



Liaisons par Chélation et Liaisons Hydrogène: une Mesure Directe

David Taresté

► **To cite this version:**

David Taresté. Liaisons par Chélation et Liaisons Hydrogène: une Mesure Directe. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2002. Français. <tel-00001889>

HAL Id: tel-00001889

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00001889>

Submitted on 30 Oct 2002

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.

**LABORATOIRE DE PHYSIQUE STATISTIQUE
DE L'ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE**



THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS VI

Spécialité : Physique des Liquides

Présentée par

David TARESTE

Pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Paris VI

Liaisons par Chélation et Liaisons Hydrogène : une Mesure Directe



Soutenue le 20 Septembre 2002 devant le jury composé de :

Mme Françoise Brochard	Examineur
Mme Élisabeth Charlaix	Rapporteur
M. François Gallet	Examineur
M. Patrick Guenoun	Rapporteur
M. Charles Mioskowski	Examineur
M. Éric Perez	Directeur de thèse

Avant-propos

Je remercie Sébastien Balibar et Jacques Meunier de m'avoir accueilli au Laboratoire de Physique Statistique de l'École Normale Supérieure.

Ce travail de thèse a été réalisé sous la direction d'Éric Perez, que je souhaite remercier pour la confiance qu'il a bien voulu m'accorder. Il a su faire preuve, à mon égard, d'une extrême indulgence et m'a toujours laissé faire "comme je voulais". Je souhaite que notre collaboration scientifique pour les années à venir puisse conduire à une *fusion* fructueuse entre le laboratoire de James Rothman et le Laboratoire de Physique Statistique.

L'aboutissement de ce travail doit beaucoup à Frédéric Pincet dont j'admire les qualités scientifiques et humaines. Il a su, exactement quand il le fallait, apporter les lumières qui m'ont permis de sortir indemne de l'abîme du second sous-sol. Je lui exprime ici toute ma gratitude.

Il m'a été très agréable de collaborer avec Charles Mioskowski et Luc Lebeau. Je tiens à les remercier pour leur grande disponibilité et pour les judicieux conseils qu'ils m'ont donnés. Je souhaite également remercier Pierre-Henri Puech pour les discussions très intéressantes que nous avons eues ensemble et pour avoir réalisé les expériences de microscopie de fluorescence.

J'adresse mes remerciements à Élisabeth Charlaix et Patrick Guenoun, qui ont bien voulu être les rapporteurs de mon travail de thèse, ainsi qu'à Françoise Brochard et François Gallet, qui ont accepté de faire partie du jury.

Je remercie Wladimir Urbach de m'avoir offert la possibilité d'enseigner à ses côtés à l'Université René Descartes et de m'avoir fait profiter de son objectivité et de son expérience.

Je souhaite bon courage à Christine Gourier pour son combat de tous les jours contre les *virus*, à Erol Kurtisovski pour la réalisation de ses nombreuses missions furtives, à Yann Gambin pour la création de sa brocante et à Julien Husson pour son apprentissage de la sténographie.

Anke Lindner, Julie Drappier, Salima Rafai et Nicolas Tsapis ont toujours été à mes côtés, que ce soit dans l'eau, sous terre ou sur terre. Leur présence a été très importante lors de ces années passées au Laboratoire de Physique Statistique.

Je remercie enfin Maureen Augeres et David Saint-Riquier pour leur soutien et les nombreuses escapades vers un Shangaï tricolore, ainsi que Magali Chaix et Cyril Vekris pour leur amitié.

Sommaire

Introduction	7
Chapitre I : Généralités	11
1. <i>Bicouches de molécules amphiphiles</i>	<i>11</i>
1-1. Présentation des molécules amphiphiles	11
1-1-1. Structure	11
1-1-2. Tension de surface	12
1-1-3. Agrégation des molécules amphiphiles	12
1-2. Monocouche d'amphiphiles – Isothermes de compression.....	13
1-3. Bicouche fixe d'amphiphiles – Prélèvements de Langmuir-Blodgett	16
1-4. Bicouche libre d'amphiphiles – Vésicules	17
1-4-1. Formation et propriétés mécaniques des vésicules	17
1-4-2. Pression osmotique – Morphologie des vésicules en solution aqueuse ...	19
2. <i>Les forces intervenant entre deux bicouches de molécules amphiphiles.....</i>	<i>21</i>
2-1. Les forces électrostatiques double-couche	21
2-2. Les forces de van der Waals	26
2-2-1. L'interaction de van der Waals entre deux molécules	27
2-2-2. L'interaction de van der Waals entre deux surfaces solides	28
2-2-3. L'interaction de van der Waals entre deux bicouches	29
2-2. Les forces de nature stérique	32
2-2-1. L'interaction d'ondulation d'Helfrich	33
2-2-2. L'interaction péristaltique	34
2-2-3. L'interaction de protrusion	34
2-2-4. L'interaction entre bicouches recouvertes de polymères	35
2-3. Les forces d'hydratation	39
2-3-1. Les forces oscillatoires entre deux surfaces solides	39
2-3-2. Les forces d'hydratation entre deux bicouches d'amphiphiles	43
2-4. Les forces spécifiques	44
2-4-1. Les liaisons hydrogène	45
2-4-2. Les liaisons par chélation	48
2-4-3. Les liaisons récepteur-ligand	48
3. <i>Les rétinoïdes.....</i>	<i>50</i>
3-1. Fonction biologique de l'acide rétinoïque	51
3-1-1. Rappel sur la synthèse et la structure des protéines	51
3-1-2. Mode d'action de l'acide rétinoïque	53
3-2. Les récepteurs de l'acide rétinoïque	54
3-2-1. Différents types de récepteurs	54
3-2-2. Structure du récepteur et liaison au ligand	56
3-2-3. Oligomérisation des récepteurs	58
3-2-4. Ligands synthétiques des récepteurs	60

Chapitre II : Dispositifs Expérimentaux	62
1. <i>La balance de Langmuir.....</i>	62
2. <i>L'appareil de mesure de forces entre surfaces (SFA).....</i>	63
2-1. Les surfaces d'étude	64
2-2. Le système de déplacement des surfaces	65
2-3. Le principe de mesure de la distance	66
2-4. Le principe de mesure de la force	68
2-5. Energie d'interaction et énergie d'adhésion entre les surfaces	69
3. <i>La technique des vésicules micromanipulées.....</i>	71
3-1. Préparation et observation des surfaces d'étude	71
3-2. Mesure de l'énergie d'adhésion entre deux vésicules micromanipulées	73
4. <i>Les outils moléculaires.....</i>	76
4-1. Les lipides NTA et NTA-Ni.....	77
4-2. Les récepteurs possédant une étiquette histidine.....	79
4-3. Le lipide rétinol.....	80
Chapitre III : Mesure d'une Liaison Hydrogène.....	82
1. <i>Isothermes et stabilité des lipides NTA et NTA-Ni dans l'eau pure.....</i>	84
1-1. Isothermes des lipides NTA et NTA-Ni à l'interface eau-air	85
1-2. Stabilité des monocouches NTA et NTA-Ni à l'interface eau-air	87
1-3. Dépôt de Langmuir-Blodgett et stabilité des bicouches dans l'eau pure	89
1-3-1. Rapports de prélèvement.....	90
1-3-2. Stabilité des bicouches.....	91
2. <i>Mesures de forces dans l'eau pure.....</i>	92
2-1. Profils de force NTA/NTA et NTA-Ni/NTA-Ni	93
2-2. Profils de force DMPE/DMPE, MeT/T et MeT/A.....	97
2-3. Comportement "sticky fluid" des monocouches de lipide NTA.....	98
2-4. Energies d'adhésion macroscopiques.....	100
2-5. Estimation de l'énergie d'une liaison hydrogène.....	102
3. <i>Conclusion.....</i>	111
Chapitre IV : Mesure d'une Liaison par Chélation.....	112
1. <i>Isothermes et stabilité des lipides NTA et NTA-Ni dans le Tris.....</i>	114
1-1. Isothermes des lipides NTA et NTA-Ni à l'interface Tris-air	115
1-2. Stabilité des monocouches NTA et NTA-Ni à l'interface Tris-air	116
1-3. Rapports de prélèvement et stabilité des bicouches dans le Tris	116
2. <i>Mesures de forces dans le Tris.....</i>	118
2-1. Profils de force NTA/NTA, NTA/NTA-Ni et NTA-Ni/NTA-Ni.....	119
2-2. Répulsion électrostatique double-couche et répulsion stérique	124
2-2-1. Répulsion électrostatique double-couche	124
2-2-2. Répulsion stérique.....	125
2-3. Traitement statistique des courbes expérimentales	127
2-3-1. Comportement moyen pour chaque configuration expérimentale.....	128
2-3-2. Longueur de Debye.....	128

2-3-3. Densités de charge des surfaces.....	130
2-3-4. Forces de séparation effectives	131
2-4. Estimation de l'énergie d'une liaison par chélation.....	135
3. <i>Mesures par la technique des vésicules micromanipulées</i>	138
3-1. Préparation des vésicules	139
3-2. Energies d'adhésion macroscopiques.....	140
3-3. Estimation de l'énergie d'une liaison par chélation.....	144
4. <i>Conclusion</i>	146
Chapitre V : Mesures de Forces Impliquant des Rétinoïdes	148
1. <i>Tests d'affinité entre la molécule d'hexahistidine et le lipide NTA-Ni</i>	150
1-1. Mesures de pressions de surface	150
1-1-1. Mesures à aire moléculaire fixée	150
1-1-2. Mesures d'isothermes	152
1-2. Mesures de fluorescence	154
1-2-1. Mesures par microscopie de fluorescence classique.....	154
1-2-2. Mesures par microscopie à deux photons	155
1-2-3. Spécificité de la liaison de la GFP-6His au lipide NTA-Ni.....	156
2. <i>Mesures de forces entre deux couches de récepteurs des rétinoïdes</i>	158
2-1. Fixation des récepteurs sur des monocouches de lipide NTA-Ni	159
2-2. Fixation des récepteurs sur des monocouches de lipide rétinoïde	161
2-2-1. Isotherme et stabilité du lipide rétinoïde dans le Tris	162
2-2-2. Profils de force récepteurs/récepteurs.....	163
3. <i>Mesures de forces entre une monocouche de lipide rétinoïde et une couche de récepteurs RXR</i>	165
4. <i>Mesures de forces dans l'eau pure entre deux monocouches de lipide rétinoïde : un exemple d'interaction entre deux surfaces hydrophobes</i>	168
5. <i>Conclusion</i>	172
Conclusion	174
Références	177

Introduction

Les milieux vivants sont le siège de liaisons fortes et de liaisons faibles. Les liaisons fortes, c'est-à-dire les liaisons covalentes, sont utilisées pour créer des structures très stables, capables de résister aux variations de température, de pression et de pH du milieu environnant. Ces liaisons assurent par exemple la stabilité de la structure primaire des protéines (enchaînement d'acides aminés) ainsi que celle du squelette de la molécule d'ADN (enchaînement de sucres et de phosphates). Les liaisons faibles (interactions de van der Waals, liaisons hydrogène, liaisons par chélation, *etc.*) sont utilisées quant à elles pour assurer la cohésion de structures transitoires (complexes moléculaires ou macromoléculaires) qui nécessitent d'être formées et détruites rapidement. Ces structures transitoires permettent notamment le déclenchement de signaux, sans cesse présents au sein des cellules, et qui modifient leur métabolisme (Alberts, 1998). La durée de vie d'une liaison faible étant de plusieurs ordres de grandeur inférieure à celle du temps caractéristique de la plupart des phénomènes biologiques, plusieurs liaisons faibles s'associent généralement en parallèle afin de créer leurs effets (Evans¹, 1997). Les liaisons faibles maintiennent les structures secondaires (hélices α et feuillets β) et tertiaires des protéines ainsi que la structure en double hélice de la molécule d'ADN. Elles interviennent lors des processus de reconnaissance et de communication entre les cellules, à travers la formation de divers complexes moléculaires protéine-ligand, protéine-protéine ou encore protéine-ADN. Elles gouvernent la formation de complexes moléculaires assurant le transport de composés à travers des milieux qui leur sont normalement imperméables. C'est ainsi que les ions métalliques, en se liant par chélation à deux acides aminés particuliers, peuvent traverser la membrane intestinale et être absorbés par l'organisme.

Les techniques de diffraction par rayons X, de RMN et d'électrocristallographie permettent de donner de bonnes informations structurales sur ces divers complexes moléculaires. A l'heure actuelle, la structure de plus d'une centaine de complexes entre protéines et un nombre équivalent de complexes protéines-ADN a pu être déterminée à des résolutions à l'échelle atomique (Nadassy, 1999 – Lo Conte, 1999). Ces techniques donnent une image statique des complexes formés mais elles ne donnent pas

d'information directe sur l'affinité entre les molécules les constituant. Les énergies impliquées sont relativement peu connues, notamment en raison du nombre important d'interactions agissant en parallèle. Le présent travail a pour objectif de mesurer l'énergie de deux liaisons faibles particulières : les liaisons hydrogène et les liaisons par chélation, ainsi que l'énergie associée aux interactions de type protéine-protéine et protéine-ligand intervenant lors du métabolisme des rétinoides. Différentes nanotechniques récemment maîtrisées permettent de mesurer désormais avec précision des énergies ou des forces au niveau moléculaire : microscope à force atomique (AFM), pinces optiques, capteur de forces à bille (BFP), techniques des vésicules micromanipulées, appareil de mesure de forces entre surfaces (SFA), *etc.* Par ailleurs, les compétences actuelles en synthèse bio-organique et en biologie moléculaire permettent la création de molécules synthétiques ou de molécules biologiques modifiées comprenant les groupes fonctionnels que l'on souhaite étudier, isolés de leur environnement naturel. On s'affranchit ainsi des diverses interactions qui existent *in vivo* avec d'autres groupes fonctionnels et qui compliquent l'interprétation des phénomènes observés. Les techniques SFA et AFM ont ainsi permis de réaliser la première mesure de forces de type protéine-ligand entre la streptavidine et la biotine (Helm, 1991 – Florin, 1994). La technique SFA a également permis de mesurer des énergies d'interaction de type protéine-protéine (Sivasankar, 1999 – Leckband, 2000b) ou encore de mesurer les énergies de liaison entre les bases de la molécule d'ADN (Pincet, 1994).

Dans notre étude nous avons isolé des groupes fonctionnels capables de former des liaisons hydrogène et des liaisons par chélation et nous les avons incorporés dans des bicouches lipidiques. Ceci nous a permis de réaliser une mesure directe des liaisons qu'ils pouvaient former en utilisant la technique SFA ou la technique des vésicules micromanipulées. Notre choix s'est porté sur un lipide dont la tête hydrophile était constituée d'un groupement nitrilotriacétate (lipide NTA). Le groupement NTA possède trois fonctions carboxyle qui sont capables de former des liaisons hydrogène dans l'eau pure. Dans certaines conditions physico-chimiques, le groupement NTA peut fixer un ion nickel et former ainsi une liaison par chélation. Cette forme complexée au nickel (groupement NTA-Ni) présente une forte affinité pour les molécules d'histidine ; elle permet ainsi la fixation de protéines génétiquement modifiées possédant une séquence

additionnelle de plusieurs molécules d'histidine (protéines "his-taguées"). Un lipide possédant une tête hydrophile constituée du groupement NTA-Ni (lipide NTA-Ni) a donc été utilisé afin de coupler des récepteurs "his-tagués" des rétinoïdes aux surfaces d'étude des techniques expérimentales ; ceci nous a permis de réaliser une mesure d'énergie d'interaction de type récepteur-récepteur. L'utilisation d'un lipide dont la tête polaire était constituée d'un rétinoïde synthétique (lipide rétinoïde) a permis, par ailleurs, de mesurer une énergie d'interaction de type récepteur-ligand.

Le premier chapitre du manuscrit présente les propriétés structurales des molécules amphiphiles ainsi que les différentes forces pouvant exister entre deux bicouches de molécules amphiphiles plongées en solution aqueuse. Il revient sur certains résultats qui ont pu être obtenus à l'aide de la technique SFA ou de la technique des vésicules micromanipulées. Une partie est consacrée à la structure et au mode d'action biologique des rétinoïdes.

Le deuxième chapitre présente les techniques expérimentales utilisées (la balance de Langmuir, la technique SFA et la technique des vésicules micromanipulées) ainsi que les outils moléculaires ayant permis de coupler les molécules étudiées aux surfaces d'étude de ces techniques expérimentales.

Le troisième chapitre est consacré aux mesures de forces qui ont été réalisées dans l'eau pure sur les lipides NTA et NTA-Ni. Les mesures effectuées sur le lipide NTA ont mis en évidence une forte énergie d'adhésion attribuée aux liaisons hydrogène. Les résultats obtenus sont comparés aux expériences qui avaient été réalisées sur des lipides dont la tête hydrophile contenait des bases modifiées de l'ADN (Pincet, 1994). Un modèle statistique est utilisé afin d'obtenir une estimation de l'énergie d'une liaison hydrogène.

Le quatrième chapitre présente les mesures d'énergies d'adhésion qui ont été réalisées à pH 8 sur des bicouches constituées des lipides NTA ou NTA-Ni. Deux techniques expérimentales ont été utilisées : la technique SFA et la technique des vésicules micromanipulées. Pour chaque technique, un modèle statistique est développé afin d'estimer l'énergie de liaison entre deux groupements NTA se partageant un ion nickel (liaison par chélation).

Le cinquième chapitre est consacré à diverses mesures de forces ayant impliqué les rétinoïdes et leurs récepteurs. L'affinité de l'étiquette histidine pour le lipide NTA-Ni est tout d'abord testée à partir de mesures sur la balance de Langmuir et de mesures en

microscopie de fluorescence. Une tentative de mesure de l'énergie associée à la dimérisation des récepteurs des rétinoïdes ainsi qu'à la reconnaissance des rétinoïdes par leur récepteur est donnée. Une dernière partie présente des mesures de forces qui ont été réalisées dans l'eau pure sur le lipide rétinoïde. Ces mesures ont mis en évidence une forte énergie d'adhésion due à l'effet combiné des forces hydrophobes et des liaisons hydrogène.

Chapitre I : Généralités

1. Bicouches de molécules amphiphiles

1-1. Présentation des molécules amphiphiles

1-1-1. Structure

Une molécule amphiphile comporte deux parties bien distinctes : une tête polaire hydrophile, qui présente une forte affinité pour les molécules d'eau et une queue apolaire hydrophobe, que les molécules d'eau ont plutôt tendance à fuir (figure I-1). La tête hydrophile est généralement constituée d'un ion ou d'un groupement possédant un moment dipolaire et la queue hydrophobe d'une ou de plusieurs chaînes aliphatiques. Comme exemple de molécules amphiphiles, nous pouvons citer les acides carboxyliques, qui ont pour formule générale $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ ou les phospholipides, qui sont les principaux constituants des membranes cellulaires. Lorsqu'elles se trouvent à l'interface eau-air, les molécules amphiphiles ont tendance à diriger leur tête hydrophile vers l'eau et leur queue hydrophobe vers l'air, ce qui a pour conséquence de modifier l'énergie de l'interface. Pour cette raison, les molécules amphiphiles sont également appelées tensioactifs ou surfactants.

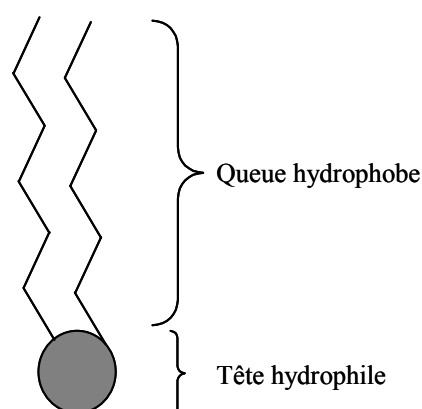


Figure I-1 : Schéma simplifié d'une molécule amphiphile à deux chaînes aliphatiques.

1-1-2. Tension de surface

Les molécules qui se trouvent au cœur d'un liquide forment des liaisons avec leurs voisines dans toutes les directions ; la force résultante est donc nulle. Les molécules qui se trouvent à la surface d'un liquide forment seulement quant à elles des liaisons avec leurs voisines latérales et inférieures ; la force résultante est donc dirigée vers l'intérieur du liquide. Les molécules se trouvant en surface sont donc attirées par le cœur du liquide ; c'est pour cette raison qu'un liquide a toujours tendance à minimiser l'aire de son interface. Cet effet est directement observable à travers, par exemple, la forme sphérique qu'adoptent spontanément les gouttes d'eau. La grandeur qui caractérise la résistance à toute augmentation de l'aire de l'interface s'appelle la tension de surface du liquide ; elle est notée γ . En thermodynamique, la tension de surface est définie comme l'énergie libre nécessaire pour augmenter l'aire de l'interface d'une unité. Elle entre dans le bilan de l'énergie libre du système à travers le terme :

$$\delta F = -\gamma \delta A \quad (I-1)$$

Où : A est l'aire de l'interface.

La présence de molécules amphiphiles à l'interface eau-air modifie la tension de surface du système. En effet, contrairement aux molécules d'eau qui n'ont de forte affinité qu'avec leurs homologues, les molécules amphiphiles ont une forte affinité pour l'eau (par l'intermédiaire de leur tête hydrophile) et pour l'air (par l'intermédiaire de leur queue hydrophobe). Cette affinité des molécules amphiphiles pour les deux phases du système rend énergétiquement moins défavorable toute augmentation de l'aire de l'interface. Ainsi la présence de molécules amphiphiles à l'interface eau-air abaisse la tension de surface du système.

1-1-3. Agrégation des molécules amphiphiles

Les molécules amphiphiles à l'interface eau-air sont également en équilibre avec des molécules amphiphiles en solution. Au delà d'une certaine concentration, appelée concentration micellaire critique, ces molécules en solution, initialement isolées, peuvent se regrouper en mettant en contact leurs parties hydrophobes. La formation de tels agrégats isole les chaînes hydrophobes des molécules d'eau et minimise ainsi

l'énergie du système. Selon la géométrie des molécules amphiphiles (structure de la chaîne hydrophobe, taille de la tête hydrophile relativement à celle de la chaîne hydrophobe) et les propriétés physico-chimiques de la solution (concentration en sels, pH, température, *etc.*) ces agrégats vont pouvoir adopter différentes structures (figure I-2 – Israelachvili, 1992).

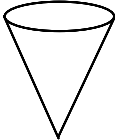
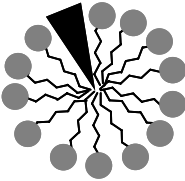
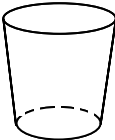
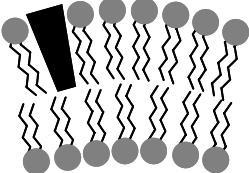
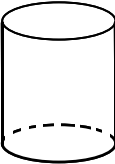
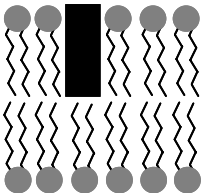
<u>Géométrie de la molécule</u>	<u>Structure formée</u>	<u>Nature de la molécule</u>
<p data-bbox="389 633 448 658">Cône</p> 	<p data-bbox="708 633 900 658">Micelle sphérique</p> 	<p data-bbox="1027 705 1331 797">Amphiphiles possédant une grosse tête hydrophile et une seule chaîne aliphatique</p>
<p data-bbox="344 891 491 916">Cône tronqué</p> 	<p data-bbox="708 880 900 936">Bicouche flexible Vésicule</p> 	<p data-bbox="1027 976 1331 1099">Amphiphiles possédant une grosse tête hydrophile et deux chaînes aliphatiques Lipides en phase fluide</p>
<p data-bbox="368 1151 467 1176">Cylindre</p> 	<p data-bbox="719 1151 888 1176">Bicouche plane</p> 	<p data-bbox="1027 1216 1331 1339">Amphiphiles possédant une petite tête hydrophile et deux chaînes aliphatiques Lipides en phase solide</p>

Figure I-2 : Quelques unes des structures que peuvent former les molécules amphiphiles en fonction de leur géométrie.

1-2. Monocouche d'amphiphiles – Isothermes de compression

Les molécules amphiphiles très insolubles préfèrent s'adsorber à la surface de l'eau plutôt que de rester en solution. Elles s'organisent alors à l'interface eau-air en une couche monomoléculaire (ou monocouche). Ces couches d'amphiphiles qui se forment spontanément à la surface de l'eau sont appelées films de Gibbs. Il est également possible de former une couche monomoléculaire d'amphiphiles par un dépôt direct des

molécules à la surface de l'eau. La méthode consiste à dissoudre les molécules amphiphiles dans un solvant organique très volatile qui s'étale bien à la surface de l'eau puis de déposer quelques gouttes de la solution à l'interface eau-air. Le solvant s'étale alors uniformément sur la surface puis s'évapore très rapidement en laissant une couche monomoléculaire d'amphiphiles.

Considérons à présent deux interfaces séparées l'une de l'autre par un flotteur : la première (à gauche) est une interface eau-air et la deuxième (à droite) est une interface eau-air sur laquelle a été déposée une monocouche d'amphiphiles (figure I-3). La surface à gauche du flotteur, qui n'est constituée que de molécules d'eau, est plus désireuse de minimiser son aire que la surface à droite du flotteur, qui comporte des molécules amphiphiles. Cette différence de tension de surface a tendance à attirer le flotteur du côté où il n'y a pas de molécules amphiphiles, en exerçant la force :

$$\delta F = (\gamma_e - \gamma_m)l \quad (I-2)$$

Où : γ_e est la tension de surface de l'eau, γ_m la tension de surface de la monocouche et l la longueur du flotteur.

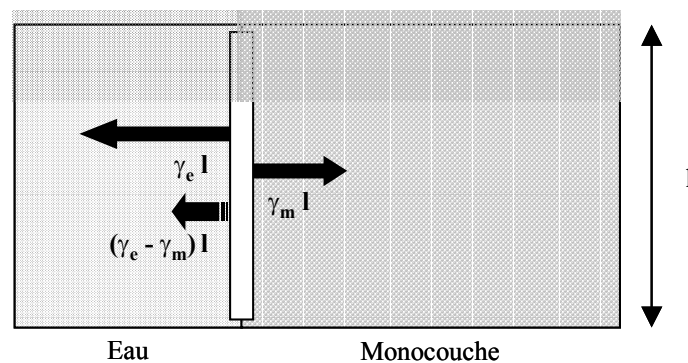


Figure I-3 : Bilan des forces exercées sur un flotteur séparant une surface d'eau pure d'une surface d'eau recouverte d'une monocouche.

Le terme $\pi = \gamma_e - \gamma_m$ est appelé pression de surface de la monocouche. Il est l'analogue, à deux dimensions, de la pression que l'on rencontre, à trois dimensions, dans les gaz. On peut en effet se représenter la monocouche comme une assemblée de molécules amphiphiles qui sont libres de se déplacer dans le plan de l'interface eau-air et qui viennent se heurter sur les parois de la cuve. Ainsi, si l'on diminue l'aire accessible à la monocouche, les molécules amphiphiles se retrouvent serrées les unes contre les autres ;

elles sont alors beaucoup moins libres de diffuser et interagissent plus fortement entre elles : la pression de surface augmente. D'une façon analogue au cas à trois dimensions, on peut tracer des isothermes représentant la pression de surface π en fonction de l'aire σ accessible à chaque molécule amphiphile (σ est aussi appelée l'aire moléculaire). Ces mesures sont réalisées sur une balance de Langmuir (chapitre II-1). Lors de la compression de la monocouche on peut observer, selon la nature des molécules amphiphiles, le passage par différentes phases dont les transitions sont marquées par des plateaux – dans le cas des transitions de phase du premier ordre – ou des changements de pente – dans le cas des transitions de phase du second ordre (figure I-4). A partir d'une certaine pression, appelée pression de collapse, la monocouche atteint son état de compactage maximum et devient très instable. Si l'on poursuit la compression, les molécules amphiphiles quittent la surface de l'eau pour partir en solution ou forment des multicouches à l'interface eau-air (figure I-5).

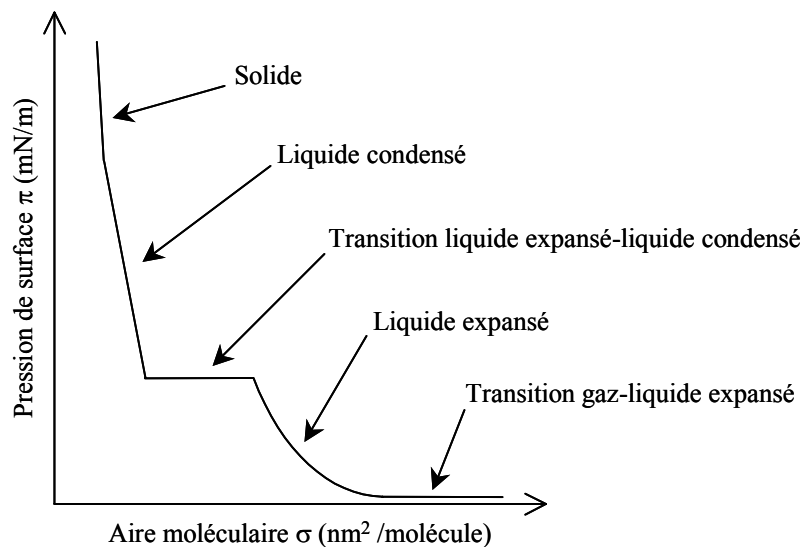


Figure I-4 : Isotherme standard d'une monocouche d'amphiphiles.

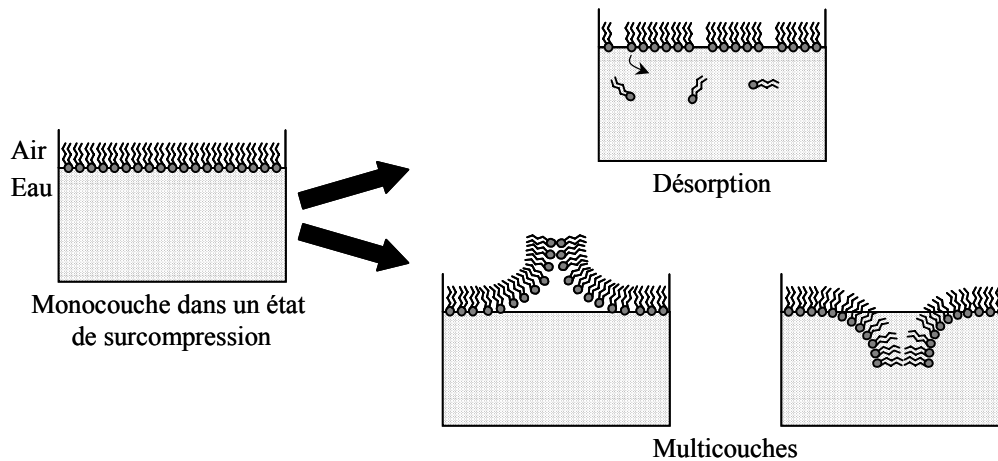


Figure I-5 : Comportement d'une monocouche d'amphiphiles au delà de la pression de collapse.

1-3. Bicouche fixe d'amphiphiles – Prélèvements de Langmuir-Blodgett

Une monocouche se trouvant à l'interface eau-air peut être transférée sur une surface solide (Gaines, 1966). Pour y parvenir, il faut utiliser un substrat hydrophile ayant une forte affinité pour les têtes polaires de la molécule amphiphile. Le substrat est plongé initialement en solution puis il est tiré hors de l'eau. Lorsqu'il traverse l'interface eau-air, il accroche les têtes polaires des molécules amphiphiles et devient alors hydrophobe (figure I-6). Afin d'obtenir un dépôt homogène sur le substrat, on doit prélever à aire moléculaire constante donc à pression constante. La perte de molécules en surface est donc compensée en permanence par une compression de la monocouche. Il est ensuite possible de déposer une nouvelle monocouche d'amphiphiles (qui peut être différente de la première). Il suffit pour cela que le substrat traverse l'interface eau-air dans l'autre sens ; les molécules amphiphiles se fixeront cette fois par l'intermédiaire de leur queue hydrophobe. On peut, de cette manière, déposer plusieurs monocouches sur un substrat ; les molécules amphiphiles se greffant alternativement par l'intermédiaire de leur tête hydrophile et de leur queue hydrophobe.

La qualité du dépôt est déterminée par le rapport de prélèvement qui est défini comme le rapport entre l'aire moléculaire à la surface de l'eau et l'aire moléculaire à la surface du substrat. En pratique, pour l'obtenir, on calcule le rapport entre l'aire dont a varié la

monocouche durant le dépôt et l'aire de la surface du substrat. Un bon dépôt aura un rapport proche de 1.

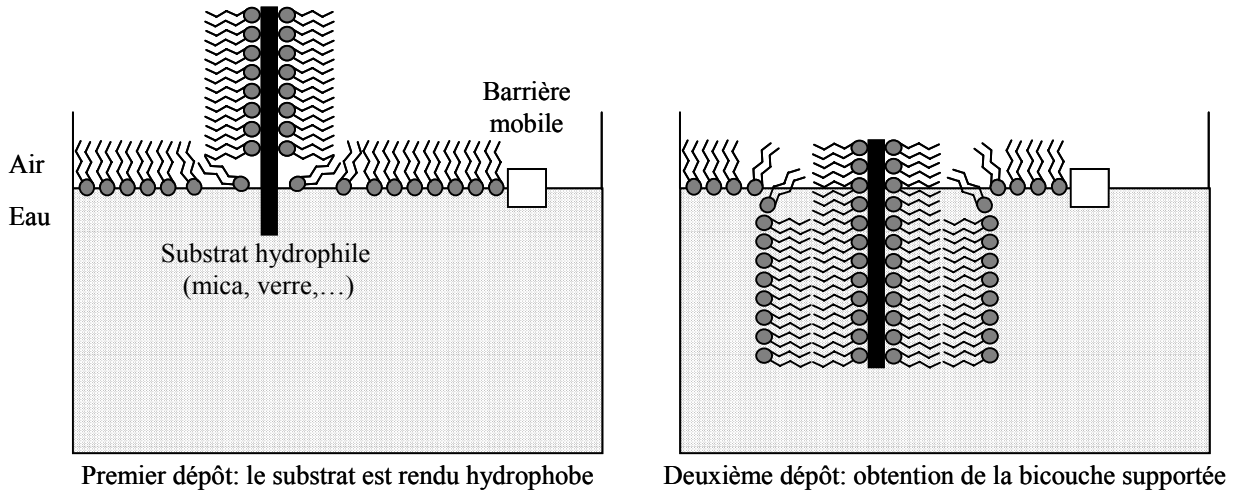


Figure I-6 : Prélèvements de Langmuir-Blodgett.

1-4. Bicouche libre d'amphiphiles – Vésicules

1-4-1. Formation et propriétés mécaniques des vésicules

Les molécules amphiphiles dont la tête hydrophile a une taille du même ordre de grandeur que la queue hydrophobe préfèrent s'agréger en formant des bicouches plutôt que des micelles (voir figure I-2) ; c'est le cas de la plupart des molécules amphiphiles possédant deux chaînes hydrophobes. De plus, dans certaines conditions, il peut être énergétiquement plus favorable pour les molécules amphiphiles de s'agréger en formant des bicouches sphériques fermées (ou vésicules) plutôt que des bicouches planes (figure I-7).

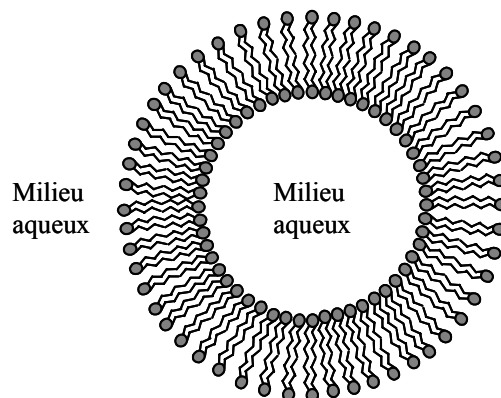


Figure I-7 : Structure d'une vésicule.

Cette structure en bicouche sphérique fermée est tout à fait similaire à celle de l'armature lipidique des cellules vivantes. Les vésicules constituées de phospholipides synthétiques sont, pour cette raison, souvent étudiées comme des membranes modèles. Les vésicules sont également beaucoup étudiées et utilisées en raison des propriétés mécaniques particulières de leur membrane (chapitre II-3). La membrane d'une vésicule est très fine (environ 5 nm) et offre peu de résistance au phénomène de courbure ; elle est libre d'onduler et de se déformer sous l'effet de l'agitation thermique. Quand la membrane s'incurve, la courbure est limitée par les deux phénomènes antagonistes de confinement et d'extension subits respectivement par les monocouches interne et externe. La membrane d'une vésicule offre par contre une grande résistance au phénomène d'étirement, liée à la cohésion entre les molécules amphiphiles qui la constituent. La conséquence directe est qu'une vésicule évoluant librement en solution aqueuse possède une aire constante.

Les vésicules peuvent également exister à l'état multilamellaire (la lamellarité correspond au nombre de bicouches constituant le système). On distingue plusieurs types de vésicules que l'on classe en fonction de leur taille et de leur lamellarité. Les "Multi Lamellar Vesicles" (MLV) sont constituées de plusieurs bicouches et peuvent atteindre quelques micromètres ; on les appellent aussi "oignons". Les "Giant Unilamellar Vesicles" (GUV), "Large Unilamellar Vesicles" (LUV) et "Small Unilamellar Vesicles" (SUV) sont, quant à elles, constituées d'une seule bicouche et ont respectivement des tailles de l'ordre de 10 μm , 1 μm et 0,1 μm .

Plusieurs techniques permettent de fabriquer des vésicules. Le principe en est toujours le gonflement, par hydratation, d'un film d'amphiphiles qui a été préalablement séché. Ce gonflement peut se faire d'une façon spontanée (Reeves, 1969 – Needham, 1988) ou par application d'un champ électrique oscillant (Angelova, 1992). La deuxième méthode permet d'obtenir des GUV avec un très bon rendement (90% de vésicules unilamellaires). Dans le cadre de nos expériences nous avons utilisé la première méthode qui est plus simple à mettre en oeuvre et qui donne également de très bons résultats.

1-4-2. Pression osmotique – Morphologie des vésicules en solution aqueuse

Les bicouches de molécules amphiphiles se comportent comme des membranes perméables vis-à-vis des molécules d'eau. Les vésicules sont donc très sensibles à la pression osmotique du milieu dans lequel elles se trouvent.

Rappelons tout d'abord quelques notions liées à la pression osmotique. Lorsque deux solutions présentent des concentrations différentes de solutés, la solution la plus concentrée est dite hypertonique et la solution la moins concentrée est dite hypotonique. Si les deux solutions présentent la même concentration de solutés, elles sont dites isotoniques. Considérons une membrane qui sépare deux milieux ayant des concentrations de solutés différentes et qui est perméable aux molécules d'eau mais pas aux molécules de solutés (on parle alors de membrane semi-perméable). L'eau diffusera de la solution hypotonique vers la solution hypertonique. Ce phénomène qui tend à égaliser la concentration des deux milieux est appelé osmose. La pression osmotique, ou osmolarité, d'une solution peut être définie comme sa capacité à gagner des molécules d'eau lorsqu'elle est séparée d'un réservoir d'eau pure par une membrane semi-perméable. Dans le cas de solutions très diluées, elle est proportionnelle à la concentration du soluté et est donnée par la loi de Van't Hoff :

$$p = k_B T \rho_{\text{soluté}} \quad (\text{I-3})$$

Où : $\rho_{\text{soluté}}$ est la concentration moléculaire du soluté.

Ainsi, si une membrane semi-perméable sépare deux solutions ayant des pressions osmotiques différentes, les molécules d'eau diffuseront de la solution ayant la pression osmotique la plus faible vers la solution ayant la pression osmotique la plus forte.

Les deux milieux qui se trouvent à l'intérieur et à l'extérieur des vésicules peuvent avoir des pressions osmotiques différentes. La membrane des vésicules se comportant comme une membrane semi-perméable, la forme des vésicules en solution aqueuse dépend fortement des valeurs relatives de ces pressions osmotiques. Si les vésicules sont plongées dans un milieu dont la pression osmotique est supérieure à celle qui règne en leur sein, l'eau diffuse de l'intérieur vers l'extérieur des vésicules. L'équilibre est atteint lorsque les deux pressions osmotiques deviennent égales. Dans ce cas de figure, la membrane des vésicules a une tension nulle ; les vésicules sont flasques (figure I-8a). Si les vésicules sont plongées dans un milieu dont la pression osmotique est inférieure à celle qui règne en leur sein, l'eau diffuse de l'extérieur vers l'intérieur des vésicules. Les vésicules gonflent et l'équilibre est atteint lorsque la tension de la membrane compense la différence de pression osmotique entre les deux milieux. Dans ce cas de figure, la membrane des vésicules est mise sous tension ; les vésicules sont sphériques (figure I-8b). La différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la vésicule est reliée à la tension de sa membrane par l'équation de Laplace.

$$p_i - p_e = \frac{2\tau}{R} \quad (\text{I-4})$$

Où : τ est la tension de membrane de la vésicule et R est son rayon moyen.

Si les vésicules sont plongées dans des solutions très diluées, dont la pression osmotique est très faible, il peut arriver que les membranes se tendent jusqu'à dépasser les limites de leur élasticité et qu'elles se rompent. Dans ce cas, les vésicules explosent ; elles sont détruites par choc osmotique.

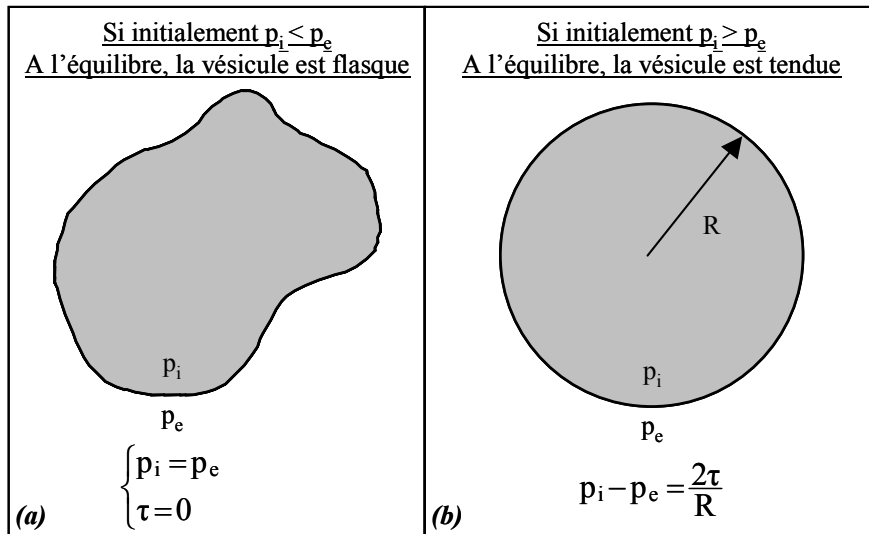


Figure I-8 : Morphologies d'une vésicule en solution aqueuse.

2. Les forces intervenant entre deux bicouches de molécules amphiphiles

Nous allons présenter les différentes forces qui peuvent intervenir entre deux bicouches de molécules amphiphiles immergées en solution aqueuse.

2-1. Les forces électrostatiques double-couche

La surface d'une bicouche peut être chargée suite à l'ionisation de la tête hydrophile des molécules amphiphiles qui la composent ou suite à l'adsorption d'ions provenant de la solution. Si l'on rapproche l'une de l'autre deux bicouches chargées, il apparaît entre elles une répulsion de nature électrostatique dont la portée dépend de la concentration des ions en solution. Nous allons établir l'expression de cette répulsion dans le cas modèle de deux surfaces solides chargées interagissant dans une solution d'électrolyte ; les résultats que l'on obtient avec ce système modèle s'appliquent relativement bien au cas de deux bicouches d'amphiphiles.

Considérons deux surfaces solides planes de même charge séparées d'une distance D et plongées dans une solution d'électrolyte (figure I-9). Les ions de la solution portant une

charge opposée à celle des surfaces (les contre-ions) ont tendance à se rapprocher des surfaces alors que les ions de même charge ont tendance à s'en éloigner. La couche de contre-ions qui se développe alors au voisinage des surfaces écran leur charge et à partir d'une certaine distance (de l'ordre de quelques longueurs de Debye) les surfaces sont vues comme des surfaces neutres. On rappelle que la longueur de Debye λ_D s'écrit :

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r k_B T}{\sum_i z_i^2 e^2 \rho_i(\infty)}} \quad (\text{I-5})$$

Où : ε_0 et ε_r sont respectivement la permittivité du vide et la permittivité relative de la solution d'électrolyte et où z_i et $\rho_i(\infty)$ sont respectivement la valence des ions i et leur concentration loin des surfaces (en volume).

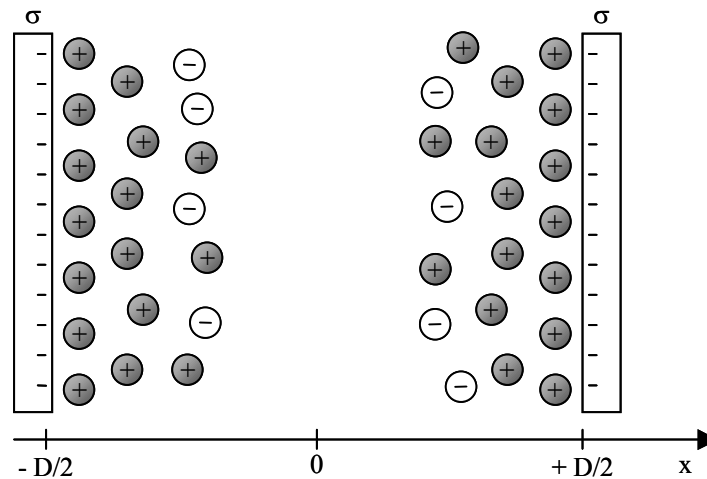


Figure I-9 : Deux surfaces chargées négativement plongées dans une solution d'électrolyte.

Si l'on rapproche les deux surfaces l'une de l'autre, une force répulsive apparaît dès que les deux couches de contre-ions commencent à se recouvrir. Il s'agit d'une répulsion de nature entropique que l'on peut estimer à partir de calculs faisant intervenir la pression exercée sur les deux surfaces (Israelachvili, 1992). A température constante, la pression est liée aux potentiels chimiques μ_i des ions en solution par la relation de Gibbs-Duhem :

$$dP = \sum_i \rho_i d\mu_i \quad (\text{I-6})$$

Avec :

$$\mu_i = \mu_i^0 + z_i e \psi + k_B T \log(\rho_i) \quad (\text{I-7})$$

Où : ψ est le potentiel électrostatique et où toutes les variables dépendent *a priori* de la distance D entre les deux surfaces et de l'abscisse x (figure I-9).

La pression ressentie à l'abscisse x lorsque les deux surfaces sont amenées de l'infini jusqu'à une distance D l'une de l'autre vaut :

$$P_x(D) = \int_{\infty}^D \sum_i (\rho_i z_i e d\psi + k_B T d\rho_i) \quad (I-8)$$

En utilisant la relation de Poisson à une dimension :

$$\frac{d^2\psi}{dx^2} + \frac{1}{\epsilon_0 \epsilon_r} \sum_i z_i e \rho_i = 0 \quad (I-9)$$

On obtient :

$$P_x(D) = -\frac{1}{2} \epsilon_0 \epsilon_r \left[\left(\frac{d\psi}{dx} \right)_x^2(D) - \left(\frac{d\psi}{dx} \right)_x^2(\infty) \right] + k_B T \sum_i [\rho_{ix}(D) - \rho_{ix}(\infty)] \quad (I-10)$$

Où : l'indice x signifie que les valeurs sont calculées à la distance x du centre. Le premier terme de l'équation (I-10) correspond à la contribution électrostatique ; c'est une contribution attractive. Le second terme correspond à la contribution entropique ; c'est une contribution répulsive.

Afin de simplifier l'équation (I-10) nous allons établir une relation entre $\rho_{ix}(D)$ et $\rho_{io}(D)$. Les ions sont distribués en solution selon une statistique de type Boltzmann décrite par l'équation :

$$\rho_i = \rho_i(\infty) \exp\left(\frac{-z_i e \psi}{k_B T}\right) \quad (I-11)$$

Si l'on dérive l'équation (I-11) par rapport à x , on obtient :

$$\frac{d\rho_i}{dx} = -\frac{z_i e}{k_B T} \frac{d\psi}{dx} \rho_i \quad (I-12)$$

En utilisant la relation de Poisson (I-9), on en déduit :

$$\sum_i \frac{d\rho_i}{dx} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{k_B T} \frac{d\psi}{dx} \frac{d^2\psi}{dx^2} = \frac{1}{2} \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{k_B T} \frac{d}{dx} \left(\frac{d\psi}{dx} \right)^2 \quad (I-13)$$

Sachant que :

$$\left(\frac{d\psi}{dx} \right)_{x=0} = E_{x=0} = 0 \quad (I-14)$$

On a alors :

$$\sum_i [\rho_{ix}(D) - \rho_{io}(D)] = \int_0^x \sum_i \frac{d\rho_{ix}(D)}{dx} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{2k_B T} \left(\frac{d\psi}{dx} \right)_x^2 (D) \quad (I-15)$$

C'est-à-dire :

$$\sum_i \rho_{ix}(D) = \sum_i \rho_{io}(D) + \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{2k_B T} \left(\frac{d\psi}{dx} \right)_x^2 (D) \quad (I-16)$$

La relation (I-16) est valable quelque soit la distance D entre les surfaces (donc en particulier lorsque les surfaces sont à une distance infinie l'une de l'autre).

L'équation (I-10) devient alors :

$$P_x(D) = k_B T \sum_i [\rho_{io}(D) - \rho_{io}(\infty)] \quad (I-17)$$

La pression $P_x(D)$ est donc uniforme entre les surfaces ; on la notera désormais $P(D)$. Elle correspond à la pression ressentie dans la solution d'électrolyte mais aussi à celle ressentie au niveau des deux surfaces. L'équation (I-17) montre que la pression $P(D)$ correspond à l'excès de pression osmotique des ions lorsqu'ils se trouvent au milieu et entre les deux surfaces par rapport à sa valeur lorsqu'ils se trouvent au milieu mais en volume. Les concentrations des ions en volume sont connues ; les paramètres à déterminer sont donc les concentrations des ions au milieu, entre les deux surfaces.

Si on injecte l'équation (I-11) dans l'équation (I-9), on obtient l'équation de Poisson-Boltzmann :

$$\frac{d^2\psi}{dx^2} + \frac{1}{\epsilon_0 \epsilon_r} \sum_i z_i e \rho_i(\infty) \exp\left(\frac{-z_i e \psi}{k_B T}\right) = 0 \quad (I-18)$$

La résolution de l'équation (I-18) permet de calculer la concentration des ions i au milieu, entre les deux surfaces, mais certaines approximations doivent être faites afin d'obtenir des résultats analytiques simples (Verwey, 1948 – Hiemenz, 1977). Dans le cas particulier d'un électrolyte 1 : 1, l'équation (I-17) devient :

$$P(D) = k_B T \rho(\infty) \left\{ \left[\exp\left(\frac{-e\psi_0}{k_B T}\right) - 1 \right] + \left[\exp\left(\frac{e\psi_0}{k_B T}\right) - 1 \right] \right\} \quad (I-19)$$

Où : ψ_0 est le potentiel électrostatique au milieu, entre les deux surfaces. Supposons que ce potentiel soit petit et qu'il corresponde à la superposition des potentiels de chaque surface prise séparément. Le potentiel électrostatique à la distance d d'une surface isolée, plongée dans un électrolyte 1 : 1 est donné – dans le cas où la distance d est grande devant la longueur de Debye λ_D – par (Gouy, 1910 – Chapman, 1913) :

$$\psi(d) \cong \frac{4k_B T \gamma}{e} \exp\left(-\frac{d}{\lambda_D}\right) \quad (\text{I-20})$$

Avec :

$$\gamma = \tanh\left(\frac{e\psi_s}{4k_B T}\right) \quad (\text{I-21})$$

Où : ψ_s est le potentiel électrostatique sur les surfaces.

On en déduit :

$$P(D) \cong \frac{\rho(\infty)e^2 \psi_s^2}{k_B T} \cong 64k_B T \gamma^2 \rho(\infty) \exp\left(\frac{-D}{\lambda_D}\right) \quad (\text{I-22})$$

L'énergie libre par unité de surface E associée à cette pression s'obtient alors par intégration sur D :

$$E(D) = \int_{\infty}^D P(D) dD = 64k_B T \gamma^2 \lambda_D \rho(\infty) \exp\left(\frac{-D}{\lambda_D}\right) \quad (\text{I-23})$$

Pour les faibles potentiels de surface ($\frac{\psi_s}{k_B T} \ll 1$, soit $\psi_s \ll 25,7$ mV à 298 K),

l'équation (I-23) devient :

$$E(D) \cong \frac{2\varepsilon_0 \varepsilon_r}{\lambda_D} \psi_s^2 \exp\left(\frac{-D}{\lambda_D}\right) \quad (\text{I-24})$$

Le potentiel de surface ψ_s peut être relié à densité surfacique de charge σ à l'aide de l'équation de Grahame (Grahame, 1953) qui, dans les mêmes conditions d'approximation, s'écrit :

$$\sigma = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \psi_s}{\lambda_D} \quad (\text{I-25})$$

D'où :

$$E_{DC}(D) = \frac{2\lambda_D \sigma^2}{\varepsilon_0 \varepsilon_r} \exp\left(\frac{-D}{\lambda_D}\right) \quad (\text{I-26})$$

On voit donc que l'énergie d'interaction électrostatique entre deux surfaces solides chargées séparées d'une distance D décroît de façon exponentielle avec D ; la longueur caractéristique de cette décroissance est la longueur de Debye λ_D . La relation (I-26) présente l'avantage d'être valable pour tous les types d'électrolyte (1:1, 1:2, 2:2, *etc.*) tant que la distance D séparant les surfaces est supérieure à la longueur de Debye λ_D . Pour des distances inférieures à la longueur de Debye, il est nécessaire d'avoir recours à des résolutions numériques de l'équation de Poisson-Boltzmann. La concentration des

ions dans la zone entre les deux surfaces devient alors très grande et il faut utiliser des modèles plus compliqués prenant en compte la taille des ions ainsi que les effets de corrélation des ions adsorbés sur les surfaces.

Le tableau I-1 donne les relations permettant de calculer rapidement la longueur de Debye d'un électrolyte de concentration molaire c en fonction de sa nature.

	Electrolytes 1:1 (c en mol.l ⁻¹)	Electrolytes 1:2 et 2:1 (c en mol.l ⁻¹)	Electrolytes 2:2 (c en mol.l ⁻¹)
λ_D (nm)	$\frac{0,304}{\sqrt{c}}$	$\frac{0,176}{\sqrt{c}}$	$\frac{0,152}{\sqrt{c}}$

Tableau I-1 : Relations permettant de calculer la longueur de Debye selon la nature de l'électrolyte.

Remarque – Théorème des valeurs au contact

La pression étant uniforme entre les deux surfaces et $E_s = (d\psi/dx)_s$ étant indépendant de la distance entre les deux surfaces, on peut réécrire l'équation (I-10) sous la forme :

$$P(D) = k_B T \sum_i [\rho_{is}(D) - \rho_{is}(\infty)] \quad (I-27)$$

La pression est donc également donnée par l'augmentation de concentration des ions au niveau des surfaces lorsque celles-ci sont rapprochées de l'infini jusqu'à une distance D l'une de l'autre. Cette expression est valable tant que les ions n'interagissent pas avec les surfaces, c'est-à-dire tant que les ions ne s'adsorbent pas sur les surfaces et que la densité surfacique de charge σ reste constante.

2-2. Les forces de van der Waals

Deux bicouches de molécules amphiphiles interagissent également par l'intermédiaire d'une force attractive : la force de van der Waals. Cette force, qui apparaît quelque soit l'état de charge des bicouches, a pour origine des interactions de type dipolaire. Après avoir rappelé l'origine moléculaire de la force de van der Waals, nous donnerons son expression dans le cas de deux surfaces macroscopiques, et ce pour différentes géométries puis nous étudierons le cas de deux bicouches de molécules amphiphiles.

2-2-1. L'interaction de van der Waals entre deux molécules

Toutes les molécules possèdent un moment dipolaire, qui peut être un moment dipolaire instantané ou, dans le cas des molécules polaires, la superposition d'un moment dipolaire instantané et d'un moment dipolaire permanent. Le moment dipolaire instantané d'une molécule a pour origine la fluctuation quantique des nuages d'électrons autour des noyaux. Par ailleurs, toutes les molécules sont polarisables : l'application d'un champ électrique \mathbf{E} déplace les nuages d'électrons et les noyaux dans des sens opposés, créant ainsi un moment dipolaire induit $\mathbf{p} = \alpha \mathbf{E}$, où α est la polarisabilité de la molécule. Considérons donc deux molécules 1 et 2 de polarisabilité α_1 et α_2 , séparées d'une distance r . La molécule 1 possède un moment dipolaire \mathbf{p}_1 qui crée à l'emplacement de la molécule 2 un champ \mathbf{E}_1 ; ce champ induit sur la molécule 2 un moment dipolaire $\mathbf{p}_2 = \alpha_2 \mathbf{E}_1$ qui va interagir avec le moment dipolaire \mathbf{p}_1 de la molécule 1. Il peut alors apparaître trois types d'interactions dipolaires entre les molécules 1 et 2. La première, qui est toujours présente, est une interaction de type dipôle instantané – dipôle instantané. Une étude faisant appel aux théories de l'électrodynamique quantique a révélé qu'il s'agissait d'une interaction attractive en $1/r^6$ (London, 1937) ; elle est appelée interaction de dispersion ou interaction de London. La deuxième, qui apparaît dès que l'une des deux molécules est polaire, est une interaction attractive de type dipôle permanent – dipôle induit ; elle est appelée interaction d'induction ou interaction de Debye et présente également un profil en $1/r^6$. La troisième enfin, qui est présente si les deux molécules sont polaires, est une interaction attractive de type dipôle permanent – dipôle permanent ; elle est appelée interaction d'orientation ou interaction de Keesom et a aussi un profil en $1/r^6$. Les trois précédentes interactions sont regroupées sous le terme d'interaction de van der Waals. Les interactions de dispersion dominent généralement sur les deux autres sauf si l'on a affaire à des molécules très polaires (comme les molécules d'eau par exemple). L'interaction de van der Waals entre deux molécules 1 et 2 séparées d'une distance r peut donc s'écrire :

$$e_{\text{VDW}}(r) = \frac{a}{r^6} \quad (\text{I-28})$$

Les résultats précédents supposent que les moments dipolaires instantanés des molécules 1 et 2 restent constants pendant la durée nécessaire au champ électrique pour

se propager d'une molécule à l'autre. Ils ne sont donc valables que pour des faibles distances intermoléculaires. Lorsque $r > 5$ nm, il faut prendre en considération les variations des moments dipolaires durant la phase de propagation du champ électrique ; l'interaction de van der Waals est alors plus faible et présente un profil en $1/r^7$ (Casimir, 1948). On parle alors d'interaction de van der Waals retardée.

2-2-2. L'interaction de van der Waals entre deux surfaces solides

L'interaction de van der Waals macroscopique entre deux surfaces solides peut-être déduite des interactions de van der Waals microscopiques entre les molécules qui les composent. En première approximation, on peut supposer qu'elles sont additives et additionner toutes les interactions existant entre les molécules de la première surface et les molécules de la deuxième surface. Le résultat dépend des géométries des deux surfaces considérées. Pour deux corps de densité moléculaire ρ_1 et ρ_2 séparés d'une distance D et dont les molécules interagissent selon $e_{VDW}(r) = a/r^6$, on obtient l'interaction macroscopique (Hamaker, 1937) :

$$E_{VDW}(D) = \frac{A}{12\pi D^2}, \quad (I-29)$$

dans le cas de l'interaction entre deux plans.

$$E_{VDW}(D) = \frac{AR}{6D}, \quad (I-30)$$

dans le cas de l'interaction entre une sphère de rayon R et un plan.

$$E_{VDW}(D) = \frac{A\sqrt{R_1 R_2}}{6D}, \quad (I-31)$$

dans le cas de l'interaction entre deux cylindres croisés de rayons R_1 et R_2 .

Où : A est la constante de Hamaker associée à l'interaction entre les deux interfaces considérées.

$$A = \pi^2 a \rho_1 \rho_2 \quad (I-32)$$

Ces résultats partent de l'hypothèse d'une interaction de van der Waals moléculaire en $1/r^6$ et négligent donc les effets de retard associés à la propagation du champ électrique. Ils ne sont donc valables qu'aux faibles distances ($D < 5$ nm). Il existe une théorie plus complète, appelée théorie DLP, basée sur les fluctuations du champ électromagnétique dans un système fait de deux espaces semi-infinis séparés par un troisième milieu

(Dzyaloshinskii, 1961). Elle prend en compte ces effets de retard et ne suppose pas l'additivité des interactions de van der Waals microscopiques. Elle inclut de plus la contribution du milieu dans lequel les deux corps sont plongés.

2-2-3. L'interaction de van der Waals entre deux bicouches

Les interactions de van der Waals entre deux bicouches de molécules amphiphiles plongées dans l'eau ont été calculées par application de la théorie DLP. Ces interactions ayant essentiellement pour origine des interactions dipolaires entre les parties hydrophobes des molécules, le système est représenté par deux tranches d'hydrocarbure d'épaisseur h , séparées d'une distance D et interagissant à travers un milieu aqueux (figure I-10).

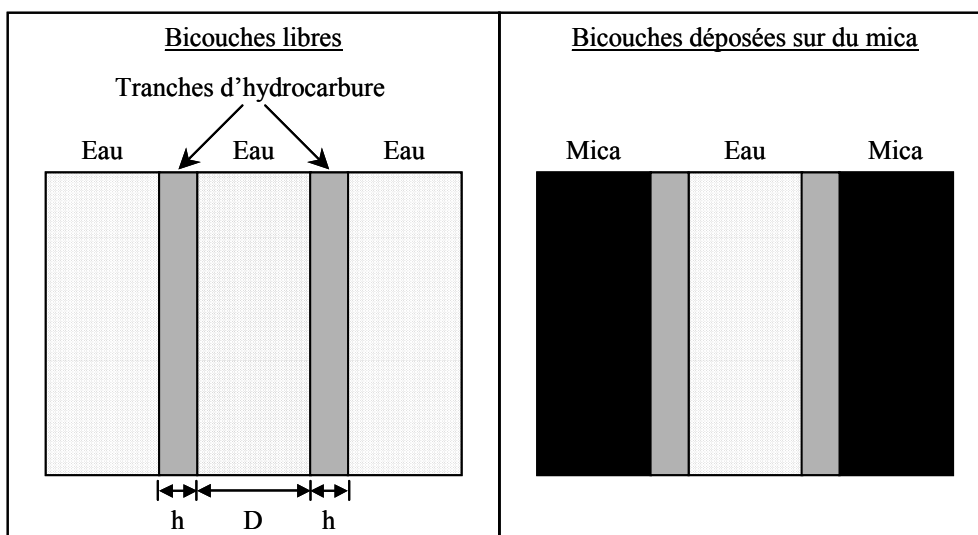


Figure I-10 : Modèles utilisés pour étudier l'interaction de van der Waals entre deux bicouches.

Dans le cas de deux bicouches libres dans l'eau, un calcul négligeant les effets de retard donne (Mahanty, 1976 – Parsegian, 1993) :

$$E_{\text{VDW-Bicouches Libres}}(D) = \frac{A_{\text{heh}}}{12\pi D^2} \left(1 - \frac{2}{\left(1 + \frac{h}{D}\right)^2} + \frac{1}{\left(1 + \frac{2h}{D}\right)^2} \right) \quad (\text{I-33})$$

Où : A_{heh} est la constante de Hamaker associée à l'interaction entre les deux interfaces hydrocarbure-eau.

Si les bicouches sont fixées sur un substrat l'expression est plus compliquée car il faut aussi prendre en compte la contribution de ce substrat. Dans la limite du régime non-retardé, l'interaction de van der Waals entre deux bicouches déposées sur des surfaces de mica vaut (Israelachvili, 1972 – Parsegian, 1993) :

$$E_{\text{VDW-Bicouches Supportées}}(D) = \frac{A_{\text{heh}}}{12\pi D^2} \left(1 + \frac{2A_{\text{mhe}}/A_{\text{heh}}}{\left(1 + \frac{h}{D}\right)^2} + \frac{A_{\text{mhm}}/A_{\text{heh}}}{\left(1 + \frac{2h}{D}\right)^2} \right) \quad (\text{I-34})$$

Où : A_{mhe} est la constante de Hamaker correspondant à l'interaction entre l'interface mica-hydrocarbure et l'interface hydrocarbure-eau et A_{mhm} la constante de Hamaker correspondant à l'interaction entre les deux interfaces mica-hydrocarbure.

On remarque que si la distance séparant les bicouches tend vers zéro, c'est-à-dire si l'on se rapproche du contact, les deux expressions (I-33) et (I-34) tendent vers une valeur commune correspondant à l'interaction entre deux plans d'hydrocarbure dans l'eau. En pratique, on considère que l'on est dans cette situation lorsque la distance est inférieure à l'épaisseur des bicouches :

Si $D < h$:

$$E_{\text{VDW-Bicouches Libres}}(D) \cong E_{\text{VDW-Bicouches Supportées}}(D) \cong \frac{A_{\text{heh}}}{12\pi D^2} \quad (\text{I-35})$$

Dans la limite des grandes distances les deux expressions prennent des formes très différentes. L'interaction de van der Waals entre les deux bicouches supportées est plus grande que celle entre les deux bicouches libres. Cette différence est attribuée à une contribution énergétique du mica à l'énergie d'interaction de van der Waals.

Si $D \gg h$:

$$E_{\text{VDW-Bicouches Libres}}(D) \cong \frac{A_{\text{heh}} h^2}{2\pi D^4} \quad (\text{I-36})$$

$$E_{\text{VDW-Bicouches Supportées}}(D) \cong \frac{A_{\text{heh}}}{12\pi D^2} \left(1 + 2A_{\text{mhe}}/A_{\text{heh}} + A_{\text{mhm}}/A_{\text{heh}} \right) \quad (\text{I-37})$$

Remarque – Théorie DLVO

Le profil d'interaction entre deux bicouches chargées plongées dans une solution aqueuse est donné, en première approximation, par la combinaison des effets associés à

la répulsion électrostatique et à l'attraction de van der Waals. La théorie qui détermine l'importance relative des deux effets a été développée initialement sur des systèmes colloïdaux ; elle porte le nom de théorie DLVO (figure I-11), d'après le nom des chercheurs qui ont participé à son élaboration : Derjaguin et Landau (Derjaguin, 1941), Verwey et Overbeek (Verwey, 1948).

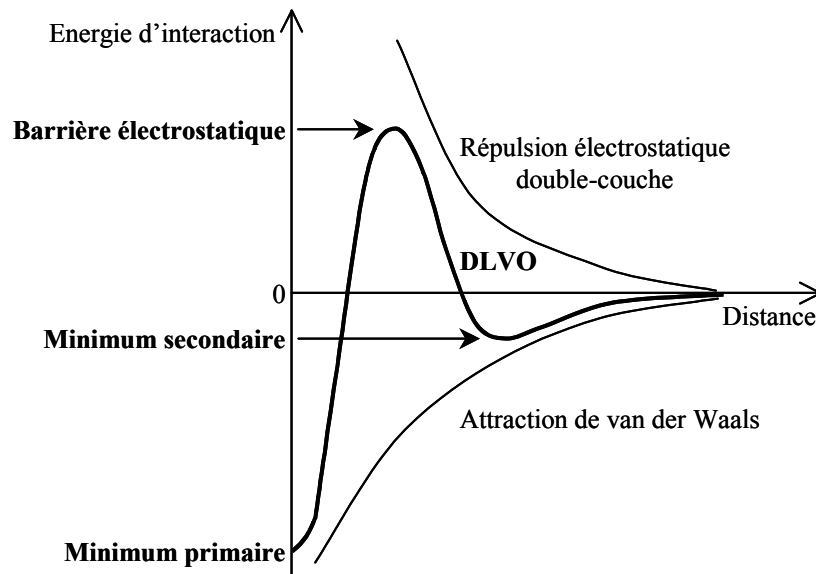


Figure I-11 : Représentation schématique du profil d'interaction de type DLVO.

Selon la distance séparant les deux surfaces, c'est l'un ou l'autre des deux effets qui domine dans le profil de force. L'attraction de van der Waals présente un profil en loi de puissance qui décroît très rapidement avec la distance ; en conséquence, aux très longues distances, c'est la répulsion électrostatique et son profil exponentiel qui dominant. En revanche, aux très courtes distances, la répulsion électrostatique tend vers une valeur finie et c'est l'attraction de van der Waals qui détermine le profil de force. Par ailleurs, contrairement à l'interaction électrostatique double-couche, l'interaction de van der Waals peut être considérée, en première approximation, comme étant indépendante de la concentration de l'électrolyte. Compte-tenu de toutes ces approximations, différents cas de figure peuvent en réalité se présenter en fonction de la concentration de l'électrolyte et de la densité de charge des surfaces. Dans le cas où les surfaces sont très chargées et plongées dans un électrolyte très dilué, la répulsion électrostatique est très forte et domine le profil de force ; elle atteint un maximum – qui

constitue une barrière d'énergie – aux alentours de 1 à 4 nm ; dans ce cas, les deux surfaces se repoussent fortement. Si l'électrolyte est plus concentré, les surfaces peuvent adhérer très faiblement et d'une façon réversible l'une à l'autre ; on dit qu'elles se trouvent dans un minimum secondaire de l'énergie. A densité de charge des surfaces plus faible, la barrière d'énergie imposée par la répulsion électrostatique est moins difficile à franchir ; les surfaces restent dans le minimum secondaire de l'énergie ou bien passent dans le minimum primaire de l'énergie et adhèrent fortement l'une à l'autre. Enfin, lorsque les surfaces ne sont quasiment pas chargées, l'attraction de van der Waals domine le profil de force ; dans ce cas, les deux surfaces s'attirent fortement. La théorie DLVO a pu être vérifiée expérimentalement grâce à des mesures de forces réalisées entre deux surfaces de mica (Israelachvili, 1978) ; l'accord a été très bon pour des distances de séparation supérieures à 3 nm. En effet, pour des distances plus faibles, il faut prendre en compte des forces liées aux propriétés d'organisation du solvant : les forces d'hydratation (chapitre I-2-3). Les profils de force prévus par la théorie DLVO ont également été obtenus entre des bicouches d'amphiphile chargées (Pashley, 1981 – Marra, 1985) ; le comportement à courte distance (inférieure à 3 nm) s'est, ici aussi, écarté de la théorie. Afin d'expliquer cet écart, il est nécessaire de prendre en compte, en plus des forces d'hydratation, des forces liées au caractère mobile des bicouches : les forces stériques (chapitre I-2-2).

2-2. Les forces de nature stérique

Les bicouches d'amphiphiles sont des objets mous qui se déforment sous l'effet de l'agitation thermique. Lorsque deux bicouches se rapprochent l'une de l'autre, les oscillations qui en découlent génèrent inévitablement des chocs et les bicouches se repoussent. Ces répulsions de nature entropique se présentent sous différentes formes, correspondant chacune à un mode d'oscillation particulier de la bicouche. Des répulsions peuvent également apparaître lorsque des objets de type polymère sont adsorbés à la surface des bicouches.

2-2-1. L'interaction d'ondulation d'Helfrich

Une bicouche libre est tout d'abord capable d'ondulations de grande amplitude, correspondant à un mouvement d'ensemble de la structure macroscopique (figure I-12).

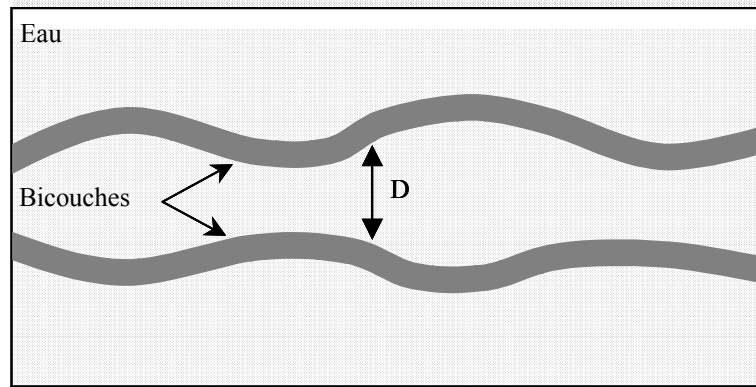


Figure I-12 : Ondulations d'Helfrich.

Ces ondulations, ainsi que l'interaction qui en découle, sont bien sûr fortement dépendantes du module de rigidité de courbure κ_c des bicouches. L'interaction d'ondulation a été estimée pour la première fois sur des systèmes multilamellaires (Helfrich, 1978). Les résultats ont ensuite été précisés et notamment deux régimes ont été distingués en fonction de la distance D séparant les bicouches (Helfrich, 1984 – Evans¹, 1992).

Aux petites distances, typiquement lorsque $D \leq \sqrt{\frac{k_B T}{4\pi c \tau}}$ (de l'ordre de 2 nm) :

$$E_{\text{Hel}}(D) \cong \frac{(k_B T)^2}{16\pi^2 \kappa_c (cD^2)} \quad (\text{I-38})$$

Aux grandes distances, typiquement lorsque $D \geq \sqrt{\frac{k_B T}{4\pi c \tau}}$:

$$E_{\text{Hel}}(D) \cong \frac{e \tau k_B T}{8\pi \kappa_c} \exp\left(\frac{-4\pi \tau (cD^2)}{k_B T}\right) \quad (\text{I-39})$$

Où : κ_c est le module de rigidité de courbure de la bicouche, c est une constante géométrique qui vaut environ 0,1 pour les bicouches et τ est la tension de la bicouche.

L'interaction d'ondulation d'Helfrich disparaît lorsque les bicouches sont fixées sur des substrats solides et elle est considérablement réduite lorsque les bicouches sont mises sous tension.

2-2-2. L'interaction péristaltique

Une bicouche est également le siège de fluctuations d'épaisseur (figure I-13).

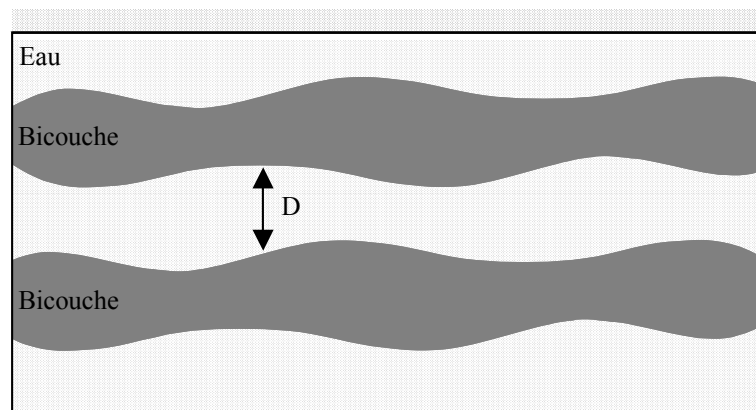


Figure I-13 : Ondulations péristaltiques.

Ces fluctuations sont de moins grande amplitude que les ondulations d'Helfrich. L'interaction correspondante est appelée interaction péristaltique ; elle dépend de la capacité qu'a une bicouche à augmenter l'aire de sa surface et elle est de plus courte portée (environ 1 nm) que l'interaction d'ondulation d'Helfrich. L'interaction péristaltique entre deux bicouches séparées d'une distance D est bien décrite par l'équation (Israelachvili, 1992) :

$$E_{\text{Per}}(D) \cong \frac{(k_B T)^2}{2\pi^2 \kappa_e D^4} \quad (\text{I-40})$$

Où : κ_e est le module d'expansion de la surface de la bicouche.

2-2-3. L'interaction de protrusion

Les molécules amphiphiles qui composent une bicouche ne sont pas irrémédiablement fixées à celle-ci. Elles peuvent en effet s'écarter individuellement de la structure bidimensionnelle et sortir partiellement de la bicouche (figure I-14).

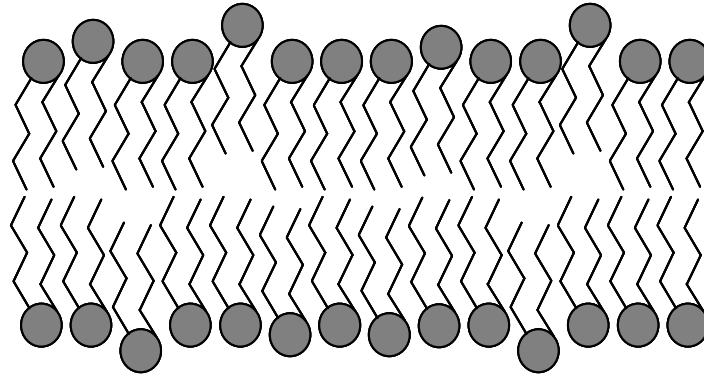


Figure I-14 : Protrusion des molécules amphiphiles.

La répulsion entropique qui en résulte lorsque deux bicouches sont à proximité l'une de l'autre est appelée interaction de protrusion ; c'est une interaction de très courte portée (environ 0,1 à 0,3 nm). Il n'existe pas à proprement parler de théorie qui décrive cette interaction ; son expression a été établie de façon purement empirique (Israelachvili, 1992) :

$$E_{\text{pro}}(D) \cong 3 \Sigma_{\text{pro}} k_B T \exp\left(\frac{-D}{\lambda_{\text{pro}}}\right) \quad (\text{I-41})$$

Où : Σ_{pro} est la densité surfacique des sites de protrusion et λ_{pro} la longueur de décroissance caractéristique de l'interaction de protrusion (de l'ordre de quelques dixièmes de nanomètre).

2-2-4. L'interaction entre bicouches recouvertes de polymères

Lors de certaines expériences on est amené à fonctionnaliser la surface des bicouches avec des polymères ou des objets assimilables aux polymères par certaines de leurs propriétés. C'est par exemple le cas lorsqu'on adsorbe des protéines à la surface de bicouches afin d'étudier leur interaction (chapitre V-2). En effet, une protéine peut au cours d'une expérience se dénaturer (elle se déploie) et adopter alors un comportement assimilable à celui des polymères. C'est également le cas lorsqu'on réalise des bicouches à partir de deux lipides différents dont l'un possède une partie hydrophile beaucoup plus grande que l'autre ; cette partie ressort alors de la bicouche et se comporte comme un polymère flexible. Lorsqu'on rapproche l'une de l'autre deux bicouches dont les surfaces sont recouvertes de polymères, il apparaît généralement une

force répulsive d'origine entropique. Il existe cependant des cas où la force est attractive suite à des phénomènes de pontage ou de déplétion des polymères dans la zone située entre les deux surfaces.

Forces répulsives entre deux surfaces recouvertes de polymères

Lorsque les polymères sont mis en solution dans un bon solvant, leurs chaînes se déploient et s'organisent en pelotes statistiques dont la taille est donnée par le rayon de Flory R_F :

$$R_F = l n^{3/5} \quad (\text{I-42})$$

Où : n est le nombre de monomères constituant le polymère et l est la taille d'un monomère.

Il en est de même lorsque les polymères sont greffés sur une surface à condition que la densité de greffage soit suffisamment faible pour que deux polymères voisins ne se chevauchent pas (figure I-15a). Dans ces conditions, les polymères d'une surface interagissent uniquement, sur le plan stérique, avec les polymères de l'autre surface.

Le paramètre d'échelle utilisé dans les problèmes faisant intervenir les polymères est leur rayon de giration R_g , qui donne la taille de la pelote statistique formée par leur chaîne dans le cas idéal où les monomères n'interagissent pas les uns avec les autres :

$$R_g = \frac{l\sqrt{n}}{\sqrt{6}} \quad (\text{I-43})$$

Lorsque les deux surfaces sont rapprochées l'une de l'autre jusqu'à une distance inférieure à quelques rayons de giration, les polymères se retrouvent confinés ; ceci induit une diminution du nombre de configurations qui leur sont accessibles et il apparaît une force répulsive d'origine entropique. Dans la gamme des distances comprises entre $8R_g$ et $2R_g$, l'interaction entre les deux surfaces est bien décrite par la relation (Dolan, 1974) :

$$E_{\text{pol}}(D) \cong 36 \Sigma_{\text{pol}} k_B T \exp\left(\frac{-D}{R_g}\right) \quad (\text{I-44})$$

Où : Σ_{pol} est la densité surfacique des polymères.

Pour des densités de greffage plus élevées, les polymères ressentent en plus un effet de confinement au sein de la surface sur laquelle ils sont fixés. Leurs chaînes s'étendent

alors sur une longueur L supérieure au rayon de giration ; c'est le régime "brosse" (figure I-15b). Lorsque la distance entre les surfaces devient inférieure à $2L$, elles se repoussent sous l'effet de la pression (de Gennes, 1985 – de Gennes, 1987) :

$$P(D) \cong \frac{k_B T}{s^3} \left[\left(\frac{2L}{D} \right)^{9/4} - \left(\frac{D}{2L} \right)^{3/4} \right] \quad (\text{I-45})$$

Où : s est la distance moyenne séparant les sites de fixation des polymères sur les surfaces.

Le premier terme de l'équation (I-45) est un terme répulsif ; il correspond à la répulsion entropique entre les chaînes des polymères qui tend à augmenter D . Le second terme est un terme attractif ; il correspond à la réponse élastique des chaînes des polymères au phénomène d'étirement et tend à diminuer D . Dans la gamme des distances comprises entre $0,9L$ et $0,2L$, l'énergie d'interaction entre les deux surfaces peut s'écrire (Israelachvili, 1992) :

$$E_{\text{pol}}(D) \cong \frac{100L\Sigma_{\text{pol}}^{3/2}}{\pi} k_B T \exp\left(\frac{-\pi D}{L}\right) \quad (\text{I-46})$$

Où :

$$L = s \left(\frac{R_F}{s} \right)^{5/3} \quad (\text{I-47})$$

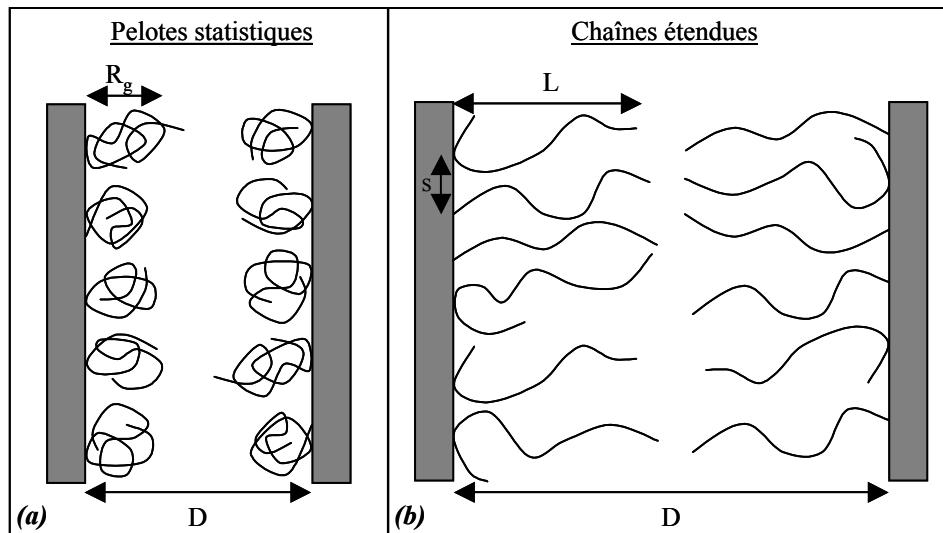


Figure I-15 : Interactions répulsives entre deux surfaces recouvertes de polymères.

Forces attractives entre deux surfaces recouvertes de polymères

Dans certaines circonstances, des forces de nature attractive peuvent également apparaître entre deux surfaces recouvertes de polymères.

Lorsque les polymères se trouvent dans un bon solvant et que leur densité de greffage sur les surfaces est faible, ils peuvent réaliser des pontages c'est-à-dire se lier aux deux surfaces en même temps (figure I-16a). La force d'attraction correspondante est bien sûr d'autant plus importante que l'affinité des polymères pour les deux surfaces est grande. C'est le cas, par exemple, lorsque les polymères s'adsorbent spontanément sur les surfaces.

Une attraction peut également apparaître si les polymères se trouvent dans un mauvais solvant. Dans une telle situation, leurs chaînes ont effectivement tendance à s'attirer afin de réduire les zones de contact avec les molécules du solvant. Les surfaces sont alors rapprochées l'une de l'autre et une répulsion de nature stérique réapparaît lorsque le confinement des polymères devient trop important.

Le dernier cas pouvant générer une attraction est celui où les polymères ne présentent pas d'affinité pour les surfaces. Lorsqu'on rapproche les deux surfaces l'une de l'autre, les polymères sont chassés de la zone entre les deux surfaces (figure I-16b). Leur concentration en volume devient alors plus importante que leur concentration entre les deux surfaces et il apparaît une attraction d'origine osmotique ; on parle également de force de déplétion entre les deux surfaces.

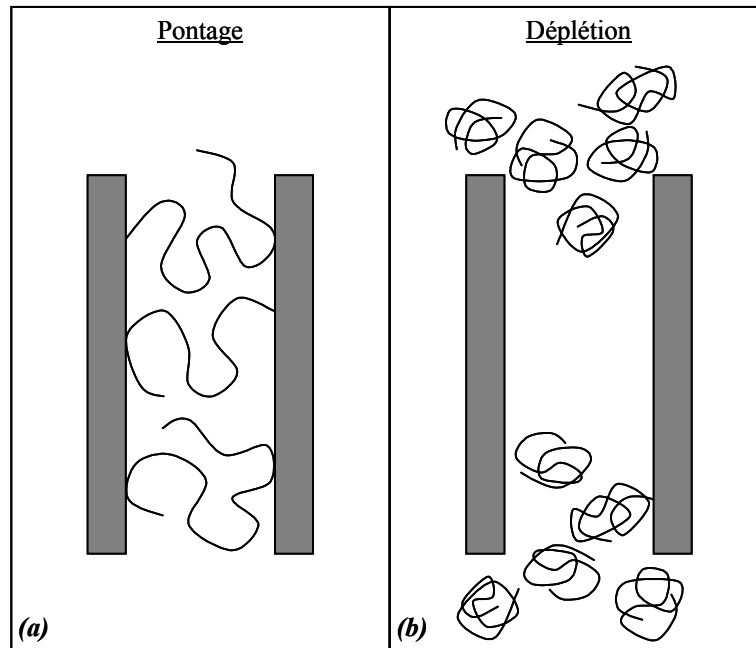


Figure I-16 : Interactions attractives entre deux surfaces recouvertes de polymères.

2-3. Les forces d'hydratation

Les molécules d'eau ne possèdent pas les mêmes propriétés d'organisation lorsqu'elles se trouvent en volume ou lorsqu'elles se trouvent à proximité de la surface d'une bicouche. La forte affinité entre les têtes polaires et les molécules d'eau forcent ces dernières à s'organiser en couches discrètes sur une distance correspondant à quelques diamètres moléculaires ; la zone ainsi créée est appelée zone d'hydratation. Lorsque deux bicouches se rapprochent l'une de l'autre, les zones d'hydratation se recouvrent et il apparaît une force répulsive de courte portée que l'on appelle force d'hydratation ou force structurale. Nous allons tout d'abord présenter la forme que prend cette force dans le cas de deux surfaces solides puis nous étudierons le cas de deux bicouches d'amphiphiles.

2-3-1. Les forces oscillatoires entre deux surfaces solides

Dans le cas de deux surfaces solides, la force d'hydratation présente généralement un profil oscillatoire et peut-être attractive ou répulsive selon l'affinité de la surface pour les molécules d'eau. Afin de bien comprendre l'origine de cette force, il est nécessaire

de savoir comment les molécules d'eau s'organisent à proximité des surfaces puis comment cette organisation est perturbée lorsqu'on rapproche les deux surfaces l'une de l'autre.

Surfaces solides inertes

Considérons le cas modèle où les molécules d'eau sont représentées par des sphères qui n'interagissent pas avec les surfaces et qui n'interagissent entre elles qu'à travers une répulsion de type sphères dures. Des études théoriques et des simulations numériques ont révélé que la densité des molécules d'eau à proximité d'une surface solide présentait alors un profil oscillatoire amorti dont la période est de l'ordre du diamètre σ des molécules d'eau et dont la portée est de l'ordre de quelques σ (Rao, 1979 – figure I-17).

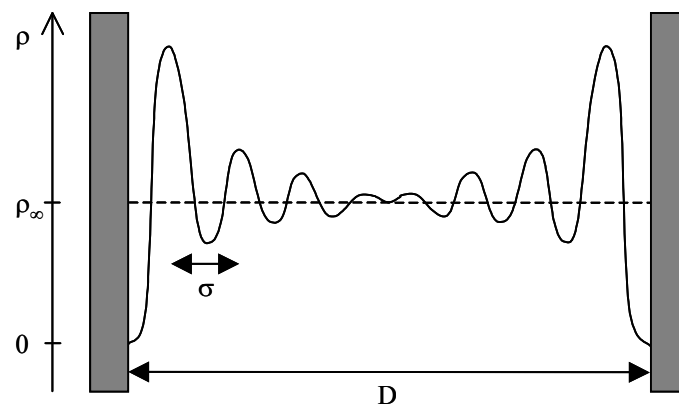


Figure I-17 : Profil de densité des molécules d'eau au voisinage de deux surfaces solides inertes.

De manière analogue au cas de deux surfaces chargées interagissant à travers une solution d'électrolyte (équation I-27), on peut établir une relation pour la pression qui s'exerce sur deux surfaces plongées dans l'eau et rapprochées jusqu'à une distance D l'une de l'autre (Evans², 1990) :

$$P(D) = k_B T [\rho_s(D) - \rho_s(\infty)] \quad (I-48)$$

Où : $\rho_s(D)$ et $\rho_s(\infty)$ sont les densités des molécules d'eau au niveau des surfaces lorsque celles-ci sont respectivement à une distance D ou à une distance infinie l'une de l'autre. La force d'hydratation entre deux surfaces est donc directement liée à la variation de densité des molécules d'eau au niveau de ces deux surfaces lorsqu'on les rapproche

l'une de l'autre. Elle correspond à la force qu'il est nécessaire de fournir pour détruire les couches successives de molécules d'eau et présente également un profil oscillatoire amorti dont la période est de l'ordre de σ et dont l'amortissement est de l'ordre de quelques σ (figure I-18).

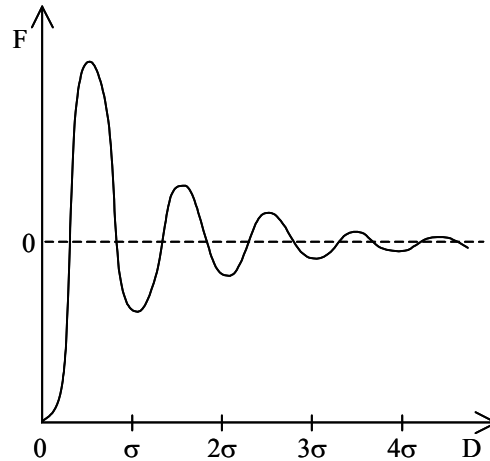


Figure I-18 : Forces d'hydratation entre deux surfaces solides inertes.

Dans la limite des très faibles séparations, lorsque la dernière couche de molécules d'eau a été éjectée, on a :

$$P(D \rightarrow 0) = -k_B T \rho_S(\infty) \quad (\text{I-49})$$

La force entre les deux surfaces est alors une force attractive. En première approximation, et pour des distances de séparation de quelques σ , la pression qui s'exerce sur les deux surfaces peut s'écrire (van Megen, 1979) :

$$P(D) \cong -k_B T \rho_S(\infty) \cos\left(\frac{2\pi D}{\sigma}\right) \exp\left(\frac{-D}{\sigma}\right) \quad (\text{I-50})$$

Surfaces hydrophiles – Surfaces hydrophobes

En réalité, les molécules d'eau interagissent entre elles et avec les surfaces par l'intermédiaire de potentiels plus compliqués que des potentiels de type sphères dures. L'importance relative de ces potentiels détermine l'état d'organisation des molécules d'eau au voisinage d'une surface. En présence de surfaces très hydrophiles, les molécules d'eau ont tendance à s'organiser en couches très denses et à se lier très fortement aux surfaces (Snook, 1979). La destruction de ces couches nécessite

beaucoup d'énergie et le résultat est une force d'hydratation qui présente un comportement globalement répulsif mais qui conserve son caractère oscillatoire (figure I-19a). Par contre, lorsque l'affinité des molécules d'eau pour les surfaces est moins importante que l'affinité des molécules d'eau entre elles, la force d'hydratation a tendance à être globalement attractive (figure I-19b). C'est ce qui se produit lorsque l'on met en contact deux surfaces hydrophobes dans l'eau. A courte distance, les molécules d'eau ont tendance à fuir l'espace se trouvant entre les deux surfaces. Leur densité au niveau des surfaces est alors plus faible que leur densité en volume et le résultat est une force attractive de type déplétion. On parle également de forces hydrophobes pour caractériser de telles attractions ; on les rencontre par exemple entre deux surfaces d'hydrocarbures ou de fluorocarbures. Des expériences de mesures de forces réalisées entre deux surfaces de mica ont permis de vérifier le comportement globalement répulsif de la force d'hydratation dans le cas de deux surfaces hydrophiles plongées dans l'eau (Israelachvili, 1983). Elles ont mis en évidence un profil exponentiel ayant une longueur caractéristique de décroissance d'environ 1 nm et une portée d'environ 4 nm. Un profil oscillatoire ayant une période d'environ 0,25 nm (correspondant au diamètre σ des molécules d'eau) a également été observé pour des distances inférieures à 1,5 nm. Quant aux forces hydrophobes, elles ont pu être étudiées expérimentalement pour la première fois grâce à des mesures de forces entre deux micas rendus hydrophobes par adsorption d'une monocouche d'amphiphile (Israelachvili, 1982). Ces mesures ont mis en évidence une force attractive exponentielle ayant une portée de plusieurs dizaines de nanomètres et dont l'intensité est deux fois plus importante que celle de la force de van der Waals. Même si des explications à ces phénomènes ont pu être proposées (Marcelja, 1977 – Henderson, 1986 – Attard, 1988 – Luzar, 1987 – Yaminsky, 1996 – Lum, 1999), il n'existe pas encore, à l'heure actuelle, de théorie permettant de décrire de façon satisfaisante les forces d'hydratation.

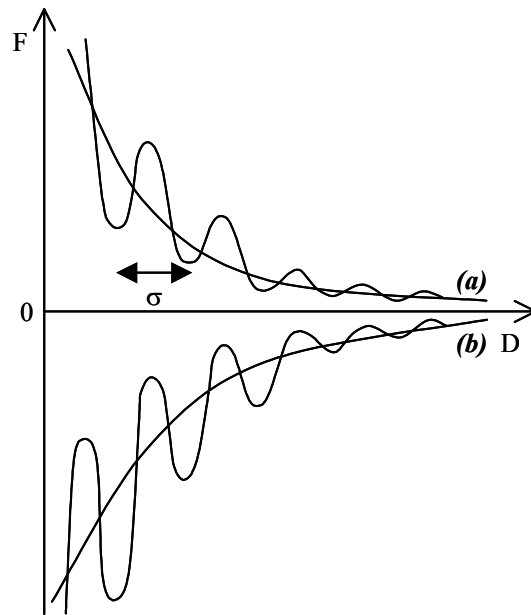


Figure I-19 : Forces d'hydratation entre deux surfaces solides hydrophiles (a) ou hydrophobes (b).

2-3-2. Les forces d'hydratation entre deux bicouches d'amphiphiles

Dans le cas de deux bicouches d'amphiphiles, l'organisation des molécules d'eau en couches discrètes bien définies n'est plus possible. En effet, la surface formée par les têtes polaires est très rugueuse à l'échelle des molécules d'eau et la bicouche est, comme on l'a vu au chapitre I-2-2, un objet qui fluctue sous l'effet de l'agitation thermique. On n'observe plus dans ce cas de force oscillatoire mais uniquement une force répulsive présentant un profil exponentiel (Caffrey, 1983). De nombreuses expériences ont été réalisées, utilisant des techniques de mesures de pressions osmotiques (LeNeveu, 1976), l'appareil de mesures de forces entre surfaces (Marra, 1985) ou encore la technique des vésicules micromanipulées (Evans¹, 1987) ; elles ont toutes mis en évidence une répulsion de type exponentiel présentant une longueur caractéristique de décroissance de 0,1 à 0,6 nm et une portée de 1 à 3 nm. L'énergie d'interaction associée à la force d'hydratation entre deux bicouches séparées d'une distance D est bien décrite par l'équation :

$$E_{\text{hyd}}(D) = E_{\text{hyd}0} \exp\left(\frac{-D}{\lambda_h}\right) \quad (\text{I-51})$$

Où : λ_h , la longueur caractéristique de décroissance de la force d'hydratation, est de l'ordre de quelques dixièmes de nanomètre.

Cette interaction présentant un profil très similaire à celui des forces stériques de protrusion (équation I-41), il est très difficile d'estimer la contribution de chacun des deux phénomènes d'hydratation et de protrusion. Une explication consiste à penser que le phénomène d'hydratation n'intervient qu'à travers un habillage plus ou moins important des têtes polaires, ce qui a pour conséquence d'augmenter leur taille et donc la portée de la force de protrusion (Israelachvili, 1990). Cette interprétation a donné lieu à de vives discussions (Parsegian, 1991) et d'autres expériences et études théoriques doivent encore être réalisées afin de pouvoir déterminer la contribution à la répulsion à courte distance due à la fluctuation des molécules amphiphiles hors de la bicouche et celle due à la structuration de l'eau au voisinage des têtes polaires.

Remarque – Force hydrophobe entre bicouches

L'interaction hydrophobe qui pourrait avoir lieu dans l'eau entre les chaînes carbonées des molécules amphiphiles est généralement masquée par la présence des têtes hydrophiles. Elle peut néanmoins réapparaître lorsque l'aire occupée par les têtes hydrophiles devient plus petite et qu'il existe alors des zones de contact entre les chaînes hydrophobes et la phase aqueuse (Helm, 1989). De telles situations peuvent se produire lorsque la bicouche est le siège de phénomènes d'expansions latérales liés, par exemple, à l'application d'un champ électrique ou à un gonflement par effet osmotique.

2-4. Les forces spécifiques

Les forces de nature électrique (forces électrostatiques double-couche et forces de van der Waals) ainsi que les forces de nature stérique se retrouvent dans la plupart des systèmes impliquant des bicouches d'amphiphiles. Nous allons présenter ici des forces qui sont plus spécifiques à la structure chimique et géométrique des molécules constituant la bicouche. Les connaissances actuelles en synthèse bio-organique permettent en effet de créer des composés amphiphiles très originaux comportant des groupes fonctionnels capables de mimer certaines des liaisons qui sont présentes au sein des systèmes biologiques. Nous parlerons dans cette partie des liaisons hydrogène, des liaisons par chélation et des liaisons récepteur-ligand.

2-4-1. Les liaisons hydrogène

Les liaisons hydrogène de l'eau

La molécule d'eau peut être vue comme une molécule possédant une charge partielle négative – localisée au niveau de l'atome d'oxygène – et des charges partielles positives – localisées au niveau des atomes d'hydrogène. Quand deux molécules d'eau sont proches l'une de l'autre, leurs régions de charges opposées s'attirent. Chaque atome d'hydrogène de la molécule d'eau se retrouve ainsi lié à deux atomes d'oxygène par l'intermédiaire d'une liaison intramoléculaire covalente et d'une liaison intermoléculaire de nature électrostatique, appelée liaison hydrogène (Joesten, 1974 – Schuster, 1976). Cette liaison hydrogène est relativement forte : elle est environ dix fois plus forte qu'une interaction de type van der Waals mais reste dix fois moins forte qu'une liaison covalente. Elle est également directionnelle et organise les molécules d'eau en une structure tétraédrique (figure I-20). Ceci confère à l'eau des propriétés très particulières. Par exemple, l'eau possède une température de vaporisation anormalement élevée compte tenu de la petite taille de ses molécules car le passage de l'état liquide à l'état vapeur nécessite de rompre les liaisons hydrogène, ce qui coûte beaucoup d'énergie.

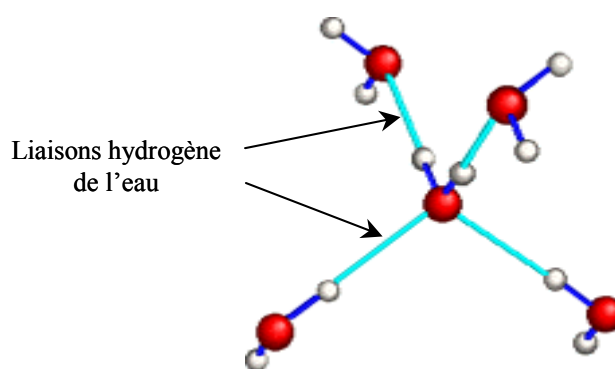


Figure I-20 : Structure tétraédrique locale formée par les molécules d'eau.

Autres systèmes présentant des liaisons hydrogène

Les liaisons hydrogène ne sont pas spécifiques à l'eau. Elles peuvent se former d'une façon générale entre un atome très électronégatif A (l'accepteur) et un atome d'hydrogène H lié de manière covalente à un autre atome très électronégatif D (le donneur) ; la liaison se note D-H---A. La force d'une liaison hydrogène est d'autant plus grande que le donneur est plus électronégatif ; ainsi les liaisons de type O-H---A seront, par exemple, plus intenses que les liaisons de type N-H---A. En l'absence de contrainte stérique, la liaison hydrogène est linéaire ; des écarts angulaires sont néanmoins tolérés mais ils réduisent son intensité. Les liaisons hydrogène sont présentes également dans de nombreux édifices macromoléculaires dont elles assurent la stabilité. Elles interviennent par exemple lors du processus de repliement des protéines et sont, avec les forces hydrophobes, les principales forces responsables de la stabilité des protéines globulaires (Pace, 1996 – Myers, 1996). De même, la cohésion de la structure en double hélice de l'ADN est assurée par les liaisons hydrogène que forment entre elles les bases complémentaires de chaque brin (figure I-21). L'interaction par liaisons hydrogène a pu être étudiée, entre autres, grâce à des mesures de forces en SFA entre deux bicouches comprenant des groupes donneurs et des groupes accepteurs de liaisons hydrogène (Pincet, 1994 – Schneider, 1998). La première étude impliquait des lipides synthétiques dont la tête polaire était constituée des bases A ou T de l'ADN (figure I-22 – Lebeau, 1992). Elle a mis en évidence une attraction à très longue distance (50 nm) et a permis de réaliser une mesure directe des énergies d'adhésion A/A, T/T et A/T. La deuxième étude concernait des lipides synthétiques dont la tête polaire comprenait une glycine. Elle a confirmé que les forces impliquées lors de la séparation de bicouches capables de former des liaisons hydrogène étaient très grandes.

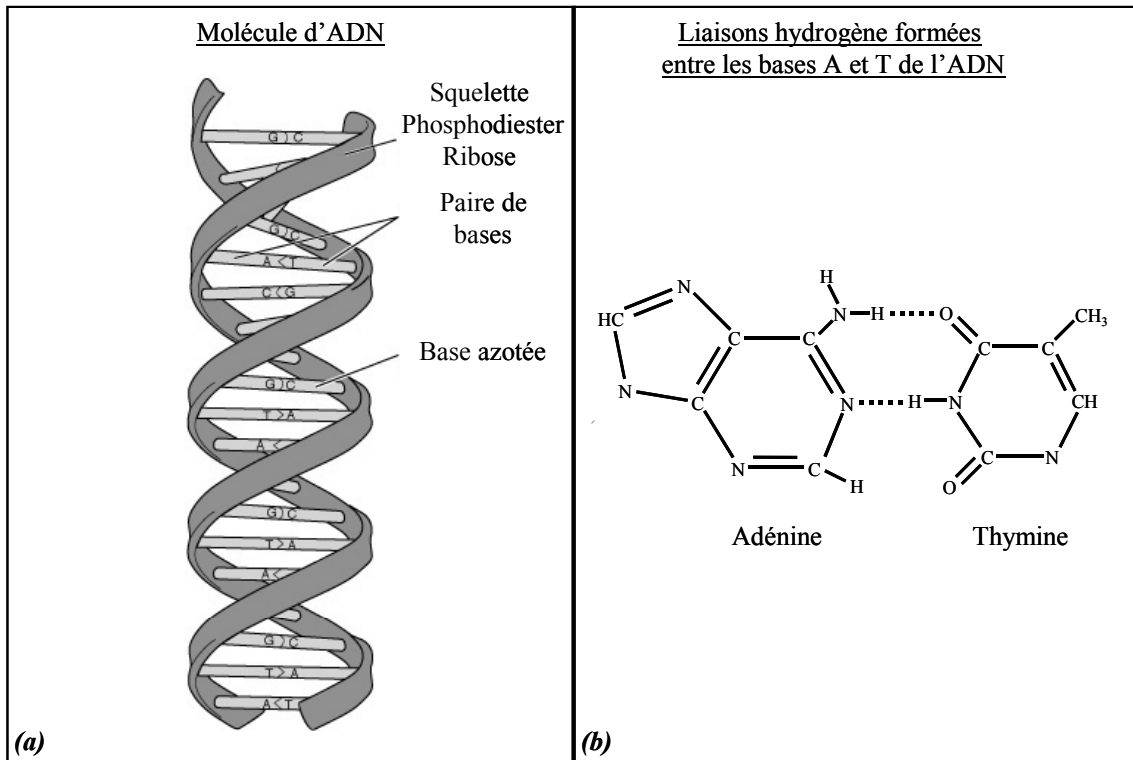


Figure I-21 : Liaisons hydrogène entre les bases de l'ADN.

D'après : <http://www.accessexcellence.org/AB/GG/>

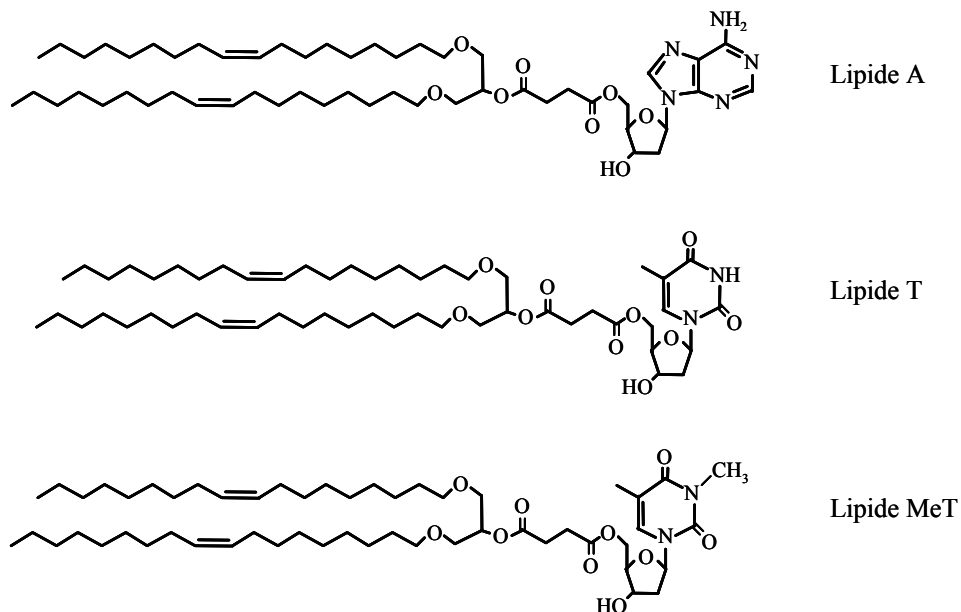


Figure I-22 : Structures lipidiques utilisées pour la mesure des énergies d'adhésion A/A, T/T et A/T. La base modifiée MeT a permis d'étudier l'effet d'un blocage de la fonction donneur de liaisons hydrogène sur les énergies d'adhésion mesurées (chapitre III).

2-4-2. Les liaisons par chélation

Dans les milieux biologiques, les ions métalliques ne se trouvent pas à l'état libre ; ils forment généralement des complexes avec des molécules organiques. Par exemple, l'absorption des minéraux par l'organisme ne peut se faire que si ces derniers sont liés à deux acides aminés qui vont permettre leur passage à travers la paroi intestinale puis leur distribution dans le système sanguin. Le mode de liaison utilisé s'appelle la chélation. Le mot chélation vient du grec *khele* qui signifie pince. C'est un mode de liaison au cours duquel au moins deux groupes d'une molécule organique se lient à un même atome métallique pour former une structure annulaire (figure I-23). Afin que la liaison par chélation soit effective, les deux groupes de la molécule organique ne doivent pas être trop éloignés l'un de l'autre par comparaison à la taille de l'atome métallique. La liaison doit être suffisamment forte pour empêcher que d'autres composés s'imposent en compétiteur vis-à-vis de la molécule organique chélatante mais également suffisamment faible pour pouvoir être rompue quand cela sera nécessaire. La structure fermée du complexe protège l'ion métallique vis-à-vis d'éventuelles réactions chimiques indésirables.

A l'heure actuelle, très peu de choses sont connues sur le mécanisme de chélation et notamment aucune mesure de forces n'a encore été réalisée afin d'évaluer l'énergie de liaison d'un ion métallique à un composé chélatant.

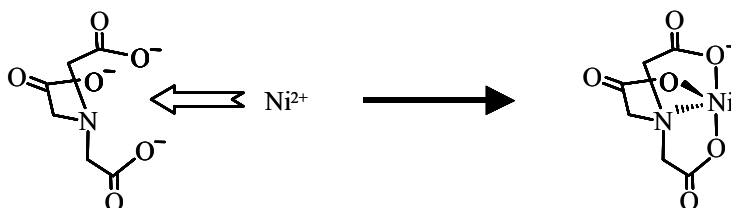


Figure I-23 : Chélation d'un ion nickel par un groupement nitrilotriacétate (NTA).

2-4-3. Les liaisons récepteur-ligand

La transmission de nombreuses informations au sein des milieux vivants est assurée par des molécules (les ligands) qui interagissent avec les cellules en se liant à des protéines

spécifiques (les récepteurs). Ces interactions sont la résultante d'interactions connues (interactions de van der Waals, interactions hydrophobes, liaisons hydrogène, *etc.*) et d'une bonne compatibilité géométrique entre le ligand et le récepteur. On les rencontre, par exemple, lors de la reconnaissance des antigènes par les anticorps ou encore lors de l'association des enzymes à leurs substrats (figure I-24).

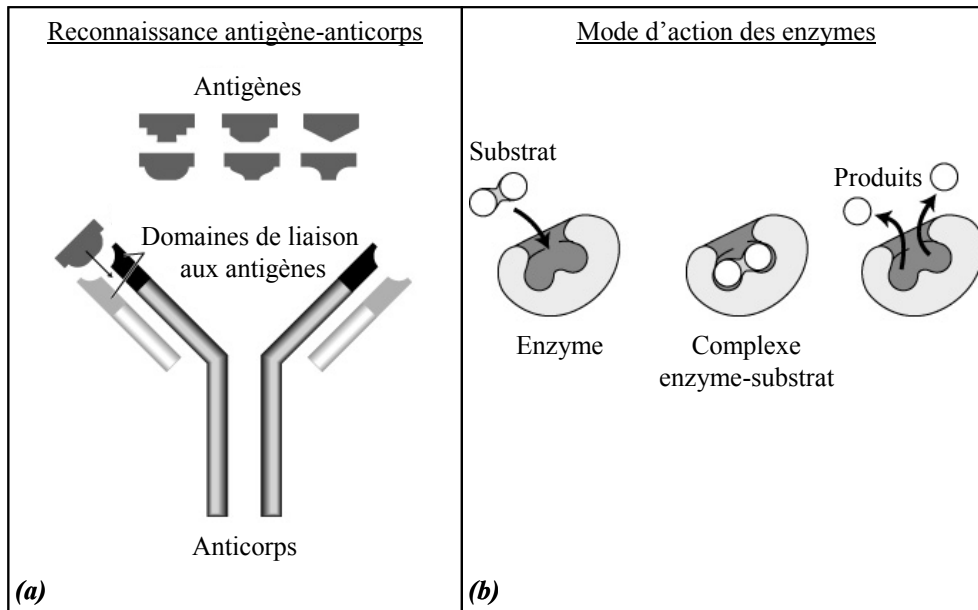


Figure I-24 : Exemple de phénomènes faisant intervenir des interactions de type ligand-récepteur.

D'après : <http://www.accessexcellence.org/AB/GG/>

L'affinité du récepteur pour son ligand est déterminée par la constante de dissociation du complexe formé par les deux molécules :



Où :

$$K_d = \frac{[L-R]}{[L][R]} \quad (I-53)$$

Cette constante de dissociation est souvent connue mais il n'en est pas de même des mécanismes physiques gouvernant l'interaction. Ainsi, bien souvent, ni la portée, ni l'intensité des forces mises en jeu ne sont connues. Une méthode permettant de caractériser ces interactions consiste à effectuer des mesures de forces en SFA entre une bicouche sur laquelle est fixé le récepteur et une bicouche dans laquelle est incorporé un

lipide ayant pour tête polaire le ligand. Les premières mesures de ce type ont été réalisées pour le couple streptavidine-biotine (figure I-25 – Helm, 1991 – Wong, 1999) ; elles ont mis en évidence une attraction très forte à très courte distance (environ 1 nm). La méthode a pu également être appliquée à l'étude de l'interaction entre un antigène et un anticorps (Leckband, 2000a).

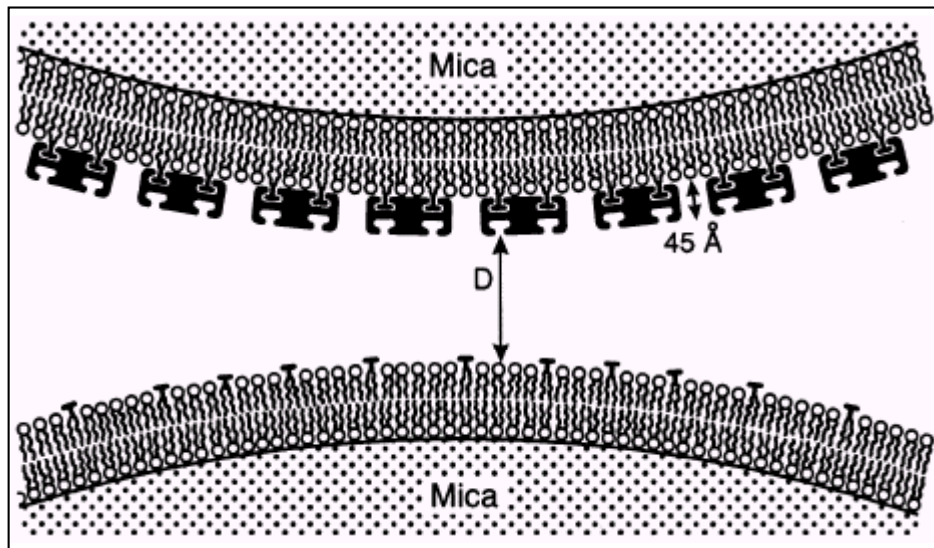


Figure I-25 : Configuration expérimentale ayant permis de mesurer l'interaction streptavidine-biotine en SFA. D'après (Wong, 1999).

3. Les rétinoïdes

L'acide rétinoïque est une molécule dérivée de la vitamine A ou rétinol (figure I-26a) qui intervient lors de nombreux processus physiologiques comme la régulation de la croissance et de la division cellulaire ou encore le développement embryonnaire. Parmi les dérivés biologiquement actifs de la vitamine A, on compte également le rétinol (figure I-26b), qui joue un rôle important dans le maintien de la fonction visuelle. Les fonctions très importantes qu'occupe la vitamine A au sein de notre organisme ont motivé de nombreuses recherches dans le milieu médical. Des dérivés synthétiques ont notamment été élaborés dans le but d'obtenir des composés plus actifs et moins toxiques. Certains dérivés se sont ainsi révélés très efficaces dans le traitement de maladies dermatologiques comme l'acné (Bershad, 2001) ou le psoriasis (Marks, 1999) et d'autres ont pu être utilisés en thérapie anti-cancéreuse (Lippman, 1987) et

notamment dans le traitement de la leucémie promyélocytaire (Chomienne, 1996). A l'heure actuelle, de nombreux essais cliniques sont encore réalisés sur des dérivés synthétiques du rétinol afin de tester leur efficacité dans la prévention et le traitement de certains cancers (Hong, 1997). La vitamine A et l'ensemble de ses dérivés biologiquement actifs, naturels ou synthétiques, forment la famille des rétinoïdes.

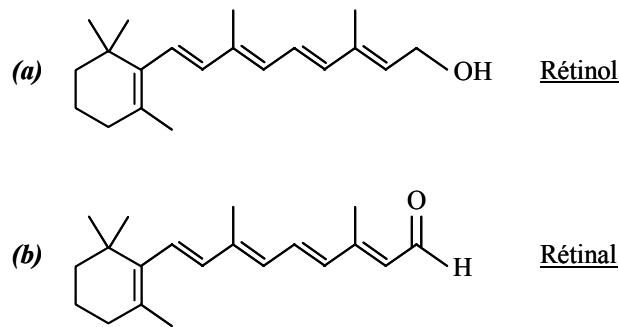


Figure I-26 : Structures du rétinol et du rétinal.

3-1. Fonction biologique de l'acide rétinoïque

L'acide rétinoïque intervient dans de nombreux processus de transcriptions géniques au cours desquels il module la synthèse de diverses protéines.

3-1-1. Rappel sur la synthèse et la structure des protéines

Synthèse des protéines

Les protéines sont les principaux constituants des cellules ; elles représentent plus de 50% de leur masse sèche totale. Leur synthèse est donc fondamentale à l'entretien, la croissance et le développement des cellules. Elle est le résultat d'une collaboration entre différentes molécules dérivées de l'ADN et nécessite plusieurs étapes préalables. La molécule d'ADN est tout d'abord copiée en une molécule d'ARN au niveau de la zone codant pour la protéine ; c'est la phase de transcription. L'enzyme permettant cette transcription est l'ARN polymérase. La molécule d'ARN est ensuite débarrassée de ses séquences non codantes et devient une molécule d'ARN messenger (ARNm) ; c'est la phase de maturation. L'ARNm passe alors dans le cytoplasme où l'information qu'elle

contient est décodée au niveau des ribosomes ; c'est la phase de traduction, qui aboutit à la formation de la protéine (figure I-27).

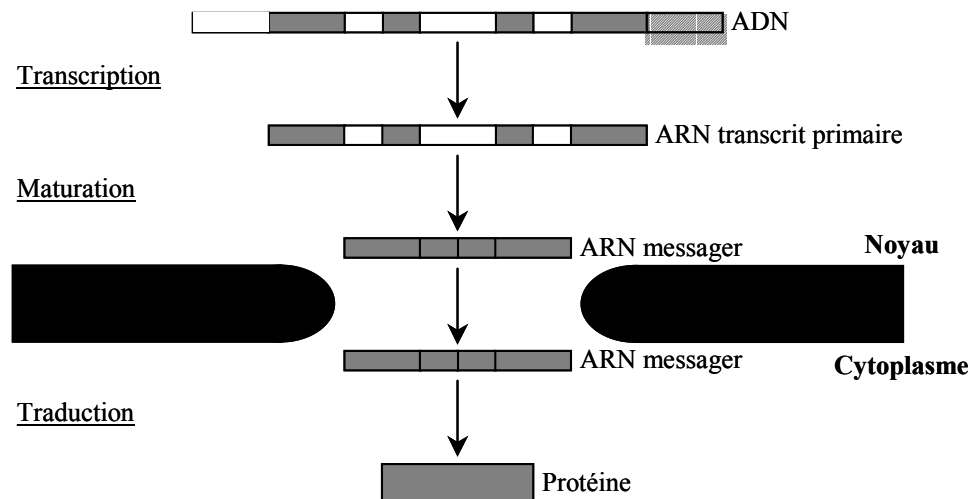


Figure I-27 : Différentes étapes conduisant à la synthèse d'une protéine.

Structure des protéines

Les protéines possèdent une structure à plusieurs niveaux d'organisation (figure I-28). Cette structure très particulière leur permet de remplir des fonctions bien spécifiques. Les protéines sont constituées d'un enchaînement d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons covalentes (liaisons peptidiques et liaisons disulfides). L'ordre de cet enchaînement détermine la structure primaire d'une protéine. Certains segments de cette structure primaire peuvent se replier sur eux-mêmes sous l'effet de liaisons hydrogène pour former des motifs particuliers. Ces motifs, qui présentent généralement une structure hélicoïdale (hélices α) ou une structure en feuillets (feuillets β), constituent la structure secondaire des protéines. Les hélices α et les feuillets β sont reliés les uns aux autres par des chaînes de la structure primaire, ce qui leur confèrent une grande mobilité ; ils s'organisent dans l'espace sous l'effet de liaisons non covalentes (liaisons hydrogène, forces hydrophobes, forces électrostatiques, *etc.*) pour former la structure tertiaire des protéines. Les protéines peuvent également présenter une structure quaternaire, qui consiste en un regroupement de motifs de la structure tertiaire. Les liaisons de la structure quaternaire sont les mêmes que celles de la structure tertiaire.

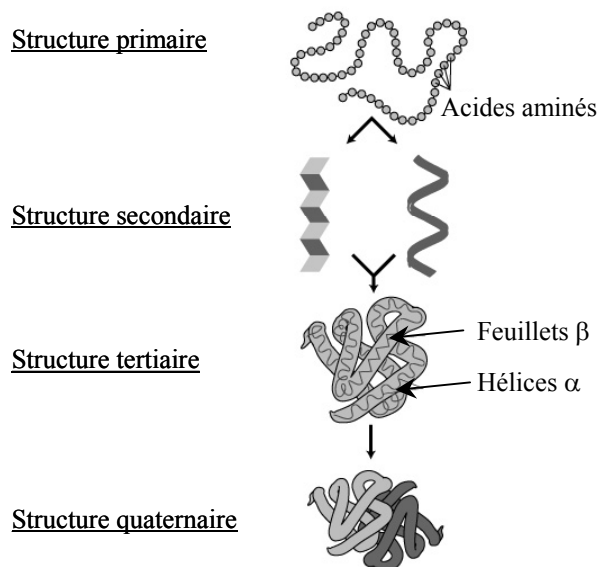


Figure I-28 : Structure des protéines.

D'après : <http://www.accessexcellence.org/AB/GG/>

3-1-2. Mode d'action de l'acide rétinoïque

Les rétinoïdes sont fournis à l'organisme sous la forme d'esters de rétinol par des aliments d'origine animale (jaunes d'oeufs, graisses animales, foies, *etc.*) ou sous la forme de caroténoïdes par des aliments d'origine végétale (carotte, persil, abricot, *etc.*). Les esters de rétinol et les caroténoïdes sont ensuite hydrolysés en rétinol dans les entérocytes (cellules de l'intestin) puis le rétinol est stocké dans les cellules stellaires hépatiques (cellules du foie). Le rétinol est libéré dans le plasma sanguin sous la forme d'un complexe qu'il forme avec une protéine : la RBP (retinol binding protein). Le complexe binaire rétinol-RBP se lie lui-même à une protéine de transport : la transthyrétine (TTR) ; la fixation du rétinol à la RBP est nécessaire à la formation du complexe ternaire rétinol-RBP-TTR. Le complexe rétinol-RBP-TTR est ensuite acheminé jusqu'aux cellules des tissus cibles, où le rétinol est oxydé en acide rétinoïque. Dans les cellules, l'acide rétinoïque se fixe sur une protéine de transport cytoplasmique appelée CRABP (cytoplasmic retinoic acid binding protein) qui lui permet de diffuser jusque dans le noyau. Dans le noyau, l'acide rétinoïque se lie à l'un de ses récepteurs nucléaires, appelés RAR et RXR (pour retinoic acid receptor et retinoid X receptor) puis les couples acide rétinoïque-récepteur s'associent deux par

deux pour former des homodimères ou des hétérodimères. Ces dimères se fixent alors sur une région particulière de l'ADN appelée RARE (retinoic acid response elements), où ils vont initier la transcription de gènes codant pour certaines protéines. Le rôle des complexes acide rétinoïque-récepteur est de participer à la fixation de l'ARN polymérase sur la région de l'ADN contenant le code génétique de la protéine à exprimer et d'interagir avec divers co-facteurs permettant d'activer la transcription.

3-2. Les récepteurs de l'acide rétinoïque

Les récepteurs de l'acide rétinoïque ne peuvent initier la transcription d'un gène donné que lorsqu'ils sont liés à leur hormone (ou ligand). Ils appartiennent à la famille des facteurs de transcription hormone-dépendants (ou ligand-dépendants), qui comporte également, entre autres, les récepteurs de la vitamine D, les récepteurs des hormones stéroïdes (androgènes, oestrogènes) ou encore les récepteurs des hormones thyroïdiennes. En l'absence d'hormone, ces récepteurs sont souvent liés à des co-facteurs inhibiteurs de la transcription, ce qui a pour conséquence de bloquer l'expression des gènes cibles de l'hormone. En revanche, en présence d'hormone, la liaison hormone-récepteur induit un changement de conformation du récepteur (chapitre I-3-2-3) qui empêche toute liaison à des co-facteurs inhibiteurs au profit de liaisons à des co-facteurs activateurs ; le gène cible de l'hormone peut alors être exprimé (Germain, 2002). L'acide rétinoïque est capable d'exprimer une grande variété de gènes. Cette diversité dans l'activité génique de l'acide rétinoïque s'explique essentiellement par l'existence de différents types de récepteurs et de différents rétinoïdes naturels capables de se lier à ces récepteurs (Chambon, 1996). Une autre source de diversité est liée à la capacité qu'ont les récepteurs à former des oligomères et aux différentes formes d'interactions pouvant exister entre ces oligomères et la région de l'ADN codant pour la protéine à exprimer.

3-2-1. Différents types de récepteurs

Il existe deux familles de récepteurs de l'acide rétinoïque : la famille des RAR (retinoic acid receptors) et la famille des RXR (retinoid X receptors). Chaque famille de

récepteurs comporte trois types (ou isotypes) α , β et γ qui peuvent eux-mêmes exister sous différentes formes (ou isoformes) ; les récepteurs sont donc notés : RAR α 1, RAR α 2, *etc.* Les RAR possèdent deux ligands naturels : l'acide rétinoïque tout-trans et l'acide rétinoïque 9-cis (figure I-29) alors que les RXR possèdent pour unique ligand naturel l'acide rétinoïque 9-cis.

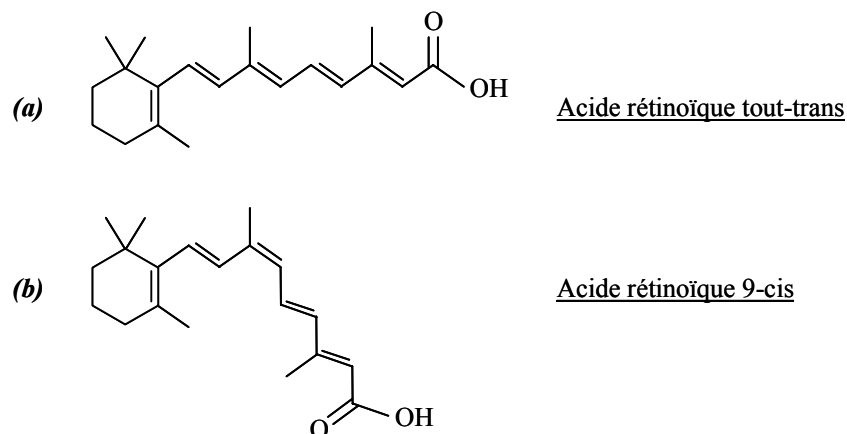


Figure I-29 : Ligands naturels des récepteurs des rétinoïdes.

Les récepteurs des rétinoïdes possèdent, comme tous les récepteurs nucléaires, une structure organisée en différents domaines, chaque domaine étant associé à une fonction particulière. Ces domaines sont repérés par les lettres A à F allant de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale de la protéine. La structure des RAR comporte six domaines distincts alors que celle des RXR n'en comporte que cinq (figure I-30). Le domaine A/B situé dans la région N-terminale du récepteur possède une fonction d'activation de la transcription qui est indépendante du ligand et que l'on note AF-1. Le domaine central C est le domaine de liaison du récepteur à la région RARE de l'ADN ; il est noté DBD (DNA binding domain). La fixation du récepteur à l'ADN est assurée par une structure en "doigts de zinc" de la surface du DBD (sorte de pincement sur la chaîne du DBD) qui lui permet de venir s'incruster dans les sillons créés par les hélices de l'ADN (Rastinejad, 2000). Cette région possède également une petite surface de dimérisation. Le domaine D est essentiellement un domaine charnière entre le DBD et le domaine suivant dont la longueur dépend fortement de la nature de la région RARE de l'ADN ; il confère aux récepteurs une grande flexibilité leur permettant de se lier à des

sandwich entre les hélices H1 et H3 d'une part et les hélices H6, H7, H10 et H11 d'autre part (figure I-31a). Notons que l'hélice H2 n'est présente que chez les récepteurs RXR. La liaison du ligand au récepteur induit un compactage général de la structure en "sandwich d'hélices α ". Mais le changement le plus frappant se situe au niveau de l'hélice H12 qui est dirigée vers le solvant dans la forme non liée (apo) et qui est complètement repliée contre le LBD dans la forme liée (holo) (figure I-31b). Un mécanisme de "piège à souris" a été proposé afin de décrire le processus de liaison du ligand au LBD (Wurtz, 1996 – Egea, 2000). Lorsque l'hélice H12 pointe vers l'extérieur du LBD, le ligand pénètre dans le récepteur et vient se loger au coeur de celui-ci, qui constitue une poche hydrophobe (LPB pour "ligand binding pocket"). Son arrivée oblige l'hélice H11 à se décaler pour venir s'aligner avec H10. L'hélice H12 bascule alors sous H4 et agit comme un couvercle sur la cavité hydrophobe. En pivotant, l'hélice H3 pousse finalement le ligand au fond de la cavité et contribue à l'équilibre dynamique de la liaison. Cette modification dans la structure du LBD a permis d'apporter de nouvelles informations concernant le mécanisme d'activation des transcriptions ligand-dépendantes. En effet, le changement de conformation du LBD entraînerait la disparition du site de liaison des co-facteurs inhibiteurs et la création d'une nouvelle surface, contenant l'hélice H12, permettant la liaison des co-facteurs activateurs (Bourguet, 2000a – Germain, 2002).

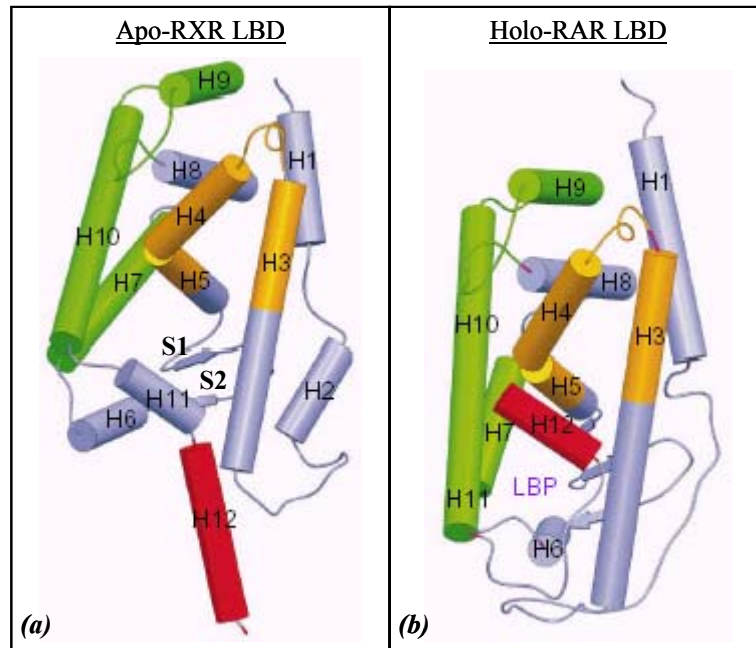


Figure I-31 : Structure du domaine de liaison au ligand du récepteur RXR dans l'état non lié (a) et du récepteur RAR lorsqu'il est lié à son ligand (b). Les hélices α sont représentées par des cylindres, les feuillets β par des flèches et les chaînes d'acides aminés par des fils. La poche dans laquelle vient se loger le ligand est notée LBP. D'après (Bourguet, 2000a).

3-2-3. Oligomérisation des récepteurs

Les récepteurs de l'acide rétinoïque possèdent la faculté de s'associer pour former des homodimères (RAR-RAR et RXR-RXR) ou des hétérodimères (RAR-RXR). Etant donné le nombre important de récepteurs différents, ceci amène un niveau de complexité supplémentaire dans le mode d'action de l'acide rétinoïque. La surface de dimérisation des récepteurs est constituée essentiellement des hélices H9 et H10 ; les hélices H7 et H8 interviennent également mais dans une moindre mesure (figure I-32 – Bourguet, 2000b).

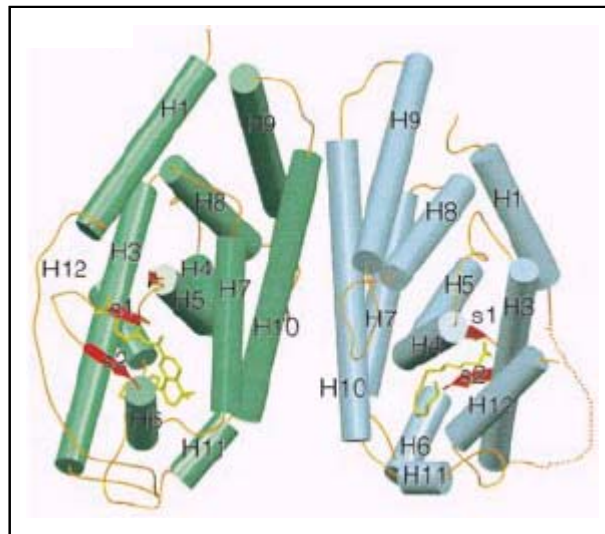


Figure I-32 : Structure de l'hétérodimère RAR-RXR au niveau du domaine de liaison au ligand.

Le récepteur RAR est dessiné en vert, le récepteur RXR en bleu et les ligands en jaune.

D'après (Bourguet, 2000b).

La capacité des récepteurs à s'associer en dimères a pour conséquence d'augmenter l'affinité et la spécificité de leur liaison à la région RARE de l'ADN. La tendance est encore plus marquée lorsque les récepteurs s'associent pour former des hétérodimères (Leid, 1992b – Venepally, 1997). Il semblerait d'ailleurs que les complexes RAR-RXR soient des facteurs de transcription privilégiés lors du contrôle de l'expression génique par l'acide rétinoïque (Minucci, 1997 – Kastner, 1997). Les récepteurs de la famille des RXR ont de plus la capacité à former des tetramères (Kersten, 1995a) dont l'affinité pour la région RARE de l'ADN est encore plus grande que celle des dimères (Kersten, 1997). L'état d'oligomérisation des récepteurs n'est pas le même selon qu'ils sont liés ou non à leur ligand ou aux éléments de réponse de l'ADN (Chen, 1998). Ainsi il a été montré par exemple que les tetramères de RXR se décomposaient en espèces plus petites (dimères ou monomères) suite à l'accrochage d'un ligand (Kersten, 1995b). Ceci, bien sûr, apporte encore une source de diversité dans le mode de signalisation des rétinoïdes.

3-2-4. Ligands synthétiques des récepteurs

Devant l'importance et la diversité des modes d'action de l'acide rétinoïque, de nombreuses recherches ont été entreprises dans le but de découvrir des ligands synthétiques plus spécifiques d'un type de récepteur particulier. L'objectif était de développer des composés pharmaceutiques plus efficaces et présentant moins d'effets secondaires. A l'heure actuelle, plusieurs centaines de ligands ont ainsi été synthétisés. Les principaux ligands synthétiques des RAR sont ceux de la série des arotinoïdes (figure I-33a, Loeliger, 1980) et ceux de la série des acides rétinoïques (figure I-33b – Kagechika, 1988). Des ligands spécifiques à chaque isotype de récepteur RAR (α , β ou γ) ont pu être synthétisés. Certains se sont révélés être très efficaces dans le traitement de maladies dermatologiques comme le psoriasis (Chandraratna, 1997) et d'autres sont aujourd'hui utilisés pour leurs effets anti-prolifératifs dans le traitement de certains cancers (Zhang, 1996). La découverte des premiers ligands synthétiques spécifiques des RXR (SR 11237 et SR 11217) a eu lieu un peu plus tard (Lehmann, 1992 – figure I-34a). De nombreux dérivés, pour la plupart spécifiques des RXR α et répondant à la formule générale donnée dans la figure I-34b, ont ensuite rapidement été découverts (Dawson, 1996). Certains ligands synthétiques des RXR semblent exercer un effet hypoglycémiant qui pourrait être utilisé dans le traitement du diabète (Nagpal, 2000).

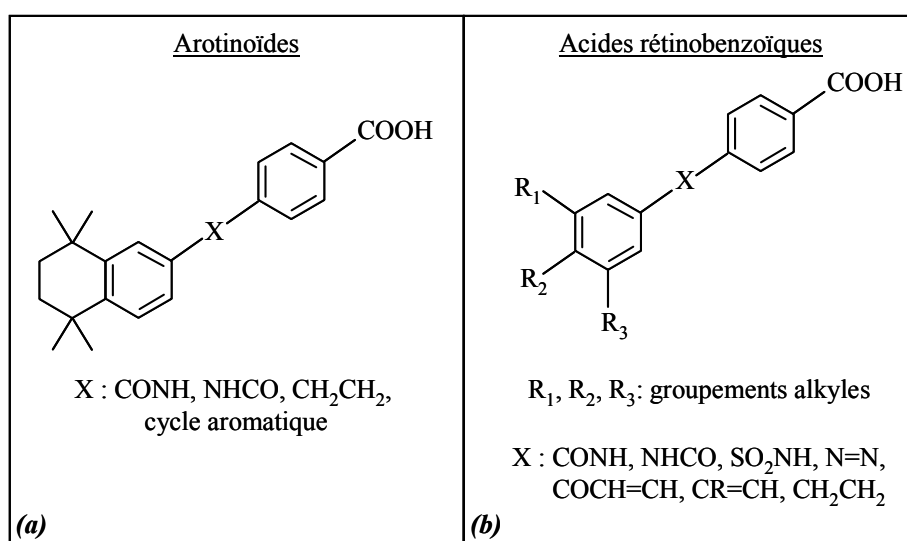


Figure I-33 : Exemples de ligands synthétiques spécifiques des récepteurs RAR.

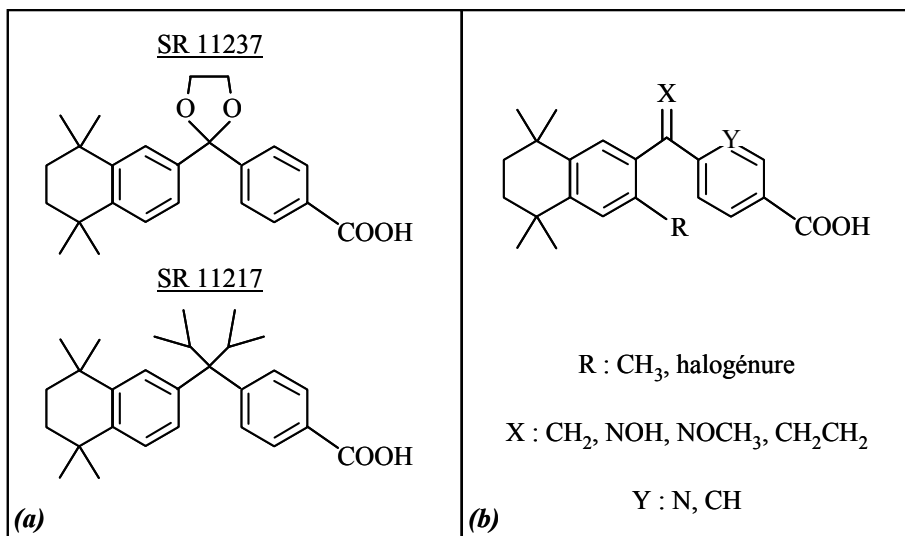


Figure I-34 : Exemples de ligands synthétiques spécifiques des récepteurs RXR.

Chapitre II : Dispositifs Expérimentaux

1. La balance de Langmuir

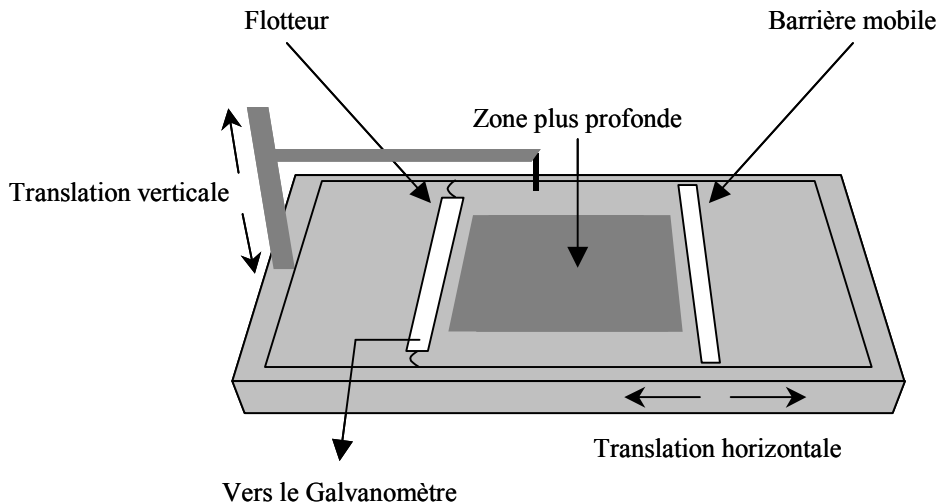


Figure II-1 : Représentation schématique de la balance de Langmuir du laboratoire.

La balance de Langmuir dont nous disposons au laboratoire est constituée d'une cuve de longueur $L = 25$ cm et de largeur $l = 15$ cm entièrement recouverte de téflon (figure II-1). Le flotteur, lui aussi en téflon, isole l'une de l'autre les deux interfaces eau-air sans monocouche et eau-air avec monocouche. La force horizontale $F = \pi l$ (chapitre I-1-2) exercée par la monocouche sur le flotteur est transmise à un galvanomètre par l'intermédiaire d'une aiguille mobile dans le plan vertical (Perez, 1994). Le galvanomètre envoie alors un courant I qui permet de compenser exactement la force exercée par la monocouche et qui replace ainsi l'aiguille dans sa position initiale. La valeur de I donne, après calibration, la pression de surface de la monocouche. L'intensité I_0 correspondant au zéro de pression est obtenue par une mesure en l'absence de monocouche. Une barrière mobile dans le plan horizontal permet de faire varier l'aire accessible à la monocouche ; sa position x est repérée par un codeur optique et peut être lue également directement à l'aide d'une règle graduée. La pression de surface de la monocouche et l'aire moléculaire des molécules amphiphiles sont calculées à partir des relations :

$$\left\{ \begin{array}{l} \pi = (I - I_0) \times 0,87 \quad (a) \\ \sigma = \frac{(x \times 1) \times 10^{-14}}{N_{\text{molécules}}} \quad (b) \end{array} \right. \quad (\text{II-1})$$

Où : $N_{\text{molécules}}$ est le nombre de molécules amphiphiles déposées à la surface de la cuve et où π est exprimée en mN/m, I et I_0 en mA, σ en nm^2 et x en cm.

L'équation (II-1a) qui relie la pression de surface à l'intensité est obtenue à l'aide d'une calibration réalisée à partir de masselottes de masses connues. Un système de translation verticale permet à des substrats de traverser l'interface eau-air et donc de fixer une ou plusieurs monocouches (chapitre I-1-3). Un PC pilote les deux systèmes de translation et collecte l'ensemble des données relatives à la position de la barrière et à l'intensité envoyée par le galvanomètre. Un cycle de mesures isothermes consiste à comprimer puis à décompresser une monocouche ; le système dont nous disposons au laboratoire ne permet de mesurer la pression de surface que lors de la phase de compression de la monocouche.

2. L'appareil de mesure de forces entre surfaces (SFA)

L'appareil de mesure de forces entre surfaces (SFA) que nous avons utilisé (figure II-2) est une reproduction de l'appareil "Mark II" développé en 1978 par Jacob Israelachvili (Israelachvili, 1978). Cet appareil permet de mesurer la force entre deux surfaces moléculairement planes en fonction de la distance qui les sépare ; les mesures peuvent être réalisées en milieu liquide ou dans l'air. La force est obtenue avec une précision de $0,1 \mu\text{N}$ et la distance avec une précision de $0,01 \text{ nm}$. Le SFA permet également de mesurer l'indice de réfraction du milieu dans lequel les surfaces sont plongées ainsi que la déformation des surfaces résultant de leur adhésion. Son utilisation a permis de vérifier expérimentalement des théories comme celles concernant l'interaction électrostatique double-couche ou l'interaction de van der Waals et a permis de donner de nouvelles informations sur des interactions moins connues comme les interactions hydrophobes ou les interactions spécifiques. Nous allons maintenant présenter les principaux éléments de l'expérience, à savoir : les surfaces d'étude, le système de déplacement des surfaces et les systèmes de mesure de la distance et de la force.

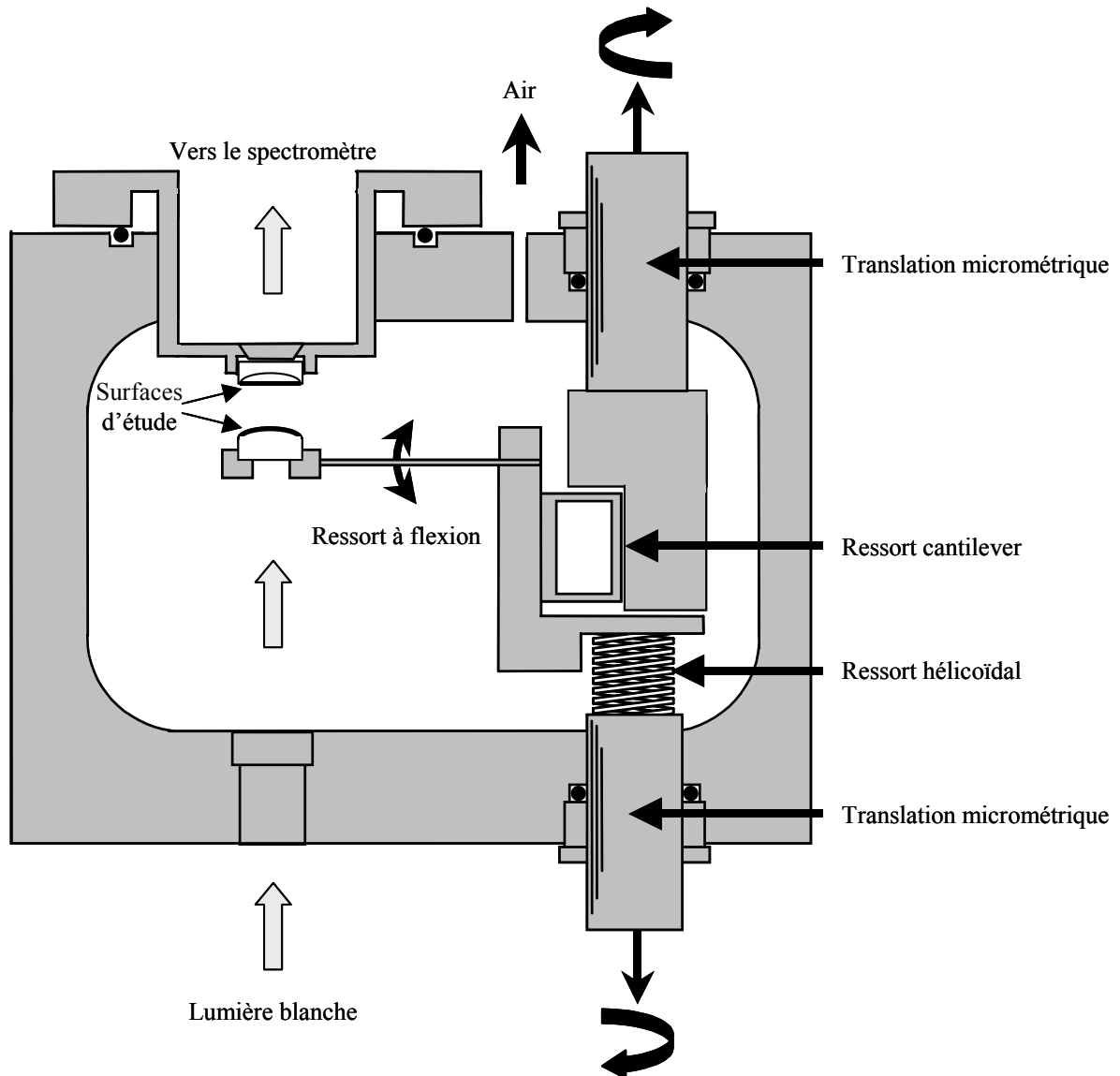


Figure II-2 : Représentation schématique de l'appareil de mesure de forces entre surfaces (SFA).

2-1. Les surfaces d'étude

Dans les expériences SFA, les molécules dont on veut étudier l'énergie d'interaction sont incorporées dans des structures en bicouches, qui sont déposées par la technique de Langmuir-Blodgett (chapitre I-1-3) sur des surfaces de mica. On utilise du mica parce qu'il est possible d'en obtenir, par clivage, des feuilles moléculairement planes de quelques centimètres carrés ayant seulement quelques micromètres d'épaisseur. Le mica ayant une surface de haute énergie, la phase de clivage est réalisée sous une hotte à flux

laminaire afin d'éviter toute contamination de sa surface par les poussières. On part d'une feuille d'environ 1 mm d'épaisseur que l'on sépare en feuillets de plus en plus fins à l'aide d'une aiguille propre, jusqu'à obtenir l'épaisseur désirée. Par réflexion de la lumière sur la surface du mica, on peut distinguer les zones où l'épaisseur est constante : elles correspondent aux plages sur lesquelles la couleur est homogène. On découpe alors sur cette surface plusieurs petits bouts d'environ $0,5 \text{ cm}^2$ à l'aide d'un fil de platine chauffé à blanc. Les petits bouts de mica sont alors déposés sur une grande plaque propre de mica à laquelle ils adhèrent grâce aux forces de van der Waals. La face des bouts de mica qui est collée contre la plaque est alors à l'abri de toute contamination. La plaque est ensuite argentée dans un évaporateur. Au début de chaque expérience, les micas argentés sont collés sur des lentilles de verre cylindriques, la face argentée étant plaquée contre la surface des lentilles. On dépose sur l'autre face une monocouche de DMPE (dimyristoyl-phosphatidyl-éthanolamine), dont la tête hydrophile a une forte affinité pour la surface du mica. Les lipides dont on veut étudier l'énergie d'interaction sont ensuite déposés sur les chaînes hydrophobes du lipide DMPE.

2-2. Le système de déplacement des surfaces

L'une des deux lentilles est fixée en haut de l'appareil ; sa position reste constante durant tout le déroulement des mesures. L'autre, solidaire d'un ressort à flexion, est fixée à l'extrémité d'un système de butée différentielle à ressort. Il s'agit de deux ressorts montés en série dont l'un a une constante de raideur mille fois plus grande que l'autre. Le ressort de faible raideur est un ressort hélicoïdal et le ressort de forte raideur un ressort cantilever. Une vis micrométrique mise en rotation par un moteur synchrone et dont la position est repérée à l'aide d'un codeur optique appuie sur le ressort hélicoïdal. Ainsi un déplacement de la vis de $1 \mu\text{m}$ génère un déplacement de la base du ressort à flexion de 1 nm . Ce système permet d'obtenir des déplacements de la lentille à l'échelle du nanomètre avec une très bonne précision. Une autre vis micrométrique reliée à un moteur pas à pas agit directement sur la position de la base du ressort à flexion et permet de réaliser des déplacements plus rapides mais moins précis. Ce

dernier système est utilisé au début et à la fin des expériences lorsque l'on a besoin de rapprocher et de séparer rapidement les surfaces l'une de l'autre.

2-3. Le principe de mesure de la distance

Le système formé par les deux micras argentés et le milieu dans lequel les mesures sont réalisées (milieu aqueux ou air) constitue un interféromètre de type Fabry-Perot (figure II-3). Si l'on envoie une lumière blanche perpendiculairement aux deux surfaces d'étude, elle subit de multiples réflexions sur les faces argentées des deux micras avant de ressortir de l'interféromètre. Les rayons réfléchis interfèrent les uns avec les autres et seules certaines longueurs d'onde de la lumière blanche incidente conduisent à des interférences constructives. La figure d'interférence à la sortie de l'interféromètre est constituée d'une série de franges, chaque frange correspondant à une longueur d'onde particulière.

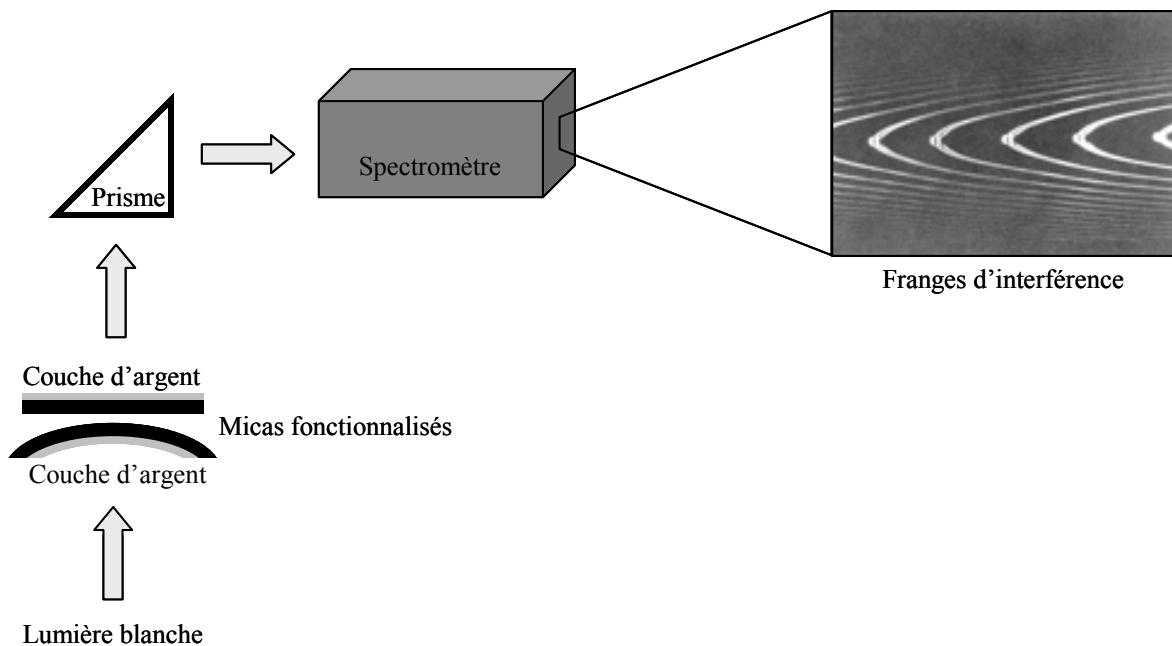


Figure II-3 : Interféromètre de type Fabry-Perot formé par les deux surfaces de mica argentées.

Les longueurs d'ondes sont caractérisées par leur ordre d'interférence n qui correspond au nombre d'extrema que présente le champ électromagnétique dans l'espace délimité

par les deux faces de mica argentées. Dans une expérience SFA, la figure d'interférence de référence est celle qui est obtenue lorsque les deux micas sont en contact ($D = 0$). Lorsque les surfaces sont séparées d'une distance D , chaque frange λ_n est décalée vers les grandes longueurs d'onde d'une valeur $\Delta\lambda_n$ par rapport à sa position au contact (figure II-4). Pour de petites distances de séparation ($D < 20$ nm), on a les relations (Israelachvili, 1973) :

$$D = \frac{n \Delta\lambda_n}{2\mu_1}, \quad (\text{II-2})$$

lorsque l'ordre d'interférence n de la frange λ_n est un nombre impair.

Et :

$$D = \frac{n \Delta\lambda_n \mu_1}{2\mu_3^2}, \quad (\text{II-3})$$

lorsque l'ordre d'interférence n de la frange λ_n est un nombre pair.

Où : μ_1 et μ_3 sont respectivement les indices de réfraction du mica et du milieu dans lequel les mesures sont réalisées. Les changements de longueur d'onde en fonction de la distance sont donc différents selon la parité de la frange. Le décalage des franges impaires est indépendant de l'indice de réfraction μ_3 du milieu entre les deux surfaces et permet d'obtenir directement la distance D , alors que le décalage des franges paires dépend de μ_3 . Les équations (II-2) et (II-3) permettent donc de connaître simultanément la distance entre les deux surfaces et l'indice du milieu dans lequel les mesures sont réalisées. Dans nos expériences, on utilise les relations exactes qui sont plus compliquées (Israelachvili, 1973).

Le spectre d'interférence peut être observé à l'oeil directement à la sortie du spectromètre à transformée de Fourier ; la position des franges est alors repérée à l'aide d'un réticule micrométrique. Pour un repérage plus précis de la position des franges, on a recouru à une caméra linéaire CCD. Le principe est de réaliser une coupe de la figure d'interférence à l'aide d'une barrette en silicium constituée de nombreux pixels sensibles à l'intensité lumineuse. La caméra est montée sur un système de translation permettant de couvrir la totalité du spectre d'interférence.

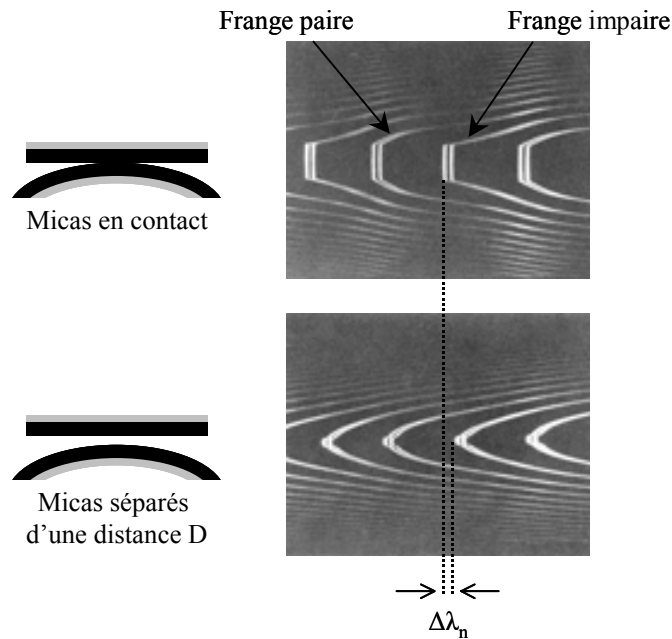


Figure II-4 : Principe de mesure de la distance en SFA. Lorsque les deux surfaces de mica sont séparées de la distance D , la figure d'interférence est modifiée. Le déplacement des franges d'interférence ($\Delta\lambda_n$) permet de remonter à la distance entre les deux micas.

2-4. Le principe de mesure de la force

Si aucune force ne s'exerce entre les deux surfaces d'étude (par exemple à longue distance), le déplacement de l'extrémité du ressort à flexion correspond à celui imposé par le moteur synchrone. Lorsque des forces apparaissent entre les deux surfaces et que celles-ci ont tendance à s'attirer ou à se repousser, il apparaît une déformation du ressort à flexion (figure II-5). La connaissance simultanée du déplacement imposé par le moteur synchrone (donné par le codeur optique) et du déplacement effectivement subi par la lentille (donné par interférométrie) permet de connaître la déflexion du ressort et donc la force qui s'exerce entre les deux surfaces. Selon le ressort utilisé, la précision sur la mesure de la force est plus ou moins grande. Il faut également prendre en compte les incertitudes liées à la dérive thermique. Pour un ressort de raideur 100 N/m, la précision sur la mesure de la force est estimée à 0,1 μN .

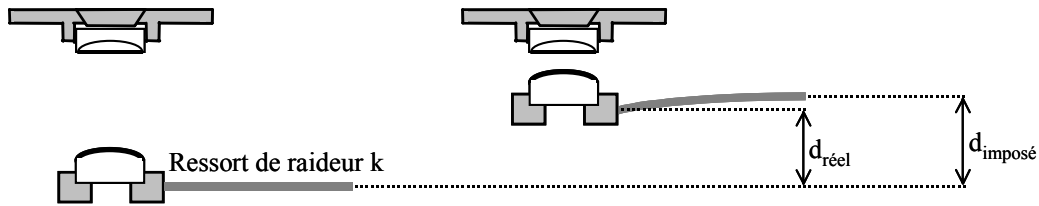


Figure II-5 : Principe de mesure de la force en SFA. Lorsqu'une force apparaît entre les deux surfaces (dans l'exemple de la figure, une force répulsive), le déplacement imposé à la base du ressort ($d_{\text{imposé}}$) diffère du déplacement réel des surfaces ($d_{\text{réel}}$). La force est donnée par l'équation :

$$F = k (d_{\text{imposé}} - d_{\text{réel}}).$$

2-5. Energie d'interaction et énergie d'adhésion entre les surfaces

Les mesures réalisées lors d'une expérience SFA nous donnent accès à la force F qui s'exerce entre deux cylindres croisés en fonction de la distance D qui les sépare. Afin de pouvoir comparer ces résultats à la théorie ou aux résultats obtenus par d'autres expériences, il est utile de connaître l'énergie d'interaction par unité de surface E correspondante pour deux plans séparés d'une distance D . Les deux cylindres ayant des rayons identiques, la géométrie est équivalente à une géométrie de type sphère-plan et l'approximation de Derjaguin (Derjaguin, 1934) permet d'écrire :

$$F(D) = 2\pi R E(D) \quad (\text{II-4})$$

Où : R est le rayon de courbure des surfaces.

Les résultats d'une expérience SFA sont généralement présentés en traçant le rapport F/R en fonction de D , c'est-à-dire l'énergie d'interaction entre deux plans, à un facteur multiplicatif près, en fonction de la distance qui les sépare.

Au cours d'une expérience SFA, les surfaces sont rapprochées l'une de l'autre jusqu'au contact (phase aller) puis elles sont séparées jusqu'à retrouver la distance de séparation initiale (phase retour). Si les deux surfaces n'adhèrent pas l'une à l'autre, la phase retour du profil de force se superpose exactement à la phase aller. En revanche, si une adhésion apparaît, la distance de séparation mesurée lors de la phase retour ne varie pratiquement pas tant que la force appliquée pour séparer les deux surfaces ne compense pas celles qui les lient l'une à l'autre. Lorsqu'une force suffisamment importante est appliquée, les surfaces se séparent brusquement et se retrouvent loin

l'une de l'autre ; on parle alors de saut adhésif. La force qu'il a fallu appliquer s'appelle la force de séparation ("pull off" force) et sera notée F_0 . Le saut adhésif est d'autant plus important que l'énergie d'adhésion entre les deux surfaces est grande.

Il existe deux théories permettant de relier l'énergie d'adhésion macroscopique E_0 entre deux surfaces à la force F_0 qu'il a fallu appliquer pour les séparer.

La première théorie, la théorie de Johnson, Kendal et Roberts (théorie JKR), considère que le phénomène d'adhésion génère une déformation des surfaces au niveau de la zone de contact et que cette zone de contact est plane juste avant la séparation (figure II-6a). Elle prévoit la relation (Johnson, 1971) :

$$F_0 = \frac{3\pi R E_0}{2} \quad (\text{II-5})$$

La deuxième théorie, la théorie de Derjaguin, Muller et Toporov (théorie DMT), considère que deux surfaces en contact adhésif sont indéformables et que la zone de contact est ponctuelle juste avant la séparation (figure II-6b). Elle propose la relation (Derjaguin, 1975) :

$$F_0 = 2\pi R E_0 \quad (\text{II-6})$$

Les deux théories ont pu être réconciliées en considérant que l'une ou l'autre pouvait être appliquée selon l'importance de la force de séparation mesurée entre les deux surfaces et selon leur déformabilité (Maugis, 1992). Dans le cas où l'énergie d'adhésion entre les deux surfaces est grande comparée à leur élasticité, elles se déforment et la zone de contact est plane ; on applique alors la théorie JKR. Dans le cas contraire, elles sont indéformables et la zone de contact est ponctuelle ; on applique alors la théorie DMT.

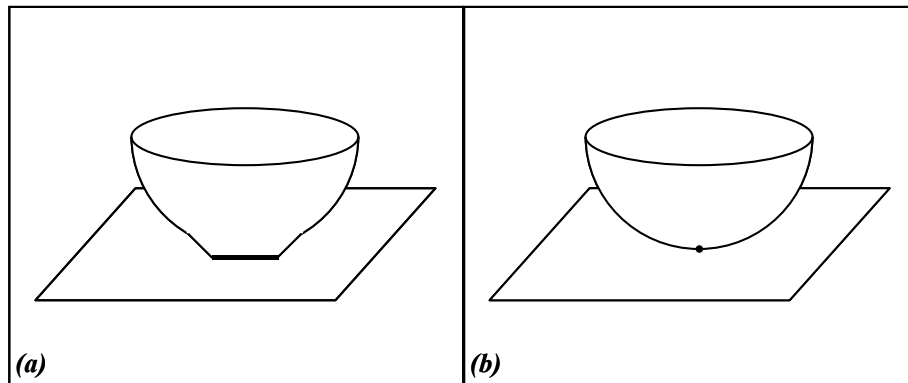


Figure II-6 : Géométrie de la zone de contact entre deux surfaces adhésives dans la géométrie sphère-plan selon la théorie JKR (a) ou selon la théorie DMT (b).

3. La technique des vésicules micromanipulées

La technique des vésicules micromanipulées a été mise au point en 1980 par Evan Evans (Evans¹, 1980 – Evans¹, 1984). Elle permet de mesurer l'énergie d'adhésion macroscopique entre deux bicouches lipidiques fonctionnalisées. L'expérience consiste à mettre en contact deux vésicules maintenues par aspiration dans des micropipettes et à observer la déformation qui résulte de leur adhésion (Evans¹, 1990). Cette technique permet de mesurer l'énergie d'adhésion par unité de surface entre deux bicouches avec une précision de l'ordre de $10 \mu\text{J}/\text{m}^2$. Son utilisation a permis, entre autres, d'évaluer expérimentalement la compétition, à courte distance, entre la répulsion électrostatique double-couche et l'attraction de van Der Waals (Evans¹, 1991) ou encore de vérifier les théories liées aux interactions d'Helfrich (Evans¹, 1992).

3-1. Préparation et observation des surfaces d'étude

Dans l'expérience des vésicules micromanipulées, les molécules dont on veut mesurer l'adhésion sont directement incorporées dans la membrane des vésicules. La méthode couramment utilisée au laboratoire consiste à faire croître les vésicules par hydratation d'un film lipidique sec. On commence par faire une solution chloroformique à 10 g/l constituée à 90% du lipide SOPC (stéaroyl-oléoyl-phosphatidyl-choline) et à 10% du lipide que l'on veut étudier. On dépose puis on étale, à l'aide d'une microseringue, 30

μl de cette solution sur une pastille en téflon d'environ 3 cm de diamètre. La pastille est ensuite déposée au fond d'un "bêcher" que l'on recouvre de Parafilm M[®] percé d'un trou. Le tout est mis dans une cloche à vide pendant 2 à 4 heures afin de sécher complètement le film lipidique (élimination du chloroforme et de l'eau). Le film lipidique est ensuite "pré-hydraté" pendant environ 20 minutes par passage dans le "bêcher" d'un flux d'argon chargé en eau (on fait passer ce flux dans une solution aqueuse avant de le diriger vers la pastille en téflon). Une solution de saccharose filtrée à $0,22 \mu\text{m}$ est alors versée délicatement sur la pastille recouverte du film lipidique. Le "bêcher" est ensuite complètement recouvert de Parafilm M[®] puis il est placé dans une étuve à 34°C pendant toute la nuit. Le lendemain matin, on obtient un nuage blanc en forme d'anneau dans la solution de saccharose : ce sont les vésicules. La méthode permet d'obtenir, avec un bon rendement, des vésicules géantes unilamellaires (GUV) dont on connaît bien les propriétés mécaniques (ce sont celles des vésicules de SOPC). Les vésicules sont ensuite transférées dans la chambre d'observation d'un microscope. Cette chambre est constituée de deux lamelles de verre entre lesquelles on a injecté d'une solution de glucose. La membrane des vésicules étant imperméable aux molécules de soluté, l'intérieur des vésicules reste rempli de la solution de saccharose. La différence d'indice de réfraction entre l'intérieur et l'extérieur des vésicules rend alors possible leur observation par microscopie à contraste interférentiel. De plus, le glucose étant moins dense que le saccharose, les vésicules sédimentent au fond de la chambre d'observation et sont ainsi plus accessibles à l'expérimentateur. On vient alors les chercher à l'aide de micropipettes en verre ayant un diamètre de l'ordre de $5 \mu\text{m}$ puis on les transfère vers une deuxième chambre d'observation. Cette chambre est remplie de la solution aqueuse dans laquelle on souhaite réaliser nos mesures (en général une solution saline). La solution de glucose et la solution dans laquelle les mesures sont effectuées ont des osmolarités supérieures à celle de la solution de saccharose. Les vésicules sont donc rendues flasques par effet osmotique, ce qui facilite leur manipulation par les micropipettes et évite leur destruction par choc osmotique.

3-2. Mesure de l'énergie d'adhésion entre deux vésicules micromanipulées

Les deux vésicules que l'on a transférées dans la deuxième chambre d'observation sont mises en face l'une de l'autre et sont maintenues par aspiration dans les micropipettes. L'une des deux vésicules est soumise à une faible pression d'aspiration et reste flasque ; l'autre est tendue par l'application d'une forte pression d'aspiration. Les deux vésicules sont alors rapprochées l'une de l'autre jusqu'au contact. Dans le cas où une adhésion apparaît entre les bicouches, la vésicule flasque ressort un peu de sa micropipette et vient épouser le contour de la vésicule tendue (figure II-7). La connaissance simultanée des paramètres géométriques associés à cette déformation et de la pression d'aspiration de la vésicule flasque permet de déduire l'énergie d'adhésion par unité de surface entre les deux bicouches. La déformation associée au phénomène d'adhésion est d'autant plus importante que la vésicule flasque est faiblement aspirée. L'expérience consiste donc à prendre des photos du phénomène pour différentes valeurs de la pression d'aspiration de la vésicule flasque.

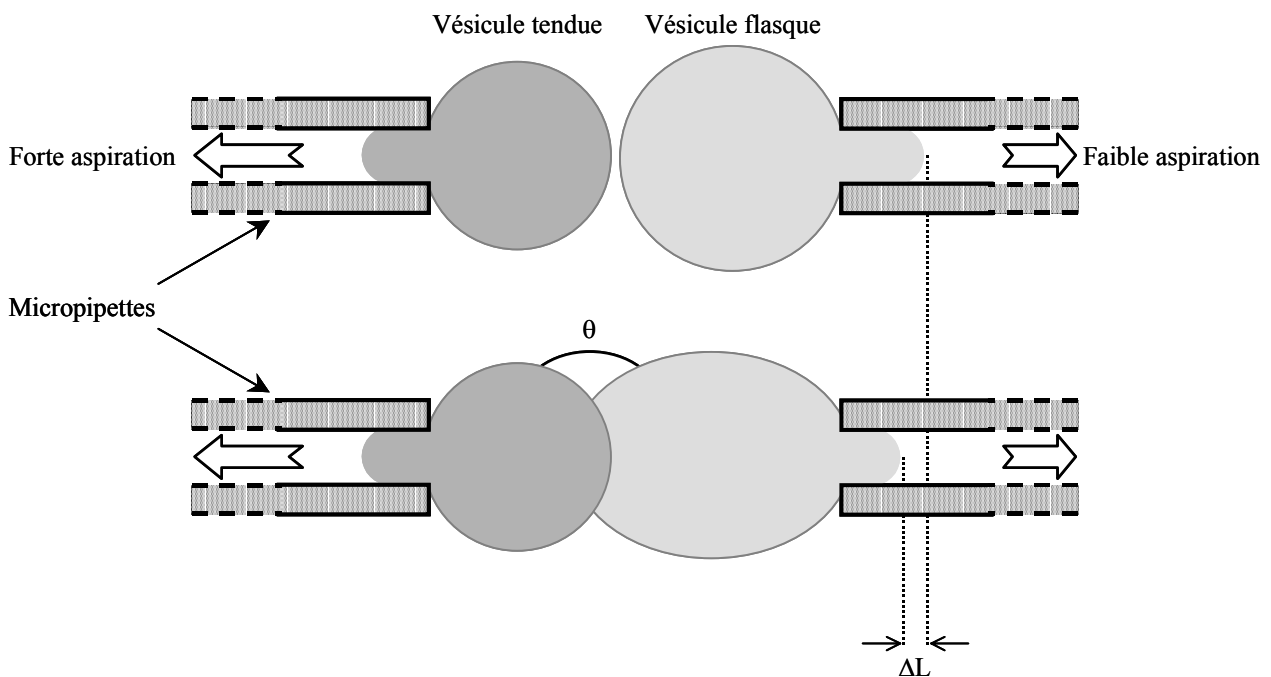


Figure II-7 : Principe de la mesure de l'énergie d'adhésion entre deux vésicules micromanipulées.

L'énergie d'adhésion par unité de surface entre les deux vésicules correspond au travail qu'il faut fournir pour détacher deux portions de surface des bicouches d'aire unité. Ce travail est donné par l'équation de Dupré (figure II-8) :

$$W = -\gamma_{tf} + \gamma_t + \gamma_f \quad (\text{II-7})$$

Où : γ_{tf} est la tension de surface de l'interface entre les deux vésicules et où γ_t et γ_f sont respectivement les tensions de surface de la vésicule tendue et de la vésicule flasque.

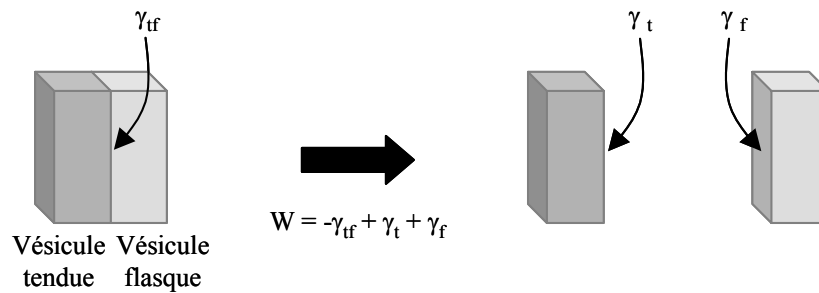


Figure II-8 : Equation de Dupré. Lorsqu'une portion d'aire unité de la vésicule flasque se sépare d'une portion d'aire unité de la vésicule tendue, on perd l'énergie γ_{tf} et on gagne les deux énergies γ_t et γ_f . Le travail fourni W correspond à l'énergie d'adhésion par unité de surface entre les deux vésicules.

La relation d'équilibre mécanique de la vésicule flasque sur la vésicule tendue est d'autre part donnée par l'équation de Young (figure II-9) :

$$\gamma_{tf} - \gamma_t - \gamma_f \cos\theta = 0 \quad (\text{II-8})$$

Où : θ est l'angle de contact entre les deux vésicules.

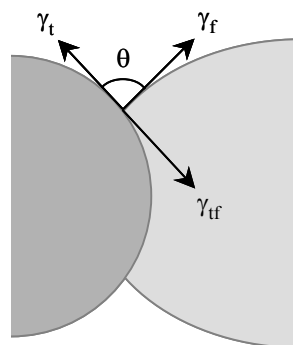


Figure II-9 : Equilibre mécanique de la vésicule flasque sur la vésicule tendue.

On en déduit que l'énergie d'adhésion par unité de surface E_0 entre les deux vésicules vaut :

$$E_0 = \gamma_f (1 - \cos\theta) \quad (\text{II-9})$$

A l'équilibre, la tension γ_f de la vésicule flasque est uniforme et peut être reliée à sa pression d'aspiration dans la micropipette (figure II-10).

La relation d'équilibre mécanique de la partie de la membrane de la vésicule flasque se trouvant à l'extérieur de la micropipette est donnée par l'équation de Laplace :

$$P_i - P_e = 2\gamma_f c \quad (\text{II-10})$$

Où : P_i et P_e sont les pressions à l'intérieur et à l'extérieur de la vésicule flasque et c est la courbure moyenne de la vésicule flasque.

La relation d'équilibre mécanique de la partie de la membrane de la vésicule flasque se trouvant à l'intérieur de la micropipette s'écrit quant à elle :

$$P_i - P_p = \frac{2\gamma_f}{R} \quad (\text{II-11})$$

Où : P_p est la pression à l'intérieur de la micropipette et R est le rayon de la micropipette.

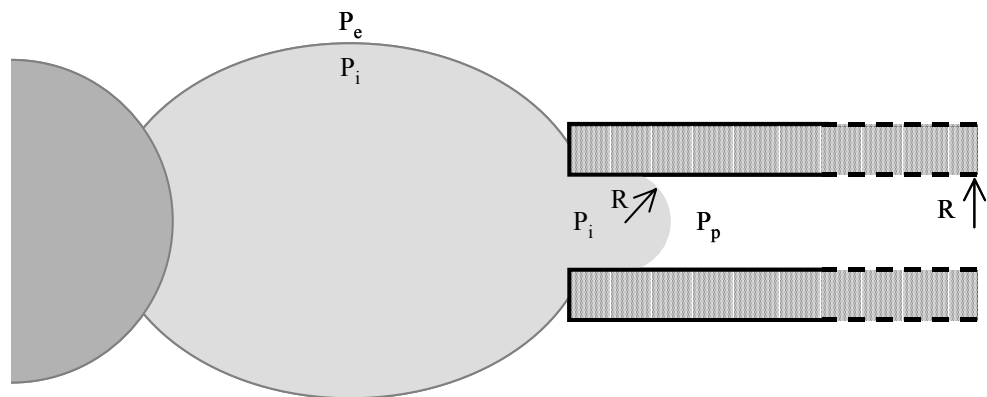


Figure II-10 : Application de la loi de Laplace à la vésicule flasque à l'extérieur et à l'intérieur de la micropipette.

On en déduit la relation entre la tension de la membrane de la vésicule flasque γ_f et sa pression d'aspiration dans la micropipette $\Delta P = P_e - P_p$:

$$\gamma_f = \frac{R}{2(1 - Rc)} \Delta P \quad (\text{II-12})$$

On a donc :

$$E_0 = \frac{(1 - \cos\theta)R}{2(1 - Rc)} \Delta P \quad (\text{II-13})$$

Afin de mesurer l'énergie d'adhésion E_0 , il faut donc connaître la courbure moyenne c de la vésicule flasque et l'angle de contact θ entre les deux vésicules. Il est très délicat de déterminer ces deux paramètres à partir des différentes photos prises au cours de l'expérience. Un calcul partant de l'hypothèse que la courbure, l'aire et le volume de la vésicule flasque sont conservés durant tout le déroulement de l'expérience permet de connaître c et θ à partir du seul déplacement ΔL de la vésicule flasque dans la micropipette (Evans¹, 1980).

Au début de chaque expérience on réalise une photo du système lorsque les deux vésicules sont éloignées l'une de l'autre. Ceci permet de repérer la position de la vésicule flasque dans la micropipette en l'absence d'adhésion et de déterminer ses caractéristiques géométriques (aire et volume). Les deux vésicules sont ensuite mises en contact et plusieurs photos du phénomène d'adhésion sont réalisées pour différentes valeurs de la pression d'aspiration. Les résultats sont présentés en traçant la pression d'aspiration dans la micropipette ΔP en fonction du facteur géométrique G défini par :

$$G = \frac{2(1 - Rc)}{(1 - \cos\theta)R} \quad (\text{II-14})$$

On obtient alors une droite dont la pente correspond à l'énergie d'adhésion par unité de surface E_0 entre les deux vésicules.

4. Les outils moléculaires

Afin de coupler les groupes fonctionnels à étudier aux surfaces d'étude des techniques expérimentales (SFA et technique des vésicules micromanipulées), on a recouru à des outils moléculaires bien spécifiques. Ces outils permettent non seulement d'incorporer les groupes fonctionnels dans des bicouches lipidiques mais également d'assurer leur mobilité au sein de ces bicouches et leur accessibilité en solution aqueuse. Les récents progrès réalisés dans les domaines de la synthèse bio-organique et de la biologie moléculaire ont d'ores et déjà permis de concevoir de tels outils moléculaires avec une extraordinaire diversité (Schmitt, 1994 – Held, 1997 – Venien-Bryan, 1997 – Lebeau, 2001).

4-1. Les lipides NTA et NTA-Ni

(C. Mioskowski, L. Lebeau et F. Balavoine – Laboratoire de Synthèse Bio-Organique, Faculté de Pharmacie, Illkirch et Service des Molécules Marquées, CEA, Saclay)

Le lipide NTA

L'acide nitrilotriacétique (NTA) comporte trois groupes carboxyle (COOH) qui sont capables de former des liaisons hydrogène dans l'eau pure. Un lipide dont la tête hydrophile est constituée d'un groupement NTA a été synthétisé dans le but de mesurer l'énergie associée à ces liaisons (chapitre III). Nous l'appellerons lipide NTA (2-(bis-carboxyméthyl-amino)-6-[2-(1,3-di-*O*-oleyl-glyceroxy)-acétyl-amino] hexanoïc acid) (figure II-11).

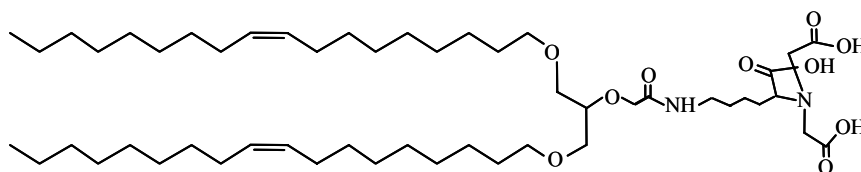


Figure II-11 : Structure du lipide NTA.

Afin d'assurer la stabilité de la monocouche lipidique à l'interface eau-air ou sur les chaînes du lipide DMPE, il est nécessaire que la partie hydrophile du lipide ne soit pas trop grosse par rapport à sa partie hydrophobe. En utilisant une partie hydrophobe constituée de deux chaînes hydrocarbonées, on écarte tout risque d'agrégation des lipides sous la forme de micelles au profit d'une organisation en bicouches et on assure une bonne cohésion aux couches formées.

Il est également important que les lipides soient libres de diffuser au sein de leur monocouche afin qu'ils puissent "choisir" la position qui leur permettra d'interagir de façon optimale avec les lipides de l'autre monocouche. Cette liberté de translation à l'intérieur de la monocouche est obtenue lorsque le lipide (ou plus exactement sa partie hydrophobe) est en phase fluide. La température de transition gel-liquide, en dessous de

laquelle un lipide cesse d'être en phase fluide, peut être considérablement diminuée par la présence d'insaturations dans les chaînes hydrocarbonées. En effet les insaturations fixent certaines orientations et perturbent l'organisation des chaînes en structures très compactes. Par exemple, le DSPC (distéaroyl-phosphatidyl-choline), qui est constitué de deux chaînes hydrocarbonées à 18 atomes de carbones (C_{18}), possède une température de transition de phase gel-liquide à 55°C alors que le DOPC (dioléoyl-phosphatidyl-choline), qui ne diffère que par la présence d'une double liaison dans chaque chaîne hydrocarbonée, possède une température de transition de phase gel-liquide à -22°C . Nous avons donc utilisé pour la partie hydrophobe du lipide NTA deux chaînes hydrocarbonées en C_{18} possédant une double liaison entre C_9 et C_{10} .

Pour permettre à deux groupes fonctionnels d'interagir l'un avec l'autre en se plaçant dans une configuration géométrique optimale, il est essentiel de leur laisser également une totale liberté d'orientation. Cette liberté d'orientation est obtenue par l'insertion d'un bras espaceur flexible hydrophile entre les chaînes hydrophobes et le groupe fonctionnel NTA.

Le lipide NTA-Ni

Le groupement NTA peut, dans certaines conditions physico-chimiques, lier par chélation un ion métallique comme le Ni^{2+} pour former le complexe NTA-Ni. L'ion nickel possède six sites libres dans sa sphère de coordination ($\text{Ni}^{2+} : [\text{Ar}] 4s^2 3d^6$). Lorsqu'il est chélaté par un groupement NTA, quatre de ces six sites sont occupés. Les deux sites vacants peuvent alors être utilisés pour lier d'autres molécules et notamment former une liaison par chélation avec un autre groupement NTA (chapitre IV). L'énergie associée à cette liaison par partage d'un ion nickel a pu être mesurée en utilisant les deux lipides NTA et NTA-Ni. La structure du lipide NTA-Ni ne diffère de celle du lipide NTA que par la présence de l'ion nickel dans la cage constituée par le groupement NTA (figure II-12).

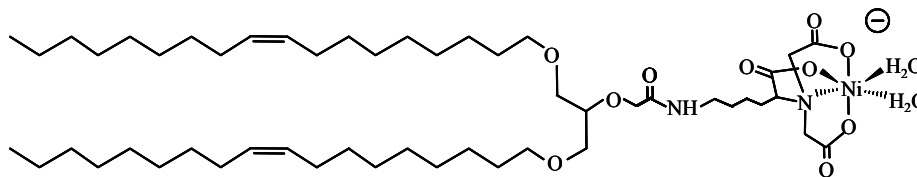


Figure II-12 : Structure du lipide NTA-Ni.

4-2. Les récepteurs possédant une étiquette histidine

(H. Gronemeyer – Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Louis Pasteur, Illkirch)

Les molécules d’histidine (figure II-13) peuvent interagir avec les deux sites vacants du complexe NTA-Ni par l’intermédiaire de leur atome d’azote qui présente une forte affinité pour le nickel. Les deux molécules d’eau sont alors substituées par deux molécules d’imidazole (figure II-14).

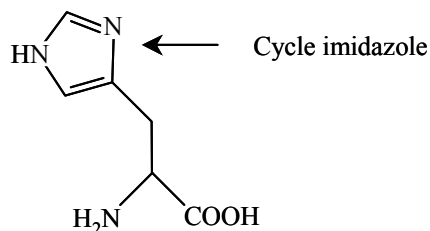


Figure II-13 : Structure de la molécule d’histidine.

Les connaissances actuelles en biologie moléculaire permettent de produire des protéines qui ont été génétiquement modifiées et dont l’extrémité N- ou C-terminale comporte plusieurs histidines ; on parle alors de protéine “his-taguée”. La liaison de l’histidine au complexe NTA-Ni peut alors être mise à profit afin de fixer ces protéines modifiées sur un support contenant le complexe NTA-Ni. La fixation est meilleure lorsque les protéines possèdent six résidus histidine (Hochuli, 1990). Lors des expériences de mesures de forces impliquant les récepteurs de l’acide rétinoïque (chapitre V), nous avons utilisé des récepteurs RAR et RXR qui comportaient une séquence additionnelle de six molécules d’histidine.

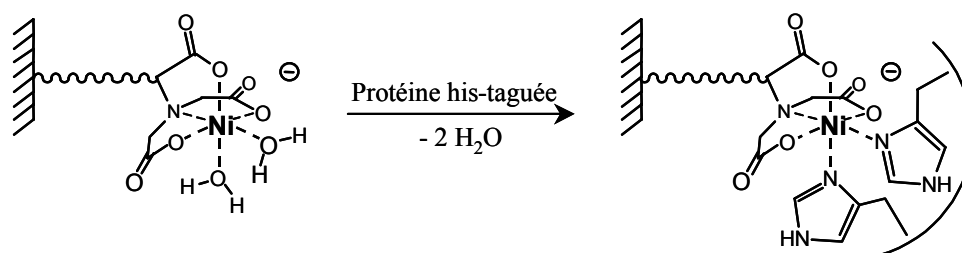


Figure II-14 : Mécanisme de fixation d'une protéine "his-taguée" sur un complexe NTA-Ni. Les deux liaisons que faisait le complexe avec les molécules d'eau sont remplacées par deux liaisons avec les cycles imidazole des molécules d'histidine.

4-3. Le lipide rétinol

Lors des expériences visant à caractériser l'interaction entre un récepteur de l'acide rétinoïque et son ligand (chapitre V), nous avons utilisé un lipide dont la tête hydrophile contenait le ligand synthétique SR 11237 (figure II-15), qui est spécifique des récepteurs RXR (chapitre I-3-2-4). L'utilisation du ligand naturel, l'acide 9-cis rétinoïque, aurait été en effet très délicate en raison de sa faible stabilité isomérique et de sa grande sensibilité à l'oxydation. Il a fallu également résoudre le problème lié à la forte hydrophobicité des rétinoïdes qui complique considérablement le choix du support permettant de les rendre accessibles en solution aqueuse. En utilisant un support lipidique identique à celui choisi pour la fixation du groupement NTA, on risquait de voir le ligand s'insérer dans la partie hydrophobe de la monocouche et devenir alors inaccessible à son récepteur. Une méthode permettant de contourner le problème consiste à utiliser un lipide dont la partie hydrophobe est constituée d'une zone hydrocarbonée et d'une zone fluorocarbonée (Lebeau, 2001). Les fluorocarbures présentent en effet le double avantage d'être hydrophobes et de ne pas se mélanger avec les hydrocarbures. Ainsi, en utilisant un bras espaceur hydrophile suffisamment court, on écarte tout risque d'insertion du ligand dans la zone hydrocarbonée. Le ligand est alors confiné entre la zone fluorocarbonée et la phase aqueuse et reste parfaitement accessible à son récepteur. Afin d'assurer une totale liberté de diffusion du lipide au sein de la monocouche, une ramification à trois atomes de carbone a été placée sur chaque chaîne hydrocarbonée. Cette ramification, au même titre qu'une double liaison,

limite la capacité de structuration des chaînes hydrophobes et augmente ainsi la fluidité du lipide.

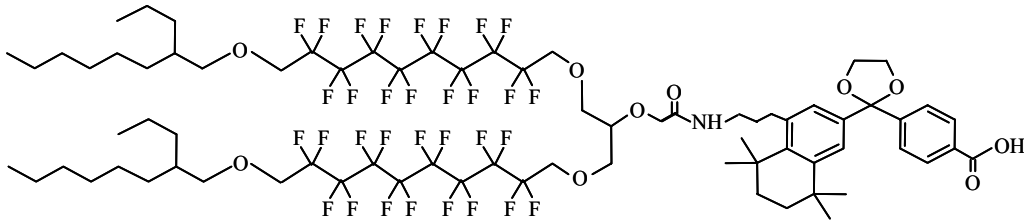


Figure II-15 : Structure du lipide rétinol.

Chapitre III : Mesure d'une Liaison Hydrogène

La fonction des macromolécules biologiques (protéines, acides nucléiques, polysaccharides, *etc.*) est très étroitement liée à l'agencement de leurs monomères (acides aminés, nucléotides, sucres, *etc.*) au sein de la chaîne polymérique (structure primaire) mais également à leur répartition dans l'espace à trois dimensions (structure tertiaire). La stabilité de la structure tertiaire (ou repliée) de ces macromolécules est assurée par un jeu d'interactions intramoléculaires présentes au cœur même de la structure. Pendant de nombreuses années, on a considéré que les interactions de nature hydrophobe étaient les principales interactions impliquées dans le phénomène de repliement des protéines (Kauzmann, 1959 – Tanford, 1962). Les interactions par liaison hydrogène jouent également un rôle lors du repliement mais on ne sait pas si elles contribuent à la stabilité de la structure tertiaire de la protéine (Baker, 1984 – McDonald, 1994). Lorsque qu'une protéine se replie, la plupart des liaisons hydrogène intermoléculaires que ses groupes polaires font avec les molécules d'eau sont cassées pour être remplacées par des liaisons hydrogène intramoléculaires entre groupes polaires (figure III-1).

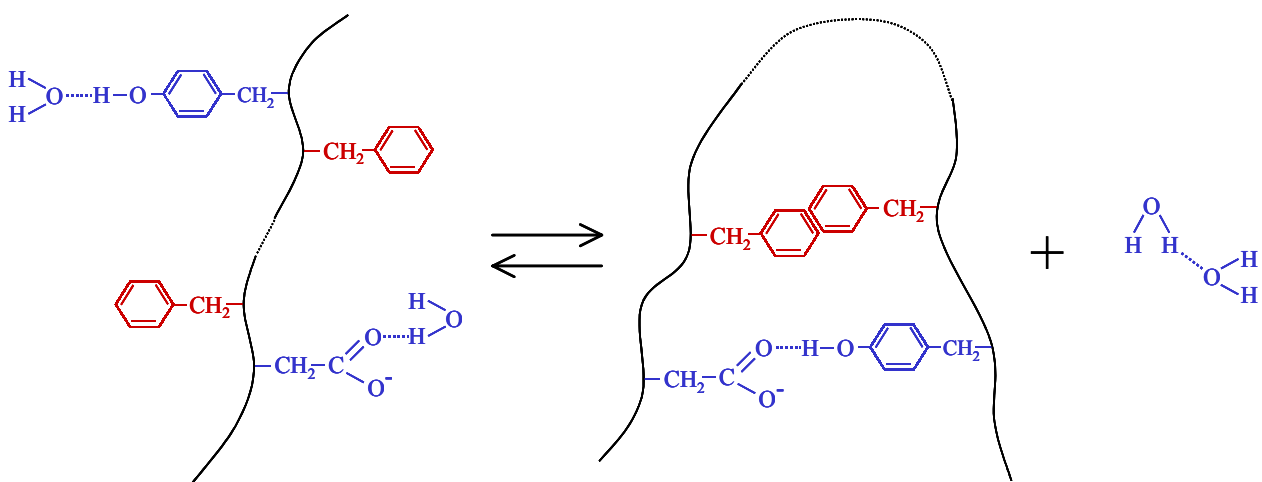


Figure III-1 : Représentation schématique de la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire durant le phénomène de repliement d'une protéine (en bleu : des groupes polaires, en rouge : des groupes hydrophobes). Deux liaisons hydrogène intermoléculaires groupe polaire/eau sont cassées et sont remplacées par une liaison hydrogène intramoléculaire groupe polaire/groupe polaire et une liaison hydrogène eau/eau.

Il s'agit donc de savoir s'il est énergétiquement plus favorable pour les groupes polaires de former des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau lorsque la protéine est dépliée ou de former des liaisons hydrogène entre eux lorsque la protéine est repliée (protéine sous sa forme globulaire). Des études récentes de simulation sur des composés modèles et de mutagenèse dirigée sur site ont révélé que les interactions par liaison hydrogène augmentaient la stabilité des protéines globulaires et que leur contribution était du même ordre de grandeur que celle des interactions hydrophobes (Pace, 1996 – Myers, 1996 – Pace, 2001 – Pokkuluri, 2002). Cette contribution a été estimée en moyenne à 1 kcal/mol par liaison hydrogène intramoléculaire formée. Néanmoins, étant donnée la structure très complexe des protéines, il est très difficile de pouvoir distinguer la contribution due à chaque interaction (forces hydrophobes, liaisons hydrogène, forces électrostatiques, *etc.*) et donc d'obtenir une valeur précise et reproductible pour la contribution énergétique des liaisons hydrogène au phénomène de repliement.

Une méthode permettant de mesurer l'énergie de ces liaisons hydrogène consiste à mesurer l'énergie d'interaction entre deux surfaces portant des groupes donneurs et des groupes accepteurs de liaisons hydrogène. Dans de tels systèmes, les liaisons hydrogène sont parfaitement bien isolées et leur énergie peut être déduite de l'énergie d'adhésion mesurée entre les deux surfaces. Nous avons utilisé des surfaces de mica sur lesquelles on peut déposer, par la méthode de Langmuir-Blodgett, des bicouches lipidiques fonctionnalisées. La première monocouche est constituée du lipide DMPE, qui est déposé dans sa phase solide ; elle permet de rendre le mica hydrophobe. La deuxième monocouche est composée d'un lipide dont la tête polaire est capable de former des liaisons hydrogène dans l'eau pure. Les mesures d'énergies d'interaction sont réalisées à l'aide de la technique SFA, qui permet de donner l'énergie d'interaction entre les deux bicouches lipidiques en fonction de la distance qui les sépare (chapitre II-2).

De telles mesures ont déjà été réalisées sur des lipides dont la tête polaire contenait des groupements nucléosides : adénosine (lipide A), thymidine (lipide T) ou méthyle-thymidine (lipide MeT) (Pincet, 1994 – figure I-22). Les groupements A et T possèdent tous les deux une fonction donneur et une fonction accepteur de liaisons hydrogène (figure III-14). Des mesures de forces en SFA impliquant les lipides A et T ont permis de retrouver les énergies d'adhésion moléculaires connues pour les systèmes A/A, T/T et A/T. Dans le groupement MeT, un atome d'hydrogène du groupement T a été

remplacé par un groupement méthyle. Son utilisation a permis d'étudier l'effet d'un blocage de la fonction donneur de liaisons hydrogène sur les énergies d'interaction mesurées.

Afin d'étendre les résultats obtenus avec les groupements A, T et MeT à d'autres groupements fonctionnels, nous avons réalisé des mesures de forces en SFA entre des monocouches d'un lipide dont la tête polaire contient un groupement nitrilotriacétate (NTA) (figure II-11). Le groupement NTA est constitué de trois groupes carboxyle, qui possèdent chacun la fonction donneur et la fonction accepteur de liaison hydrogène. Dans les groupements A et T les groupes donneurs de liaisons hydrogène étaient uniquement des amines. L'étude sur le lipide NTA offre l'avantage d'impliquer les groupes carboxyle qui sont présents dans la structure des acides aminés. Les fonctions donneur de liaisons hydrogène du groupement NTA peuvent être bloquées lorsque celui-ci chélate un ion nickel. En effet, dans ce cas, les trois liaisons O-H terminales sont cassées pour permettre la formation de liaisons entre les atomes d'oxygène et l'ion nickel (figure II-12). Des mesures de forces en SFA ont également été réalisées avec le lipide NTA-Ni pour étudier l'effet d'un blocage des liaisons hydrogène sur les énergies d'interaction mesurées.

Nous présenterons donc dans ce chapitre des mesures de forces réalisées dans l'eau pure, par la technique SFA, entre deux monocouches de lipide NTA puis entre deux monocouches de lipide NTA-Ni. Les résultats seront comparés aux mesures de forces qui avaient été obtenues avec les lipides A, T et MeT. Ceci nous permettra de donner une estimation de l'énergie associée à la rupture des liaisons hydrogène dans les différents systèmes considérés.

1. Isothermes et stabilité des lipides NTA et NTA-Ni dans l'eau pure

Avant de réaliser toute mesure de forces en SFA, il est nécessaire de bien connaître les caractéristiques des lipides utilisés et de s'assurer de leur stabilité lorsqu'ils sont déposés à l'interface eau-air et lorsqu'ils forment des bicouches en solution aqueuse. A cet égard, un certain nombre d'expériences préliminaires sont réalisées à l'aide de la balance de Langmuir (chapitre II-1).

1-1. Isothermes des lipides NTA et NTA-Ni à l'interface eau-air

Les isothermes ont été réalisées sur une eau ultra-pure (produite par le système Elgastat Maxima, modèle HPLC) et dégazée par sonication et aspiration par une trompe à eau. La phase de dégazage est nécessaire afin de limiter l'oxydation des lipides par l'oxygène résiduel se trouvant en solution aqueuse. Les lipides NTA et NTA-Ni ont été solubilisés dans du chloroforme (CHCl_3) ; les solutions obtenues avaient une concentration de 1 g/l. Afin de former les monocouches de lipide NTA ou NTA-Ni, on déposait 20 μl de ces solutions à la surface de l'eau à l'aide d'une micro-seringue. Les masses molaires des lipides NTA et NTA-Ni étant respectivement 894 g/mol et 985,69 g/mol, on déposait donc environ $1,3 \cdot 10^{16}$ molécules de lipide à la surface de la cuve de Langmuir. L'aire allouée à la monocouche était alors progressivement diminuée et la pression de surface correspondante était mesurée (figure III-2).

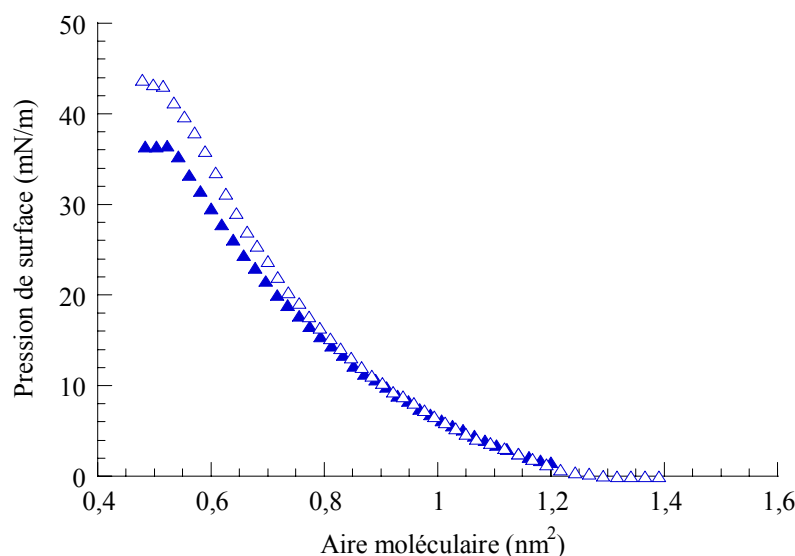


Figure III-2 : Isothermes des lipides NTA (triangles pleins) et NTA-Ni (triangles vides) à l'interface eau-air. Les courbes sont caractéristiques de lipides se trouvant en phase fluide. Les pressions de collapse des lipides NTA et NTA-Ni valent respectivement 36 mN/m et 42 mN/m.

Les isothermes des lipides NTA et NTA-Ni sont caractéristiques de lipides se trouvant en phase fluide puisqu'on n'observe aucun plateau caractéristique d'un changement de phase (chapitre I-1-2). Ce résultat était attendu en raison de la présence de la double

liaison dans les chaînes hydrocarbonées (chapitre II-4-1). La condition de mobilité des lipides au sein de leur monocouche – qui leur permet d'adopter une position optimale pour interagir avec les lipides de l'autre monocouche – sera donc bien assurée.

A partir d'une pression de surface de l'ordre de 10 mN/m, la monocouche constituée du lipide NTA a tendance à se compacter davantage que la monocouche constituée du lipide NTA-Ni. Sur les isothermes, on remarque en effet qu'à forte pression de surface l'aire occupée par un lipide NTA est plus petite que celle occupée par un lipide NTA-Ni. Ce phénomène peut se comprendre par l'observation des structures des deux lipides (figure II-11 et II-12). Dans le cas du lipide NTA-Ni, les trois fonctions carboxyle qui se trouvent à l'extrémité de la tête hydrophile sont liées à l'ion nickel. Leur mobilité (nombre de rotations permises autour de l'atome d'azote) est donc réduite par rapport au cas où elles sont libres (configuration du lipide NTA). On peut donc aisément imaginer que, sous l'effet d'une compression latérale, les branches carboxyle du groupement NTA se replient plus facilement sur elles-mêmes – à l'image des ailes d'un papillon – que celles du groupement NTA-Ni.

La deuxième différence remarquable entre les deux isothermes se situe au niveau des valeurs de la pression de collapse, qui est plus faible dans le cas du lipide NTA. Ceci s'explique par le fait que le groupement NTA, avec ses trois fonctions carboxyle libres, est sensiblement plus hydrophile que le groupement NTA-Ni. Le lipide NTA sera donc plus soluble dans l'eau que son homologue complexé au nickel et il partira plus facilement en solution sous l'effet d'une forte pression de surface.

Lors des expériences SFA, les lipides sont déposés par la technique de Langmuir-Blodgett, à la pression de surface la plus grande possible, sur une monocouche de DMPE, elle-même déposée sur le mica. On obtient ainsi une couche bien compacte et on élimine toute contribution hydrophobe des chaînes du lipide DMPE à la force que l'on mesure entre les deux monocouches externes. De plus, une forte densité de surface augmente la probabilité de rencontre entre les groupements fonctionnels fixés sur les deux surfaces. En général, on se place juste en dessous de la pression de collapse des lipides étudiés. Les deux lipides ayant des pressions de collapse différentes, on déposera ici juste en dessous de la pression de collapse du lipide NTA, c'est-à-dire à 35 mN/m.

Les courbes isothermes nous ont permis de vérifier que les lipides étudiés se trouvaient bien en phase fluide et de déterminer la pression à laquelle ils devaient être déposés sur les chaînes du lipide DMPE. Il s'agit à présent d'évaluer la stabilité des monocouches à l'interface eau-air et sur les chaînes du lipide DMPE.

1-2. Stabilité des monocouches NTA et NTA-Ni à l'interface eau-air

Des premières mesures de désorption ont déjà été implicitement réalisées à travers la détermination des courbes isothermes des lipides NTA et NTA-Ni. En effet, au cours de ces expériences, au moins trois cycles de compression-décompression de la monocouche ont été réalisés et les isothermes obtenues étaient parfaitement superposables. Une mesure d'isotherme nécessitant environ une demi-heure nous savons déjà que la monocouche est bien stable sur l'échelle d'une heure ou deux. Si un phénomène de désorption était apparu, le nombre de molécules effectivement présentes à la surface aurait diminué. L'aire moléculaire, qui est déterminée à partir de la quantité de lipide initialement déposée, aurait donc été sous-estimée par rapport à sa valeur réelle et nous aurions observé un décalage des isothermes vers les petites aires moléculaires.

Mais une expérience SFA – ou plus exactement la phase associée aux mesures des forces d'interaction – se déroule typiquement sur l'échelle d'une demi-journée. De plus, les lipides sont déposés sur les surfaces d'étude à la densité maximale, ce qui augmente les risques de désorption. Une mesure de désorption à l'interface eau-air permet d'avoir une première estimation de la stabilité d'un lipide au sein d'une bicouche. On peut même avoir tendance à penser qu'un lipide incorporé dans une bicouche désorbera moins vite qu'à l'interface eau-air en raison de l'attraction hydrophobe existant entre les chaînes hydrocarbonées des deux monocouches.

Nous avons donc formé des monocouches de lipide NTA et NTA-Ni à l'interface eau-air et nous les avons soumises à une pression de surface de 35 mN/m. Lorsque des molécules quittaient l'interface, une boucle d'asservissement rattachée au système de mesure de la pression repositionnait le piston de manière à conserver une aire moléculaire (et donc une pression de surface) constante. La proportion p_t des molécules qui avaient quitté l'interface au bout du temps t pouvait alors être calculée à partir de la variation de la position du piston.

$$p_t = \frac{N_0 - N_t}{N_0} = \frac{\sigma S_0 - \sigma S_t}{\sigma S_0} = \frac{l x_0 - l x_t}{l x_0} = 1 - \frac{x_t}{x_0} \quad (\text{III-1})$$

Où : N_0 et N_t , S_0 et S_t , x_0 et x_t sont respectivement les nombres de molécules, les aires allouées à la monocouche et les positions du piston aux instants initiaux et finaux et où σ est l'aire moléculaire (σ reste constante durant toute la durée de l'expérience).

Les mesures de désorption ont été réalisées sur une durée de 6 heures, qui est le temps caractéristique nécessaire à l'obtention d'une mesure de forces en SFA.

Dans le cas du lipide NTA, nous avons trouvé :

$$p_{t=6h}(\text{NTA}) = 0,06 \pm 0,02 \quad (\text{III-2})$$

Et dans le cas du lipide NTA-Ni, nous avons obtenu :

$$p_{t=6h}(\text{NTA-Ni}) = 0,05 \pm 0,02 \quad (\text{III-3})$$

Avec un maximum de 6% de désorption en 6 heures les lipides NTA et NTA-Ni peuvent être considérés comme étant très stables lorsqu'ils sont déposés à l'interface eau-air. En effet, les mêmes expériences menées avec le lipide DOPC, qui est considéré comme étant insoluble, avaient révélé une désorption de 10% en 6 heures (Pincet, 1994).

Remarque – Oxydation des lipides NTA et NTA-Ni

Des mesures de désorption ont également été effectuées sur une durée supérieure à 6 heures. Au bout de 8 heures, le lipide présentait généralement un forte propension à désorber. Afin de comprendre l'origine de cette désorption plusieurs isothermes ont été tracées tout au long d'une journée. A partir d'une durée typique de 8 heures, la courbe isotherme a changé d'allure et le phénomène de désorption s'est amplifié (figure III-3). Ce comportement est peut-être dû à une oxydation des chaînes hydrocarbonées par l'oxygène de l'air. Les chaînes des lipides NTA et NTA-Ni présentent en effet une double liaison au niveau des deux atomes de carbone situés en position 9 et 10 (figures II-11 et II-12). Cette double liaison peut se transformer en un cycle oxirane par fixation d'un atome d'oxygène. Le nouveau composé, un époxyde, est alors plus polaire et donc plus soluble dans l'eau. Il peut éventuellement lui-même réagir avec une molécule d'eau pour former un diol qui sera également hydrophile (figure III-4). Dans tous les cas, la

monocouche serait donc constituée de plusieurs espèces lipidiques présentant une balance hydrophile-hydrophobe différente de celle du lipide de départ et qui serait plutôt déplacée du côté hydrophile. Durant la compression, une partie des espèces les plus solubles serait donc expulsée en phase aqueuse, ce qui entraînerait une sous-estimation de l'aire moléculaire.

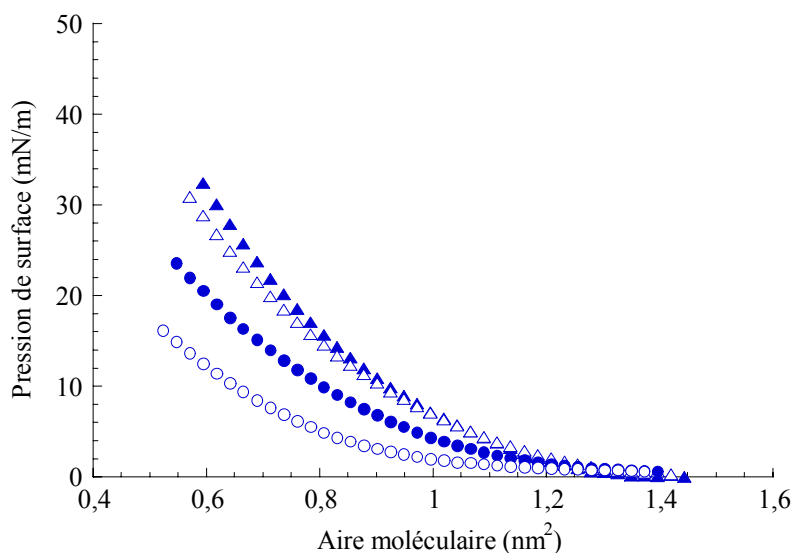


Figure III-3 : Evolution au cours du temps de l'isotherme du lipide NTA-Ni déposé à l'interface eau-air. 6h : triangles pleins, 8h30min : triangles vides, 11h : cercles pleins, 13h30min : cercles vides.

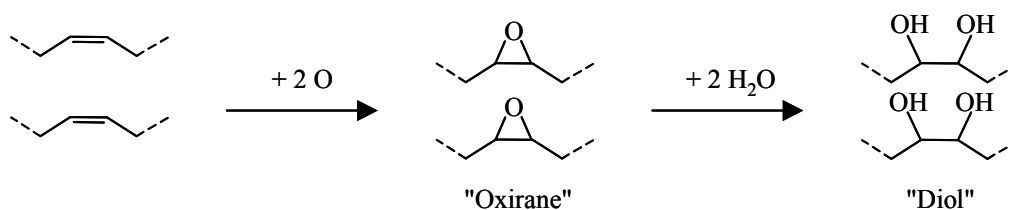


Figure III-4 : Dégradation de la chaîne hydrocarbonée des lipides NTA et NTA-Ni.

1-3. Dépôt de Langmuir-Blodgett et stabilité des bicouches dans l'eau pure

Les bicouches utilisées lors de nos expériences SFA étaient constituées d'une monocouche de DMPE et d'une monocouche du lipide étudié. Le lipide DMPE était déposé en phase solide sur les surfaces de mica par l'intermédiaire de sa tête hydrophile.

Le lipide étudié était déposé en phase fluide sur les chaînes du lipide DMPE par l'intermédiaire de ses chaînes hydrophobes. Pour rendre possible l'interprétation des mesures de forces en SFA, il est nécessaire de bien connaître la densité moléculaire des bicouches formées et de s'assurer de leur intégrité en solution aqueuse ; on réalise pour cela des expériences test sur des bicouches modèle.

1-3-1. Rapports de prélèvement

Les surfaces de mica sur lesquelles sont réalisées les dépôts de Langmuir-Blodgett au cours d'une expérience SFA sont trop petites pour que l'on puisse évaluer la qualité des prélèvements effectués. On a donc réalisé une expérience témoin en utilisant une grande plaque de mica (environ 20 cm²) sur laquelle on a déposé les lipides étudiés dans les mêmes conditions que lors d'une expérience SFA.

Au début de l'expérience, la plaque est plongée au fond de la cuve de Langmuir, dans une solution d'eau pure et dégazée. La monocouche de DMPE est déposée à la surface de l'eau puis elle est soumise à une pression de surface de 38 mN/m (pour laquelle le lipide DMPE se trouve en phase solide). La plaque est alors tirée hors de l'eau et le lipide DMPE quitte l'interface eau-air pour venir se fixer sur le mica par l'intermédiaire de sa tête hydrophile. Le système d'asservissement en pression compense en permanence la perte en lipide DMPE à l'interface eau-air par une compression de la monocouche, ce qui permet de connaître le nombre de molécules qui ont quitté l'interface eau-air pour aller sur le mica. On peut alors calculer le rapport de prélèvement défini comme le rapport entre l'aire qu'occupaient les lipides DMPE à l'interface eau-air et l'aire qu'ils occupent sur le mica :

$$\Gamma_{\text{DMPE}} = \frac{\Delta A_{\text{DMPE}}}{2 A_{\text{mica}}} = 1,03 \pm 0,05 \quad (\text{III-4})$$

Où : ΔA_{DMPE} est l'aire dont a varié la monocouche de DMPE durant le dépôt et A_{mica} est l'aire de la plaque de mica. Le facteur 2 provient du fait que les lipides se déposent sur les deux faces de la plaque de mica. La monocouche de DMPE a donc tendance à se compacter lorsqu'elle passe de l'interface eau-air à la surface du mica.

On a procédé de manière similaire pour les lipides NTA et NTA-Ni mais les dépôts ont été réalisés à une pression d'asservissement de 35 mN/m (pour laquelle les lipides se trouvent en phase fluide). On a trouvé les mêmes valeurs pour les rapports de prélèvement des lipides NTA et NTA-Ni :

$$r_{\text{NTA et NTA-Ni}} = \frac{\Delta A_{\text{NTA (NTA-Ni)}}}{2 A_{\text{mica}}} = 0,94 \pm 0,04 \quad (\text{III-5})$$

Les monocouches de NTA et NTA-Ni ont donc tendance à se dilater lorsqu'elles quittent l'interface eau-air pour venir se fixer sur les chaînes du lipide DMPE.

Connaissant le rapport de prélèvement des lipides NTA et NTA-Ni, on peut maintenant calculer l'aire moléculaire de ces lipides au sein de leur monocouche lorsqu'ils sont déposés sur les surfaces de mica rendues hydrophobes. La connaissance de cette aire moléculaire nous permettra lors des expériences SFA de calculer l'énergie d'adhésion microscopique entre deux groupements fonctionnels à partir de l'énergie d'adhésion macroscopique entre les deux monocouches lipidiques étudiées.

L'aire moléculaire d'un lipide i déposé à la surface du mica vaut :

$$\sigma_{i/\text{mica}} = \frac{2 A_{\text{mica}}}{N_{i/\text{mica}}} = \frac{2 A_{\text{mica}}}{\Delta A_i / \sigma_i} = \frac{\sigma_i}{r_i} \quad (\text{III-6})$$

Où : N_i est le nombre de molécules de lipide i ayant quitté l'interface eau-air pendant le dépôt et σ_i est l'aire moléculaire de l'espèce i au moment du dépôt (elle s'obtient directement à partir de la courbe isotherme).

Pour une pression de surface de 35 mN/m, on a :

$$\sigma_{\text{NTA}} = 0,53 \text{ nm}^2 \text{ et } \sigma_{\text{NTA-Ni}} = 0,58 \text{ nm}^2 \quad (\text{III-7})$$

On en déduit donc d'après les équations (III-5) et (III-6) :

$$\sigma_{\text{NTA}/\text{mica}} = 0,56 \text{ nm}^2 \text{ et } \sigma_{\text{NTA-Ni}/\text{mica}} = 0,62 \text{ nm}^2 \quad (\text{III-8})$$

1-3-2. Stabilité des bicouches

Nous avons vérifié que les dépôts de Langmuir-Blodgett du lipide DMPE et des lipides étudiés présentaient des rapports de prélèvement proches de 1 et que les lipides formaient donc des couches bien compactes à la surface du mica. Il faut maintenant s'assurer que les bicouches formées sont stables en solution aqueuse et notamment que

les lipides étudiés restent bien accrochés aux chaînes du lipide DMPE. Une expérience permettant de le vérifier consiste à laisser la plaque de mica en solution, au fond de la cuve de Langmuir, après que les deux dépôts aient été réalisés. Après une durée d'au moins 6 heures, qui est le temps caractéristique d'une expérience SFA, on ressort alors la plaque de la solution et on compte le nombre de molécules qui se redéposent à la surface de l'eau. Pour y parvenir, avant de ressortir la plaque, on dépose une monocouche du lipide étudié à la surface de l'eau et on la comprime jusqu'à la pression de dépôt. On note la position du piston, ce qui permet de calculer l'aire occupée par la monocouche. On décomprime ensuite la monocouche et on ressort la plaque de la solution. Il est nécessaire de décompresser la monocouche avant de ressortir la plaque afin d'écartier tout risque de formation d'une tricouche. Lorsque la plaque est complètement hors de l'eau, on comprime à nouveau la monocouche et on note la nouvelle position du piston. On en déduit ainsi l'augmentation d'aire de la monocouche, ce qui permet de calculer le nombre de molécules qui se sont redéposées à la surface de l'eau. Ce nombre est ensuite comparé au nombre de molécules qui s'étaient déposées sur les chaînes hydrophobes du lipide DMPE. Lors du calcul, il faut également prendre en compte la perte instantanée liée au mode expérimental en lui-même et qui est indépendante du temps d'immersion. Cette perte peut être évaluée en ressortant la plaque de mica immédiatement après avoir réalisé un dépôt ; elle a été estimée à 10%. Compte tenu de cette correction, la perte en lipide NTA (ou NTA-Ni) pour les bicouches supportées DMPE/NTA ou DMPE/NTA-Ni a été estimée à 1% par heure en moyenne. On retrouve donc l'ordre de grandeur obtenu lors des mesures de désorption des lipides à l'interface eau-air. Les monocouches de lipide NTA et NTA-Ni sont donc également très stables lorsqu'elles sont déposées sur les chaînes du lipide DMPE.

2. Mesures de forces dans l'eau pure

Nous allons présenter les profils de force obtenus dans l'eau pure entre deux monocouches de lipide NTA et entre deux monocouches de lipide NTA-Ni. Ces profils seront comparés à celui d'un phospholipide classique (dans le sens où il ne présente pas de liaison hydrogène), le lipide DMPE, ainsi qu'aux profils de force déjà obtenus avec les lipides nucléosides : lipides A, T et MeT.

2-1. Profils de force NTA/NTA et NTA-Ni/NTA-Ni

Les mesures de forces ont été réalisées sur des bicouches composées du lipide DMPE (monocouches internes) et des lipides NTA ou NTA-Ni (monocouches externes) déposées sur des surfaces de mica moléculairement planes. Le lipide DMPE était déposé en phase solide à 38 mN/m. Les lipides NTA et NTA-Ni étaient déposés en phase fluide à 35 mN/m sur les chaînes hydrophobes du lipide DMPE (figure III-5). Les dépôts de Langmuir-Blodgett ainsi que les mesures de forces ont été réalisés dans une eau ultra-pure et dégazée, avant chaque expérience, par sonication et aspiration par une trompe à eau.

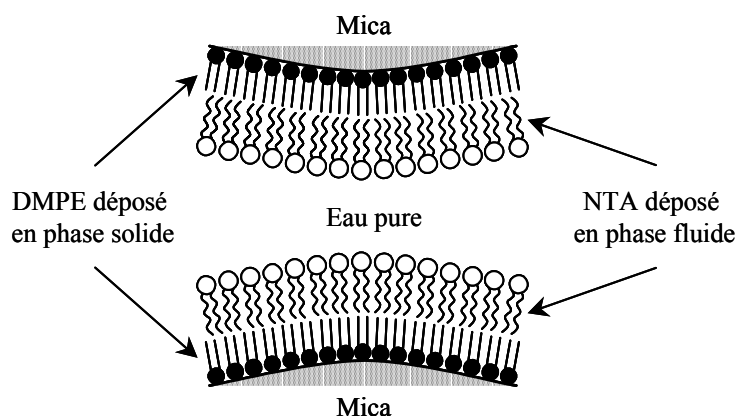


Figure III-5 : Configuration expérimentale permettant l'étude en SFA de l'énergie d'interaction entre deux monocouches de lipide NTA plongées dans l'eau pure. Le lipide DMPE est déposé en phase solide à 38 mN/m et le lipide NTA est déposé en phase fluide à 35 mN/m. La bicouche est supportée par une surface de mica moléculairement plane.

Les mesures de forces sont généralement commencées à partir d'une distance de séparation de 200 nm. Si une force est détectée au delà de cette distance, cela signifie qu'une contamination est venue s'intercaler entre les deux surfaces ; il faut alors modifier la position relative des deux surfaces ou recommencer complètement l'expérience. Les surfaces sont alors rapprochées l'une de l'autre jusqu'au contact (phase aller) puis elles sont séparées jusqu'à retrouver la distance de séparation initiale (phase retour). On réalise en général au moins trois allers-retours différents pour chaque position choisie et on recommence les mesures en modifiant la position relative des

deux surfaces. La même expérience est alors répétée sur un autre couple de bicouches (nouveaux dépôts de Langmuir-Blodgett). Un résultat peut être validé lorsque le même profil de force a été obtenu pour au moins deux couples de bicouche différents et qu'aucun signe de dégradation n'a été observé au cours des différents allers-retours. Une dégradation de la bicouche se manifeste en général par une distance de contact et une énergie d'adhésion non reproductibles d'un aller-retour sur l'autre. Souvent cela résulte d'une déplétion de la monocouche externe (celle qui est fixée sur les chaînes du lipide DMPE) qui induit une contribution de l'interaction hydrophobe entre les chaînes du lipide DMPE à l'énergie d'interaction mesurée.

Les profils de force présentent le rapport de la force F mesurée entre les deux surfaces au rayon de courbure R de ces surfaces en fonction de la distance de séparation D . Ce rapport est proportionnel à l'énergie d'interaction E entre deux plans (Derjaguin, 1934) :

$$\frac{F(D)}{R} = 2\pi E(D) \quad (\text{III-9})$$

Par abus de langage, nous emploierons souvent le terme "force" pour évoquer la grandeur F/R . L'origine de la distance ($D = 0$) est prise au contact hydrophobe entre les chaînes du lipide DMPE. La distance D comprend donc l'épaisseur des deux monocouches de lipide NTA ou NTA-Ni habillées de leurs couches de solvation. Le contact hydrophobe est déterminé à la fin des mesures de forces. La cuve du SFA est entièrement vidée, ce qui a pour conséquence de ne laisser à la surface des micas que la monocouche de DMPE. Les deux surfaces sont alors rapprochées jusqu'au contact et le spectre d'interférence correspondant est enregistré.

Tant qu'aucune force ne s'exerce entre les deux surfaces, le déplacement imposé à la base du ressort à flexion (donné par l'angle dont a tourné la vis micrométrique) correspond au déplacement résultant pour la surface de mica solidaire du ressort (mesuré par interférométrie). Lorsqu'une force apparaît, le ressort subit une déformation et les deux déplacements ne sont plus identiques (chapitre II-2-4).

Les figures III-6a et III-6b donnent les profils de force obtenus entre deux monocouches de lipide NTA et entre deux monocouches de lipide NTA-Ni dans l'eau pure. Pour plus de clarté, les résultats n'ont été présentés qu'à partir d'une distance de séparation de 100 nm ; mais aucune force n'avait été détectée entre 200 nm et 100 nm.

Lors du rapprochement des surfaces, on n'observe aucune force répulsive de nature électrostatique. La résolution du SFA étant inférieure à 1 charge pour 1000 lipides

(Pincet, 1999), on peut donc considérer que les monocouches de lipide NTA et NTA-Ni sont électriquement neutres dans l'eau pure. Ce point sera discuté dans le chapitre III-2-5.

Une force attractive apparaît aux alentours de 100 nm et augmente lorsque l'on rapproche les deux surfaces l'une de l'autre (insert des figures III-6a et III-6b). L'origine de cette force est inconnue. Une attraction semblable avait déjà été observée lors des mesures de forces réalisées entre les lipides nucléosides (Pincet, 1994) et avait été attribuée à la capacité qu'ont les groupements A et T à s'organiser en mettant leurs plans parallèles les uns aux autres (Perez, 1998) ; ce phénomène s'appelle "stacking". Une telle organisation n'a jamais été observée entre les groupements NTA mais son existence n'est pas exclue.

Lorsque le gradient de la force devient supérieur à la constante de raideur du ressort, les deux surfaces sautent au contact. Elles subissent alors l'effet d'une force répulsive de nature stérique sur une distance de 2 à 3 nm. Cette force a pour origine le caractère mobile des têtes polaires qui sont liées aux chaînes hydrophobes par l'intermédiaire d'un bras espaceur flexible.

Si l'on force un peu les deux surfaces l'une contre l'autre, les lipides NTA et NTA-Ni ne se comportent alors plus de la même manière. Dans le cas du lipide NTA-Ni, une fois que les deux monocouches ont atteint leur état de compactage théorique maximum ($D = D_0$ de l'ordre de 5 nm), la distance ne varie quasiment plus alors que dans le cas du lipide NTA, la distance continue de décroître sur une échelle d'environ 3 nm. Ceci est révélateur d'une perte de lipide au niveau de la zone de contact entre les deux monocouches externes (monocouches de lipide NTA). Cette perte conduit à un contact plan entre les deux surfaces. Ce comportement n'est généralement pas observé entre des monocouches de phospholipides bien qu'il ait déjà été obtenu pour les lipides A et T (Pincet, 1994) ; nous en reparlerons dans le chapitre III-2-3.

Au début de la phase de séparation, la distance ne varie pratiquement pas puis augmente à nouveau progressivement jusqu'à atteindre la valeur D_0 correspondant à deux monocouches compactes. Les chaînes hydrophobes et les bras espaceurs se détendent alors plus ou moins avant que les surfaces ne se séparent brusquement pour se retrouver loin l'une de l'autre (saut adhésif). Un tel saut est caractéristique d'un comportement adhésif entre les deux surfaces. La force associée à ce saut s'appelle la force de

séparation ("pull off" force) et est notée F_0 . L'importance du saut dépend directement de la valeur de l'énergie d'adhésion entre les deux surfaces : plus l'adhésion est forte, plus le saut est important. Les deux monocouches de lipide NTA se séparent à partir d'une force d'environ 20 mN/m et les deux monocouches de lipide NTA-Ni à partir d'une force d'environ 5 mN/m. Ceci est cohérent avec l'hypothèse d'un blocage des liaisons hydrogène dans le cas où le groupement NTA est fonctionnalisé par un ion nickel.

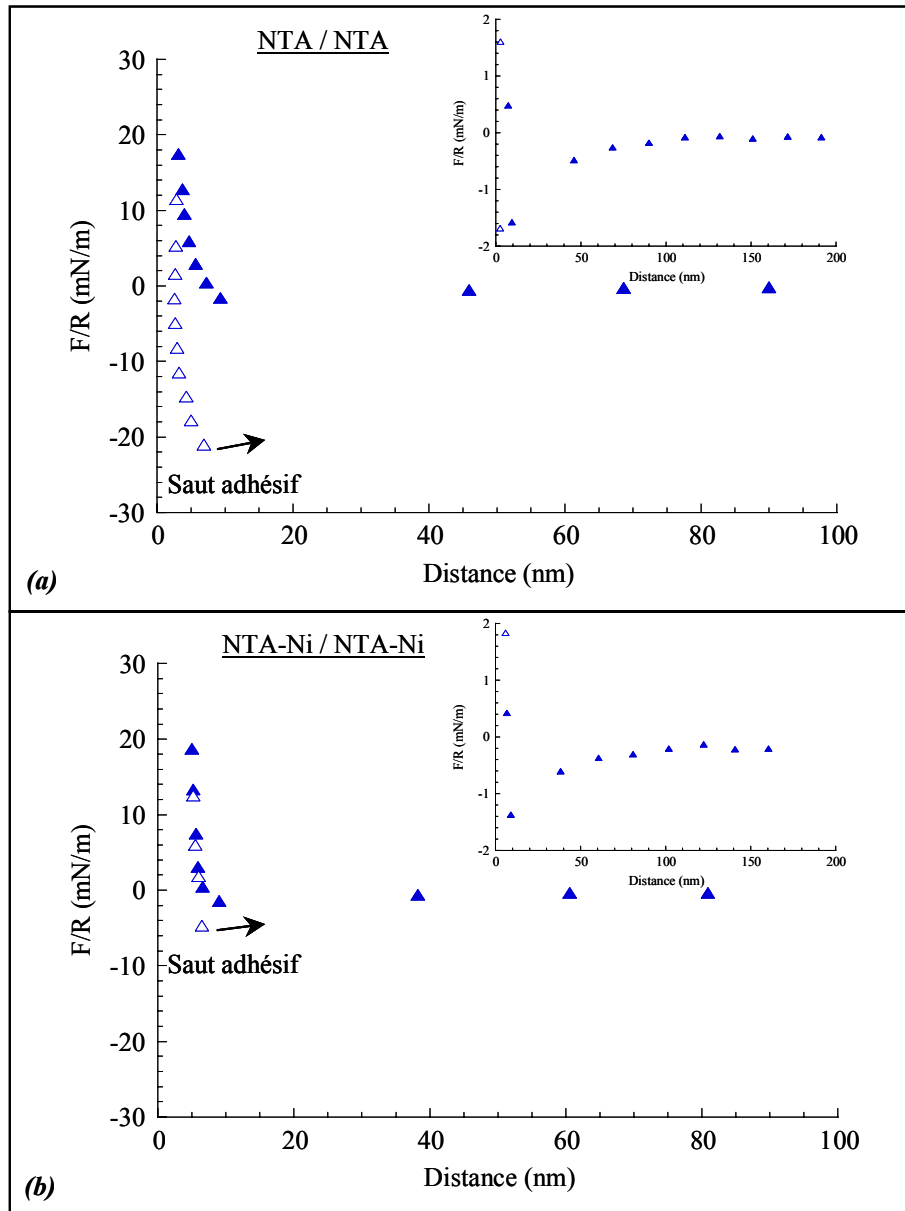


Figure III-6 : Profils de force obtenus dans l'eau pure entre deux monocouches de lipide NTA (a) et entre deux monocouches de lipide NTA-Ni (b). En insert, on peut visualiser les forces attractives s'exerçant à longue distance entre les deux surfaces. Rapprochement des surfaces : triangles pleins, séparation des surfaces : triangles vides.

2-2. Profils de force DMPE/DMPE, MeT/T et MeT/A

Le profil de force du lipide NTA-Ni est à rapprocher de ceux que l'on observe habituellement entre des phospholipides neutres, à savoir : pas de répulsion électrostatique double couche, pas de variation significative de la distance de contact et une faible force de séparation. La figure III-7 présente, à titre d'exemple, le profil de force obtenu dans l'eau pure entre deux monocouches de lipide DMPE.

Le profil de force du lipide NTA est, quant à lui, à rapprocher de ceux qui ont déjà été obtenus avec les lipides nucléosides : lipides A, T et MeT. Les mesures avaient également mis en évidence une diminution de la distance lors du contact entre les deux monocouches ainsi que de grandes forces de séparation (figure III-8). Nous ne présentons ici que les deux profils de forces MeT/T et MeT/A, les profils A/A, A/T et A/T ayant déjà été publiés (Pincet, 1994).

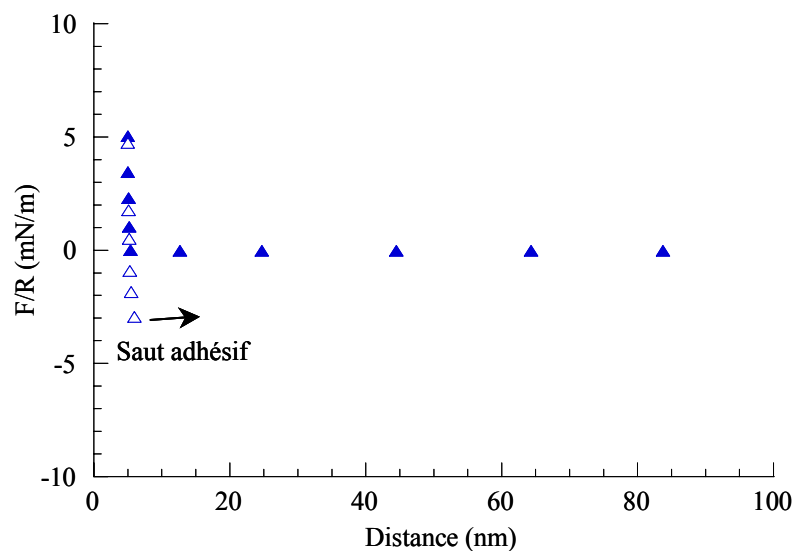


Figure III-7 : Profil de force obtenu dans l'eau pure entre deux monocouches de lipide DMPE. Ce profil est à rapprocher de celui qui a été obtenu entre les deux monocouches de lipide NTA-Ni.

Rapprochement des surfaces : triangles pleins, séparation des surfaces : triangles vides.

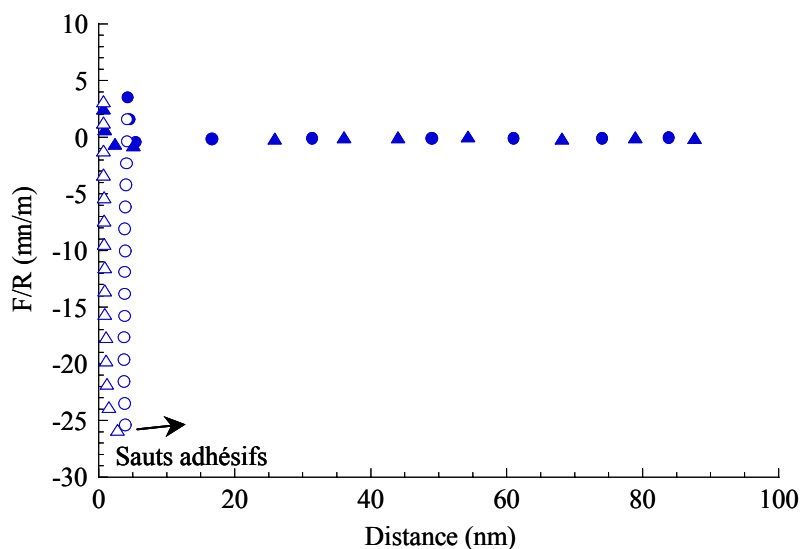


Figure III-8 : Profils de force obtenus dans l'eau pure entre une monocouche de lipide MeT interagissant avec une monocouche de lipide T (cercles) ou une monocouche de lipide A (triangles). Les symboles pleins correspondent aux mesures réalisées lors du rapprochement des surfaces et les symboles vides à celles réalisées lors de la séparation des surfaces.

2-3. Comportement “sticky fluid” des monocouches de lipide NTA

Dans le cas du lipide NTA, après que les surfaces aient sauté au contact, on remarque que la distance décroît en dessous de la valeur correspondant à deux monocouches lipidiques compactes. Cette distance peut être estimée à partir du profil de force du lipide NTA-Ni, qui ne présente pas ce comportement ; elle vaut environ 5 nm (figure III-9). Cette décroissance de la distance au contact conduit à un contact plan entre les deux surfaces, qui est directement observable à travers la forme des franges d'interférences. Dans le cas du lipide NTA-Ni, les franges ont au contact une forme arrondie alors que dans le cas du lipide NTA elle sont aplaties à leur extrémité. L'hypothèse d'une fusion des monocouches externes est exclue dans la mesure où, lors de la phase de séparation et jusqu'au moment du saut adhésif, la distance augmente à nouveau jusqu'à retrouver la valeur correspondant à deux monocouches compactes. De plus, le profil de force à proximité du contact ainsi que la force de séparation sont reproductibles d'un aller-retour sur l'autre.

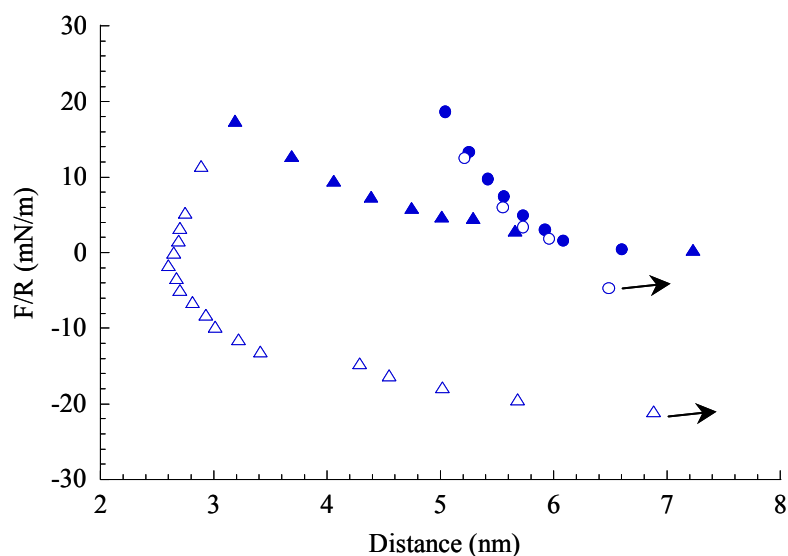


Figure III-9 : Profils de force à proximité du contact entre deux monocouches de lipide NTA (triangles) et entre deux monocouches de lipide NTA-Ni (cercles). Les symboles pleins correspondent aux données d'approche et les symboles vides aux données de séparation. Dans le cas du lipide NTA la distance continue de décroître après que les monocouches aient atteint leur état de compactage théorique maximum ($D_0 \cong 5\text{nm}$).

Ce comportement avait également été observé pour les lipides nucléosides et avait été baptisé comportement “sticky fluid”. Il semble être commun à tous les lipides se trouvant en phase fluide et présentant une forte énergie d’adhésion. Son existence a été attribuée à un phénomène de réarrangement des lipides dans la zone de contact (Pincet, 1996). Lorsque les lipides sont en contact, ils se lient par l’intermédiaire de liaisons fortes, en l’occurrence des liaisons hydrogène, et forment des complexes moléculaires qui sont plus hydrophobes que les deux lipides pris séparément et qui vont donc présenter des propriétés d’organisation différentes. Quand on force un peu les surfaces l’une contre l’autre, ces complexes se comportent plus ou moins sur le plan collectif comme une paraffine (figure III-10c) et fuient le centre de la zone de contact pour venir s’accumuler aux extrémités. Lors de la phase de séparation, les lipides reviennent progressivement vers le centre de la zone de contact sous l’effet de la force hydrophobe des chaînes du lipide DMPE et les monocouches retrouvent leur état d’organisation initial (figure III-10a).

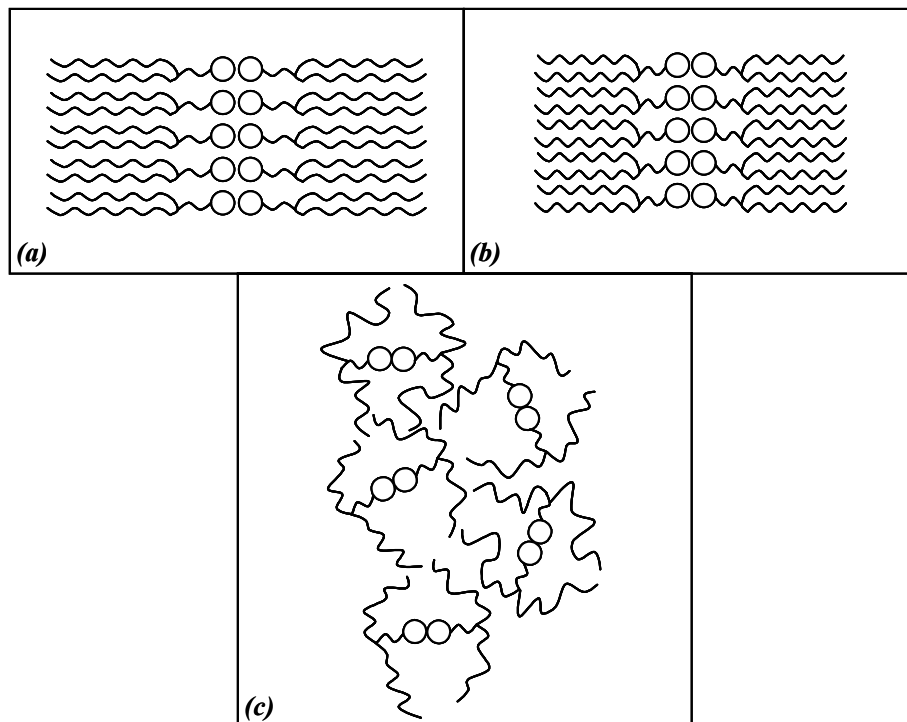


Figure III-10 : Différentes étapes conduisant au comportement “sticky fluid” entre deux monocouches. Après que les surfaces aient sauté au contact (a) si l’on continue d’essayer de les rapprocher l’une de l’autre, les bras espaceurs et les chaînes hydrophobes se compriment jusqu’à ce que les monocouches atteignent leur état de compactage théorique maximum (b). Les complexes lipidiques formés étant plus hydrophobes que les lipides pris séparément, ils présentent des propriétés d’assemblage différentes qui sont à l’origine du comportement “sticky fluid” (c).

2-4. Energies d’adhésion macroscopiques

L’énergie d’adhésion macroscopique E_0 entre deux surfaces peut être déduite de la force F_0 qu’il a fallu appliquer pour les séparer. La relation entre E_0 et F_0 dépend de la géométrie de la zone de contact entre ces deux surfaces (chapitre II-2-5).

Dans le cas de l’interaction NTA/NTA et des interactions impliquant les lipides A, T et MeT, la force de séparation est importante et le contact entre les deux surfaces est plan. On applique donc la théorie JKR (Johnson, 1971) :

$$E_0 = \frac{2}{3\pi} \frac{F_0}{R} \quad (\text{III-10})$$

Dans le cas de l’interaction NTA-Ni/NTA-Ni et DMPE/DMPE, la force de séparation est peu importante et le contact entre les deux surfaces est ponctuel. On applique donc la théorie DMT (Derjaguin, 1975) :

$$E_0 = \frac{1}{2\pi} \frac{F_0}{R} \quad (\text{III-11})$$

Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux III-1 et III-2.

	NTA/NTA	NTA-Ni/NTA-Ni	DMPE/DMPE
$\frac{F_0}{R}$ (mN/m)	19	6	3
E_0 (mJ/m ²)	4	1	0,5

Tableau III-1 : Forces de séparation F_0 et énergies d'adhésion macroscopiques E_0 mesurées en SFA pour les systèmes NTA/NTA, NTA-Ni/NTA-Ni et DMPE/DMPE.

	MeT/T	MeT/A	A/A	T/T	A/T
$\frac{F_0}{R}$ (mN/m)	28	22	50	43	110
E_0 (mJ/m ²)	5,9	4,7	10,6	9,1	23,3

Tableau III-2 : Forces de séparation F_0 et énergies d'adhésion macroscopiques E_0 mesurées en SFA pour différentes configurations expérimentales impliquant les lipides A, T et MeT.

Comme dans le cas des mesures de forces impliquant les lipides A, T et MeT celles réalisées entre deux monocouches de lipide NTA ont mis en évidence une énergie d'adhésion bien supérieure à celles que l'on mesure habituellement entre des phospholipides ne présentant pas de liaison hydrogène. Deux monocouches de DMPE présentent par exemple une énergie d'adhésion de 0,5 mJ/m² dans l'eau pure (figure III-7, tableau III-1). De même, des mesures de forces réalisées en solution aqueuse entre deux monocouches de divers lipides phosphatidyl-choline ou phosphatidyl-

ethanolamine avaient mis en évidence des énergies d'adhésion allant de 0,1 à 0,8 mJ/m² (Marra, 1985).

Lorsque les groupements NTA sont fonctionnalisés par des ions nickel, l'énergie d'adhésion diminue considérablement pour passer de 4 mJ/m² à 1 mJ/m². Dans ce cas, les trois liaisons O-H terminales sont remplacées par trois liaisons O-Ni et il ne peut plus se former de liaisons hydrogène entre les groupements NTA. Ceci prouve que l'énergie d'adhésion mesurée entre deux monocouches de lipide NTA est bien due aux liaisons hydrogène qui se forment entre les groupes carboxyle COOH.

Dans le cas des lipides A, T et MeT nous savions déjà, d'après de précédentes études, que les énergies d'adhésion mesurées étaient dues aux liaisons hydrogène qui se forment entre les nucléosides (Tinoco, 1973 – Saenger, 1984 – Pincet, 1994).

D'autres expériences SFA impliquant des lipides dont la tête hydrophile contenait une glycine, qui est capable de former des liaisons hydrogène, avaient également mis en évidence de très grandes forces de séparation entre les monocouches (Schneider, 1998).

Tous ces résultats montrent que des groupes polaires qui sont capables de former des liaisons hydrogène, préfèrent former ces liaisons hydrogène entre eux plutôt qu'avec les molécules d'eau.

2-5. Estimation de l'énergie d'une liaison hydrogène

Le but de ce paragraphe est d'obtenir une estimation de l'énergie associée à la rupture d'une liaison hydrogène dans l'eau pure. Pour y parvenir, nous allons utiliser les énergies d'adhésion macroscopiques que nous avons mesurées en SFA entre des monocouches de lipide NTA ainsi que celles qui avaient été mesurées entre des monocouches des lipides A, T et MeT. Ce travail nécessite la connaissance préalable du nombre de sites donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène qui sont effectivement présents au sein des têtes hydrophiles des lipides étudiés et qui contribuent aux énergies d'adhésion mesurées.

Le premier paramètre à déterminer est l'état d'ionisation des têtes hydrophiles. On se heurte alors au difficile problème qui est de connaître le pK_a effectif d'une espèce au sein d'une monocouche compacte.

Dans le cas des monocouches de lipide NTA, on peut considérer l'ensemble formé par les têtes hydrophiles comme une assemblée compacte de groupements R-COOH, où R = CH ou CH₂. Le pK_a de ces groupements en solution est approximativement égal à celui de l'acide acétique CH₃COOH, c'est-à-dire 4,8. Mais en surface il faut tenir compte des effets coopératifs entre les différentes molécules. Lorsque les groupements R-COOH sont très proches les uns des autres, certains atomes d'hydrogène se retrouvent bloqués entre deux atomes d'oxygène (figure III-11), ce qui a pour conséquence de rendre énergétiquement moins favorable l'ionisation des groupes carboxyle et donc d'augmenter la valeur effective de leur pK_a . Ces liaisons peuvent se former au sein d'un même groupement NTA (liaisons intramoléculaires) mais également – puisque les monocouches de lipide NTA sont compactes – entre deux groupements NTA voisins au sein d'une même monocouche (liaisons intermoléculaires).

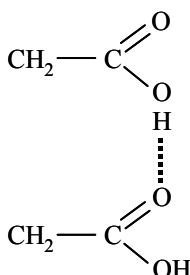
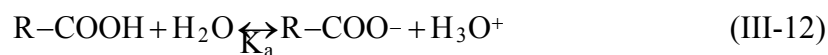


Figure III-11 : Liaisons hydrogène pouvant se former entre deux groupes carboxyle au sein d'un même groupement NTA (liaisons intramoléculaires) ou entre deux groupes carboxyle appartenant à des groupements NTA voisins au sein d'une même monocouche compacte (liaisons intermoléculaires).

D'une manière générale, lorsque des molécules se trouvent en surface, l'équilibre acido-basique est toujours déplacé dans le sens de la formation des espèces neutres, dont l'énergie libre de surface est plus basse que celle des espèces ionisées. Des mesures comparant les pK_a en solution aux pK_a de surface ont déjà été effectuées sur des monocouches d'acides faibles et de bases faibles (Payens, 1955 – Betts, 1956 – Zhao, 1993 – Vezenov, 1997). Toutes ces études ont révélé que le pK_a de surface était

supérieur au pK_a de volume dans le cas des acides faibles et qu'il lui était inférieur dans le cas des bases faibles ; la différence a été estimée à 1 unité de pK (entre 0,7 et 1,3).

L'équation de dissociation des groupements R-COOH s'écrit :



Où :

$$K_a = \frac{[R-COO^-][H_3O^+]}{[R-COOH]} \quad (III-13)$$

D'où :

$$\frac{[R-COO^-]}{[R-COOH]} = 10^{pH - pK_a} \quad (III-14)$$

Or, les expériences ont été réalisées dans l'eau pure dont le pH fluctue entre 5,3 et 5,7 en raison de la dissociation du dioxyde de carbone de l'air. Par ailleurs, d'après les résultats obtenus avec les monocouches d'acides faibles et de bases faibles, nous pouvons estimer que le pK_a de surface des groupes R-COOH est d'environ 5,8.

On en déduit donc :

$$\frac{[R-COO^-]}{[R-COOH]} \cong 1 \quad (III-15)$$

Nous estimerons donc que la moitié des groupes carboxyle des monocouches de lipide NTA sont dissociés dans l'eau pure et qu'ils perdent par conséquent leur fonction donneur de liaison hydrogène.

Remarque – Neutralité électrique des monocouches de lipide NTA et NTA-Ni

On peut s'étonner de ne pas avoir observé de répulsion électrostatique double-couche dans les profils de force obtenus entre les monocouches de lipide NTA ou NTA-Ni. Le lipide NTA-Ni est en effet supposé porter une charge globale négative (figure II-12). Quant au lipide NTA, nous venons de voir qu'il portait au moins 1 charge négative dans l'eau pure (chaque lipide contient trois groupes carboxyle). La neutralité électrique des monocouches de lipide NTA ou NTA-Ni peut s'expliquer par le fait que, même dans l'eau pure, une grande quantité de contre-ions peut venir s'adsorber sur les surfaces

(Marra, 1986). Ces contre-ions proviennent de certaines parties de l'appareil SFA (inox, téflon, verre,..) et de la dissociation, dans l'eau, du dioxyde de carbone de l'air.

Les liaisons hydrogène qui se forment entre les groupes carboxyle au sein d'un même groupement NTA (liaisons intramoléculaires) ainsi que celles qui se forment entre deux groupements NTA voisins au sein d'une même monocouche compacte (liaisons intermoléculaires) ne contribuent pas à l'énergie d'adhésion que nous avons mesurée en SFA entre les deux monocouches de lipide NTA. Les seules liaisons hydrogène qui contribuent à l'énergie d'adhésion mesurée sont celles qui se forment entre deux surfaces différentes (liaisons hydrogène "inter-couches"). Nous devons donc estimer à présent la proportion de ces liaisons hydrogène "inter-couches".

Reprenons l'idée d'une assemblée compacte de groupements R-COOH et modélisons ces groupements par des sphères afin de pouvoir visualiser leur organisation lors du contact des deux monocouches. La façon la plus compacte de disposer des sphères dans un plan correspond à l'organisation hexagonale (figure III-12a) ; nous considérerons que telle est l'organisation des groupements R-COOH au sein d'une même monocouche. Lorsque les deux monocouches de lipide NTA sont en contact, les groupements R-COOH d'une surface ont également pour voisins immédiats les groupements R-COOH de l'autre surface, avec lesquels ils forment aussi une "structure" compacte. La façon la plus compacte d'empiler deux couches de sphères correspond à la situation où les sphères de la deuxième couche s'emboîtent dans les creux de la première (figure III-12b).

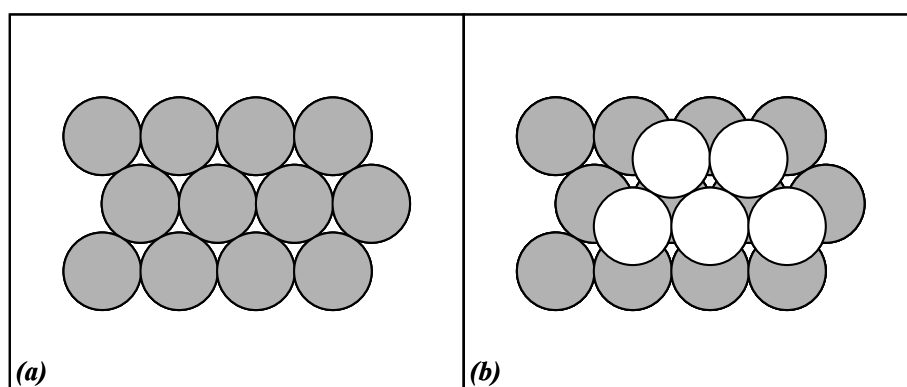


Figure III-12 : Empilement compact de sphères dans un plan (a) et empilement compact de deux plans de sphères (b).

Dans une telle configuration chaque groupement R-COOH possède alors 6 voisins immédiats au sein de la même monocouche et 3 voisins immédiats au sein de l'autre monocouche. Sur 9 liaisons hydrogène potentielles, 3 seulement seront donc formées avec des groupements appartenant à l'autre monocouche autrement dit seulement 1/3 des liaisons hydrogène seront des liaisons hydrogène "inter-couches".

Nous avons vu par ailleurs que la moitié des groupes carboxyle étaient ionisés dans l'eau pure et qu'il ne restait par conséquent, en moyenne, par groupe carboxyle, qu'un seul site capable de participer à la formation d'une liaison hydrogène (un groupe carboxyle non ionisé possède un site donneur et un site accepteur de liaison hydrogène). Comme seulement 1/3 des liaisons hydrogène formées sont des liaisons hydrogène "inter-couches", nous en déduisons que seulement 1/6 des sites hydrogène (sites donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogène) forment des liaisons hydrogène "inter-couches" et contribuent ainsi à l'énergie d'adhésion mesurée.

Dans le cas des lipides A, T et MeT les énergies d'adhésion moléculaires mesurées correspondent à celles qui avaient été obtenues par des méthodes thermodynamiques et par des calculs de mécanique quantique (Pullman, 1969 – Tinoco, 1973 – Kudritskaya, 1976). On peut donc en déduire que la totalité des sites hydrogène participent à la formation de liaisons hydrogène "inter-couches".

Ceci est cohérent avec les valeurs de pK_a connues pour les groupements A et T en solution aqueuse (figure III-13). De plus, les liaisons hydrogène au sein d'une même monocouche peuvent effectivement être négligées dans le cas des lipides nucléosides. En effet, il a été montré par des expériences de diffractions de rayons X menées sur des monocouches de lipide A et T que les têtes hydrophiles avaient tendance à s'associer en mettant leurs plans parallèles les uns aux autres (Perez, 1998). Ce phénomène, appelé "stacking", empêche la formation de liaisons hydrogène au sein d'une même monocouche.

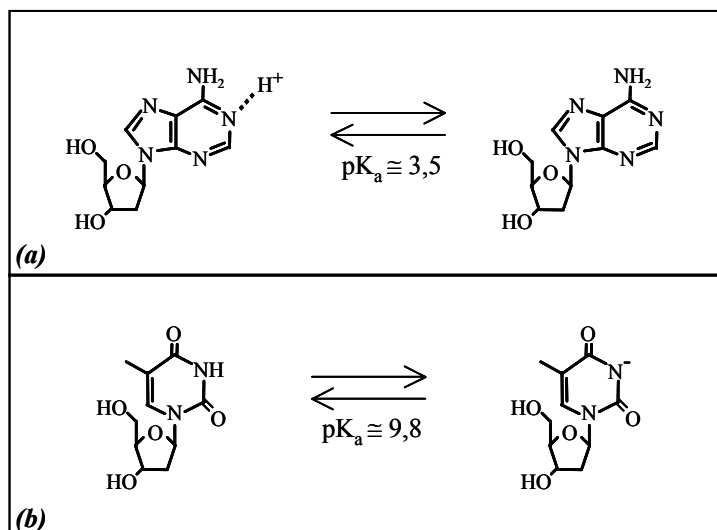


Figure III-13 : Valeurs de pK_a en solution aqueuse des groupements adénosine (a) et thymidine (b).

Nous connaissons maintenant, pour chaque groupement fonctionnel, la proportion des sites hydrogène qui contribuent aux énergies d'adhésion mesurées. Nous allons pouvoir en déduire une estimation de l'énergie des liaisons hydrogène impliquées dans chaque système étudié. Chaque groupement NTA possède trois groupes carboxyle qui peuvent former chacun deux liaisons hydrogène (figure III-14a) ; il existe donc six sites hydrogène par tête NTA. Etant donné que seulement 1/6 de ces sites contribuent à l'énergie d'adhésion mesurée, nous en déduisons que les groupements NTA forment en moyenne 1 liaison hydrogène "inter-couches". Dans le cas des lipides A, T et MeT, tous les sites hydrogène participent à la formation de liaisons "inter-couches" ; les groupements A et T forment donc en moyenne 2 liaisons hydrogène "inter-couches" et les groupements MeT 1 liaison hydrogène "inter-couches" (figures III-14b à III-14f).

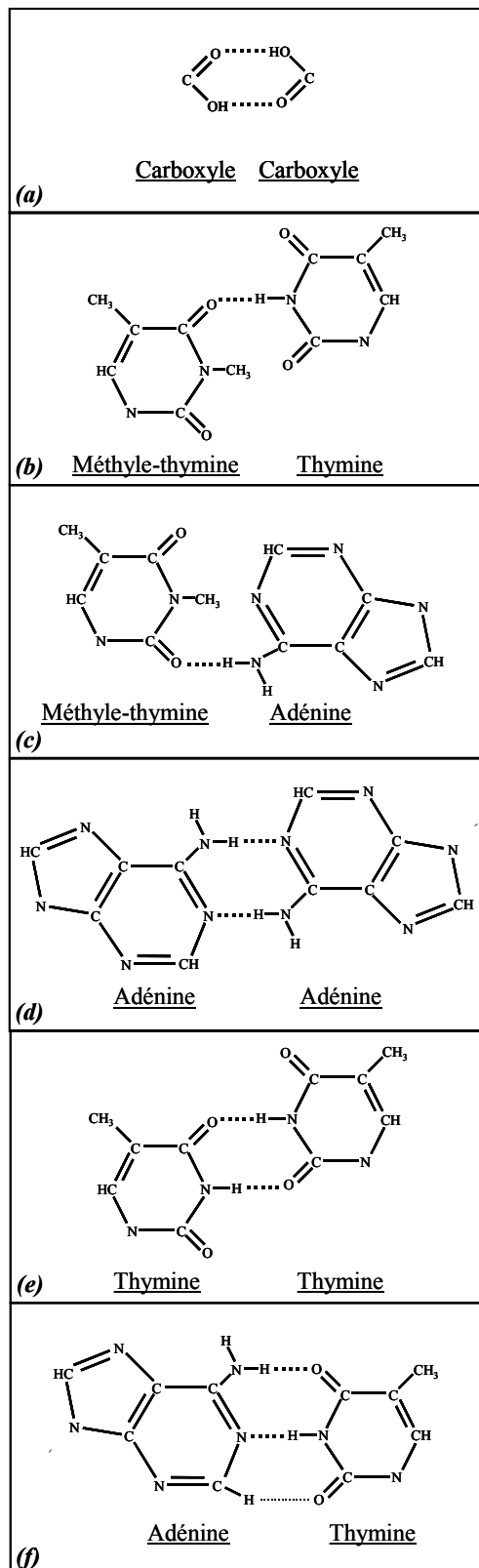


Figure III-14 : Liaisons hydrogène pouvant se former dans les différents systèmes étudiés. Dans le cas du lipide NTA (a), chaque tête hydrophile possède trois groupes carboxyle et chaque groupe carboxyle est capable de former deux liaisons hydrogène.

L'énergie d'adhésion macroscopique E_0 entre deux monocouches est reliée à l'énergie moyenne e_H d'une liaison hydrogène par l'équation :

$$E_0 = \Sigma_{H_1} e_H \quad \text{(III-16)}$$

Où : Σ_{H_1} est la densité surfacique des sites hydrogène liés.

Une statistique de type Boltzmann considérant que chaque site peut être lié ou non lié permet de relier Σ_{H_1} à Σ_H , la densité surfacique totale des sites hydrogène.

La fonction de partition du système formé d'un site hydrogène s'écrit :

$$Z = 1 + \exp(e_H) \quad \text{(III-17)}$$

Où : e_H est donnée en unité $k_B T$; dans cette expression e_H correspond à la valeur absolue de l'énergie de liaison, ce qui explique l'absence du signe négatif.

La probabilité de former une liaison hydrogène par site s'écrit :

$$P = \frac{\exp(e_H)}{Z} \quad \text{(III-18)}$$

D'où :

$$\Sigma_{H_1} = \Sigma_H \frac{\exp(e_H)}{1 + \exp(e_H)} \quad \text{(III-19)}$$

La densité surfacique totale des sites hydrogène est elle-même reliée à l'aire occupée par chaque groupement fonctionnel (NTA, A, T ou MeT) au sein de la monocouche, c'est-à-dire à l'aire moléculaire σ des lipides étudiés (dans nos systèmes, l'aire moléculaire des lipides est en effet déterminée par l'aire occupée par leur tête polaire puisque cette dernière est plus grosse que la partie hydrophobe) :

$$\Sigma_H = \frac{n_H}{\sigma} \quad \text{(III-20)}$$

Où : n_H est le nombre de sites hydrogène liés par groupement fonctionnel.

On en déduit :

$$E_0 = \frac{n_H}{\sigma} \frac{e_H}{1 + \exp(-e_H)} \quad \text{(III-21)}$$

Où : E_0 est également donnée en unité $k_B T$.

Dans le cas des configurations non-symétriques (MeT/T, MeT/A et A/T), l'aire moléculaire pertinente est la plus grande des deux.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau III-3.

	NTA/NTA	MeT/T	MeT/A	A/A	T/T	A/T
E_0 (mJ/m ²)	4	5,9	4,7	10,6	9,1	23,3
σ (nm ² /molécule)	0,56	0,56	0,63	0,63	0,56	0,63
n_H	1	1	1	2	2	2
e_H (k _B T/liaison)	0,8	1,1	1	1,1	0,9	2
e_H (kcal/mol)	0,5	0,6	0,6	0,6	0,5	1,2

Tableau III-3 : Valeurs des énergies d'adhésion macroscopiques E_0 mesurées entre les différentes monocouches lipidiques étudiées et valeurs des énergies e_H associées à la rupture d'une liaison hydrogène dans l'eau pure ; e_H est calculée à partir de l'équation III-21 connaissant l'aire par tête polaire σ et le nombre de sites hydrogène liés n_H .

Pour le système A/T, nous avons considéré que les liaisons hydrogène de type NH---O et NH---N possédaient la même énergie. La force d'une liaison hydrogène dépend en effet essentiellement de l'électronégativité du donneur (chapitre I-2-4-1). L'approximation a été validée *a posteriori* puisque nous avons trouvé la même valeur d'énergie pour les liaisons hydrogène des systèmes MeT/T, MeT/A et T/T (NH---O) et pour celles du système A/A (NH---N). Par ailleurs, nous avons mesuré des énergies égales pour les liaisons hydrogène dont le donneur est un atome d'azote (cas des groupes amine des nucléosides : liaisons NH---O et NH---N) et pour celles dont le donneur est un atome d'oxygène (cas des groupes carboxyle du groupement NTA : liaisons OH---O). Excepté pour le système A/T, nous avons donc trouvé des valeurs égales (à la barre d'erreur près) pour les énergies des liaisons hydrogène impliquées dans les différents systèmes étudiés : de l'ordre de 1 k_BT (0,6 kcal/mol). On peut expliquer la plus grande énergie mesurée dans le cas A/T par une meilleure configuration géométrique de la liaison formée (angles et distances optimaux) et par l'existence éventuelle d'une troisième liaison hydrogène partielle entre les groupements A et T (représentée par les petits points dans la figure III-14f).

3. Conclusion

Les mesures de forces réalisées dans l'eau pure entre diverses monocouches lipidiques capables de former des liaisons hydrogène (monocouches des lipides NTA, A, T et MeT) ont conduit à une valeur reproductible de l'énergie d'une liaison hydrogène, à savoir $1 k_B T$ (0,6 kcal/mol). Cette énergie était indépendante de la nature de l'atome donneur (N ou O). Ces mesures de forces prouvent par ailleurs qu'il est énergétiquement plus favorable pour les têtes polaires de former des liaisons hydrogène entre elles plutôt qu'avec les molécules d'eau. Ce résultat est cohérent avec de précédentes études réalisées sur la stabilité des protéines, qui montraient que les liaisons hydrogène intramoléculaires au sein d'une protéine repliée étaient énergétiquement plus favorables que les liaisons hydrogène avec les molécules d'eau au sein d'une protéine dépliée ; la contribution des liaisons hydrogène à la stabilisation des protéines globulaires avait alors été estimée à 1 kcal/mol par liaison intramoléculaire formée. Mais dans nos expériences, les liaisons hydrogène sont bien isolées et leur énergie de liaison est directement mesurée, ce qui n'est pas le cas dans les expériences impliquant des protéines, dont la structure est bien plus complexe. Ces nouveaux résultats donnent donc une estimation plus précise de la contribution énergétique des liaisons hydrogène au phénomène de repliement des protéines. Cette approche pourrait être complémentaire d'autres méthodes à savoir les simulations sur des composés modèles et les études de mutagenèse dirigée sur site. Elle pourrait également être utilisée pour d'autres systèmes présentant des liaisons hydrogène comme les acides nucléiques ou certains systèmes colloïdaux.

Chapitre IV : Mesure d'une Liaison par Chélation

Les méthodes de purification et d'analyse structurale des protéines nécessitent que ces dernières soient préalablement immobilisées sur un support solide ou à l'interface eau-air. Une technique d'ancrage très utilisée consiste à mettre à profit la forte affinité existant entre la molécule d'histidine et l'ion nickel. Il est en effet possible, par manipulation génétique, de modifier la séquence de certaines protéines dont on a identifié le gène en ajoutant à leur extrémité N- ou C-terminale une ou plusieurs molécules d'histidine ; on parle alors de protéine "his-taguée". L'utilisation d'un support fonctionnalisé au nickel permet alors l'immobilisation de ces protéines "his-taguées". La capacité qu'ont les groupements nitrilotriacétate (NTA) à chélater des ions métalliques comme le nickel a été à cet égard très largement mise à profit. Des supports solides comprenant des complexes NTA-Ni ont ainsi déjà été utilisés dans de nombreux problèmes de purification de protéines par chromatographie d'affinité (stratégie IMAC pour "Immobilized Metal Affinity Chromatography"). En utilisant des monocouches de lipide dont la tête hydrophile contient un complexe NTA-Ni, il a également été possible d'utiliser la reconnaissance histidine-nickel pour produire des cristallisations bidimensionnelles de protéines à l'interface eau-air.

Sur le plan chimique, l'ion nickel est alors partagé entre le groupement NTA et les deux motifs imidazole présents sur la chaîne latérale des molécules d'histidine (figure II-13). Mais la manipulation génétique qui consiste à ajouter des molécules d'histidine à la séquence des protéines s'est avérée être parfois très délicate voire impossible. De plus, la méthode n'est applicable qu'aux protéines dont le gène a été préalablement identifié et cloné. Une alternative à cette méthode consiste à utiliser le ligand de la protéine comme outil de greffage. Cette nouvelle stratégie permettrait de travailler sur des protéines dans leur état naturel et de s'affranchir des lourdes étapes de manipulation génétique. Elle consiste à utiliser un ligand naturel de la protéine sur lequel on aurait greffé un motif capable d'interagir avec le support (figure IV-1) ; ce nouveau composé jouerait ainsi un rôle de relais entre la protéine et le support sur lequel on souhaite l'immobiliser.

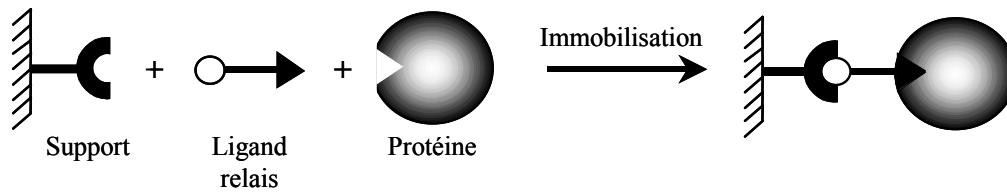


Figure IV-1 : Utilisation d'un ligand relais pour l'immobilisation des protéines.

Le choix du motif à greffer sur le ligand naturel s'est encore une fois porté sur un composé capable de chélater des ions métalliques. Ce type de composé devrait en effet pouvoir se lier à un composé homologue par partage de l'ion métallique. Des études préliminaires de spectrométrie de masse et de microscopie électronique (Laboratoire de Synthèse Bioorganique à Strasbourg) effectuées sur des groupements NTA ont montré que ces composés avaient effectivement tendance à former des dimères en présence d'un défaut d'ion nickel. La stratégie consisterait donc à greffer un groupement chélatant à l'extrémité du ligand et à fonctionnaliser le support avec le groupement homologue complexé avec l'ion métallique (figure IV-2).

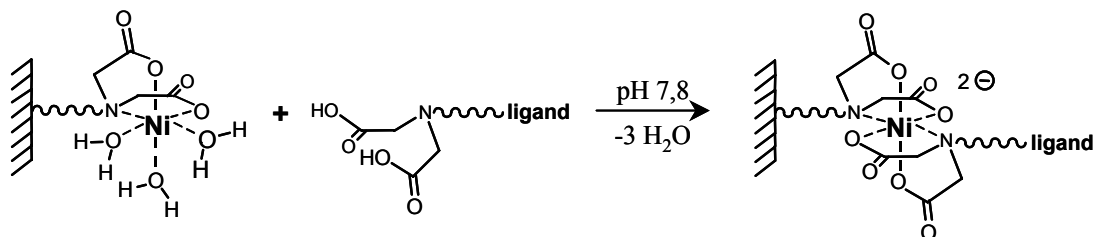


Figure IV-2 : Fixation par dimérisation de composés chélatants.

Afin que cette méthode soit efficace, il est nécessaire que la liaison entre les deux groupements chélatants soit suffisamment forte. C'est pourquoi nous avons voulu mesurer l'énergie de liaison entre deux groupements NTA se partageant un ion nickel. Cette mesure contribuera à la validation de la méthode et permettra d'obtenir une borne inférieure à l'énergie de chélation de l'ion nickel par un groupement NTA.

L'estimation de l'énergie associée au phénomène de chélation présente également un intérêt sur le plan fondamental. Les liaisons par chélation interviennent par exemple lors de certains phénomènes de reconnaissance entre macromolécules biologiques : lors du mécanisme de réplication génétique, la liaison des récepteurs à l'élément de réponse de l'ADN se fait par l'intermédiaire d'une structure en "doigts de zinc" de la surface du

récepteur qui vient s'incruster dans les sillons de la molécule d'ADN (chapitre I-3-2-1). Cette structure en "doigts de zinc" est stabilisée par une liaison par chélation. De même l'absorption des minéraux par l'organisme ne peut se faire que si ces derniers se sont préalablement liés par chélation à des acides aminés particuliers capables d'assurer leur transport. La chélation est également mise à profit à des fins thérapeutiques ou environnementales dans le but d'extraire les ions toxiques de certains organismes ou environnements contaminés.

Les mesures d'énergie d'adhésion ont été réalisées en SFA et par la technique des vésicules micromanipulées. La tête hydrophile des lipides utilisés était constituée d'un groupement NTA complexé ou non avec un ion nickel (figures II-11 et II-12). Afin d'obtenir un pH équivalent au pH physiologique, nous avons utilisé dans toutes nos expériences une solution aqueuse du tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane de concentration 10 mM. Cette solution a été purifiée au laboratoire ; nous l'appellerons plus simplement "Tris" dans le reste du manuscrit.

Après avoir vérifié que les lipides NTA et NTA-Ni peuvent former des couches stables dans le Tris, nous présenterons les résultats obtenus en SFA. Les profils de force seront ajustés à l'aide de fonctions exponentielles et polynomiales, qui permettront d'obtenir une moyenne statistique des comportements observés. Nous présenterons ensuite les résultats obtenus par la technique des vésicules micromanipulées. Pour chaque approche expérimentale, un modèle statistique simple sera développé afin d'obtenir une valeur de l'énergie associée à la liaison entre deux groupements NTA par partage d'un ion nickel.

1. Isothermes et stabilité des lipides NTA et NTA-Ni dans le Tris

Cette première partie présente les expériences préliminaires qui ont permis de s'assurer que des mesures de forces pouvaient être réalisées dans le Tris avec les lipides NTA et NTA-Ni. Notamment il fallait déterminer la pression de collapse des monocouches qu'ils forment à l'interface Tris-air et également vérifier la stabilité des bicouches DMPE/NTA et DMPE/NTA-Ni lorsqu'elles sont plongées dans le Tris. Ces expériences sont identiques à celles qui avaient été réalisées dans l'eau pure. Aussi nous

présenterons essentiellement ici les résultats obtenus ; le lecteur pourra trouver le détail des protocoles expérimentaux suivis dans le chapitre III-1-1.

1-1. Isothermes des lipides NTA et NTA-Ni à l'interface Tris-air

Au début de chaque expérience, la solution de Tris était filtrée à $0,22\ \mu\text{m}$ puis dégazée pendant 30 minutes par sonication et aspiration par une trompe à eau. Cette solution était ensuite versée dans la cuve de Langmuir et les lipides étaient déposés à l'interface Tris-air. On attendait alors 20 minutes afin que le chloroforme s'évapore puis on lançait les mesures isothermes (figure IV-3).

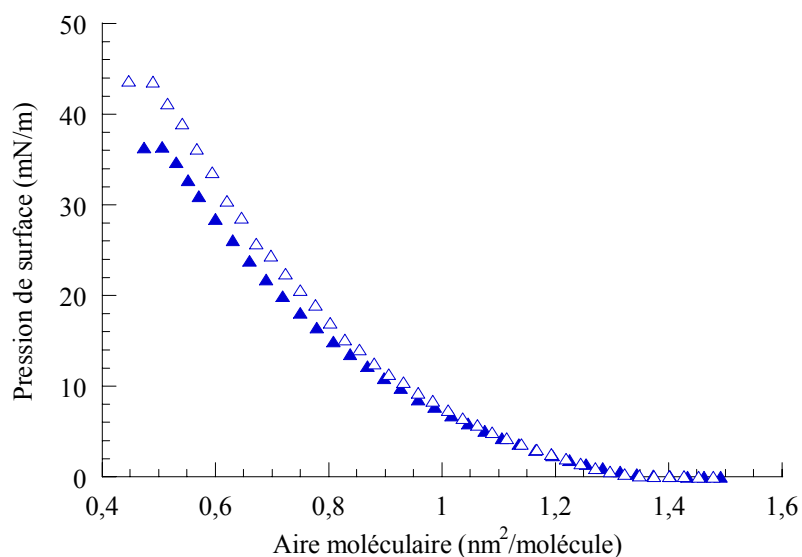


Figure IV-3 : Isothermes des lipides NTA (triangles pleins) et NTA-Ni (triangles vides) déposés à l'interface Tris-air. Les courbes obtenues sont caractéristiques de lipides se trouvant en phase fluide. Les pressions de collapse des lipides NTA et NTA-Ni valent respectivement 36 mN/m et 42 mN/m.

Les isothermes obtenues pour les lipides NTA et NTA-Ni sur le Tris ne présentent pas de plateau caractéristique d'un changement de phase et sont donc représentatives de lipides se trouvant en phase fluide. Les lipides pourront donc diffuser librement au sein de leur monocouche et choisir ainsi une position optimale pour interagir avec les lipides de l'autre monocouche. On observe à nouveau que la monocouche de lipide NTA se compacte davantage, au niveau des petites aires moléculaires, que la monocouche de lipide NTA-Ni et que sa pression de collapse est plus basse (chapitre III-1-1). Lors des

mesures de forces, on dépose à la pression de surface la plus grande possible en faisant en sorte de choisir la même pour les deux lipides. On se placera donc juste en dessous de la pression de collapse du lipide NTA, c'est-à-dire à 35 mN/m. A cette pression, d'après les isothermes obtenues, les aires moléculaires des lipides NTA et NTA-Ni sont respectivement :

$$\sigma_{\text{NTA}} = 0,53 \text{ nm}^2 \quad (\text{IV-1})$$

Et :

$$\sigma_{\text{NTA-Ni}} = 0,58 \text{ nm}^2 \quad (\text{IV-2})$$

1-2. Stabilité des monocouches NTA et NTA-Ni à l'interface Tris-air

Nous avons formé des monocouches de lipide NTA et NTA-Ni à l'interface Tris-air et nous les avons soumises à une pression de surface de 35 mN/m pendant 6 heures, qui est la durée typique d'une expérience SFA. Le système d'asservissement en pression permettait de conserver une aire moléculaire constante durant tout le déroulement de l'expérience. Si l'on note x_0 et x_t les positions respectives du piston mobile au début de l'expérience et au bout du temps t , la proportion de lipides ayant quitté l'interface Tris-air au bout du temps t s'écrit :

$$p_t = 1 - \frac{x_t}{x_0} \quad (\text{IV-3})$$

Nous avons obtenu :

$$p_{t=6h}(\text{NTA}) = 0,05 \pm 0,02 \quad (\text{IV-4})$$

Et :

$$p_{t=6h}(\text{NTA-Ni}) = 0,06 \pm 0,02 \quad (\text{IV-5})$$

Les lipides NTA et NTA-Ni peuvent donc être considérés comme étant insolubles lorsqu'ils sont déposés à l'interface Tris-air.

1-3. Rapports de prélèvement et stabilité des bicouches dans le Tris

La cinétique de désorption des monocouches NTA et NTA-Ni n'est pas forcément la même lorsqu'elles sont déposées à une interface entre un milieu aqueux et l'air et lorsqu'elles sont fixées sur un substrat solide. Lors des expériences SFA, ces

monocouches sont déposées, par la technique de Langmuir-Blodgett, sur des monocouches de DMPE, elles-mêmes déposées sur une surface de mica. Pour analyser les mesures de forces en SFA, nous avons besoin de connaître la densité des lipides au sein des surfaces d'étude et également de nous assurer de la stabilité des bicouches formées.

Rapports de prélèvement

Les lipides ont été déposés sur une grande plaque de mica (environ 20 cm²) dans les mêmes conditions que lors du protocole suivi en SFA (chapitre IV-2-1) : la monocouche de DMPE a été déposée à l'interface eau-air puis transférée, à la pression de 38 mN/m, sur le mica et la monocouche de NTA ou NTA-Ni a été déposée à l'interface Tris-air puis transférée, à la pression de 35 mN/m, sur la monocouche de DMPE.

Le rapport de prélèvement du lipide DMPE a déjà été calculé dans le chapitre III-1-3-1 et vaut :

$$r_{\text{DMPE}} = \frac{\Delta A_{\text{DMPE}}}{2 A_{\text{mica}}} = 1,03 \pm 0,05 \quad (\text{IV-6})$$

Pour les lipides NTA et NTA-Ni, nous avons mesuré :

$$r_{\text{NTA et NTA-Ni}} = \frac{\Delta A_{\text{NTA (NTA-Ni)}}}{2 A_{\text{mica}}} = 0,96 \pm 0,03 \quad (\text{IV-7})$$

Où : ΔA_{DMPE} , ΔA_{NTA} et $\Delta A_{\text{NTA-Ni}}$ sont les aires qu'occupaient les monocouches de DMPE, NTA et NTA-Ni à l'interface Tris-air et A_{mica} est l'aire de la plaque de mica (les monocouches occupent l'aire $2A_{\text{mica}}$ sur la plaque de mica).

On constate donc que les monocouches de lipide NTA ou NTA-Ni ont tendance à se dilater lorsqu'elles quittent l'interface Tris-air pour aller se fixer sur les chaînes du DMPE.

On en déduit donc l'aire moléculaire des lipides NTA et NTA-Ni lorsqu'ils sont déposés à la surface du mica :

$$\sigma_{\text{NTA/mica}} = \frac{\sigma_{\text{NTA}}}{r_{\text{NTA}}} = 0,55 \text{ nm}^2 \quad (\text{IV-8})$$

Et :

$$\sigma_{\text{NTA-Ni/mica}} = \frac{\sigma_{\text{NTA-Ni}}}{r_{\text{NTA-Ni}}} = 0,60 \text{ nm}^2 \quad (\text{IV-9})$$

Où : σ_{NTA} et $\sigma_{\text{NTA-Ni}}$ sont les aires moléculaires des lipides NTA et NTA-Ni à l'interface Tris-air dans les conditions du dépôt de Langmuir-Blodgett (équation IV-1 et IV-2).

Stabilité des bicouches dans le Tris

La stabilité des bicouches supportées DMPE/NTA et DMPE/NTA-Ni a également pu être vérifiée dans le Tris. L'expérience, identique à celle qui avait été réalisée dans l'eau pure, a mis en évidence une perte d'environ 1% de lipide par heure.

Les résultats obtenus lors de ces différentes expériences préliminaires sont sensiblement identiques à ceux qui avaient été obtenus dans l'eau pure. Nous avons pu vérifier la fluidité des lipides NTA et NTA-Ni et la stabilité des monocouches qu'ils peuvent former à l'interface Tris-air ou sur une monocouche de DMPE, elle-même déposée sur du mica. Les rapports de prélèvement mesurés sont proches de 1, ce qui nous assure que les lipides formeront des monocouches bien compactes à la surface du mica.

2. Mesures de forces dans le Tris

Toutes les mesures de forces présentées ici ont été réalisées dans une solution aqueuse du tampon Tris, dégazée, de concentration 10 mM et de pH 8. La monocouche utilisée afin de rendre le mica hydrophobe était constituée du lipide DMPE, déposé à 38 mN/m. La deuxième monocouche était constituée soit du lipide NTA soit du lipide NTA-Ni, tous deux déposés à 35 mN/m. Les dépôts de Langmuir-Blodgett ont été effectués dans l'eau pure pour la monocouche de DMPE et dans le Tris pour les monocouches de NTA et NTA-Ni. Trois configurations expérimentales distinctes ont été utilisées afin d'évaluer l'énergie de liaison entre deux groupements NTA par partage d'un ion nickel. Elles différaient par la nature complexée ou non au nickel des deux surfaces mises en vis-à-vis. Nous avons donc étudié les trois configurations : NTA/NTA, NTA/NTA-Ni et NTA-Ni/NTA-Ni (figure IV-4).

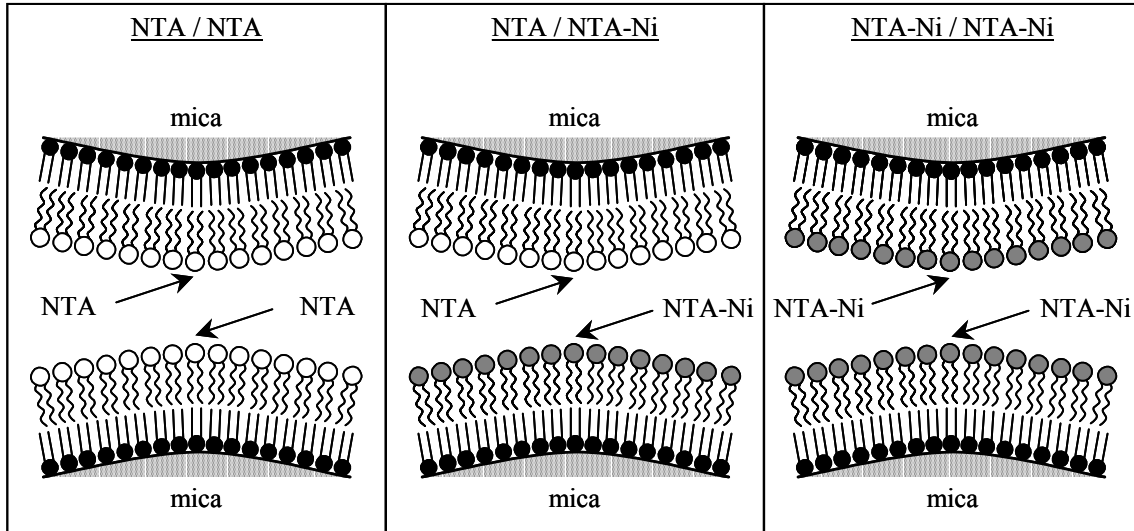


Figure IV-4 : Configurations expérimentales utilisées afin d'évaluer l'énergie de liaison entre deux groupements NTA par partage d'un ion nickel. La première monocouche est constituée du lipide DMPE, déposé en phase solide à 38 mN/m et la deuxième monocouche est constituée des lipides NTA ou NTA-Ni, tous deux déposés en phase fluide à 35 mN/m.

2-1. Profils de force NTA/NTA, NTA/NTA-Ni et NTA-Ni/NTA-Ni

Pour chaque configuration expérimentale, l'expérience a été répétée pour au moins trois couples de bicouches différents. A chaque fois au moins deux positions différentes ont été testées et pour chaque position au moins trois allers-retours successifs ont été réalisés. Un résultat type obtenu pour chaque configuration expérimentale est donnée dans la figure IV-5. Les courbes représentent le rapport de la force F mesurée entre les deux surfaces au rayon de courbure R de ces surfaces ; ce rapport est proportionnel à l'énergie d'interaction entre deux plans (chapitre II-2-5). L'origine de la distance ($D = 0$) correspond à la situation de contact hydrophobe entre les chaînes du lipide DMPE. Les mesures étaient commencées à partir d'une distance $D = 200$ nm. Lorsqu'une force est détectée au delà de 200 nm, il s'agit d'une contamination et l'expérience doit être recommencée. Pour plus de clarté nous n'avons représenté les mesures qu'à partir d'une distance de 100 nm.

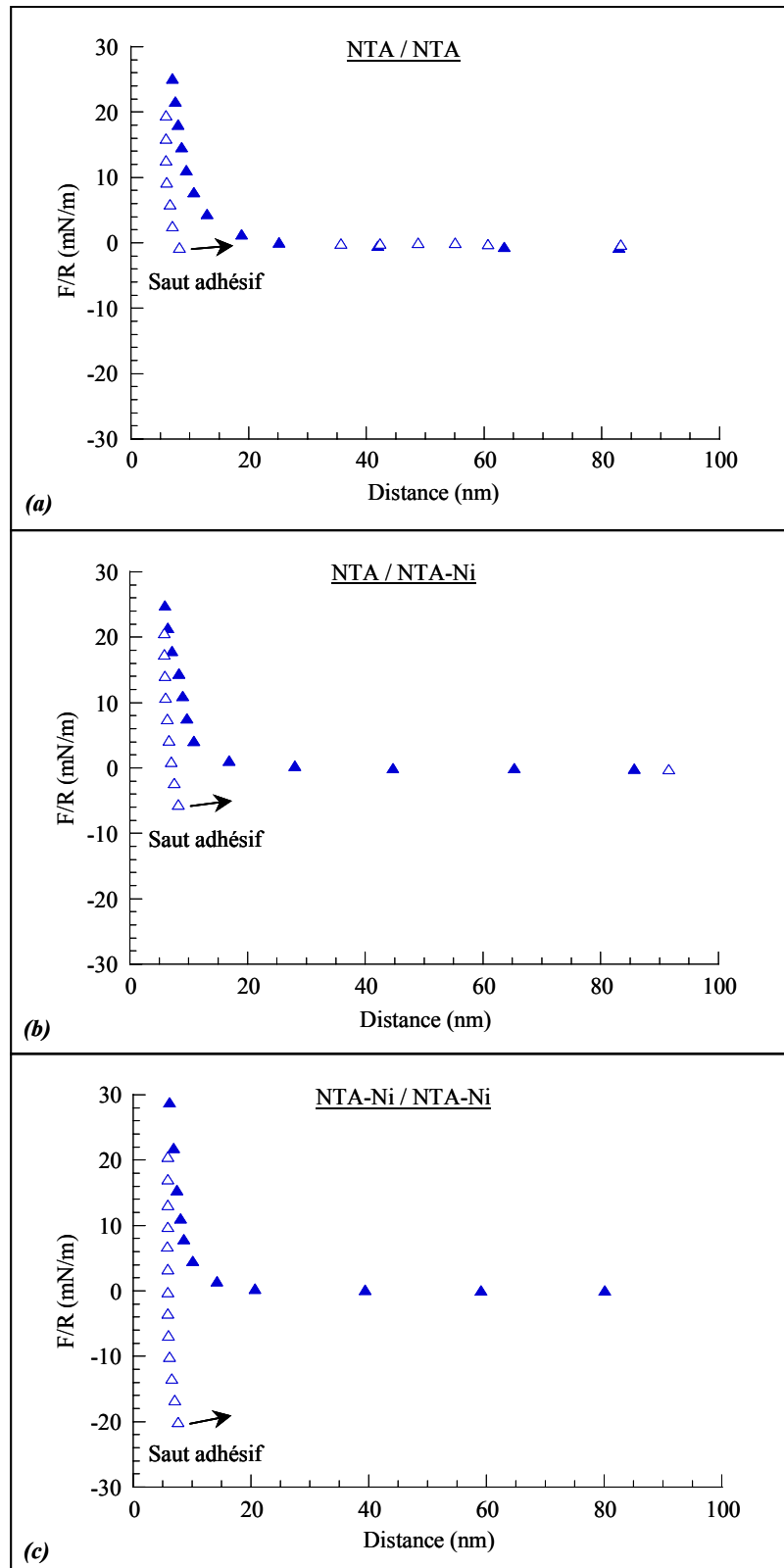


Figure IV-5 : Profils de force obtenus dans le Tris pour les configurations NTA/NTA (a), NTA/NTA-Ni (b) et NTA-Ni/NTA-Ni (c). Rapprochement des surfaces : triangles pleins, séparation des surfaces : triangles vides.

Pour les trois systèmes aucune force n'est détectée entre 200 nm et 20 nm environ. A partir de 20 nm une force de nature répulsive apparaît. Cette force correspond à la répulsion électrostatique entre les têtes hydrophiles chargées des lipides. Aux alentours de 8-9 nm vient s'ajouter à la répulsion électrostatique une répulsion de nature stérique liée à la mobilité des têtes hydrophiles, qui sont accrochées aux chaînes hydrophobes *via* un bras espaceur flexible. Le contact entre les deux monocouches est obtenu pour une distance de 6 nm. Cette distance correspond à l'épaisseur de deux monocouches compactes de lipide NTA ou NTA-Ni dont les têtes hydrophiles sont habillées de molécules d'eau et éventuellement de certains des contre-ions présents en solution : ions de l'électrolyte, ions provenant de certaines parties de l'appareil (verre, téflon, inox, *etc.*). Au début de la phase retour la distance ne varie quasiment pas jusqu'à ce qu'une force suffisamment importante soit appliquée entre les deux surfaces. La distance augmente alors à nouveau légèrement sur une échelle de 1 à 2 nm puis les surfaces se séparent brusquement et se retrouvent loin l'une de l'autre (saut adhésif). Ce saut est la marque d'un phénomène d'adhésion entre les deux surfaces ; la force à laquelle le saut adhésif a lieu est appelée force de séparation et est notée F_0 . L'augmentation de la distance lors de la phase retour, juste avant le saut adhésif, est liée à l'extension des chaînes hydrophobes et du bras espaceur des lipides. Selon l'importance de l'énergie d'adhésion entre les deux surfaces, le saut s'effectue sur une distance plus ou moins grande. Ainsi, dans le cas du système NTA-Ni/NTA-Ni, le saut a lieu jusqu'à une distance d'environ 250 nm et n'est pas visible à l'échelle de la figure IV-5c.

Le profil de force obtenu dans le cas de la configuration NTA/NTA montre qu'il subsiste encore des liaisons hydrogène entre les groupements carboxyle (chapitre III). A pH 8, on s'attendait à ce qu'ils soient tous ionisés mais si tel avait été le cas, la seule contribution à l'énergie d'adhésion aurait été celle des forces de van der Waals et le saut adhésif n'aurait pas été aussi important. Ce point sera précisé dans le chapitre IV-2-3-4 lorsque nous calculerons la force de séparation effective entre les deux surfaces, c'est-à-dire la force de séparation tenant compte des répulsions observées à l'aller.

Lorsque l'une des deux monocouches est fonctionnalisée avec du nickel, on mesure une énergie d'adhésion plus grande. C'est la preuve expérimentale qu'il existe une nouvelle source de liaison entre les deux surfaces. Ces liaisons sont des liaisons par chélation se

formant entre l'ion nickel d'un groupement NTA-Ni d'une surface et un groupement NTA de l'autre surface ; l'ion nickel est alors partagé par deux groupements NTA distincts. Ces liaisons ont pu être observées également dans l'eau pure comme l'explique la remarque ci-dessous.

Remarque – Chélation dans l'eau pure

Des mesures de forces ont également été réalisées dans l'eau pure entre une monocouche de lipide NTA et une monocouche de lipide NTA-Ni ; elles ont conduit à une énergie d'adhésion du même ordre de grandeur que celle mesurée entre deux monocouches de lipide NTA (figures III-6a et IV-6). Or, les groupements NTA-Ni ne possédant plus la fonction donneur de liaison hydrogène, nous nous attendions à mesurer une énergie d'adhésion plus faible lorsque l'une des deux monocouches était fonctionnalisée au nickel. Le nombre réduit de liaisons hydrogène a en fait été compensé par l'existence de liaisons par chélation entre les groupements NTA-Ni et les groupements NTA (figure IV-7).

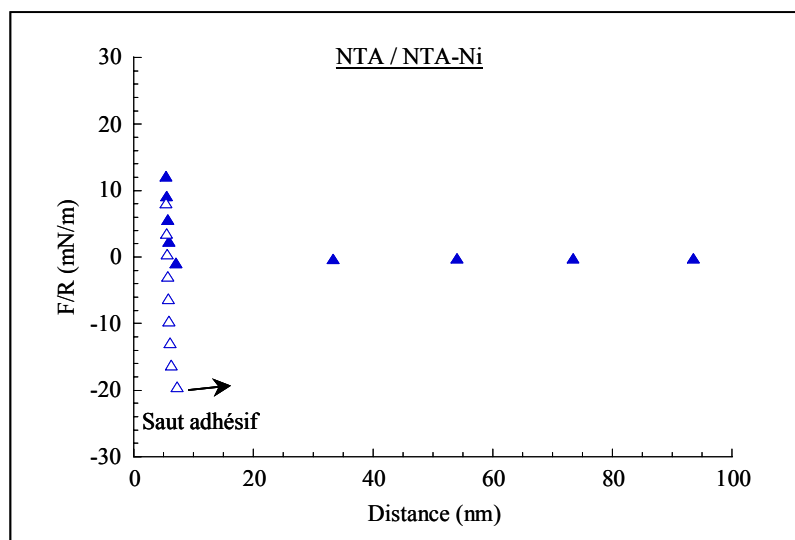


Figure IV-6 : Profil de force obtenu dans l'eau pure entre une monocouche de lipide NTA et une monocouche de lipide NTA-Ni. L'énergie d'adhésion est du même ordre de grandeur que celle qui avait été obtenue entre deux monocouches de lipide NTA (figure III-6a). Cette adhésion est due au partage des ions nickel par les groupements NTA des deux surfaces. Triangles pleins : rapprochement des surfaces, triangles vides : séparation des surfaces.

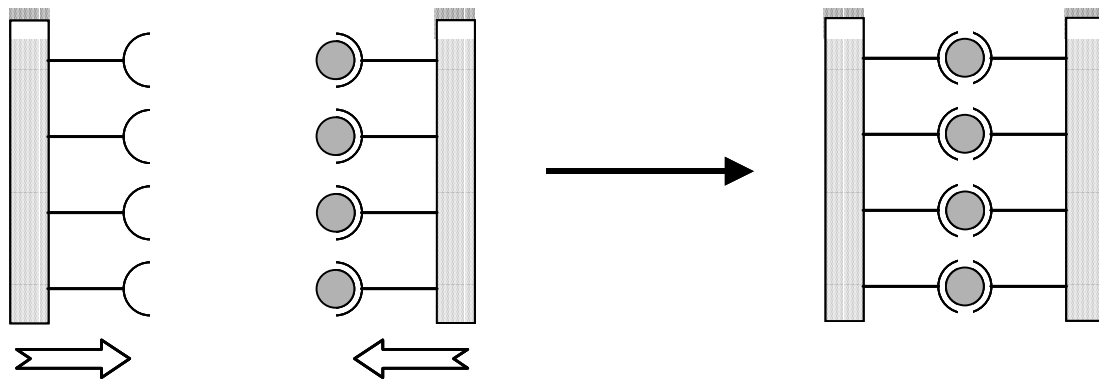


Figure IV-7 : Représentation schématique de la liaison par partage des ions nickel entre une monocouche de lipide NTA et une monocouche de lipide NTA-Ni (cas de l'eau pure).

Lorsque les deux monocouches sont fonctionnalisées avec du nickel, on mesure l'énergie d'adhésion la plus grande des trois configurations expérimentales étudiées. Le comportement est donc différent de celui qui avait été obtenu dans l'eau pure où les liaisons hydrogène étaient bloquées par la présence de l'ion nickel dans la cage NTA. Il semblerait donc qu'en présence de Tris une grande proportion des groupements NTA-Ni perdent leur ion nickel et que l'on mesure ainsi une énergie d'adhésion due à l'effet combiné des liaisons hydrogène (entre deux groupements NTA) et des liaisons par chélation (entre un groupement NTA-Ni et un groupement NTA). La constante de complexation du Tris aux ions métalliques en général, et aux ions nickel en particulier, est censée être relativement faible mais tout se passe comme si le Tris pouvait fixer l'ion nickel et se placer ainsi en compétiteur vis-à-vis du groupement NTA.

Remarque – “Refonctionnalisation” des lipides NTA-Ni

Nous avons tenté de “refonctionnaliser” les monocouches de lipide NTA-Ni en injectant du chlorure de nickel NiCl_2 directement dans la cuve du SFA, à proximité des deux surfaces d'étude. Mais cette opération s'est révélée infructueuse ; de plus, les ions issus de la décomposition de ce sel, et notamment les ions chlorure, avaient tendance à apporter des contaminations à la solution.

Les énergies d'adhésion mesurées entre deux monocouches de NTA sont donc dues aux seuls liaisons hydrogène alors que celles mesurées entre une monocouche NTA et une

monocouche NTA-Ni ou entre deux monocouches de NTA-Ni sont dues aux liaisons hydrogène et aux liaisons par chélation. Afin d'obtenir une valeur de l'énergie associée au phénomène de chélation, nous devons déduire la contribution des liaisons hydrogène. Nous devons également prendre en compte la contribution des différentes forces répulsives observées à l'aller (électrostatiques et stériques) et qui sont indépendantes du phénomène de chélation.

2-2. Répulsion électrostatique double-couche et répulsion stérique

Cette partie a pour objectif de présenter un peu plus en détail mais d'une façon relativement qualitative les différentes répulsions observées lors du rapprochement des monocouches dans le Tris. Les phénomènes seront illustrés à partir d'un comportement type obtenu pour le système NTA-Ni/NTA-Ni. Un traitement statistique (et donc plus quantitatif) des résultats obtenus pour les trois systèmes sera présenté dans le chapitre IV-2-3 ; ce traitement statistique permettra de déterminer l'énergie associée aux liaisons se formant entre les surfaces.

2-2-1. Répulsion électrostatique double-couche

La répulsion électrostatique entre les bicouches apparaît, pour les trois configurations, aux alentours de 20 nm. Son effet se fait sentir jusqu'à la situation de contact entre les têtes hydrophiles et dure pendant toute la phase de séparation, jusqu'au moment du saut adhésif. A son effet vient s'ajouter aux environs de 8-9 nm celui d'une répulsion de nature stérique entre les têtes hydrophiles mobiles des lipides. Le moment où la répulsion de nature stérique commence à intervenir est visible sur les courbes expérimentales de la phase de rapprochement par l'apparition d'une rupture de pente dans le profil de force. La figure IV-8 donne un profil répulsif type obtenu pour la configuration NTA-Ni/NTA-Ni. La partie de la courbe comprise entre 20 nm et 8-9 nm présente un profil exponentiel caractéristique d'une interaction électrostatique double-couche entre deux bicouches chargées. La longueur de décroissance obtenue (environ 4 nm) est tout à fait compatible avec la concentration de l'électrolyte ; nous en reparlerons dans le chapitre IV-2-3-1.

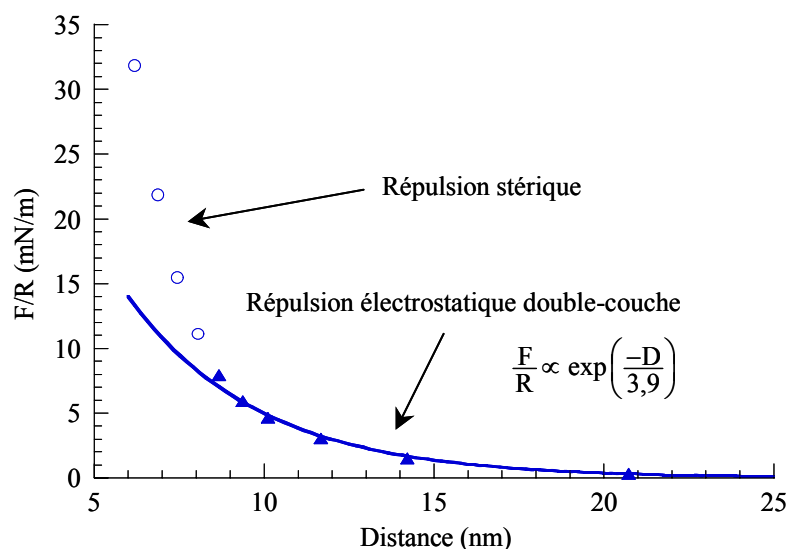


Figure IV-8 : Force de répulsion électrostatique double-couche (triangles pleins) et force de répulsion stérique (cercles vides) entre deux monocouches de lipide NTA-Ni.

2-2-2. Répulsion stérique

La partie de la courbe comprise entre 8-9 nm et 6 nm comprend la superposition de l'interaction électrostatique double-couche et de l'interaction de nature stérique. Afin de connaître la contribution de la répulsion de nature stérique, nous avons appliqué la fonction représentative du profil exponentiel caractérisant la répulsion électrostatique aux valeurs de distances expérimentales comprises entre 9 nm et 6 nm. Les résultats obtenus ont ensuite été soustraits aux valeurs de force mesurées à ces distances. Le profil de force résultant est exponentiel avec une longueur de décroissance de 0,8 nm (figure IV-9). Le même travail a été réalisé sur différentes courbes expérimentales et pour les trois configurations étudiées. Nous avons obtenu à chaque fois un profil exponentiel ayant une longueur de décroissance de l'ordre de 0,8 nm.

Remarque – Les lipides à tête flexible traités comme des polymères

Un modèle permettant de comprendre l'origine de cette répulsion consiste à assimiler l'ensemble constitué du bras espaceur et de la tête hydrophile à un polymère flexible. Afin d'estimer le rayon de Flory de ce polymère, on calcule celui du bras espaceur

auquel on ajoute la taille de la tête hydrophile, que l'on considère comme étant un objet rigide. Le bras espaceur est constitué d'un enchaînement de 9 liaisons : 5 liaisons C-C, 2 liaisons C-O et 2 liaisons C-N. Chacune de ces liaisons possède une longueur d'environ 0,15 nm. Une estimation du rayon de Flory du bras espaceur est donc donnée par (chapitre I-2-2-4) :

$$R_F \cong 0,15 \times (9)^{3/5} \cong 0,6 \text{ nm} \quad (\text{IV-10})$$

La tête NTA mesure quant à elle environ 0,6 nm. Le rayon de Flory R'_F de l'ensemble vaut donc environ 1,2 nm. Pour deux surfaces recouvertes d'une brosse de polymères, on attend un profil d'interaction exponentiel ayant une longueur de décroissance :

$$\frac{L}{\pi} = \frac{1}{\pi} s^{-2/3} R'_F{}^{5/3} \quad (\text{IV-11})$$

Où : s est la distance moyenne séparant les sites de fixation des bras espaceurs sur les chaînes hydrophobes.

Le paramètre s est très difficile à estimer. On connaît néanmoins l'aire moléculaire des lipides NTA et NTA-Ni, qui est de l'ordre de 0,6 nm². On peut donc estimer la longueur s par :

$$s \cong \sqrt{0,6} \cong 0,8 \text{ nm} \quad (\text{IV-12})$$

On s'attend donc à trouver une longueur de décroissance :

$$\frac{L}{\pi} \cong \frac{1}{\pi} (0,8)^{-2/3} (1,2)^{5/3} \cong 0,5 \text{ nm} \quad (\text{IV-13})$$

Expérimentalement nous avons trouvé une longueur de décroissance un peu plus grande mais qui est néanmoins du même ordre de grandeur. Il aurait fallu avoir plus de points expérimentaux dans la région correspondant au phénomène de répulsion stérique afin de pouvoir mieux ajuster les courbes expérimentales et ainsi obtenir un meilleur accord avec le modèle théorique.

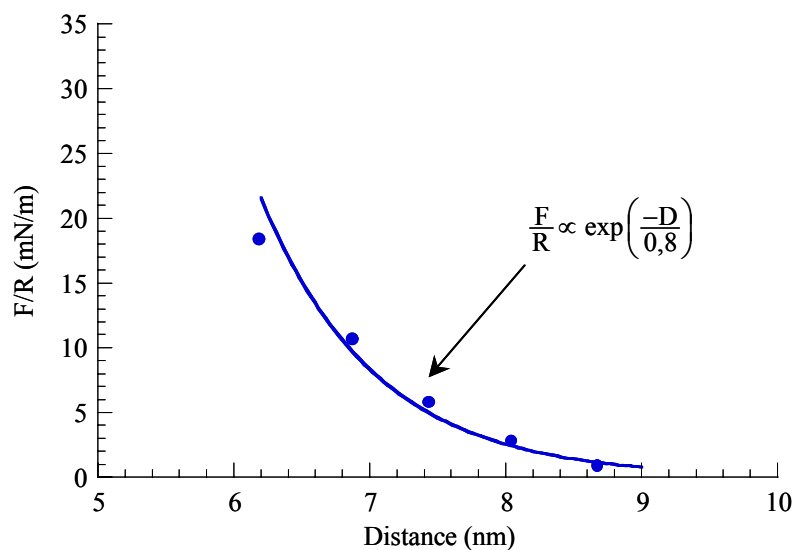


Figure IV-9 : Contribution de la répulsion de nature stérique à l'énergie d'interaction dans le Tris entre deux monocouches de lipide NTA-Ni.

2-3. Traitement statistique des courbes expérimentales

La répulsion électrostatique entre les bicouches s'est avérée être d'autant plus importante qu'il y avait moins d'ions nickel sur les surfaces (figure IV-5). Afin de pouvoir comparer les énergies d'adhésion mesurées pour les différents systèmes étudiés, il faudra tenir compte de la contribution de cette répulsion lors de la phase de séparation entre les surfaces menant jusqu'au saut adhésif.

Un traitement statistique des résultats expérimentaux a été réalisé afin d'obtenir un comportement moyen pour chacune des trois configurations étudiées. Nous vérifierons dans cette partie que les profils issus de ce traitement statistique sont compatibles avec la composition de l'électrolyte utilisé et nous déterminerons l'état de charge des surfaces. Nous estimerons ensuite à partir de ces profils, et pour chaque configuration expérimentale, la contribution des liaisons (hydrogène et chélation) aux énergies d'adhésion mesurées entre les surfaces.

2-3-1. Comportement moyen pour chaque configuration expérimentale

La partie de chaque courbe expérimentale correspondant à la répulsion électrostatique a été ajustée par une courbe exponentielle. Pour chaque configuration expérimentale, nous avons ensuite effectué une moyenne des différents comportements exponentiels obtenus et déduit ainsi un comportement moyen pour la répulsion électrostatique. Le même travail a été réalisé pour la phase de séparation entre les surfaces. Cette fois les courbes expérimentales ont été ajustées par des courbes polynomiales. Ces fonctions polynomiales n'avaient pas de sens sur le plan physique mais elles ont permis d'obtenir une bonne estimation de l'énergie à laquelle les sauts adhésifs avaient lieu (figure IV-10).

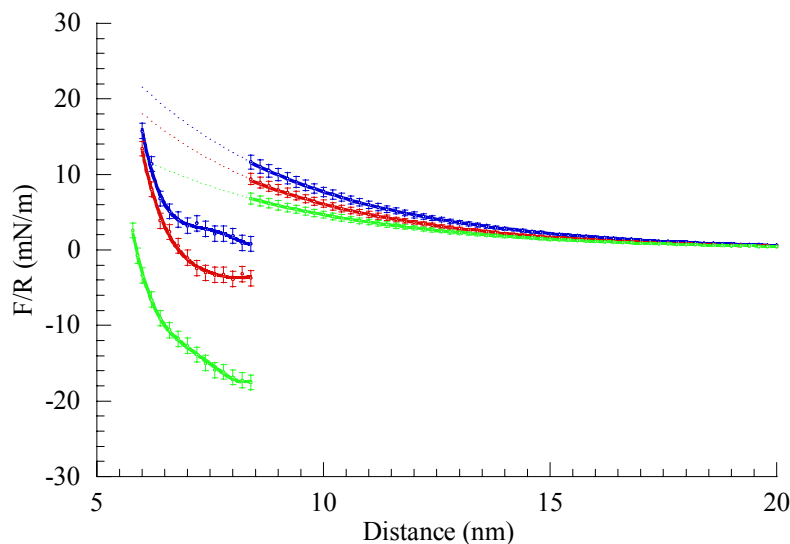


Figure IV-10 : Comportement moyen obtenu pour l'interaction électrostatique double-couche et pour la phase de séparation entre les surfaces dans les différentes configurations étudiées (bleu : NTA/NTA, rouge : NTA/NTA-Ni, vert : NTA-Ni/NTA-Ni). Les traits pointillés correspondent à l'extrapolation de la répulsion électrostatique dans le domaine des distances où la répulsion stérique intervient.

2-3-2. Longueur de Debye

Les trois systèmes présentent un profil de répulsion électrostatique dont la longueur de décroissance est de l'ordre de 4 nm. Nous allons vérifier que ce résultat est en accord avec la composition de l'électrolyte utilisé.

Les expériences ont été réalisées dans une solution de Tris de pH 8 et de concentration 10 mM. Les ions présents en solution sont : les ions hydronium (H_3O^+) et les ions chlorure (Cl^-) tous deux issus de la décomposition de l'acide chlorhydrique (HCl) ainsi que les ions $(\text{HOCH}_2)_3\equiv\text{CNH}_3^+$ issus de la décomposition du Tris $((\text{HOCH}_2)_3\equiv\text{CNH}_2)$. La réaction de décomposition du Tris s'écrit :



Où :

$$K_b = \frac{[(\text{HOCH}_2)_3\equiv\text{CNH}_3^+][\text{OH}^-]}{[(\text{HOCH}_2)_3\equiv\text{CNH}_2]} \quad (\text{IV-15})$$

Or :

$$\text{p}K_b = 14 - \text{p}K_a = 14 - 8,1 \cong 14 - \text{pH} \cong \text{pOH} \quad (\text{IV-16})$$

Et :

$$\text{p}K_b = -\log[(\text{HOCH}_2)_3\equiv\text{CNH}_3^+] + \text{pOH} + \log[(\text{HOCH}_2)_3\equiv\text{CNH}_2] \quad (\text{IV-17})$$

A l'état d'équilibre, on a donc, en symbolisant les états initiaux et finaux par les lettres i et f :

$$[(\text{HOCH}_2)_3\equiv\text{CNH}_2]_f \cong [(\text{HOCH}_2)_3\equiv\text{CNH}_3^+]_f \quad (\text{IV-18})$$

D'où :

$$[(\text{HOCH}_2)_3\equiv\text{CNH}_3^+]_f \cong \frac{1}{2} [(\text{HOCH}_2)_3\equiv\text{CNH}_2]_i \cong 5 \text{ mM} \quad (\text{IV-19})$$

La relation d'électroneutralité de la solution d'électrolyte s'écrit par ailleurs :

$$[(\text{HOCH}_2)_3\equiv\text{CNH}_3^+]_f + [\text{H}_3\text{O}^+]_f = [\text{Cl}^-]_f \quad (\text{IV-20})$$

Or :

$$[\text{H}_3\text{O}^+]_f = 10^{-\text{pH}} = 10^{-8} \text{ M} \quad (\text{IV-21})$$

D'où :

$$[(\text{HOCH}_2)_3\equiv\text{CNH}_3^+]_f \cong [\text{Cl}^-]_f \quad (\text{IV-22})$$

Le couple $((\text{HOCH}_2)_3\equiv\text{CNH}_3^+, \text{Cl}^-)$ peut donc être traité comme un électrolyte 1:1 dont la longueur de Debye est donnée par (chapitre I-2-1) :

$$\lambda_D = \frac{0,304}{\sqrt{[(\text{HOCH}_2)_3\equiv\text{CNH}_3^+]_f}} \cong \frac{0,304}{\sqrt{5 \cdot 10^{-3}}} \cong 4,3 \text{ nm} \quad (\text{IV-23})$$

Cette longueur de Debye est bien en accord avec les résultats expérimentaux obtenus.

2-3-3. Densités de charge des surfaces

Les profils issus du traitement statistique nous permettent également de déterminer l'état de charge des surfaces étudiées. La théorie prévoit en effet pour l'interaction électrostatique double-couche un profil de la forme (chapitre I-2-1) :

$$\frac{F}{R} = \frac{4\pi \lambda_D \Sigma^2}{\epsilon_0 \epsilon_r} \exp\left[-\frac{(D-6)}{\lambda_D}\right] \quad (\text{IV-24})$$

Où : $\epsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 \cdot \text{J}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$ (permittivité du vide) et $\epsilon_r = 78,4$ (en admettant que la permittivité relative du milieu soit égale à celle de l'eau) et où Σ est la densité de charge des surfaces.

L'origine des distances a été décalée de 6 nm afin de tenir compte du fait que les mesures de distances comprennent la taille des deux monocouches de lipide NTA ou NTA-Ni (dans l'expression théorique, la distance correspond à celle séparant les têtes hydrophiles des deux monocouches).

L'extrapolation des courbes moyennes de répulsion électrostatique dans la région où la répulsion stérique intervient (traits pointillés de la figure IV-10) permet de connaître la force d'interaction électrostatique au contact ($D = 6 \text{ nm}$) et donc de déduire la densité de charge des surfaces (tableau IV-1) :

$$\Sigma = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r \frac{F(D=6\text{nm})}{R}}{4\pi \lambda_D}} \quad (\text{IV-25})$$

	NTA/NTA	NTA/NTA-Ni	NTA-Ni/NTA-Ni
$\frac{F}{R}$ (D=6nm) (mN/m)	21,5	18,0	12,1
Σ (C/m ²)	$1,7 \cdot 10^{-2}$	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$1,3 \cdot 10^{-2}$
Nombre de charges par molécule	$6,5 \cdot 10^{-2}$	$6,0 \cdot 10^{-2}$	$4,7 \cdot 10^{-2}$

Tableau IV-1 : Densités de charge Σ des surfaces calculées à partir de la force électrostatique au contact $F(D = 6 \text{ nm})/R$. Le nombre de charges par molécule est calculé à partir de la densité de charge Σ des surfaces connaissant l'aire moléculaire σ des lipides.

Les résultats obtenus sont assez surprenants : seule 1 molécule sur 20 est chargée, alors que les têtes NTA-Ni portent une charge globale négative (figure II-12) et qu'à pH 8 une grande proportion des groupes COOH des têtes NTA devraient se trouver sous la forme ionisée COO⁻. Le phénomène avait déjà été observé lors des expériences réalisées dans l'eau pure (chapitre III) et avait été attribué à une adsorption, sur les têtes hydrophiles, de contre-ions provenant de certaines parties de l'appareil (verre, téflon, inox, etc.). Cet effet est toujours présent dans le Tris où il faut en plus tenir compte de l'adsorption des cations (HOCH₂)₃CNH₃⁺ issus de la décomposition du Tris.

2-3-4. Forces de séparation effectives

La force nécessaire pour séparer deux surfaces en contact adhésif dépend de l'intensité des liaisons qui se sont créées entre les groupes fonctionnels présents sur ces surfaces mais également des différentes forces répulsives existant entre les deux surfaces. Les systèmes que nous avons étudiés étaient soumis à des forces de répulsion de nature électrostatique et stérique. Les forces stériques étaient indépendantes de la configuration étudiée mais les forces électrostatiques variaient d'une configuration à l'autre (chapitre

IV-2-2 et figure IV-10). Afin de pouvoir comparer entre elles les différentes forces de séparation mesurées, il est donc nécessaire de prendre en compte la contribution de la répulsion électrostatique. Cette contribution favorise la séparation des deux surfaces ; elle doit donc être ajoutée à la force de séparation mesurée afin d'obtenir une force de séparation effective $F_{0\text{eff}}/R$ (force de séparation que l'on aurait mesurée entre les deux surfaces si la répulsion électrostatique avait été absente). Les sauts adhésifs ayant lieu en moyenne à 8,5 nm, la contribution de la répulsion électrostatique est évaluée à cette distance. Dans le cas de la configuration NTA/NTA, le saut adhésif a lieu dans la région des forces positives, ce qui explique le signe négatif devant la valeur de la force de séparation (tableau IV-2).

	NTA/NTA	NTA/NTA-Ni	NTA-Ni/NTA-Ni
$\frac{F_0}{R}$ (D=8,5 nm) (mN/m)	-1 ± 1	4 ± 1	17 ± 1
$\frac{F_e}{R}$ (D=8,5 nm) (mN/m)	12 ± 1	9 ± 1	7 ± 1
$\frac{F_{0\text{eff}}}{R} = \left(\frac{F_0}{R} + \frac{F_e}{R} \right)$ (mN/m)	11 ± 2	13 ± 2	24 ± 2

Tableau IV-2 : Forces de séparation effectives $F_{0\text{eff}}/R$ entre les deux surfaces calculées en ajoutant la contribution de la répulsion électrostatique F_e/R à la force de séparation mesurée F_0/R . F_0/R et F_e/R ont été évaluées à la distance $D = 8,5$ nm (distance moyenne à laquelle les sauts adhésifs avaient lieu) à partir des courbes moyennes de la figure IV-10.

La force de séparation effective mesurée entre deux monocouches de lipide NTA dans le Tris est environ deux fois plus faible que celle qui avait été mesurée dans l'eau pure mais reste néanmoins relativement grande. Cette force de séparation ne peut pas être attribuée aux seules forces de van der Waals dont la contribution, dans les conditions de l'expérience, n'est pas aussi importante. Dans le cas du lipide DMPE, pour lequel les

forces de van der Waals sont importantes, nous avons mesuré en effet dans le Tris une force de séparation effective de l'ordre de 2 mN/m (figures IV-11 et IV-12 et tableau IV-3).

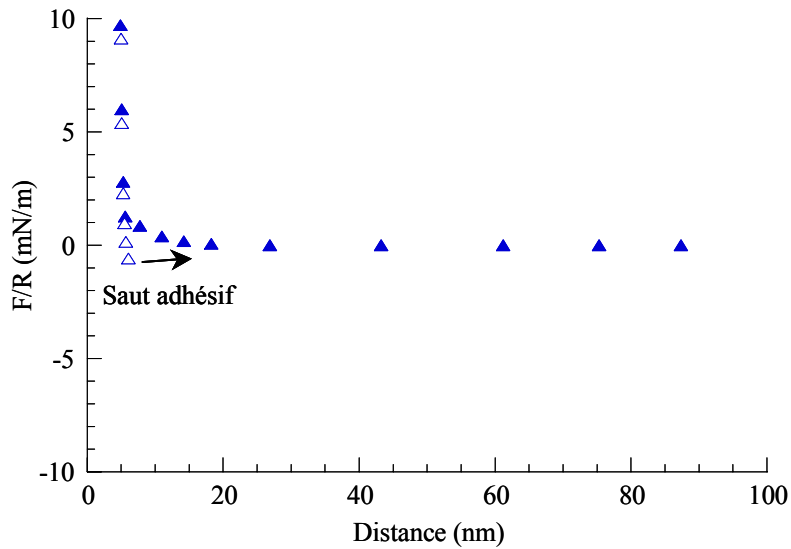


Figure IV-11 : Profil de force obtenu dans le Tris entre deux monocouches de DMPE. Triangles pleins : rapprochement des surfaces, triangles vides : séparation des surfaces.

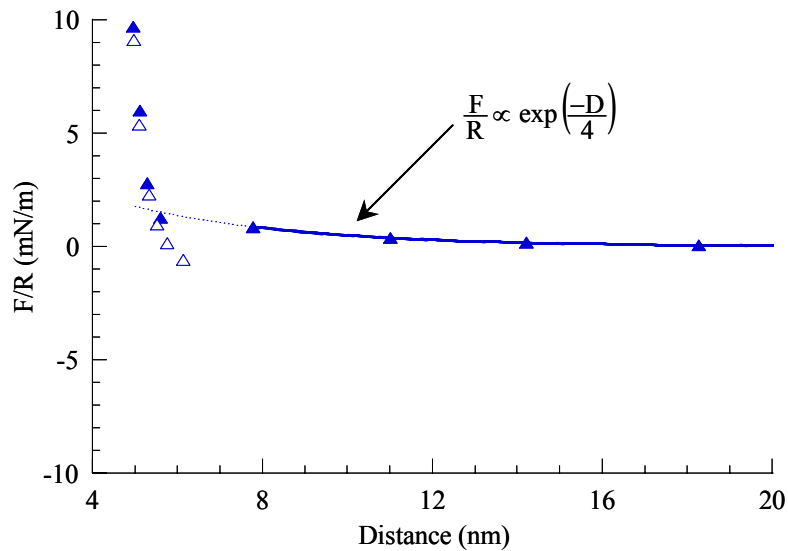


Figure IV-12 : Force de répulsion électrostatique double-couche entre deux monocouches de DMPE plongées dans le Tris.

	DMPE/DMPE
$\frac{F_0}{R}$ (D=6 nm) (mN/m)	0,6
$\frac{F_e}{R}$ (D=6 nm) (mN/m)	1,4
$\frac{F_{0\text{eff}}}{R} = \left(\frac{F_e}{R} + \frac{F_0}{R} \right)$ (mN/m)	2

Tableau IV-3 : Force de séparation effective $F_{0\text{eff}}/R$ entre deux monocouches de DMPE calculée en ajoutant la contribution de la répulsion électrostatique F_e/R à la force de séparation mesurée F_0/R . F_0/R et F_e/R ont été évaluées à la distance $D = 6$ nm (distance à laquelle le saut adhésif avait lieu).

Nous en déduisons donc qu'il se forme toujours des liaisons hydrogène, même dans le Tris, entre deux monocouches de lipide NTA. Le nombre de ces liaisons a bien diminué comme prévu par la valeur de pK_a des groupes carboxyle mais reste néanmoins étonnamment grand. A pH 8, on s'attendait en effet à avoir seulement 1 groupe carboxyle sur 100 qui n'était pas ionisé. Nous devons donc inévitablement prendre en compte la contribution de ces liaisons hydrogène aux énergies d'adhésion mesurées dans les configurations NTA/NTA-Ni et NTA-Ni/NTA-Ni.

Lorsque l'une des deux surfaces est recouverte de nickel, la force de séparation effective est légèrement plus grande que pour la configuration NTA/NTA mais reste néanmoins du même ordre de grandeur. Etant donné que dans le Tris une certaine proportion des groupements NTA-Ni perdent leur ion nickel, l'énergie mesurée comprend une contribution des liaisons hydrogène et une contribution des liaisons par chélation.

Lorsque les deux surfaces sont recouvertes de nickel, on mesure la force de séparation effective la plus grande des trois configurations étudiées. Cette force comprend toujours une contribution des liaisons hydrogène et une contribution des liaisons par chélation. Les résultats obtenus montrent de plus que la proportion des groupements NTA-Ni qui ont perdu leur ion nickel est supérieure à 50% ; la configuration NTA-Ni/NTA-Ni offre en effet la combinaison de liaisons hydrogène et de liaisons par chélation la plus

favorable. Ce résultat sera confirmé à partir du modèle statistique développé dans le chapitre suivant.

2-4. Estimation de l'énergie d'une liaison par chélation

Nous allons évaluer ici, à l'aide d'un modèle statistique simple, l'énergie de liaison E_C entre deux groupements NTA se partageant un ion nickel (liaison par chélation entre un groupement NTA-Ni et un groupement NTA). La valeur obtenue fournira une borne inférieure à l'énergie de chélation d'un ion nickel par un groupement NTA.

Ce modèle nécessite plusieurs hypothèses :

- (i) Tous les groupements NTA ne sont pas ionisés dans le Tris. Il peut donc encore se former des liaisons hydrogène entre deux groupements NTA.
- (ii) Un certain pourcentage de groupements NTA-Ni perdent leur ion nickel lorsqu'ils sont plongés dans le Tris. Soit p_{Ni} la proportion des groupements NTA-Ni qui possèdent toujours leur ion nickel.
- (iii) Il ne peut se former en même temps une liaison par chélation et une liaison hydrogène entre un groupement NTA et un groupement NTA-Ni.
- (iv) La contribution de l'énergie d'interaction entre deux groupements NTA-Ni à l'énergie d'adhésion mesurée peut être négligée.
- (v) Tous les groupements NTA, quel que soit leur état d'ionisation, peuvent former des liaisons par chélation avec un ion nickel.

Munis de ces hypothèses, nous pouvons écrire les énergies d'adhésion mesurées pour les différents systèmes étudiés comme la somme de deux contributions, l'une correspondant aux liaisons hydrogène et l'autre associée aux liaisons par chélation.

$$E_0(\text{NTA}/\text{NTA}) = E_H \quad (\text{IV-26})$$

$$E_0(\text{NTA}/\text{NTA-Ni}) = (1-p_{Ni}) E_H + p_{Ni} E_C \quad (\text{IV-27})$$

$$E_0(\text{NTA-Ni}/\text{NTA-Ni}) = (1-p_{Ni})^2 E_H + 2p_{Ni} (1-p_{Ni}) E_C \quad (\text{IV-28})$$

Où : l'écriture E_H rappelle que l'énergie d'adhésion mesurée entre deux monocouches de lipide NTA est due essentiellement aux liaisons hydrogène (la contribution des forces de van der Waals est du même ordre de grandeur que l'erreur expérimentale sur la mesure de l'énergie d'adhésion) et où E_C correspond à l'énergie d'adhésion que l'on mesurerait dans le Tris entre une monocouche de lipide NTA et une monocouche de lipide NTA-Ni si tous les groupements NTA-Ni possédaient leur ion nickel.

Pour mieux visualiser ces différentes contributions, on peut se référer à la figure IV-13.

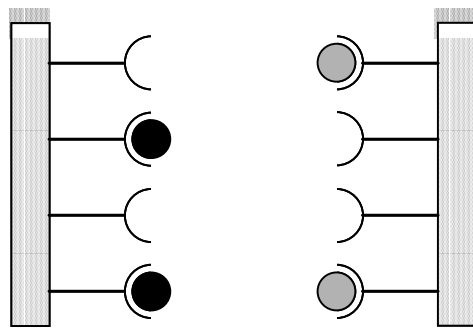


Figure IV-13 : Schéma illustrant la proportion de liaisons par chélation pouvant se former dans la configuration NTA/NTA-Ni (ions nickel symbolisés par les billes grises) et dans la configuration NTA-Ni/NTA-Ni (ions nickel symbolisés par les billes noires ou grises) dans le cas où 50% des groupements NTA-Ni possèdent toujours leur ion nickel ($p_{Ni} = 1/2$). Dans le cas NTA/NTA-Ni, il se forme 2 liaisons hydrogène et 2 liaisons par chélation ($1-p_{Ni} = p_{Ni} = 1/2$) ; dans le cas NTA-Ni/NTA-Ni, il se forme 1 liaison hydrogène et 2 liaisons par chélation ($(1-p_{Ni})^2 = 1/4$, $2p_{Ni}(1-p_{Ni}) = 1/2$).

Les énergies d'adhésion des différents systèmes se déduisent des forces de séparation effectives (tableau IV-2) par la relation (chapitre II-2-5) :

$$E_0 = \frac{1}{2\pi} \frac{F_{0\text{eff}}}{R} \quad (\text{IV-29})$$

L'énergie macroscopique E_C est par ailleurs reliée à l'énergie microscopique e_C par l'équation :

$$E_C = \Sigma_{C_1} e_C \quad (\text{IV-30})$$

Où : Σ_{C_1} est la densité surfacique des sites chélateurs liés.

Une statistique de type Boltzmann partant de l'hypothèse que chaque site chélateur peut être lié ou non lié permet par ailleurs de relier Σ_{C_1} à Σ_C , la densité surfacique totale des

sites chélateurs (raisonnement similaire à celui qui avait été développé au chapitre III-2-5 pour les sites hydrogène) :

$$\Sigma_{Cl} = \Sigma_C \frac{\exp(e_C)}{1 + \exp(e_C)} \quad (IV-31)$$

Comme nous sommes partis de l'hypothèse que chaque groupement NTA pouvait former des liaisons par chélation, la densité surfacique totale des sites chélateurs est reliée à l'aire occupée par un groupement NTA, c'est-à-dire à l'aire moléculaire des lipides NTA, par l'équation :

$$\Sigma_C = \frac{1}{\sigma_{NTA}} \quad (IV-32)$$

On en déduit :

$$E_C = \frac{1}{\sigma_{NTA}} \frac{e_C}{1 + \exp(-e_C)} \quad (IV-33)$$

Afin de calculer e_C , on résout donc tout d'abord le système formé par les deux équations (IV-27) et (IV-28). On obtient alors E_C et p_{Ni} ; e_C est ensuite calculée à partir de la relation (IV-33).

Le calcul conduit à :

$$p_{Ni} = 0,15 \pm 0,05 \quad (IV-34)$$

Et :

$$e_C = (2,0 \pm 0,5) k_B T \quad (IV-35)$$

Remarque – Limites du modèle

Les calculs conduisant aux relations (IV-34) et (IV-35) ont nécessité de "jouer" sur les barres d'erreur des résultats expérimentaux afin d'obtenir des valeurs physiquement acceptables pour p_{Ni} et e_C et les résultats obtenus ne donnent donc qu'une estimation de ces valeurs. Le modèle n'est évidemment pas sans faille et notamment nous avons considéré qu'il ne pouvait pas se former simultanément, sur un même groupement NTA, une liaison hydrogène et une liaison par chélation. En réalité, il est probable qu'une certaine proportion des groupements NTA forment les deux types de liaison en même temps et il faudrait alors élaborer un modèle plus compliqué.

Le modèle présenté dans ce chapitre a donc permis d'obtenir une estimation de l'énergie associée à la liaison entre deux groupements NTA par partage d'un ion nickel (liaison par chélation entre un groupement NTA-Ni et un groupement NTA) ; elle est de l'ordre de $2 k_B T$. Il a aussi confirmé le fait que, dans le Tris et dans les conditions de nos expériences SFA, une grande proportion des groupements NTA-Ni perdent leur ion nickel. La proportion des groupements NTA-Ni qui possèdent toujours leur ion nickel a été estimée à environ 15%.

3. Mesures par la technique des vésicules micromanipulées

En complément des mesures de forces réalisées par la technique SFA, nous avons effectué des mesures d'adhésion entre des vésicules fonctionnalisées avec les lipides NTA ou NTA-Ni. Les expériences ont également été réalisées dans une solution aqueuse de Tris de pH 8. Les vésicules étaient composées d'un mélange du lipide SOPC et des lipides NTA ou NTA-Ni (figure IV-14).

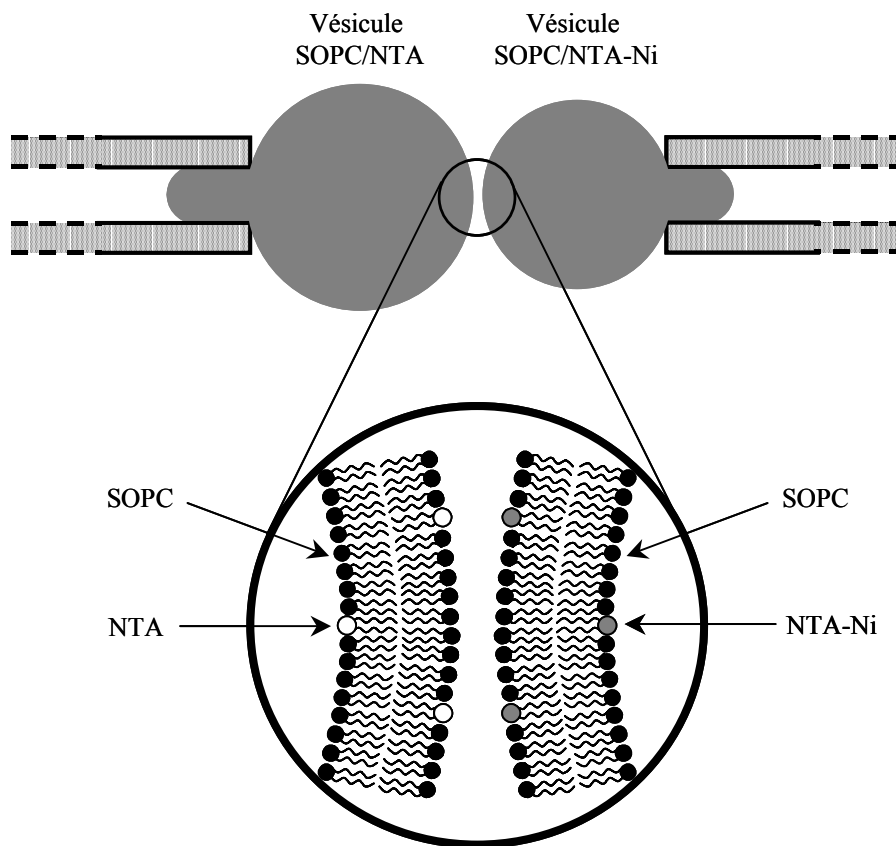


Figure IV-14 : Configuration expérimentale utilisée pour les mesures d'adhésion par micromanipulation de vésicules fonctionnalisées. Cas du système NTA/NTA-Ni.

3-1. Préparation des vésicules

Des essais avaient été réalisés dans le but de concevoir des vésicules composées à 100% des lipides NTA ou NTA-Ni mais de tels objets n'étaient pas stables en solution aqueuse. Au microscope optique nous avons observé essentiellement des agrégats de lipides de taille variable. Ceci est très certainement dû à la géométrie des lipides NTA ou NTA-Ni dont la tête est trop grosse pour leur permettre une association stable sous la forme de bicouches sphériques. En diluant les lipides NTA et NTA-Ni dans une solution de lipide SOPC, dans un rapport moléculaire d'environ 1/10, on est parvenu à obtenir des composés très stables avec un bon rendement.

Lors des mesures d'adhésion, un deuxième problème est apparu, lié à l'état de charge des lipides NTA et NTA-Ni. En effet, lorsque la surface des vésicules est trop chargée

on ne parvient pas à mesurer d'adhésion parce que celle-ci est masquée par le phénomène de répulsion électrostatique. Ainsi, lorsque la proportion moléculaire des lipides NTA ou NTA-Ni était supérieure à 9%, l'adhésion était masquée. Nous avons donc travaillé avec des mélanges à 8% en lipide NTA ou NTA-Ni. On déposait sur les pastilles en téflon 30 μ l d'un mélange SOPC/NTA ou SOPC/NTA-Ni composé à 92% du lipide SOPC. La phase de croissance des vésicules avait lieu dans une solution de saccharose d'osmolarité 190 mOsm (180 mM). Les observations sous microscope visant à sélectionner le couple de vésicules à étudier se faisaient dans une solution de glucose d'osmolarité 200 mOsm (190 mM). Les mesures étaient ensuite réalisées dans un mélange Tris/NaCl d'osmolarité 230 mOsm (190 mM). L'utilisation de solutions de glucose et de Tris ayant une osmolarité supérieure à celle du saccharose (qui constitue le milieu interne des vésicules) permet de rendre les vésicules flasques et donc aisément micromanipulables.

3-2. Energies d'adhésion macroscopiques

Les mesures d'adhésion consistent à rapprocher deux vésicules, maintenues par aspiration dans des micropipettes, jusqu'à ce que leurs membranes entrent en contact. L'une des deux vésicules est fortement aspirée et reste soumise à une pression d'aspiration constante durant tout le déroulement de l'expérience ; c'est la vésicule tendue. L'autre vésicule est soumise à une pression d'aspiration plus faible dont on modifie la valeur au cours de l'expérience ; c'est la vésicule flasque. Lorsque les membranes des deux vésicules entrent en contact et qu'un phénomène d'adhésion apparaît, la vésicule flasque se déforme et épouse le contour de la vésicule tendue. Les paramètres géométriques associés à cette déformation permettent de remonter à l'énergie d'adhésion (chapitre II-3-2).

En pratique, on commence toujours par faire une photo du système lorsque les deux vésicules sont éloignées l'une de l'autre (figure IV-15a), ce qui permet de connaître leurs caractéristiques géométriques initiales. On met alors les membranes des deux vésicules en contact tout en imposant une pression d'aspiration ΔP_0 relativement élevée à la vésicule flasque (figure IV-15b). On diminue ensuite progressivement la pression

d'aspiration et on note le déplacement correspondant pour la langue de la vésicule flasque (partie de la vésicule se trouvant dans la micropipette – figure IV-15c). Avant que la vésicule flasque ne ressorte complètement de sa micropipette, on augmente à nouveau progressivement la pression d'aspiration jusqu'à retrouver la valeur initiale ΔP_0 . Une photo du système est prise pour chaque valeur de la pression d'aspiration. Cette série de mesures est répétée au moins 5 fois pour chaque couple de vésicule testé et la même expérience est reproduite pour d'autres couples de vésicules. On peut alors tracer le graphe représentant la pression d'aspiration ΔP de la vésicule flasque en fonction du facteur géométrique G défini par (chapitre II-3-2) :

$$G = \frac{2(1-Rc)}{(1-\cos\theta)R} \quad (\text{IV-36})$$

Où : R est le rayon de la micropipette, c est la courbure moyenne de la vésicule flasque et θ est l'angle de contact entre les deux vésicules (c et θ sont calculés à partir du déplacement de la langue ΔL).

La pente des droites obtenues correspond à l'énergie d'adhésion E_0 entre les deux vésicules (figure IV-16).

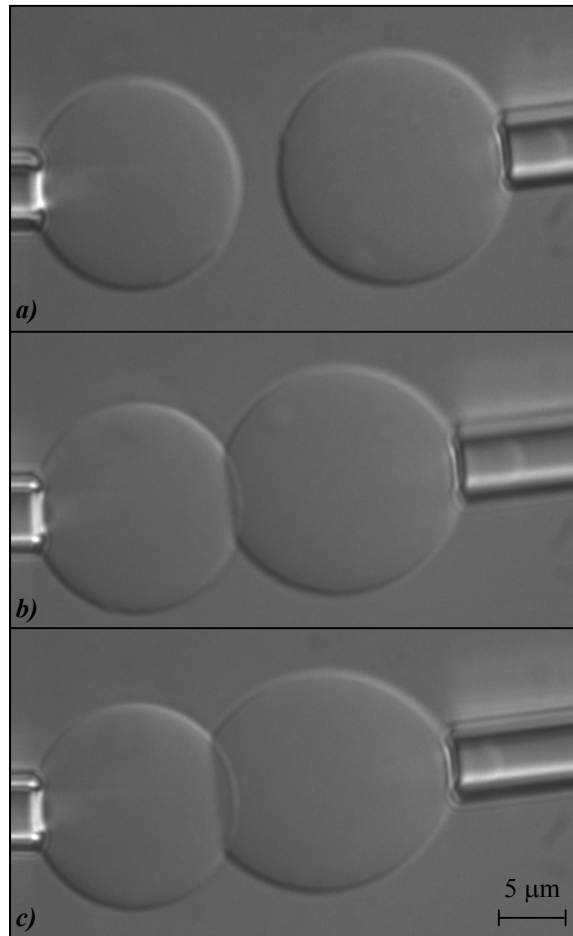


Figure IV-15 : Mesures d'adhésion entre deux vésicules dont la membrane est composée d'un mélange des lipides SOPC et NTA. La première photo (a) permet de déterminer les caractéristiques géométriques initiales des deux vésicules. Les deux vésicules sont ensuite mises en contact et sous l'effet de l'adhésion la vésicule flasque se déforme (b). Si l'on relâche la pression d'aspiration, la déformation de la vésicule flasque s'accroît et la langue ressort un peu de la micropipette (c).

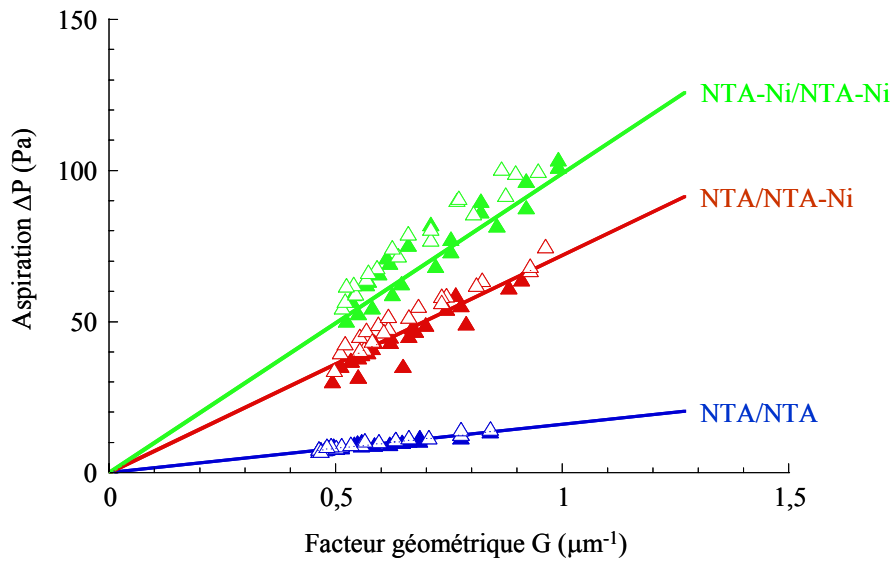


Figure IV-16 : Courbes d'adhésions obtenues entre deux vésicules NTA (bleu), entre une vésicule NTA et une vésicule NTA-Ni (rouge) et entre deux vésicules NTA-Ni (vert). La pente des droites correspond à l'énergie d'adhésion entre les deux vésicules (tableau IV-4). Triangles pleins : pressions d'aspiration décroissantes, triangles vides : pressions d'aspiration croissantes.

	NTA/NTA	NTA/NTA-Ni	NTA-Ni/NTA-Ni
E_0 ($\mu\text{J}/\text{m}^2$)	16 ± 3	72 ± 6	99 ± 6

Tableau IV-4 : Energies d'adhésion mesurées dans le Tris entre deux vésicules NTA, entre une vésicule NTA et une vésicule NTA-Ni et entre deux vésicules NTA-Ni.

On retrouve donc à travers les résultats obtenus par la technique des vésicules micromanipulées un comportement similaire, sur le plan qualitatif, à celui qui avait été observé lors des expériences SFA. Les énergies d'adhésion mesurées vont en effet dans le sens d'une augmentation lorsque les groupements NTA sont fonctionnalisés par un ion nickel. De plus, le fait que la configuration NTA-Ni/NTA-Ni présente à nouveau l'énergie d'adhésion la plus grande prouve qu'une certaine proportion des groupements NTA-Ni n'ont plus leur ion nickel. Tout ceci va être précisé grâce au modèle statistique développé dans le chapitre suivant.

3-3. Estimation de l'énergie d'une liaison par chélation

Cette partie a pour objectif d'évaluer l'énergie d'adhésion moléculaire e_C entre un groupement NTA-Ni et un groupement NTA (énergie de liaison entre deux groupements NTA par partage d'un ion nickel). Pour y parvenir, nous allons développer un modèle statistique qui permettra de déduire e_C des énergies d'adhésion macroscopiques E_0 des différents systèmes étudiés. Les hypothèses dont nous partons afin d'élaborer ce modèle sont les mêmes que celles présentées dans le chapitre IV-2-4 ; les relations (IV-26) à (IV-28) sont donc toujours valables. Cependant nous devons retrancher ici aux énergies d'adhésion la contribution des forces de van der Waals entre les bicouches de SOPC. Cette contribution ne peut, en effet, plus être négligée étant donné que l'on travaille avec des bicouches ne contenant que 8% de lipides NTA ou NTA-Ni et conduisant, de ce fait, à des énergies d'adhésion plus faibles. Les relations deviennent donc :

$$E_0(\text{NTA/NTA}) - E_0(\text{SOPC/SOPC}) = E_H \quad (\text{IV-37})$$

$$E_0(\text{NTA/NTA-Ni}) - E_0(\text{SOPC/SOPC}) = (1 - p_{\text{Ni}}) E_H + p_{\text{Ni}} E_C \quad (\text{IV-38})$$

$$E_0(\text{NTA-Ni/NTA-Ni}) - E_0(\text{SOPC/SOPC}) = (1 - p_{\text{Ni}})^2 E_H + 2 p_{\text{Ni}} (1 - p_{\text{Ni}}) E_C \quad (\text{IV-39})$$

Une mesure de l'énergie d'adhésion entre deux vésicules de SOPC a déjà été réalisée au laboratoire dans les mêmes conditions que celles de nos expériences (et notamment à concentration de sel équivalent) et a donné :

$$E_0(\text{SOPC/SOPC}) \cong 12 \mu\text{J.m}^{-2} \quad (\text{IV-40})$$

Afin de relier E_C à e_C , nous allons utiliser un autre modèle que celui présenté dans les chapitres III-2-5 et IV-2-4. Ce modèle tient compte du fait que les lipides NTA et NTA-Ni sont libres de diffuser au sein de la membrane de chaque vésicule et qu'ils sont attirés par la zone de contact entre les deux vésicules. La conséquence est une augmentation de leur densité au niveau de la zone de contact ; on parle d'enrichissement local en sites fonctionnels. Une relation traduisant cet enrichissement a été écrite pour la

première fois dans le cas de molécules faisant des liaisons fortes (Bell, 1984 – Evans¹, 1985) :

$$E_C = (\Sigma_Z - \Sigma_{HZ}) k_B T \quad (IV-41)$$

Où : Σ_Z est la densité des sites fonctionnels au niveau de la zone de contact et Σ_{HZ} est leur densité hors de la zone de contact.

Une description microcanonique a permis d'étendre le résultat au cas de molécules établissant des liaisons faibles et réversibles et l'expression obtenue a pu être vérifiée expérimentalement (Pincet, 2001). En appliquant le résultat obtenu par ces auteurs au cas de notre système, nous arrivons à la relation :

$$E_C \cong \frac{1}{10} \Sigma_C \left(\frac{\exp(e_C) - 1}{2} \right) k_B T \quad (IV-42)$$

Où : Σ_C est la densité des sites chélateurs à la surface des vésicules et où le facteur 1/10 traduit le fait qu'un groupement NTA situé sur l'une des deux vésicules a environ 1 chance sur 10 de se trouver en face d'un groupement NTA-Ni de l'autre vésicule ; le terme de probabilité lié à l'état fonctionnalisé ou non du groupement NTA-Ni est, quant à lui, déjà inclu dans les expressions (IV-38) et (IV-39).

Afin d'estimer la densité surfacique des sites chélateurs, il faut tenir compte de la dilution des lipides NTA dans la bicouche de SOPC. Dans une vésicule de SOPC, l'aire occupée par chaque lipide est d'environ 0,65 nm² (Rand, 1989), ce qui correspond pour une monocouche de SOPC à une pression de surface de l'ordre de 20 mN/m. Sur l'isotherme des lipides NTA et NTA-Ni, on peut voir que cette pression est associée à une aire moléculaire d'environ 0,7 nm². Nous considérerons que telle est l'aire moléculaire des lipides NTA et NTA-Ni au sein des vésicules de SOPC. Sachant que les vésicules SOPC/NTA et SOPC/NTA-Ni sont composées à 92% de lipide SOPC, nous en déduisons la densité des groupements NTA et NTA-Ni à la surface des vésicules :

$$\Sigma_{NTA} = \Sigma_{NTA-Ni} = \frac{8}{8 \times 0.70 + 92 \times 0.65} \cong 0,12 \text{ molécule.nm}^{-2} \quad (IV-43)$$

Puisque nous partons de l'hypothèse que tous les groupements NTA peuvent former des liaisons par chélation, cette densité est également la densité des sites chélateurs à la surface des vésicules :

$$\Sigma_C \cong 0,12 \text{ molécules.nm}^{-2} \quad (IV-44)$$

Afin d'obtenir e_C , on calcule tout d'abord E_C à partir des valeurs d'adhésions macroscopiques expérimentales et des équations (IV-37) à (IV-39) ; ceci nous permet également de connaître p_{Ni} . On déduit ensuite e_C de la relation (IV-42).

On obtient :

$$p_{Ni} = 0,25 \pm 0,10 \quad (IV-45)$$

Et :

$$e_C = (2,5 \pm 0,5) k_B T \quad (IV-46)$$

On vérifie donc bien que certains groupements NTA-Ni ont perdu leur ion nickel dans le Tris. La proportion des groupements NTA-Ni qui possèdent toujours leur ion nickel est ici légèrement supérieure à celle qui avait été estimée lors des expériences SFA. On mesure par ailleurs une énergie de chélation e_C du même ordre de grandeur que celle mesurée en SFA.

4. Conclusion

Les mesures d'adhésion réalisées en SFA et par la technique des vésicules micromanipulées ont montré que deux groupements NTA pouvaient se lier par mise en commun d'un ion nickel. Nous avons obtenu une estimation de l'énergie associée à cette liaison par chélation ; elle est de l'ordre de $2 k_B T$. Cette énergie fournit une borne inférieure à l'énergie de chélation d'un ion nickel par un groupement NTA. Nous avons également observé que plus de la moitié des groupements NTA-Ni perdaient leur ion nickel lorsqu'ils étaient plongés dans le Tris (environ 15% lors des expériences SFA et environ 25% lors des expériences avec les vésicules micromanipulées). Aucune explication n'a pu être donnée à ce phénomène hormis que le Tris puissent faire des liaisons avec le nickel et se placer ainsi en compétiteur vis-à-vis du groupement NTA.

La capacité qu'ont les ions nickel à pouvoir se lier simultanément à deux groupements NTA pourrait être mise à profit dans l'élaboration de nouvelles techniques d'ancrage des protéines aux interfaces. L'utilisation d'un ligand relais auquel on aurait ajouté un groupement NTA et d'une surface possédant le groupement complémentaire NTA-Ni permettrait la fixation de protéines par l'intermédiaire de la reconnaissance ligand-

protéine ; on s'affranchirait ainsi des étapes de manipulation génétique des protéines que nécessitent les techniques actuelles.

L'étude réalisée dans ce chapitre a de plus permis de comparer des résultats issus de deux nanotechniques différentes : la technique SFA et la technique des vésicules micromanipulées. Nous avons utilisé pour chaque technique un modèle statistique permettant de relier les énergies d'adhésion macroscopiques aux énergies de liaison à l'échelle moléculaire. L'accord obtenu entre les deux approches est très satisfaisant.

Chapitre V : Mesures de Forces Impliquant des Rétinoïdes

Les cellules disposent de véritables “laboratoires moléculaires” qui assurent leur survie et qui leur permettent de communiquer les unes avec les autres (Alberts, 1998). Elles sont en permanence le siège d’assemblages et de désassemblages entre diverses macromolécules provenant du milieu extérieur ou présentes au cœur même de la cellule. Ces interactions permettent le déclenchement de nombreux événements sans cesse présents au sein des cellules et qui influencent leur métabolisme. La liaison entre un récepteur (une protéine) et son ligand est un outil de reconnaissance très largement mis à profit par la cellule lors de ces différents événements. Il s’agit d’une interaction spécifique, c’est-à-dire qu’une protéine ne peut interagir qu’avec un seul ligand ou un seul groupe de ligands (la liaison se forme sur une région particulière de la protéine dont la structure est complémentaire de celle du ligand). Les cellules possédant de nombreux ligands différents, cette spécificité n’autorise les protéines à s’associer qu’avec le ligand approprié, qui déclenchera le signal lié à leur fonction. Il s’agit également d’une interaction réversible, ce qui permet de libérer le récepteur une fois que le signal a été transmis et de le rendre ainsi disponible pour interagir avec d’autres ligands. On distingue deux grands groupes de récepteurs : les récepteurs membranaires qui sont situés dans la membrane plasmique des cellules et les récepteurs nucléaires qui se trouvent dans le noyau et dont le ligand est capable de pénétrer librement dans la cellule. Les principaux ligands des récepteurs nucléaires sont : les hormones stéroïdes, les hormones thyroïdiennes, l’acide rétinoïque et la vitamine D₃. En se liant à leurs ligands, les récepteurs nucléaires acquièrent une forte affinité pour des régions particulières de l’ADN contenant le code génétique de certaines protéines et participent ainsi à la transduction du signal génétique. A l’heure actuelle, on connaît très peu de choses concernant la nature et le mode d’action des forces qui sont impliquées dans le mécanisme de reconnaissance d’un ligand par son récepteur. Une meilleure connaissance des mécanismes physico-chimiques impliqués permettrait de mieux comprendre le mode d’action des récepteurs nucléaires et pourrait contribuer au développement de composés pharmacologiques.

Récemment, certaines techniques à champ proche ont rendu possible l'étude des énergies d'interaction entre des molécules d'intérêt biologique (Helm, 1991 – Pincet, 1994 – Wong, 1999 – Leckband, 2000b – Sivasankar, 2001). Nous avons utilisé l'appareil à force entre surfaces pour tenter de mesurer les énergies d'interaction impliquées lors du mode d'action des rétinoïdes (chapitre I-3). Les différentes étapes de l'action des rétinoïdes sont successivement : la fixation de l'acide rétinoïque à ses récepteurs, la dimérisation des récepteurs (pour former des homodimères ou des hétérodimères) et la fixation du complexe à l'élément de réponse de l'ADN à l'acide rétinoïque (chapitre I-3-1-2). Nous avons donc pour objectif de mesurer les énergies d'interaction associées à la reconnaissance de l'acide rétinoïque par ses récepteurs et à la dimérisation des récepteurs.

Ce travail a nécessité l'utilisation d'outils moléculaires permettant de coupler les molécules biologiques aux surfaces d'étude du SFA et de les rendre parfaitement accessibles lors des mesures de forces (chapitre II-4). Ceci a été rendu possible grâce à une collaboration avec des équipes de biologistes (H. Gronemeyer et J. Iyer) et de chimistes (C. Mioskowski, L. Lebeau et F. Balavoine). Un lipide dont la tête hydrophile contenait un ligand synthétique spécifique des RXR (lipide rétinoïde – figure II-15) a été synthétisé par l'équipe des chimistes alors que les biologistes nous ont fourni des récepteurs RAR et RXR portant une étiquette histidine. Ces récepteurs ont pu être fixés sur une monocouche de lipide NTA-Ni grâce à la forte affinité existant entre la molécule d'histidine et l'ion nickel.

Avant de réaliser toute mesure de forces entre les récepteurs ou entre le ligand et son récepteur, il était nécessaire de s'assurer que le lipide NTA-Ni utilisé était effectivement capable de fixer une séquence de plusieurs molécules d'histidine. Des expériences préliminaires ont donc été réalisées et seront présentées dans la première partie de ce chapitre. Seront présentées ensuite les mesures de forces qui ont été réalisées entre les récepteurs des rétinoïdes. Deux modes de fixation ont été utilisés : celui mettant à profit l'affinité entre l'ion nickel et la molécule d'histidine et celui utilisant la liaison du ligand à son récepteur. Nous donnerons ensuite un premier résultat obtenu pour l'énergie d'interaction entre une monocouche du lipide rétinoïde et une monocouche du lipide NTA-Ni sur laquelle ont été greffés des récepteurs RXR. Dans un dernier paragraphe, nous présenterons les profils de force obtenus dans l'eau pure entre deux

monocouches du lipide rétinol. Ces mesures se situent hors du contexte de l'interaction récepteur-ligand mais présentent l'intérêt sur le plan physico-chimique de mettre en jeu simultanément des forces hydrophobes et des liaisons hydrogène.

1. Tests d'affinité entre la molécule d'hexahistidine et le lipide NTA-Ni

Deux expériences différentes ont été menées dans le but de tester la capacité d'une molécule d'hexahistidine (6His) à se fixer sur le lipide NTA-Ni dont nous disposions. La première a été réalisée sur la balance de Langmuir et la deuxième était basée sur des mesures de fluorescence effectuées sur des vésicules fonctionnalisées.

1-1. Mesures de pressions de surface

Le but de cette première expérience était de former une monocouche de lipide NTA-Ni à l'interface Tris-air et de mesurer la variation de pression de surface de cette monocouche suite à l'injection en sous-phase (sous la monocouche) de molécules contenant une étiquette histidine.

1-1-1. Mesures à aire moléculaire fixée

Les molécules "his-taguées" utilisées étaient des molécules de FITC-6His de masse molaire 1301 g/mol (le caractère fluorescent n'était d'aucune utilité dans cette expérience mais nous disposions de ces molécules au laboratoire dans le but de réaliser également des mesures en microscopie de fluorescence, comme nous le verrons dans le chapitre V-1-2). Les molécules de FITC-6His étaient solubilisées au début de chaque expérience dans 3 ml de Tris 10 mM de manière à obtenir une solution de FITC-6His à 0,15 mM. La cuve de Langmuir était remplie de Tris 10 mM dégazé et une monocouche de lipide NTA-Ni était déposée à l'interface Tris-air. La monocouche était comprimée jusqu'à une pression de surface de l'ordre de 30 mN/m, pour laquelle elle se trouve dans un état compact (aire moléculaire de 0,62 nm²) ; on injectait ensuite en sous-phase les 3

ml de la solution de FITC-6His. Pour rendre l'injection la plus homogène que possible, nous avons injecté cette solution en différents endroits, à gauche et à droite de la monocouche, c'est-à-dire à gauche du flotteur et à droite de la barrière mobile (figure II-1). On laissait alors diffuser environ 30 minutes et on mesurait la nouvelle pression de surface.

Toutes les expériences réalisées ont mis en évidence une augmentation de la pression de surface suite à l'injection de FITC-6His ; cette augmentation était de (3 ± 1) mN/m, pour une aire moléculaire initiale au sein de la monocouche NTA-Ni de $0,62 \text{ nm}^2$. Or dans l'hypothèse d'une fixation des molécules de FITC-6His sur le lipide NTA-Ni, les têtes hydrophiles deviennent plus grosses et les répulsions stériques au sein de la monocouche augmentent ; il en résulte donc une augmentation de la pression de surface. Il semblerait donc que les molécules injectées en sous-phase viennent bien s'adsorber sur les têtes hydrophiles du lipide NTA-Ni. Il reste cependant à vérifier qu'il s'agit bien d'une adsorption spécifique, c'est-à-dire se faisant par l'intermédiaire de la liaison entre l'hexahistidine et le nickel.

Nous avons donc effectué la même expérience sur des monocouches de lipide NTA. Aucune variation significative de la pression de surface n'a alors été observée après l'injection en sous-phase de molécules de FITC-6His. L'augmentation obtenue avec les monocouches de lipide NTA-Ni était donc bien due à une fixation des molécules de FITC-6His sur les têtes hydrophiles du lipide NTA-Ni (figure V-1).

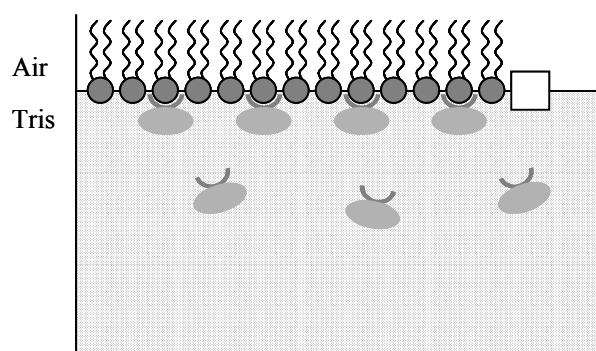


Figure V-1 : Monocouche de lipide NTA-Ni mise en présence de molécules de FITC-6His. La fixation des molécules via l'étiquette histidine augmente l'aire des têtes hydrophiles et par conséquent les répulsions stériques au sein de la monocouche. L'effet est observable à travers l'augmentation de la pression de surface qui en résulte et qui a été estimée à environ 3 mN/m lorsque la monocouche était dans un état compact (aire moléculaire initiale de $0,62 \text{ nm}^2$).

1-1-2. Mesures d'isothermes

Nous avons également souhaité observer l'effet de l'injection de FITC-6His en sous-phase sur les courbes isothermes du lipide NTA-Ni, c'est-à-dire à aire moléculaire variable. Le protocole suivi était le même que celui décrit au chapitre V-1-1-1 mais cette fois nous mesurons une courbe isotherme du lipide NTA-Ni avant et après l'injection des molécules de FITC-6His. Une augmentation de la pression de surface a encore une fois été observée (figure V-2a) mais elle devenait moins importante au niveau des petites aires moléculaires pour disparaître complètement lorsque la monocouche se trouvait dans son état compact (figure V-2b). Ceci peut s'expliquer par les effets combinés de deux phénomènes. D'une part, une rupture des liaisons hexahistidine-nickel provoquée par les perturbations générées lors de la compression de la monocouche. D'autre part, une désorption des complexes lipide NTA-Ni/FITC-6His au cours de la compression (le complexe NTA-Ni/FITC-6His est plus hydrophile que le groupement NTA-Ni seul) qui entraîne une sous-estimation de l'aire moléculaire de la monocouche lors des mesures isothermes.

Remarque – Stabilité de la liaison histidine-nickel

Si une nouvelle mesure d'isotherme était réalisée juste après le cycle de compression-décompression (les mesures ne sont prises que lors de la phase de compression), la courbe obtenue ne se superposait pas à la première (figure V-2b). Si l'on attendait 20 à 30 minutes avant de réaliser la deuxième isotherme, on remarquait que la pression de surface augmentait à nouveau et on obtenait une isotherme relativement similaire à la première (compte-tenu des désorptions ayant eu lieu lors de la première compression). Les molécules de FITC-6His avaient alors certainement eu le temps de se fixer à nouveau au lipide NTA-Ni. Il semblerait donc que la liaison histidine-nickel soit assez sensible à la dynamique du système.

Le résultat à retenir de cette série d'expériences réalisées sur la balance de Langmuir est que l'injection de molécules portant une étiquette histidine sous une monocouche de

lipide NTA-Ni a conduit à une augmentation de la pression de surface, ce qui est révélateur d'une fixation des molécules "his-taguées" sur les têtes hydrophiles du lipide ; la spécificité de cette liaison a de plus été démontrée par une expérience témoin faite avec les mêmes lipides mais sans nickel.

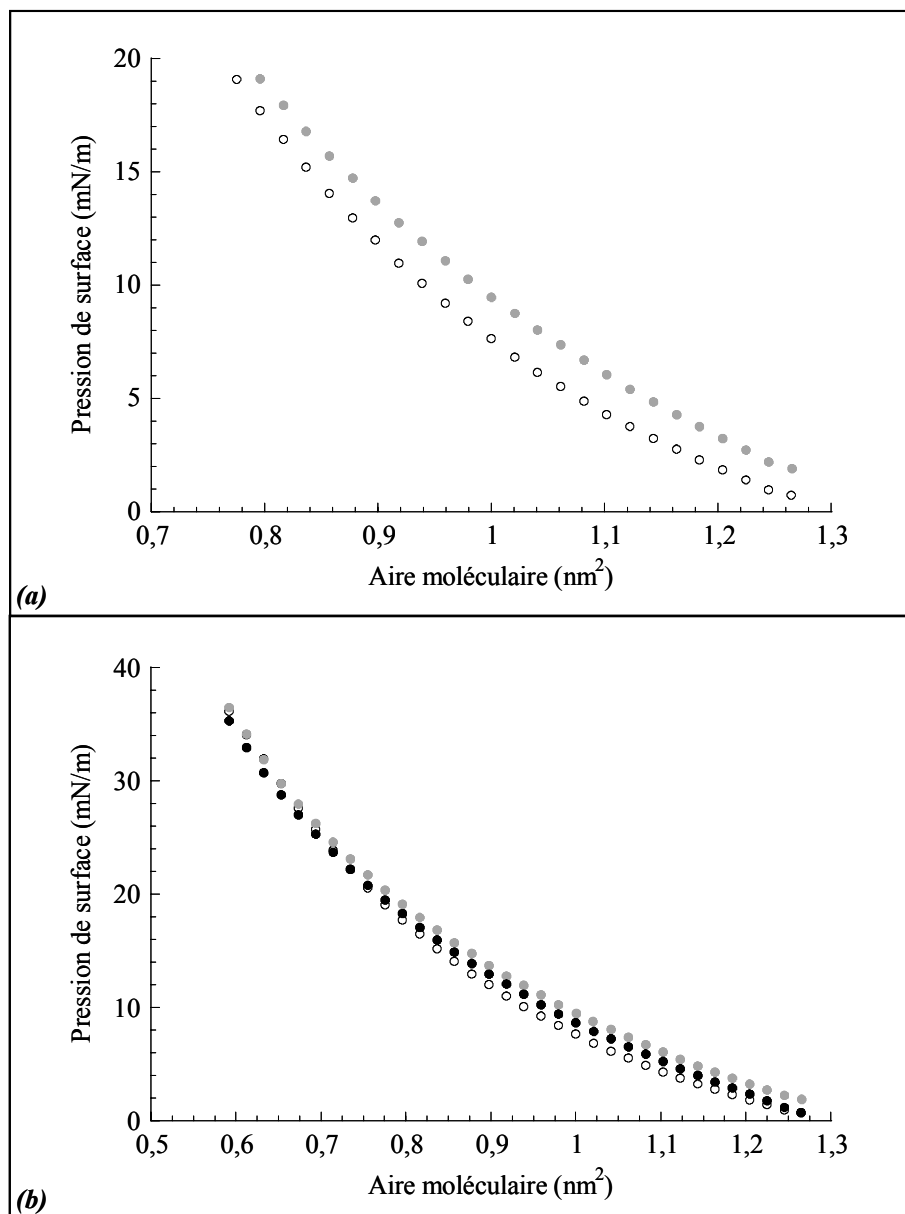


Figure V-2 : Effet de l'injection de FITC-6His sous une monocouche de lipide NTA-Ni. Ronds blancs : isotherme du lipide NTA-Ni. Ronds gris : première isotherme mesurée après l'injection de FITC-6His. Ronds noirs : deuxième isotherme mesurée après l'injection de FITC-6His. Les deux figures (a) et (b) sont issues de la même expérience, seule l'échelle a été modifiée.

1-2. Mesures de fluorescence

(En collaboration avec Pierre-Henri Puech de l'équipe Surfaces Douces à l'Institut Curie, Paris)

L'objectif de cette expérience était de visualiser le signal de fluorescence de la membrane d'une vésicule contenant du lipide NTA-Ni lorsqu'elle était mise en présence de molécules d'hexahistidine fluorescentes.

Les vésicules étaient constituées d'un mélange du lipide DOPC et du lipide NTA-Ni, à 10% en molécules de lipide NTA-Ni. Elles ont été formées par "électroformation" (Angelova, 1992) dans un mélange glucose/saccharose à 300 mOsm. Deux techniques expérimentales distinctes ont été utilisées : la microscopie de fluorescence classique et la microscopie à deux photons. Pour chaque technique expérimentale, nous avons fait usage de deux molécules fluorescentes différentes : la FITC-6His et la GFP-6His.

On prélevait au début des expériences 100 μ l de la suspension de vésicules que l'on laissait sédimenter 30 minutes dans 400 μ l d'un mélange Tris/glucose à 300 mOsm (pH 8,1). On enlevait alors le surnageant en ne laissant que 50 μ l de la solution puis on injectait 100 μ l d'une solution de molécules fluorescentes (FITC-6His ou GFP-6His). Les vésicules incubaient alors pendant 1 heure en présence de FITC-6His (à 5 μ M) ou de GFP-6His (à 10 μ M) ; 5 μ l de la solution non rincée étaient alors introduits dans une cellule d'observation de 50 μ l remplie du mélange Tris/glucose à 300 mOsm.

1-2-1. Mesures par microscopie de fluorescence classique

Après incubation dans une solution de FITC-6His, aucun signal significatif n'a été observé sur la membrane des vésicules. En réalité le signal détecté se confondait pratiquement avec le signal observable en solution et provenant des molécules de FITC-6His libres. La suspension de vésicules n'avait en effet pas été rincée afin d'écartier tout risque de décrochage du fluorochrome durant une telle manipulation. Il est probable que le microscope optique utilisé ne soit pas approprié à des mesures avec cette molécule fluorescente, dont il a été observé que le signal s'atténuait très vite dans les conditions

de l'expérience (à pH 8,1 la quasi-totalité du signal disparaît au bout d'environ 1 minute).

Les observations réalisées après incubation dans une solution de GFP-6His se sont révélées plus fructueuses puisqu'un signal de membrane, même s'il était relativement faible, a été détecté (figure V-3). Ceci constituait une première preuve de l'accrochage de l'hexahistidine sur le groupement NTA-Ni mais il était nécessaire de réaliser une deuxième mesure qui vienne confirmer ce fait. Des observations ont donc été effectuées par microscopie à deux photons et en utilisant seulement la molécule de GFP-6His, qui s'est montrée plus efficace en microscopie de fluorescence classique.

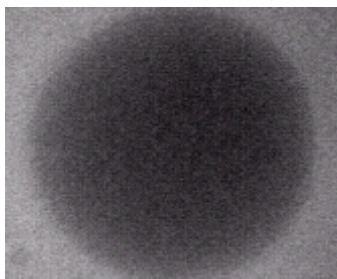


Figure V-3 : Signal de membrane obtenu en microscopie de fluorescence classique pour une vésicule DOPC/NTA-Ni (10:1) ayant incubé dans une solution à 10 μ M de GFP-6His. Le signal de fluorescence est faible mais observable.

1-2-2. Mesures par microscopie à deux photons

Les expériences menées sur le microscope à deux photons ont mis en évidence un signal de fluorescence de la membrane qui était bien plus important que celui obtenu en microscopie de fluorescence classique. La technique a permis en effet de s'affranchir du bruit de fond dû aux GFP-6His se trouvant en solution et a ainsi offert une meilleure définition du signal de la membrane (figure V-4).

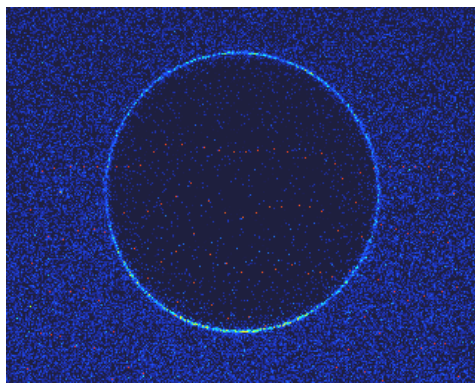


Figure V-4 : Image obtenue en microscopie à deux photons pour une vésicule DOPC/NTA-Ni (10:1) après incubation dans une solution à 10 μ M de GFP-6His. La technique a permis d'observer un signal de fluorescence très bien défini sur la membrane de la vésicule.

1-2-3. Spécificité de la liaison de la GFP-6His au lipide NTA-Ni

Deux expériences ont été entreprises dans le but de s'assurer que la liaison de la GFP-6His au lipide NTA-Ni se faisait bien *via* l'étiquette histidine et n'était donc pas due à une interaction non-spécifique.

La première a consisté à refaire les mesures de fluorescence à deux photons avec un lipide non fonctionnalisé au nickel. Ces mesures ont été réalisées sur des vésicules composées d'un mélange du lipide DOPC et du lipide DOGS-NTA (10:1) après qu'elles aient été mises en présence de GFP-6His ; le lipide DOGS-NTA est le lipide commercialisé par "Avanti Polar Lipids" qui ne diffère de notre lipide NTA (figure II-11) que par la structure de son bras espaceur, qui est un peu plus long. Sur les images obtenues, la membrane présentait un signal de fluorescence bien plus faible que celui obtenu avec le lipide NTA-Ni (figure V-5). Ceci montre qu'il existe une petite adsorption non spécifique de la molécule de GFP-6His sur la membrane de la vésicule mais que cette adsorption est négligeable devant la fixation spécifique de la molécule au lipide NTA-Ni.

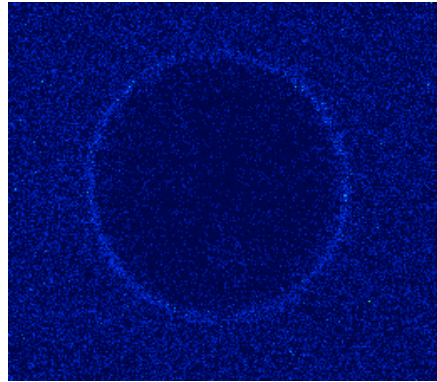


Figure V-5 : Image obtenue en microscopie à deux photons pour une vésicule DOPC/DOGS-NTA (10:1) (donc sans ion nickel) ayant incubé dans 10 μ M de GFP-6His. Le signal obtenu est beaucoup plus faible que celui qui avait été obtenu avec les vésicules DOPC/NTA-Ni (10:1) (figure V-4) ; il est dû à une adsorption non-spécifique de la GFP-6His sur la membrane de la vésicule.

Une deuxième preuve de la spécificité de la liaison est donnée par la structure même de la molécule de GFP-6His utilisée. En effet, on connaît dans cette molécule l'orientation du groupe fluorescent par rapport à l'axe principal de la molécule : il lui est perpendiculaire. L'étiquette histidine est quant à elle fixée à la partie COOH terminale de la molécule de GFP. On peut donc, par analyse de la polarisation du signal de fluorescence émis, avoir une information sur l'orientation de la molécule et donc en déduire son mode d'accrochage à la membrane de la vésicule (figure V-6).

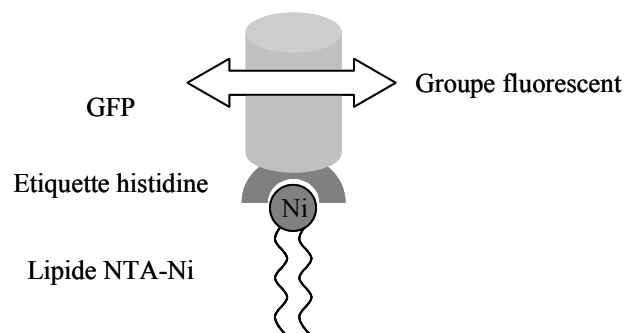


Figure V-6 : Représentation schématique du complexe lipide NTA-Ni/GFP-6His. Le groupe fluorescent de la GFP-6His (symbolisée par un cylindre) est perpendiculaire à l'axe principal de la molécule. L'étiquette histidine est fixée à une extrémité de la molécule de GFP.

Des mesures de fluorescence à deux photons ont été réalisées en excitant la cellule (remplie de vésicules DOPC/NTA-Ni (10:1) ayant incubé dans 10 μ M de GFP-6His) à

l'aide d'un faisceau laser de polarisation connue et en plaçant un analyseur sur le chemin du signal de fluorescence émis (L. Moreaux, ESPCI, Paris et F. Amblard, Institut Curie, Paris). Le signal présentait bien la bonne polarisation, ce qui a permis de conclure que la molécule de GFP-6His se fixait effectivement au lipide NTA-Ni par l'intermédiaire de son étiquette histidine et qu'elle s'orientait perpendiculairement à la membrane de la vésicule.

Remarque – Proportion des lipides NTA-Ni fonctionnalisés

La même étude que celle présentée précédemment avait été réalisée sur les lipides DOGS-NTA-Ni commercialisés par “Avanti Polar Lipids” (P.H. Puech, Institut Curie, Paris). Les signaux de fluorescence obtenus étaient légèrement plus marqués, ce qui laissait à penser que le taux de fonctionnalisation de ces lipides au nickel était plus important que celui de nos lipides DOGA-NTA-Ni. Des mesures de forces ont donc été entreprises en SFA sur des monocouches du lipide DOGS-NTA-Ni, qui aurait peut-être pu constituer un meilleur outil de fixation pour les récepteurs des rétinoïdes. Mais ces lipides se sont révélés être relativement instables puisqu'un phénomène de déplétion des monocouches a été détecté dès la deuxième mise en contact. L'instabilité des monocouches de lipide DOGS-NTA-Ni avait déjà été observée par D. Leckband lors d'essais sur la balance de Langmuir.

2. Mesures de forces entre deux couches de récepteurs des rétinoïdes

Les récepteurs de l'acide rétinoïque ont pu être fixés sur des monocouches lipidiques par deux méthodes différentes. La première utilisait la reconnaissance entre l'étiquette histidine présente à l'extrémité des récepteurs et l'ion nickel des lipides NTA-Ni (figure II-12) et la deuxième mettait à profit l'affinité du récepteur pour un ligand synthétique incorporé dans une structure lipidique (figure II-15). Ces méthodes ont été utilisées afin de tenter de mesurer l'énergie associée au phénomène de dimérisation des récepteurs.

2-1. Fixation des récepteurs sur des monocouches de lipide NTA-Ni

Cette première expérience consistait à réaliser une mesure de forces entre deux monocouches de lipide NTA-Ni en l'absence puis en présence des récepteurs RAR ou RXR. Les récepteurs étaient injectés directement dans la cuve du SFA, à proximité des deux surfaces d'étude (figure V-7).

L'appareil dont nous disposons au laboratoire est muni d'une petite cuve (d'environ 10 ml) qui permet de plonger les deux surfaces d'étude dans un volume plus petit que celui de la cuve principale (d'environ 300 ml). On peut ainsi modifier facilement l'environnement des monocouches (en l'occurrence en les mettant en présence des récepteurs RAR ou RXR) sans avoir à injecter de trop grandes quantités de produits. De plus, cette cuve est amovible et donc facile à nettoyer, ce qui est essentiel lorsque l'on travaille avec des protéines.

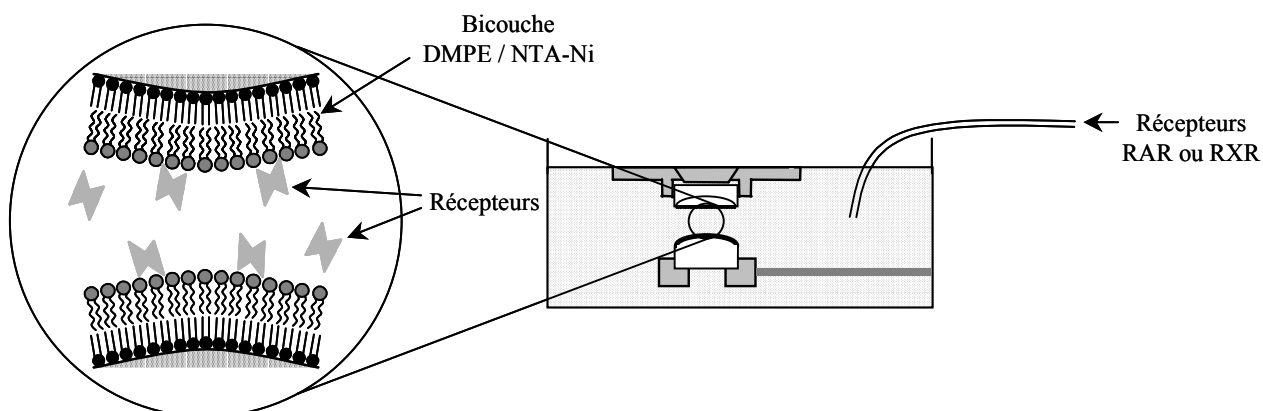


Figure V-7 : Fonctionnalisation des monocouches de lipide NTA-Ni. Les récepteurs RAR ou RXR sont injectés directement dans la petite cuve du SFA, à proximité des deux surfaces d'étude.

Après que les mesures de forces aient été réalisées entre les deux monocouches en l'absence de récepteur, les surfaces étaient séparées au moteur pas à pas jusqu'à une distance d'environ 0,5 mm et la cuve principale du SFA était vidée. Les deux surfaces d'étude restaient, elles, immergées dans la petite cuve.

On diluait alors 150 μ l d'une solution mère de récepteur à 2 g/l ($M_{\text{RAR}} \cong M_{\text{RXR}} \cong 3.10^4$ g/mol) dans 1 ml de Tris et on filtrait la nouvelle solution à l'aide d'un filtre à 0,1 μ m. On prélevait 1 ml de la solution de Tris contenue dans la petite cuve que l'on remplaçait

par 1 ml de la solution de récepteur ; la concentration des récepteurs dans la petite cuve était alors d'environ 1 μM . Juste après avoir injecté les récepteurs et pour homogénéiser au maximum le mélange, on prélevait avec la même seringue 1 ml de solution de la petite cuve que l'on ré-injectait immédiatement après ; l'opération était répétée au moins 3 fois de suite. On rapprochait ensuite les deux surfaces, à l'aide du moteur pas à pas, jusqu'à une distance d'environ 50 μm puis on les séparait immédiatement après jusqu'à une distance d'environ 0,5 mm ; l'opération était également répétée au moins trois fois de suite. La solution pouvait alors être considérée comme homogène. On laissait finalement diffuser les récepteurs pendant 30 minutes, les deux surfaces restant à 0,5 mm l'une de l'autre. On pouvait alors réaliser une nouvelle mesure de forces entre les deux surfaces d'étude. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure V-8.

Les expériences menées avec les deux récepteurs RAR ou RXR ont donné les mêmes résultats. En l'absence de récepteur, on observait un comportement adhésif entre les deux surfaces. Après l'injection des récepteurs, la distance de contact augmentait de 10 nm et le phénomène adhésif disparaissait. Ceci est révélateur d'une adsorption des récepteurs sur les monocouches de lipide NTA-Ni. Le décalage observé est compatible avec la taille des récepteurs. Cette taille a en effet été estimée à environ 5 nm par l'équipe des biologistes. Une augmentation de la distance de contact de 10 nm est donc en accord avec la fixation d'une couche relativement compacte de récepteurs sur chaque monocouche de lipide NTA-Ni. En revanche, aucune adhésion n'a pu être mesurée entre ces deux couches de récepteur : le profil de force obtenu au retour se superposait pratiquement à celui observé à l'aller. On peut noter que la force à la séparation diminuait très progressivement pour atteindre la ligne de base (force nulle). La dimérisation des récepteurs n'a donc pas pu être observée à travers les mesures de forces réalisées ici. Une rupture du contact au niveau de la liaison histidine-nickel n'est bien sûr pas exclue. Mais quel que soit le phénomène concerné, l'énergie impliquée n'était pas suffisamment importante pour compenser l'effet des forces répulsives (électrostatiques et stériques) observées à l'aller.

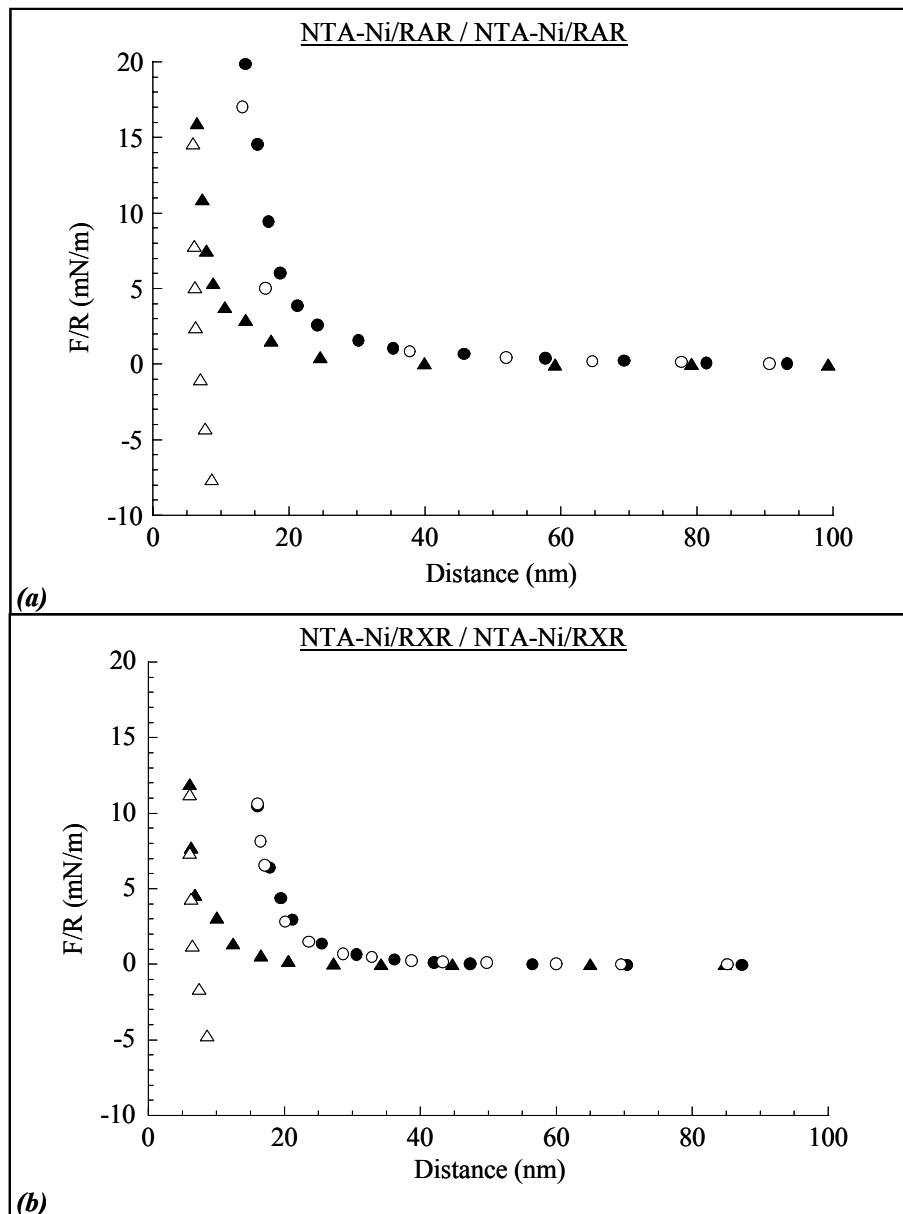


Figure V-8 : Mesures de forces dans le Tris entre deux monocouches de lipide NTA-Ni en l'absence (triangles) puis en présence (ronds) de récepteurs RAR (a) ou RXR (b). Rapprochement des surfaces : symboles pleins, séparation des surfaces : symboles vides.

2-2. Fixation des récepteurs sur des monocouches de lipide rétinol

Une deuxième méthode a été utilisée afin de tenter de mesurer l'énergie associée au phénomène de dimérisation des récepteurs. Elle consistait à fixer ces récepteurs sur une monocouche du lipide rétinol (figure II-15). Ce lipide a donc fait l'objet d'une étude

préalable afin de vérifier qu'il pouvait bien être utilisé pour des mesures de forces en SFA.

2-2-1. Isotherme et stabilité du lipide rétinoïde dans le Tris

Afin de connaître la pression maximale à laquelle nous pouvons déposer le lipide rétinoïde sur les chaînes du lipide DMPE, nous devons tout d'abord connaître son isotherme de compression à l'interface Tris-air (figure V-9).

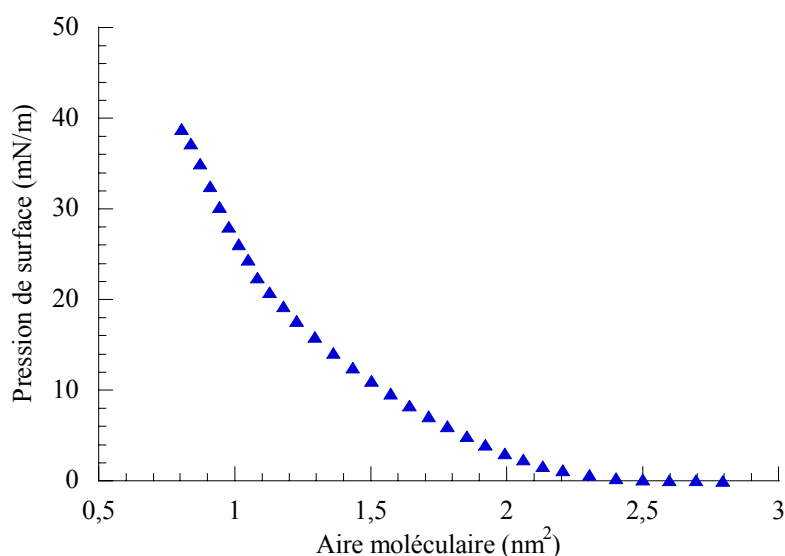


Figure V-9 : Isotherme du lipide rétinoïde à l'interface Tris-air. Le collapse est atteint pour une pression de surface de 38 mN/m, ce qui correspond à une aire moléculaire de 0,8 nm².

L'isotherme obtenue est caractéristique d'un lipide se trouvant en phase fluide, comme prévu par la structure ramifiée de sa chaîne hydrophobe (chapitre II-4-3). Le collapse de la monocouche est atteint pour une pression de surface de 38 mN/m et une aire moléculaire de 0,8 nm². Les dépôts de Langmuir-Blodgett pourront donc être réalisés à 35 mN/m, comme pour le lipide NTA-Ni.

La stabilité de la monocouche à l'interface Tris-air a également pu être vérifiée par une mesure de désorption. Le lipide s'est révélé être très stable puisque seulement 4% des molécules avaient désorbé au bout de 6 heures :

$$p_{t=6h}(\text{rétinoïde}) = 0,04 \pm 0,02 \quad (\text{V-1})$$

Où l'on utilise les mêmes notations qu'aux chapitres III-1-2 et IV-1-2.

Une grande plaque de mica a également été utilisée afin de mesurer le rapport de prélèvement lors du transfert d'une monocouche du lipide rétinoïde de l'interface Tris-air vers une monocouche de DMPE (chapitres III-1-3 et IV-1-3). Nous avons trouvé :

$$r_{\text{rétinoïde}} = 0,98 \pm 0,03 \quad (\text{V-2})$$

Le lipide rétinoïde formera donc des monocouches bien compactes à la surface du mica (rapport de prélèvement proche de 1).

Pour une pression de dépôt de 35 mN/m, son aire moléculaire à l'interface Tris-air est de 0,87 nm². A la surface du mica, elle deviendra donc :

$$\sigma_{\text{rétinoïde/mica}} = \frac{\sigma_{\text{rétinoïde}}}{r_{\text{rétinoïde}}} = 0,89 \text{ nm}^2 \quad (\text{V-3})$$

Quant aux mesures de stabilité de la bicouche DMPE/rétinoïde déposée sur la plaque de mica et plongée dans une solution de Tris, elles ont mis en évidence une perte d'environ 1,5% de lipide par heure. C'est un peu plus que ce qui avait été mesuré pour les lipides NTA et NTA-Ni (chapitre IV-1-3) mais ceci assure néanmoins que les bicouches seront stables à l'échelle d'une expérience SFA.

2-2-2. Profils de force récepteurs/récepteurs

Le protocole suivi lors de ces nouvelles mesures était en tout point identique à celui présenté dans le chapitre V-2-1. Nous commençons par étudier le profil de force entre deux monocouches du lipide rétinoïde plongées dans le Tris puis étudions l'effet de l'injection des récepteurs, à proximité des deux surfaces d'étude, sur ce profil de force. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure V-10.

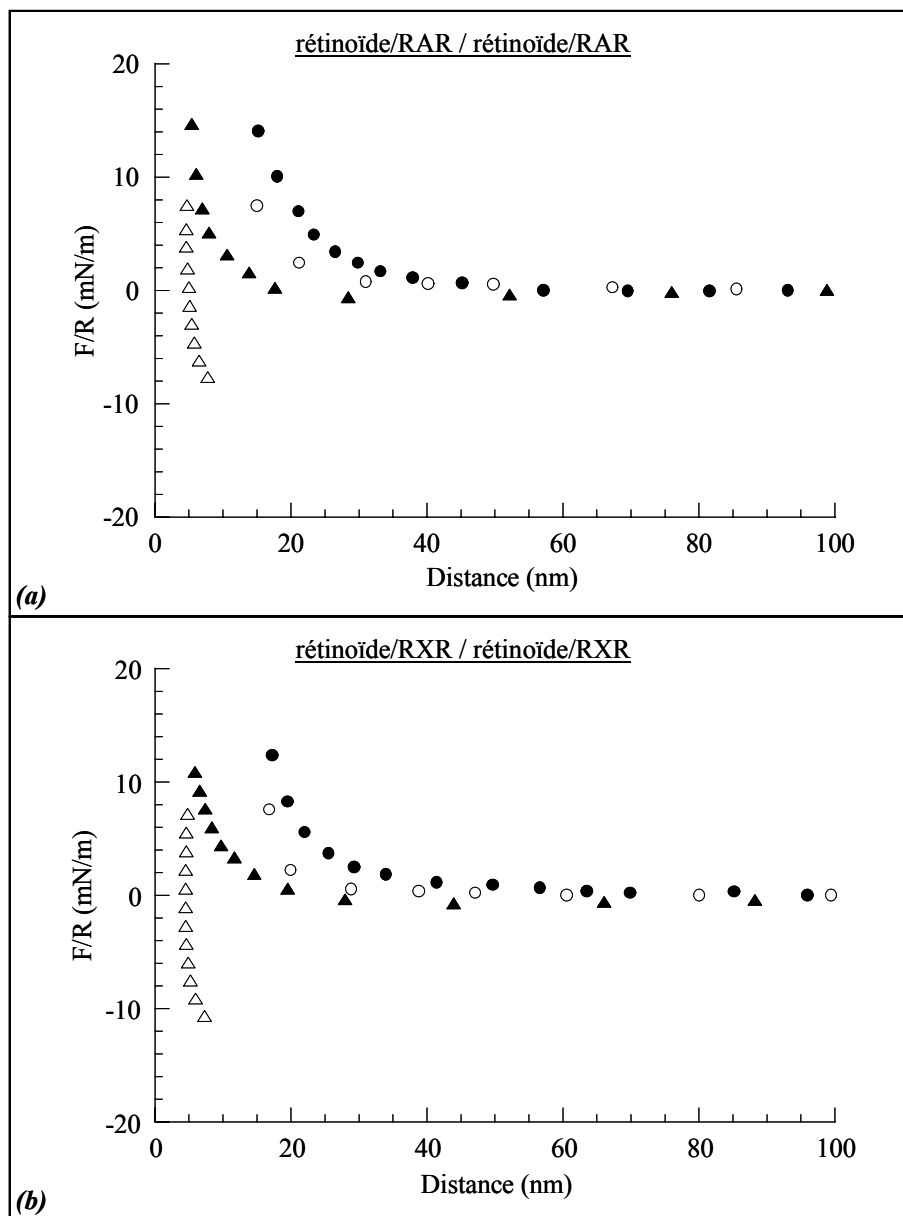


Figure V-10 : Mesures de forces dans le Tris entre deux monocouches de lipide rétinoïde en l'absence (triangles) puis en présence (ronds) des récepteurs RAR (a) ou RXR (b). Rapprochement des surfaces : symboles pleins, séparation des surfaces : symboles vides.

Comme dans le cas des monocouches NTA-Ni, les expériences menées avec les récepteurs RAR ou RXR ont conduit aux mêmes résultats. En l'absence de récepteur, la distance de contact était de 6 nm et on mesurait une force de séparation de l'ordre de 10 mN/m entre les deux surfaces. Après l'injection des récepteurs, la distance de contact augmentait de 10 nm et nous n'observions plus d'adhésion. Cette augmentation de la distance de contact est compatible avec la taille des récepteurs (5 nm) dans une

configuration où une seule couche de récepteur se fixe sur chaque monocouche de lipide rétinoïde.

La spécificité supposée du ligand synthétique pour le récepteur RXR n'a donc pas été vérifiée puisque les récepteurs RAR se fixaient également sur les monocouches de lipide rétinoïde. L'affinité du ligand pour le récepteur RAR ne semble donc pas très différente de son affinité pour le récepteur RXR (dans les deux cas le ligand vient s'insérer dans la poche hydrophobe du récepteur).

Le profil de force obtenu lors de la séparation des surfaces ne se superposait pas exactement à celui observé à l'aller. Cette différence est simplement due à une diminution de la taille des récepteurs résultant de leur compression lors de la phase de rapprochement. Mais la force mesurée lors de la séparation diminuait encore progressivement jusqu'à atteindre la ligne de base (force nulle). Aucune adhésion liée à la dimérisation des récepteurs n'a donc été observée ici.

Les mesures de forces réalisées entre des monocouches du lipide NTA-Ni ou du lipide rétinoïde mises en présence des récepteurs RAR ou RXR ont révélé que les protéines se fixaient bien sur les surfaces mais la dimérisation des récepteurs n'a pas pu être observée à travers les profils obtenus. Deux explications peuvent être données à ce résultat : soit les récepteurs n'avaient pas la bonne orientation, soit ils s'absorbaient déjà sous la forme de dimères. Dans ce dernier cas, étant donné la distance de contact mesurée, ces dimères devaient être couchés sur la monocouche.

3. Mesures de forces entre une monocouche de lipide rétinoïde et une couche de récepteurs RXR

Dans cette partie nous présentons les premières mesures de forces obtenues entre une monocouche de lipide rétinoïde et une monocouche de lipide NTA-Ni recouverte de récepteurs RXR. Le lipide rétinoïde et le lipide NTA-Ni étaient tous les deux déposés à la pression de 35 mN/m et les expériences étaient réalisées dans une solution de Tris 10 mM. Ici, nous ne pouvions pas utiliser le même protocole expérimental afin de fonctionnaliser les monocouches de lipide NTA-Ni. En effet, en injectant le récepteur directement dans la cuve du SFA, on risquait de le voir venir s'accrocher également sur

la monocouche de lipide rétinoïde, ce qui aurait rendu impossible la mesure de forces entre le récepteur et son ligand. Nous avons donc préféré laisser incuber la lentille sur laquelle la bicouche DMPE/NTA-Ni avait été déposée dans un petit “bêcher” de 5 ml contenant une solution du récepteur RXR à 1 μM (75 μl d’une solution mère de récepteur RXR à 2 g/l avait été préalablement diluée dans 5 ml de Tris et cette solution avait été filtrée à 0,1 μm). Nous laissons diffuser le récepteur pendant environ 1 heure puis nous rincions la lentille en la plongeant dans un grand “bêcher” de 100 ml. La lentille était alors fixée comme d’habitude dans la cuve du SFA et les mesures étaient entreprises.

Les mesures de forces ont été réalisées en différents endroits de la monocouche. Selon la position choisie et selon le temps d’attente avant le lancement des mesures, deux profils de force différents ont été obtenus. Pour chaque position testée on réalisait plusieurs allers-retours successifs en pressant à chaque fois un peu plus les deux surfaces l’une contre l’autre. Sur la première mesure réalisée (triangles de la figure V-11), la distance de contact correspondait à 2 tailles de récepteur (plus celle des deux monocouches de lipide rétinoïde et NTA-Ni), c’est-à-dire environ 15 nm. Contrairement à ce qui avait été observé entre des monocouches recouvertes de récepteurs, la cinétique de séparation des surfaces a mis ici en évidence un phénomène adhésif. La force mesurée lors de la séparation diminuait progressivement au début mais rejoignait la ligne de base (force nulle) par un saut d’environ 20 nm (saut adhésif). La constante de raideur du ressort utilisé étant de 1680 N/m et les surfaces d’étude ayant un rayon de courbure de 2 cm, ceci correspond à une force de séparation de l’ordre de 2 mN/m. Pour confirmer ce résultat nous devons travailler avec un ressort de constante de raideur plus faible et essayer d’obtenir davantage de points dans la région des distances proches du saut adhésif, c’est-à-dire entre 20 et 40 nm.

Sur les mesures suivantes, lorsque la force maximale imposée dépassait 20 mN/m, la distance de contact diminuait. Les récepteurs étaient alors expulsés hors de la zone de contact entre les deux surfaces.

Si nous testions une nouvelle position sur la monocouche immédiatement après, sans laisser le temps aux récepteurs de se réorganiser, la distance de contact correspondait plutôt à 1 taille de récepteur (plus celle des deux monocouches), soit environ 10 nm

(ronds de la figure V-10). Nous observions également dans ce cas un petit saut adhésif de l'ordre de 20 nm.

Si nous attendions environ 30 min après avoir changé de position et avant de lancer une nouvelle mesure, nous retrouvions la distance de contact initiale, c'est-à-dire 15 nm (courbe équivalente à celle symbolisée par les triangles de la figure V-11).

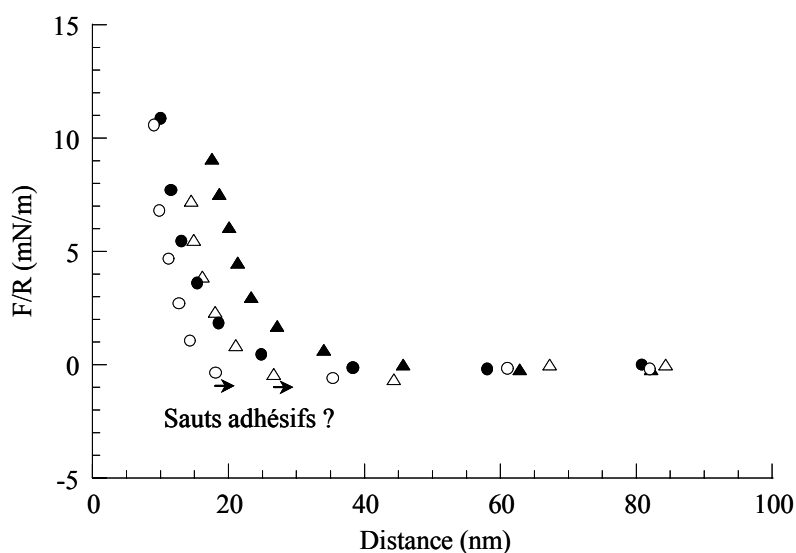


Figure V-11 : Mesures de forces dans le Tris entre une monocouche de lipide rétinoïde et une monocouche de lipide NTA-Ni recouverte de récepteurs RXR. Les deux profils (triangles et ronds) sont issus de la même expérience. Dans le cas du profil symbolisé par les triangles, la monocouche de lipide NTA-Ni est recouverte de dimères des récepteurs RXR et dans le cas du profil symbolisé par les ronds, elle est recouverte de monomères. Rapprochement des surfaces : symboles pleins, séparation des surfaces : symboles vides.

Il semblerait donc que les monocouches de lipide NTA-Ni soient initialement recouvertes de dimères des récepteurs (figure V-12a) puis que la série de mesures réalisée perturbe cette organisation pour ne laisser qu'une seule couche de récepteur à la surface des monocouches (figure V-12b). En attendant plus longtemps avant de lancer une nouvelle série de mesures, on laisse le temps aux récepteurs de se réorganiser et on retrouve l'organisation en dimères.

Une petite adhésion a donc pu être observée entre le récepteur RXR et son ligand. Le saut hors du contact (saut adhésif) était de l'ordre de 20 nm, ce qui correspond, compte

tenu de la raideur du ressort utilisé, à une force de séparation de l'ordre de 2 mN/m. Ce résultat nécessite d'être confirmé et notamment il faudra réaliser une étude plus fine de la phase de séparation entre les deux surfaces. La prochaine mesure sera donc réalisée avec un ressort ayant une constante de raideur 10 fois plus faible et tentera de faire apparaître davantage de points expérimentaux dans la région proche du saut adhésif.

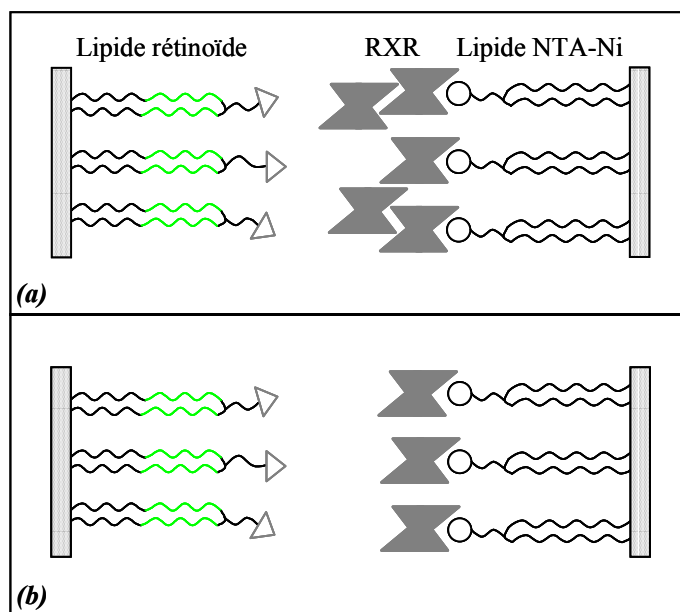


Figure V-12 : Configurations expérimentales supposées lors des mesures de forces entre une monocouche de lipide rétinoïde et une monocouche de lipide NTA-Ni recouverte de récepteurs RXR. Après réorganisation, les récepteurs se fixent sous la forme de dimères (a). Les perturbations générées par la série de mesures de forces peuvent détruire cette organisation en ne laissant qu'une seule couche de récepteurs en surface (b).

4. Mesures de forces dans l'eau pure entre deux monocouches de lipide rétinoïde : un exemple d'interaction entre deux surfaces hydrophobes

De part sa structure chimique, le lipide rétinoïde s'est révélé être également un outil de choix pour des mesures de forces impliquant à la fois des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogène. Sa tête polaire est en effet constituée de deux cycles

aromatiques hydrophobes (un cycle benzénique et un cycle tétrahydronaphtalénique) et d'un groupe carboxyle capable de former des liaisons hydrogène (figure V-13).

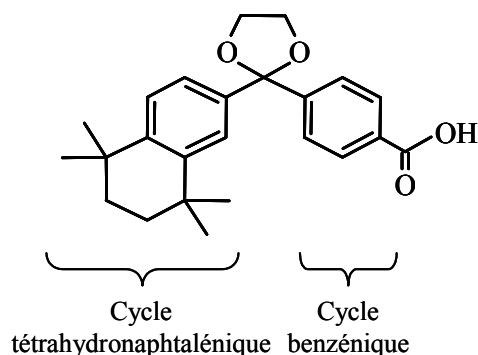


Figure V-13 : Structure chimique de la tête polaire du lipide rétinoïde. Les deux cycles aromatiques apporte un comportement hydrophobe alors que la fonction carboxyle est polaire et peut former des liaisons hydrogène.

Des mesures de forces ont été réalisées entre deux bicouches DMPE/rétinoïde supportées par des surfaces de mica. Le lipide DMPE était déposé sur le mica à 38 mN/m et le lipide rétinoïde était déposé sur les chaînes du lipide DMPE à 35 mN/m. Les dépôts de Langmuir-Blodgett ainsi que les mesures de forces étaient réalisés dans une eau ultra-pure et dégazée.

Un profil de force type obtenu entre deux monocouches de lipide rétinoïde plongées dans l'eau pure est présenté dans la figure V-14. Aucune force n'a été détectée entre 200 nm et 100 nm. Nous n'avons pas observé non plus de répulsion électrostatique entre les deux surfaces. Ceci nous permet de conclure que les deux monocouches de lipide rétinoïde sont électriquement neutres dans l'eau pure. Cette électroneutralité peut s'expliquer par le fait que, même dans l'eau pure, une grande proportion de contre-ions peuvent venir d'adsorber sur les surfaces et les rendre ainsi électriquement neutres (chapitre III-2-5). Aux alentours de 100 nm, il apparaissait une force attractive qui augmentait lorsque l'on rapprochait les deux surfaces l'une de l'autre (insert de la figure V-14). L'origine de cette force est inconnue mais elle pourrait être liée à une tendance des cycles aromatiques à s'organiser en mettant leurs plans parallèles les uns aux autres, comme il avait déjà été observé pour les lipides nucléosides (Perez, 1998). Lorsque le gradient de la force s'exerçant entre les deux surfaces devenait supérieur à la constante

de raideur du ressort, les deux surfaces sautaient au contact. Une répulsion de nature stérique apparaissait alors sur une échelle de 0,5 à 1 nm. Si l'on continuait de rapprocher les deux surfaces l'une de l'autre, on atteignait rapidement l'état de compactage théorique maximum des deux monocouches de lipide rétinoïde (D_0 de l'ordre de 6 nm). Les franges d'interférence avaient alors une forme aplatie, ce qui est caractéristique de deux surfaces en fort contact adhésif (chapitre II-2-5). Au début de la phase de séparation, la distance ne variait pratiquement pas puis, lorsque la force appliquée devenait suffisamment grande, elle augmentait à nouveau pour retrouver la valeur obtenue après le saut au contact. Les deux surfaces se séparaient alors brusquement (saut adhésif) et se retrouvaient à 500 nm l'une de l'autre.

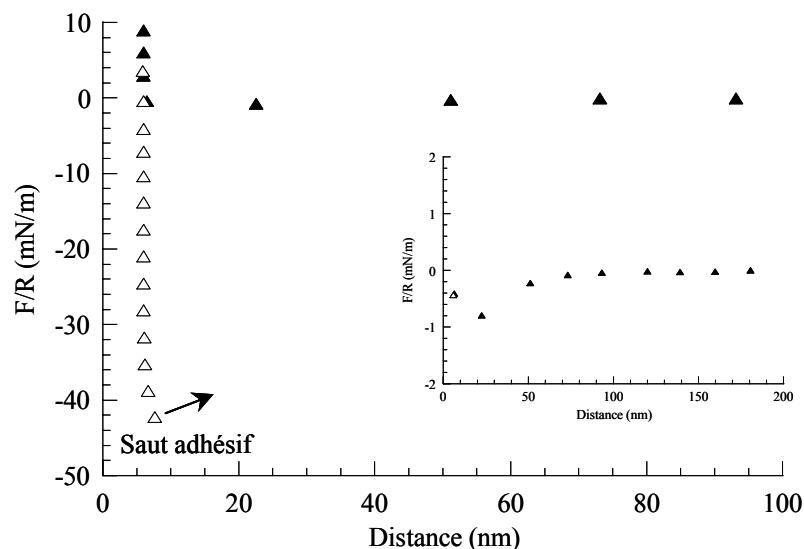


Figure V-14 : Mesures de forces dans l'eau pure entre deux monocouches de lipide rétinoïde. En insert, on peut visualiser la force attractive qui s'exerçait à longue distance lors du rapprochement des deux surfaces. Rapprochement des surfaces : triangles pleins, séparation des surfaces : triangles vides.

L'expérience a mis en évidence une très grande force de séparation entre les deux surfaces (de l'ordre de 40 mN/m). Cette force comprend une contribution des liaisons hydrogène qui peuvent se former entre les groupes carboxyle et une contribution des forces hydrophobes existant entre les cycles aromatiques. De la force de séparation F_0 , on peut déduire l'énergie d'adhésion macroscopique entre les deux surfaces. Le contact entre ces deux surfaces étant plat, nous appliquons pour cela la théorie JKR :

$$E_0 = \frac{2}{3\pi} \frac{F_0}{R} \cong 8,9 \text{ mJ/m}^2 \quad (\text{V-4})$$

Nous allons à présent tenter de donner une première estimation de la contribution des forces hydrophobes à l'énergie d'adhésion mesurée au niveau macroscopique puis à l'échelle des têtes polaires des lipides rétinoïde (têtes rétinoïde). Pour cela nous allons partir de l'hypothèse que les têtes des lipides ne forment pas de liaisons hydrogène "intra-couche". Il est en effet fort probable qu'à l'instar des bases de l'ADN, les cycles aromatiques s'organisent en mettant leurs plans parallèles les uns aux autres, ce qui a pour conséquence d'empêcher toute formation de liaisons hydrogène au sein d'une même monocouche. Par ailleurs, nous avons vu au chapitre III-2-5 que la moitié des groupes carboxyle étaient ionisés dans l'eau pure. Nous en déduisons donc qu'il se forme en moyenne 1 liaison hydrogène par tête rétinoïde. D'après l'expression III-21 donnant l'énergie d'adhésion macroscopique entre deux surfaces portant des sites hydrogène, nous en déduisons que la contribution des liaisons hydrogène à l'énergie mesurée entre les deux monocouches de lipide rétinoïde s'écrit :

$$E_H(\text{rétinoïde/rétinoïde}) = \frac{k_B T}{\sigma} \frac{e_H}{1 + \exp(-e_H)} \quad (\text{V-5})$$

Où : σ est donnée par l'équation (V-3) et où e_H est l'énergie moyenne d'une liaison hydrogène dans l'eau pure (de l'ordre de $1 k_B T$).

On obtient :

$$E_H(\text{rétinoïde/rétinoïde}) \cong 3,3 \text{ mJ/m}^2 \quad (\text{V-6})$$

D'où :

$$E_{\text{Hydrophobe}}(\text{rétinoïde/rétinoïde}) \cong E_0 - E_H(\text{rétinoïde/rétinoïde}) \cong 5,6 \text{ mJ/m}^2 \quad (\text{V-7})$$

Ce qui correspond à une contribution moyenne des forces hydrophobes au niveau moléculaire de :

$$e_{\text{Hydrophobe}}(\text{rétinoïde/rétinoïde}) = \frac{\sigma E_{\text{Hydrophobe}}(\text{rétinoïde/rétinoïde})}{k_B T} \cong 1,2 k_B T \quad (\text{V-8})$$

La contribution des forces hydrophobes à l'énergie d'adhésion entre deux têtes rétinoïde serait donc du même ordre de grandeur que celle des liaisons hydrogène.

Remarque – Comparaison avec les mesures de forces réalisées dans le Tris

Les profils de force obtenus dans le Tris entre deux monocouches de lipide rétinoïde (figure V-10) ont mis en évidence des forces de séparation moins importantes (de l'ordre de 10 mN/m). Mais dans ces conditions la plupart des groupes carboxyle sont ionisés et il ne se forme plus de liaison hydrogène. Le pK_a des groupes carboxyle se trouvant en surface est en effet de 5,8 (chapitre III-2-5) ce qui ne laisse qu'1 groupe carboxyle sur 100 non ionisé dans les conditions de l'expérience. On mesure donc uniquement une énergie d'adhésion due aux forces hydrophobes entre les têtes rétinoïde. Afin d'estimer cette énergie d'adhésion, il faut calculer la force de séparation effective entre les deux surfaces, c'est-à-dire ajouter à la force de séparation mesurée la contribution de la force de répulsion électrostatique (chapitre IV-2-3-4). Cette force de séparation effective est de l'ordre de 20 mN/m, ce qui correspond à une énergie d'adhésion macroscopique de l'ordre de 4 mJ/m² et à une énergie d'adhésion moyenne par tête rétinoïde de l'ordre de 0,9 $k_B T$. On retrouve bien l'ordre de grandeur calculé dans l'eau pure.

5. Conclusion

Des mesures de pressions de surface sur la balance de Langmuir ainsi que des mesures en microscopie de fluorescence ont permis de vérifier qu'une séquence de six molécules d'histidine s'accrochait bien de façon spécifique, c'est-à-dire par l'intermédiaire de la reconnaissance histidine-nickel, sur le lipide NTA-Ni. Deux outils différents pouvaient donc être utilisés afin de fixer des récepteurs de l'acide rétinoïque portant une étiquette histidine : des monocouches de lipide NTA-Ni (fixation par l'intermédiaire de la liaison histidine-nickel) ou des monocouches de lipide rétinoïde (fixation par l'intermédiaire de la liaison récepteur-ligand). Dans les deux cas, les mesures de forces ont bien fait apparaître la fixation des récepteurs sur les monocouches. En revanche, l'adhésion liée à la dimérisation des récepteurs n'a pas été observée dans les conditions de nos expériences. Ceci implique que les récepteurs n'avaient peut-être pas la bonne orientation sur les surfaces ou qu'ils s'étaient déjà adsorbés sous la forme de dimères. Des mesures de forces réalisées entre une monocouche de lipide rétinoïde et une

monocouche de lipide NTA-Ni recouverte de récepteurs RXR ont révélé une faible force de séparation, de l'ordre de 2 mN/m ; le résultat est à confirmer. En effectuant des mesures de forces entre deux monocouches de lipide rétinoïde dans l'eau pure, nous avons mis en évidence une forte énergie d'adhésion attribuée aux forces hydrophobes et aux liaisons hydrogène. Les contributions des forces hydrophobes et des liaisons hydrogène à l'énergie d'adhésion entre deux têtes rétinoïde se sont avérées être du même ordre de grandeur, soit environ $1 k_B T$.

Conclusion

La mise en commun des compétences actuelles en synthèses chimiques, en biologie moléculaire et en physique de l'adhésion nous a offert la possibilité d'isoler des groupes fonctionnels de leur environnement naturel pour obtenir, par mesure directe, leurs énergies de liaison. Les chimistes et les biologistes produisent des outils moléculaires incluant ou mimant certaines fonctions du milieu vivant, ce qui permet aux physiciens de mesurer, grâce aux nanotechniques récemment maîtrisées, des énergies d'adhésion au niveau moléculaire.

Un lipide synthétique dont la tête polaire était constituée d'un groupement nitrilotriacétate (lipide NTA) ainsi que sa forme complexée par un ion nickel (lipide NTA-Ni) ont été impliqués dans un certain nombre d'expériences de mesures de forces dans le but de quantifier l'énergie de différentes liaisons : liaison hydrogène, liaison par chélation et liaison récepteur-ligand. Les mesures ont été principalement réalisées à l'aide de l'appareil de mesure de forces entre surfaces (SFA) et certaines ont été complétées et confirmées par la technique des vésicules micromanipulées. Dans les deux expériences les lipides étaient incorporés dans des structures en bicouche.

Les mesures de forces réalisées dans l'eau pure sur le lipide NTA ont mis en évidence des énergies d'adhésion bien plus grandes que celles généralement observées entre des phospholipides ne formant pas de liaisons hydrogène. Une description statistique simple nous a permis d'en déduire l'énergie d'une liaison hydrogène entre deux fonctions carboxyle dont l'atome donneur de liaisons hydrogène est un atome d'oxygène (liaison de type OH---O). Le modèle statistique a également été appliqué à des mesures d'énergies d'adhésion entre des lipides dont la tête polaire était constituée de bases modifiées de l'ADN. Ces têtes polaires contenaient des fonctions amine dont l'atome donneur de liaisons hydrogène est un atome d'azote (liaisons de type NH---O et NH---N). Le résultat inattendu est que les énergies obtenues pour ces liaisons hydrogène étaient égales (aux incertitudes près) à celles mesurées entre les fonctions carboxyle. Ceci nous a donc permis d'estimer l'énergie moyenne d'une liaison hydrogène dans

l'eau pure : environ $1 k_B T$ (ou $0,6 \text{ kcal/mol}$). Ce résultat peut être utile à la compréhension de certains phénomènes faisant intervenir les liaisons hydrogène comme le repliement des protéines ou la reconnaissance entre les acides nucléiques.

Les mesures de forces réalisées dans l'eau pure sur le lipide NTA-Ni ont révélé une énergie d'adhésion comparable à celles généralement observées entre des phospholipides classiques. Cette adhésion était beaucoup plus faible que celle obtenue avec le lipide NTA. Les groupements NTA-Ni étaient donc tous fonctionnalisés au nickel dans l'eau pure et les liaisons hydrogène étaient bloquées.

Les mesures d'adhésion réalisées dans le Tris (pH 8) ont utilisé les deux techniques expérimentales : SFA et vésicules micromanipulées. Durant cette étude, nous nous sommes heurtés à un problème de taille : les lipides NTA-Ni n'étaient que partiellement fonctionnalisés au nickel ! Une image claire des phénomènes observés a néanmoins pu ressortir grâce à un très bon accord entre les résultats obtenus à l'aide des deux techniques expérimentales. Il a été estimé que seulement 20% des lipides NTA-Ni possédaient toujours leur ion nickel durant ces expériences. Cette perte en ions nickel pourrait être due à leur fixation par le Tris. Les résultats ont montré qu'un ion nickel pouvait être partagé par deux groupements NTA distincts (un groupement NTA initialement fonctionnalisé au nickel et un groupement NTA initialement vacant). Pour chaque technique expérimentale, un modèle statistique a été utilisé afin d'obtenir une estimation de l'énergie de chélation de l'ion nickel par le groupement NTA initialement vacant. Les deux approches ont conduit à une même valeur pour l'énergie de liaison entre deux groupements NTA par partage d'un ion nickel : environ $2 k_B T$. Ce résultat constitue la première mesure directe de l'énergie d'une liaison par chélation. Etant donné la somme des phénomènes faisant intervenir la chélation d'un ion métallique par une molécule organique, la connaissance de l'énergie impliquée pourra intéresser d'autres domaines de la recherche scientifique : recherche médicale, recherche environnementale, *etc.* Le résultat ouvre de plus la voie à de nouvelles techniques d'ancrage des protéines aux interfaces, qui pourront utiliser un ligand relais et s'affranchir ainsi des lourdes étapes de manipulation génétique actuellement utilisées.

Le lipide NTA-Ni a également été utilisé comme un outil permettant de coupler des récepteurs de l'acide rétinoïque portant une étiquette histidine aux surfaces d'étude du SFA. Un lipide dont la tête polaire était constituée d'un ligand synthétique des récepteurs RXR (lipide rétinoïde) a permis d'effectuer une mesure de forces entre une monocouche de ligands et une monocouche recouverte de récepteurs. Une faible force de séparation, de l'ordre de 2 mN/m, a été mesurée. Les mesures ayant été réalisées en différents endroits de la bicouche mais pour un seul couple de bicouches, ce résultat reste à confirmer. Des mesures de forces ont également été réalisées entre deux couches de récepteurs et en utilisant deux modes d'ancrage différents : la liaison histidine-nickel et la liaison récepteur-ligand. L'accrochage était effectif mais aucune adhésion associée au phénomène de dimérisation n'a été observée. Dans les conditions de l'expérience, les récepteurs n'avaient visiblement pas la bonne orientation ou peut-être s'étaient-ils déjà adsorbés sur les monocouches sous la forme de dimères.

Le lipide rétinoïde a également permis d'effectuer des mesures de forces tout à fait originales entre deux bicouches à fort caractère hydrophobe. Les mesures de forces sont en effet habituellement réalisées soit entre les têtes polaires hydrophiles de deux bicouches soit entre les chaînes hydrophobes de deux monocouches. Nous avons ici une situation nouvelle où les têtes étaient à la fois polaires et hydrophobes. En effet, la tête du lipide rétinoïde est constituée d'un groupement carboxyle polaire et de deux cycles aromatiques hydrophobes. Les expériences ont été réalisées dans différentes conditions physico-chimiques. Dans l'eau pure (pH 5-6), les mesures ont mis en évidence une très forte énergie d'adhésion due à l'effet combiné des liaisons hydrogène et des forces hydrophobes. Dans le Tris (pH 8), l'énergie d'adhésion était plus faible : les groupes carboxyle étaient ionisés et l'adhésion n'était due qu'aux forces hydrophobes. La contribution des forces hydrophobes à l'énergie d'adhésion moyenne entre deux têtes rétinoïde a pu être évaluée : environ $1 k_B T$. Le lipide rétinoïde peut être vu comme un composé modèle permettant de reproduire certaines des interactions présentes au sein des protéines et qui assurent la stabilité de leurs structures tridimensionnelles (forces hydrophobes et liaisons hydrogène).

Références

Alberts, B. 1998. *The Cell as a Collection of Protein Machines : Preparing the Next Generation of Molecular Biologists*. Cell. 92 : 291–294.

Angelova, M.I., S. Soléau, P. Meléard, J.F. Faucon, and P. Bothorel. 1992. *Preparation of Giant Vesicles by External AC Electric Fields. Kinetics and Applications*. Prog. Colloid Polym. Sci. 89 : 127-131.

Attard, P., and M.T. Batchelor. 1988. *A Mechanism for the Hydration Force Demonstrated in a Model System*. Chem. Phys. Lett. 149 : 206-211.

Baker, E.N., and R.E. Hubbard. 1984. *Hydrogen Bonding in Globular Proteins*. Prog. Biophys. Mol. Biol. 44 : 97-179.

Bell, G.I., M. Dembo, and P. Bongrand. 1984. *Competition between Nonspecific Repulsion and Specific Binding*. Biophys. J. 45 : 1051-1064.

Bershad, S. 2001. *Developments in Topical Retinoid Therapy for Acne*. Semin. Cutan. Med. Surg. 20 : 154-161.

Betts, J.J., and B.A. Pethica. 1956. *The Ionization Characteristics of Monolayers of Weak Acids and Bases*. Trans. Faraday Soc. 52 : 1581-1589.

Bourguet, W., M. Ruff, P. Chambon, H. Gronemeyer, and D. Moras. 1995. *Crystal Structure of the Ligand-Binding Domain of the Human Nuclear Receptor RXR-alpha*. Nature. 375 : 377-382.

Bourguet, W., P. Germain, and H. Gronemeyer. 2000a. *Nuclear Receptor Ligand-Binding Domains : Three-Dimensional Structures, Molecular Interactions and Pharmacological Implications*. TIPS. 21 : 381-388.

- Bourguet, W., V. Vivat, J.M. Wurtz, P. Chambon, H. Gronemeyer, and D. Moras. 2000b. *Crystal Structure of a Heterodimeric Complex of RAR and RXR Ligand-Binding Domains*. Mol. Cell. 5 : 289-298.
- Caffrey M., and D.H. Bilderback. 1983. *Real-Time X-Ray Diffraction Using Synchrotron Radiation : System Characterization and Applications*. Nucl. Instrum. Methods. 208 : 495-510.
- Casimir, H.B.G., and D. Polder. 1948. *The influence of Retardation on the London-Van der Waals Forces*. Phys. Rev. 73 : 360-372.
- Chambon, P. 1996. *A Decade of Molecular Biology of Retinoic Acid Receptors*. FASEB J. 10 : 940-954.
- Chapman, D.L. 1913. *A Contribution to the Theory of Electrocapillarity*. Philos. Mag. 25 : 475-481.
- Chandraratna, R.A. 1997. *Tazarotene : the First Receptor-Selective Topical Retinoid for the Treatment of Psoriasis*. J. Am. Acad. Dermatol. 37 : S12-S17.
- Chen, Z.P., J. Iyer, W. Bourguet, P. Held, C. Mioskowski, L. Lebeau, N. Noy, P. Chambon, and H. Gronemeyer. 1998. *Ligand- and DNA-Induced Dissociation of RXR Tetramers*. J. Mol. Biol. 275 : 55-65.
- Chomienne C., P. Fenaux, L. Degos. 1996. *Retinoid Differentiation Therapy in Promyelocytic Leukemia*. FASEB J. 10 : 1025-1030.
- Davies, J.T., and E.K. Rideal. 1963. *Interfacial Phenomena*. Academic Press, New York.

Dawson M.I., L. Jong, H.D. Hobbs, J.F. Cameron, W.R. Chao, M. Pfahl, M.O. Lee, B. Shroot, and M. Pfahl. 1995. *Conformational Effects on Retinoid Receptor Selectivity. 2. Effects of Retinoid Bridging Group on Retinoid X Receptor Activity and Selectivity*. J. Med. Chem. 38 : 3368-3383.

De Gennes, P.G. 1985. *Stabilité de Films Polymère/Solvant*. C. R. Acad. Sci. (Paris). 300 : 839-843.

De Gennes, P.G. 1987. *Polymers at an Interface ; a Simplified View*. Adv. Colloid Interface Sci. 27 : 189-209.

Derjaguin, B.V. 1934. *Untersuchungen über die Reibung und Adhäsion*. Kolloid Z. 69 : 155-164.

Derjaguin, B.V., and L. Landau. 1941. *Theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols and of the Adhesion of Strongly Charged Particles in Solutions of Electrolytes*. Acta Physicochim. URSS. 14 : 633-662.

Derjaguin, B.V., V.M. Muller, and Y.P. Toporov. 1975. *Effect of Contact Deformations on the Adhesion of Particles*. J. Colloid Interface Sci. 53 : 314-326.

Dolan, A.K., and S.F. Edwards. 1974. *Theory of the Stabilization of Colloids by Adsorbed Polymer*. Proc. R. Soc. Lond. A. 337 : 509-516.

Dzyaloshinskii, I.E., E.M. Lifshitz, and L.P. Pitaevskii. 1961. *The General Theory of Van der Waals Forces*. Adv. Phys. 10 : 165-209.

Egea, P.F., A. Mitschler, N. Rochel, M. Ruff, P. Chambon, and D. Moras. 2000. *Crystal Structure of the Human RXR-alpha Ligand-Binding Domain Bound to its Natural Ligand : 9-cis Retinoic Acid*. EMBO J. 19 : 2592-2601.

Evans¹, E. 1980. *Analysis of Adhesion of Large Vesicles to Surfaces*. Biophys. J. 31 : 425-431.

Evans¹, E., and M. Metcalfe. 1984. *Free Energy Potential for Aggregation of Giant, Neutral Lipid Bilayer Vesicles by Van Der Waals Attraction*. Biophys. J. 46 : 423-426.

Evans¹, E. 1985. *Detailed Mechanics of Membrane-Membrane Adhesion and Separation. Continuum of Molecular Cross-Bridges*. Biophys. J. 48 : 175-183.

Evans¹, E., and D. Needham. 1987. *Physical Properties of Surfactant Bilayer Membranes*. J. Phys. Chem. 91 : 4219-4227.

Evans¹, E. 1990. *Adhesion of Surfactant-Membrane Covered Droplets : Special Features and Curvature Elasticity Effects*. Colloid. Surface. 43 : 327-347.

Evans¹, E. 1991. *Entropy-Driven Tension in Vesicle Membranes and Unbinding of Adherent Vesicles*. Langmuir. 7 : 1900-1908.

Evans¹, E. 1992. *Equilibrium "Wetting" of Surfaces by Membrane-Covered Vesicles*. Adv. Colloid Interface Sci. 39 : 103-128.

Evans¹, E., and K. Ritchie. 1997. *Dynamic Strength of Molecular Adhesion Bonds*. Biophys. J. 72 : 1541-1555.

Evans², R., and A.O. Parry. 1990. *Liquids at Interfaces : What Can a Theorist Contribute?* J. Phys. : Condens. Matter. 2 : SA15-SA32.

Florin, E.L., V.T. Moy, and H.E. Gaub. 1994. *Adhesion Forces between Individual Ligand-Receptor Pairs*. Science. 264 : 415-417.

Gaines, G.L. 1966. *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*. Interscience Publishers, New York.

Germain P., J. Iyer, C. Zechel, and H. Gronemeyer. 2002. *Coregulator Recruitment and the Mechanism of Retinoic Acid Receptor Synergy*. *Nature*. 415 : 187-192.

Gouy, G. 1910. *Sur la Constitution de la Charge Electrique à la Surface d'un Electrolyte*. *J. Phys.* 9 : 457-468.

Grahame, D.C. 1953. *Diffuse Double Layer Theory for Electrolytes for Unsymmetrical Valence Types*. *J. Chem. Phys.* 21 : 1054-1060.

Hamaker, H.C. 1937. *The London-van der Waals Attraction between Spherical Particles*. *Physica*. 4 : 1058-1072.

Held, P., F. Lach, L. Lebeau, and C. Mioskowski. 1997. *Synthesis and Preliminary Evaluation of a New Class of Fluorinated Amphiphiles Designed for In-Plane Immobilisation of Biological Macromolecules*. *Tetrahedron Lett.* 38 : 1937-1940.

Helfrich, W. 1978. *Steric Interaction of Fluid Membranes in Multilayer Systems*. *Z. Naturforsch.* 33a : 305-315.

Helfrich, W., and R.M. Servuss. 1984. *Undulations, Steric Interaction and Cohesion of Fluid Membranes*. *Nuovo Cimento*. 3 : 137-151.

Helm, C.A., J.N. Israelachvili, and P.M. McGuiggan. 1989. *Molecular Mechanisms and Forces Involved in the Adhesion and Fusion of Amphiphilic Bilayers*. *Science*. 246 : 919-922.

Helm, C.A., W. Knoll, and J.N. Israelachvili. 1991. *Measurement of Ligand-Receptor Interactions*. *Biochemistry*. 88 : 8169-8173.

Henderson, D., and M. Lozada-Cassou. 1986. *A Simple Theory for the Forces between Spheres Immersed in a Fluid*. *J. Colloid Interface Sci.* 114 : 180-183.

Hiemenz, P.C. 1977. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. Marcel Dekker, New York and Basel.

Hochuli, E. 1990. *Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Adsorbent*. Genet. Eng. 12 : 87-98.

Hong, W.K., and M.B. Sporn. 1997. *Recent Advances in Chemoprevention of Cancer*. Science. 1997. 278 : 1073-1077.

Israelachvili, J.N. 1973. *Thin Film Studies Using Multiple-Beam Interferometry*. J. Colloid Interface Sci. 44 : 259-272.

Israelachvili, J.N., and D. Tabor. 1973. *Progress in Surface and Membrane Science*. Academic Press, New York and London.

Israelachvili, J.N., and G.E. Adams. 1978. *Measurement of Forces between two Mica Surfaces in Aqueous Electrolyte Solutions in the Range 0-100 nm*. J. Chem. Soc. Faraday Trans. I. 74 : 975-1001.

Israelachvili, J.N., and R.M. Pashley. 1982. *The Hydrophobic Interaction is Long Range, Decaying Exponentially with Distance*. Nature. 300 : 341-342.

Israelachvili, J.N., and R.M. Pashley. 1983. *Molecular Layering of Water at Surfaces and the Origin of Repulsive Hydration Forces*. Nature. 306 : 249-250.

Israelachvili, J.N., and H. Wennerström. 1990. *Hydration or Steric Forces between Amphiphilic Surfaces*. Langmuir. 6 : 873-876.

Israelachvili, J.N. 1992. *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press, London.

Joesten, M.D., and L.J. Schaad. 1974. *Hydrogen Bonding*. Marcel Dekker, New York.

Johnson, K.L., K. Kendall, and A.D. Roberts. 1971. *Surface Energy and the Contact of Elastic Solids*. Proc. R. Soc. Lond. A. 324 : 301-313.

Kagechika, H., E. Kawachi, Y. Hashimoto, T. Himi, and K. Shudo. 1988. *Retinobenzoic Acids. I. Structure-Activity Relationships of Aromatic Amides with Retinoidal Activity*. J. Med. Chem. 31 : 2182-2192.

Kastner P., M. Mark, N. Ghyselinck, W. Krezel, V. Dupé, J.M. Grondona, and P. Chambon. 1997. *Genetic Evidence that the Retinoid Signal is Transduced by Heterodimeric RXR/RAR Functional Units During Mouse Development*. Development. 124 : 313-326.

Kauzmann, W. 1959. *Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation*. Adv. Protein Chem. 14 : 1-63.

Kersten, S., D. Kelleher, P. Chambon, H. Gronemeyer, and N. Noy. 1995a. *Retinoid X Receptor Alpha Forms Tetramers in Solution*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92 : 8645-8649.

Kersten, S., L. Pan, P. Chambon, H. Gronemeyer, and N. Noy. 1995b. *Role of Ligand in Retinoid Signaling. 9-cis Retinoic Acid Modulates the Oligomeric State of the Retinoid X Receptor*. Biochemistry. 34 : 13717-13721.

Kersten, S., H. Gronemeyer, and N. Noy. 1997. *The DNA Binding Pattern of the Retinoid X Receptor is Regulated by Ligand-Dependent Modulation of its Oligomeric State*. J. Biol. Chem. 272 : 12771-12777.

Kudritskaya, Z.G., and V.I. Danilov. 1976. *Quantum Mechanical Study of Bases Interactions in Various Associates in Atomic Dipole Approximation*. J. Theor. Biol. 59 : 303-318.

Lebeau, L., S. Olland, P. Oudet, and C. Mioskowski. 1992. *Rational Design and Synthesis of Phospholipids for the Two-Dimensional Crystallization of DNA Gyrase, a Key Element in Chromosome Organization*. Chem. Phys. Lipids. 62 : 93-103.

Lebeau, L., F. Lach, C. Venien-Bryan, A. Renault, J. Dietrich, T. Jahn, M.G. Palmgren, W. Kuhlbrandt, and C. Mioskowski. 2001. *Two-Dimensional Crystallization of a Membrane Protein on a Detergent-Resistant Lipid Monolayer*. J. Mol. Biol. 308 : 639-647.

Leckband, D.E., T.L. Kuhl, H.K. Wang, W. Muller, J. Herron, and H. Ringsdorf. 2000a. *Force Probe Measurements of Antibody-Antigen Interactions*. Methods-A Companion to Methods in Enzymology. 20 : 329-340.

Leckband, D.E. 2000b. *Measuring the Forces that Control Protein Interactions*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29 : 1-26.

Lehmann, J.M., L. Jong, A. Fanjul, J.F. Cameron, X.P. Lu, P. Haefner, M.I. Dawson, and M. Pfahl. 1992. *Retinoids Selective for Retinoid X Receptor Response Pathways*. Science. 258 : 1944-1946.

Leid, N., P. Kastner, and P. Chambon. 1992a. *Multiplicity Generates Diversity in the Retinoic Acid Signaling Pathway*. Trends Biochem. Sci. 17 : 427-433.

Leid, M., P. Kastner, R. Lyons, H. Nakshatri, M. Saunders, T. Zacharewski, J.Y. Chen, A. Staub, J.M. Garnier, and S. Mader. 1992b. *Purification, Cloning, and RXR Identity of the HeLa Cell Factor with which RAR or TR Heterodimerizes to Bind Target Sequences Efficiently*. Cell. 68 : 377-395.

LeNeveu, D.M., R.P. Rand, and V.A. Parsegian. 1976. *Measurement of Forces between Lecithin Bilayers*. Nature. 259 : 601-603.

- Lippman S.M., J.F. Kessler, F.L. Meyskens. 1987. *Retinoids as Preventive and Therapeutic Anticancer Agents*. Cancer Treatment Rep. 71 : 391-405, 493-515.
- Lo Conte, L., C. Chothia, and J. Janin. 1999. *The Atomic Structure of Protein-Protein Recognition Sites*. J. Mol. Biol. 285 : 2177-2198.
- Loeliger, P., W. Bollag, and H. Mayer. 1980. *Arotinoids, a New Class of Highly Active Retinoids*. Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther. 15 : 9-15.
- London, F. 1937. *The General Theory of Molecular Forces*. Trans. Faraday Soc. 33 : 8-26.
- Lum, K., D. Chandler, and J.D. Weeks. 1999. *Hydrophobicity at Small and Large Length Scales*. J. Phys. Chem. B. 103 : 4570-4577.
- Luzar, A., Bratko, D., and L.J. Blum. 1987. *Monte Carlo Simulation Hydrophobic Interaction*. J. Chem. Phys. 86 : 2955-2959.
- Mahanty, J., and B.W. Ninham. 1976. *Dispersion Forces*. Academic Press, London.
- Marcelja, S., D.J. Mitchell, B.W. Ninham, and M.J. Sculley. 1977. *Role of Solvent Structure in Solution Theory*. J. Chem. Soc. Faraday Trans. II. 73 : 630-648.
- Marks, R. 1999. *The Role of Tazarotene in the Treatment of Psoriasis*. Br. J. Dermatol. 140 : 24-28.
- Marra, J., and J.N. Israelachvili. 1985. *Direct Measurements of Forces between Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine Bilayers in Aqueous Electrolyte Solutions*. Biochemistry. 24 : 4608-4618.
- Maugis, D. 1992. *The JKR-DMT Transition Using a Dugdale Model*. J. Colloid Interface Sci. 150 : 243-269.

- McDonald, I.K., and J.M. Thornton. 1994. *Satisfying Hydrogen Bonding Potential in Proteins*. J. Mol. Biol. 238 : 777-793.
- Minucci, S., M. Leid, R. Toyama, J.P. Saint-Jeannet, V.J. Peterson, V. Horn, J.E. Ishmael, N. Bhattacharyya, A. Dey, I.B. Dawid, and K. Ozato. 1997. *Retinoid X Receptor (RXR) within the RXR-Retinoic Acid Receptor Heterodimer Binds its Ligand and Enhances Retinoid-Dependent Gene Expression*. Mol. Cell. Biol. 17 : 644-655.
- Myers, J.K., and C.N. Pace. 1996. *Hydrogen Bonding Stabilizes Globular Proteins*. Biophys. J. 71 : 2033-2039.
- Nadassy, K., S.J. Wodak, and J. Janin. 1999. *Structural Features of Protein-Nucleic Acid Recognition Sites*. Biochemistry. 38 : 1999-2017.
- Nagpal, S., and R.A. Chandraratna. 2000. *Recent Developments in Receptor-Selective Retinoids*. Curr. Pharm. Des. 6 : 919-931.
- Needham, D., and E. Evans. 1988. *Structure and Mechanical Properties of Giant Lipid (DMPC) Vesicle Bilayers from 20°C below to 10°C above the Liquid Crystal-Crystalline Phase Transition at 24°C*. Biochemistry. 27 : 8261-8269.
- Pace, C.N., B.A. Shirley, M. McNutt, and K. Gajiwala. 1996. *Forces Contributing to the Conformational Stability of Proteins*. FASEB J. 10 : 75-83.
- Pace, C.N., G. Horn, E.J. Hebert, J. Bechert, K. Shaw, L. Urbanikova, J.M. Scholtz, and J. Sevcik. 2001. *Tyrosine Hydrogen Bonds Make a Large Contribution to Protein Stability*. J. Mol. Biol. 312 : 393-404.
- Parsegian, V.A., and R.P. Rand. 1991. *On Molecular Protrusion as the Source of Hydration Forces*. Langmuir. 7 : 1299-1301.

Parsegian, V.A. 1993. *Reconciliation of van der Waals Force Measurements between Phosphatidylcholine Bilayers in Water and between Bilayer-Coated Mica Surfaces*. Langmuir. 9 : 3625-3628.

Pashley, R.M., and J.N. Israelachvili. 1981. *A Comparison of Surface Forces and Interfacial Properties of Mica in Purified Surfactant Solutions*. Colloid. Surface. 2 : 169-187.

Payens, T.A.J. 1955. *Ionized Monolayers*. Philips Res. Rep. 10 : 425-481.

Perez, E., and J. Wolfe. 1994. *A Simple, Cheap, Clean, Reliable, Linear, Sensitive, Low-Drift Transducer for Surface Pressure*. Langmuir. 10 : 974-975.

Perez, E., F. Pincet, M. Goldmann, C. Mioskowski, and L. Lebeau. 1998. *Translational Order in Liquid-Expanded Lipid Monolayers Functionalized with Nucleosides*. Eur. Phys. J. B. 6 : 1-4.

Pincet, F., E. Perez, G. Bryant, L. Lebeau, and C. Mioskowski. 1994. *Long-Range Attraction between Nucleosides with Short Range Specificity : Direct Measurements*. Phys. Rev. Lett. 73 : 2780-2783.

Pincet, F., E. Perez, G. Bryant, L. Lebeau, and C. Mioskowski. 1996. *Specific Forces between DNA Bases*. Mod. Phys. Lett. B. 10 : 81-99.

Pincet, F., S. Cribier, and E. Perez. 1999. *Bilayers of Neutral Lipids Bear a Small but Significant Charge*. Eur. Phys. J. B. 11 : 127-130.

Pincet, F., E. Perez, J.C. Loudet, and L. Lebeau. 2001. *From Macroscopic Adhesion Energy to Molecular Bonds : A Test of the Theory*. Phys. Rev. Lett. 87 : 178101-178104.

Pokkuluri, P.R., R. Raffin, L. Dieckman, C. Boogaard, F.J. Stevens, and M. Schiffer. 2002. *Increasing Protein Stability by Polar Surface Residues : Domain-Wide Consequences of Interactions Within a Loop*. *Biophys. J.* 82 : 391-398.

Pullman, B., and A. Pullman. 1969. *Quantum-Mechanical Investigations of the Electronic Structure of Nucleic Acids and their Constituents*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 9 : 327-402.

Rand, R.P., and V.A. Parsegian. 1989. *Hydration Forces between Phospholipids Bilayers*. *Biochim. Biophys. Acta.* 988 : 351-376.

Rao, M., B.J. Berne, J.K. Percus, and M.H. Kalos. 1979. *Structure of a Liquid-Vapor Interface in the Presence of a Hard Wall in the Transition Regions*. *J. Chem. Phys.* 71 : 3802-3806.

Rastinejad, F., T. Wagner, Q. Zhao, and S. Khorasanizadeh. 2000. *Structure of the RXR-RAR DNA-Binding Complex on the Retinoic Acid Response Element DRI*. *EMBO J.* 19: 1045-1054.

Reeves, J.P., and R.M. Dowben. 1969. *Formation and Properties of Thin-Walled Phospholipid Vesicles*. *J. Cell. Biol.* 73 : 49-60.

Renaud, J.P., N. Rochel, M. Ruff, V. Vivat, P. Chambon, H. Gronemeyer, and D. Moras. 1995. *Crystal Structure of the RAR-gamma Ligand-Binding Domain Bound to All-trans Retinoic Acid*. *Nature.* 378 : 681-689.

Saenger, W. 1984. *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag, New York.

Schmitt, L., C. Dietrich, and R. Tampé. 1994. *Synthesis and Characterization of Chelator-Lipids for Reversible Immobilization of Engineered Proteins at Self-Assembled Lipid Interfaces*. *J. Am. Chem. Soc.* 116 : 8485-8491.

Schneider, J., Y. Dori, M. Tirrell, and R. Sharma. 1998. *Effect of Substrate Anchoring on the Mechanical Strength of Langmuir-Blodgett Bilayers*. *Thin Solid Films*. 327-329 : 772-777.

Schuster, P., G. Zundel, and C. Sandorfy. 1976. *The Hydrogen Bond – Recent Developments in Theory and Experiment*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.

Sivasankar, S., W. Briehner, N. Lavrik, B. Gumbiner, and D. Leckband. 1999. *Direct Molecular Force Measurements of Multiple Adhesive Interactions between Cadherin Ectodomains*. *PNAS*. 96 : 11820-11824.

Sivasankar, S., B. Gumbiner, and D. Leckband. 2001. *Direct Measurements of Multiple Adhesive Alignments and Unbinding Trajectories between Cadherin Extracellular Domains*. *Biophys. J.* 80 : 1758-1768.

Snook, I.K., and W. van Megen. 1979. *Structure of Dense Liquids at Solid Interfaces*. *J. Chem. Phys.* 70 : 3099-3105.

Tanford, C. 1962. *Contribution of Hydrophobic Interactions to the Stability of the Globular Conformation of Proteins*. *J. Am. Chem. Soc.* 84 : 4240-4247.

Tinoco, I.Jr., P.N. Borer, B. Dengler, M.D. Levine, O.C. Uhlenbeck, D.M. Crothers, and J. Gralla. 1973. *Improved Estimation of Secondary Structure in Ribonucleic Acids*. *Nature New Biol.* 246 : 40-41.

van Megen, W., and I.K. Snook. 1979. *Solvent Structure and Solvation Forces between Solid Bodies*. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II.* 75 : 1095-1102.

Venepally P., L.G. Reddy, and B.P. Sani. 1997. *Analysis of Homo- and Hetero-Dimerization of Retinoid Receptors in Solution*. *Arch. Biochem. Biophys.* 343 : 234-242.

Venien-Bryan, C., F. Balavoine, B. Toussaint, C. Mioskowski, E.A. Hewat, B. Helme, and P.M. Vignais. 1997. *Structural Study of the Response Regulator HupR from Rhodobacter Capsulatus. Electron Microscopy of Two-Dimensional Crystals on a Nickel-Chelating Lipid*. J. Mol. Biol. 274 : 687-692.

Verwey, E.J.W., and J.T.G. Overbeek. 1948. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. Elsevier Publishing, Amsterdam.

Vezenov, D.V., A. Noy, L.F. Rozsnyai, and C.M. Lieber. 1997. *Force Titrations and Ionization State Sensitive Imaging of Functional Groups in Aqueous Solutions by Chemical Force Microscopy*. J. Am. Chem. Soc. 119 : 2006-2015.

Wong, J., A. Chilkoti, and V.T. Moy. 1999. *Direct Force Measurement of the Streptavidin-Biotin Interaction*. Biomolecular Engineering. 16 : 45-55.

Wurtz, J.M., W. Bourguet, J.P. Renaud, V. Vivat, P. Chambon, D. Moras, and H. Gronemeyer. 1996. *A Canonical Structure for the Ligand-Binding Domain of Nuclear Receptors*. Nature Struct. Biol. 3 : 87-94.

Yaminsky, V.V., B.W. Ninham, H.K. Christenson, and R.M. Pashley. 1996. *Adsorption Forces between Hydrophobic Monolayers*. Langmuir. 12 : 1936-1943.

Zhang, L., A.M. Nadzan, R.A. Hayman, D. Love, D.E. Mais, G. Croston, W.I. Lamph, and M.F. Boehm. 1996. *Discovery of Novel Retinoic Acid Receptor Agonists Having Potent Antiproliferative Activity in Cervical Cancer Cells*. J. Med. Chem. 39 : 2659-2663.

Zhao, X., S. Ong, H. Wang, and K.B. Eisenthal. 1993. *New Method for Determination of Surface pK_a Using Second Harmonic Generation*. Chem. Phys. Lett. 214 : 203-207.