqué pour extraire les paramètres : ΔG^\ddagger l'énergie du complexe activé à l'état de transition, x_β , et $k_{off} = 1/t_{off}$ avec k_{off} la constante de taux de dissociation. La seconde étude porte sur l'extraction de ces mêmes paramètres dans le cas de l'interaction peptide/or. Nous appliquerons un premier traitement dans lequel la charge sera supposée constante, et calculée comme $r = k_{cant}v_s$ où k_{cant} est la constante de raideur du levier et v_s sa vitesse de rétractation. Nous exposerons ensuite un second traitement dans lequel la vitesse de charge n'est plus considérée comme constante, mais varie non-linéairement suivant l'extension de l'agent de couplage. La validité de ces deux approches sera discutée.

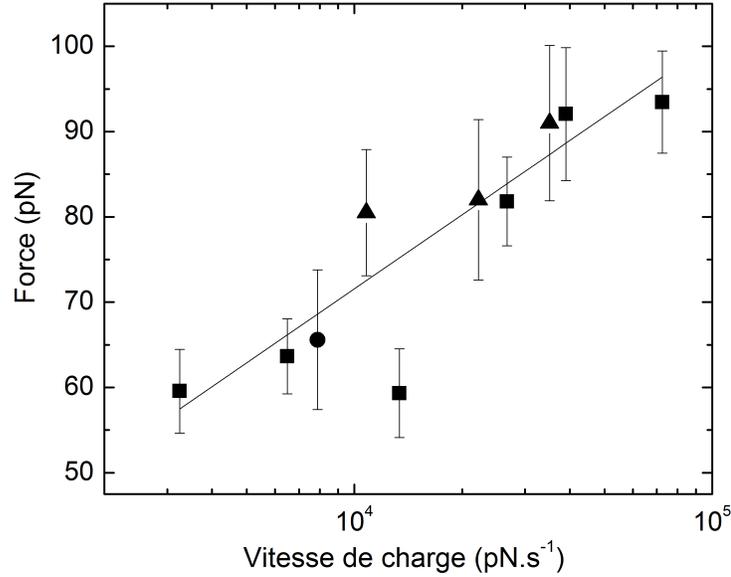


FIGURE VI.24 – Spectre de force modulé en vitesse de charge pour l'interaction biotine-streptavidine. L'ajustement conduit à une estimation de $x_\beta = 0.33$ nm et $k_{off} = 2.604$ s⁻¹. L'erreur est prise en σ/\sqrt{N} avec N le nombre de mesures.

mais vont généralement de une à deux, dépendant de la plage de vitesse de charges sondées. Des études ont déjà révélé qu'il pouvait être décrit par trois barrières principalement [90], [91]. Néanmoins, le temps d'exploration durant la phase d'extension est suffisant pour permettre à l'interaction une relaxation vers un minimum en énergie, si bien que la modélisation de l'interaction avec deux, voire une barrière aux vitesses de charges appliquées est une approximation valable. Compte tenu de notre statistique et du risque que représente un ajustement à 4 variables (sur 10 points), nous choisissons l'ajustement à une barrière. L'ajustement du spectre conduit à l'estimation de $x_\beta = 0.33$ nm et de $k_{off} = 2.6$ s⁻¹. Dans cette approximation, la valeur obtenue pour x_β est en très bon accord avec la littérature [91],[92]. Une première barrière est en principe attendue en $x_\beta = 0.5$ nm et $k_{off} = 0.006$ s⁻¹, et une seconde intervient en $x_\beta = 0.1$ nm avec $k_{off} = 40$ s⁻¹ [93]. Le résultat de notre ajustement vient confirmer que nous nous situons probablement dans un régime intermédiaire où deux barrières sont sondées. A partir de ces valeurs, la force de rupture à l'équilibre est déduite : $f_{eq} = k_B T / x_\beta =$

12.34 pN, et se situe également à une valeur intermédiaire entre la première barrière ($f_{eq} = 7.7$ pN) et la seconde ($f_{eq} = 44$ pN). A partir de l'expression de l'expression de $\lambda(F)$ (cf. chapitre 2), il est possible de remonter à ΔG^\ddagger l'énergie du complexe activé d'après l'expression de k_{off} selon :

$$\Delta G^\ddagger = -k_B T \ln \left(\tau_D k_{off} \right) \quad (\text{VI.1})$$

où $\tau_D = 2\pi\gamma/\omega_{min}\omega_{max}$ correspond à un temps de diffusion de relaxation et est estimé à 1.10^{-9} s dans le cas de l'interaction biotine/streptavidine [94], [92]. Nous obtenons $\Delta G^\ddagger = 19.77 k_B T$, ce qui est en très bon accord avec la littérature [91], [95]. Les expériences de spectroscopie de force doivent être faites dans un environnement à température contrôlée. Tenant compte de conditions expérimentales n'incluant dans notre cas pas de contrôle de la température, nous estimons l'impact des fluctuations thermiques sur la force :

$$\delta F = \delta T \frac{k_B}{x_\beta} \left(\ln \left(\frac{r_F x_\beta}{k_B T k_{off}} \right) - 1 \right)$$

L'impact d'une fluctuation de 10 degrés mène à une incertitude sur la force de rupture allant de 1.48 pN jusqu'à 2.77 pN soit une contribution négligeable.

VI.3.2 Spectre DFS de l'interaction Peptide/Or

Suivant une approche similaire, nous appliquons ce traitement au cas de l'interaction peptide/or. Trois traitements seront explorés :

1. spectre $F^*(r)$: un premier traitement similaire à celui effectué sur biotine/streptavidine où la vitesse de charge est prise égale à $k_c v$ où k_c est la constante de raideur du levier. Seule la force la plus probable F^* est utilisée. Les paramètres x_β et k_{off} sont extraits à partir de la courbe $F^*(r)$.
2. spectre $F(r)$: un second traitement où l'influence de l'agent de couplage est prise en compte dans l'expression de la vitesse de charge. A chaque force est donc associée une vitesse de charge dépendant de l'élongation de l'ensemble linker-peptide au moment de la rupture, et tous les couples $F(r)$ sont utilisés dans l'estimation de x_β et k_{off} .
3. spectre $F^*(r^*)$: un troisième traitement où l'influence de l'agent de couplage est prise en compte dans l'expression de la vitesse de charge. A la différence du précédent, tous les couples $F(r)$ ne sont pas considérés, mais seulement ceux réalisant les maxima des probabilités $p(F)$ et $p(r)$. Seules les force F^* et vitesses de charges r^* les plus probables sont utilisées dans l'estimation de x_β et k_{off} .

Selon les tendances observées, les modèles Bell-Evans ou Friddle-De Yoreo seront utilisés pour estimer les paramètres de la barrière. Par commodité d'écriture, le taux de dissociation à l'équilibre désigné par k_u^0 dans le modèle Friddle-De Yoreo sera ici noté k_{off} .

Validité numérique : Nous avons constaté lors de l'ajustement de nos données que numériquement, les modèles sont sensibles aux valeurs initiales *a priori* que lui fournit l'utilisateur pour les variables d'ajustement x_β et k_{off} . Il est probable qu'une restriction des domaines de variation puisse aider à la convergence, néanmoins dans le cas de notre peptide, ces paramètres sont des inconnues et la plage de variation de k_{off} pouvant inclure plusieurs ordres de grandeurs, nous préférons nous affranchir de toute contrainte sur ces domaines. Nous choisissons donc pour cela de réaliser une analyse de résidus afin de valider nos ajustement. Pour cela, un grand nombre de couples

initiaux (k_{off}, x_{β}) sont testées en boucle, et le résultat de la convergence (χ^2) est tracé en fonction de ces couples. La figure VI.25 donne un exemple des courbes obtenues lors de la convergence progressive vers la meilleure ligne d'ajustement pour le modèle Friddle-De-Yoreo.

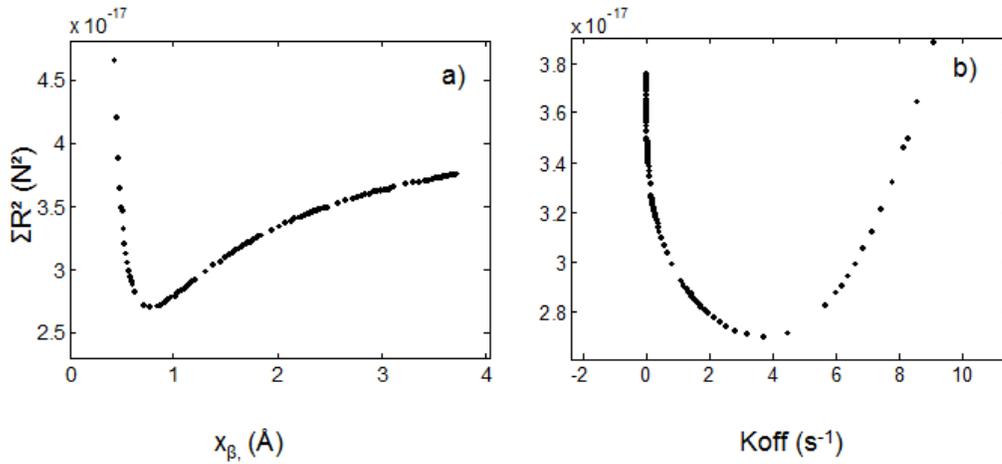


FIGURE VI.25 – Convergence de l'ajustement pour (a) x_{β} et (b) k_{off} lorsque les conditions initiales sont variées.

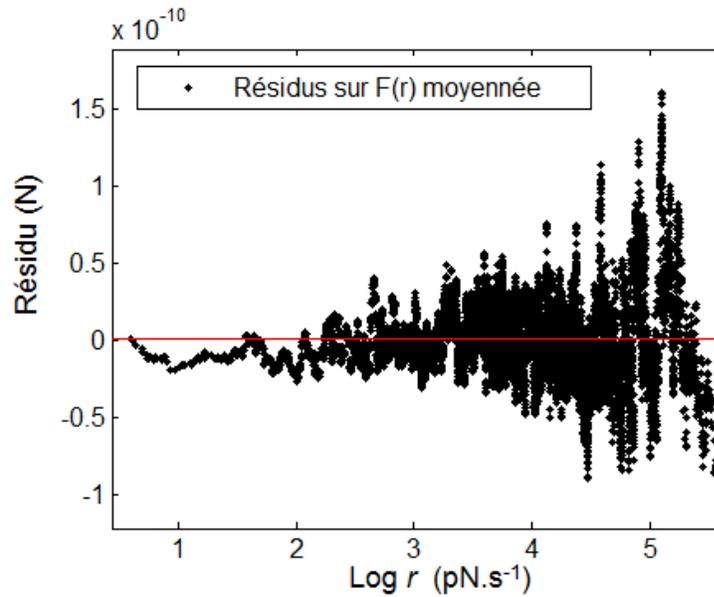


FIGURE VI.26 – Résideu en fonction de la variable ajustée r .

A partir de ces courbes est extrait le couple (k_{off}, x_β) réalisant le minimum de la somme des résidus. La ligne d'ajustement est tracée avec ces nouveaux paramètres puis comparée à la courbe expérimentale. Son résidu est analysé en fonction maintenant de la variable ajustée. Nous obtenons le type de courbe montré sur la figure VI.26. Sur cet exemple, l'ensemble des couples $F(r)$ a été pris en compte, et la distribution expérimentale est donc dans un premier temps moyennée sur 50 points. Nous observons malgré le lissage que les variables $F(r)$ sont hétéroscédastiques. Ce comportement est le signe d'une augmentation de la dispersion des données. Néanmoins, la distribution des résidus ne suit aucune tendance, et l'on peut dans ces conditions avoir confiance en notre ajustement.

Vitesse de charge constante ($F^*(r)$) : La figure VI.27 présente les spectres de force obtenus pour les interactions classées spécifiques, et les interactions uniques. Nous observons une dispersion qui ne permet pas sans hypothèses de correspondance directe avec un modèle dynamique.

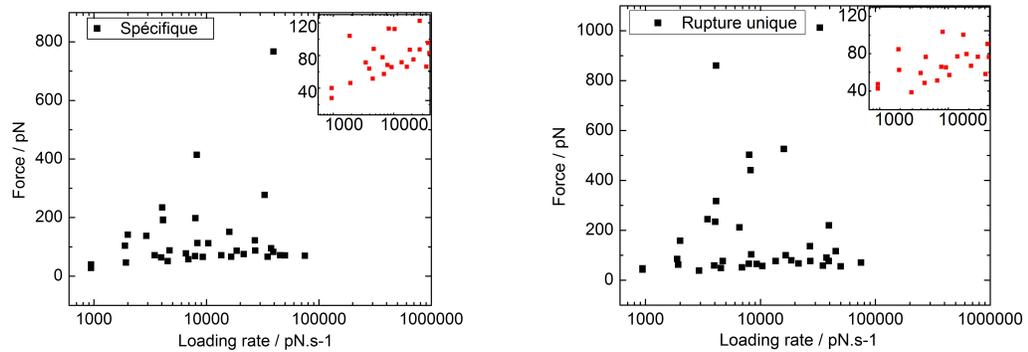


FIGURE VI.27 – Spectre de force des interactions spécifiques et uniques pour le système peptide-or. Un élargissement de la zone [20-120] pN est montré en insert.

Un agrandissement dans la zone [20-120] pN révèle une première évolution à faible valeur de rupture. Aux ruptures plus élevées, à des vitesses comparables une seconde évolution linéaire apparaît. Dans une première interprétation, ce résultat suggérerait la co-existence de deux modes de dissociation : à une vitesse de charge donnée, deux modes dissociatif distincts sont accessibles à la molécule qui peut alors parcourir au

cours de la rupture soit l'un ou l'autre des chemins réactionnels. Donc en supposant une charge constante exprimée comme $r_{const} = k_{cant}v_s$, la bi-dispersité des forces de rupture suggérerait la coexistence de deux mécanismes de désorption.

Nous avons donc procédé à un découpage en deux domaines : à $F^*(r) < 150$ pN, et un second domaine à $F^*(r) > 150$ pN, et ajusté à l'aide du modèle Bell-Evans (BE). La figure VI.28 montre les résultats de l'ajustement pour ces deux zones. L'estimation de x_β et k_{off} conduit à des résultats similaires sur interaction spécifique et unique, soit :

1. $F^*(r) < 150$ pN : $x_\beta = 7.8$ Å et $k_{off} = 0.02$ s⁻¹
2. $F^*(r) > 150$ pN : $x_\beta = 0.22$ Å et $k_{off} = 316$ s⁻¹

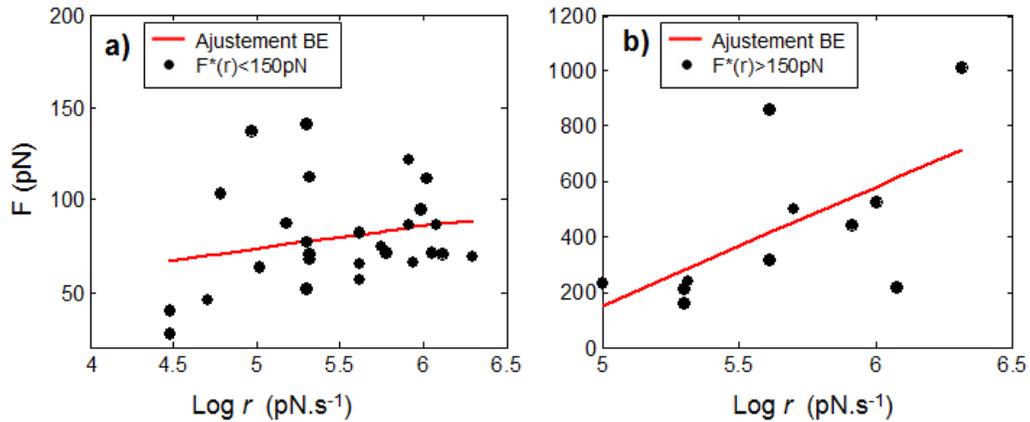


FIGURE VI.28 – Spectre de force ajustés avec le modèle BE pour les domaines (a) $F^*(r) < 150$ pN et (b) $F^*(r) > 150$ pN

Nous avons également testé le modèle Friddle-De Yoreo (FDY). Pour les valeurs $F^*(r) > 150$ pN l'ajustement ne trouve pas de solutions. Pour $F^*(r) < 150$ pN l'ajustement donne $x_\beta = 7.8$ Å et $k_{off} = 0.9$ s⁻¹ et $F_{eq} = 22$ pN, mais nous mettons en garde sur le faible nombre de points sur lequel l'ajustement est effectué pour un modèle à 3 variables. Bien que ces ajustements aient convergé, l'adaptation du modèle en fonction du régime de force considéré (au seuil de 150 pN) est difficilement justifiable, et nous a mené à reconsidérer la contribution de l'agent de couplage dans l'expression de la vitesse de charge.

Vitesse de charge corrigée et influence du linker ($F(r)$) : L'introduction d'un agent de couplage ne modifie pas seulement la chimie de surface, elle modifie au niveau de la barrière énergétique le potentiel avec lequel la liaison est sondée. En effet, si le potentiel de la pointe peut se modéliser comme un potentiel harmonique en $k_{cant}x^2$, ce n'est pas le cas de l'agent de couplage dont l'extension suit une relation décrite dans le chapitre 2. Le couplage avec la molécule introduit également une contribution en série k_{mol} . En définitive le potentiel qui sonde la molécule est en $k_{app}x^2$ où :

$$k_{app} = \left(\frac{1}{k_{cant}} + \frac{1}{k_{linker}} + \frac{1}{k_{mol}} \right)^{-1} \quad (\text{VI.2})$$

En toute rigueur, une première correction doit donc être appliquée sur la vitesse de charge de sorte à prendre en compte ces contributions : $R_{const} = k_{app}v_s$ [96]. La seconde correction intervient au niveau de k_{linker} et k_{mol} . Si nous revenons à la définition de la vitesse de charge, celle-ci apparaît comme la vitesse à laquelle la force charge la liaison au moment de la rupture, soit dF/dt en $F = F_{rupt}$ qui s'exprime comme $dF/dt = v_s dF/dz$. C'est alors qu'intervient une approximation courante, et valable si seul le levier contribue à l'élasticité du système sondé : $dF/dz \approx k_{cant}$ qui est effectivement constant car le levier est modélisé par un ressort idéal. Reprenons à présent l'expression de r_{const} corrigée. $r_{const} = k_{app}v_s$ ne donne une constante qu'à la condition que k_{linker} et k_{mol} le soient également, et donc que leur comportement décrive celui d'un ressort idéal. Ce qui n'est d'après le comportement de l'élongation pas le cas. En réalité, il n'y a qu'à deux régimes que cette approximation est valide : lorsque $FL_K \ll k_B T$ où la rigidité idéale varie linéairement avec F en $3k_B T/N_s L_K^2$, et dans le modèle corrigé aux hauts régimes de force lorsque $FL_K \gg k_B T$ où la rigidité varie à nouveau linéairement avec F en k_s/N_s . Aux régimes intermédiaires, typiquement ceux que nous sondons sur la plage [100-500] pN, dF/dz est non-linéaire, et la charge ne peut probablement pas être considérée constante. Dans l'exploitation qui suit, nous exprimons le spectre de force en fonction de la charge instantanée $r(t)$, tenant compte de ses variations lorsque la courbe d'élongation est parcourue. Elle est extraite en routine pour chaque rupture à partir de la tangente de la courbe de force sur les 200/150/100 points qui précèdent la rupture, dépendant de l'échantillonnage

de la courbe. Dans ce traitement, la vitesse de charge est donc exprimée comme [96] :

$$r(t) = v_s k_{app}(t) = v_s \left(\frac{1}{k_{cant}} + \frac{1}{\frac{dF}{dz}(t)} \right)^{-1} \quad (\text{VI.3})$$

où $v_s dF/dz$ contient la contribution en charge instantanée perçue par la liaison à l'instant de la rupture de l'ensemble linker et peptide. Quelques travaux rapportent le passage par l'utilisation d'une charge instantanée et font état d'une variation apparente qui leur permet un traitement sur des énergies de barrière [97] sur un modèle FDY. Nous nous proposons de tester cette approche.

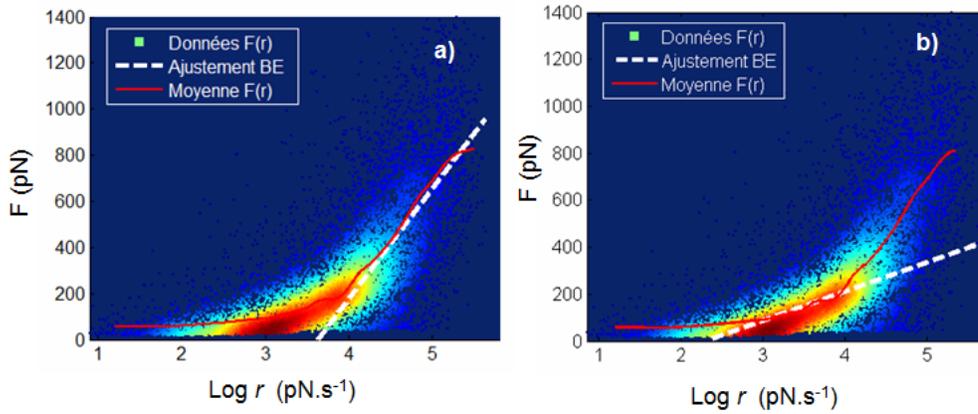


FIGURE VI.29 – Spectre de force $F(r)$ regroupant 10578 courbes, et ajustements suivant le modèle BE à vitesse de charge élevée (a) ($r > 10^4$ pN/s) et à vitesse de charge faible (b) $r = [10^2 - 10^4]$ pN/s

Nous observons sur la figure VI.29 que le comportement de $F(r)$ ne peut être considéré linéaire que par morceaux. Nous ajustons donc ces données avec deux barrières. Pour la zone $r > 10^4$ pN/s, les résultats de l'ajustement donnent $x_\beta = 0.41$ Å et $k_{off} = 3.3$ s⁻¹. Pour la zone $r = [10^2 - 10^4]$ pN/s, nous obtenons $x_\beta = 0.77$ Å et $k_{off} = 3.5$ s⁻¹. Nous avons également testé cet ajustement avec le modèle FDY, dont le résultat est présenté sur la figure VI.30. Nous obtenons $x_\beta = 0.19$ Å et $k_{off} = 30.1$ s⁻¹ et $f_{eq} = 63$ pN.

Nous constatons que les résultats obtenus avec chaque modèle diffèrent notable-

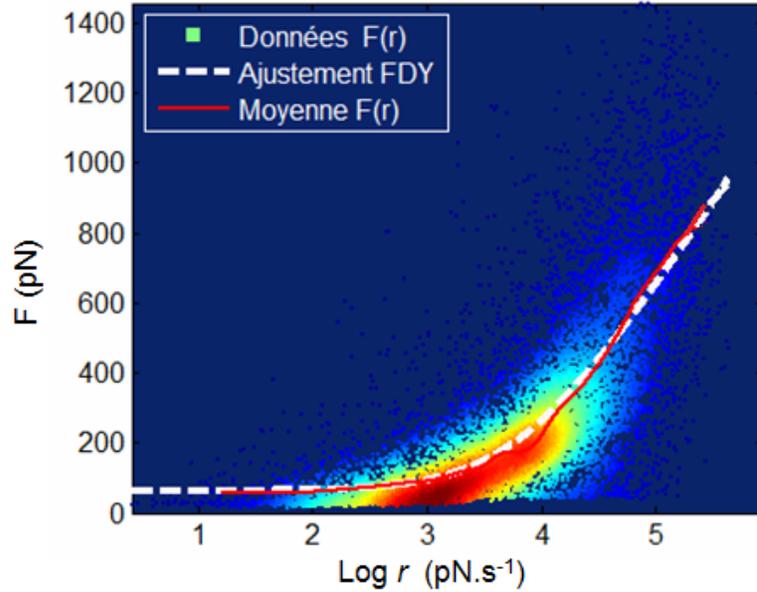


FIGURE VI.30 – Spectre $F(r)$ et ajustement avec le modèle FDY. Les résultats de l'ajustement donnent $x_{\beta} = 0.19 \text{ \AA}$ et $k_{off} = 30.1 \text{ s}^{-1}$

ment. Il est probable que dans le cas où l'ensemble $F(r)$ est considéré, le modèle BE ne soit pas adapté. En effet dans ce modèle, la relation liant F à r est obtenue par minimisation de la probabilité $p(F)$. Cette minimisation ne trouve de solutions que si r est supposé indépendant de F . Autrement dit, il n'est valable uniquement dans l'approximation où r est constant dans l'expression de $p(F)$. Dans le modèle FDY, l'expression de la distribution des événements suppose également une indépendance de F à r , contenue dans l'expression de p_b la probabilité de reformation de la liaison [42]. Si dans ce modèle la force moyenne est utilisée, l'hypothèse d'une distribution gaussienne des forces implique que $\langle F \rangle = F^*$. Quel que soit le modèle, l'ajustement des couples $F(r)$ sans passage par une estimation statistique peut donc mener à une interprétation erronée. De plus, le danger de l'utilisation directe des couples (F,r) réside dans le fait qu'une relation existe déjà entre F et r dans l'élongation d'une chaîne gaussienne. Elle peut être déduite également à partir du modèle E-FJC, sans qu'interviennent les

paramètres cinétiques x_β et k_{off} :

$$r^{-1} = \frac{dz}{dF} = N_s L_K \left[\frac{L_K}{k_B T} \left(1 - \coth^2 \left(\frac{F L_K}{k_B T} \right) \right) + \frac{k_B T}{F^2 L_K} \right] + \frac{N_s}{K_s} \quad (\text{VI.4})$$

Ajuster donc les paramètres de la barrière avec les couples (F,r) obtenus revient à attribuer aux grandeurs extrapolées des valeurs qui dépendent en réalité des paramètres d'élongation N_s , L_K et K_s . Quel que soit le modèle utilisé pour interpréter la barrière énergétique, tenir compte de la statistique de F est un pré-requis. Bien que cette méthode soit donc présente dans la littérature [97], nous choisissons donc de comparer ces résultats dans une troisième méthode [96] tenant compte à la fois de F^* mais également de r^* dans le cas où la vitesse de charge est corrigée, mais pour chaque jeu de données estimée à sa valeur la plus probable.

Vitesse de charge corrigée et influence du linker ($F^*(r^*)$) : Dans ce traitement, les paramètres cinétiques x_β et k_{off} sont conservés [96]. Les distributions sur r sont également extraites, et nous permettent d'associer à F^* une valeur où $p(r)$ réalise localement autour de F^* un maximum local duquel r^* est extrait.

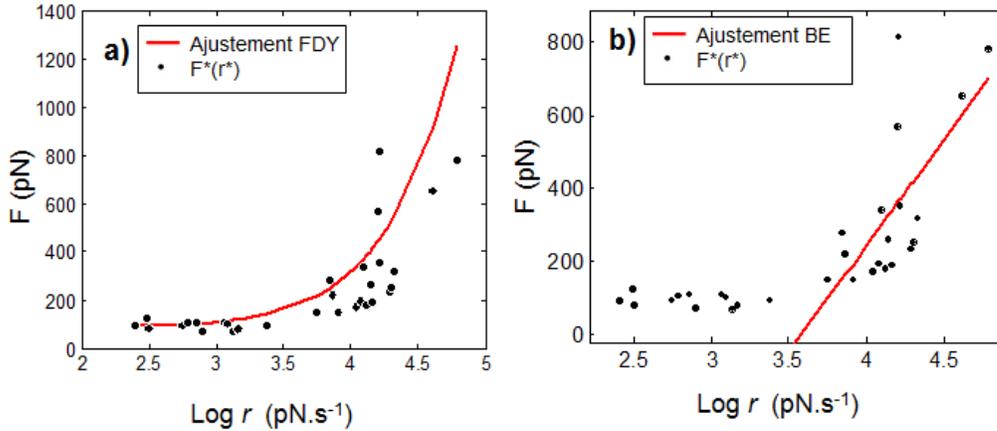


FIGURE VI.31 – Spectre $F^*(R^*)$ et ajustement avec les modèles (a) FDY et (b) BE. le modèle FDY et.

Sur la figure VI.31 (a), nous obtenons les résultats d'ajustement suivant avec un modèle FDY : $F_{eq} = 85$ pN, $x_\beta = 1.7 \times 10^{-2}$ Å et $k_{off} = 41$ s $^{-1}$. Pour l'ajustement sur

le modèle BE (b), nous obtenons : $x_\beta = 0.2 \text{ \AA}$ et $k_{off} = 15 \text{ s}^{-1}$. A nouveau, les valeurs ne se recouvrent pas entre les deux modèles.

VI.3.3 Discussion

Le tableau VI.1 regroupe les valeurs obtenues pour chaque ajustement, indépendamment de sa pertinence qui sera discutée.

Modèle	Bell-Evans		Friddle-De Yoreo		
Variabes	x_β (Å)	k_{off} (s ⁻¹)	x_β (Å)	k_u (s ⁻¹)	f_{eq} (pN)
$F^*(r), r = k_c v_s$	$F < 150 \text{pN}$				
	7.8	0.02	7.8	0.9	22
	$F > 150 \text{pN}$				
	0.22	316	-	-	-
$F(r), r(t) = k_{app}(t)v_s$	$r < 10^4 \text{pN.s}^{-1}$		0.19	30.1	63
	0.77	3.5			
	$r > 10^4 \text{pN.s}^{-1}$				
	0.41	3.3			
$F^*(r^*), r^* = \max(r(t), F^*)$	$r > 10^{3.5} \text{pN.s}^{-1}$		0.02	41	85
	0.2	15			

Table VI.1 – Résultats obtenus par ajustement des modèles BE et FDY suivant 3 traitements de la vitesse de charge.

Nous constatons que les valeurs obtenues dans chaque traitement peuvent différer de plusieurs ordres de grandeur et dépendent à la fois de la méthode de traitement choisie pour extraire le spectre de force, mais également du modèle utilisé. Concernant les modèles, il est probable que seuls les ajustements sur $F^*(r)$ et $F^*(r^*)$ contiennent encore l'information cinétique. Bien que nous n'en ayons pas la preuve, nous pensons que la dépendance apparente sur l'ensemble des ruptures avec r serait liée à l'élongation de l'agent de couplage. Si les forces de ruptures ne passent par aucun maximum de la probabilité $p(F)$, elles peuvent néanmoins produire un échantillonnage de la courbe d'élongation, dont la tangente dépend également, et induire une réponse non-linéaire caractéristique.

Nous avons évoqué en introduction de cette section l'importance de $t_{off} = 1/k_{off}$

dans la spécificité de l'interaction. Ces valeurs permettent de situer plusieurs systèmes de reconnaissance sur une même échelle, et de les classer en fonction de leur temps de vie. Bien souvent, un temps de vie est élevé (k_{off} faible) est le signe d'une spécificité élevée. Les études mesurant en DFS cette constante dans le cas d'interactions biomolécule/surface inorganique sont rares. Une étude rapportant l'interaction de polypeptides sur surface oxydée [98] a permis de montrer l'existence de deux régimes de dissociation, donnant des constantes de 4.2 s^{-1} à 340 s^{-1} à vitesse de charge faible et élevée respectivement. Dans tels systèmes, les liaisons mises en jeu sont essentiellement non covalentes : hydrogène et Van der Waals. Dans le cas de liaisons covalentes ou donneur-accepteur, il est probable que ces valeurs diffèrent grandement. A titre d'exemple, la dissociation spontanée de liaisons thiol-or à l'interface biomolécule/métal est un phénomène déjà observé, et induisant une stabilité modérée de l'ADN sur nanoparticules d'or. Par ailleurs, les résultats de conductance présentés par l'équipe de Wandlowski [21] ont également suggéré une certaine mobilité de l'azote sur les sites d'or induisant des fluctuations de conductance. Des valeurs élevées de k_{off} pourraient donc correspondre aux interactions amine/or. Concernant les valeurs de x_β , nous pouvons nous représenter cette distance comme la distance d'interaction, ou l'élongation d'une liaison dans le cas amine/or, projetée sur l'axe d'application de la force.

Les couples k_{off} faible, x_β élevé pourraient donc correspondre à l'existence d'une barrière liée aux interactions Van der Waals, et les couples k_{off} élevé, x_β faible aux interactions amine/or. Le modèle BE ajusté sur deux régimes de forces permet cette interprétation. Cependant, nous ne rapportons aucune étude ayant observé l'existence de deux régimes simultanément sondés. Bien que les valeurs de k_{off} diffèrent avec la méthode de calcul de la vitesse de charge, il donne sur $F^*(r)$ et $F^*(r^*)$ 316 s^{-1} et 15 s^{-1} . Le modèle FDY rejoint sur le spectre $F(r)$ des valeurs obtenues à haut régime de rupture ou vitesse de charge élevée. Une interprétation possible serait de considérer qu'à haut régime de force/vitesse de charge, la rupture n'est plus gouvernée par sa probabilité de diffusion à travers la barrière, mais par la dynamique de restauration de l'agent de couplage dF/dz .

VI.4 Caractérisation de l'élongation

Nous terminons ce chapitre par une dernière caractérisation mécanique de notre système, qui est ici présentée en ouverture, en vue d'une implémentation numérique du programme existant ou encore d'une extraction des longueurs caractéristiques du peptide dans le cas où celui-ci posséderait un nombre de résidus plus important (longueur de Kuhn ou longueur de persistance selon le modèle choisi). Nous nous sommes jusqu'à présent intéressé aux forces de rupture de notre système, mais la spectroscopie de force permet également de remonter à d'autres propriétés d'une molécule unique, notamment son élasticité. Compte tenu des dimensions de notre peptide (≈ 2 nm en forme hélicoïdale), la réponse en force observée sera essentiellement celle de l'agent de couplage, et il apparaît raisonnable de considérer le peptide comme une perturbation dans l'élongation du linker. Les courbes seront donc ajustées suivant le modèle couramment employé pour décrire son élongation : le modèle E-FJC (*Extended Freely-joint-chain*). Les travaux de Gaub [1] ont déjà permis d'évaluer les paramètres associés à l'élongation de chaînes de PEG et grand nombre d'équipes modélisent les réponses en force de leur systèmes à partir de ceux-ci, en ne faisant varier que la longueur de contour prise alors indépendante de la longueur de Kuhn. Cependant, des travaux rapportent des fluctuations de ces paramètres [99] qui peuvent devenir critique lorsque ces ajustements sont effectués sur de faibles longueurs de contour. Dans l'étude qui suit, nous mettrons à profit les outils numériques développés pour estimer ces paramètres dans le cas où le linker est couplé à la biotine et lorsqu'il est couplé au peptide.

VI.4.1 Biais liés à l'estimation de L_K

Le modèle E-FJC décrit le comportement élastique entropique de l'élongation des chaînes du polymère PEG jusqu'à sa longueur de contour L_c , ainsi qu'une correction à haut régime de force lorsque l'extension se poursuit au delà de L_c selon l'expression :

$$L(F) = N_s L_k \left[\coth \left(\frac{FL_k}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{FL_k} \right] + \frac{N_s F}{K_s} \quad (\text{VI.5})$$

où $N_s L_k = L_c$ avec N_s le nombre de segments (monomères) du polymère, L_k la longueur de Kuhn d'un segment, $k_B T$ la contribution de l'énergie d'entropie, et K_s la constante de raideur d'un segment. Nous négligerons dans ce qui suit la contribution ΔG des changements conformationnels des chaînes PEG en milieu PBS compte tenu du trop grand nombre de variables libres que sa prise en compte dans l'ajustement introduit. Dans son étude [1], Gaub situe la valeur de L_k à 0.7 nm, avec $K_s = 150$ N/m. Nous avons remarqué qu'en général, sans précautions supplémentaires sur l'ajustement les valeurs obtenues pour L_k tendent à être plus faible, parfois même d'un ordre de grandeur. D'après les travaux de Guo et al. [99], plusieurs facteurs sont à l'origine d'une diminution apparente de L_k . D'une part, la hauteur h à laquelle est fixée le linker au niveau de l'apex diminue L_k d'autant qu'il disperse ses valeurs, d'après simulations sur une gamme de hauteur allant jusqu'à 4.5 nm. Il en va de même pour la position de la ligne de base, qu'ils recommandent de réajuster à 0 aux points immédiats qui succèdent la discontinuité marquant la rupture. D'autre part, le nombre de ruptures simultanées diminue significativement L_k menant à une estimation jusqu'à deux fois inférieure à sa valeur pour deux décrochages simultanés. Expérimentalement, les biais liés aux ruptures multiples peuvent être réduits en utilisant des pointes à faible rayon de courbure, telles qu'employées dans nos expériences sur les modèles MSCT. En revanche, la dispersion des hauteurs d'accroche du linker sur l'apex est dans ce cas augmentée. Une attention particulière devra donc être portée sur ce point lors de nos ajustements.

VI.4.2 Exemple sur PEG(18)-Biotine/Streptavidine

La figure VI.32 référence les courbes de forces rencontrées dans ce système (a),(c),(d) et sur son contrôle (b). La majorité des interactions décrit un signal d'adhésion repoussé à des distances plus élevées, de la longueur de contour de la chaîne tel que présenté sur (a), ou un signal associable au dépliement des chaîne du linker présenté sur (c). La courbe d'élongation du linker n'est donc pas parcourue dans son ensemble. Néanmoins, dans de rares cas ($< 1\%$) une élongation au delà de 200 pN a pu être observée (d), et est parcourue sur l'ensemble des régimes de force que couvre la fonction E-FJC. Les courbes de force en (b), présentent un contrôle réalisé par interaction d'une pointe

non-fonctionnalisée sur streptavidine.

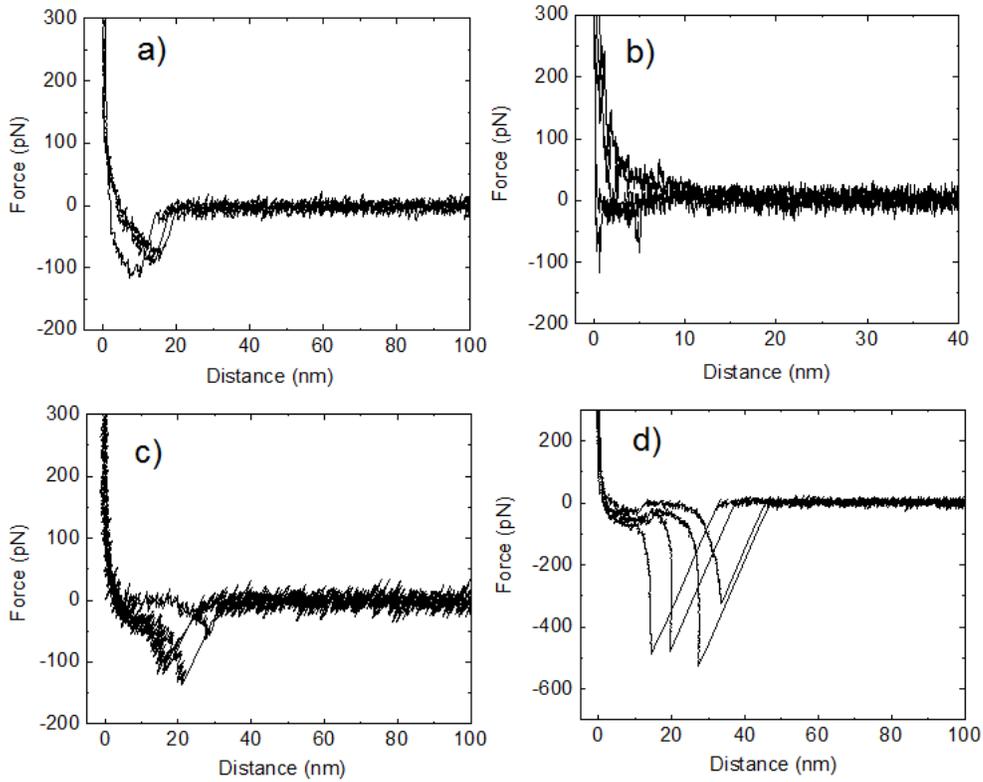


FIGURE VI.32 – Courbes de force réalisées sur a) interaction biotine/streptavidine sans dépliement du linker b), (b) pointe non-fonctionnalisée /streptavidine (contrôle), c) interaction biotine/streptavidine avec dépliement du linker et d) présentant dans cette configuration une élévation complète.

Avant de procéder à l'ajustement, les courbes sont reconstruites à partir de fonctions polynomiales à l'aide d'une fonction qui n'a pas fait l'objet de ces travaux. Cette fonction nécessite que le signal ne subisse pas de brusques variations pour effectuer une reconstruction adéquate, lorsque la courbe est segmentée il est donc possible de l'utiliser. Le signal est découpé en nombre de nœuds (*knots*) entre lesquels la portion de courbe est ajustée par une somme de polynômes choisie de sorte à optimiser la reconstruction. La courbe obtenue est continue et monotone. Cette étape est nécessaire à l'estimation de la longueur de Kuhn. En effet, le domaine d'influence de ce paramètre se situe dans les faibles régimes de force : dans la limite $F \ll f_\beta$, la fonction de Langevin $\coth x - 1/x$ tend vers $x/3$ soit $F/3f_\beta$. Or dans cette gamme de force, le bruit thermique

est non-négligeable et oscille autour de 0 pN menant à des changements de signes locaux de la force qui introduisent à leur tour des changements de signe lors de l'ajustement. La reconstruction permet de fixer le sens de variation, la réponse en force étant monotone lors de l'élongation, et participe à une meilleure convergence de l'ajustement sans qu'il soit nécessaire de contraindre outre-mesure le domaine de variation de L_k autour de sa valeur supposée. La figure VI.33 illustre ce résultat.

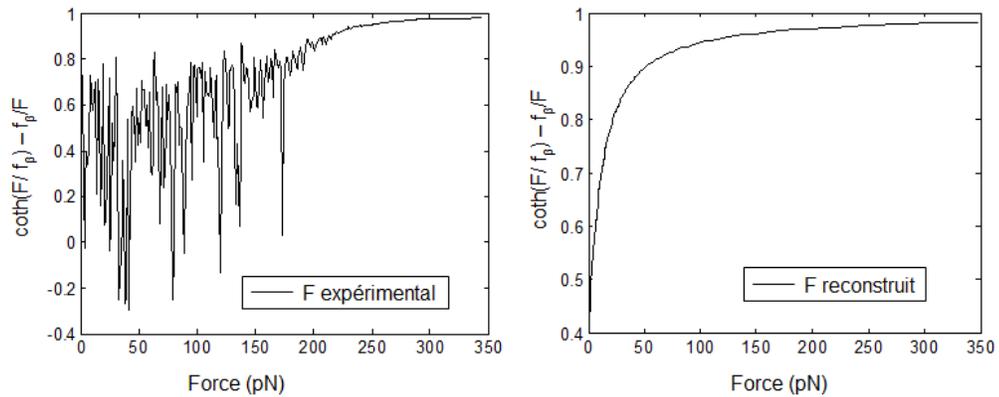


FIGURE VI.33 – Évolution de la fonction de Langevin sur les valeurs de force expérimentales et les valeurs de force reconstruites. Les dispersions observées sur la première courbe entre 0 et 200 pN sont imputables au bruit thermique.

Nous avons mentionné que les biais d'estimation de L_k pouvaient être introduits par la position de l'ancrage du linker vis à vis de l'apex, ainsi qu'une erreur de positionnement de la ligne de base en F . De sorte à limiter l'impact de ces facteurs, nous procédons à une analyse des résidus par variation successive du positionnement de la réponse en force par pas de 0.5 nm - 0.5 pN sur une échelle de variation de $\Delta F = [-10;10]$ pN et $\Delta z = [-10;10]$ nm, selon une méthode utilisée pour l'ajustement des spectres de force. La cartographie figure VI.34 donne un exemple de cette analyse. Lorsqu'un minimum global est trouvé, la valeur de L_k est extraite, et les offsets en force et distance correspondants sont relevés.

Il est intéressant de remarquer sur la cartographie des résidus la présence d'une zone de convergence nette sur ΔF où le minimum est réalisé autour de 6-8 pN, traduisant ici l'existence d'un offset en force quel que soit la longueur de contour supposée. En se fixant sur l'axe 0 nN l'erreur commise peut entraîner une estimation de L_k allant

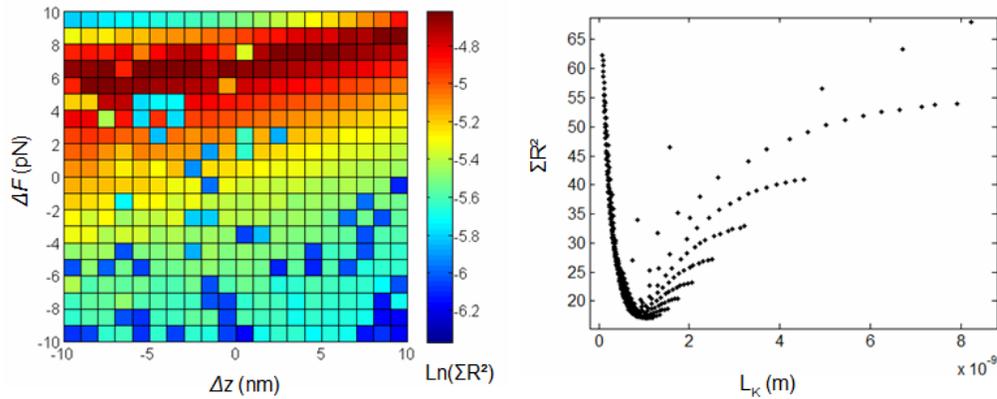


FIGURE VI.34 – Cartographie de la somme résiduelle des carrés pour chaque couple $\Delta F, \Delta z$ et illustration de la convergence vers L_k pour quelques couples. Le minimum est obtenu à un offset de 7 pN et 3nm

jusqu'au double de sa valeur. Également, il est à noter que les valeurs de Δz négatives n'ont pas d'autre sens que celui d'une erreur de positionnement de la courbe lors de sa transformation force-trajectoire piézoélectrique/force-distance. Généralement, les offsets sur cette région sont largement inférieurs à 10 nm, les distances négatives n'ont donc ici aucun sens physique, et à l'avenir ne devront pas être considérées dans l'ajustement. Les distances positives correspondent à une hauteur d'ancrage de l'agent de couplage au niveau de la pointe.

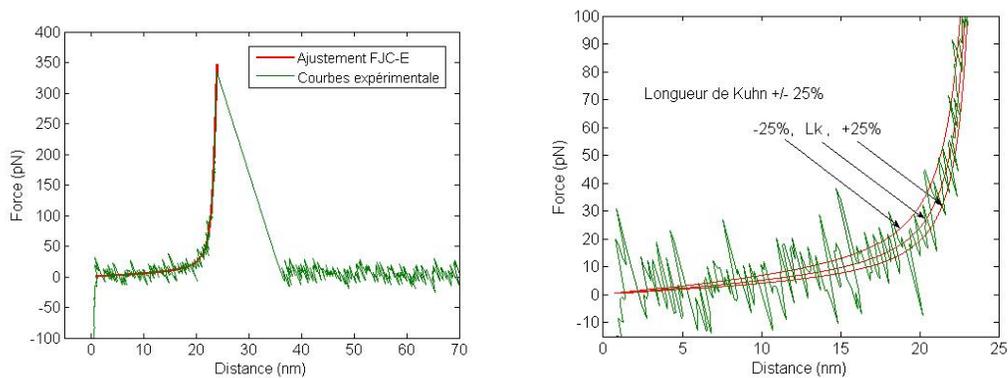


FIGURE VI.35 – Réponse en force du système linker-biotine et ajustement correspondant au modèle d'élongation. La courbe de droite présente un agrandissement de la zone $[0-100]$ pN où la valeur de L_k est modulée à $\pm 25\%$ de sa valeur. Résultats de l'ajustement : $N_s \approx 20$, $L_k = 1.16$ nm.

Sur la réponse en force VI.35, la courbe expérimentale est superposée au résultat de l'ajustement. Dans cet exemple, nous obtenons une longueur de Kuhn de 1.16 nm pour un nombre de segment à $N_s \approx 20$.

VI.4.3 Comparaison avec le système PEG(18)-Peptide

Au total, 9 courbes ont ainsi pu être ajustées sur biotine-streptavidine et 7 sur notre peptide. En toute rigueur, l'ajustement avec le système couplé linker et peptide doit être effectué avec la longueur de contour de chacun de ces éléments, en tenant compte de leur élasticité avec deux longueurs de Kuhn différentes, mais les dimensions du peptide ne permettent pas de justifier une description où son comportement serait décrit par celui d'une chaîne gaussienne. Une seule longueur de Kuhn est donc extraite pour l'ensemble PEG-peptide. La figure VI.36 synthétise les résultats qui ont été obtenus sur ces deux systèmes.

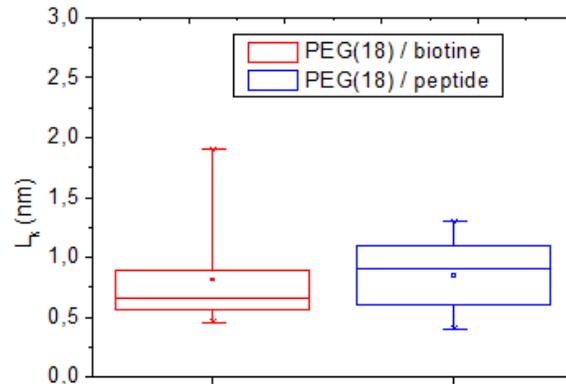


FIGURE VI.36 – Diagramme en boîte de Tukey représentant le résultat de l'ajustement suivant le modèle E-FJC pour la longueur de Kuhn L_k sur le système PEG(18)-biotine (9 courbes) et PEG(18)-peptide (7 courbes).

Les diagrammes en boîte de Tukey permettent une visualisation rapide des paramètres statiques. La barre centrale correspond à la valeur médiane (soit la moyenne pour une distribution normale), et la dimension de la boîte est fixée par les valeurs comprises entre le premier quartile (25% des valeurs) et le troisième quartile (75% des valeurs). La moyenne de L_k se situe à 0.65 nm pour le système PEG(18) biotine et à 0.91 nm pour le système PEG(18) peptide. Ces valeurs sont cohérentes avec l'élonga-

tion de l'agent de couplage. En effet, les travaux de Gaub ont permis d'établir que la longueur de Kuhn de chaînes PEG se situe à 0.7 nm [1]. Pour le système PEG-peptide, nous constatons néanmoins un léger écart, mais dont l'origine peut aussi bien provenir de sa contribution que d'un sous-échantillonnage des données.

Il serait intéressant d'observer si cette tendance se vérifie par une augmentation de cette statistique au automatisant ce traitement dans la routine numérique déjà développée. Également, nous suggérons en ouverture qu'une étude sur des chaînes peptidiques plus longues en milieu promoteur d'hélice α devrait permettre de quantifier l'élasticité pour cette séquence, et de la comparer avec les longueurs de persistances obtenues sur ce type de système.

VI.5 Conclusion

Au travers de ce chapitre, nous avons vu que sur un système biologique simple, un oligopeptide CK(AAAAK)₂C interagissant avec une surface d'or nu, une variété considérable de ruptures était obtenue. L'association d'un traitement de sélection adapté, d'une statistique pertinente et d'une chimie de surface contrôlée s'est révélé une combinaison efficace pour mettre en lumière les voies d'interactions accessibles à notre système.

VI.5.1 Forces de rupture en milieu tamponné

La mise en évidence des forces de ruptures les plus probables F^* et leur attribution aux groupements fonctionnels du peptide était l'un des aspects critique de ce chapitre. D'autant que la littérature n'offrait que peu de consensus sur ces interactions qui, nous l'avons vu, couvrent une gamme de force considérable.

Interactions non-covalentes : Nous avons observé une première voie d'interaction, dont les forces F sont inférieures à 100 pN. Cette voie, bien que majoritaire, peut être attribuée à des interactions non-covalentes, et provient probablement de l'interaction de l'agent de couplage avec la surface selon nos contrôles. Lors de la fonctionnalisation, la concentration en peptide est volontairement fixée très faible (μM) de sorte à obtenir en bout d'apex une majorité d'agents de couplage libres, et seulement quelques peptides, un seul idéalement. Il n'est donc pas surprenant que l'interaction majoritaire soit celle de l'agent de couplage.

Interactions des groupements fonctionnels : Nous avons ensuite observé trois interactions à 178 pN, 431 pN et 705 pN. Les contrôles réalisés par variation de pH nous ont permis d'attribuer ces contributions aux groupements amines, en montrant une modulation du nombre d'interactions par variation du ratio $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$. Cette attribution se trouve confirmée dans la littérature. L'étude bibliographique a soulevé de nombreuses questions quant à l'ordre de grandeur attendu pour ces forces. Nous y apportons un élément de réponse. En C-AFM, les mesures réalisées par l'équipe

de Venkataraman sur la putrescine (butane-1,4-diamine) et l'hexaméthylènediamine donnaient respectivement 690 pN et 620 pN. Sur la para-phenylènediamine, ils obtenaient 530 pN. L'étude de Wandlowski sur 4,4-(éthyne-1,2-diyl)dianiline donnait 600 pN. En C-AFM, ces mesures ont été réalisées pour une statistique de l'ordre de 10^4 courbes à minima. En spectroscopie de force avec pointe fonctionnalisée, Gaub obtient sur l'adénosine 150-170 pN. La statistique dans ce domaine est plutôt généralement de l'ordre de quelques centaines de courbes, voire de la dizaine. En regroupant un grand nombre de systèmes fonctionnalisés, nous avons obtenu une statistique similaire aux expériences C-AFM, et observé l'ensemble de ces signatures. Nous émettons donc l'hypothèse que l'estimation de l'ensemble des forces de rupture est fortement dépendante de la statistique, que celle-ci en spectroscopie agit comme un filtre qui ne permet pas de recouvrement avec les mesures couplées en conductance tant que celle-ci se trouve à deux ordres de grandeur supérieure. Nous avons également attribué la force observée à 431 pN aux groupements amines, compte tenu de son occurrence. Néanmoins, l'interaction de l'acide carboxylique avec l'or n'a, par manque de données disponibles sur le sujet en AFM, pas été discutée. Nous ajoutons donc un bémol sur ce pic, duquel nous ne pouvons écarter avec certitude la contribution de l'acide carboxylique. Nous terminons avec la liaison soufre-or, qui bien qu'attendue n'a été que rarement observée. Les mesures réalisées dans un agent promoteur d'hélicité ont mené à une augmentation des interactions amine/or, mais n'ont pas permis d'incriminer la conformation du peptide dans l'absence régulière de cette interaction. Il est également impossible de mettre en cause la sélectivité de l'or, car plusieurs résultats réalisés en XPS sur GSH (glutathion) montrent une adsorption préférentielle *via* une liaison S-Au. Nous émettons donc l'hypothèse qu'un encombrement stérique au niveau de la cystéine bloque cette interaction.

VI.5.2 Spectroscopie de force dynamique

Nous avons également poursuivi cette étude à plusieurs vitesses de charge. L'observation de deux modes simultanément sondés sur les spectres $F^*(r)$ nous a conduit à explorer diverses méthodes de détermination de la vitesse de charge, notamment par la prise en compte de la contribution de l'agent de couplage dans l'expression de la

constante de raideur apparente. Malgré les difficultés d'interprétation qu'amène cette étude, nous concluons qu'à vitesse de charge constante, deux modes d'interaction sont simultanément sondés. Compte tenu du caractère marginal de cette interprétation, nous considérons le cas où cette vitesse de charge est variable. Ainsi, une tendance unique est observée, dont les paramètres cinétiques rejoignent ceux à haut régime de rupture ou vitesse de charge élevée. La correspondance des valeurs obtenues pour x_β et k_{off} sur le modèle Friddle-De Yoreo où l'ensemble des couples $F(r)$ était traité, avec les valeurs obtenues dans le modèle Bell-Evans à vitesse de charge élevée où F^* était conservé indiquerait potentiellement que sur des forces de rupture élevées, la rupture n'est elle-même plus gouvernée par sa probabilité de diffusion à travers la barrière, mais échantillonne la courbe d'élongation de l'agent de couplage suivant un comportement non-linéaire en dF/dz .

VI.5.3 Ajustement des réponses en force

Nous finissons ce chapitre sur une ouverture possible quant à la continuité de ce projet. Nous avons vu que l'extraction de la longueur de Kuhn requiert certaines précautions, que ne permet probablement pas un simple ajustement où l'ensemble des paramètres N_s , K_s et L_K sont laissés libres. En effet, la position relative au niveau de l'apex ainsi que la dispersion induite par l'agitation thermique aux faibles régimes de force où la contribution de L_K est importante peut mener sur des longueurs de linker aussi faibles à des problèmes de convergence, et induire une mauvaise estimation de L_K . Une analyse de résidus similaire à celle conduite lors des ajustements de spectres de force a permis de contourner ce problème, et d'obtenir des valeurs pour L_K en accord avec la littérature, et présentant une dispersion attendue. Concernant notre peptide, l'extraction de la longueur de Kuhn ne peut être réalisée avec un ajustement sommant deux longueurs de contour suivant un modèle de type E-FJC. En effet, notre peptide ne dispose que de deux pas d'hélice, ce qui ne permet pas décrire son comportement par celui d'une chaîne gaussienne. Nous avons donc préféré réaliser nos ajustements en considérant notre peptide comme une perturbation dans la chaîne de l'agent de couplage, et comparé les différences de distribution avec celles obtenues sur linker-Biotine/Streptavine (considérant dans ce cas la biotine comme un objet ponc-

tuel). Il serait intéressant de pouvoir caractériser à l'aide des routines mises en place l'élongation de notre peptide sur un motif plus élevé, avec une longueur de chaîne nettement supérieure à celle de la chaîne PEG du linker de sorte à pouvoir extraire sa longueur de Kuhn suivant un modèle E-FJC à deux contributions.

Chapitre VII

Caractérisation électrique de l'interaction Peptide/Or

Nous présentons dans cette partie la mise en œuvre d'une seconde technique de champ proche en vue d'obtenir une signature sur des jonctions individuelles or-Peptide-or au moyen de mesures de conductance. Nous exposerons les résultats obtenus sur les jonctions de référence Au-Au, Au - 1,8-octanedithiol - Au et la jonction Au - peptide - Au. Dans le cas de jonctions moléculaires, le substrat d'or est fonctionnalisé par la molécule d'intérêt à des faibles taux de recouvrement, obtenus via des solutions faiblement concentrées ($10^{-6} \mu\text{M}$) suivant un protocole décrit au chapitre 4. Une section sera réservée aux mesures couplées dans une configuration où le peptide est embarqué dans une matrice de thiols. L'expérience est réalisée sur un mode similaire au force-volume en AFM. Une tension V , généralement prise à 100 mV, est appliquée entre l'échantillon et la pointe (AFM conductrice ou STM). Plusieurs cycles d'approche/retrait sont réalisés suivant un mode similaire au Force-Volume. La position en X ou Y est variée de 10 nm à chaque mesure, réalisant ainsi un quadrillage allant de 100×100 nm à $1 \times 1 \mu\text{m}$ selon le nombre de points. En STM, le courant est relevé en fonction de la distance après quelques nm d'indentation sur des rampes de longueurs variables. La consigne amorçant le retrait du piezoélectrique est fixée sur la distance. Les courbes $I(z)$ sont acquises en Labview et traitées en Matlab via une routine non-développée dans ces travaux. Le STM a été utilisée principalement pour les contacts atomiques Au-Au. En

C-AFM, à la fois la force et le courant sont contrôlés. La valeur de consigne sur laquelle le piézoélectrique inverse la trajectoire peut être fixée sur la force d'appui ou un courant de saturation. Nous verrons cependant que la réalisation d'un contact électrique à chaque cycle est loin d'être garantie, et imposer une consigne sur le courant peut dans ces conditions mettre en péril la pointe dès lors qu'aucun courant n'est détecté. La rampe de balayage en C-AFM sera plus grande qu'en STM, précisément parce que la consigne est fixée sur la force, et que celle-ci est plus sujette à fluctuations sur de faibles distances. Des rampes inférieures à 10 nm ne permettent pas une déflexion suffisante pour que le point de contact ne soit fixé. Les courbes $F(z)$ - $I(z)$ sont acquises par le logiciel constructeur Nanoscope, et traitées sur Matlab via deux routines présentées dans la section Méthodes numériques.

VII.1 Jonction Or-Or

VII.1.1 Configuration STM

Ces mesures ont été réalisées sur un appareil STM monté en laboratoire dans de précédents travaux. Les pointes utilisées sont conçues en laboratoire suivant un protocole décrit dans le chapitre 4. Les courbes sont acquises à l'air à une tension de $V_{bias} = 0.1$ V. Les vitesses d'approche et de retrait sont ici de 20 nm/s et la fréquence d'échantillonnage est prise à 1kHz. Lorsqu'un contact est établi, l'amplificateur de courant atteint sa tension de saturation. Le contact est maintenu pendant un délai en surface de 1s avant rétractation. Un temps de 10 ms est fixé entre chaque cycle. A partir de la fréquence d'échantillonnage et de la vitesse, la rampe est convertie en nm. Le courant en sortie est converti en tension, puis les valeurs sont ré-exprimées en multiples de G_0 suivant $I = NG_0V$, où $G_0 = 77.6 \mu S$.

Sur la figure VII.1 (a) sont présentés quelques exemples de paliers de conductance. Les longueurs de ces paliers sont assez variables, mais sont généralement comprises entre 0.1-1 nm révélant ainsi l'élasticité de la jonction. L'histogramme réalisé sur plus de 10.000 courbes brutes sans tri présente une signature marquée en G_0 ainsi qu'à ses multiples.

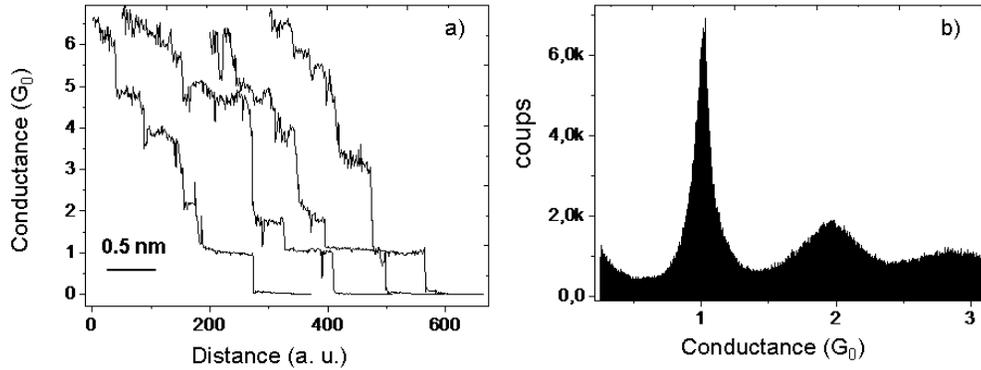


FIGURE VII.1 – Courbes de conductance sur jonction atomique or-or(a) et histogramme réalisé sur 10204 courbes en STM (b) ($V_{bias} = 0.1V$).

En STM, des contacts atomiques reproductibles ont pu être observés. Néanmoins, ces mesures nécessitent une grande stabilité mécanique, et notre instrumentation apporte un bruit mécanique intermittent qui ne permet pas à l’heure actuelle d’obtenir un signal sur molécule unique de façon contrôlée. Les mesures de contrôle sur jonction moléculaire seront donc effectuées directement en C-AFM. Une amélioration possible serait d’équiper le système d’une table optique anti-vibratoire.

VII.1.2 Configuration C-AFM

En C-AFM, les mesures sont effectuées avec une pointe préalablement métallisée. En première approche, deux catégories de leviers ayant différentes constantes de raideur ont été testés pour déterminer l’impact de la constante de raideur sur la stabilité de la jonction. La constante de raideur agit directement sur la sensibilité de la mesure de force, et des leviers souples peuvent être préférables en vue de l’observation d’un dépliement, où les ruptures de liaisons H isolées n’excèdent pas quelques dizaines de pN en ordre de grandeur. Une première indication nous est fournie dans les travaux réalisés par Frei et al. [100] qui rapportent une diminution de la stabilité de la jonction sur des leviers souples. Selon leurs observations, des leviers à 1 N/m sont trop souples pour induire une rupture or-or de façon contrôlée, la torsion induite au moment de la rupture étant trop grande pour que la jonction ne soit mécaniquement stable. La rupture interviendrait alors de façon spontanée. Il est probable qu’une condition liant

le gradient des forces appliqué au levier au moment de la rupture avec la constante de raideur de la liaison soit à l'origine de cette perte de stabilité.

Leviers rigides [28-45] N/m : Les mesures suivantes ont été effectuées à l'air pour une vitesse d'approche de 200 nm/s et de retrait à 40 nm/s, sur 100 nm de rampe, et sont échantillonnées à 20×10^3 points. Deux jeux de donnée ont été exploités. Dans le premier jeu, le seuil de déclenchement du retrait est fixé sur la force d'appui, prise dans ces expériences à 100 nN pour $k = 45$ N/m et 1 μ N pour $k = 28$ N/m. Cette force est fixée par la distance d'indentation à laquelle un contact électrique est établi. Dans le second jeu, la perte progressive du contact électrique ne permet plus de fixer ce seuil sur la force, celui-ci intervenant dans des gammes de déflexion hors de la plage de détection de la photodiode. Le seuil est donc fixé sur le courant à 600 nA.

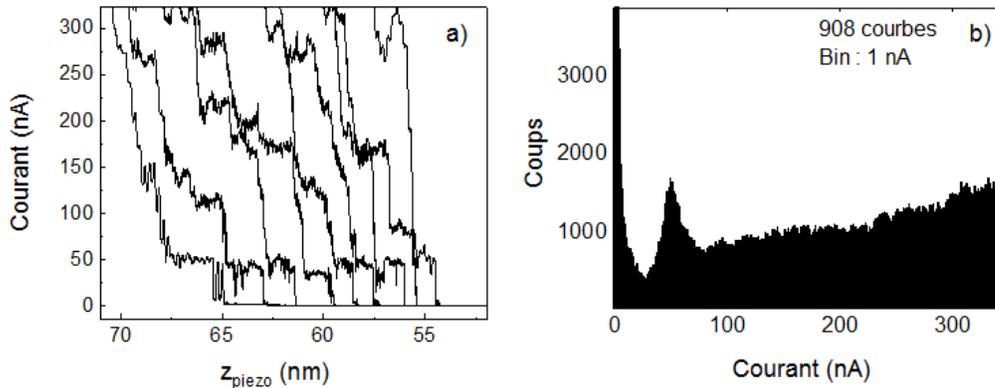


FIGURE VII.2 – Courbes de conductance sur jonction atomique or-or(a) et histogramme réalisé sur 908 courbes en C-AFM (b) regroupant $k = 28$ N/m et 45 N/m. Le déclenchement est fixé sur la force d'appui.

En jonction atomique, les courants mesurés sont de l'ordre du μ A à $V_{bias} = 100$ mV, ce qui nous place à la limite haute de la gamme de détection en courant (100nA/V). Sur jonction atomique nous travaillerons donc à faible tension (10 mV). Dans ces gammes, le bruit est important et peut amener à des fluctuations sur V_{bias} qui seront également amplifiées sur le courant. Nous sommes également proche de l'offset en tension de l'appareil. Une différence entre V_{bias} et la tension effectivement perçue

au niveau du substrat peut être observée. Pour une tension de 10 mV, 1.8 mV sont mesurés au niveau du substrat. Nous nous baserons donc sur la fréquence d'observation du palier en conductance pour déduire la présence de contacts atomiques. Les courbes de conductance présentées sur la figure VII.2 montrent une contribution reproductible à 50 nA, également prononcée sur l'histogramme. En associant cette valeur à G_0 , la tension réellement appliquée au niveau du substrat est de 0.6 mV soit une tension localement inférieure d'un facteur 3 à celle mesurée. L'absence de pic secondaire ne garantit pas l'attribution.

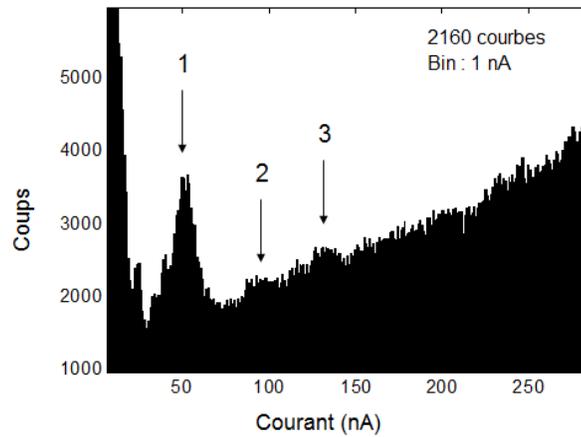


FIGURE VII.3 – Histogramme réalisé sur 2160 courbes en C-AFM à $k = 45$ N/m. Le déclenchement est fixé sur le courant. Les pics secondaires correspondent au nombre d'atomes assurant encore la conduction.

Lorsqu'au fil des acquisitions, une chute en courant progressive depuis sa valeur de saturation est amorcée, nous pouvons nous risquer à travailler sur le courant dès lors que la pointe ne sera pas ré-utilisée. L'histogramme VII.3 est réalisé sur un nombre de courbes plus conséquent, ce qui permet une meilleure définition des pics associables à la rupture des 3, 2 et du dernier atome d'or maintenant encore la jonction. Cette signature est donc attribuable à G_0 . La forte atténuation de ces pics ainsi que leur élargissement peuvent être attribués aux fluctuations de la tension, attendues sur des gammes inférieures au mV.

Leviers souples 5 N/m : Ces courbes sont acquises dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment, à l'exception de la vitesse de retrait, fixée à 80 nm/s. Dans ces acquisitions, la force d'appui est fixée à 2 μN , force d'indentation à laquelle un contact électrique est finalement obtenu. Dès lors qu'une chute en courant intervient, le déclenchement est effectué sur le courant de sorte à augmenter notre statistique. Ces forces étant conséquentes, nous observons rapidement une dégradation du contact.

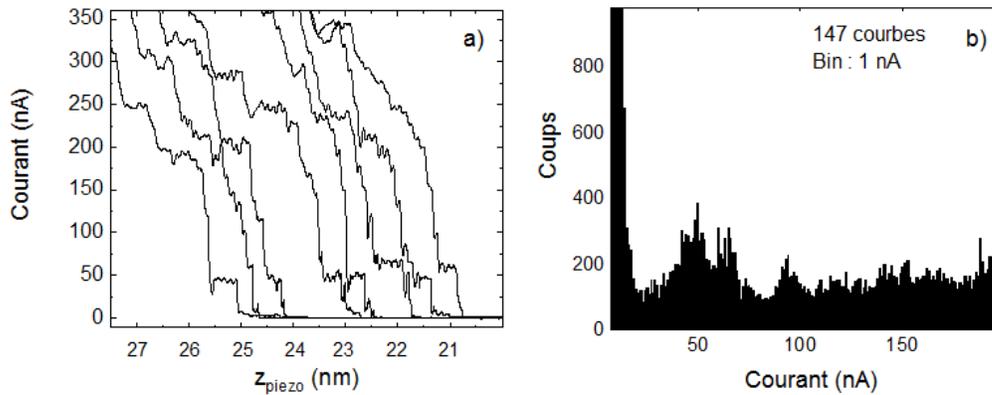


FIGURE VII.4 – Courbes de conductance sur jonction atomique or-or(a) et histogramme réalisé sur 147 courbes en C-AFM (b) à $k = 5 \text{ N/m}$.

Les courbes de conductance sur la figure VII.4 (a) montrent la présence de plateaux à 50 nA confirmés par l'histogramme (b). Le faible nombre de courbe couplé aux possibles modulations de tension contribue à une diminution de la définition des pics. Malgré la statistique, le signal est encore marqué.

VII.2 Jonction Or-1,8-octanedithiol-Or

Sur jonction moléculaire, l'ordre de grandeur des paliers se situe autour de $10^{-4}G_0$, les courants détectés sont de l'ordre du nA à $V_{bias}=100 \text{ mV}$, ce qui nous situe dans la gamme de mesure de l'appareil. Sur la jonction or-1,8-octanedithiol-or, deux familles de conductance sont attendues, dépendant du degré de coordination de l'atome d'or à la rupture :

1. un mode H avec des multiples à $G = 2.5 \times 10^{-4}G_0 = 19.4 \text{ nS}$,

2. un mode L avec des multiples à $G = 0.52 \times 10^{-4} G_0 = 4 \text{ nS}$.

Ces mesures ont été réalisées à l'air. Des acquisitions dans le tétradecane ont été effectuées mais la statistique associée ne permet pas de traitement.

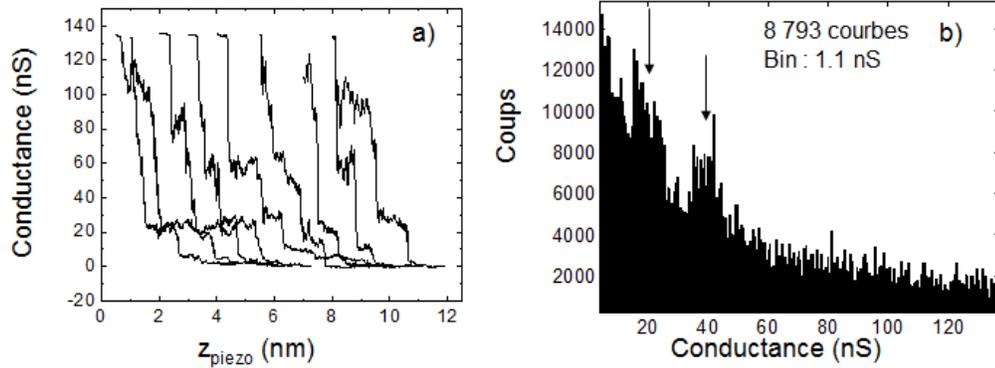


FIGURE VII.5 – Courbes de conductance sur jonction atomique or-1,8-octanedithiol-or en C-AFM à $k = 24 \text{ N/m}$ (a) et histogramme réalisé sur 11 746 courbes reconstruites (b).

Le déclenchement est fixé sur la force d'appui, à $F = 7.3 \text{ }\mu\text{N}$. Les plateaux de conductance VII.5 (a) présentent une dispersion assez élevée dont nous tenons compte lors du traitement de données. Un premier tri manuel est effectué pour exclure les courbes présentant une contribution non attribuable à l'ODT ou à une décroissance tunnel. Malgré ce tri, la dispersion des plateaux est encore trop importante pour qu'ils contribuent significativement dans l'histogramme. Les courbes restant sont donc reconstruites suivant une méthode décrite dans le chapitre 5. Sur la figure VII.6, nous présentons deux histogrammes réalisés sur cette jonction avant et après reconstruction.

Les fluctuations observées sur la conductance sont prises en compte lors de cette étape en choisissant une tolérance sur la déviation standard au niveau du plateau à 50 fois la déviation du bruit électronique. A 1.8 pA , ce seuil correspond à 0.9 nS de variation tolérée. La figure VII.7 présente quelques exemples de courbes traitées à partir desquelles l'histogramme a été construit.

Sur l'histogramme VII.5, nous observons deux contributions corrélables à la signature en conductance H, autour de 20 nS et plus nettement visible à 40 nS . Les

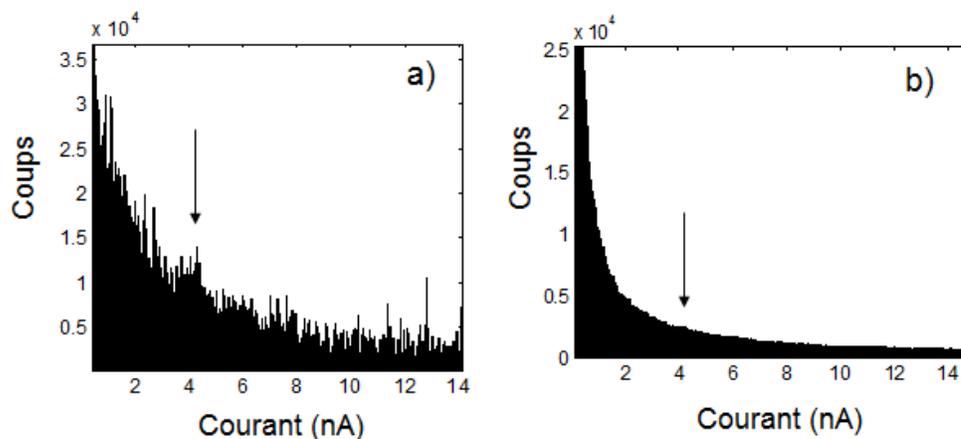


FIGURE VII.6 – Histogramme avec reconstruction des courbes (a) et sans reconstruction (b) sur jonction or-1,8 octanedithiol-or. Une contribution à 4 nA peut ainsi être observée.

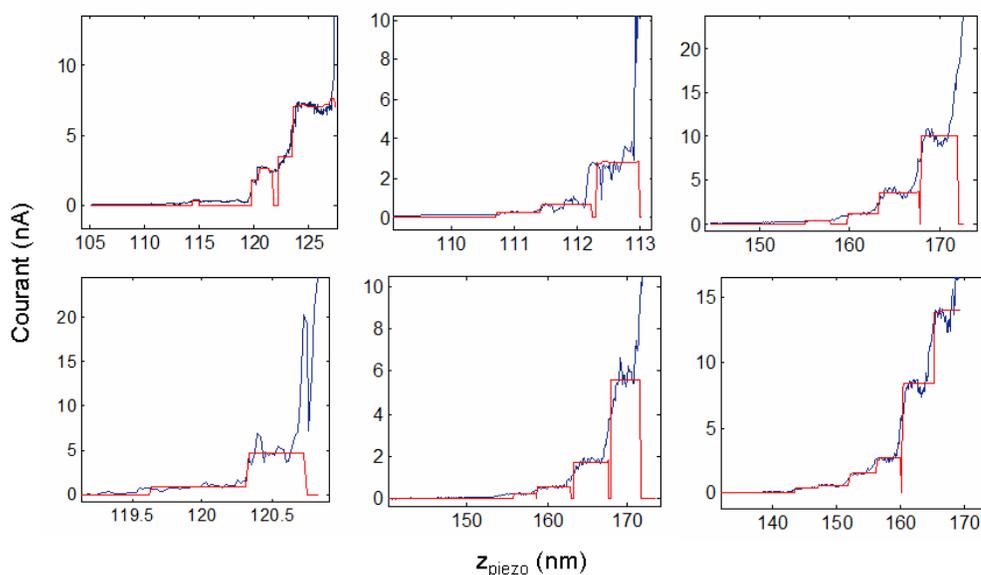


FIGURE VII.7 – Courbes de conductance sur jonction moléculaire or-1,8-octanedithiol-or reconstruites.

contributions L à plus faibles conductance ne sont pas suffisamment représentées pour ressortir dans l'histogramme. La sélection manuelle associée à une reconstruction est donc efficace dans le traitement de ces courbes, mais cela nécessite encore la connaissance préalable de la conductance de la jonction. Sans tri, seule la signature à 40 nS

est faiblement observable.

VII.3 Jonction Or-Peptide-Or

VII.3.1 Conductance

Nous présentons ici les résultats obtenus sur la jonction or-peptide-or à 100 mV de bias. L'histogramme obtenu pour cette jonction sur la figure VII.8 montre une dispersion notable des valeurs de conductance, provenant d'une multiplicité de paliers observée sur les courbes. La figure VII.9 illustre la dispersion de ces plateaux.

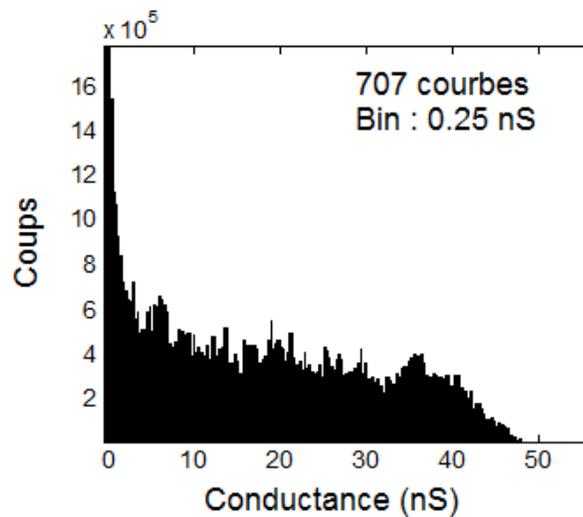


FIGURE VII.8 – Histogramme sur jonction moléculaire or-peptide-or réalisé sur 707 courbes.

Nous remarquons néanmoins sur quelques paliers la présence d'une signature à faible valeur de conductance (< 0.5 nA, soit à 100 mV 5 nS) dont l'ordre de grandeur corrèle avec celui obtenu par Scullion et al. [7] de 1.7 nS sur des dimensions d'oligopeptide similaires. Néanmoins, la fréquence d'apparition de ces plateaux n'est pas suffisante pour qu'ils contribuent significativement sur nos histogrammes parmi les autres signatures.

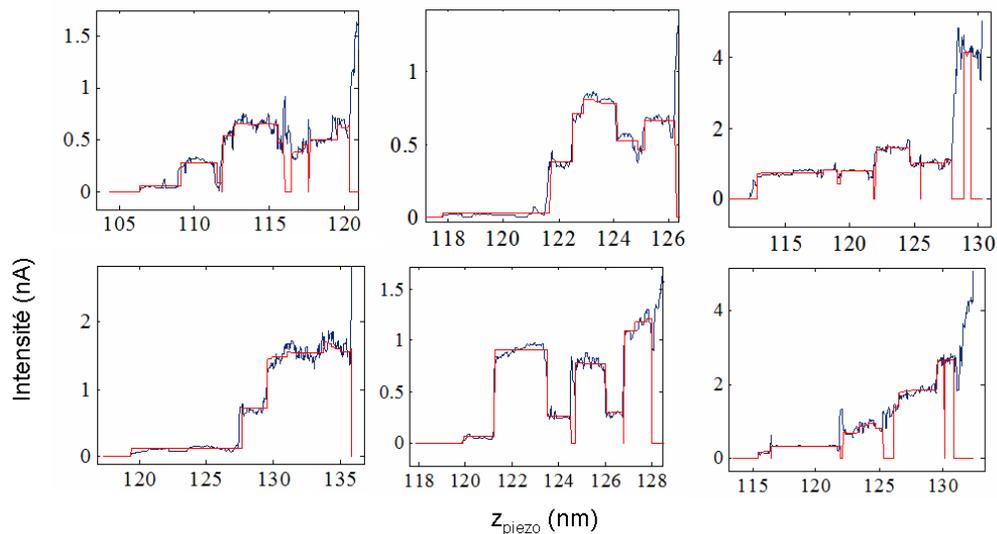


FIGURE VII.9 – Courbes de conductance sur jonction moléculaire or-peptide-or reconstruites illustrant la dispersion des plateaux.

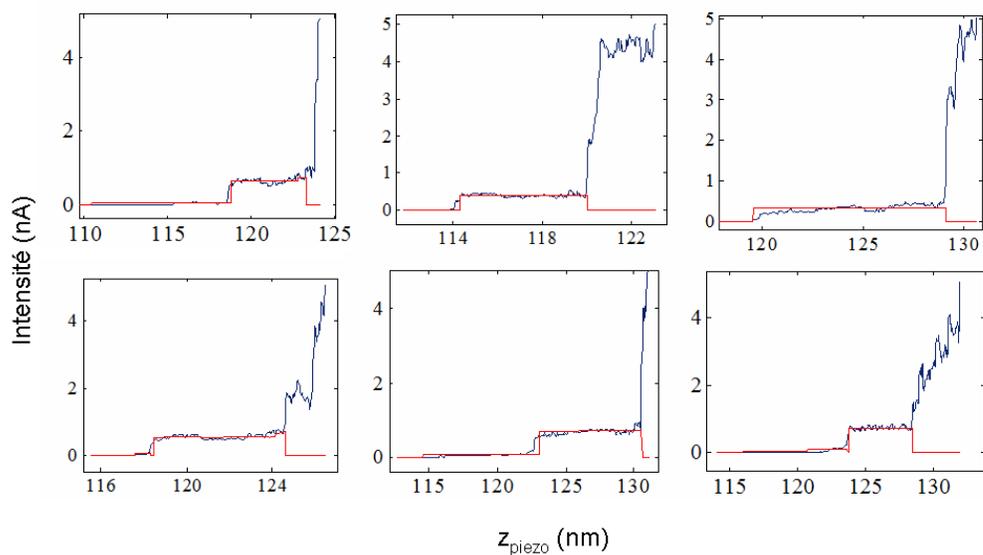


FIGURE VII.10 – Courbes de conductance sur jonction moléculaire or-peptide-or reconstruites sur plateaux de faible conductance.

VII.3.2 Mesures couplées

Les résultats présentés en conductance ne sont pas représentatifs de la majorité des expériences qui ont été conduites. Sur jonctions moléculaires en C-AFM, un maintien

du courant est obtenu sur quelques courbes, puis une chute intervient dont les origines seront discutées plus loin. Un contact peut être à nouveau obtenu mais nécessite d'imposer des forces d'appui conséquentes, de plusieurs dizaines de nN, et déplace le point de contact en courant du point de contact en force de plusieurs nm. Ces mesures ont ici été réalisées dans le tétradécane. Nous présentons sur la figure VII.11 deux cartographies réalisées sur SAM mixte de dodécane-thiol(DDT)/peptide, et sur surface fonctionnalisée avec le peptide. Ces cartographies représentent l'ensemble des interactions.

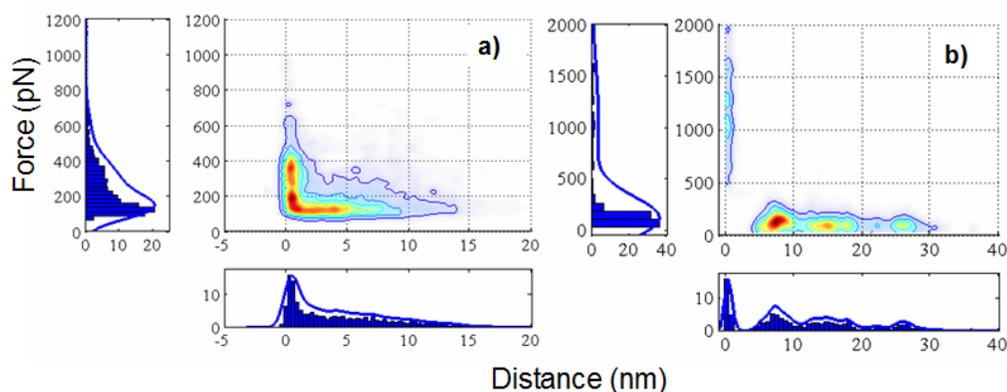


FIGURE VII.11 – Cartographies sur (a) surface d'or mixtes DDT/peptide (1506 courbes) et (b) surface d'or à faible taux de recouvrement en peptide (1126 courbes)

Aucun tri n'est effectué car nous ne sommes pas dans les conditions où un agent de couplage a été introduit. Nous retrouvons pour chacune de ces deux configurations de jonction des forces de rupture F^* similaires à celles obtenue en spectroscopie de force lorsque les distributions sont uni-modales : 192 pN (a) et 145 pN (b).

La figure VII.12 illustre quelques courbes présentant les problèmes que nous avons énoncé. Dans les mesures couplées (a) et (b), nous observons une chute progressive du courant avec absence de saturation, signifiant que la jonction devient progressivement isolante. Plusieurs raisons peuvent en être à l'origine.

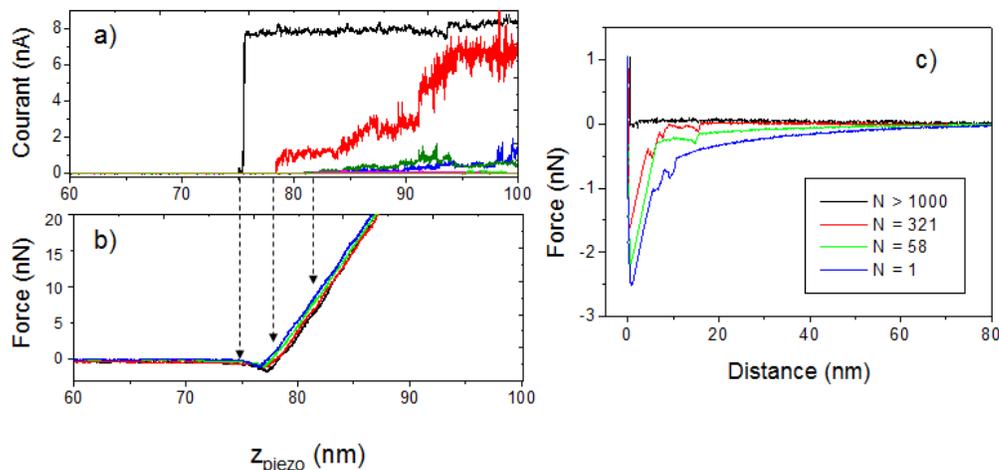


FIGURE VII.12 – Courant (a) et force (b) couplées sur surface à faible taux de recouvrement de peptide sur levier rigide (21 N/m) et (c) force collectée sur levier intermédiaire (0.3 N/m). La figure (c) présente une illustration du recouvrement progressif de la pointe au fil des acquisitions.

Fluctuations de résistance : La résistance de l'échantillon peut augmenter en cours d'expérience. La continuité du contact entre l'échantillon et son support est réalisé par une soudure à l'arc sur un fil de tungstène. En milieu liquide non-conducteur, des fluctuations de résistance sont susceptibles d'intervenir si le fil réalise un contact insuffisant, ou au contraire trop important avec le substrat (la couche d'or est localement altérée et le mica n'est pas conducteur). Les fluctuations de résistance étant de plusieurs ordres de grandeurs, elles se traduisent généralement par une chute immédiate, ainsi qu'une absence de courant par augmentation de la force d'appui.

Dégradation du recouvrement de la pointe : Lorsqu'en revanche, un courant marqué par une saturation nette est obtenu, mais qu'il nécessite que des forces d'appui croissantes soient appliquées pour le maintenir, la résistance de l'échantillon n'est pas en cause, et le problème provient du levier. En effet nous avons observé dans quelques cas de figure une diminution progressive du nombre d'interactions couplé à une diminution des forces électrostatiques, que nous supposons liées à une dégradation du recouvrement. Une seconde hypothèse serait qu'un recouvrement progressif de la pointe par le peptide s'effectue, jusqu'à ce que les charges au niveau du substrat et de

la pointe soient équilibrées. Néanmoins, ce point est invérifiable. Dans la figure VII.12 (c), des courbes prises à différents intervalles illustrent ce problème.

VII.4 Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons vu qu'il était possible en C-AFM de réaliser une jonction électrique or-molécule-or. Des paliers de conductance ont pu être observés pour la jonction or-or à une statistique suffisante. En jonction moléculaire cependant, un tri manuel préalable des courbes présentant des plateaux est nécessaire. Malgré cela sans traitement supplémentaire, ils ne contribuent pas suffisamment dans les histogrammes. Nous avons donc contourné ce problème en reconstruisant les plateaux, de sorte à diminuer leur dispersion.

Concernant les forces de rupture en C-AFM, nous retrouvons sur la jonction or-peptide-or des ordres de grandeur déjà rencontrés en AFM-DFS. Nous notons néanmoins que la rupture soufre-or n'a que très rarement été observée. Des études préliminaires réalisées sur ocanedithiol ont montré dans notre cas que les ruptures obtenues étaient toujours inférieures à 1 nN, ce qui pose la question des constantes de raideur des leviers. Comme évoqué dans les travaux de Frei et al. [100], des leviers souples pourraient ne pas être de bons candidats pour quantifier des ruptures élevées, comme S-Au. Des travaux rapportent que la constante de raideur de cette liaison doit se situer autour de 150 N/m [101] (estimée en spectroscopie Raman à partir du mode d'élongation *stretch* à 1.46 mdyne/Å soit $k_{S-Au} = 146$ N/m). La constante de raideur k_{S-Au} est également le gradient des forces que percevra la pointe lorsque la jonction sera mise en tension. Nous émettons donc l'hypothèse que lorsque le gradient des forces s'exerce au niveau de la pointe excède sa constante de raideur propre, alors nous atteignons une zone d'instabilité mécanique.

Concernant les mesures couplées, plusieurs problèmes se sont posés. La question des leviers semble à nouveau être le point sensible de ces mesures. D'après les travaux réalisés par Frei, des contacts reproductibles peuvent être obtenus à constante de raideur élevée, et dans une configuration où la pression est exercée par un plan, et non une pointe. Ainsi, la dégradation de la pointe peut être minimisée, et des forces d'appui plus élevées peuvent être appliquées de sorte à renouveler le contact si un recouvrement par la molécule s'opère.

Chapitre VIII

Mise en œuvre de la spectroscopie TERS sur rotaxanes

Les études précédentes ont soulevé des questions vis-à-vis de l'orientation et de la conformation des systèmes étudiés. La comparaison entre courants et forces de rupture a déjà donné des informations intéressantes. Dans ce cadre, les spectroscopies vibrationnelles représentent également une alternative possible. Toutefois, la résolution R d'un microscope optique est limitée par le critère de Rayleigh :

$$R = \frac{1.22\lambda}{NA} \quad (\text{VIII.1})$$

où NA est l'ouverture numérique de l'objectif. Par conséquent, il est impossible d'obtenir des informations à l'échelle d'une seule entité directement. Une première alternative est d'avoir recours à des sondes fluorescentes. Une deuxième, qui est celle que nous allons explorer, est de coupler spectroscopie vibrationnelle et expériences de champ proche. Ci-dessous, nous présenterons les deux approches possibles pour acquérir un spectre vibrationnel local. Ensuite, nous mettrons en œuvre la stratégie TERS (*Tip Enhanced Raman Spectroscopy*) sur un système de référence, puis sur une molécule géante. Ce travail constitue un préambule à l'étude de systèmes biologiques.

VIII.1 Signature vibrationnelle en champ proche

VIII.1.1 Approche photothermique : AFM-IR

Cet outil (développé par Alexandre Dazzi à Orsay et commercialisé par la société Anasys) vise à coupler la spectroscopie infrarouge (IR) à la microscopie à force atomique. La figure VIII.1 illustre son fonctionnement. Lorsque le faisceau infrarouge est absorbé par l'échantillon, un échauffement local se produit. La dilatation résultante excite mécaniquement le levier AFM. Par conséquent, le suivi transitoire de la déflexion renseigne sur l'absorption infrarouge. Pour chaque point, un spectre peut donc être enregistré en balayant en longueur d'onde (à l'aide de lasers infrarouge à cascade quantique ou d'un synchrotron).

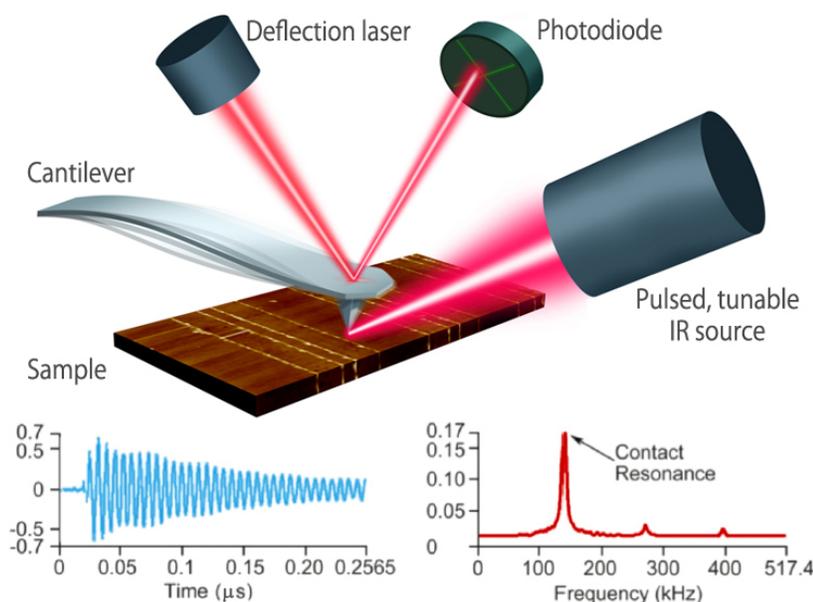


FIGURE VIII.1 – Principe de la spectroscopie AFM-IR. Lorsque le matériau absorbe le faisceau infrarouge, la dilatation entraîne une oscillation du levier qui est détectée.

Néanmoins cette méthode présente un inconvénient : le faisceau incident se situant dans l'IR, en milieu liquide il est absorbé. Cette technique est donc impossible à mettre en œuvre pour l'étude en milieu liquide, ce que nous souhaitons à terme réaliser.

VIII.1.2 Spectroscopie Raman locale : *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (SERS)

Spectroscopie Raman : Nous ne ferons pas ici une description complète et quantitative de cette spectroscopie, mais nous précisons les points qui sont importants pour les systèmes étudiés. En spectroscopie Raman, l'échantillon est éclairé avec un laser de fréquence ν_0 dans le domaine du visible. La majeure partie de la lumière qui est diffusée l'est à la longueur d'onde incidente. Toutefois, un photon sur 10 millions présente une fréquence légèrement différente de celles d'excitation. Pour les fréquences supérieures à celle d'excitation ($\nu_0 + \nu_{vib}$) nous parlons de raies anti-Stokes, tandis que pour celles inférieures ($\nu_0 - \nu_{vib}$), nous parlons de raies Stokes. Dans ce cas le niveau vibrationnel sondé a pour énergie ν_{vib} comme indiqué sur la figure VIII.2.

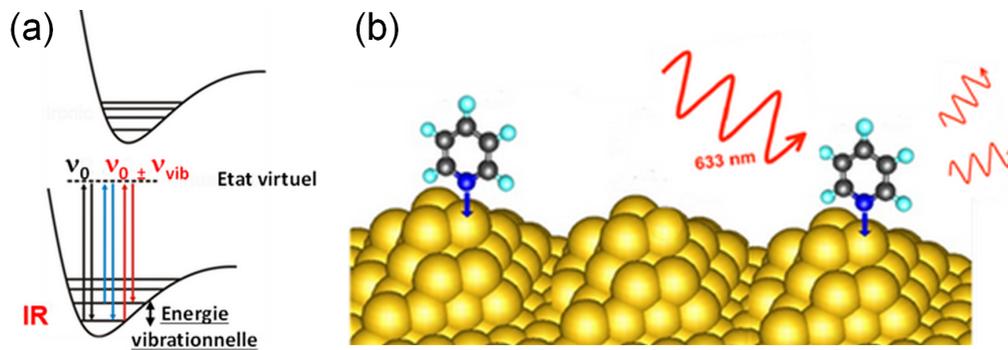


FIGURE VIII.2 – Principe de la spectroscopie Raman (a) et illustration de l'exaltation du champ électromagnétique au voisinage d'une surface rugueuse (b).

Néanmoins, il reste que dans l'absolu la détection d'un signal Raman est compliquée. Pour palier à cela, il est parfois possible de recourir à la spectroscopie SERS (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*) [102]. Cette approche utilise le fait qu'au voisinage d'une constriction métallique nanométrique, il est possible de créer une oscillation collective des électrons libres sous l'effet d'une irradiation avec un rayonnement de fréquence adaptée. On parle alors de plasmon de surface localisé. Au voisinage immédiat de cette constriction, le champ électrique \mathbf{E} est plus intense. Le signal Raman étant proportionnel à \mathbf{E}^4 , l'amplification peut aller jusqu'à des facteurs de 10^{12} [103]. Avec l'argent et l'or, la résonance plasmon se situe dans le visible. Deux bénéfiques

immédiats peuvent être mis à profits en SERS. En premier lieu, la sensibilité est maintenant très importante, et le SERS est de plus en plus utilisé pour la détection de traces (d'explosifs par exemple). Il est même possible de détecter des molécules individuelles. En second lieu, en milieu liquide, le signal provient de la surface, donc seules les molécules s'y trouvant fourniront un signal intense, qui prédominera par rapport à celui du liquide, et d'autant plus si l'on utilise un microscope confocal. Cette stratégie a par exemple été utilisée en électrochimie [104],[105]. Historiquement, des surfaces rugosifiées par électrochimie étaient employées [106], mais le manque de reproductibilité a orienté vers l'emploi de nanoparticules qui permettent un meilleur contrôle de la surface [107]. Néanmoins, pour l'imagerie le critère de Rayleigh est toujours applicable, si bien que la résolution est toujours limitée à 300 nm, et ne permet pas d'imager des nano-objets.

VIII.1.3 Spectroscopie Raman locale : *Tip Enhanced Raman Spectroscopy* (TERS)

Pour obtenir une signature spectrale à une échelle plus fine que le micromètre, il faut que la source de l'excitation Raman soit elle-même nanométrique. Cette méthodologie récente exploite, comme pour le SERS, l'amplification du champ électromagnétique observé au niveau d'une pointe donnant lieu à une résonance plasmon localisée intense. Pour le TERS, une sonde champ proche en or ou argent (ou recouverte de l'un de ces métaux) est irradiée par un laser d'excitation de longueur d'onde appropriée. Le signal sous la pointe est alors considérablement amplifié et donc facile à distinguer du signal de fond en champ lointain. Via l'obtention d'une source de lumière quasi nanoscopique à la fois en illumination et collection, il est à l'heure actuelle possible d'identifier une composition chimique à une échelle inférieure à 10 nm, bien en dessous de la limite de diffraction, et de sonder des systèmes présentant une réponse Raman faible de par leur petite taille ou leur nature chimique. A basse température, une résolution sub-moléculaire a ainsi été obtenue [108], alors qu'à température ambiante la résolution atteint 1.7 nm sur des nanotubes de carbone. Cette nouvelle méthodologie a été proposée pour la première fois dans les années 2000 [109], [110]. Depuis, son fort potentiel d'applications dans les divers domaines de la chimie et de la physique ont

poussé les industriels à développer des systèmes commerciaux couplant des systèmes à sonde locale et la microscopie Raman. Ceux-ci sont disponibles depuis quelques années.

Les systèmes étudiés par TERS sont très divers. Si nous pouvons choisir la molécule, il est préférable de travailler avec des molécules possédant une section efficace Raman très grande (Raman résonnant) et dans une configuration appelée "gap mode", c'est-à-dire en déposant la molécule étudiée sur une surface d'or ou d'argent. Dans ce cas, comme pour le SERS réalisé dans l'espace entre deux nanoparticules, l'exaltation du champ électromagnétique est encore supérieure. Par ailleurs, beaucoup d'objets biologiques comme des brins d'ADN, mais aussi des protéines ou des peptides ont été investigués par TERS [111]. Dans notre cas, nous avons travaillé sur deux types de systèmes. Le premier est un système de référence constitué d'une monocouche autoassemblée d'azobenzénethiol. Le deuxième représente le premier pas vers une imagerie de systèmes d'intérêt en électronique moléculaire. Il s'agit d'un rotaxane géant qui sera présenté dans les sections suivantes VIII.3. Ce système présente l'avantage d'être plus facilement manipulable que des protéines et constitue néanmoins un premier pas vers l'imagerie de molécules biologiques.

VIII.2 Mise en œuvre sur système de référence

Les pointes que nous avons utilisé pour les expériences de TERS sont en or. Elles sont préparées par dissolution électrochimique dans un mélange HCl/éthanol 50 :50 en volume comme détaillé dans le chapitre 4. Nous avons utilisé un STM SmartSPM 1000 (AIST) couplé à un spectromètre Raman confocal (Horiba HR Evo). Dans ce couplage, le laser est envoyé sur l'échantillon avec un angle de 30° . Une caméra peut également servir à visualiser la pointe et l'échantillon. L'objectif 100x utilisé possède une distance de travail de 6 mm. Ici, la pointe est fixe. L'objectif d'une part, et l'échantillon d'autre part sont chacun montés sur des systèmes de déplacement piézoélectriques indépendants. La première étape consiste à trouver le "point chaud", c'est-à-dire à focaliser aussi précisément que possible le laser sur la pointe. Pour cela, trois vis micrométriques permettent de ramener l'extrémité de la pointe dans le champ de l'objectif, puis de

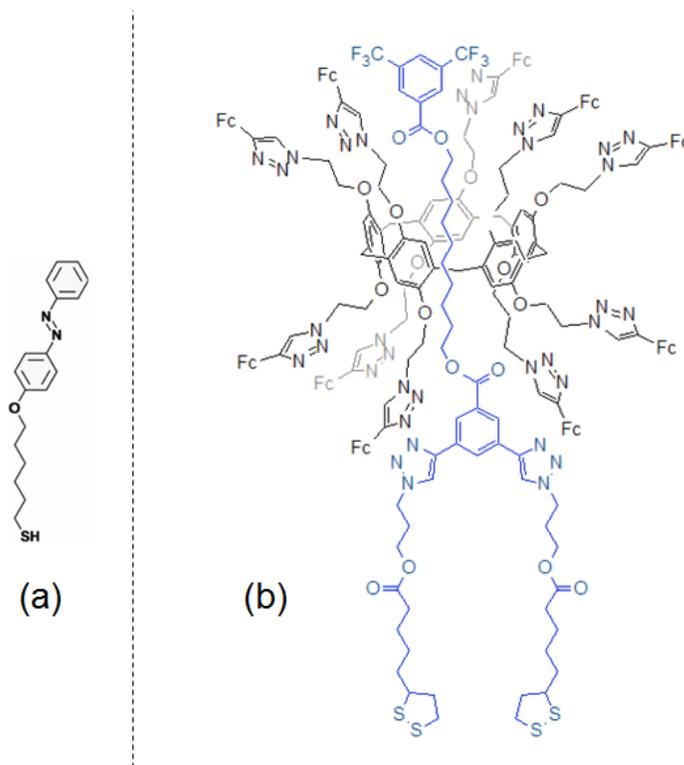


FIGURE VIII.3 – Dérivé thiolé d'azobenzène (a) et rotaxane géant (b). Ces deux molécules ont été étudiées en TERS.

focaliser grossièrement le laser sur celle-ci. Ensuite, des "cartographies d'objectif" (XY, XZ et YZ) sont effectuées, c'est-à-dire que l'objectif est déplacé dans les trois directions. Le signal recueilli, lié à la luminescence de l'or, est intégré. Le maximum de l'intégrale définit le point chaud. Une image optique montrant la focalisation du laser sur la pointe ainsi que l'intensité du signal de luminescence de l'or sont présentés sur la figure VIII.4.

La position de l'objectif étant alors verrouillée sur le point chaud, l'échantillon est ramené au contact en approche STM classique. Les spectres TERS peuvent alors être collectés. La figure VIII.5 montre un spectre TERS, obtenu sur une monocouche autoassemblée d'azobenzénethiol, en asservissement STM pour une tension de 0.1 V et un courant tunnel de 100 pA. Ici, le trou confocal du spectromètre Raman a été réglé à 300 μm . La résolution spectrale est de 2 cm^{-1} et la puissance de 14 μW .

Ici, un temps d'intégration de seulement 1s est nécessaire pour obtenir un spectre

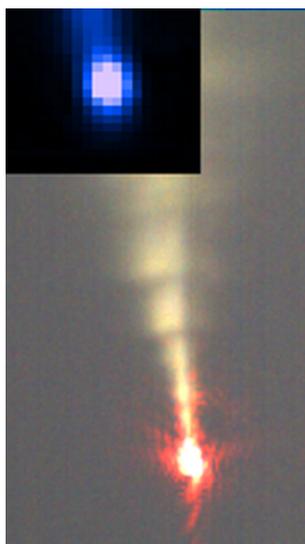


FIGURE VIII.4 – Focalisation du laser sur la pointe et (insert) définition du point chaud lors d'une cartographie d'objectif XY.

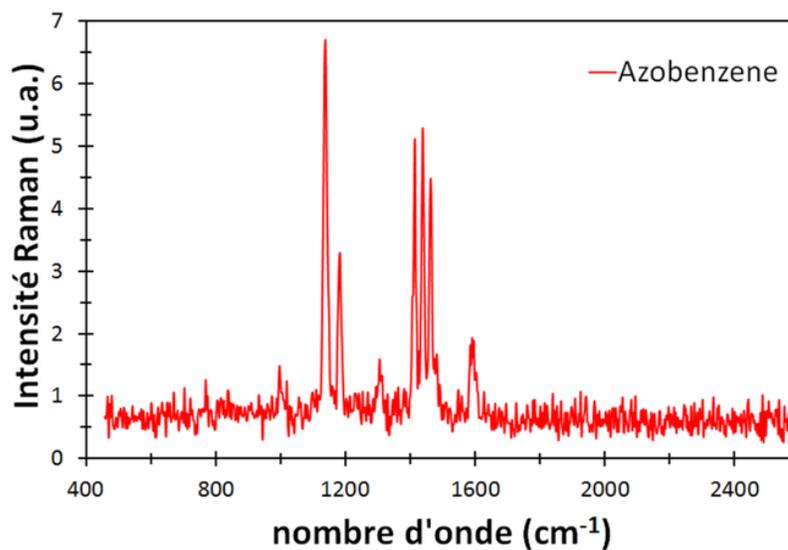


FIGURE VIII.5 – Spectre TERS obtenu en routine pour le dérivé thiolé d'azobenzène adsorbé sur une surface d'or.

avec un bon rapport signal/bruit. Ce spectre est conforme à ceux obtenus dans la littérature sur le même système [112]. Il est même possible de descendre à 100 ms de temps d'intégration si l'on ne s'intéresse qu'aux pics les plus intenses. En revanche, en Raman classique, il faut des temps d'intégration beaucoup plus grands et une intensité de laser

supérieure pour obtenir des spectres comparables. Avec des puissances laser plus importantes (ici supérieures à environ 500 μW), nous commençons à observer l'apparition de bandes liées au carbone amorphe. En effet, l'exaltation du champ électromagnétique est si forte sous la pointe que la molécule se décompose. Ce système présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre. Il a été utilisé ici pour des mesures préliminaires et de façon à déterminer si les pointes utilisées présentaient une amplification TERS conséquente. Les pointes ne donnant pas de signal ont été systématiquement écartées.

VIII.3 Imagerie et spectroscopie TERS d'un rotaxane géant

VIII.3.1 Molécule étudiée

Les rotaxanes sont des molécules constituées d'un axe statique entouré d'un macrocycle mobile. La mobilité de ce cycle peut être induite de plusieurs façon, notamment par application d'un potentiel [113]. Cette particularité en fait un candidat idéal à l'étude des moteurs moléculaires [114], dont le travail mécanique peut être en amont quantifié par spectroscopie de force [115]. La formule du rotaxane géant est présentée sur la figure VIII.3. Celui-ci a été synthétisé par l'équipe de Jean-François Nierengarten (Laboratoire de Chimie des Matériaux Moléculaires, Strasbourg).

VIII.3.2 Imagerie STM

Même si à l'heure actuelle il est possible d'obtenir une résolution sub-moléculaire en AFM, le STM constitue néanmoins à ce jour la méthode la plus adaptée à partir du moment où le substrat est conducteur ou semi conducteur. Dans notre cas, la molécule de rotaxane est relativement haute (au plus 3 nm) et par conséquent assez isolante. Nous avons donc dû procéder à une optimisation en imagerie afin de pouvoir détecter des molécules individuelles. En effet, afin d'éviter une pénétration de la pointe dans la molécule ce qui altérerait la qualité des images et favoriserait la contamination, nous pouvons utiliser des tensions V_{bias} relativement élevées et des courants de consigne I_p faibles [116], [117]. Tous les échantillons ont été analysés à l'air, à température ambiante avec des pointes Platine/Iridium (80/20).

Pour une préparation à concentration élevée (préparation : 1 mM pendant 90 min ; rinçage : 3 bains de 20 min même solvant), les images reflètent une réorganisation de la surface d'or. Ceci est caractéristique de ce qui est couramment observée avec des thiols.

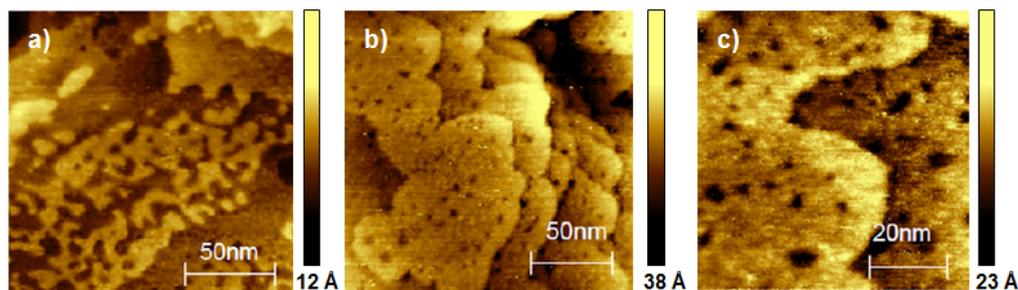


FIGURE VIII.6 – Topographies STM de rotaxanes adsorbés sur Au[111] à (a) $V_{bias} = 1.8 V$, $I_p = 20 pA$ et (b),(c) $V_{bias} = 0.1V$, $I_p = 100 pA$.

Dans ces conditions, il est impossible d'observer des molécules individuelles. Le contraste généré pour deux positions de la pointe, typiquement à la verticale de la molécule ou entre deux molécules doit être significatif. Ici, les bras électroactifs sont très mobiles et probablement enchevêtrés entre les molécules, si bien que dans l'image de la figure VIII.6, le contraste provient de la réorganisation de la surface.

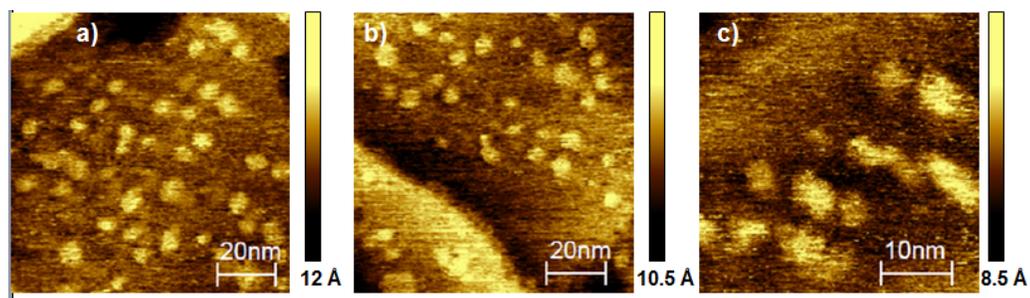


FIGURE VIII.7 – Topographies STM de rotaxanes adsorbés sur Au[111] à (a),(b) $V_{bias} = 1 V$, $I_p = 20 pA$ et (c) $V_{bias} = 0.8V$, $I_p = 20 pA$.

Nous avons donc également travaillé sur des échantillons formés à plus faible concentration (préparation : 10^{-2} mM pendant 10 min ; rinçage : 3 bains de 20 min même solvant). Les molécules individuelles sont clairement apparentes ici sur l'image de la figure VIII.7. Les dimensions de la molécule sont de 3 nm de haut, pour un diamètre

de pied d'environ 2 nm. Sur la figure VIII.8, le profil latéral XY est estimé à partir de la largeur sur trois rotaxanes isolés et donne 4.5 nm , 6.2 nm et 8.2 nm (FWHM). Nous observons un diamètre moyen plus élevé probablement de part un effet de convolution par la pointe. La résolution latérale est cependant supérieure à celle obtenue en AFM sur ces molécules (résultats non montrés). Une résolution inférieure à 0.1 nm, à température et pression ambiantes, ne peut être obtenue que sur des surfaces organisées où les écarts de hauteur sont faibles. Pour ce qui est de la résolution axiale, les hauteurs sont cohérentes avec elles obtenues sur ce type de molécule en configuration isolées [117].

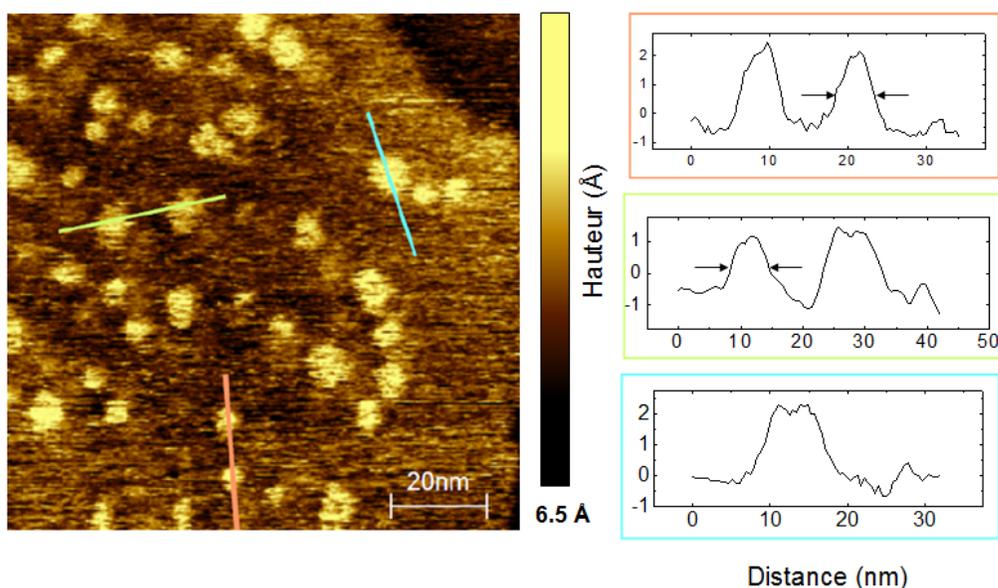


FIGURE VIII.8 – Topographie STM de rotaxanes adsorbés sur une surface d'or à $V_{bias} = 1$ V, $I_p = 20$ pA et coupes transverses associées. Les lignes de profil correspondent à la direction indiquée sur l'image de topographie.

VIII.3.3 Obtention d'un spectre TERS

Référence sur poudre : La figure VIII.9 représente les spectres de poudres en microscopie Raman conventionnelle du rotaxane (désigné ici par NT90), ainsi que celui de la molécule de ferrocène. Trois bandes notées 1, 2 et 3 sont particulièrement visibles. La bande 1 à 310 cm^{-1} correspond à la vibration A_{1g} du ferrocène [118].

La bande 2 à 1107 cm^{-1} correspond aux vibrations d'élongation des liaisons C=C des cycles cyclopentadienyl du ferrocène [118]. La bande 3 à 1590 cm^{-1} correspond aux vibrations de respiration du cycle aromatique de l'anneau central et est donc absente du signal du ferrocène.

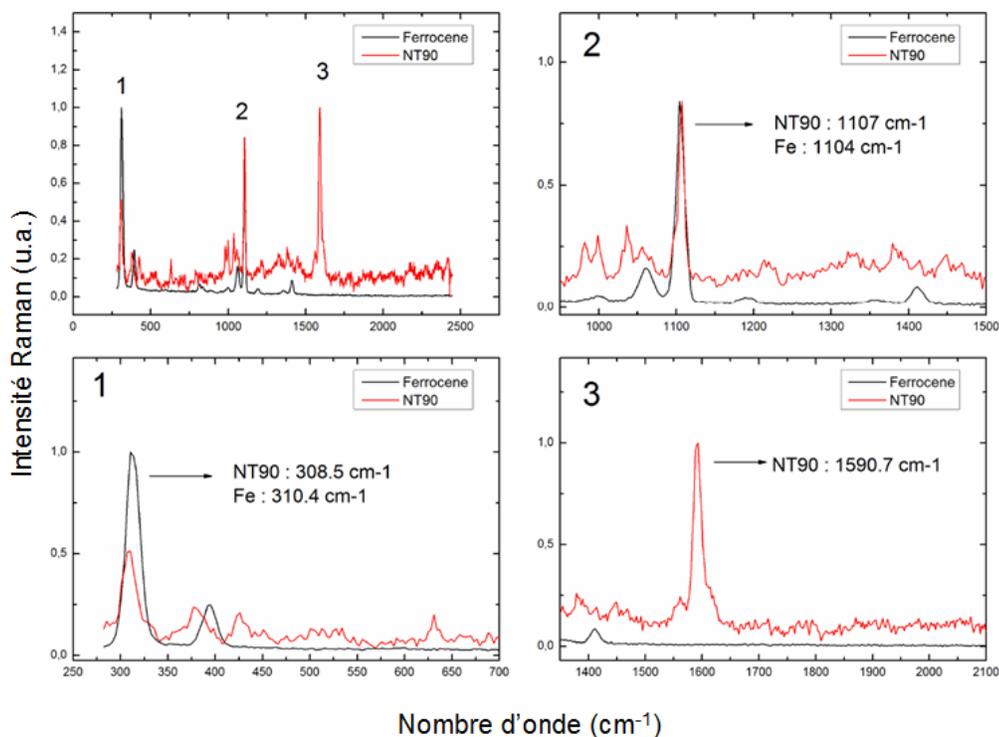


FIGURE VIII.9 – Spectres raman sur poudre de ferrocène (noir) et du rotaxane NT90 (rouge) collectés à 633 nm d'excitation, 1% de puissance laser, 1 seconde d'acquisition et 10 accumulations. Les figures numérotées correspondent à un élargissement d'échelle aux 3 zones indiquées du spectre complet

Spectre TERS : Nous avons dans un premier temps procédé de manière analogue à l'étude présentée ci-dessus pour l'azobenzène. Néanmoins, malgré plusieurs tentatives, nous nous sommes rendus compte que nous devons utiliser un temps d'intégration de 60 s, ce qui est trop long pour s'affranchir de la dérive thermique et donc ultérieurement effectuer de l'imagerie. Nous avons donc appliqué un courant de consigne plus grand (1 nA) pour nous rapprocher de la surface, à une tension identique (0.1 V), et en augmentant la puissance laser à $98\text{ }\mu\text{W}$. Dans ces conditions, nous avons effectué une

cartographie de l'échantillon pour sonder la surface à différents endroits. Le spectre (b) de la figure VIII.10 a pu être obtenu en un point.

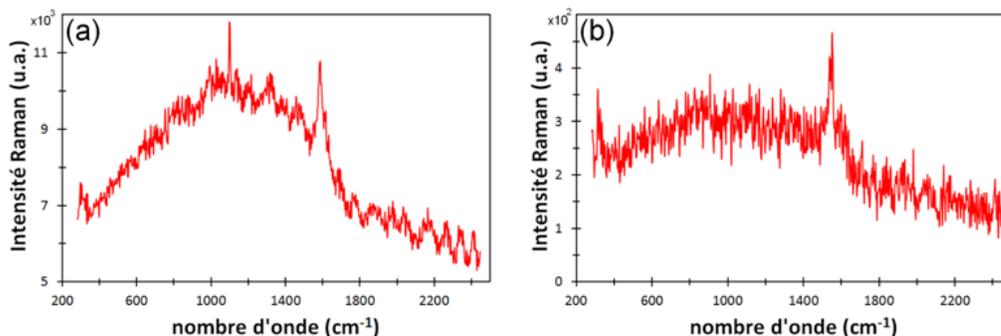


FIGURE VIII.10 – Spectre TERS de rotaxane adsorbés sur $AU[111]$ obtenus à 60 s (a) et à 1 s (b).

Toutefois, en effectuant une moyenne sur plusieurs spectres, nous nous apercevons que 2 à 6 spectres consécutifs suffisent à obtenir un spectre comparable à celui obtenu sur poudre (a). Ceci montre que la répartition des rotaxanes sur la surface est assez homogène. Ceci est également reflété par un faible contraste dans les cartographies représentant les intensités (avec soustraction de la ligne de base) des trois bandes les plus intenses du rotaxane et présentées VIII.11.

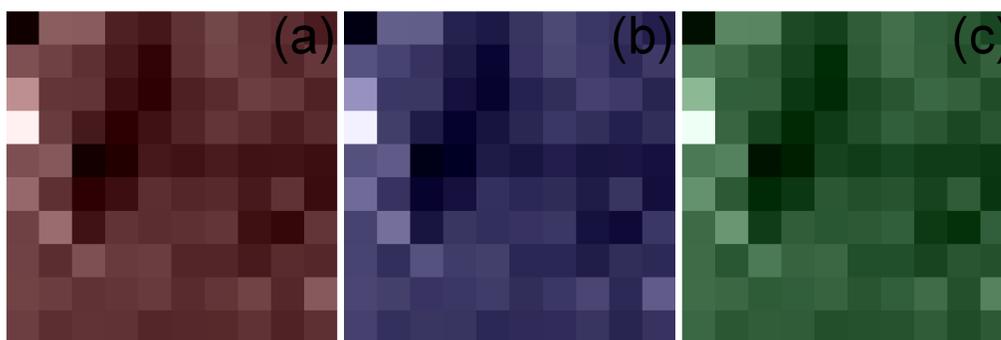


FIGURE VIII.11 – cartographie des trois bandes (a, b, c) obtenues par intégration des pics entre 287 et 350 cm^{-1} (a), 1098 et 1135 cm^{-1} (b) et 1549 et 1655 cm^{-1} (c). La ligne de base a été soustraite.

Il est en fait logique que les spectres soient plus difficiles à acquérir. Prenons l'exemple des cycles aromatiques que l'on retrouve à la fois dans l'azobenzène et le rotaxane. Pour le rotaxane, il a été calculé par électrochimie (travaux effectués par

Alina Latus) un taux de couverture de 2.6×10^{-11} mol.cm⁻², ce qui donne une valeur de 1.3×10^{-10} mol.cm⁻² en cycles benzéniques de l'anneau par exemple d'après la composition du rotaxane. En comparaison, l'azobenzène ayant un taux de recouvrement de 6.6×10^{-10} mol.cm⁻² [112], sa contribution doit être 5 fois supérieure. Ceci explique la plus faible intensité du signal. Cependant, une comparaison quantitative nécessiterait d'évaluer plus précisément les sections efficaces Raman des deux molécules et éventuellement considérer des effets d'orientation. D'autre part, il est à l'heure actuelle difficile de savoir combien de molécules contribuent au signal pour un spectre. Après stabilisation, la dérive thermique des scanners est inférieure à 0.2 nm.s⁻¹. Pendant un temps d'acquisition de 1s, la pointe sonde donc sensiblement toujours la même aire. La résolution spatiale du TERS dépend fortement du rayon de courbure de la pointe, qui est d'ordinaire inférieur à 10 nm. A partir de ces dimensions, une estimation du nombre de molécules peut être proposée [119]. Néanmoins, ces méthodes sont encore sujet à discussion dans la communauté.

VIII.3.4 Conclusions et perspectives

Les résultats obtenus dans ce chapitre démontrent qu'il est possible d'obtenir une réponse en TERS sur une molécule complexe à de faibles taux de recouvrement. Ces résultats constituent une étude préliminaire à la réalisation d'un couplage imagerie STM- spectroscopie TERS où un spectre pourra être associé à l'émission d'une molécule unique. A ce stade, plusieurs limitations entrent encore en jeu. En premier lieu, l'étude STM nous a montré que les conditions d'imagerie imposaient d'être assez loin de la surface (bias élevé et courant de consigne faible). En revanche, l'exaltation du champ électromagnétique est plus importante lorsque la pointe est plus proche de la surface en TERS (bias faible, courant de consigne élevé). Une augmentation du temps d'acquisition n'est pas souhaitable, car la dérive des scanners en imagerie doit rester négligeable. Nous avons néanmoins montré qu'à 1 s d'acquisition, une signature TERS associable au rotaxane pouvait être obtenue.

Conclusion

Au cours de cette thèse, plusieurs aspects ont été approfondis, dont le point central s'articule autour d'une thématique : l'observation d'une signature propre à une molécule individuelle.

Dans la première partie de ces travaux, nous avons cherché à caractériser l'interaction d'un oligopeptide de séquence CK(AAAAK)₂C avec une surface d'or par le couplage de deux techniques de champ proche : AFM et STM. Les deux stratégies envisagées (surfaces faiblement diluées et surface bi-fonctionnalisée) n'ont pour le moment pas permis de mesurer simultanément force et conductance à des ordres de grandeurs où leur signature était attendue. L'absence de contrôle de l'état de surface de la pointe métallisée, et sa possible modification en cours d'expérience pourraient être mis en cause. Si l'on considère la surface comme un réservoir infini de molécules, et la pointe comme un réservoir fini d'atomes d'or, il advient qu'un recouvrement progressif de la pointe par le peptide peut intervenir, isolant progressivement la pointe. Sur leviers rigides à rayon de courbure élevés (pointes plateau), la possibilité d'indenter la surface en re-crétant une nouvelle jonction or-or à chaque contact devrait permettre de réaliser ces contacts sans néanmoins dégrader le revêtement métallique. Une approche découplée a donc été envisagée.

Réponse mécanique : L'étude en spectroscopie de force des interactions peptide/or nous a permis de révéler la complexité des interactions sondées entre une biomolécule et une surface inorganique. Dans la majorité des expériences, plusieurs signatures s'échelonnant de 100 pN à plus de 300 pN en ordre de grandeur ont été observées, et

plus rarement, quelques signatures supérieures à 1 nN. La comparaison de ces forces avec la littérature nous a permis d'attribuer aux groupements amines et thiolés respectivement ces forces de rupture. Les expériences de contrôle garantissent que ces forces sont bien corrélables au peptide. Bien que plusieurs groupements soient impliqués, nous avons testé l'application de modèles cinétiques utilisés dans les systèmes ligand-récepteur à notre système. Plusieurs méthodes d'exploitation, en fonction de l'expression prise pour la vitesse de charge, ont été testées de sorte à n'exclure aucune possible correspondance liée à cette expression. Nous avons également caractérisé en élongation notre système en tenant compte de biais intervenant sur l'estimation des variables d'ajustement. Les dimensions de notre peptide ne nous permettent pas d'associer son comportement à celui d'une chaîne gaussienne. En associant sa contribution à celle d'un objet ponctuel dans l'élongation de l'agent de couplage, nous avons retrouvé les valeurs caractéristiques associées au dépliement des chaînes du PEG(18). En vue d'une caractérisation incluant la longueur de contour du peptide, une longueur de chaînes plus élevée sera préférable.

Réponse électrique : Les mesures de conductance en C-AFM ont permis d'observer plusieurs signatures mais à une statistique trop faible pour que puissent être estimés convenablement plusieurs canaux de conductance. Des fluctuations locales persistantes sur plusieurs nm suggèreraient que durant la traction subie par la jonction, des réorganisations interviennent mais à ce stade, il n'est pas encore possible de corrélérer ces variations à un changement de structure, ou au niveau du point de contact.

Traitement statistique et numérique : En vue d'un couplage, un premier traitement numérique avait été proposé de sorte à pouvoir combiner ces deux signatures conjointement en cartographie. En approche découplée, il a été remis à profit pour traiter les courbes en spectroscopie de force uniquement. Détecter, classer et représenter ces interactions sont 3 étapes cruciales où l'intervention de biais a été limitée. Les biais liés au sous-échantillonnage de données, liés à une sélection manuelle, ou liés au choix des critères de classement variables sont limités par la mise en place d'outils automatisant ce processus, tout en permettant un dernier contrôle visuel lors de la sélection.

En conductance, une reconstruction des plateaux a été mise en place associée toujours à un contrôle visuel devant la reconstruction. En revanche, si la présence d'impuretés, ou un nombre trop grand de canaux différents ne permet pas de faire ressortir quelques contributions notables par histogramme dans le cas du peptide sur les données brutes, un tel traitement ne pourra améliorer ça.

Dans la seconde partie de ce projet, nous avons observé la signature Raman-TERS de rotaxanes adsorbés sur or à de faibles taux de recouvrement. Pour aller plus loin dans cette étude, il serait néanmoins intéressant de travailler sur des couches plus diluées, et d'effectuer sur le même échantillon une double analyse : une image STM pourrait révéler des amas de quelques molécules seulement, qui seraient ensuite analysés par TERS. Cette approche pourrait fournir à la communauté un meilleur moyen pour évaluer le nombre de molécules analysées qui est toujours à présent sujet à débat. La section efficace de diffusion Raman est aussi un facteur qui peut être amélioré. Dans les prochaines études, un rotaxane synthétisé par l'équipe de J.-F. Nierengarten possédant 10 porphyrines, et ayant une section efficace Raman plus importante que les ferrocènes sera testé. Il serait également intéressant d'effectuer une étude similaire sur notre peptide, ce qui n'a pas été fait faute de temps disponible.

Annexes

Annexe A

Caractérisations complémentaires

A.1 Spectre DRX

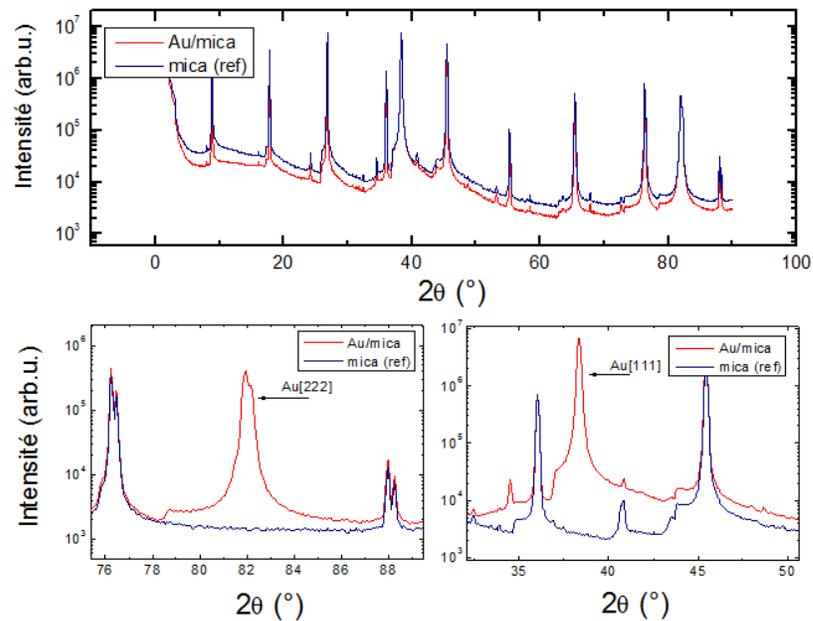


FIGURE A.1 – Spectres de DRX (diffraction de rayons X) du dépôt d'or réalisé sur mica pour une épaisseur de 80-100 nm, et référence (mica).

A.2 Pointes AFM

La figure A.2 montre deux images MEB de pointes AFM (MLCT, Bruker) et leur agrandissement au niveau de l'apex, recouvertes par un dépôt d'or en pulvérisation cathodique. La première pointe n'a subi aucune modification, tandis que la seconde a été utilisée en C-AFM en milieu liquide.

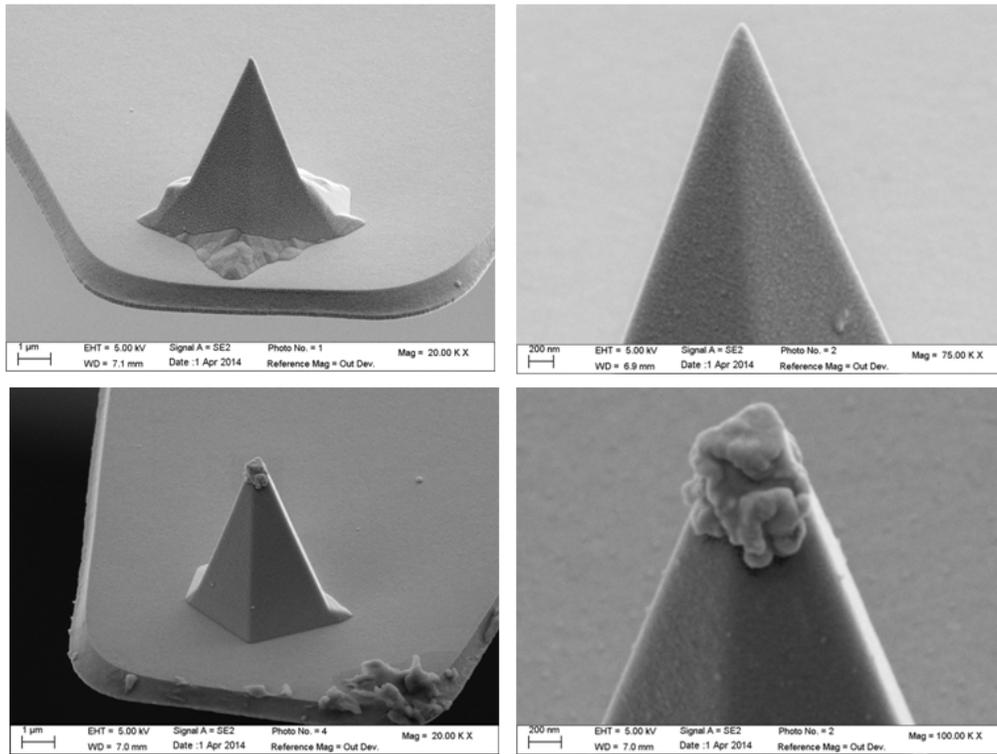


FIGURE A.2 – Images MEB de pointes AFM recouvertes par un dépôt d'or en pulvérisation cathodique.

A.3 Pointes STM

La figure A.3 montre plusieurs images MEB de pointes STM réalisées par dissolution électrochimique. Les dégagements gazeux se produisant au niveau du ménisque, des effets d'écrantage apparaissent, et peuvent alors induire des formes de pointes irrégulières, signe que localement le milieu n'était plus homogène.

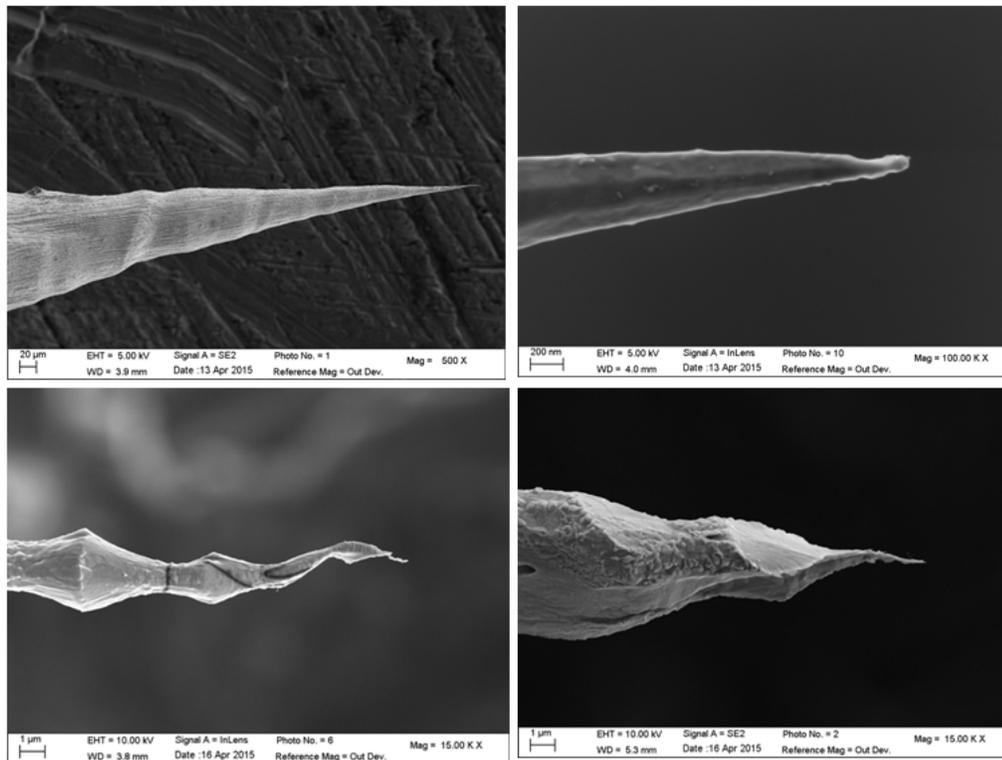


FIGURE A.3 – Images MEB de pointes STM réalisées par dissolution électrochimique.

Annexe B

Programmes Matlab

Ce chapitre regroupe une partie des scripts qui ont été développés pour le traitement des courbes de force et des courbes de conductance. Ils peuvent fonctionner sur des courbes préalablement extraites en format ASCII (.txt) comprenant la déflexion en nm/V (pour l’affichage force-distance), et la force. La rampe n’a pas besoin d’être extraite, une entrée utilisateur est implémentée où doit être indiquée sa taille en nm, pour sa reconstruction. La vitesse de charge est également demandée en entrée utilisateur.

B.1 Traitement des courbes de force

B.1.1 Programme principal

```
1 addpath('C:\Users\Emmanuel\Desktop\Marie\redaction\matlab
    fichiers'); % path of the functions
2 fDirectory = uigetdir('D:\Data Marie\datas\AFM\2014-AFM\
    Peptide\Peptide pointe souple\20112014\loading rate study
    \50nms\ASCII'); % path of the FZ curves
3 cd(fDirectory)
4 delete('distance_force_max.txt'); delete('force_max.txt');
    delete('Histforce_max.txt');
5 set(0, 'DefaultAxesFontName', 'Times New Roman', '
    DefaultAxesFontSize', 12, 'DefaultLineLineWidth', 2)
```

```

6 whitebg(0, 'white')
7 d = dir('*.txt');
8
9 %% User inputs %% 1 = TRUE, 0 = FALSE
10
11 bSgolay = 0; % if TRUE FZ curve are
    smoothed
12     sgolayN = 5; sgolayM = 41;
13 PushButton = 0; % if TRUE switch to the next
    FZ curve after mouse click
14 DisplayForceCurve = 0; % if TRUE display FZ curve
15 DoubleLayer = 0; % if TRUE double layer of FZ
    curve is substracted :  $A \cdot \exp(-z/\lambda)$ ;
16     DoubleLayerAmplitude = 0.8e-9; % value of A amplitude of
    layer decay
17     lambda_D = 7.33e-9; % Value exponential
    factor decay
18 Onlyadhesion = 0; % if TRUE only maximum of FZ
    curves is selected
19 ManualSelection = 0; % if TRUE make peak selection
    with close-to-peak mouse click /!\ Erase the automatic peak
    detection !
20 PartOfCurve = 2; % Portion of FZ curve for
    baseline fitting
21     windowPeak = 3; % Size of the moving
    variance window
22     threshVariance = 5e-4; % Variance threshold for
    peak detection
23     nNoiseStd = 10; % Absolute threshold :
    Multiplier of noise std for peak threshold

```

```

24     peakHeight =20e-12;           % Relative threshold :
        Minimum height for peak detection
25     lengthLinker =5e-9;          % Tip-substrate distance
        for specific/non-specific sort
26     SlopeOfCurve = 0;            % if TRUE determine the
        slope of FZ curve at each peak
27     windowdFdx = 150;           % Size of the window for
        slope before peak rupture
28     OnlyHistogram = 0;           % if TRUE display
        histogram , if FALSE display histogram plus force-distance
        Map
29     SpringConstant_Correction =1; % Spring constant
        correction (new value/ past value)
30
31 % end User inputs %%%%%%%%%%%
32
33 %% User prompt %%%%%%%%%%%
34
35 prompt = 'Number of files for histos ? Press enter for all
        files ';
36 nFiles = input(prompt);          % number of .txt-Files
37 prompt ='Speed of the piezo retraction ? in mm/s ';
38 speed= input(prompt);           % retraction speed
39 if nFiles> length(d)
40     error('Not enough file in the folder')
41 elseif isempty(nFiles);
42     nFiles = length(d);
43 end
44 prompt = 'No Z-piezo data detected in force curve file. Enter
        size ramp in mm ';

```

```
45 rampSize = 1e-9*input(prompt);      % size of the z-ramp
46
47 %% Allocation 1
48
49 %Vectors
50     dataForce_init = zeros(1,nFiles);
51     dataForce = zeros(1,nFiles);
52     dataRamp = zeros(1,nFiles);
53     dataForceApproach = zeros(1,nFiles);
54     dataDefl = zeros(1,nFiles);
55     dataDefl_init = zeros(1,nFiles);
56     dataTime = zeros(1,nFiles);
57
58 %histograms
59     mergeNoise = [];
60     merge_adhesion_force = []; merge_adhesion_ramp = [];
61     merge_adhesion_distance = [];
62     merge_nonspec_force = []; merge_nonspec_ramp = [];
63     merge_nonspec_distance = [];
64     merge_unique_force = []; merge_unique_ramp = [];
65     merge_unique_distance = [];
66     merge_mult_force = []; merge_mult_ramp = [];
67     merge_mult_distance = [];
68     merge_all_force = []; merge_all_ramp = [];
69     merge_all_distance = [];
70     merge_last_force = []; merge_last_ramp = [];
71     merge_last_distance = [];
72     mergeMax = []; mergedFdx = []; mergeDistdFdx = [];
73     mergeSeg = []; segmentationIndex = [];
74     coeffBaseline = []; constBaseline = [];
```

```
69
70 %Counts
71 count_allInteraction = 0;
72 count_no_interaction = 0;
73 count_adhesion = 0;
74 count_nonspec = 0;
75 count_unique = 0;
76 count_mult = 0;
77 count_last = 0;
78 %%
79
80
81
82
83
84 for i=1:nFiles
85 %% Allocation 2
86     vecNoise = []; dFdx = [];
87     adhesionForce = []; adhesionRamp = []; adhesionDistance =
88         [];
89     nonspecForce = []; nonspecRamp = []; nonspecDistance = [];
90     uniqueForce = []; uniqueRamp = []; uniqueDistance = [];
91     multForce = []; multRamp = []; multDistance = [];
92     AllForce = []; AllRamp = []; AllDistance = [];
93     lastForce = []; lastRamp = []; lastDistance = [];
94     off = []; forcedFdx = []; distdFdx = []; distancedFdx =
95         [];
96
97 %% Datas import
98 A = importdata(['data (' num2str(i) ').txt']);
```

```

97     data = A.data;
98     header = A.textdata;
99     nColumndata = size(A.data);
100    nPoints = nColumndata(1);
101    for j=1:nColumndata(2)
102        if strcmp(header{1,j}, 'Defl_V_Rt')
103            dataForce_init = data(:,j);
104        elseif strcmp(header{1,j}, 'Defl_pN_Rt')
105            dataForce_init = 1e-12*
106                SpringConstant_Correction*data(:,j);
107        elseif strcmp(header{1,j}, 'Time_s_Rt')
108            dataTime = data(:,j);
109        elseif strcmp(header{1,j}, 'Defl_pN_Ex')
110            dataForceApproach = 1e-12*data(:,j) ;
111            dataForceApproach = flipud(dataForceApproach);
112        elseif strcmp(header{1,j}, 'Defl_nm_Rt')
113            dataDefl_init = 1e-9*data(:,j) ;
114        end
115    end
116
117    dataRamp_init = (rampSize* linspace(1, nPoints, nPoints)/
118        nPoints)';
119
120    %% If smooth
121    if any(bSgolay)
122        dataForce_init = sgolayfilt(dataForce_init, sgolayN,
123            , sgolayM);
124        dataDefl_init = sgolayfilt(dataDefl_init, sgolayN,
125            , sgolayM);
126    end

```

```

123
124
125 %% Baseline correction
126
127 % Offset in dataDistance correction
128 %dataDistance_init = dataDefl_init + dataRamp_init;
129
130 [dataRamp ,dataDefl , ~,~,~] = f__BaselineCorrection(
    dataRamp_init , dataDefl_init ,PartOfCurve);
131 [dataRamp ,dataForce ,vecNoise ,ak ,bk] =
    f__BaselineCorrection(dataRamp_init , dataForce_init ,
    PartOfCurve);
132 dataDistance = dataDefl + dataRamp;
133
134 distOffset = mean(dataDistance(1:50));
135 dataDistance = dataDistance - distOffset;
136
137 %% Double Layer correction
138     if ~isempty(find(DoubleLayer))
139         dataDistance = dataDistance - mean(dataDistance
            (1:5));
140         layerDecay = DoubleLayerAmplitude*exp(-
            dataDistance/lambda_D);
141         dataForce(dataDistance>0) = dataForce(
            dataDistance>0) - layerDecay(dataDistance>0);
142         dataForce(dataDistance<0) = dataForce(
            dataDistance<0) - DoubleLayerAmplitude;
143     end
144
145 [mu, sigma] = normfit(vecNoise);

```

```

146 %% If manual selection
147     if ~isempty(find(ManualSelection))
148         f = figure(1);
149         box on
150         set(gcf, 'units', 'normalized', 'outerposition', [0 0
151             1 1])
152         plot(dataDistance, (-1e12)*dataForce)
153         [x,y] = ginput;
154         if ~isempty(x)
155             index = knnsearch([dataDistance (-1e12)*
156                 dataForce] , [x y], 'Distance', 'seuclidean');
157         else
158             index = [];
159         end
160
161         w = waitforbuttonpress;
162         if w == 0
163             disp('Button click')
164         else
165             disp('Key press')
166         end
167     else
168         %% Else : automatic selection
169         [index var]= f__PeakDetection5(dataForce, dataRamp, ak,
170             windowPeak, nNoiseStd*sigma, threshVariance, peakHeight);
171         index=unique(index');
172         index=index';
173         count_allInteraction = count_allInteraction + length(index
174             ');

```

```

172 %% Sort peaks
173     if isempty(index)           % no peak
174         count_no_interaction = count_no_interaction +1 ;
175
176     else                         % peak detected
177         index = sort(index,1);
178         for j = 1 : length(index)
179             % Non specific
180             if dataDistance(index(j)) <= lengthLinker
181                 if abs(dataDistance(index(1))) <= 0.8e-9;
182                     % First peak
183                         adhesionForce = dataForce(index(1));
184                         adhesionRamp = dataRamp(index(1));
185                         adhesionDistance = dataDistance(index(1));
186                         count_adhesion = count_adhesion +1 ;
187                     elseif abs(dataDistance(index(j))) > 0.8e-9 &&
188                         dataDistance(index(j)) <= lengthLinker ;
189                         % others non-specific
190                         nonspecForce = vertcat(nonspecForce ,
191                             dataForce(index(j)));
192                         nonspecRamp = vertcat(nonspecRamp ,
193                             dataRamp(index(j)));
194                         nonspecDistance = vertcat(
195                             nonspecDistance , dataDistance(index
196                                 (j)));
197                         count_nonspec = count_nonspec +1 ;
198
199                     end
200             % Specific
201             elseif dataDistance(index(j)) > lengthLinker

```

```

196     if length(find(dataDistance(index)>
197         lengthLinker)==1) == 1
198         % Unique peak
199             uniqueForce = dataForce(index(j));
200             uniqueRamp = dataRamp(index(j));
201             uniqueDistance = dataDistance(index(j)
202                 );
203             count_unique = count_unique +1 ;
204         end
205     % All specific
206     multForce = vertcat(multForce, dataForce(index
207         (j)));
208     multRamp = vertcat(multRamp, dataRamp(index(j))
209         );
210     multDistance = vertcat(multDistance,
211         dataDistance(index(j)));
212     count_mult = count_mult +1 ;
213     % Last peak
214     lastForce = dataForce(index(end));
215     lastRamp = dataRamp(index(end));
216     lastDistance = dataDistance(index(end));
217     count_last = count_last +1 ;
218     end
219     end
220     end
221 %% If only minimum is required

```

```

221         %
222         if ~isempty(find(Onlyadhesion))
223             clear index
224             index = find(dataForce == min(dataForce));
225         end
226
227     end
228
229     %% Not sorted peaks
230     AllForce = dataForce(index);
231     AllRamp = dataRamp(index);
232     AllDistance = dataDistance(index);
233
234
235
236     %% Slope for dF/dx
237     dFdx = []; distancedFdx = [];
238     if ~isempty(find(SlopeOfCurve))
239         if (~isempty(index) == 1)
240             for d = 1 : length(index)
241                 if index(d)-windowdFdx < 0 && dataDistance
242                     (index(d))<lengthLinker;
243                     dFdx(d,:) = 0;
244                     distancedFdx(d,:) = 0;
245                     forcedFdx(d,:) = 0;
246                 elseif index(d)-windowdFdx > 0 &&
247                     dataDistance(index(d))>lengthLinker;
248                     x = dataDistance(index(d));
249                     y = dataForce(index(d));

```

```

248         p = fit ( dataDistance ( index ( d ) - windowdFdx
                    : index ( d ) - 5 ) , ( -1 ) * dataForce ( index ( d ) -
                    windowdFdx : index ( d ) - 5 ) , 'poly1 ' ) ;
249         dFdx ( d , : ) = p . p1 ;
250         distdFdx ( d , : ) = dataDistance ( index ( d ) ) ;
251         off ( d , : ) = p . p2 ;
252         %           forcedFdx ( d , : ) = dataForce ( index ( d )
                    - 50 : index ( d ) + 10 ) ;
253         %           distancedFdx ( d , : ) = dataDistance (
                    index ( d ) - 50 : index ( d ) + 10 ) ;
254         %           dFdx ( d , : ) = abs ( ( dataForce ( index ( d )
                    , : ) - dataForce ( index ( d ) - 20 , : ) ) . / ( dataDistance
                    ( index ( d ) , : ) - dataDistance ( index ( d ) - 20 , : ) ) ) ;
255         distancedFdx ( d , : ) = dataDistance ( index
                    ( d ) - windowdFdx : index ( d ) + 5 ) ;
256         forcedFdx ( d , : ) = dFdx ( d , : ) *
                    distancedFdx ( d , : ) + off ( d , : ) ;
257         end
258     end
259 end
260 end
261
262
263 %% Vector concatenation
264
265 % First peak
266 merge_adhesion_force = vertcat ( merge_adhesion_force ,
                    adhesionForce ) ;
267 merge_adhesion_ramp = vertcat ( merge_adhesion_ramp , adhesionRamp
                    ) ;

```

```
268 merge_adhesion_distance = vertcat(merge_adhesion_distance ,
    adhesionDistance);
269 % Non specific
270 merge_nonspec_force = vertcat(merge_nonspec_force , nonspecForce
    );
271 merge_nonspec_ramp = vertcat(merge_nonspec_ramp , nonspecRamp);
272 merge_nonspec_distance = vertcat(merge_nonspec_distance ,
    nonspecDistance);
273 % Unique
274 merge_unique_force = vertcat(merge_unique_force , uniqueForce);
275 merge_unique_ramp = vertcat(merge_unique_ramp , uniqueRamp);
276 merge_unique_distance = vertcat(merge_unique_distance ,
    uniqueDistance);
277 % Multiple
278 merge_mult_force = vertcat(merge_mult_force , multForce);
279 merge_mult_ramp = vertcat(merge_mult_ramp , multRamp);
280 merge_mult_distance = vertcat(merge_mult_distance , multDistance
    );
281 % All peak
282 merge_all_force = vertcat(merge_all_force , AllForce);
283 merge_all_ramp = vertcat(merge_all_ramp , AllRamp);
284 merge_all_distance = vertcat(merge_all_distance , AllDistance);
285 % Last peak
286 merge_last_force = vertcat(merge_last_force , lastForce);
287 merge_last_ramp = vertcat(merge_last_ramp , lastRamp);
288 merge_last_distance = vertcat(merge_last_distance , lastDistance
    );
289 % Slope
290 mergedFdx = vertcat(mergedFdx , dFdx);
291 mergeDistdFdx = vertcat(mergeDistdFdx , distdFdx);
```

```

292 % Max force
293 vecMax = min(dataForce);
294 mergeMax = vertcat(mergeMax,vecMax);
295 % Noise
296 mergeNoise = vertcat(mergeNoise , vecNoise);
297 % Piezo positions
298 coeffBaseline = vertcat(coeffBaseline ,ak);
299 constBaseline = vertcat(constBaseline ,bk);
300
301
302 %% Print export
303 display(['Import complete ' num2str(i*100/nFiles) ' % '])
304
305 %% Display FZ curve & peak detected
306
307 if ~isempty(find(DisplayForceCurve))
308     f = figure(1);
309     box on
310     set(gcf, 'units', 'normalized', 'outerposition', [0 0 1 1])
311     %plot(dataDistance_init,(-1)*dataForce_init,'y')
312     %hold on
313     plotyy(dataDistance,(-1)*dataForce , dataDistance , var)
314     hold on
315     stem(adhesionDistance,(-1)*adhesionForce , 'b')
316     stem(nonspecDistance,(-1)*nonspecForce , 'k')
317     stem(uniqueDistance,(-1)*uniqueForce , 'r')
318     stem(multDistance,(-1)*multForce , 'c')
319     plot(dataDistance , nNoiseStd*sigma*(0*dataForce +1), 'r')
320     if ~isempty(find(SlopeOfCurve))
321         for d = 1: length(dFdx)

```

```

322         plot(distancedFdx(d,:),forcedFdx(d,:), 'r')
323     end
324 end
325 hold off
326 drawnow; pause(0.1);
327     if ~isempty(find(PushButton))
328         w = waitforbuttonpress;
329         if w == 0
330             disp('Button click')
331             else
332             disp('Key press')
333             end
334     end
335 end
336 end
337
338 save('workspace.mat')
339 format short g
340
341 %% Histogram and force-distance map
342
343
344 merge_nonspec_distance = vertcat(merge_nonspec_distance ,
    merge_adhesion_distance);
345 merge_nonspec_force = vertcat(merge_nonspec_force ,
    merge_adhesion_force);
346 mergedFdx(mergedFdx ==0)=[]; mergeDistdFdx(mergeDistdFdx==0)
    = [];
347 MM = vertcat(merge_unique_distance , merge_last_distance);
348     [dummy I]=unique(MM, 'first');

```

```

349     merge_AllUnique_distance=MM(sort(I));
350     MM=vertcat(merge_unique_force,merge_last_force);
351     [dummy I]=unique(MM,'first');
352     merge_AllUnique_force=MM(sort(I));
353     distance = []; force = []; maxHistDistance = []; maxHistForce =
        []; vectext = [];
354
355
356     for fig = 1 : 8
357         if fig == 1
358             datX = merge_adhesion_distance*(1e9);
359             datY = merge_adhesion_force*(-1e12);
360             tit = 'Adhesion';
361             vectext = ['Adhesion = ',num2str(length(
                merge_adhesion_force)*100/length(merge_all_force)),
                '%'];
362             col = 'b';
363         elseif fig == 2
364             datX = merge_nonspec_distance*(1e9);
365             datY = merge_nonspec_force*(-1e12);
366             tit = 'Non specific';
367             vectext = ['Non specific = ',num2str(length(
                merge_nonspec_force)*100/length(merge_all_force)), '%
                '];
368             col = 'k';
369         elseif fig == 3
370             datX = merge_unique_distance*(1e9);
371             datY = merge_unique_force*(-1e12);
372             tit = 'Unique';

```

```
373     vectext = [ 'Unique = ', num2str(length(
           merge_unique_force)*100/length(merge_all_force)), '%'
           ];
374     col = 'r';
375 elseif fig == 4
376     datX = merge_mult_distance*(1e9);
377     datY = merge_mult_force*(-1e12);
378     tit = 'Specific';
379     vectext = [ 'Specific = ', num2str(length(
           merge_mult_force)*100/length(merge_all_force)), '%' ];
380     col = 'c';
381 elseif fig == 5
382     datX = merge_last_distance*(1e9);
383     datY = merge_last_force*(-1e12);
384     tit = 'Last';
385     vectext = [ 'Last = ', num2str(length(merge_last_force)
           *100/length(merge_all_force)), '%' ];
386     col = 'g';
387 elseif fig == 6
388     datX = merge_all_distance*(1e9);
389     datY = merge_all_force*(-1e12);
390     tit = 'All';
391     vectext = [ 'All = ', num2str(length(merge_all_force)
           *100/length(merge_all_force)), '%' ];
392     col = 'b';
393 elseif fig == 7
394     datX = merge_AllUnique_distance*(1e9);
395     datY = merge_AllUnique_force*(-1e12);
396     tit = 'Toutes';
```

```

397     vectext = [ 'Toutes = ', num2str(length(
           merge_AllUnique_force)*100/length(merge_all_force)),
           '%'];
398     col = 'b';
399 elseif fig == 8
400     A=mergeDistdFdx(ismember(mergeDistdFdx,
           merge_AllUnique_distance));
401     B=mergedFdx(ismember(mergeDistdFdx,
           merge_AllUnique_distance));
402     A(find(B<0))=[];
403     B(find(B<0))=[];
404     datX = A*(1e9);
405     datY = speed*1e3*B;
406     tit = 'dFdx';
407     vectext = [ 'dFdx = ', num2str(length(
           merge_AllUnique_force)*100/length(merge_all_force)),
           '%'];
408     col = 'b';
409 end
410 if ~isempty(find(OnlyHistogram));
411 n = length(datY);
412 nbins = 1:1:n;nbins = nbins';
413 J = []; h = [];
414 for i = 1: length(nbins)
415     N = hist(datY, nbins(i));
416     N=N';
417     h(i) = (max(datY)-min(datY))/nbins(i);
418     J(i) = 2/((n-1)*h(i)) - ((n+1)/(n^2*(n-1)*h(i)))*sum(N
           .*N);
419 end

```

```

420     nIdeal = 28;%(max(datY)-min(datY))/h(J==min(J));
421     if ~ (length(datY) <=2);
422     figure(fig)
423     hold on
424     title(tit)
425     [n,x] = hist(datY,nIdeal);
426     h=bar(x,n./nFiles*100,'hist');
427     set(h,'facecolor',col)
428     plot(x,n/nFiles*100)
429     bw = Opt_Hyp_Gauss_Ker_Reg(1,datY,length(datY));
430     [f,x] = ksdensity(datY,'width',bw);
431     m = max(f(:));
432     f = max(n/nFiles*100)*f/m;
433     plot(x,f);
434     text(max(x)-200,max(f),{vectext,x(f==max(f))})
435     maxHistForce(fig) = x(f==max(f));
436
437
438     lambda = 20;
439     bin = [];
440     if length(datX)>1000
441         len = 1000;
442     else
443         len = length(datX);
444     end
445     edges1 = linspace(min(datX),max(datX),len+1);
446     ctrs1 = edges1(1:end-1) + 0.5*diff(edges1);
447     edges1 = [-Inf edges1(2:end-1) Inf];
448     edges2 = linspace(min(datY),max(datY),len+1);
449     ctrs2 = edges2(1:end-1) + 0.5*diff(edges2);

```

```

450     edges2 = [-Inf edges2(2:end-1) Inf];
451
452     [~, bin(:,2)] = histc(datX, edges1);
453     [~, bin(:,1)] = histc(datY, edges2);
454     H = accumarray(bin, 1);
455     G = smooth1D(H, length(datX)/lambda);
456     F = smooth1D(G', length(datX)/lambda)';
457     [ c, ix ] = max(F(:));
458     [ I1, I2 ] = ind2sub( size(F), ix );
459     distance(fig) = ctrs1(I2);
460     force(fig) = ctrs2(I1);
461     else
462         figure(fig)
463         distance(fig)=0; force(fig)=0; maxHistForce(fig) = 0;
464     end
465     else
466     if isempty(datY) || length(datY) <= 2;
467         figure(fig)
468         distance(fig) = 0;
469         force(fig) = 0;
470
471     else
472
473     lambda = 20;
474     bin = [];
475         if length(datX)>1000
476             len = 1000;
477         else
478             len = length(datX);
479     end

```

```

480 edges1 = linspace(min(datX), max(datX), len+1);
481 ctrs1 = edges1(1:end-1) + 0.5*diff(edges1);
482 edges1 = [-Inf edges1(2:end-1) Inf];
483 edges2 = linspace(min(datY), max(datY), len+1);
484 ctrs2 = edges2(1:end-1) + 0.5*diff(edges2);
485 edges2 = [-Inf edges2(2:end-1) Inf];
486
487 [~, bin(:,2)] = histc(datX, edges1);
488 [~, bin(:,1)] = histc(datY, edges2);
489 H = accumarray(bin, 1);
490 G = smooth1D(H, length(datX)/lambda);
491 F = smooth1D(G', length(datX)/lambda)';
492 [ c, ix ] = max(F(:));
493 [ I1, I2 ] = ind2sub( size(F), ix );
494 distance(fig) = ctrs1(I2);
495 force(fig) = ctrs2(I1);
496
497 figure(fig)
498 title(tit)
499 positionVector1 = [0.35 0.35 0.55 0.55];
500 subplot('Position', positionVector1)
501 h1=surf(ctrs1, ctrs2, F);
502 set(gca, 'YDir', 'normal')
503 shading interp
504 view(2)
505 alpha(h1, 'color');
506
507 nIdeal = 70;% (max(dat)-min(dat))/h(J==min(J));
508 positionVector2 = [.35 .1 .55 .15];
509 subplot('Position', positionVector2)

```

```

510     [n,x] = hist(datX,nIdeal);
511     h=bar(x,n./nFiles*100,'hist');
512     set(h,'facecolor',col)
513     hold all
514     bw = 0.5;% Opt_Hyp_Gauss_Ker_Reg(1,datX,length(datX));
515     [f,x] = ksdensity(datX,'width',bw);
516     m = max(f(:));
517     f = max(n/nFiles*100)*f/m;
518     plot(x,f);
519     maxHistDistance(fig) = x(f==max(f));
520
521
522     nIdeal = 50;% (max(dat)-min(dat))/h(J==min(J));
523     positionVector3 = [.1 .35 .15 .55];
524     subplot('Position',positionVector3)
525     [n,x] = hist(datY,nIdeal);
526     h=barh(x,n./nFiles*100,'hist');
527     set(h,'facecolor',col)
528     hold all
529     bw = Opt_Hyp_Gauss_Ker_Reg(1,datY,length(datY));
530     [f,x] = ksdensity(datY,'width',bw);
531     m = max(f(:));
532     f = max(n/nFiles*100)*f/m;
533     plot(f,x);
534     %maxHistForce(fig) = x(f==max(f));
535     end
536
537     end
538
539

```

```
540 end
541
542 %% Save in workspace
543
544 B = [maxHistForce ''];
545 fid=fopen('Histforce_max.txt','w');
546 fprintf(fid, '%f \n', B);
547 fclose(fid);
548 type Histforce_max.txt
549
550 A = [force ''];
551 fid=fopen('force_max.txt','w');
552 fprintf(fid, '%f \n', A);
553 fclose(fid);
554 type force_max.txt
555
556 A = [distance ' force'];
557 fid=fopen('distance_force_max.txt','w');
558 fprintf(fid, '%f %f \n', A);
559 fclose(fid);
560 type distance_force_max.txt
561
562 h = get(0, 'children');
563 for i=1:length(h)
564     saveas(h(i), ['figure' num2str(i)], 'fig');
565     saveas(h(i), ['figure' num2str(i)], 'jpg');
566 end
567
568 save('workspace.mat')
```

B.1.2 Fonctions

```

1 function v = f__movingvar(x,m)
2
3 n = size(x,1);
4 f = zeros(m,1)+1/m;
5
6 v = filter2(f,x.^2)-filter2(f,x).^2;
7 m2 = floor(m/2);
8 n2 = ceil(m/2)-1;
9 v = v([zeros(1,m2)+m2+1,(m2+1):(n-n2),zeros(1,n2)+(n-n2)],:);

1 function [X,Y,Z,a,b] = f__BaselineCorrection(ramp,force,
    partOfCurve)
2     baseline = fit(ramp(round(end-end/partOfCurve):end), force
    (round(end-end/partOfCurve):end), 'poly1');
3     force = force - baseline(ramp);
4     noise = force(round(end-end/partOfCurve):end);
5
6 b = baseline.p2;
7 a = baseline.p1;
8
9     X = ramp;
10    Y = force;
11    Z = noise;

1 function [peakList1 v] = f__PeakDetection5 (data,dataDFL,ak,
    dataWindow,epsilon,threshVar,peakHeight)
2
3 data(find((-1)*data < epsilon)) = 0;
4 v = f__movingvar(data,dataWindow);
5 v=v/max(v);
6 peakList1 = zeros(length(data),1);
7 if abs(ak)> 0.02

```

```

8     peakList1 = [];
9 else
10    aboveThresholdVar = (v > threshVar);
11    edges = diff(aboveThresholdVar);
12    rising = find(edges==1);
13    falling = find(edges==-1);
14
15    if isempty(find(length(rising)~=length(falling)))
16        storeInVecPeak = []; peakMin = []; peakRise =
17            []; peakFall = []; indexVecRise=[];
18            indexVecFall = [];
19        k=1;
20        for i = 1 : length(falling)
21            peakMin(i) = min(data(k:falling(i)));
22            k = rising(i);
23            peakRise(i) = data(rising(i));
24            peakFall(i) = data(falling(i));
25            if abs(abs(peakMin(i)) - abs(peakFall(i))) >
26                peakHeight;
27                storeInVecPeak(i) = peakMin(i);
28            end
29        end
30        aboveThresholdPeak = storeInVecPeak(find(abs(
31            storeInVecPeak) > epsilon ));
32        for i = 1 : length(aboveThresholdPeak)
33            peakList1(i) = find(data == aboveThresholdPeak(i))
34            ;
35        end
36        peakList1 = peakList1(find(peakList1));
37    else

```

```

33     peakList1 = [];
34     end
35
36 end

```

B.2 Traitement des courbes de conductance

```

1  addpath('C:\Users\Emmanuel\Desktop\Marie\redaction\matlab
    fichiers'); % Path of functions
2  fDirectory = uigetdir('D:\Data Marie\datas\AFM\2014-AFM\
    Peptide\Peptide in tetradecane\24092014\IZ current\
    ASCII_last_treat'); %1 nA/V 100mV
3  cd(fDirectory)
4  set(0, 'DefaultAxesFontName', 'Times New Roman', '
    DefaultAxesFontSize',12, 'DefaultLineLineWidth', 2) % for
    figures plot options
5  whitebg(0, 'white')
6  d = dir('*.txt'); % Only looking for .txt-Files
7  Sens=1; Volt=0.1;
8  nbins = 100;
9
10 CurMax = 5.5;
11 binRange = linspace(-0.1,5.5,nbins);
12
13 nFiles = length(d);
14 A = importdata(['data (' num2str(1) ').txt']);
15 Y = A.data;
16 NumDataColumn = size(Y,2);
17 NumDataLines = size(Y,1);
18
19 nFiles_begin = 1;

```

```

20 nFiles_end = nFiles;
21 CountFile = nFiles_end;
22
23 %% User input
24 VarianceWin_Step = 5;
25 Pow = linspace(-2,5,10);
26 VarianceThresh_Step = 10.^(-Pow);
27 LengthStep = 15;
28 nNoise = 100;
29 balise = 1;
30
31 %%
32
33 y = zeros(1,NumDataLines); binVector = zeros(1,nbins);
    binVectorSlm = zeros(1,nbins);
34
35     for i=nFiles_begin:nFiles_end
36
37         A = importdata(['data (' num2str(i) ').txt']);
38         data = A.data;
39         nPoints = length(data);
40         dataRamp = (200*linspace(1,nPoints,nPoints)/nPoints)';
41         if size(data,2) == 2;
42             data = data(:,2);
43         end
44         f=Sens*flipud(data);
45         f = f-mean(f(1:100));
46         noise = std(f(1:100));
47         findPeakNoise = find(abs(f)>2*noise);
48         f(findPeakNoise(1))=0;

```

```

49
50     for turn = 1:10
51         findPeakNoise = find(abs(f)>2*noise);
52
53         for m = 2 : length(findPeakNoise)-1
54             if findPeakNoise(m+1) - findPeakNoise(m) > 1 &&
                    findPeakNoise(m)>1 || findPeakNoise(m) -
                    findPeakNoise(m-1) > 1 ;
55                 %f(findPeakNoise(m)) = (f(findPeakNoise(m)-2)+
                    f(findPeakNoise(m)+2))/2;
56                 f(findPeakNoise(m)) = 0;%(f(findPeakNoise(m)
                    -2)+f(findPeakNoise(m)-1)+f(findPeakNoise(m)
                    +1)+f(findPeakNoise(m)+2))/4;
57             elseif findPeakNoise(m+1) - findPeakNoise(m) == 0
                    && findPeakNoise(m)>1 || findPeakNoise(m) -
                    findPeakNoise(m-1) == 0;
58                 if abs(f(findPeakNoise(m+1))- f(findPeakNoise(
                    m+1))) > noise || abs(f(findPeakNoise(m))-
                    f(findPeakNoise(m-1))) > noise &&
                    findPeakNoise(m)>1
59                 % f(findPeakNoise(m)) = (f(findPeakNoise(m)
                    -2)+f(findPeakNoise(m)+2))/2;
60                 f(findPeakNoise(m)) = 0;% (f(findPeakNoise(
                    m)-2)+f(findPeakNoise(m)-1)+f(
                    findPeakNoise(m)+1)+f(findPeakNoise(m)
                    +2))/4;
61
62             end
63         end
64     end

```

```

65     end
66     idxSat = find(f>5,1); idx0=find(f>3*noise,1);
67
68
69     if idxSat-idx0 > 50 && idx0>100
70         ydata = f(idx0-100:idxSat);
71         xdata = dataRamp(idx0-100:idxSat);
72     else
73         ydata = NaN(500,1);
74         xdata = NaN(500,1);
75     end
76
77 v1 = f__movingvar(ydata, VarianceWin_Step); v2=CurMax*(v1./max(
    v1));
78 v= diff(v2);
79     yreconstruct = zeros(1,length(ydata));
80     xreconstruct = xdata;
81     Newvec=zeros(1,length(ydata));
82     ydata2 = zeros(1,length(ydata));
83 for variance_index = 1 : length(VarianceThresh_Step)
84     aboveThresholdVar = (v > VarianceThresh_Step(
        variance_index));
85     edges = diff(aboveThresholdVar);
86     rising = find(edges==1); falling = find(edges==-1);
87
88     if ~isempty(falling)
89
90         j=1;
91         while j<length(falling)-1;
92             NumOfPoints_Step = abs(falling(j)-falling(j

```

```

+1));
93
94   if NumOfPoints_Step < LengthStep
95       while std(ydata(falling(j):falling(j)+
                    NumOfPoints_Step))<nNoise*noise*mean(
                    ydata(falling(j):falling(j))) &&
                    falling(j)+NumOfPoints_Step<length(
                    ydata) &&ydata(falling(j))> 3*noise;
96           NumOfPoints_Step=NumOfPoints_Step+1;
97       end
98       if NumOfPoints_Step > LengthStep
99           yreconstruct((falling(j):falling(j)+
                    NumOfPoints_Step)) = mean(ydata((
                    falling(j):falling(j)+NumOfPoints_Step
                    -5)));
100          ydata2((falling(j):falling(j)+
                    NumOfPoints_Step))=ydata((falling(j):
                    falling(j)+NumOfPoints_Step));
101       end
102       elseif std(ydata(falling(j):falling(j)+
                    NumOfPoints_Step))<nNoise*noise*mean(ydata
                    (falling(j):falling(j))) && length(ydata(
                    falling(j):falling(j)+NumOfPoints_Step))>
                    LengthStep &&ydata(falling(j))> 3*noise;
103          yreconstruct((falling(j):falling(j)+
                    NumOfPoints_Step)) = mean(ydata((
                    falling(j):falling(j)+NumOfPoints_Step
                    -5)));
104          ydata2((falling(j):falling(j)+
                    NumOfPoints_Step))=ydata((falling(j):

```

```

                                falling(j)+NumOfPoints_Step));
105
106         end
107
108         test = falling(j)+NumOfPoints_Step;
109         test2 = find(falling>test);
110         if ~isempty(test2)
111             j = test2(1);
112         else
113             j=j+1;
114         end
115
116         end
117     end
118     [binCountsSlm,~] = histc(yreconstruct,binRange);
119     binVectorSlm = binVectorSlm + binCountsSlm;
120 end
121
122 if ~isnan(ydata)
123     if balise == 1
124         figure(1);
125         ylim([-0.1 5.5])
126         plot(xdata,ydata,'r','linewidth',1)
127         hold on
128         plot(xdata,v2)
129         plot(xreconstruct,yreconstruct,'g','linewidth',2)
130         hold off
131         drawnow
132     end
133     display(['Import complete ' num2str(i*100/nFiles) '

```

```
                                % '])  
134  end  
135      [binCounts,~] = histc(ydata',binRange);  
136      binVector = binVector + binCounts;  
137  end  
138  
139  figure(2)  
140  bar(binRange,binVector)  
141  figure(3)  
142  bar(binRange,binVectorS1m)  
143  save(['workspace (' num2str(CountFile) ').mat'])
```

Bibliographie

- [1] F. Oesterhelt, M. Rief, et H. E. Gaub, “Single molecule force spectroscopy by AFM indicates helical structure of poly(ethylene-glycol) in water,” *New Journal of Physics* **1**, 6–6 (1999). URL : <http://dx.doi.org/10.1088/1367-2630/1/1/006>. (document), II.1, II.1, VI.4, VI.4.1, VI.4.3
- [2] D. J. Muller et A. Engel, “Atomic force microscopy and spectroscopy of native membrane proteins,” *Nat Protoc* **2**, 2191–2197 (2007). URL : <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.309>. (document), II.2
- [3] Y. Chen, S. E. Radford, et D. J. Brockwell, “Force-induced remodelling of proteins and their complexes,” *Current Opinion in Structural Biology* **30**, 89–99 (2015). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2015.02.001>. (document), II.3
- [4] X. Li, J. He, J. Hihath, B. Xu, S. M. Lindsay, et N. Tao, “Conductance of single alkanedithiols : conduction mechanism and effect of molecule-electrode contacts,” *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2135–2141 (2006). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/ja057316x>. (document), ??, ??, ??, ??, III.1, III.1.2, III.2, III.3
- [5] G. Rubio-Bollinger, S. R. Bahn, N. Agraït, K. W. Jacobsen, et S. Vieira, “Mechanical properties and formation mechanisms of a wire of single gold atoms,” *Phys. Rev. Lett.* **87**, 026101 (2001). URL : <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.87.026101>. (document), III.1.1, III.1.1, III.1, III.1.3
- [6] R. David, M. Erdmann, A. R. Fornof, et H. E. Gaub, “Functionalization of cantilever tips with nucleotides by the phosphoramidite method,” *ChemMedChem* **9**, 2049–2051 (2014). URL : <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201402165>. (document), ??, ??, III.3, III.2.2

- [7] L. Scullion, T. Doneux, L. Bouffier, D. G. Fernig, S. J. Higgins, D. Bethell, et R. J. Nichols, "Large conductance changes in peptide single molecule junctions controlled by pH," *J. Phys. Chem. C* **115**, 8361–8368 (2011). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/jp201222b>. (document), III.3, III.4, VII.3.1
- [8] A. K. A. Aliganga, A.-S. Duwez, et S. Mittler, "Binary mixtures of self-assembled monolayers of 1, 8-octanedithiol and 1-octanethiol for a controlled growth of gold nanoparticles," *Organic Electronics* **7**, 337–350 (2006). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.orgel.2006.03.013>. (document), IV.2, IV.5
- [9] J. Zhang, P. Chen, B. Yuan, W. Ji, Z. Cheng, et X. Qiu, "Real-space identification of intermolecular bonding with atomic force microscopy," *Science* **342**, 611–614 (2013). URL : <http://dx.doi.org/10.1126/science.1242603>. (document)
- [10] N. Kodera, D. Yamamoto, R. Ishikawa, et T. Ando, "Video imaging of walking myosin v by high-speed atomic force microscopy," *Nature* **468**, 72–76 (2010). URL : <http://dx.doi.org/10.1038/nature09450>. (document)
- [11] G. Binnig et H. Rohrer, "Scanning tunneling microscopy—from birth to adolescence(nobel lecture)," *Angewandte Chemie International Edition in English* **26**, 606–614 (1987). URL : <http://dx.doi.org/10.1002/anie.198706061>. (document)
- [12] C. R. So, J. L. Kulp, E. E. Oren, H. Zareie, C. Tamerler, J. S. Evans, et M. Sarikaya, "Molecular recognition and supramolecular self-assembly of a genetically engineered gold binding peptide on au{111}," *ACS Nano* **3**, 1525–1531 (2009). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/nn900171s>. (document)
- [13] Q. Li, G. Lee, C. Ong, et C. Lim, "AFM indentation study of breast cancer cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications* **374**, 609–613 (2008). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.078>. I.1
- [14] S. E. Cross, Y.-S. Jin, J. Tondre, R. Wong, J. Rao, et J. K. Gimzewski, "AFM-based analysis of human metastatic cancer cells," *Nanotechnology* **19**, 384003 (2008). URL : <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/19/38/384003>. I.1
- [15] T. G. Kuznetsova, M. N. Starodubtseva, N. I. Yegorenkov, S. A. Chizhik, et R. I. Zhdanov, "Atomic force microscopy probing of cell elasticity," *Micron* **38**,

- 824–833 (2007). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2007.06.011>.
I.1
- [16] G. Francius, B. Tesson, E. Dague, V. Martin-Jézéquel, et Y. F. Dufrêne, “Nanostructure and nanomechanics of live phaeodactylum tricornutum morphotypes,” *Environ Microbiol* **10**, 1344–1356 (2008). URL : <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01551.x>. I.1
- [17] J. J. Heinisch, V. Dupres, D. Alsteens, et Y. F. Dufrêne, “Measurement of the mechanical behavior of yeast membrane sensors using single-molecule atomic force microscopy,” *Nat Protoc* **5**, 670–677 (2010). URL : <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2010.19>. I.1
- [18] D. Alsteens, V. Dupres, K. M. Evoy, L. Wildling, H. J. Gruber, et Y. F. Dufrene, “Structure, cell wall elasticity and polysaccharide properties of living yeast cells, as probed by afm,” *Nanotechnology* **19**, 384005 (2008). URL : <http://stacks.iop.org/0957-4484/19/i=38/a=384005>. I.1
- [19] B. Xu, X. Xiao, et N. J. Tao, “Measurements of single-molecule electromechanical properties,” *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 16164–16165 (2003). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/ja038949j>. I.1, ??, ??, ??, ??, III.1.1, III.1.3, ??, III.3
- [20] M. Frei, S. V. Aradhya, M. S. Hybertsen, et L. Venkataraman, “Linker dependent bond rupture force measurements in single-molecule junctions,” *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 4003–4006 (2012). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/ja211590d>. I.1, ??, ??
- [21] K. Yoshida, I. V. Pobelov, D. Z. Manrique, T. Pope, G. Mészáros, M. Gulcur, M. R. Bryce, C. J. Lambert, et T. Wandlowski, “Correlation of breaking forces, conductances and geometries of molecular junctions,” *Sci. Rep.* **5**, 9002 (2015). URL : <http://dx.doi.org/10.1038/srep09002>. I.1, ??, ??, III.1.1, III.1.3, ??, ??, ??, VI.3.3
- [22] P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H. J. Gruber, K. Schilcher, et H. Schindler, “Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 3477–3481 (1996). URL : <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.8.3477>. I.1

- [23] C. Stroh, H. Wang, R. Bash, B. Ashcroft, J. Nelson, H. Gruber, D. Lohr, S. M. Lindsay, et P. Hinterdorfer, “Single-molecule recognition imaging microscopy,” *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 12503–12507 (2004). URL : <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0403538101>. I.1
- [24] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces, Third Edition* (Academic Press, 2010). I.2, VI.1.3
- [25] T. Stifter, O. Marti, et B. Bhushan, “Theoretical investigation of the distance dependence of capillary and van der waals forces in scanning force microscopy,” *Phys. Rev. B* **62**, 13667–13673 (2000). URL : <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevB.62.13667>. I.2
- [26] H.-J. Butt, B. Cappella, et M. Kappl, “Force measurements with the atomic force microscope : Technique, interpretation and applications,” *Surface Science Reports* **59**, 1–152 (2005). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.surfrep.2005.08.003>. I.2, I.2, V.1.1, VI.2.4
- [27] S. Marčelja et N. Radić, “Repulsion of interfaces due to boundary water,” *Chemical Physics Letters* **42**, 129–130 (1976). URL : [http://dx.doi.org/10.1016/0009-2614\(76\)80567-2](http://dx.doi.org/10.1016/0009-2614(76)80567-2). I.2
- [28] J. Israelachvili et H. Wennerström, “Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions,” *Nature* **379**, 219–225 (1996). URL : <http://dx.doi.org/10.1038/379219a0>. I.2
- [29] J. J. Valle-Delgado, J. A. Molina-Bolivar, F. Galisteo-Gonzalez, M. J. Galvez-Ruiz, A. Feiler, et M. W. Rutland, “Hydration forces between silica surfaces : Experimental data and predictions from different theories,” *The Journal of Chemical Physics* **123**, 034708 (2005). URL : <http://dx.doi.org/10.1063/1.1954747>. I.2
- [30] M. A. Reed, “Conductance of a molecular junction,” *Science* **278**, 252–254 (1997). URL : <http://dx.doi.org/10.1126/science.278.5336.252>. I.3
- [31] B. Xu, “Measurement of single-molecule resistance by repeated formation of molecular junctions,” *Science* **301**, 1221–1223 (2003). URL : <http://dx.doi.org/10.1126/science.1087481>. I.3

- [32] L. Venkataraman, J. E. Klare, C. Nuckolls, M. S. Hybertsen, et M. L. Steigerwald, "Dependence of single-molecule junction conductance on molecular conformation," *Nature* **442**, 904–907 (2006). URL : <http://dx.doi.org/10.1038/nature05037>. I.3
- [33] S. Y. Quek, L. Venkataraman, H. J. Choi, S. G. Louie, M. S. Hybertsen, et J. B. Neaton, "Amine-gold linked single-molecule circuits : experiment and theory," *Nano Letters* **7**, 3477–3482 (2007). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/nl1072058i>. I.3
- [34] F. Chen, X. Li, J. Hihath, Z. Huang, et N. Tao, "Effect of anchoring groups on single-molecule conductance : comparative study of thiol-, amine-, and carboxylic-acid-terminated molecules," *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 15874–15881 (2006). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/ja065864k>. I.3, V
- [35] D. C. Milan, O. A. Al-Owaedi, M.-C. Oerthel, S. Marqués-González, R. J. Brooke, M. R. Bryce, P. Cea, J. Ferrer, S. J. Higgins, C. J. Lambert, P. J. Low, D. Z. Manrique, S. Martin, R. J. Nichols, W. Schwarzacher, et V. M. García-Suárez, "Solvent dependence of the single molecule conductance of oligoynes-based molecular wires," *J. Phys. Chem. C* (2015). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b08877>. I.3
- [36] M. K. T. A. Vilgis, G. Heinrich, *Reinforcement of Polymer Nano-Composites : Theory, Experiments and Applications* (Cambridge University Press, 2009). II.1
- [37] G. Bell, "Models for the specific adhesion of cells to cells," *Science* **200**, 618–627 (1978). URL : <http://dx.doi.org/10.1126/science.347575>. II.2
- [38] E. Evans, D. Berk, A. Leung, et N. Mohandas, "Detachment of agglutinin-bonded red blood cells. II. mechanical energies to separate large contact areas," *Biophysical Journal* **59**, 849–860 (1991). URL : [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82297-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82297-4). II.2
- [39] E. Evans et K. Ritchie, "Strength of a weak bond connecting flexible polymer chains," *Biophysical Journal* **76**, 2439–2447 (1999). URL : [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77399-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77399-6). II.2

- [40] E. Evans, “Probing the relation between force—lifetime—and chemistry in single molecular bonds,” *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **30**, 105–128 (2001). URL : <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biophys.30.1.105>. II.2
- [41] H. Kramers, “Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions,” *Physica* **7**, 284–304 (1940). URL : [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-8914\(40\)90098-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-8914(40)90098-2). II.2
- [42] R. W. Friddle, A. Noy, et J. J. D. Yoreo, “Interpreting the widespread nonlinear force spectra of intermolecular bonds,” *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 13573–13578 (2012). URL : <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1202946109>. II.2, VI.3.2
- [43] S. Datta, *Electronic Transport in Mesoscopic Systems (Cambridge Studies in Semiconductor Physics and Microelectronic Engineering)* (Cambridge University Press, 1997). II.3.2
- [44] S. V. Aradhya, M. Frei, M. S. Hybertsen, et L. Venkataraman, “Van der waals interactions at metal/organic interfaces at the single-molecule level,” *Nature Materials* **11**, 872–876 (2012). URL : <http://dx.doi.org/10.1038/nmat3403>. III, ??
- [45] J. L. Hutter et J. Bechhoefer, “Calibration of atomic-force microscope tips,” *Rev. Sci. Instrum.* **64**, 1868 (1993). URL : <http://dx.doi.org/10.1063/1.1143970>. III
- [46] S. Ahn, S. V. Aradhya, R. S. Klausen, B. Capozzi, X. Roy, M. L. Steigerwald, C. Nuckolls, et L. Venkataraman, “Electronic transport and mechanical stability of carboxyl linked single-molecule junctions,” *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 13841 (2012). URL : <http://dx.doi.org/10.1039/C2CP41578J>. III.2.2
- [47] M. Grandbois, “How strong is a covalent bond ?” *Science* **283**, 1727–1730 (1999). URL : <http://dx.doi.org/10.1126/science.283.5408.1727>. ??, III.1.3
- [48] K. C. Langry, T. V. Ratto, R. E. Rudd, et M. W. McElfresh, “The AFM measured force required to rupture the dithiolate linkage of thioctic acid to gold is less than

- the rupture force of a simple gold-alkyl thiolate bond,” *Langmuir* **21**, 12064–12067 (2005). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/la0513555>. ??, ??, ??, III.1.3
- [49] Huang, Xu, Chen, M. D. Ventra, et Tao, “Measurement of current-induced local heating in a single molecule junction,” *Nano Letters* **6**, 1240–1244 (2006). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/nl0608285>. ??, ??, ??, ??, ??, ??, III.1.3, III.1.3
- [50] H. Skulason et C. D. Frisbie, “Detection of discrete interactions upon rupture of Au microcontacts to self-assembled monolayers terminated with -s(CO)CH₃ or -SH,” *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9750–9760 (2000). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/ja994524e>. ??, III.1.3
- [51] Y. Xue, X. Li, H. Li, et W. Zhang, “Quantifying thiol–gold interactions towards the efficient strength control,” *Nature Communications* **5** (2014). URL : <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5348>. ??, III.1.3
- [52] R. G. Nuzzo et D. L. Allara, “Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces,” *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 4481–4483 (1983). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/ja00351a063>. III.1.1
- [53] D. Krüger, R. Rousseau, H. Fuchs, et D. Marx, “Cover picture : Towards “mechananochemistry” : Mechanically induced isomerizations of thiolate–gold clusters (angew. chem. int. ed. 20/2003),” *Angewandte Chemie International Edition* **42**, 2203–2203 (2003). URL : <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200390457>. :ANIE200390457
- [54] D. Krüger, H. Fuchs, R. Rousseau, D. Marx, et M. Parrinello, “Pulling monatomic gold wires with single molecules : An *Ab Initio* simulation,” *Phys. Rev. Lett.* **89**, 186402 (2002). URL : <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.89.186402>.
- [55] D. E. King, “Oxidation of gold by ultraviolet light and ozone at 25 °c,” *Journal of Vacuum Science & Technology A : Vacuum, Surfaces, and Films* **13**, 1247 (1995). URL : <http://dx.doi.org/10.1116/1.579869>. III.1.3

- [56] M. Frei, S. V. Aradhya, M. Koentopp, M. S. Hybertsen, et L. Venkataraman, "Mechanics and chemistry : Single molecule bond rupture forces correlate with molecular backbone structure," *Nano Letters* **11**, 1518–1523 (2011). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/nl1042903>. ??, ??, ??, ??
- [57] M. Erdmann, R. David, A. R. Fornof, et H. E. Gaub, "Electrically induced bonding of DNA to gold," *Nature Chemistry* **2**, 745–749 (2010). URL : <http://dx.doi.org/10.1038/nchem.722>. ??, ??, III.2.2, III.2.2
- [58] Y. Kim, T. J. Hellmuth, M. Burkle, F. Pauly, et E. Scheer, "Characteristics of amine-ended and thiol-ended alkane single-molecule junctions revealed by inelastic electron tunneling spectroscopy," *ACS Nano* **5**, 4104–4111 (2011). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/nn200759s>. III.2.1
- [59] N. S. H. Ante Bilic, Jeffrey R. Reimers et J. Hafner, "Adsorption of ammonia on the gold (111) surface," *The Journal of Chemical Physics* **116**, 8981 (2002). URL : <http://dx.doi.org/10.1063/1.1471245>. III.2.2
- [60] N. A. Lambropoulos, J. R. Reimers, et N. S. Hush, "Binding to gold(0) : Accurate computational methods with application to AuNH[sub 3]," *The Journal of Chemical Physics* **116**, 10277 (2002). URL : <http://dx.doi.org/10.1063/1.1473197>. III.2.2
- [61] D. J. Wold, R. Haag, M. A. Rampi, et C. D. Frisbie, "Distance dependence of electron tunneling through self-assembled monolayers measured by conducting probe atomic force microscopy : unsaturated versus saturated molecular junctions," *The Journal of Physical Chemistry B* **106**, 2813–2816 (2002). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/jp013476t>. III.3
- [62] J. M. Scholtz, S. Marqusee, R. L. Baldwin, E. J. York, J. M. Stewart, M. Santoro, et D. W. Bolen, "Calorimetric determination of the enthalpy change for the alpha-helix to coil transition of an alanine peptide in water." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 2854–2858 (1991). URL : <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.88.7.2854>. IV.1
- [63] S. Marqusee, V. H. Robbins, et R. L. Baldwin, "Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides." *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences **86**, 5286–5290 (1989). URL : <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.86.14.5286>. IV.1
- [64] J. M. Scholtz, H. Qian, E. J. York, J. M. Stewart, et R. L. Baldwin, “Parameters of helix-coil transition theory for alanine-based peptides of varying chain lengths in water,” *Biopolymers* **31**, 1463–1470 (1991). URL : <http://dx.doi.org/10.1002/bip.360311304>. IV.1, IV.1
- [65] R. Afrin, I. Takahashi, K. Shiga, et A. Ikai, “Tensile mechanics of alanine-based helical polypeptide : Force spectroscopy versus computer simulations,” *Biophysical Journal* **96**, 1105–1114 (2009). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2008.10.046>. IV.1
- [66] D. Roccatano, G. Colombo, M. Fioroni, et A. E. Mark, “Mechanism by which 2, 2, 2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides : A molecular dynamics study,” *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 12179–12184 (2002). URL : <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.182199699>. IV.1
- [67] N. J. Greenfield, “Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure,” *Nature Protocol* **1**, 2876–2890 (2007). URL : <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.202>. IV.1
- [68] A. Vallée, V. Humblot, C. Méthivier, et C.-M. Pradier, “Glutathione adsorption from UHV to the liquid phase at various pH on gold and subsequent modification of protein interaction,” *Surface and Interface Analysis* **40**, 395–399 (2008). URL : <http://dx.doi.org/10.1002/sia.2636>. IV.2
- [69] B. Ren, G. Picardi, et B. Pettinger, “Preparation of gold tips suitable for tip-enhanced raman spectroscopy and light emission by electrochemical etching,” *Rev. Sci. Instrum.* **75**, 837 (2004). URL : <http://dx.doi.org/10.1063/1.1688442>. IV.3.1
- [70] J. Park, T. Hong, N. Lee, K. Kim, et Y. Seo, “Viscosity dependence of electrochemical etching for gold tip fabrication,” *Current Applied Physics* **11**, 1332–1336 (2011). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.cap.2011.03.075>. IV.3.1

- [71] C. K. Riener, C. M. Stroh, A. Ebner, C. Klampfl, A. A. Gall, C. Romanin, Y. L. Lyubchenko, P. Hinterdorfer, et H. J. Gruber, "Simple test system for single molecule recognition force microscopy," *Analytica Chimica Acta* **479**, 59–75 (2003). URL : [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)01373-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(02)01373-9). IV.3.3
- [72] C. K. Riener, F. Kienberger, C. D. Hahn, G. M. Buchinger, I. O. Egwim, T. Haselgrübler, A. Ebner, C. Romanin, C. Klampfl, B. Lackner, H. Prinz, D. Blaas, P. Hinterdorfer, et H. J. Gruber, "Heterobifunctional crosslinkers for tethering single ligand molecules to scanning probes," *Analytica Chimica Acta* **497**, 101–114 (2003). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2003.08.041>. IV.3.3
- [73] A. Ebner, F. Kienberger, G. Kada, C. M. Stroh, M. Geretschläger, A. S. M. Kamruzzahan, L. Wildling, W. T. Johnson, B. Ashcroft, J. Nelson, S. M. Lindsay, H. J. Gruber, et P. Hinterdorfer, "Localization of single avidin-biotin interactions using simultaneous topography and molecular recognition imaging," *ChemPhysChem* **6**, 897–900 (2005). URL : <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.200400545>. IV.3.3
- [74] N. Aissaoui, L. Bergaoui, J. Landoulsi, J.-F. Lambert, et S. Boujday, "Silane layers on silicon surfaces : Mechanism of interaction, stability, and influence on protein adsorption," *Langmuir* **28**, 656–665 (2012). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/la2036778>. IV.3.3
- [75] N. Aissaoui, L. Bergaoui, S. Boujday, J.-F. Lambert, C. Méthivier, et J. Landoulsi, "Enzyme immobilization on silane-modified surface through short linkers : Fate of interfacial phases and impact on catalytic activity," *Langmuir* **30**, 4066–4077 (2014). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/la404935q>. IV.3.3
- [76] N. W. Anne-Sophie Duwez, *Molecular Manipulation with Atomic Force Microscopy* (CRC Press, 2011). 1
- [77] J. Struckmeier, R. Wahl, M. Leuschner, J. Nunes, H. Janovjak, U. Geisler, G. Hofmann, T. Jähnke, et D. J. Müller, "Fully automated single-molecule force spectroscopy for screening applications," *Nanotechnology* **19**, 384020 (2008). URL : <http://stacks.iop.org/0957-4484/19/i=38/a=384020>. V

- [78] B. Andreopoulos et D. Labudde, “Efficient unfolding pattern recognition in single molecule force spectroscopy data,” *Algorithms Mol Biol* **6**, 16 (2011). URL : <http://dx.doi.org/10.1186/1748-7188-6-16>. V
- [79] A. Marsico, D. Labudde, T. Sapra, D. J. Muller, et M. Schroeder, “A novel pattern recognition algorithm to classify membrane protein unfolding pathways with high-throughput single-molecule force spectroscopy,” *Bioinformatics* **23**, e231–e236 (2007). URL : <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bt1293>. V
- [80] P. D. Bosshart, P. L. Frederix, et A. Engel, “Reference-free alignment and sorting of single-molecule force spectroscopy data,” *Biophysical Journal* **102**, 2202–2211 (2012). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2012.03.027>. V
- [81] R. Lévy, “Interactions intra et intermoléculaires, conformation des polymères adsorbés, transitions de phases sous étirement : Que peut-on apprendre des mesures de force ?” Th de doctorat, Université Louis Pasteur Strasbourg 1 (2002). V.1.2
- [82] R. Lévy et M. Maaloum, “Probing adsorbed polymer chains using atomic force microscopy : interpretation of rupture distributions,” *Journal of Physics : Condensed Matter* **16**, 7199 (2004). URL : <http://stacks.iop.org/0953-8984/16/i=41/a=003>. V.1.2
- [83] E. Zivot et J. Wang, *Modeling Financial Time Series with S-PLUS®* (Springer, 2006). V.1.2
- [84] B. Derjaguin, “On the repulsive forces between charged colloid particles and on the theory of slow coagulation and stability of lyophobic sols,” *Trans. Faraday Soc.* **35**, 203 (1940). URL : <http://dx.doi.org/10.1039/TF9403500203>. VI.2.4
- [85] B. Derjaguin et L. Landau, “Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes,” *Progress in Surface Science* **43**, 30–59 (1993). URL : [http://dx.doi.org/10.1016/0079-6816\(93\)90013-L](http://dx.doi.org/10.1016/0079-6816(93)90013-L). VI.2.4
- [86] E. J. W. Verwey et J. T. G. Overbeek, *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids (Dover Books on Chemistry)* (Dover Publications (édition originale 1948), 1999). VI.2.4

- [87] J. Sotres et A. Baró, “AFM imaging and analysis of electrostatic double layer forces on single DNA molecules,” *Biophysical Journal* **98**, 1995–2004 (2010). URL : <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2009.12.4330>. VI.2.4
- [88] D. Barten, J. M. Kleijn, J. Duval, J. Lyklema, et M. A. C. Stuart, “Double layer of a gold electrode probed by AFM force measurements,” *Langmuir* **19**, 1133–1139 (2003). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/la0117092>. VI.2.4
- [89] U. Piran et W. J. Riordan, “Dissociation rate constant of the biotin-streptavidin complex,” *Journal of Immunological Methods* **133**, 141–143 (1990). URL : [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(90\)90328-S](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(90)90328-S). VI.3
- [90] F. Pincet et J. Husson, “The solution to the streptavidin-biotin paradox : The influence of history on the strength of single molecular bonds,” *Biophysical Journal* **89**, 4374–4381 (2005). URL : <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.105.067769>. VI.3.1
- [91] J. Husson et F. Pincet, “Analyzing single-bond experiments : Influence of the shape of the energy landscape and universal law between the width, depth, and force spectrum of the bond,” *Physical Review E* **77** (2008). URL : <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.77.026108>. VI.3.1, VI.3.1
- [92] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, et E. Evans, “Energy landscapes of receptor–ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy,” *Nature* **397**, 50–53 (1999). URL : <http://dx.doi.org/10.1038/16219>. VI.3.1, VI.3.1
- [93] A. Noy, *Handbook of molecular force spectroscopy* (Springer, New York, NY, 2008). VI.3.1
- [94] M. A. Koussa, K. Halvorsen, A. Ward, et W. P. Wong, “DNA nanoswitches : a quantitative platform for gel-based biomolecular interaction analysis,” *Nature Methods* **12**, 123–126 (2014). URL : <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3209>. VI.3.1
- [95] P. M. Williams, A. Moore, M. M. Stevens, S. Allen, M. C. Davies, C. J. Roberts, et S. J. B. Tendler, “On the dynamic behaviour of the forced dissociation of ligand–receptor pairs,” *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* p. 5–8 (2000). URL : <http://dx.doi.org/10.1039/A907750B>. VI.3.1

- [96] C. Friedsam, A. K. Wehle, F. Kuhner, et H. E. Gaub, “Dynamic single-molecule force spectroscopy : bond rupture analysis with variable spacer length,” *Journal of Physics : Condensed Matter* **15**, S1709 (2003). URL : <http://stacks.iop.org/0953-8984/15/i=18/a=305>. VI.3.2, VI.3.2, VI.3.2
- [97] D. Alsteens, M. Pfreundschuh, C. Zhang, P. M. Spoerri, S. R. Coughlin, B. K. Kobilka, et D. J. Müller, “Imaging g protein-coupled receptors while quantifying their ligand-binding free-energy landscape,” *Nature Methods* **12**, 845–851 (2015). URL : <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3479>. VI.3.2, VI.3.2
- [98] J. Landoulsi et V. Dupres, “Probing peptide-inorganic surface interaction at the single molecule level using force spectroscopy,” *ChemPhysChem* **12**, 1310–1316 (2011). URL : <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.201100007>. (document), VI.3.3
- [99] S. Guo, N. Li, N. Lad, S. Desai, et B. B. Akhremitchev, “Distributions of parameters and features of multiple bond ruptures in force spectroscopy by atomic force microscopy,” *J. Phys. Chem. C* **114**, 8755–8765 (2010). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/jp100543u>. VI.4, VI.4.1
- [100] M. Frei, “Force and conductance spectroscopy of single molecule junctions,” Th de doctorat, COLUMBIA UNIVERSITY (2012). VII.1.2, VII.4
- [101] C. S. Levin, B. G. Janesko, R. Bardhan, G. E. Scuseria, J. D. Hartgerink, et N. J. Halas, “Chain-length-dependent vibrational resonances in alkanethiol self-assembled monolayers observed on plasmonic nanoparticle substrates,” *Nano Letters* **6**, 2617–2621 (2006). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/nl062283k>. VII.4
- [102] P. L. Stiles, J. A. Dieringer, N. C. Shah, et R. P. V. Duyne, “Surface-enhanced raman spectroscopy,” *Annual Review of Analytical Chemistry* **1**, 601–626 (2008). URL : <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112814>. VIII.1.2
- [103] K. Kneipp, H. Kneipp, R. Manoharan, E. B. Hanlon, I. Itzkan, R. R. Dasari, et M. S. Feld, “Extremely large enhancement factors in surface-enhanced raman scattering for molecules on colloidal gold clusters,” *Appl. Spectrosc.* **52**, 1493–

- 1497 (1998). URL : <http://as.osa.org/abstract.cfm?URI=as-52-12-1493>. VIII.1.2
- [104] F. Bondu, "Etude de la conformation d'adsorption de l'acide isonicotinique sur au <111> par spectroscopie d'impédance-raman et modulation de capacité," Th de doctorat, Université Pierre et Marie Curie (2013). URL : <http://www.theses.fr/2013PA066268>, thèse de doctorat dirigée par Joiret, Suzanne Chimie Physique et Chimie Analytique Paris 6 2013. VIII.1.2
- [105] M.-C. Bernard, C. Deslouis, T. E. Moustafid, A. Hugot-LeGoff, S. Joiret, et B. Tribollet, "Combined impedance and raman analysis in the study of corrosion protection of iron by polyaniline," *Synthetic Metals* **102**, 1381–1382 (1999). URL : [http://dx.doi.org/10.1016/S0379-6779\(98\)00985-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0379-6779(98)00985-0). VIII.1.2
- [106] M. Fleischmann, P. Hendra, et A. McQuillan, "Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode," *Chemical Physics Letters* **26**, 163–166 (1974). URL : [http://dx.doi.org/10.1016/0009-2614\(74\)85388-1](http://dx.doi.org/10.1016/0009-2614(74)85388-1). VIII.1.2
- [107] L. A. Lane, X. Qian, et S. Nie, "SERS nanoparticles in medicine : From label-free detection to spectroscopic tagging," *Chemical Reviews* **115**, 10489–10529 (2015). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00265>. VIII.1.2
- [108] R. Zhang, Y. Zhang, Z. C. Dong, S. Jiang, C. Zhang, L. G. Chen, L. Zhang, Y. Liao, J. Aizpurua, Y. Luo, J. L. Yang, et J. G. Hou, "Chemical mapping of a single molecule by plasmon-enhanced raman scattering," *Nature* **498**, 82–86 (2013). URL : <http://dx.doi.org/10.1038/nature12151>. VIII.1.3
- [109] M. S. Anderson, "Locally enhanced raman spectroscopy with an atomic force microscope," *Appl. Phys. Lett.* **76**, 3130 (2000). URL : <http://dx.doi.org/10.1063/1.126546>. VIII.1.3
- [110] R. M. Stöckle, Y. D. Suh, V. Deckert, et R. Zenobi, "Nanoscale chemical analysis by tip-enhanced raman spectroscopy," *Chemical Physics Letters* **318**, 131–136 (2000). URL : [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-2614\(99\)01451-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-2614(99)01451-7). VIII.1.3
- [111] T. Schmid, L. Opilik, C. Blum, et R. Zenobi, "Nanoscale chemical imaging using tip-enhanced raman spectroscopy : A critical review," *Angewandte Chemie In-*

- ternational Edition **52**, 5940–5954 (2013). URL : <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201203849>. VIII.1.3
- [112] G. Picardi, M. Chaigneau, R. Ossikovski, C. Licitra, et G. Delapierre, “Tip enhanced raman spectroscopy on azobenzene thiol self-assembled monolayers on au(111),” *J. Raman Spectrosc.* **40**, 1407–1412 (2009). URL : <http://dx.doi.org/10.1002/jrs.2362>. VIII.2, VIII.3.3
- [113] W.-Q. Deng, R. P. Muller, et W. A. Goddard, “Mechanism of the stoddart-heath bistable rotaxane molecular switch,” *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 13562–13563 (2004). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/ja036498x>. VIII.3.1
- [114] C. A. Schalley, K. Beizai, et F. Vögtle, “On the way to rotaxane-based molecular motors : studies in molecular mobility and topological chirality †,” *Accounts of Chemical Research* **34**, 465–476 (2001). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/ar000179i>. VIII.3.1
- [115] P. Lussis, T. Svaldo-Lanero, A. Bertocco, C.-A. Fustin, D. A. Leigh, et A.-S. Duwez, “A single synthetic small molecule that generates force against a load,” *Nature Nanotech* **6**, 553–557 (2011). URL : <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2011.132>. VIII.3.1
- [116] M. Feng, L. Gao, S. X. Du, Z. T. Deng, Z. H. Cheng, W. Ji, D. Q. Zhang, X. F. Guo, X. Lin, L. F. Chi, D. B. Zhu, H. Fuchs, et H.-J. Gao, “Observation of structural and conductance transition of rotaxane molecules at a submolecular scale,” *Adv. Funct. Mater.* **17**, 770–776 (2007). URL : <http://dx.doi.org/10.1002/adfm.200600973>. VIII.3.2
- [117] H. Rath, G. A. Timco, V. Corradini, A. Ghirri, U. del Pennino, A. Fernandez, R. G. Pritchard, C. A. Muryn, M. Affronte, et R. E. P. Winpenney, “Studies of hybrid organic–inorganic [2] and [3]rotaxanes bound to au surfaces,” *Chemical Communications* **49**, 3404 (2013). URL : <http://dx.doi.org/10.1039/C3CC38699F>. VIII.3.2, VIII.3.2
- [118] J. Bodenheimer, E. Loewenthal, et W. Low, “The raman spectra of ferrocene,” *Chemical Physics Letters* **3**, 715–716 (1969). URL : [http://dx.doi.org/10.1016/0009-2614\(69\)87018-1](http://dx.doi.org/10.1016/0009-2614(69)87018-1). VIII.3.3

- [119] N. Chiang, N. Jiang, D. V. Chulhai, E. A. Pozzi, M. C. Hersam, L. Jensen, T. Seideman, et R. P. V. Duyne, “Molecular-resolution interrogation of a porphyrin monolayer by ultrahigh vacuum tip-enhanced raman and fluorescence spectroscopy,” *Nano Letters* **15**, 4114–4120 (2015). URL : <http://dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b01225>. VIII.3.3