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



Discipline : Physique

Par Axel Gromer

Membres du jury

Visualisation de la conformation de polyélectrolytes à l'interface solide-liquide par Microscopie à Force Atomique

Soutenue publiquement le 24 janvier 2007

Directeur de thèse : Rapporteur interne : Rapporteur externe : Rapporteur externe : Examinateur : Invité :

Mounir Maaloum, professeur, Strasbourg Albert Johner, DR, Strasbourg Hamidou Haidara, CR – HDR, Mulhouse François Boué, DR, Paris Michel Rawiso, DR, Strasbourg Serge Stoll, MER, Genève

Visualisation de la conformation de polyélectrolytes à l'interface solide-liquide par Microscopie à Force Atomique

Je dédie cette thèse à Bernadette et Anna

Remerciements

Ce travail n'aurait pas été possible sans les nombreuses aides et discussions dont j'ai pu bénéficier au sein de l'Institut Charles Sadron. Je tiens à remercier tout particulièrement :

- Mon directeur de thèse, Mounir Maaloum, pour m'avoir pris comme thésard et montré le chemin tout au long de ces 3 années. Son enthousiasme, sa perception aiguë des problèmes physiques et son style incomparable m'ont permis de mener ce projet à bien.
- Christophe Contal pour m'avoir permis de devenir autonome avec l'AFM grâce à ses nombreuses explications, ses conseils et ses critiques pendant toutes les expériences que nous avons réalisées ensembles.
- Bastien Seantier pour m'avoir montré en détails comment préparer des bicouches lipidiques supportées.
- Olivier Félix pour m'avoir appris à me servir de la QCM.
- Michel Rawiso et Jérôme Combet qui, avec une grande faculté d'écoute, ont répondu à mes questions sur les polyélectrolytes tout en me prodiguant des conseils utiles.
- Pascal Marie pour m'avoir initié aux joies et aux difficultés du traitement d'image avec Visilog, ainsi que pour avoir recherché des traitements adaptés à nos problèmes.
- Albert Johner pour avoir entendu mes difficultés et proposé des solutions pour jeter des passerelles entre le monde expérimental et la physique théorique.
- François Isel pour m'avoir expliqué comment il a préparé (non sans peine !) le PSS linéaire et cyclique.
- Pierre Lutz pour avoir répondu à mes questions sur les anneaux de PSS.
- Armelle Zinck et Maryline Clauzel pour m'avoir appris à me servir du Spin Coating.
- Alain Rameau pour avoir effectué l'analyse chromatographique du PSS et m'en avoir expliqué les résultats.

Je voudrais également remercier : J. Baschnagel, P. Beckrich, V. Billot, J.M. Catala, Y. Cesbron, T. Charitat, J. Dallery, L. Koch, C. Viswanathan, S. Lecuyer, J.F. Legrand, M. Meyer, S. P. Obukhov, A. Al Ouahabi, F. Schosseler, A. Schröder, M. Wehr, J. Widmaier et tous ceux que j'ai oubliés...

Enfin, je veux remercier ceux qui ont accepté de juger ce travail : Albert Johner, Hamidou Haidara, François Boué, Michel Rawiso et Serge Stoll.

Un remerciement spécial va à ceux qui m'ont soutenu moralement pendant cette traversée : ma femme Anna, qui était aux premières loges et m'a supporté (dans les deux sens du terme), mes parents et mes amis en dehors de l'institut Sadron. It is very easy to answer many of these fundamental biological questions; you just look at the thing! You will see the order of the bases in the chain; you will see the structure of the microsome. Unfortunately the present microscope sees at a level which is just a bit too crude. Make the microscope a hundred times more powerful, and many problems of biology would be made very much easier.

Richard Feynmann *There's plenty of room at the bottom* Conférence donnée à Caltech le 29 décembre 1959 pour l'American Physical Society

Le tout est de savoir s'il s'agit d'une image juste ou si c'est juste une image.

Jean-Luc Godard Le vent d'est (1977)

Introduction

Ces deux dernières décennies ont connu un intérêt croissant pour le Nanomonde. Le développement récent des techniques de microscopie à sonde locale a notamment permis des avancées importantes dans la compréhension des phénomènes de surface. Ces derniers jouent un rôle déterminant dans les propriétés des objets de l'échelle mésoscopique.

La modification des propriétés d'une surface peut être accomplie par l'adsorption de polymères. Les applications vont de la stabilisation de suspensions colloïdales à la floculation. Une variété de polymères présente à cet égard un comportement intéressant car ils ont la particularité d'être chargés en solution : il s'agit des polyélectrolytes. Ils sont utilisés dans des applications industrielles et sont également présents au sein des organismes vivants. En effet, de nombreuses molécules d'origine biologique, tel l'ADN ou les protéines, sont des polyélectrolytes.

Dans cette thèse, nous étudions par Microscopie à Force Atomique (AFM) le comportement sur des surfaces de deux polyélectrolytes, l'un d'origine naturelle (l'ADN) et l'autre synthétique (le polystyrène sulfonate : PSS). Alors que l'ADN appartient à la classe des polyélectrolytes rigides, le PSS est un polyélectrolyte flexible. De plus, du fait de sa chaîne centrale hydrophobe, ce dernier pourrait présenter en solution (dans les conditions prévues par la théorie) une surprenante structure en collier de perles. Les perles en question sont des parties de la chaîne qui se condensent sous l'effet de l'attraction hydrophobe. Elles sont reliées entre elles par des parties de chaîne étendues. L'ensemble de la chaîne obéit à une instabilité de charge de Rayleigh. Cependant, les observations directes de cette structure n'ont pas été concluantes jusqu'ici... Enfin, on s'intéresse en parallèle au cas où les polyélectrolytes ont une topologie cyclique.

Dans le **chapitre 1**, nous introduisons le cadre théorique et expérimental qui supporte ce travail. On commence par les propriétés générales des chaînes de polyélectrolytes avant de s'intéresser plus particulièrement aux structures de l'ADN et du polystyrène sulfonate (le collier de perle) en solution. On précise aussi la particularité des chaînes à topologie cyclique. Ensuite, on s'intéresse à la théorie de l'adsorption de polyélectrolytes sur une surface chargée, puis à l'irréversibilité de certains processus observés expérimentalement. On termine ce chapitre par une introduction aux phénomènes de condensation de polyélectrolytes par des agents chargés : ions multivalents, molécules chargées, etc.

Dans le **chapitre 2**, nous présentons le matériel et les méthodes utilisés dans nos expériences. Il s'agit d'abord des caractéristiques (masse moléculaire, taux de charge...) et de la préparation des polyélectrolytes (en particulier du polystyrène sulfonate). Puis, du principe de fonctionnement, des possibilités et des limitations de l'AFM. A cela s'ajoute une description de la préparation des échantillons puis des remarques importantes sur l'analyse et le traitement des images obtenues. Enfin, nous décrivons brièvement la technique de la microbalance à cristal de quartz (QCM) que nous avons utilisée en complément de l'AFM.

Dans le **chapitre 3**, nous présentons l'étude des chaînes de polystyrène sulfonate adsorbées sur le mica. Ce substrat est beaucoup utilisé pour étudier l'ADN ainsi que d'autres biomolécules par AFM. La surface atomiquement plane constitue en effet un substrat idéal pour la visualisation de molécules individuelles.

Dans le **chapitre 4**, nous présentons l'étude des chaînes de polystyrène sulfonate ainsi que de l'ADN adsorbés sur une bicouche lipidique cationique supportée. Ce type de surface fournit un moyen d'étudier les propriétés des bicouches lipidiques qui sont à la base des membranes cellulaires. La présence de lipides chargés positivement apporte un intérêt supplémentaire pour l'étude de l'adsorption de molécules chargées de signe opposé, tels les polyélectrolytes que nous utilisons.

Enfin, dans le **chapitre 5**, nous étudions la longueur de persistance du polystyrène sulfonate sur le mica et la bicouche lipidique par l'analyse statistique des chaînes.

Table des matières

Introduction générale	6
1 Le comportement des polyélectrolytes	10
1.1 Propriétés générales des chaînes de polyélectrolytes	11
1.2 Structures de polyélectrolytes	14
1.2.1 La double hélice de l'ADN	14
1.2.2 Le collier de perle du polyélectrolyte hydrophobe	16
1.2.3 Les molécules cycliques	20
1.3 Interactions avec des surfaces	22
1.3.1 Adsorption sur une surface chargée	23
1.3.2 Adsorption irréversible et relaxation	28
1.4 Condensation par des agents multivalents	30
2 Matérial et méthodes	24
2 Materier et methodes	34 34
2.1 1 PSS linéaires et cycliques à différents taux de charge	34
2.1.2 ADN cyclique	39
2.2 Le Microscope à force atomique	40
2.2.1 Petit Historique	40
2.2.2 Eléments constitutifs de l'AFM	40
2.2.3 Le mode Tapping	45
2.3 Préparation des échantillons pour l'AFM	48
2.3.1 Séchage	48
2.3.2 Spin Coating	49
2.3.3 Etude en solution	49
2.4 Analyse d'image	51
2.4.1 Résolution latérale des images d'AFM	52
2.4.2 Hauteur des images d'AFM	53
2.4.3 Traitement et analyse d'image	54
2.5 La Microbalance à Cristal de Quartz	56
3 Conformation des chaînes de PSS sur le mica	57
3.1 Introduction : les propriétés du mica	57
3.1.1 Structure du mica	57

2.2 Advertion des chaînes de DSS sur le mice	61
3.2 Ausorption des chaines de FSS sur le finda	61
3.2.1 Deposition par Spin Coaung	01
3.2.2 Etude en solution : adsorption des chaines de PSS fortement	64
chargees en presence de cations divaients ($MgCl_2$)	71
3.3 Structure des chaines de PSS en fonction du taux de charge	/1
3.4 Fibres de PSS sur le mica	/9
3.5 Résumé des principaux résultats	81
4 Conformation des polyélectrolytes sur une membrane lipidique cationique	82
4.1 Introduction : les propriétés des bicouches lipidiques	82
4.1.1 La membrane lipidique	82
4.1.2 La bicouche supportée et ses applications	85
4.2 Préparation des bicouches supportées	87
4.2.1 Le choix des lipides	87
4.2.2 Préparation d'une bicouche par fusion de vésicules	89
4.2.3 Morphologie des bicouches par AFM en solution	91
4.3 Adsorption des chaînes de PSS fortement chargées sur la bicouche lipidique	94
4.3.1 Cinétique d'adsorption des chaînes linéaires	94
4.3.2 Conformation des chaînes individuelles	98
4.3.3 Formation de monocouches ordonnées	106
4.3.4 Adsorption par-dessus la monocouche ordonnée	114
4.4 Structure des chaînes de PSS en fonction du taux de charge	116
4.5 Adsorption de l'ADN circulaire sur la bicouche lipidique	125
4.6 Résumé des principaux résultats	129
5 Etude de la longueur de persistance du PSS sur la surface	130
5.1 Introduction : principe de l'analyse statistique de $\langle R^2 \rangle$	130
5.2 Longueur de persistance sur le mica	131
5.3 Longueur de persistance sur la bicouche lipidique cationique	135
5.4 Résumé des principaux résultats	138
Conclusion générale et perspectives	139
Bibliographie	141
Annexes	147

1 Le comportement des polyélectrolytes

Les polyélectrolytes sont des polymères qui portent des groupes ionisables. Ces groupes se dissocient dans un solvant polaire tel que l'eau, ce qui a pour effet de rendre le polymère chargé tout en libérant des contreions en solution. Ainsi, le comportement des polyélectrolytes emprunte à la fois aux polymères et aux électrolytes (sels).

Bon nombre de polymères solubles dans l'eau utilisés dans l'industrie, comme l'acide polyacrylique ou le polystyrène sulfonate (PSS), sont des polyélectrolytes. D'autre part, on trouve de nombreux exemples de polyélectrolytes au sein du monde vivant : l'ADN, les protéines, les polysaccharides, etc. Aussi, dans cette thèse nous étudions un polyélectrolyte synthétique : le PSS ainsi qu'un polyélectrolyte d'origine naturelle : l'ADN. Ils sont représentés sur la figure 1.1.



FIG. 1.1 Le polystyrène sulfonate de sodium et l'ADN

Le monomère du polystyrène sulfonate de sodium et deux monomères de la molécule d'ADN. Les groupes chargés sont encerclés en jaune.

Du point de vue théorique, en contraste avec les polymères neutres dont les propriétés physiques sont aujourd'hui relativement bien comprises, les polyélectrolytes soulèvent encore de nombreuses questions. Toute la difficulté vient de l'action simultanée des interactions à courte portée entre monomères, des interactions électrostatiques à longue portée, et des contreions.

1.1 Propriétés générales des chaînes de polyélectrolytes

Les propriétés des polyélectrolytes dépendent en premier lieu du solvant dans lequel ils se trouvent. Le solvant est caractérisé par sa longueur de Bjerrum l_b : c'est la distance à partir de laquelle l'énergie électrostatique entre deux charges est compensée par l'énergie thermique.

$$l_{\rm b} = e^2 (4 \ \pi \ {\rm C} \ k_{\rm b} \ T)^{-1}$$

(*e* est la charge élémentaire, \in la constante diélectrique du solvant, k_b la constante de Boltzmann et *T* la température ; $l_b = 7.12$ angströms dans l'eau à 25°C)

La longueur de Debye-Hückel κ^{-1} est la distance à partir de laquelle les interactions électrostatiques sont écrantées en présence de sel.

$$\kappa^{-1} = (4 \pi l_b I)^{-1/2}$$

 $(I = \sum_{i} z_i^2 c_i)$ où z_i et c_i sont respectivement la valence et la concentration de l'éspèce i ;

 $\kappa^{-1} = 100$ angströms pour 1mM de sel)

Les polyélectrolytes peuvent être de plusieurs sortes. Ils sont dits fortement chargés quand une importante proportion des monomères est chargée. Dans le cas contraire, ils sont faiblement chargés. Ainsi, l'ADN et le PSS sont des polyélectrolytes fortement chargés. Une autre appellation, à ne pas confondre avec la précédente, est celle de polyélectrolyte fort ou faible. Elle qualifie la facilité avec laquelle les groupes ionisables se dissocient. Un polyélectrolyte faible possède en guise de groupes ionisables des acides faibles. Par conséquent, son taux de dissociation dépendra du pH. En revanche, un polyélectrolytes fort a pour groupes ionisables des acides forts qui sont dissociés pour une gamme de pH étendue. C'est le cas de l'ADN et du PSS.

A dilution infinie, toutes les chaînes de polyélectrolytes tendent à être fortement étendues. Le modèle du « blob électrostatique » a été introduit par de Gennes en 1979 pour rendre compte de cette conformation. Pour une chaîne faiblement chargée en solvant thêta, il existe une longueur D_e en-dessous de laquelle les interactions électrostatiques sont faibles et la chaîne conserve un comportement gaussien. En revanche, au-delà de D_e , les blobs ressentent une répulsion électrostatique de la part des autres blobs, et la chaîne prend la forme d'une succession de blobs alignés (voir figure 1.2). La taille et le nombre de monomères des blobs

dépendent uniquement de la densité de charge f de la chaîne. La taille de la chaîne entière R varie linéairement avec le nombre de monomères :

$$R \sim N b^{2/3} (f^2 l_b)^{1/3}$$

(N est le nombre de monomères, b la taille du monomère, f la densité de charge de la chaîne).



FIG. 1.2 Le modèle du Blob électrostatique

La chaîne faiblement chargée prend la forme d'une succession de blobs de dimension D_e . En dessous de cette longueur, le comportement est gaussien.

En revanche, quand du sel est ajouté à la solution, les charges peuvent être écrantées. Lorsque la longueur de Debye devient de l'ordre de la taille du blob électrostatique, les chaînes adoptent la même conformation que des chaînes neutres en bon solvant.

Dans le cas de chaînes fortement chargées et pour une quantité de sel plus faible, la répulsion tend à étendre si bien les chaînes qu'il n'y a plus de blob électrostatique. Dans ce cas, la répulsion électrostatique affecte directement la longueur de persistance. Odijk d'une part, (Odijk et al. 1997) et Skolnick et Fixman d'autre part (Skolnick et al. 1977) ont suggéré les premiers que la longueur de persistance totale des polyélectrolytes L_T est la somme de leur longueur de persistance sans charge l_0 et d'une longueur de persistance électrostatique qui varie comme le carré de la longueur de Debye :

$$L_{\rm T} = l_0 + \frac{\eta^2 l_{\rm b}}{4\kappa^2}$$

(η est la densité de charge curviligne ou charge par unité de longueur).

Cette dépendance en κ^{-2} est compatible avec les résultats expérimentaux pour l'ADN à de faibles concentrations. Toutefois, à des concentrations plus élevées, des écarts à cette loi

apparaissent. Aussi, d'autres théories existent qui prédisent l'apparition de lois d'échelles différentes (Ha et al. 1995; Netz et al. 1999) mais il manque encore des expériences permettant de les départager.

Par ailleurs, pour les polyélectrolytes fortement chargés, il faut prendre en compte le phénomène de condensation des contreions sur la chaîne. Ce dernier dépend de la compétition entre le gain en énergie électrostatique et la perte d'entropie des contreions. Au-delà d'une charge critique par unité de longueur : $\eta_c = l_b^{-1}$, les contreions ne se dispersent plus uniformément en solution mais sont confinés dans le proche voisinage de la chaîne, maintenant sa charge effective : $\eta_{eff} = \eta_c$. Selon Manning et Oosawa (Manning 1969 ; Oosawa 1971) les contreions sont divisés en 2 groupes en équilibre chimique : les contreions libres en solution et ceux qui sont condensés autour de la chaîne. Ces derniers conservent une certaine mobilité le long de la chaîne. Ainsi, la couche qui en résulte est polarisable, ce qui peut engendrer des interactions attractives similaires aux forces de van der Waals entre molécules polarisables. Ces interactions sont importantes en particulier quand la longueur de Bjerrum est élevée ainsi qu'en présence d'ions multivalents (cf 1.4). Des expériences en régime semidilué ont montré la formation d'agrégats dont l'origine pourrait être cette interaction attractive.

Ainsi, l'ADN a ses contreions condensés sur la chaîne. Quant au polystyrène sulfonate, son cas est plus complexe car, pour une sulfonation partielle, l'hydrophobicité de la chaîne accentue la condensation (Essafi et al. 2005). En effet, l'hydrophobicité induit la formation de domaines où la constante diélectrique est faible, avec pour conséquence une dissociation des contreions moins efficace. En fait, les contreions pourraient être emprisonnés dans les structures en « perles » de ce polyélectrolyte (cf 1.2.2). Pour le sujet qui nous concerne, l'adsorption des chaînes sur une surface, il faut encore s'attendre à des changements par rapport à la situation en volume. En particulier, nous verrons que les contreions peuvent être relargués en solution lors de l'adsorption sur une surface chargée (cf 1.3.1).

Nous ne présentons pas ici les théories qui décrivent les propriétés des solutions de polyélectrolytes en volume, préférant nous concentrer sur le problème de l'adsorption sur une surface chargée (cf 1.3.1). On mentionne seulement que les solutions de polyélectrolytes sont décrites principalement par deux approches théoriques : d'un côté, la théorie de Poisson-Boltzmann qui est une approche de type champ moyen qui néglige les corrélations entre monomères et entre ions, et de l'autre, les théories en lois d'échelle de de Gennes et al. (1979), puis Rubinstein et al. (1995).

1.2 Structures de polyélectrolytes

Les polyélectrolytes que nous étudions possèdent chacun une structure particulière en solution qui le rend spécial au-delà des propriétés décrites précédemment.

1.2.1 La double hélice de l'ADN

L'élucidation de la structure de l'ADN par Watson, Crick, Franklin et Wilkins a révélé par la même occasion sa fonction comme support de l'hérédité. L'ADN est un polymère séquencé à partir de 4 unités différentes, les nucléotides. Leur séquence contient l'information du code génétique qui permet de construire et de maintenir un organisme vivant, en particulier par l'intermédiaire du codage des séquences d'acides aminés qui forment les protéines.

Chaque nucléotide se compose d'une base : adénine, guanine, thymine ou cytosine. Ces dernières ne diffèrent que par la position du groupe amine, et elles sont toutes apolaires, donc hydrophobes. Chaque base est connectée à un sucre deoxyribose, lequel est relié à un autre sucre (sur le nucléotide suivant) par l'intermédiaire d'un groupe phosphate. Les groupes phosphates comportent un oxygène polaire et chargé négativement. C'est de là que vient le caractère de polyélectrolyte de la molécule.

L'adénine et la thymine, ainsi que la guanine et la cytosine forment des paires complémentaires reliées par des liaisons hydrogènes spécifiques (voir figure 1.3b). L'énergie de l'interaction est approximativement $3k_bT$ par paire de bases. De ce fait, les deux brins complémentaires de la molécule s'assemblent en une double hélice, laquelle est également stabilisée par l'interaction favorable (type van der Waals) entre bases adjacentes le long de la chaîne. Ces deux facteurs s'opposent à la répulsion électrostatique entre les groupements phosphates et empêchent la séparation des deux brins dans les conditions physiologiques. Le pas de l'hélice est de 3.4 nm, soit 10 paires de bases. Comme les bases sont attachées asymétriquement au squelette, chaque brin possède une orientation (que l'on note : 5'>3'). De plus, d'un côté, l'espace entre les 2 brins est plus important que de l'autre, ce qui fait que l'hélice possède un grand et un petit « sillon ». Le grand sillon est plus favorable à des interactions entre protéines et bases.



FIG. 1.3 L'hélice de l'ADN (G.L. Schumann)

L'hélice de l'ADN (A) résulte de l'appareillement des bases complémentaires (B).

La structure en double hélice confère à la molécule une rigidité très importante, cent fois plus environ que le polyéthylène. En tenant en plus compte de la répulsion électrostatique entre les charges, la longueur de persistance de l'ADN est typiquement 53nm.

Pour terminer, notons que l'ADN humain possède quelques centaines de millions de monomères, ce qui correspond à une longueur de plusieurs centimètres et une distance bout à bout de plusieurs dizaines de micromètres dans la forme en pelote ! Nous voyons donc qu'il est bien trop long pour entrer tel quel dans les cellules mais nécessite d'être compacté à l'aide de certaines protéines (possédant une charge électrique opposée) en une structure hiérarchiquement ordonnée : la chromatine.

1.2.2 Le collier de perle du polyélectrolyte hydrophobe

Avant d'aborder le cas d'un polyélectrolyte hydrophobe, rappelons le comportement d'une molécule hydrophobe. Une molécule hydrophobe (ou apolaire) perturbe par sa présence la formation du réseau de liaisons hydrogène de l'eau, ce qui augmente l'énergie libre (voir figure 1.4). C'est pourquoi cette molécule tend à être rejetée hors de l'eau. Aussi, plusieurs molécules hydrophobes se regroupent de façon à minimiser le nombre de liaisons perdues par les molécules polaires.



FIG. 1.4 Molécules hydrophobes (Arthur L. Buikema)

En théorie des polymères, on modélise l'interaction hydrophobe par une force d'attraction entre les monomères, laquelle est caractérisée par un second coefficient du viriel négatif : $B = -\tau b^3$, où $\tau = (\theta - T)/\theta$ est un coefficient sans dimension appelé température réduite (θ est le point thêta). Une chaîne neutre hydrophobe adopte par suite une conformation en globule (voir figure 1.5). La taille du globule est :

$$D \sim (N/n)^{1/3}$$

 $(n \sim \tau/b^3$ est la densité du globule). *D* résulte de l'équilibre entre l'attraction à deux corps et la répulsion à trois corps entre les monomères. En dessous d'une longueur caractéristique ξ_{therm} , la chaîne conserve un comportement gaussien.



FIG. 1.5 Conformation en globule d'une chaîne hydrophobe

La taille du blob thermique ξ_{therm} est la longueur à partir de laquelle l'interaction entre monomères est supérieure à l'agitation thermique.

Que se passe-t-il quand la chaîne n'est plus neutre ? La réponse a été initialement avancée par Kantor et Kardar (Kantor et al. 1994, 1995). Quand la charge électrique augmente, à un moment la répulsion coulombienne devient du même ordre que la tension de surface et le globule devient instable. L'énergie totale du globule est alors réduite par la division du globule initial en deux globules plus petits, analogues à des « perles », lesquelles restent connectées par une fine « corde ». C'est une instabilité de charge de Rayleigh (1882). Les perles se subdivisent à leur tour en perles plus petites lorsque le taux de charge augmente, à chaque fois que la charge atteint un certain seuil. C'est ainsi qu'une chaîne unique de polyélectrolyte hydrophobe adopte une conformation dite en « collier de perles ». Au sein de cette structure, les perles sont condensées par les interactions hydrophobes mais restent en même temps séparées le long de la chaîne du fait des répulsions électrostatiques entre les perles.

On peut remarquer que le même phénomène se produirait dans le cas d'une chaîne hydrophobe à charge fixée dont on changerait la qualité du solvant. Toutefois, on s'intéresse ici à la variation de la charge.

Le modèle du collier de perles est décrit en détail par Dobrynin et al. (1996, 1999). La structure est représentée sur la figure 1.6. En particulier, on peut noter que le diamètre des perles est :

$$D_{\text{perle}} \sim b \tau^{-1/3} N_{\text{perle}}^{1/3}$$
, avec : $N_{\text{perle}} \sim \tau (u f^2)^{-1}$

 $(N_{\text{perle}} \text{ est le nombre de monomères dans une perle et } u \sim l_b/b).$

Quand la chaîne est entièrement chargée, les perles disparaissent et le polymère se comporte comme un polyélectrolyte hydrophile classique.



FIG. 1.6 Le collier de perle du polyélectrolyte hydrophobe

Des simulations numériques ont confirmé l'existence de cette structure, en montrant notamment l'existence de fluctuations importantes de la distance entre les perles ainsi que du nombre de perles, en particulier lorsque celui-ci est faible (Micka et al. 1999, Chadanowski et al. 1999, Lyulin et al. 1999, Limbach et al. 2002 et 2003). Ces fluctuations pourraient constituer un obstacle important pour l'observation expérimentale.

Néanmoins, des expériences ont donné des résultats concordants avec l'existence d'un collier de perles, en particulier par l'analyse des facteurs de forme et de structure en diffusion de rayons X et de neutrons (Essafi et al. 1994 et 2005, Baigl et al. 1996, Spiteri et al. 1997 et à paraître, Combet et al. - à paraître). Nous aurons l'occasion de revenir sur certains de ces résultats pour les comparer à nos observations.

Enfin, des expériences d'AFM ont tenté de visualiser directement la structure en collier de perles sur des chaînes adsorbées sur des surfaces. Kiriy et al. (2002) n'étudient par réellement la variation du taux de charge des chaînes mais l'effet de l'addition de sels (notamment trivalents) sur des polyélectrolytes dont la charge est fixe (P2VP, PMB). De plus, ils effectuent leurs expériences sur des échantillons séchés, ce qui peut selon nous modifier la conformation des chaînes (cf 3.2.1). Kirwan et al. (2004) font varier la charge de polyélectrolytes faibles (PVA) en modifiant le pH de la solution de départ. Ils utilisent également des échantillons séchés.

Dans la présente étude, toutes les expériences sont réalisées directement en milieu aqueux (à l'exception de la partie 3.2.1). Nous utilisons des chaînes de PSS-Na (polyélectrolyte fort) dont la charge électrique est variée directement par la proportion de groupes sulfonés sur les chaînes (cf 2.1.1). Aussi, les chaînes possèdent deux topologies différentes : linéaire et cyclique. Ces dernières présentent un intérêt intrinsèque qui est abordé dans la partie suivante. De plus, ces anneaux font partie des échantillons qui ont été étudiés en diffusion par Combet et al. (résultats à paraître).

1 Le comportement des polyélectrolytes

Les chaînes de PSS présentent cette différence par rapport à la théorie qu'elles portent une distribution fixe de monomères chargés et non chargés, alors que dans le modèle chaque monomère porte une charge *fe*. Ainsi, des différences subtiles peuvent exister entre le modèle et la réalité, notamment en ce qui concerne la répartition réelle des perles sur les chaînes. Ensuite, il reste à voir si le choix du substrat pour nos expériences influence la structure des chaînes adsorbées, et de quelle manière. On peut supposer dans un premier temps que les chaînes adsorbées sur une surface conservent la structure qu'elles ont dans le volume. Dans ce cas, nous devons nous placer dans une zone précise du diagramme de phase en volume pour espérer observer le collier de perles par AFM. Le domaine qui nous intéresse est la zone 3 de la figure 1.7.



FIG. 1.7 Diagramme de phase du polyélectrolyte hydrophobe

(d'après le modèle de Dobrynin et al. 1996.)

1 pelote gaussienne : l'attraction entre les monomères et la répulsion électrostatique sont faibles

2 l'attraction provoque l'effondrement de la chaîne en globule

3 la répulsion électrostatique provoque la division du globule : cascade de transitions entre des colliers de perles avec différents nombres de perles

- 4 configuration cylindrique : polyélectrolyte en bon solvant
- 5 la condensation des contreions provoque l'effondrement de la chaîne

On ne peut pas connaître précisément la valeur du paramètre τ , mais nous savons que le polystyrène est très hydrophobe, ce qui signifie qu'on se situe vers la droite du diagramme ($\tau \sim 1$). Les charges de nos chaînes ne sont pas connues avec une grande précision car l'analyse élémentaire des taux moyens de sulfonation comporte une marge d'erreur d'environ 10%. Toutefois, nous disposons de 6 polymères avec des taux de charges *f* évalués à : 0.32, 0.67 et 0.92 pour les chaînes linéaires, ainsi que 0.4, 0.6 et 1 pour les cycles. On devrait donc être capable de balayer assez bien l'axe *f* et on espère qu'au moins un de nos échantillons, par exemple pour un taux de charge intermédiaire : 0.6 ou 0.67, tombe dans la zone 3.

Or, on sait par les expériences de diffusion de rayons X aux petits angles de Combet et al., et de neutrons aux petits angles de Spiteri (à paraître), que le facteur de forme des anneaux chargés à 60% est compatible avec l'existence possible de globules d'environ 3nm de diamètre reliés par des parties localement étirées.

1.2.3 Les molécules cycliques

Une des raisons d'étudier des polymères à topologie cyclique est qu'ils existent dans la nature. Ainsi, l'ADN adopte souvent une forme d'anneau dont le surenroulement ou le désenroulement (le nombre de tours que la chaîne effectue sur elle-même) est contrôlé par des enzymes : les topoisomérases. Le degré d'enroulement semble jouer un rôle dans les événements génétiques fondamentaux de la réplication, la transcription et la recombinaison de l'ADN. Mais la principale raison qui a conduit au développement de méthodes de préparation de polymères cycliques synthétiques est ailleurs : elle est reliée au problème fondamental de la dynamique des polymères. En effet, la dynamique des polymères linéaires est fondée sur le modèle de la reptation proposé par de Gennes (1971), et Doi et Edwards (1986). Ce modèle repose sur une vision du mouvement le long d'un tube imaginaire formé par les contraintes de l'environnement de la chaîne (voir figure 1.8).



FIG. 1.8 Modèle du tube

Les croix représentent des chaînes qui coupent le plan de la feuille. A cause des contraintes que représentent les autres chaînes, le mouvement de la chaîne représentée dans le plan de la figure est restreint à l'intérieur d'un tube.

Un des résultats de cette théorie est de prédire une transition du coefficient de diffusion des molécules à partir d'une certaine masse moléculaire. Or, c'est bien ce qui est observé en pratique pour les chaînes linéaires. Cependant, pour tester le modèle de manière plus approfondie, il faut considérer des molécules avec d'autres géométries.

La dynamique de chaînes en anneaux à forte concentration est forcément différente du mouvement de reptation des chaînes linéaires, puisque les chaînes en question n'ont ni début ni fin. On est alors conduit à imaginer que le mouvement d'un anneau ressemble à celui d'une amibe : la boucle s'étire et se rétracte au milieu de ses voisines (McLeish 2002). Une autre conséquence de cette géométrie est la réduction de l'étendue de la chaîne. Le carré moyen du rayon de giration : $\langle R_g^2 \rangle$ pour les anneaux en solvant thêta est la moitié de celui des chaînes linéaires de même masse.

Des simulations montrent que les anneaux à l'état fondu sont plus compacts que les chaînes linéaires et que, du fait des contraintes topologiques, il y a moins d'interpénétration des chaînes (Brown et al. 1998). La conséquence est une diffusion plus rapide. De plus, il n'y a apparemment pas de transition du coefficient de diffusion. Pourtant, des résultats expérimentaux contredisent cette version en observant une transition vers une dynamique plus lente pour une masse moléculaire à peine plus grande que dans le cas des chaînes linéaires (McKenna et al. 1989). Ainsi, la dynamique des anneaux n'est pas encore totalement comprise.

A notre connaissance, nos expériences nous permettent d'observer pour la première fois le comportement de polymères en anneaux synthétiques (PSS) sur des surfaces. Ici, le mouvement des chaînes est relativement limité par l'adsorption. Néanmoins, on peut

s'attendre à observer sur la surface des différences de comportement entre les chaînes cycliques et linéaires. De plus, il est intéressant de voir l'effet des répulsions électrostatiques entre monomères sur la conformation des anneaux. On peut par exemple se demander si les chaînes fortement chargées tendent vers des cercles parfaits ? Remarquons enfin que nos anneaux n'ont en principe pas de nœuds et sont peu ou pas surenroulés. La raison vient du processus de cyclisation qui a été effectué en régime dilué et en bon solvant (Ederle et al. 1999). Nous discutons de la synthèse de ces molécules dans la partie 2.1.1.

1.3 Interactions avec des surfaces

Tous les polymères ont une tendance naturelle à s'adsorber sur des surfaces, car la petite énergie d'adsorption des monomères (de l'ordre de k_bT) devient considérable lorsque la molécule entière s'adsorbe. La résistance au confinement des chaînes provient de la perte d'entropie provoquée. Cette perte est d'autant plus grande que les chaînes sont flexibles. Ainsi, la conformation d'une chaîne à l'équilibre se compose de segments adsorbés (les « trains » tandis que des boucles et des queues restent libres de fluctuer en solution (voir figure 1.9).



FIG. 1.9 Conformation à l'équilibre d'un polymère adsorbé

La chaîne présente des « trains » qui correspondent aux séquences adsorbées sur la surface, ainsi que des boucles et des queues qui restent en solution.

Cependant, quand l'interaction avec la surface est particulièrement favorable (comme dans le cas de polyélectrolytes sur une surface chargée), la chaîne s'adsorbe généralement à plat comme nous allons le voir dans la partie 1.3.1. Ajoutons que la rigidité des polyélectrolytes fortement chargés (en régime dilué et en l'absence de sel) favorise encore cette adsorption à plat car les chaînes ont moins d'entropie à perdre que des chaînes flexibles.

1.3.1 Adsorption sur une surface chargée

L'adsorption de polymères sur des surfaces chargées est un problème classique de physique des polymères. Il existe en effet de nombreuses applications : multicouches de polyélectrolytes, stabilisation de suspensions colloïdales, floculation etc. Dans certains cas, l'adsorption de polyélectrolytes peut conduire à une inversion de la charge de la surface. Ceci est montré par exemple par des expériences sur des colloïdes chargés : leur mobilité dans un champ électrique peut s'inverser après que des polyélectrolytes se soient adsorbés (Bonekamp et al. 1987). L'inversion de charge de la surface est à l'origine du procédé de formation des multicouches de polyélectrolytes qui consiste à déposer alternativement des couches de polycations et de polyanions (Decher, 1997).

Mais commençons par le début. Au départ, une surface chargée en solution possède une couche de contreions à proximité de l'interface solide-liquide (la double couche électrique) qui la neutralise globalement. L'épaisseur de cette couche est caractérisée par la longueur de Gouy-Chapman :

$$\lambda = (2\pi l_{\rm b} \,\sigma)^{-1},$$

où σ est la densité surfacique de charge.

L'adsorption de polyélectrolytes est alors gouvernée par le mécanisme de relargage des contreions des polyélectrolytes et de la surface chargée (voir figure 1.10). La libération des contreions en solution représente en effet un gain d'entropie important.



FIG. 1.10 Relargage des contreions lors de l'adsorption d'un polyélectrolyte sur une surface chargée

Pour décrire l'adsorption d'une couche de polyélectrolytes sur la surface chargée, il existe des théories qui utilisent la méthode du champ auto-cohérent. La densité de polymères y est couplée au potentiel électrostatique au travers les équations de Poisson-Boltzmann et de Edwards. A faible densité surfacique de charge, une telle méthode décrit correctement la distribution des polyelectrolytes près de la surface. Cependant, quand la densité surfacique de charge augmente, des corrélations importantes apparaissent qui ne sont pas prises en compte. En effet, les répulsions électrostatiques entre les chaînes les forcent à s'organiser à proximité de la surface (en un « liquide de Wigner » à 2D). Or, les expériences montrent qu'en pratique c'est ce qui se passe la plupart du temps. Ainsi, dans nos expériences sur la bicouche lipidique cationique (cf partie 4), il apparaît que nous sommes toujours dans le cas où les corrélations entre les chaînes sont importantes, quelle que soit la charge surfacique.

Le modèle adapté à notre problème est celui de Dobrynin et al. (2000 et 2002). Ici, on subdivise la couche de polyélectrolytes adsorbés en cellules dites cellules de Wigner comme le montre la figure 1.11.



FIG. 1.11 Représentation du modèle cellulaire (liquide de Wigner à 2D) A cause des répulsions électrostatiques, les chaînes sont cantonnées à des cellules de taille constante.

La taille des cellules résulte de l'optimisation de la répulsion électrostatique entre chaînes et de l'attraction avec la surface chargée.

A faible densité de charge (régime dilué de l'adsorption), les chaînes sont d'abord libres de se déformer. La taille des cellules ξ varie alors comme l'inverse de la racine carrée de la densité surfacique de charge σ :

$$\xi \sim \sigma^{-1/2}$$
 (régime dilué 2D)

De plus, du fait de la présence des chaînes, la surface a une charge surfacique effective qui est l'inverse de la charge surfacique sans les polymères.

A mesure que la densité de charge augmente, les chaînes se mettent progressivement à plat sur la surface. Ensuite, les chaînes se rapprochent les unes des autres jusqu'à-ce que la taille de la cellule de Wigner devienne égale à la taille des chaînes. C'est le début du régime semidilué. La répulsion électrostatique pousse alors les chaînes à s'étirer parallèlement sur la surface comme le montre la figure 1.12a. La distance entre les chaînes ξ est ici inversement proportionnelle à la densité surfacique de charge :

$$\xi \sim \tau^{1/2} (u^{1/2} b \sigma)^{-1}$$
 (régime dilué 2D)

De plus, la couche adsorbée provoque une surcharge de surface inversement proportionnelle à la longueur de Debye κ^{-1} et indépendante de la charge surfacique de la surface seule :

$$\delta \sigma \sim \tau^{1/2} (u^{1/2} b \kappa^{-1})^{-1}$$

Quand la densité surfacique de charge atteint un certain seuil, la cellule de Wigner devient aussi petite que la taille des blobs électrostatiques et les chaînes sont l'une contre l'autre (voir figure 1.12b).

Pour une densité surfacique de charge encore plus grande, l'attraction électrostatique devient suffisamment forte pour rapprocher les chaînes à des distances plus petites que le blob électrostatique. Les chaînes adsorbées forment alors une solution de polymères concentrée au contact de la surface, et une couche à 3 dimensions au-dessus de la surface (voir figure 1.13). Dans ce régime, l'interaction électrostatique d'une chaîne avec le champ effectif créé par les autres chaînes domine l'énergie électrostatique de la chaîne. Par conséquent, la distribution des polymères peut être obtenue par une approche de type champ moyen. Il s'agit d'une distribution auto-similaire avec des blobs de taille croissante à mesure que l'on s'éloigne de la surface.



FIG. 1.12 Régime semi-dilué de l'adsorption

Pour une certaine densité surfacique de charge σ , les chaînes sont espacées de ξ (a). A mesure que σ augmente, les chaînes se rapprochent jusqu'à ce que les blobs électrostatiques entrent finalement en contact (b).



FIG. 1.13 Régime 3D de l'adsorption

Pour une densité de charge surfacique élevée, les chaînes sont concentrées au contact de la surface tout en formant une couche auto-similaire en volume.

De la même manière que pour l'espacement entre les chaînes, on peut suivre la variation de l'épaisseur de la couche de polymères ζ en fonction de la densité surfacique de charge (voir figure 1.14). L'épaisseur est d'abord inversement proportionnelle à la densité surfacique de charge. Puis, elle décroît comme $\sigma^{-1/3}$. A ce stade, l'épaisseur est déterminée par le gain énergétique du à l'attraction électrostatique et la perte entropique due à la compression des chaînes. Puis, à partir d'une certaine densité de charge, l'épaisseur se met à croître comme $\sigma^{1/3}$ sous l'influence de l'attraction électrostatique et de la répulsion entre monomères (régime 3D). Enfin, l'épaisseur de la couche sature tandis que les contreions écrantent le potentiel de surface.



FIG. 1.14 Variation de l'épaisseur de la couche adsorbée en fonction de σ

Pour finir, mentionnons que l'écrantage des interactions électrostatiques entre les polyélectrolytes adsorbés en solution avec sel a pour effet une importante surcompensation de la charge surfacique par adsorption supplémentaire dans les couches à 2 dimensions. Pour les couches à 3 dimensions, l'adsorption est d'abord accrue à faible force ionique avant d'être réduite à forte force ionique.

Le modèle que nous venons de voir s'applique de manière analogue aux polyélectrolytes hydrophobes (Dobrynin et al. 2002). Dans ce cas, on remplace les chaînes par des colliers de perles tels que décrits dans la partie 1.2.2. Le régime semi-dilué de l'adsorption se subdivise alors en deux sous régimes : le régime de la «corde » puis le régime de la « perle ». Ce dernier correspond à une perle par cellule de Wigner. Par ailleurs, Borisov et al. (2001) montrent que les perles adsorbées sur la surface peuvent s'écraser telles des gouttes d'eau soumises à la gravité (dans le cas de chaînes faiblement chargées). Une augmentation de la charge surfacique ou de la force ionique peut même conduire à la coalescence des perles en « crêpes » écrasés sur la surface.

1.3.2 Adsorption Irréversible et relaxation

La théorie de la partie précédente présente un système à l'équilibre thermodynamique. Or, en pratique, les expériences d'adsorption de polymères sur des surfaces montrent souvent que l'équilibre n'est pas atteint mais que le système est bloqué ou relaxe très lentement. Dans bien des cas en effet, les interactions monomère–surface sont relativement importantes ($>k_bT$), si bien que l'adsorption devient effectivement irréversible. Le système n'est alors pas libre d'explorer librement l'espace des phases pour parvenir à l'équilibre mais se retrouve piégé dans un certain état. D'un point de vue théorique, cela implique que l'hypothèse de l'entropie de Boltzmann n'est pas applicable pour le calcul des observables. La cinétique de l'adsorption peut alors être décrite par un processus stochastique (Shaughnessy et al. 2003).

Une expérience illustre le problème. Schneider et al. (1996) et Douglas et al. (1997) étudient l'adsorption de PMMA (dilué) sur une surface de silicone oxydé. Ici, les chaînes s'adsorbent en formant des liaisons hydrogènes avec la surface ($E \sim 4k_bT$). Les auteurs mesurent le spectre d'absorption infrarouge des polymères adsorbés, ce qui leur permet de suivre dans le temps la masse totale adsorbée ainsi que la masse directement en contact avec la surface. On peut alors déterminer la fraction φ de monomères adsorbés pour les chaînes en fonction du temps. On observe que les chaînes qui arrivent en premier sur la surface ont une valeur de φ bien plus élevée que celles qui arrivent tardivement. Puis, au bout d'un certain temps, les valeurs de φ deviennent constantes. On se retrouve alors avec une distribution de φ assez large qui contraste avec celle d'une couche à l'équilibre où les chaînes ont toutes la même valeur de φ . L'interprétation de ces résultats est que les premières chaînes arrivées sur la surface s'adsorbent à plat alors que les chaînes arrivées tardivement sont restreintes par le nombre de sites disponibles et n'ont d'autre choix que de former des boucles (et des queues) au-dessus de la surface (voir figure 1.15).



FIG. 1.15 Conformation d'une chaîne arrivée tardivement sur la surface La restriction des sites d'adsorption disponible (la couche est presque saturée) contraint la chaîne à former des boucles et des queues au-dessus de la surface.

Le modèle théorique de l'adsorption irréversible proposé par Shaughnessy et al. (2003) parvient à une distribution de φ : P(φ)~ $\varphi^{-4/5}$ en bon accord avec les résultats expérimentaux précédents. Dans ce modèle, la couche de polymères adsorbés comprend une sous-couche aplatie qui résulte de l'adsorption des premières chaînes arrivées sur la surface. En effet, quand la solution est diluée, cette sous-couche a le temps de se former avant que d'autres chaînes n'arrivent pour gêner l'adsorption. Ceci s'explique par le temps très court nécessaire aux chaînes pour s'aplatir sur la surface. A partir du moment où un premier monomère est adsorbé, le reste de la chaîne diffuse vers la surface dans un temps de l'ordre du temps de relaxation de la pelote en solution (microseconde). Une fois la couche plane formée, les chaînes qui arrivent ensuite trouvent seulement un petit nombre de sites d'adsorption séparés les uns des autres, et ce nombre diminue au fur et à mesure. Par conséquent, les chaînes sont contraintes de former des boucles de plus en plus grandes au-dessus de la surface.

Dans de nombreuses expériences, l'adsorption n'est pas strictement irréversible mais la cinétique de relaxation est très lente. Le modèle précédent reste alors valable pour des périodes de l'ordre du temps de formation de la couche. Ensuite, pour des temps beaucoup plus long, des désorptions peuvent se produire et le système tend lentement vers l'équilibre.

Bien qu'un processus d'adsorption soit irréversible, il y a toujours la possibilité pour qu'une relaxation s'effectue par diffusion des chaînes sur la surface. Le cas le plus frappant est sans doute celui de l'ADN adsorbé sur une bicouche lipidique cationique en phase fluide. L'interaction ADN-lipide cationique est de l'ordre de 2 k_bT par monomère (Clausen-Schaumann et al. 1999). Or, les observations en microscopie de fluorescence montrent que l'ADN, qui est couché à plat sur la bicouche, peut diffuser librement en 2D (Maier et al. 1999). Les auteurs montrent que le coefficient de diffusion D_{iff} des chaînes individuelles varie comme l'inverse du nombre de monomères, conformément à la dynamique de Rouse. Aussi, lorsque la concentration augmente, il y a un phénomène de ségrégation des chaînes qui deviennent relativement compactes, coincées entre leurs voisines. Dans les régimes étudiés, les chaînes restent apparemment toujours à plat sur la bicouche (il n'y a pas de boucles et de queues qui pendent en solution).

Par contraste, sur une bicouche lipidique cationique en phase gel, les chaînes individuelles diffusent très peu, de telle sorte qu'on peut les observer par AFM. Les observations de Fang et al. (1997) montrent que les chaînes d'ADN tendent à s'aligner les unes à côté des autres sur la surface en formant une monocouche dense et ordonnée. Cette fois, à haute concentration, on

remarque par endroits des chaînes qui ne sont apparemment pas complètement adsorbées sur la surface faute de place. On observe en effet des zones informes par-dessus la monocouche, qui peuvent résulter du passage de la pointe de l'AFM au-dessus de segments de chaînes qui pendent en solution. Cependant, lorsque la bicouche et les polymères sont chauffés pour passer dans la phase fluide, la couche d'ADN devient plus dense et mieux ordonnée.

La diffusion des chaînes à plat est aussi possible sur une surface rigide comme le montrent Sukhishvili et al. (2000) par des expériences de spectroscopie de corrélation de fluctuation sur des chaînes de polyéthylène glycol adsorbées sur une surface de silice silanisée (à partir d'une solution diluée). Les chaînes diffusent à plat sur la surface avec un coefficient de diffusion qui dépend du nombre de monomères selon la loi : $D_{iff} \sim N^{-3/2}$. Les auteurs interprètent cette loi de puissance comme un indice du mouvement de reptation des chaînes, malgré l'absence de contraintes environnementales évidentes.

Ainsi, l'irréversibilité des processus d'adsorption et la relaxation des polymères sur la surface sont à prendre en compte dans la structure finale des couches obtenues.

1.4 Condensation par des agents multivalents

Quand on décrit les polyélectrolytes dans le cadre d'une théorie de champ moyen (Poisson-Boltzmann), il ne peut jamais y avoir de forces attractives entre les molécules qui sont de même signe. Pourtant, de nombreuses expériences montrent qu'en présence d'ions multivalents (Z>2), des agrégats se forment dans les solutions de polyélectrolytes. Pour l'expliquer, il faut considérer que les contreions qui se condensent autour des polyélectrolytes (cf 1.1) créent une distribution de charge fortement corrélée dans l'axe des chaînes, ainsi que dans l'axe perpendiculaire aux chaînes. Des anticorrélations peuvent se produire entre ces distributions de charge avec pour conséquence le phénomène d'attraction.

Ainsi, les expériences de de la Cruz et al. (1995) sur des chaînes de PSS mettent en évidence la formation d'agrégats en présence de cations trivalents (La^{3+} , Th^{4+}). La transition se produit pour une concentration en cations proportionnelle à la concentration en monomères. Puis, pour une concentration en cations plus élevée et indépendante de la concentration en polymères, les agrégats disparaissent. Les auteurs élaborent un modèle thermodynamique dans lequel les ions se condensent aléatoirement sur les chaînes. Ainsi, les monomères portent trois types de charges suivant que s'y trouve condensé un ion multivalent, un contrion d'origine ou aucun contreion. Une attraction électrostatique à courte portée se produit alors entre les monomères qui portent un ion multivalent et ceux qui n'en portent pas. Lorsque le nombre de « pontages ioniques » est suffisamment important, il y a précipitation. Toutefois, quand la concentration en ions multivalents augmente d'avantage, l'attraction entre polyélectrolytes décroît par écrantage, ce qui conduit à la re-dissociation des chaînes.

Quand la rigidité des chaînes est importante, comme par exemple pour les polyélectrolytes biologiques, la condensation par des ions multivalents conduit à des structures organisées telles que des bâtons ou des toroïdes (Bloomfield, 1998). Le toroïde est une structure formée d'ADN enroulé sur lui-même avec un ordre hexagonal compacte (voir figure 1.16). Son rayon est environ 50 nm, soit à peu près la longueur de persistance de l'ADN. A l'inverse, l'actine F se condense en bâtons et les Hyaluronans en fibres ou en réseaux (Cowman et al. 2005).



FIG. 1.16 Image en microscopie cryoélectronique d'un toroïde d'ADN lambda (Hud et al. 2001)

Toutes ces structures naissent de l'association de chaînes côtes à côtes. Pour expliquer ce mécanisme, Borukhov et al. (2002) proposent un modèle théorique et une simulation de dynamique moléculaire qui tiennent compte explicitement des ions multivalents. Au départ, deux chaînes se trouvent reliées par des ions multivalents car l'énergie libre du complexe est plus petite que celle des chaînes isolées (pour un nombre suffisant de contreions). Puis, il se forme progressivement une sorte d'échelle désordonnée dont les contreions forment les barreaux (voir figure 1.17). Le modèle montre notamment que l'alignement des deux chaînes est d'autant plus favorable que les molécules sont rigides.



FIG. 1.17 Association de chaînes côte à côte par intercalation d'ions multivalents

Dans les expériences, les agents multivalents généralement utilisés pour former ces structures condensées incluent la spermine³⁺ et la spermidine⁴⁺ ou encore $Co(NH_3)_6^{3+}$. Les concentrations de transition présentent toujours la même dépendance à la concentration en polymères. A faible concentration en chaînes, la transition est indépendante de la concentration en polymères. Puis, pour une concentration plus élevée en polymères, la concentration de transition varie linéairement avec la concentration en polymères. Enfin, les structures se redissolvent pour une concentration en ions multivalents plus élevée et indépendante de la concentration en polymères.

Nguyen et al. (2000) établissent un diagramme de phases pour des complexes : ADN-sphères chargées. Le but initial est de comprendre la formation de la chromatine, mais le modèle peut rendre compte qualitativement des phénomènes de condensation précédents.

Une transition vers des agrégats macroscopiques a lieu à proximité du point isoélectrique, c'est-à-dire pour des concentrations auxquelles la charge totale des sphères est égale à la charge totale des ADN. De part et d'autre de ce point se forment des complexes solubles d'ADN enroulé autour des sphères (comme des colliers de perles). Ces complexes sont chargés négativement ou positivement selon qu'il y a un manque ou un excédant de sphères pour neutraliser exactement la charge des ADN. Le diagramme de phase est représenté sur la figure 1.18.



FIG. 1.18 Diagramme de phase de complexes ADN/sphères chargées positivement (Nguyen et al. 2000)

S et p sont les concentrations en sphères et en polymère. La ligne en pointillés représente le point isoélectrique. La courbe en pointillés S_o représente la concentration en sphères pour laquelle les complexes formés sont neutres. Les courbes S_c et S_d délimitent le domaine d'existence d'agrégats macroscopiques. Les signes moins et plus sont les charges des complexes ADN/sphères et de leurs aggrégats de part et d'autre du point isoélectrique.

Enfin, nous voulons citer un exemple différent de la condensation par des ions multivalents mais qui présente une certaine analogie. En présence de phospholipides cationiques et neutres, les ADN s'intercalent entre des bicouches pour former des multicouches (Rädler et al. 1997). Ces complexes appelés aussi « lipoplexes » suscitent un vif intérêt pour la transvection, c'està-dire le transfert d'ADN de l'extérieur à l'intérieur de la cellule. On observe que la distance entre ADN coincés entre deux bicouches varie comme l'inverse de la proportion en lipides cationiques que contiennent les bicouches. Les chaînes d'ADN ainsi condensées en 2 dimensions peuvent par suite se retrouver à une distance aussi petite que 5nm. Si après cela on adjoint en plus à la solution des cations divalents, les ADN peuvent se condenser d'avantage jusqu'à n'être plus séparés que d'une distance de 3nm (Koltover et al. 2000). Selon les auteurs, ce dernier phénomène reflète l'importance de la dimension spatiale sur les interactions intermoléculaires. Les forces attractives qui résultent des contreions sont plus importantes lorsque les polyélectrolytes et les contreions sont confinés en 2D, ce qui permet ici à des ions divalents de condenser les chaînes.

2 Matériel et méthodes

2.1 Préparation des polyélectrolytes

2.1.1 PSS linéaires et cycliques à différents taux de charge

La synthèse des chaînes de polystyrène ainsi que leur sulfonation (pour les rendre chargées) ont été réalisées dans notre laboratoire par François Isel, sous la responsabilité de Pierre Lutz (synthèse d'anneaux) et de Michel Rawiso (sulfonation). Nous en présentons les principales étapes.

Les chaînes de polystyrène initiales

Les chaînes linéaires de polystyrène initiales ont une masse moléculaire $M_w = 81036 \text{ g.mol}^{-1}$ et une polydispersité de 1,05. Ainsi, leur longueur étendue correspond approximativement à : $(M_n/M)b = 185$ nm $(M_n = M_w/1.05, M$ est la masse du monomère de polystyrène, *b* la longueur du monomère : 0.25nm). Les précurseurs des anneaux ont quant à eux une masse moléculaire $M_w = 70000 \text{ g.mol}^{-1}$ et une polydispersité de 1,05. Leur longueur de contour est donc : $(M_n/M)b = 160$ nm.

La fermeture des anneaux a été réalisée par addition de dibromoparaxylène à des chaînes de polystyrène vivant dans du THF (Ederle et al. 1999). Pour former des cycles, il faut se placer à une concentration faible pour que l'unité xylène couple principalement deux sites vivants d'une même macromolécule. Malgré tout, il se forme aussi des polycondensats par couplage entre des sites de macromolécules différentes (voir figure 2.1). Afin de séparer les cycles des polycondensats linéaires de grande masse moléculaire, on procède à une série de fractionnements suivis de caractérisations par CES. A la fin, il reste cependant toujours parmi les cycles une petite proportion de linéaires de même masse moléculaire. Ce sont des chaînes qui n'ont pas réagi à cause de la neutralisation de leurs terminaisons par des hydrogènes.



FIG. 2.1 Couplage de l'unité xylène

Le couplage entre deux sites vivants sur une seule et même macromolécule forme un cycle (a). Le couplage entre des sites de macromolécules différentes engendre des concatémères (b).

Sulfonation

La sulfonation des chaînes de polystyrène linéaires et cycliques a été réalisée pour obtenir à chaque fois trois taux de charge différents. Le taux de charge le plus bas correspond à des chaînes juste au-dessus du seuil de solubilité (30% de monomères chargés). Le taux de charge le plus haut correspond au contraire à des chaînes dont presque tous les monomères sont chargés. Puis, le taux de charge intermédiaire a été choisi de façon à se situer à peu près au milieu de ces deux extrémités.

La méthode de sulfonation provient d'un brevet de la société Exxon (Makowski et al. 1975). Elle a été légèrement modifiée par Françoise Lafuma (Essafi et al. 1994, 1995). Le réactif est l'acide sulfurique, en présence d'anhydride acétique. L'acide acétylsulfonique est formé in situ et réagit avec les cycles aromatiques du polystyrène (dans du 1,2-dichloroéthane). La fraction de sulfonation résultante (qui deviendra la fraction de charge) dépend de la quantité de réactif employé. Puis, on ajoute NaOH au polyacide obtenu de façon à convertir les groupes acides sulfoniques en sulfonate de sodium. Les deux principales réactions sont représentées sur la figure 2.2.

2 Matériel et méthodes



FIG. 2.2 Les réactions de sulfonation et d'hydrolyse basique

Dans la première réaction, l'acide acétylsulfonique est formé in situ et réagit avec les cycles aromatiques du polystyrène. Dans la seconde réaction, on convertit le polyacide en sel par addition de soude.

Pour terminer, la solution est dialysée, puis concentrée avant la lyophilisation des polymères. La fraction de groupes sulfonates de chaque échantillon a été déterminée par analyse élémentaire. En comptant une marge d'erreur d'environ 10%, on a : 32%, 67% et 92% de groupes sulfonates pour les chaînes linéaires et 40%, 60% et 100% pour les anneaux.
Cependant, l'observation des chaînes linéaires 67% et 92% sur une surface par AFM nous a révélé que des chaînes de taille normale, c'est-à-dire correspondant approximativement à la masse moléculaire du PS parent, côtoyaient de nombreuses chaînes beaucoup plus courtes. Nous avons caractérisé ces polyélectrolytes par la technique de fractionnement dénomée « FFF »: Flux-Force-Field ou fractionnement par flux croisés (analyse effectuée par Alain Rameau). Avec cette technique, les molécules à séparer sont poussées par un flux à travers un canal aplati pour en sortir dans l'ordre des masses croissantes (par opposition à la CES). L'avantage d'utiliser cette technique ici est de limiter les problèmes de rétention que l'on rencontre habituellement en CES pour des polymères tels que le PSS. Les courbes obtenues sont représentées sur la figure 2.3b. Pour chaque taux de charge, on superpose la courbe de réfractométrie différentielle (en trait fin) et le logarithme de la masse moléculaire calculée par diffusion de lumière (en trait épai). La valeur des courbes de réfractométrie est proportionnelle à la concentration en chaînes obtenue pour un volume d'élution donné. Or, on observe pour chaque taux de charge un pic accompagné d'un plateau sur le côté gauche (ie. Pour un volume d'élution plus faible). Ces plateaux indiquent une dispersion de la masse principale (le pic) vers des masses plus faibles. Autrement dit, ils correspondent à l'existence de fragments de chaînes à côté des chaînes de taille normale. Compte tenu de la monodispersité des chaînes de polystyrène initiales (cf courbe de GPC sur la figure 2.3a), ce résultat s'interprète comme lié à une destruction des chaînes en fragments plus petits causée soit par la sulfonation, soit par un phénomène de vieillissement (la sulfonation date de 2001). Nous verrons aux chapitres 3 et 4 que les chaînes en anneaux n'ont pas été épargnées par la fragmentation mais que l'effet est moins prononcé que pour les chaînes linéaires.



FIG. 2.3 Courbes de chromatographie des chaînes linéaires

a) : le pic de la courbe de réfractométrie différentielle (CES) indique que les chaînes de polystyrène initiales sont monodisperses ($M_w/M_n = 1.05$). b) : après sulfonation, les chaînes sont polydisperses ($M_w/M_n = 1.16$ pour 67% de charge ; $M_w/M_n = 1.49$ pour 92% de charge). On observe en effet un plateau assez large au pied de chaque pic (FFF) qui correspond à la présence de masses plus faibles.

Il reste encore deux questions importantes. La première concerne la distribution des groupes sulfonates le long des chaînes. Il n'y a pas à notre connaissance de raison pour que l'acide acétylsulfonique attaque une partie spécifique de la chaîne en formant des blocs. Dans sa thèse, Damien Baigl (1996), qui a utilisé la même méthode de sulfonation, donne plusieurs arguments en faveur d'une distribution aléatoire. L'un d'entre eux est que, vu la forte hydrophobicité du polystyrène, la solubilité des chaînes chargées à 30% ne peut s'expliquer

que par une bonne répartition de la charge sur les chaînes. Il ne peut donc pas exister de longs blocs chargés. Dans la suite, nos observations par AFM nous permettent d'apporter des éléments de réponse supplémentaires.

Une autre question concerne la variation du taux de sulfonation d'une chaîne à l'autre. Il y a forcément une certaine distribution pour une même population de chaîne. Cependant, nous n'avons pas effectué d'électrophorèse capillaire pour évaluer cette distribution. Ceci est du à une maîtrise imparfaite de cette technique, récente au laboratoire, au moment de la rédaction. Là encore, les observations par AFM nous permettent d'en savoir plus.

Préparation des solutions

Pour les expériences d'AFM, les échantillons de polystyrène sulfonate lyophilisés ont été dissous dans de l'eau miliQ (Gradient, Milipore) à la concentration requise (de 10⁻⁷ à 10⁻⁴ molaire). Plusieurs durées d'incubation ont été testées (entre 1h et plusieurs jours) avec des résultats tout à fait semblables. Aussi, on pense que les fortes dilutions utilisées limitent les problèmes qui pourraient résulter d'une dissolution incomplète du polymère (présence d'agrégats).

2.1.2 ADN cyclique

L'ADN cyclique pUC18 a été acheté à la société Fermentas (fournisseur : Euromedex, Souffelweyersheim). Un des avantages de ce type de molécule est d'être monodisperse à la paire de base près. L'ADN cyclique pUC18 est un plasmide extrait de la bactérie E. coli. Sa longueur est de 2686 paires de bases, soit 940 nm. L'anneau est dans un état naturellement surenroulé, ce qui pousse la molécule à adopter une conformation vrillée en solution pour baisser l'énergie de torsion.

Avant utilisation, les solutions d'ADN fournies ont été diluées dans un tampon (10mM Tris-Hcl pH 7.6, 1mM EDTA) à la concentration requise (entre 10^{-7} et 10^{-4} molaire) puis agitées délicatement.

2.2 Le Microscope à Force Atomique

La pointe de l'AFM est tel un doigt nanométrique qui nous permet de sentir la matière à l'échelle des molécules individuelles et parfois des atomes. Cette interface est mécanique, ce qui lui confère un aspect relativement intuitif pour aborder le monde nanométrique (Michael, 2006).

2.2.1 Petit historique

L'origine de la microscopie à force atomique remonte sans doute à l'invention du profilomètre à stylet par Schmaltz en 1929. Cet appareil permettait de suivre le mouvement d'une pointe qui parcoure une surface à l'aide d'un levier optique. Les déplacements de la pointe étaient enregistrés directement sur du papier photographique (voir figure 2.4).



FIG. 2.4 Schéma de fonctionnement du profilomètre à stylet : l'ancêtre de l'AFM

Pour améliorer cette technique, Becker introduisait en 1950 l'idée de faire osciller le stylet au contact de la surface de manière à réduire les forces latérales.

En 1971, Russel Young développe le « Topographiner ». Le principe est basé sur l'utilisation du courant tunnel entre une pointe et une surface conductrice. La pointe est montée sur un matériau piézoélectrique qui permet d'effectuer des déplacements dans toutes les directions. Pendant ce temps, une boucle de rétroaction électronique assure que le courant tunnel reste constant. De cette façon, on peut balayer l'échantillon à distance constante et reconstituer une image en 3 dimensions de la surface.

En 1982, des chercheurs du laboratoire IBM de Zürich perfectionnent le principe du Topographiner en contrôlant les vibrations qui limitaient jusque-là la résolution de l'instrument. Il s'agit du STM (Binning et al. 1982) qui permet d'atteindre pour la première fois une résolution atomique et qui vaut à ses auteurs le prix Nobel de physique.

Sur ces bases, le Microscope à Force Atomique est développé au milieu des années 80 par Gerd Binning, Calvin Quate et Christopher Gerber. Cette fois-ci il n'y a plus de courant tunnel mais seulement une pointe extrêmement fine à l'extrémité d'un levier. Quand la pointe entre en contact avec une surface, le levier est défléchit selon la loi de Hooke. La détection de cette déflexion s'effectuait initialement à l'aide d'une pointe STM, mais rapidement, la technique du levier optique de Schmalz fut reprise en y adjoignant l'usage d'une photodiode. De cette manière, la mise en œuvre de l'instrument est considérablement simplifiée.

Par la suite, le microscope à force atomique est amélioré en utilisant la technique de vibration du cantilever (Martin et al. 1987). Dans le mode vibrant (ou dynamique), le cantilever est excité à proximité de sa fréquence de résonance. Les interactions entre la pointe et l'échantillon modifient alors l'amplitude d'oscillation, la phase et la fréquence de résonance. Le mode modulation d'amplitude est le plus courant. Il peut être utilisé en non-contact à proximité de la surface, ou bien en contact intermittent. Le « Tapping » est le mode de contact intermittent développé par la société Veeco (Zhong, 1993). C'est cette technique que nous avons utilisée dans cette thèse et dont nous décrivons les spécificités dans le paragraphe 2.2.3.

2.2.2 Eléments constitutifs de l'AFM

Nous allons maintenant présenter de façon plus détaillée les 4 principaux éléments à la base du fonctionnement de l'AFM. On discutera en même temps de leurs limitations.

1) La sonde

La sonde se compose de la pointe et du levier. La pointe est la partie qui interagit directement avec l'échantillon. Elle est généralement fabriquée en matériaux à base de Silicium. La raison provient du développement considérable de la microfabrication du Silicium pour la microélectronique. Les pointes peuvent avoir différentes tailles et géométries, chacune ayant ses propres caractéristiques vis-à-vis du contact avec l'échantillon et de l'image qui en résulte. De façon générale, la résolution latérale du microscope est limitée par le rayon de courbure de l'extrémité de la pointe (cf 2.4.1). La figure 2.5 montre deux images de microscopie électronique de la pointe que nous avons utilisée dans nos expériences.



FIG. 2.5 Pointe d'AFM : modèle BS-Multi75 (Budget Sensor) Le rayon de courbure de l'extrémité est inférieur à 10nm.

Comme on le voit sur la figure de droite, la pointe est montée au bout d'un levier (ou cantilever), lequel se fléchit lorsqu'une pression s'exerce sur la pointe. Le levier possède une constante de raideur que l'on choisit en fonction de l'échantillon. Une constante de raideur basse (< 1N/m) permet par exemple d'exercer des forces moins importantes et donc d'éviter de détruire un échantillon fragile. En revanche, une telle sonde est plus sujette au piégeage par les forces de tension de surface. Pour nos expériences nous utilisons une constante de raideur de 3N/m avec laquelle nous obtenons de meilleurs résultats.

On peut remarquer que, de part la souplesse du levier, la résolution verticale est limitée par le bruit thermique qui induit en permanence un petit déplacement Δz :

$$\frac{1}{2} k < (\Delta z)^2 > \sim \frac{1}{2} k_b T$$

(k est la constante de raideur du ressort).

Ainsi, la meilleur résolution verticale que l'on puisse atteindre avec un levier d'une raideur k = 3 M/m est de l'ordre de 3 dixièmes d'angströms.

2) Le scanner

Sur l'AFM que nous avons utilisé (Nanoscope IIIa, Veeco Metrology Group), l'échantillon se déplace au-dessous d'une sonde qui reste stationnaire. Les déplacements sont effectués par le scanner. Son fonctionnement repose sur l'utilisation de matériaux piézoélectriques qui permettent d'effectuer des déplacements inférieurs au nanomètre. Un scanner typique se compose de 5 éléments piézo-électriques contrôlés indépendamment pour effectuer des translations dans toutes les directions. Il faut toutefois prendre en compte le comportement non-linéaire. Ainsi, dans le scanner à tube cylindrique, le mouvement selon les axes x et y est couplé au mouvement suivant z (voir figure 2.6).



FIG. 2.6 Schéma d'un scanner à tube cylindrique

Sur ce scanner, le mouvement selon chaque axe est non linéaire. Il en résulte inévitablement un effet de courbure des images brutes (lequel peut être corrigé à l'aide du filtre « flatten » - cf 2.4.3).

A cela viennent encore s'ajouter des phénomènes d'hystérésis. Pour compenser ces effets, une calibration est nécessaire. Pour cela, on scanne un échantillon standard à la géométrie et aux dimensions connues (une grille de calibration), et on étalonne l'électronique de contrôle du scanner.

Il existe différentes tailles de scanners. Les scanners plus longs permettent des mouvements plus importants, autorisant une taille d'image et une profondeur de champ plus élevées (typiquement jusqu'à 150 μ m de large et quelques μ m de profondeur). Cependant, les scanners plus petits sont plus précis. Ainsi, la plupart des images à l'échelle atomique sont obtenues à l'aide de scanners de petite taille. Dans cette thèse nous avons choisi un scanner à tube cylindrique d'une course de 120 μ m en (*x*, *y*) et de 6.2 μ m en *z* en raison de sa meilleur stabilité par rapport à des scanners plus petits.

Pour clore ce paragraphe, remarquons que pour mesurer des hauteurs très faibles sur des échantillons lisses, il est nécessaire de choisir un échantillonnage approprié des déplacements verticaux du scanner (ceci s'effectue en limitant l'amplitude de déplacement en z).

3) La détection

Pour détecter la déflexion du cantilever lorsque la pointe entre en contact avec l'échantillon, on utilise la technique du levier optique. Un laser est réfléchit sur la face arrière du cantilever pour venir rencontrer une quadri-photodiode. Les quatre cellules permettent de détecter, sous la forme de différences de tensions, la position de l'impacte laser dans le plan de la photodiode. La distance entre le cantilever et la photodiode étant environ 100 fois plus grande que la longueur du cantilever, cette technique permet de détecter une déflexion avec une grande précision. Typiquement, un déplacement vertical du cantilever de l'ordre de 10pm est décelable, une précision comparable à celles que donnent les techniques d'interférométrie.

4) La boucle de rétroaction électronique

La boucle de rétroaction électronique permet d'ajuster le mouvement du scanner de manière à garder l'interaction entre la pointe et l'échantillon constante. De cette manière, on peut, en enregistrant tous les déplacements du scanner, créer une image de la topographie de l'échantillon. Le temps de réaction de la boucle induit cependant une limitation de la vitesse de formation des images, d'où l'impossibilité de suivre des phénomènes dynamiques trop rapides. Pour aller plus vite, on peut désactiver la boucle de rétroaction et scanner l'échantillon à hauteur constante. En mode contact, c'est de cette manière qu'on peut atteindre une résolution atomique sur des échantillons très plats (telles des surfaces cristallines).

Les éléments de base de l'AFM sont réunis sur la figure 2.7. En résumé, pour construire une image topographique de la surface, le scanner déplace l'échantillon par rapport à la pointe en suivant des lignes horizontales (x,y). Lorsque la pointe entre en contact avec la surface, le cantilever se déforme et le levier optique détecte la déflexion. La boucle de rétroaction commande alors au scanner un déplacement suivant z en conséquence. Les déplacements du scanner suivant x,y et z sont finalement utilisés par l'ordinateur pour créer une image en 3D.



FIG. 2.7 Schéma de fonctionnement de l'AFM

2.2.3 Le mode Tapping

Au commencement de cette thèse, nous avons tenté sans succès de visualiser des chaînes de PSS sur une bicouche lipidique en mode contact : les polymères étaient probablement entraînés par la pointe car ils n'apparaissaient pas sur nos images. Nous sommes donc passés au mode Tapping (Veeco TM). Comme dans d'autres modes vibrants, le cantilever est excité à sa fréquence de résonance par un bimorphe piézoélectrique. Le système pointe + cantilever fonctionne comme un oscillateur harmonique soumis à un champ de force et dont l'équation générale est :

$$z'' + 2\beta z' + \omega_o^2 z = \gamma \cos(\omega t) + f(D,t)$$

z est l'écartement de la pointe par rapport à la position d'équilibre ; $\omega_0 = (k/m)^{1/2}$ est la fréquence de résonance de l'oscillateur (*m* la masse effective de l'oscillateur); γ et ω sont l'amplitude et la fréquence de l'excitation ; β est un terme de dissipation (le facteur de qualité est $Q = \omega_0/(2\beta)$; f(D,t) est la force d'interaction pointe-surface ; *D* est la distance surface – pointe quand le cantilever n'est pas défléchi.

De plus, en mode Tapping la force est réglée de telle sorte que la pointe entre effectivement en contact avec la surface à chaque cycle d'oscillation (l'oscillateur est donc fortement non linéaire).

Si on considère en première approximation que les forces qui contribuent à la déflexion du levier sont essentiellement les forces de van der Waals et les forces coulombiennes, on peut modéliser l'interaction pointe-échantillon par le potentiel de Lennard-Jones :

$$U(r) = -4U_{\rm o}\left(\left(\frac{\sigma}{r}\right)^6 - \left(\frac{\sigma}{r}\right)^{12}\right)$$

r est la distance inter-atomique, σ est ici le diamètre moléculaire effectif et $U_0/4$ l'énergie potentielle minimale.

La figure 2.8 représente la région qui correspond au régime de contact intermittent.



FIG. 2.8 Position du régime de contact intermittent

La pointe est en contact avec la surface lorsque les nuages électroniques des atomes de la pointe et de la surface se rencontrent et se repoussent, empêchant aux deux matériaux de s'interpénétrer. Le reste du temps, la pointe évolue à une dizaine d'angströms de la surface. Les forces de van der Waals créent alors une faible attraction entre les atomes de la pointe et de l'échantillon.

La boucle de rétroaction permet de balayer la surface à amplitude constante (ce qui correspond à une force constante). Pendant ce temps, on peut suivre les variations de la phase : le retard des oscillations du levier par rapport à l'excitation. La phase caractérise la dissipation d'énergie de la pointe lorsqu'elle entre en contact avec la surface. On peut ainsi révéler des hétérogénéités de surface correspondant à des différences de propriétés viscoélastiques, d'adhésion ou de mouillage.

Le mode Tapping a initialement été développé pour s'affranchir des forces de tension superficielle exercées par la vapeur d'eau condensée sur une surface. En effet, dans ce mode la pointe transperce la couche d'eau en ne laissant pas le temps à des interactions de s'établir. Un autre avantage est une force d'interaction plus faible qu'en mode contact, ce qui permet de réduire la destruction des échantillons, en particulier ceux d'origine biologique. On peut aussi de ce fait utiliser des pointes plus fines que les pointes habituelles de contact. Enfin, le contact intermittent supprime les forces latérales qui s'exercent sur l'échantillon. On évite ainsi d'entraîner des molécules faiblement attachées sur la surface. Du côté des inconvénients, il faut noter qu'en solution, les forces hydrodynamiques qui s'exercent sur le levier entraînent une réduction du facteur de qualité de l'oscillateur, et donc une perte de sensibilité.

Pour imager des échantillons fragiles, tels que des polymères sur une surface (solide ou membrane), on réduit le plus possible la force d'interaction en choisissant une petite amplitude libre et un rapport : [amplitude de travail (« Setpoint ») / amplitude libre] proche de 1. C'est ce qu'on appelle le « light tapping ».

47

2.3 Préparation des échantillons pour l'AFM

Contrairement aux microscopes électroniques qui nécessitent le vide ainsi que la déposition d'une couche métallique sur l'échantillon, l'AFM demande peu de préparation. De plus, on n'est pas restreint aux échantillons conducteurs comme pour le microscope à effet tunnel, et on peut même imager des échantillons en solution. Il reste toutefois des contraintes. La profondeur de champ est limitée par le déplacement du tube du scanner, ainsi que par la taille de la pointe (la pointe ne peut pas accéder à des trous plus petits qu'elle). De ce fait, l'AFM est réservée à l'imagerie d'échantillons relativement plats. Par ailleurs, Les échantillons doivent être suffisamment solides pour résister au contact de la pointe.

Pour imager des polymères, on les dépose sur une surface plane (par exemple du mica). Pour cela, il existe plusieurs méthodes.

2.3.1 Séchage

Une méthode très répandue consiste à déposer une goutte de la solution de polymères sur la surface, attendre un certain temps pour que les polymères s'adsorbent, puis sécher l'échantillon sous un jet d'argon. On peut alors observer les polymères adsorbés par AFM à l'air. Cette méthode suppose que les molécules soient suffisamment bien adsorbées pour ne pas subir de modification à cause du séchage. Toutefois, si l'interaction était plus faible, les molécules risqueraient d'être emportées au moment du séchage et de former des agrégats. Il faut noter que la force capillaire exercée par le ménisque de la solution est suffisante pour étirer et briser des molécules qui ne sont pas complètement attachées à la surface. A part les polymères à étudier, le séchage peut par ailleurs entraîner la déposition sur la surface des ions présents dans la solution de départ. Ceci peut induire de légères modifications de la topographie de l'échantillon, voir affecter la conformation des chaînes. Pour finir, les molécules séchées sont figées sur la surface. Par conséquent, on ne peut évidemment pas étudier des changements de conformations ni l'influence d'un changement d'environnement (sel, pH etc.).

2.3.2 Spin Coating

Le Spin Coating est une technique largement utilisée dans l'industrie pour produire des films fins (0.2-2µm) et uniformes, la plupart du temps à base de polymères (Weill et al. 1988, Bornside et al. 1987). On l'utilise également dans certains cas pour observer des molécules individuelles. Ici, la surface et l'échantillon déposé, typiquement une goutte avec des polymères en solution, sont entraînés dans un mouvement de rotation. L'accélération subie projette tout d'abord une grosse partie du liquide en dehors de la surface. Puis, la force de frottement visqueux contrebalance l'accélération due à la rotation, ce qui permet à un film liquide très fin et uniforme de tourner avec le substrat. Alors, le film s'évapore graduellement. Les molécules déposées de cette manière sont réparties sur la surface de façon plus homogène que lors d'un séchage simple. Nous avons utilisé cette technique pour observer des molécules individuelles dans la partie 3.2.1.

2.3.3 Etude en solution

Le premier intérêt d'utiliser l'AFM en solution est de s'affranchir de la tension de surface exercée par le film d'eau qui se dépose spontanément à température ambiante. Audelà, l'intérêt est de pouvoir étudier la conformation de macromolécules, notamment d'origine biologique, dans leur environnement « naturel ». Par exemple, l'ADN ou les protéines dans des conditions de salinité et de pH physiologiques. De plus, il devient possible de suivre des phénomènes dans le temps : diffusion, reconformation, interactions intermoléculaires etc. On peut alors étudier l'influence d'un échange de solvant en temps réel.

Dans cette thèse, la majorité des expériences ont été conduites en solution. De cette façon, on se place directement dans les conditions réelles de l'adsorption de polymères à l'interface solide-liquide. A cette fin, nous utilisons une cellule liquide (Veeco Metrology Group) qui est scellée sur le substrat à l'aide d'un joint en silicone (voir figure 2.9).



FIG. 2.9 Schéma de la cellule liquide de l'AFM

Des tuyaux à l'intérieur de la cellule permettent d'effectuer les échanges de solvants. La surface du substrat en contact avec l'intérieur de la cellule liquide fait approximativement 1 cm^2 . Le volume de la cellule est ~ 100μ L.

2.4 Analyse des images

Les images d'AFM sont constituées d'une série de lignes (de coordonnée en y). Chacune correspond au déplacement de la pointe par rapport à l'échantillon selon la direction x tout en suivant le contour de la surface en z (voir figure 2.10a). Au final, on a donc une image en 3D de la topographie de la surface que l'on a l'habitude de visualiser en 2D (vue de haut) en utilisant un code colorimétrique pour la hauteur (z). Dans cette thèse, on utilise le code couleur suivant : pour une échelle en z adaptée, les zones basses de l'image sont représentées en noir, puis viennent le rouge foncé et le rouge clair et pour finir, les zones hautes sont en blanc (voir figure 2.10b).



FIG. 2.10 Exemple d'image d'AFM en représentation linéaire (a) et en vue de haut (b) (ADN sur une surface de PEMA)

Tout cela paraît simple à première vue, mais l'analyse et l'interprétation des images d'AFM présentent des difficultés que nous allons aborder.

2.4.1 Résolution latérale des images d'AFM

La résolution latérale des images d'AFM est d'abord déterminée par le pas du balayage, c'est-à-dire le rapport de la taille de la zone scannée (en μ m) sur le nombre de points (pixels) de l'image. Ici, chaque pixel correspond à la donnée d'une mesure de déflexion du cantilever. Sur l'AFM que nous utilisons, les images sont codées au maximum sur 512×512 pixels. Par conséquent pour augmenter la résolution d'une certaine partie de la surface, on doit diminuer la taille de la zone balayée.

La limitation de la résolution vient ensuite de la taille finie de la pointe qui convolue les objets scannés (voir l'exemple de la figure 2.11). L'extrémité de la pointe possède un certain rayon de courbure. Or, dans un cas extrême, les objets dont le rayon de courbure est très petit devant celui de la pointe apparaîtront comme une réplique de la pointe elle-même. A l'inverse, les creux dont le rayon de courbure est très petit seront pratiquement invisibles car la pointe ne pourra pas y pénétrer. Il existe beaucoup d'autres types d'effets que nous ne détaillerons pas ici. En fin de compte, les images d'AFM résultent d'une convolution entre les géométries de la pointe et de l'échantillon. C'est pour cette raison que beaucoup d'efforts ont été investis dans le développement d'algorithmes permettant d'extraire à partir des images les véritables géométries de la pointe et de l'échantillon. On peut citer par exemple une méthode générale basée sur la recherche sur l'image des pentes de plus grande intensité (Villarubia 1994).



FIG. 2.11 Exemple d'effet du rayon de courbure de la pointe

Cela dit, on pense que la pointe peut parfois présenter une certaine rugosité, avec à son bout un pic comportant un seul atome. Ceci expliquerait pourquoi on est capable d'atteindre une résolution atomique lorsqu'on balaye une surface très plane (surface cristalline). De la même manière, le balayage d'une couche dense de molécules permet d'accéder à des détails structurels invisibles autrement (Mou et al. 1995).

Une difficulté des expériences d'AFM est que la pointe tend à être contaminée et à perdre en résolution avec le temps. Ceci est particulièrement vrai dans le cas de l'étude d'échantillons biologiques. L'adsorption de molécules sur la pointe peut entraîner un grossissement du facteur d'aspect et donc une moins bonne résolution. Une autre conséquence possible est l'effet « pointe double » que l'on repère immédiatement à la présence de répliques qui accompagnent systématiquement les objets scannés. On parvient parfois à se débarrasser des contaminants par contact avec la surface ou par vibration (en mode Tapping).

2.4.2 Hauteur des images d'AFM

Sous réserve que l'échantillonnage du scanner soit choisi de manière adaptée (cf 2.2.2), la résolution verticale sur des échantillons relativement plats est typiquement inférieure à l'angström. Cependant, il apparaît que la hauteur des images n'est pas toujours strictement égale à la hauteur réelle des objets mesurés. C'est ce que montrent en effet plusieurs études réalisées en mode Tapping. Par exemple dans le cas d'ADN déposé sur une surface, le diamètre mesuré s'avère parfois inférieur (d'environ 1nm) à la valeur connue pour la forme B (Rivetti et al. 1996). Une telle différence est souvent attribuée à la déformation de l'échantillon, à une déshydratation ou encore à la déposition de sel sur la surface. Alors que de tels effets sont possibles, ils ne permettent pas d'expliquer les autres anomalies observées sur des échantillons inorganiques tels que des clusters de cuivre, d'or ou des nanoparticules de magnétite (Kuhle et al. 1997, Mahoney et al. 1994, Rasa et al. 2002). D'après Evenstein et al. (2002), la véritable cause des anomalies se trouve principalement dans l'influence de la fine couche d'eau déposée sur l'échantillon à température ambiante et qui exerce une force d'adhésion sur la pointe. On résoudrait donc le problème en se plaçant en environnement liquide.

Pourtant, même dans ce cas, il reste que la hauteur mesurée par l'AFM reflète aussi bien la topographie que le changement d'interaction entre la pointe et l'échantillon. De ce point de vue, il peut subsister, pour des objets qui interagissent avec la pointe différemment du reste de la surface, de légères différences entre les hauteurs apparentes et les hauteurs réelles.

2.4.3 Traitement et analyse d'image

Pour Analyser les images d'AFM, on effectue des traitements et des analyses qui nous permettent d'extraire des données quantitatives. Pour cela, on dispose en premier lieu des filtres et des fonctions du programme Nanoscope qui commande le microscope. Ici, toutes nos images d'AFM sont d'abord passées par le filtre Flatten. Ce dernier permet d'éliminer le bruit de basse fréquence ainsi que les effets de pente et de courbure (non linéarité du scanner). Pour cela, une interpolation polynomiale (d'ordre 0, 1, 2 ou 3) est calculée pour chaque ligne de scan de manière à effectuer un redressement. Dans certains cas, on peut sélectionner des régions de l'image (dans des boîtes carrées) à ne pas prendre en compte dans l'interpolation. L'outil Section permet de sélectionner des vues en coupe sur l'image. Nous l'utilisons pour mesurer des hauteurs. Pour cela, on coupe de préférence l'image horizontalement de façon à suivre une seule ligne de scan, comme sur la figure 2.12.



FIG. 2.12 Exemple de section d'image d'AFM (ADN sur surface de PEMA) Il faut remarquer qu'on utilise généralement une échelle en z bien plus fine que pour x de manière à faire ressortir le relief.

L'outil d'analyse de densité spectrale permet d'évaluer la prédominance de certaines longueurs d'ondes sur une image. On peut l'utiliser pour déterminer l'espacement moyen entre des objets sur la surface. Pour cela, il est nécessaire d'appliquer au préalable un filtre passe-bas suivit d'un passe-haut, de manière à supprimer les longueurs d'ondes qui ne reflètent pas la topographie de la surface. Dans un même ordre d'idée, on peut utiliser l'outil Spectre 2D pour obtenir le spectre de diffraction d'une image. Ce dernier nous renseigne également sur la présence d'une structure ordonnée ou orientée.

Enfin, l'outil de mesure de distances fonctionne selon le principe d'une règle que l'on reporte sur l'image. De cette manière, on peut par exemple mesurer la longueur de contour d'un objet

précis. Toutefois, lorsque nous voulons faire des mesures sur un grand nombre d'objets, on utilise un autre programme de traitement d'image : Visilog.

Ce programme permet notamment d'avoir recours aux fonctions de la morphologie mathématique (Haralick et al. 1987, Serra 1983). Le principe de ce type de traitement repose sur l'utilisation d'opérateurs (intersection, union etc.) pour simplifier une image tout en préservant sa structure géométrique. On peut par suite identifier sur l'image différents objets et faire pour chacun d'entre eux une analyse de sa géométrie. Il est ensuite possible de calculer automatiquement divers paramètres : longueur, superficie, centre de gravité, second moment d'inertie etc. Il faut noter que toutes les valeurs calculées ici correspondent à l'espace discret (i.e. constitué de pixels) que constitue une image bitmap. Pour obtenir des quantités physiques, telles que des longueurs en nanomètres, il suffit de définir la largeur du pixel (laquelle dépend de la taille de scan). Plus de détails sur les traitements que nous effectuons avec Visilog sont présentés dans l'annexe.

2.5 Microbalance à Cristal de Quartz

Nous avons utilisé la Microbalance à Cristal de Quartz (QCM) pour étudier l'adsorption des polymères sur la bicouche lipidique (cf 4.3.1). La QCM a été développée il y a une dizaine d'années par la société Q-Sense AB (Göteborg, Suède). Le principe est de détecter l'adsorption de matière depuis la solution contenue dans la cellule de la balance sur une surface de SiO₂ qui recouvre un cristal de quartz (voir figure 2.13). L'adsorption de masse se traduit par un décalage de la fréquence de résonance du cristal. On peut ainsi suivre l'évolution de l'adsorption sur tout l'échantillon en fonction du temps avec une précision de l'ordre du ng/cm² et une résolution temporelle de l'ordre de la seconde. Le cristal est excité à la fréquence de résonance fondamentale de 5 MHz et on suit en parallèle les variations de fréquence du fondamental et des 3^{ème}, 5^{ème} et 7^{ème} harmoniques.



FIG. 2.13 Schéma du principe de la QCM

En particulier, pour une couche adsorbée fine, rigide et homogène, la relation de Sauerbrey (1959) donne une bonne approximation de la masse adsorbée :

$$\Delta f = -2 \frac{f^2}{\rho_{\rm q} v_{\rm q}} \Delta m$$

Ici, *f* est la fréquence de résonance, ρ_q la densité spécifique du quartz, v_q la vitesse de cisaillement du quartz et *m* la masse adsorbée sur le cristal.

Cependant, pour une couche plus molle et plus épaisse, il y a apparition d'un couplage mécanique entre l'oscillation du cristal et le solvant, et la relation n'est plus valide.

La surface plane du mica est un substrat couramment utilisé pour visualiser des molécules uniques par AFM. Nous commençons par introduire les propriétés de la surface ainsi que différents traitements permettant de les modifier. En effet, le comportement des molécules adsorbées en dépend de façon cruciale.

3.1 Introduction : les propriétés du mica

3.1.1 Structure du mica

Le terme « mica » désigne une famille de minéraux complexes de silicates d'alumine hydratés qui possèdent un clivage parfait. La raison de leur utilisation fréquente pour les expériences d'AFM est la facilité avec laquelle on peut séparer les cristaux en feuillets atomiquement plans et propres. Parfois, la surface qui en résulte présente une succession de marches qui peuvent être plus ou moins espacées selon l'angle de clivage (voir figure 3.1).



FIG. 3.1 Représentation en coupe des marches du mica

Les bords des marches sont aisément identifiables à l'AFM de par leur forme caractéristique sur une section d'image. Ils s'étendent largement au-delà des zones de quelques micromètres que l'on balaye avec le microscope. Pour les expériences, on essaie la plupart du temps de se placer sur des zones où il n'y a pas de bords de marches visibles. De cette façon, la surface reste tout à fait plane pour le balayage et la sensibilité est accrue. Toutefois, il arrive parfois d'observer les molécules déposées qui sont agrégées à proximité des bords de marches. Les feuillets de mica sont liés électrostatiquement par des ions potassium. Dans l'eau à pH neutre, ces ions se dissolvent en libérant des oxygènes chargés négativement au niveau des cavités hexagonales (voir figure 3.2). Par suite, la surface acquiert une charge estimée à : -0.0025 C/m², ce qui correspond à 0.014 charges par nm² (Pashley 1981).





a)Vue en coupe ; b) vue de la surface sur laquelle on distingue les cavités hexagonales (Chuan-Jian Zhong).

3.1.2 Déposition spontanée d'un film d'eau

La surface du mica est très hydrophile, ce qui a pour conséquence la formation d'une fine monocouche d'eau (0.33nm d'épaisseur) à température ambiante (Miranda et al. 1998, Spagnoli et al. 2002). Ce film peut se former spontanément sur une surface fraîchement clivée après quelques heures ou bien persister suite au séchage d'une solution. Les analyses effectuées par spectroscopie vibrationnelle SFG (Miranda et al. 1998) indiquent que les molécules d'eau sont ordonnées comme dans une fine couche de glace en épitaxie avec la surface. Parfois, il se forme également des multicouches.

La présence du film d'eau joue un rôle non négligeable quand on étudie par AFM (à l'air) la morphologie de chaînes polymères individuelles déposées sur le mica. En effet, le diamètre des molécules est souvent de l'ordre de l'angström, si bien qu'elles peuvent se retrouver au moins partiellement immergées à l'intérieur de la couche d'eau. Cowman et al. (2005)

observent que des polysaccharides déposés sur un mica fraîchement clivé semblent agir comme des défauts favorisant la condensation du film.

A l'inverse, Spagnoli et al. (2002) observent que lorsque les mêmes molécules sont déposées sur un mica pré-hydraté, elles s'adsorbent de préférence par-dessus des parties déjà recouvertes par le film d'eau en évitant les zones où la couche ne s'est pas formée. De plus, la conformation de la chaîne est alors plus étendue que sur le mica sec.

Au cours des expériences d'AFM que nous avons réalisées à l'air libre, il nous est arrivé d'observer sur le mica des îlots d'épaisseur très fine (~ 0.35nm) après qu'une solution de polymères ait été séchée (voir figure 3.3). La morphologie de cette couche est similaire au film d'eau observé également par AFM par Spagnoli et al.



FIG. 3.3 Image d'AFM montrant l'existence d'une fine couche à la surface du mica suite au séchage d'une solution de polymères (air)

La couche, qui est relativement lisse (voir flèches), a une épaisseur ne dépassant pas 0.37nm (voir la section à droite de l'image), ce qui semble indiquer qu'il s'agit d'une monocouche d'eau.

3.1.3 Traitements pour l'adsorption de chaînes polymères sur la surface

Le polymère le plus étudié par AFM sur le mica, et qui fait pour nous office de référence, est l'ADN. En solution, ce dernier ne s'adsorbe pas sur le mica car le polyélectrolyte et la surface, qui sont de même signe, se repoussent. Par conséquent, pour rendre l'adsorption favorable, plusieurs traitements ont été envisagés. Le premier est la fonctionnalisation de la surface par des groupes silanes (Lyubchenko et al. 1992). Un tel traitement peut cependant conduire à une légère rugosité de la surface et donc à une perte de résolution pour l'imagerie des molécules déposées. Une autre méthode, plus répandue, consiste à introduire dans la solution des molécules chargées positivement et multivalentes. Celles-ci peuvent être des cations divalents, tel Mg²⁺ (Bezanilla et al. 1994), ou encore d'autres molécules avec une valence plus élevée, comme la spermidine³⁺ (Tanigawa et al. 1997). Le principe est toujours le même : permettre à des ponts électrostatiques de se former entre l'ADN et la surface.

Les observations par AFM d'ADN déposé sur le mica en présence de cations divalents (Mg^{2+}) montrent que les molécules s'adsorbent irréversiblement à mesure qu'elles diffusent vers la surface (Rivetti et al. 1996). En effet, sur des images successives, le nombre de molécules sur la surface croît comme la racine carrée du temps de déposition. On peut alors calculer le coefficient de diffusion de l'ADN : la valeur obtenue correspond à la valeur semi théorique attendue (Crothers et al. 1965).

Les propriétés de l'ADN adsorbé dépendent également du type de cation mis en solution. Par exemple, une étude systématique du rayon des cations employés (Hansma et al. 1996) montre que l'ADN s'adsorbe plus fortement sur la surface en présence de « petits » cations, tels que ceux des métaux de transition. En effet, lorsque le rayon augmente, l'adsorption devient de plus en plus faible comme l'atteste l'observation de la diffusion de l'ADN sur la surface (dans les expériences d'AFM en milieu liquide). Parallèlement, des observations par AFM de la structure du mica traité par des différentes cations (Nishimura et al. 1994) indiquent que les cations : Mg²⁺ et Li⁺ se fixent sur la surface au niveau des cavités hexagonales alors que le cation K⁺, dont le rayon est plus important, ne se fixe pas. Mis ensembles, les résultats de ces expériences concordent à dire que l'intensité de l'interaction entre l'ADN et la surface dépend de la capacité des cations à pouvoir se fixer efficacement au niveau des cavités hexagonales.

3.2. Adsorption des chaînes de PSS sur le mica

Avant de choisir comme pour l'ADN un traitement pour l'adsorption des chaînes de PSS (qui sont de même signe que la surface du mica) nous effectuons un test préliminaire où le polymère dilué dans l'eau (sans sel) est directement déposé sur la surface. L'échantillon est ensuite séché par Spin Coating avant d'être observé par AFM.

3.2.1 Déposition par Spin Coating

Pour pouvoir observer des molécules individuelles déposées sur la surface par Spin Coating, il faut employer une dilution suffisamment élevée (typiquement 10^{-5} - 10^{-6} molaire). Mais même dans ce cas, on observe souvent par AFM une répartition relativement inhomogène : des zones où les chaînes sont visiblement enchevêtrées coexistent avec des zones où les chaînes sont séparées. Les images que nous présentons ont été réalisées aux endroits de la surface où des molécules individuelles séparées sont identifiables sans ambiguïté sur le mica nu.

Nous avons tenté d'observer les chaînes linéaires et à topologie cyclique pour différentes fractions de charge. Cependant, les résultats obtenus varient d'une expérience à l'autre. Dans certains cas, les chaînes ont une apparence globuleuse. Ainsi, sur les chaînes linéaires :

f = 0.67 de la figure 3.5a, on observe des « blobs » de taille assez importante (h ~ 2nm) et qui semblent régulièrement espacés le long des chaînes. Sur la figure 3.5b, on distingue la topologie des chaînes en anneaux : f = 1, mais là encore, il semble y avoir des blobs le long de la chaîne.



FIG. 3.5 Images AFM de chaînes déposées par Spin Coating (air) -1 Ici, les chaînes linéaires : f = 0.67 (a) et les anneaux : f = 1 (b) présentent des blobs le long du squelette (h~2nm).

Dans d'autres expériences, on observe que les chaînes sont condensées en globules indépendamment de leurs taux de charge. C'est le cas par exemple des chaînes linéaires : f = 0.92 comme des anneaux : f = 0.4 de la figure 3.6.



FIG. 3.6 Images AFM de chaînes déposées par Spin Coating (air) -2 Les chaînes linéaires : f = 0.92 et les anneaux : f = 0.4 sont dans ces expériences condensés en globules (h~3nm).

L'interaction répulsive avec la surface pourrait expliquer pourquoi les chaînes ne s'étalent pas et restent condensées en globules, même quand le taux de charge de la chaîne est élevé (le polymère est donc normalement solubilisé). La présence de blobs le long des chaînes peut avoir la même origine et n'est sans doute pas à mettre en rapport avec la structure en collier de perles. En effet, on observe des blobs sur les anneaux chargés à 100% qui ne présentent en principe pas de perles.

Outre l'interaction défavorable avec la surface, les conformations que nous observons peuvent aussi être provoquées par d'autres facteurs : le séchage, la présence d'un film d'eau condensée sur la surface ou la présence de contreions déposés sur la surface.

Ainsi, il apparaît que la conformation des chaînes déposées par Spin Coating résulte du processus de déposition et ne reflète pas la conformation réelle des chaînes adsorbées sur la surface. Pour cette raison, nous effectuons dans la suite toutes nos observations directement en solution.

3.2.2 Etude en solution : adsorption des chaînes de PSS en présence de cations divalents (MgCl₂)

Dans cette partie, toutes les observations sont faites directement en solution à l'aide de la cellule liquide de l'AFM. On s'intéresse uniquement aux chaînes de PSS fortement chargées : les linéaires : f = 0.92 et les anneaux : f = 1. La concentration en polymères est de l'ordre de 10^{-6} molaire dans le but d'observer des molécules individuelles sur la surface. Lorsqu'on dépose une solution de chaînes linéaires sans sel sur le mica, on observe des globules adsorbés sur la surface (voir figure 3.7).



FIG. 3.7 Image AFM de chaînes linéaires : f = 0.92 en l'absence de sel (liquide)

On distingue essentiellement des globules dont la hauteur est environ 4nm.

En revanche, si nous réitérons l'expérience en ajoutant à la solution une faible quantité de MgCl₂ (2mM), on observe cette fois des chaînes individuelles étendues à plat sur la surface, ainsi que quelques globules comme le montre la figure 3.8.



FIG. 3.8 Image AFM de chaînes linéaires : f = 0.92 en présence de 2mM de MgCl₂ (liquide)

La plupart des chaînes sont étendues à plat sur la surface. On note aussi quelques globules (voir flèches) ainsi que des chaînes dont apparemment une partie est en globule, l'autre étendue.

Les chaînes étendues ont une hauteur pratiquement constante : $0.6 \pm - 0.15$ nm (voir figure 3.9), une valeur comparable à la distance entre le squelette et les groupes sulfonates du PSS (0.72nm). De plus, l'épaisseur latérale de la chaîne fait environ 10nm, ce qui correspond à l'effet de convolution par la pointe de l'AFM (cf 2.4.1). Ainsi, nous sommes en présence de chaînes tendues et pratiquement à plat sur la surface et non de blobs électrostatiques. Ceci étant, nous voyons que les chaînes linéaires : f = 0.92 présentent une polydispersité assez importante. Ceci s'explique soit par une destruction due à l'étape de sulfonation, soit par un phénomène de vieillissement (cf 2.1.1). La polydispersité sera mesurée sur la bicouche lipidique (cf partie 4).

Les globules ont une hauteur de 4nm +/- 1nm. On distingue également des globules plus petits connectés à des morceaux de chaîne étendue comme sur la figure 3.10.



FIG. 3.9 Image AFM d'une chaîne linéaire : f = 0.92 étendue sur la surface en présence de 2mM de MgCl₂ (liquide)

La chaîne est relativement aplatie sur la surface. Sur la vue en coupe de droite, on peut mesurer la hauteur de la chaîne : 0.73nm. Sur cette chaîne on remarque aussi deux endroits légèrement plus hauts qui apparaissent en clair (voir flèches).





(Chaînes linéaires : f = 0.92 en présence de 2mM de MgCl₂ en liquide) Vu la disposition des différentes parties de cet objet en forme d'escargot, on peut penser qu'il s'agit d'une seule et même chaîne. La hauteur du globule est mesurée sur la section de droite.

Il est important de souligner que les globules ne sont pas présents pour toutes les expériences (bien que les conditions soient les mêmes). Ainsi, la figure 3.11 montre un exemple d'une expérience où toutes les chaînes paraissent étendues. Pour cette raison, nous pensons que les globules ne résultent pas de chaînes peu sulfonées et condensées par l'attraction hydrophobe (lesquelles devraient être systématiquement visibles) mais plutôt d'une conformation non étendue sur la surface, avec des boucles ou des queues qui pendent en solution. La compression exercée par la pointe de l'AFM sur ces objets peut expliquer la hauteur relativement petite des globules. Quant à la raison de l'étalement incomplet des chaînes, il peut provenir d'un manque ou d'une mauvaise répartition des pontages électrostatiques pour attacher les molécules à la surface. Une autre explication pour les globules serait un phénomène de condensation des chaînes provoquée par les cations divalents, mais nous verrons dans le chapitre suivant (sur la bicouche lipidique) qu'on observe des globules même en l'absence de ces cations dans la solution.



FIG. 3.11 Image AFM de chaînes linéaires : f = 0.92 en présence de 2mM de MgCl₂ (liquide) : absence de globules

Lors de cette expérience, toutes les chaînes paraissent relativement étendues sur la surface. Ceci suggère que les globules ne sont pas dus à des chaînes faiblement sulfonées.

Les expériences sur les chaînes linéaires peuvent être reproduites pour les chaînes à topologie cyclique avec des résultats très semblables. Ainsi, sur la figure 3.12, on observe des anneaux étendus sur la surface. On note également la présence de chaînes linéaires (environ 30% des molécules). Les chaînes linéaires de longueur similaire aux anneaux peuvent s'expliquer par la neutralisation de certains précurseurs avant l'étape de cyclisation (cf 2.1.1). Mais il semble également y avoir des chaînes linéaires relativement courtes. Dans ce cas, la cause doit provenir d'une destruction ou du vieillissement comme pour les chaînes linéaires : f = 0.92.



FIG. 3.12 Image AFM de chaînes en anneaux : f = 1 en présence de 2mM de MgCl₂ (liquide)

La plupart des chaînes sont étendues à plat sur la surface. On distingue également un petit nombre de globules et de chaînes partiellement en globules (voir flèches). Parmi les chaînes à plat, on note la présence de quelques chaînes linéaires dont certaines sont très courtes.

Une image d'un anneau unique ainsi qu'une vue en coupe sont représentées sur la figure 3.13.



FIG. 3.13 Image AFM d'un anneau : f = 1 étendu sur la surface en présence de 2mM de MgCl₂ (liquide)

Sur la vue en coupe de droite, on peut mesurer la hauteur de la chaîne : 0.5nm.

Par ailleurs, on observe une fois encore des globules et des chaînes dont apparemment une partie est un globule (voir la figure 3.14).



FIG. 3.14 Image AFM d'un anneau : f = 1 relié à un globule

Sur la vue en coupe de droite, on peut mesurer la hauteur du globule : 3.2nm.

Quand on augmente la concentration de polymères (de 10⁻⁶ M à 10⁻⁵ M), le nombre de chaînes sur la surface augmente. Alors que des globules sont toujours visibles, les chaînes aplaties tendent à former une monocouche relativement dense (voir figure 3.16). Si on regarde attentivement, on remarque que les chaînes évitent toujours de se superposer. Leur conformation semble néanmoins plus compacte, sans doute en raison de l'encombrement occasionné. Enfin, on ne décèle aucune organisation (alignement, orientation) au sein de la couche.



FIG. 3.16 Image AFM de chaînes en anneaux : f = 1 et de chaînes linéaires : f = 0.92 pour deux concentrations différentes en présence de 2mM de MgCl₂ (liquide) De gauche à droite, la concentration C passe de 10⁻⁶ M à 10⁻⁵ M. Cependant, aucune organisation n'est décelable.

3.2.3 Structure des chaînes de PSS en fonction de leur taux de charge

Pour étudier la structure des chaînes individuelles de PSS à différents taux de charge, on procède de la même manière que dans la partie précédente : 2mM de MgCl₂ sont ajoutés à la solution des polymères choisis (à la concentration ~ 10^{-6} M) avant de la déposer sur le mica. Les observations sont alors menées directement en liquide.

Pour les chaînes à faible taux de charge (linéaires : f = 0.32 et anneaux : f = 0.4), on observe exclusivement des globules sur la surface (voir figure 3.17).



FIG. 3.17 Image AFM de chaînes linéaires : f = 0.32 en présence de 2mM de MgCl₂ (liquide)

On observe uniquement des globules sur la surface.

L'apparence des globules et leur taille est indépendante de la concentration. Une image d'un globule accompagné d'une vue en coupe et d'un histogramme des hauteurs sont représentés sur la figure 3.18. La hauteur moyenne du globule est environ 3.2 +/- 1 nm. Ainsi, nous sommes vraisemblablement en présence de chaînes individuelles condensées en globules

sphériques par la force hydrophobe car la répulsion électrostatique est insuffisante pour étendre les chaînes. Ce résultat est en accord avec les expériences de diffusion de neutrons et de rayons X sur les anneaux : f = 0.4 (Spiteri et al. 1997, Combet et al.). Le facteur de forme obtenu est en effet compatible avec celui d'une sphère. Toutefois, la hauteur des globules sur la surface est légèrement inférieure (de 1.6nm) au diamètre déduit du facteur de forme (4.8nm). Une explication possible de cette divergence est une légère compression exercée par la pointe de l'AFM. Une autre explication est l'existence d'un faible étalement des globules sur la surface, comme le suggèrent Borisov et al. (2001) dans le cas d'une surface chargée. Cependant, il est difficile de mesurer un petit étalement par AFM en raison de l'effet de convolution par la pointe qui élargit considérablement les globules (entre 20 et 30nm, voir la section de la figure 3.18). De plus, on aurait besoin de connaître le rayon exact de la pointe.



FIG. 3.18 Image AFM et section d'une chaîne chaîne linéaire : f = 0.32 en présence de 2mM de MgCl₂ (liquide)

A droite de l'image est représentée une section du globule. De cette manière, on mesure la hauteur de 100 globules (voir histogramme).
Nous pouvons profiter de la géométrie relativement sphérique des globules pour calculer la fonction de distribution radiale de ces objets sur la surface. Pour cela, on utilise tout d'abord le programme Visilog pour retenir de l'image bitmap uniquement les régions (2D) qui correspondent aux globules. Ceci peut être effectué par exemple à l'aide d'une fonction de seuillage. Puis, on calcule les centres de gravité à 2D de ces régions-globules à l'aide de la fonction Centroid (voir annexe). Ensuite, un programme développé par F. Schosseler nous permet de calculer directement la fonction g(r) à partir des coordonnées des centres de gravités. Le résultat est représenté sur la figure 3.19 pour la concentration 10^{-6} M.



FIG. 3.19 Distribution radiale des chaînes linéaires : f = 0.32



Le calcul est effectué sur environ 2500 globules. La distribution ne présente pas de pic d'intensité au-delà de la valeur 1, ce qui indique qu'il n'y a pas de corrélations entre les positions des chaînes sur la surface. Ce résultat est en accord avec les observations de Rivetti et al. (1996) sur les chaînes d'ADN dans les mêmes conditions expérimentales (ie. en présence de $MgCl_2$) : la cinétique d'adsorption est compatible avec une adsorption au hasard par diffusion vers la surface.

Augmentons maintenant le taux de charge des chaînes. Les chaînes linéaires : f = 0.67apparaissent cette fois étendues à plat sur la surface et on observe également quelques globules (voir figure 3.20). Le résultat est très semblable aux chaînes linéaires : f = 0.92 vues dans la partie précédente. Ainsi, il apparaît que nous sommes passés directement à une situation où la répulsion électrostatique est suffisante pour étendre complètement les chaînes (on n'observe pas de collier de perles).



FIG. 3.20 Image AFM de chaînes linéaires : *f* = 0.67 en présence de 2mM de MgCl₂ (liquide)

On observe un comportement semblable au cas des chaînes plus chargées : f = 0.92.

En revanche, les chaînes en anneaux : f = 0.6 montrent un aspect différent. On observe en effet fréquemment des globules très petits (hauteur ~1nm), de 1 à 3 par anneau, le long des chaînes (voir figure 3.21). La présence des globules induit visiblement une réduction de la longueur des anneaux, c'est pourquoi on les distingue moins bien que les anneaux : f = 1 qui sont bien étendus sur la surface (cf partie précédente). Ainsi, la figure 3.22 montre une comparaison entre la taille des anneaux : f = 0.6 et des anneaux : f = 1 (l'échelle est la même).

3 Conformation des chaînes de PSS sur le mica



FIG. 3.21 Image AFM de chaînes en anneaux : *f* = 0.6 en présence de 2mM de MgCl₂ (liquide)

Les chaînes présentent ici des globules très petits, de 1 à 3 par anneau (voir flèches).



FIG. 3.22 Images AFM d'un anneau : f = 0.6 (a) et d'un anneau : f = 1 (b) en présence de 2mM de MgCl₂ (liquide)

Les anneaux : f = 0.6 sont en général moins étendus que les anneaux : f = 1.

La figure 3.23 montre un anneau : f = 0.6 sur lequel figurent 3 petits globules. Une section de globule est représentée à droite de l'image. La taille latérale, environ 10nm, reflète l'effet de convolution d'un objet relativement petit devant la pointe de l'AFM.



FIG. 3.23 Image AFM et section d'un anneau : f = 0.6 en présence de 2mM de MgCl₂ (liquide)

On observe sur cet anneau trois petits globules. La section à droite de l'image permet de mesurer leur hauteur et leur largeur.

A l'aide de l'outil de mesure de longueur du programme Nanoscope, on peut mesurer la longueur des anneaux : f = 0.6 pour la comparer à celle des anneaux : f = 1. Comme on ne considère ici que des molécules de forme cyclique qui n'ont pas subi de destruction, la vrai longueur des chaînes devrait correspondre à la masse moléculaire des précurseurs. Les statistiques obtenues sont représentées sur la figure 3.24.



FIG. 3.24 Histogrammes de la longueur des anneaux : f = 0.6 (a) et des anneaux : f = 1 (b)

La longueur moyenne des anneaux : f = 0.6 (42 chaînes) est plus petite de 53nm de celle des anneaux : f = 1 (100 chaînes).

On constate que la longueur des anneaux : f = 0.6 avec leurs globules est plus courte de $\delta = 53$ nm de celle des anneaux : f = 1 (177nm), laquelle est par ailleurs compatible avec la longueur déterminée à partir de la masse moléculaire des précurseurs (160nm). Ainsi, alors que les anneaux fortement chargés sont tout à fait tendus sur la surface, les anneaux : f = 0.6 sont réduits du fait du nombre de monomères investis au niveau des petits globules. En supposant qu'il y a deux globules par molécules, chacun doit contenir :

$$N_{globule} = \delta / (2b) = 106$$
 monomères

(on rappelle que b est la taille du monomère).

Si on suppose de plus que les globules correspondent à des zones où la chaîne est condensée par l'attraction hydrophobe, on peut calculer approximativement le rayon des globules $R_{globule}$ correspondant :

$$\frac{4}{3} \pi R_{\text{globule}}^{3} = \frac{4}{3} \pi b^{3} \times N_{\text{globule}} \times \alpha$$

(α est un paramètre sans dimension compris entre 0 et 1 qui quantifie la qualité du solvant. Comme le polystyrène est très hydrophobe, on a α ~1). D'où :

$$R_{\text{globule}} \sim N_{globule}^{1/3} b \sim 1.2 \text{nm}.$$

Ce résultat est cohérent avec la hauteur que nous mesurons pour les globules (1nm).

Ainsi, la dimension des petits globules et la réduction de longueur qu'ils induisent sont compatibles avec le modèle de sphères condensées par l'attraction hydrophobe. On pourrait néanmoins émettre l'hypothèse que les petits globules résultent en fait de morceaux de chaînes qui forment des petites boucles au-dessus de la surface. Cependant, la fréquence et la petite taille des globules semble les rendre assez différents des quelques globules plus gros observés pour les taux de charge plus élevés (les chaînes linéaires : f = 0.67, f = 0.92 et les anneaux : f = 1), lesquels correspondent mieux à des morceaux de chaînes non adsorbés. De plus, l'explication des petites boucles ne nous dit pas pourquoi on observe des petits globules uniquement sur les anneaux chargés à 60%.

Par ailleurs, les expériences de diffusion de neutrons et de rayons X sur les anneaux : f = 0.6en volume (Combet et al.) montrent que le facteur de forme, qui est différent de celui des anneaux : f = 1, peut s'interpréter si on considère l'existence de zones condensées sur la chaîne. Bien que la hauteur des petits globules sur la surface soit inférieure (d'environ 2nm) au diamètre prévu par l'analyse du facteur de forme (3.2nm), on est conduit à penser que les structures observées par AFM existent déjà sur les chaînes en solution.

Dans ce cas, les petits globules peuvent être la signature du collier de perle hydrophobe, mais il reste encore la possibilité de la présence de blocs non sulfonés qui se condensent sur les chaînes (dans le cas d'une sulfonation hétérogène). La différence entre ces deux structures est que le collier de perles prévu par la théorie fluctue considérablement contrairement aux blocs non sulfonés qui doivent probablement rester au même endroit sur la chaîne. Dans nos expériences, les chaînes et les globules sont relativement immobiles sur la surface, ce qui peut résulter d'un phénomène de piégeage lors de l'adsorption. Par conséquent, on ne peut pas, à ce stade, conclure en faveur du collier de perle ou des blocs hydrophobes.

3.4 Fibres de PSS sur le mica

Pendant que nous observions les chaînes linéaires : f = 0.32 (à la concentration C~10⁻⁷ M) et f = 0.92 (à la concentration C~10⁻⁶ M) sur le mica en présence de MgCl₂, nous avons à plusieurs reprises pu observer parmi les chaînes de longues structures linéaires (voir la figure 3.25).



FIG. 3.25 Images AFM de chaînes linéaires : f = 0.32 en présence de 2mM de MgCl₂ (liquide) : présence de longues structures linéaires sur la surface

On peut trouver ces objets à plusieurs endroits sur la surface. Leur hauteur est relativement constante : 1.1 +/- 0.1 nm (voir figure 3.26). Leur longueur est assez variable, de quelques centaines de nanomètres à plusieurs micromètres. Enfin, les structures ne sont pas strictement linéaires mais comportent à certains endroits des embranchements. Cela est particulièrement visible sur la figure 3.27 où les lignes semblent converger en certains points. On ajoute que nous n'avons jamais observé ces structures pendant les expériences sur la bicouche lipidique (cf partie 4) en l'absence d'ions divalents.

3 Conformation des chaînes de PSS sur le mica



FIG. 3.26 Section d'image d'une structure linéaire



FIG. 3.27 Images AFM de chaînes linéaires : f = 0.32 en présence de 2mM de MgCl₂ (liquide) : structures linéaires convergentes

Comment expliquer l'apparition de ces structures ? Nous proposons une explication : les structures observées peuvent résulter d'un phénomène de condensation des chaînes par les ions divalents à proximité de la surface. Nous avons mentionné dans la partie 1.1 que les chaînes de PSS tendent à avoir une condensation des contreions importante en raison de l'hydrophobicité de la chaîne principale. Par ailleurs, la mobilité des contreions et des chaînes peut être limitée au voisinage de la surface. Ces deux facteurs pourraient amplifier l'intensité des interactions attractives entre les chaînes et conduire à un processus d'association tel que décrit dans la partie 1.4. Il faudra à l'avenir vérifier si ces structures ne se forment pas directement dans le volume mais toutes les expériences sur la condensation par des ions multivalents tendent à montrer qu'il n'y a de transition en volume que lorsque la valence z des ions est strictement supérieure à 2.

3.5 Résumé des principaux résultats

Nous avons étudié l'adsorption du PSS (linéaire et cyclique) sur le mica par AFM en solution. En présence d'ions divalents Mg^{2+} , la plupart des chaînes s'étalent à plat sur la surface. On accède alors à leur conformation en 2 dimensions. On note que, lorsqu'on augmente la concentration, on n'observe aucune organisation des couches de polymères adsorbés.

Nous avons ensuite étudié comment la structure des chaînes de PSS varie en fonction de leur taux de charge. Les chaînes faiblement chargées (f = 0.32, f = 0.4) sont condensées en globules par l'attraction hydrophobe. Les chaînes fortement chargées (f = 0.92, f = 1) sont au contraire étendues, et le résultat est le même pour le taux de charge plus faible : f = 0.67. Pour les anneaux chargés à 60% cependant, les chaînes comportent des petits globules d'environ 1 nanomètre de hauteur. La longueur de l'anneau s'en trouve réduite d'une cinquantaine de nanomètres. Par ailleurs, la présence de ces globules concorde avec l'analyse des facteurs de forme des expériences de diffusion aux rayons X (Combet et al.) et aux neutrons (Spiteri et al.), ce qui suggère que les globules reflètent une structure qui existe dans le volume. A ce stade, on ne peut cependant pas affirmer que cette structure est bien le collier de perles prévu par la théorie car il reste la possibilité que les globules résultent de blocs non sulfonés sur les chaînes qui se condensent par attraction hydrophobe.

Enfin, nous avons observé lors de ces expériences des fibres de taille micrométrique qui peuvent résulter d'un phénomène de condensation des chaînes de PSS par les ions divalents.

La membrane lipidique compose l'enveloppe externe des cellules, ainsi que la parois des organelles internes (chez les eucaryotes). La formation de membranes supportées fournit un moyen d'étudier les propriétés de tels systèmes. Lorsque la membrane comporte des lipides chargés positivement, elle constitue un substrat particulièrement intéressant pour étudier l'adsorption de molécules chargées, tels les polyélectrolytes.

4.1 Propriétés des bicouches lipidiques

4.1.1 La membrane lipidique

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles aiment et n'aiment pas l'eau : la « tête » de la molécule est hydrophile (polaire) tandis que la « queue », qui est constituée de deux chaînes aliphatiques (des chaînes de carbones avec des hydrogènes), est hydrophobe. Pour satisfaire ce caractère particulier, ces molécules se regroupent en diverses structures une fois en solution : vésicules, cylindres, bicouches lipidiques, etc. Les caractéristiques géométriques des lipides déterminent la structure finale. Ainsi par exemple, la présence de deux chaînes carbonées tend à favoriser la formation de bicouches.

Ces dernières sont comparables à de très fines membranes dont chaque côté est un fluide de lipides à 2 dimensions (voir figure 4.1). A cause des interactions hydrophobes, la structure reste stable par rapport à la dissolution des lipides dans l'eau environnante. De plus, la membrane possède une élasticité qui lui permet de se courber en réponse au mouvement brownien.



FIG. 4.1 Organisation des phospholipides dans une bicouche

Les propriétés des bicouches lipidiques dépendent en premier lieu de leur température de transition de phase gel-fluide : $T_{\rm m}$. Lorsque la bicouche résulte de l'assemblage d'un seul type de phospholipide, la température de transition dépend de la structure de la molécule : longueur des chaînes carbonées, nombre d'insaturations, type de la tête lipidique. En phase fluide (audessus de $T_{\rm m}$), les lipides sont libres de se déplacer au sein d'un liquide bidimensionnel. Leurs chaînes carbonées peuvent flucture et se courber à l'intérieur de la membrane. En phase gel en revanche (en dessous de $T_{\rm m}$), la diffusion est ralentie environ d'un facteur 100 (Lecuyer, 2006) et les chaînes carbonées sont relativement rigides et droites (voir figure 4.2).



FIG. 4.2 Phospholipides dans des bicouches lipidiques en phase fluide et en phase gel

La bicouche phospholipidique est le principal ingrédient des membranes cellulaires (voir figure 4.3). Ici, la fluidité est essentielle. Par exemple, la diffusion latérale des composants de la membrane permet la mise en place de liaisons ligands-récepteurs. Une autre caractéristique de beaucoup de membranes biologiques est leur charge négative. Celle-ci est causée par la présence de phospholipides anioniques tels que la phosphatidylserine. Cette charge surfacique joue un rôle dans l'adsorption et l'organisation de certaines protéines à la surface des membranes.



FIG. 4.3 La membrane cellulaire eucaryote

Pour étudier les propriétés physiques des bicouches lipidiques et des membranes biologiques, on peut commencer par former des bicouches artificielles sur des supports.

4.1.2 La bicouche lipidique supportée et ses applications

Construire des bicouches supportées...

Historiquement, la première méthode de formation de bicouches supportées est la technique de Langmuir-Blodgett. Ici, on dépose l'une après l'autre sur le substrat les monocouches de lipides qui sont formées initialement à la surface de l'eau. On peut contrôler la pression surfacique des couches et réaliser des bicouches asymétriques (chaque monocouche contient une variété de lipide différente). Cependant, la mise en oeuvre est assez fastidieuse car elle prend du temps et est sensible aux vibrations.

La technique de la fusion de vésicules, plus simple d'emploi, s'est développée dans les années 90 (Singh et al. 1991). Une solution de microvésicules unilamellaires est placée au contact d'une surface. Les microvésicules s'adsorbent et fusionnent pour former des disques de bicouche. Ces derniers s'étendent et finissent par se rejoindre, recouvrant toute la surface. Le mécanisme physique en question a été étudié par AFM (Reviakine et al. 2000, Jass et al. 2000), QCM (Reimhult et al. 2003) et microscopie de fluorescence (Johnson et al. 2002). Les surfaces les mieux adaptées à la formation des bicouches sont la silice, le mica et le verre. Le processus de fusion et de formation varie selon le substrat employé. Par exemple, sur le mica les vésicules ont tendance à se rompre spontanément tandis que sur la silice, une certaine concentration de vésicules sur la surface est nécessaire pour qu'il y ait rupture (Richter et al. 2003).

pour comprendre les membranes biologiques, ...

Les bicouches lipidiques supportées ont été réalisées initialement afin de reproduire le comportement des membranes biologiques naturelles (Mueller et al. 1962). Pour cela, on y incorpore plusieurs lipides différents ou encore d'autres molécules, telles des protéines transmembranaires. Cependant, sur une surface solide, la bicouche est séparée du substrat seulement par un film d'eau de 1 à 2nm d'épaisseur. Il en résulte une faible liberté de fluctuation et de déformation transversale. Pour cette raison, des protéines transmembranaires peuvent se retrouver immobilisées (McConnell et al. 1986). Ainsi, pour maintenir les propriétés structurelles et dynamiques des membranes biologiques, on cherche à minimiser l'interaction avec le substrat. Un moyen d'y parvenir est de poser la bicouche sur un « coussin » de polymères (Sackmann et al. 1996). De telles bicouches rappellent les membranes biologiques portées par le cytosquelette de l'intérieur des cellules.

détecter des molécules, ...

Par la suite, les bicouches lipidiques ont trouvé d'autres applications, telle que la fabrication de systèmes biosenseurs. Les biosenseurs sont des détecteurs moléculaires basés sur un élément sensible d'origine biologique (récepteur cellulaire, micro-organisme etc.). Ici, on utilise des lipides fonctionnalisés qui servent de récepteurs pour une molécule spécifique. Puis, un couplage avec un transducteur permet de détecter l'événement de reconnaissance moléculaire.

cristalliser des protéines, ...

Les bicouches supportées sont également utilisées pour la cristallisation de protéines en 2D (Levy et al. 2001). On a pu ainsi obtenir des informations structurelles sur plus de 20 protéines solubles (notamment par AFM). L'adsorption des protéines sur la bicouche se fait soit par interaction non spécifique (électrostatique), soit par reconnaissance moléculaire avec des ligands lipidiques spécifiques. Puis, les protéines adsorbées, ou les complexes lipides-protéines, diffusent dans le plan de la bicouche et s'auto-organisent en cristaux.

Ainsi, la bacteriorhodopsine, chargée négativement, a pu être cristallisée sur une bicouche cationique. Réciproquement, des cristaux de transporteurs de mitochondrie Anc2, chargés positivement, ont été obtenus sur une bicouche anionique.

Une autre méthode permet de cristalliser des protéines membranaires (insolubles). Des micelles contenant les protéines s'adsorbent sur la bicouche par interaction spécifique ou électrostatique. Puis, la bicouche lipidique se reconstitue autour des micelles. Les protéines peuvent alors diffuser et se cristalliser au sein de la bicouche.

et visualiser des macromolécules.

Enfin, les bicouches lipidiques peuvent être utilisées comme substrat pour l'adsorption et la visualisation de macromolécules. On a déjà évoqué (cf partie 1.3.2) l'étude des chaînes d'ADN adsorbées sur des bicouches cationiques en phase fluide (Maier et al. 1999) et en phase gel (Fang et al. 1997). Dans ce dernier cas, l'organisation des molécules en couche dense permet d'obtenir une résolution accrue pour l'observation par AFM et ainsi de visualiser le pas de l'hélice de l'ADN (Mou et al. 1995).

4.2 Préparation des bicouches supportées

4.2.1 Le choix des lipides

Nous avons acheté les phopholipides à la société Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Pour chaque bicouche, on part d'un mélange à base de 2 types de lipides : le premier porte une charge nette positive (groupe amine) et le deuxième est neutre bien que formant localement un petit dipôle (lipide zwiterionique présentant un groupe amine et un groupe phosphate). Ainsi, en variant la proportion des deux lipides nous pouvons changer la densité de charge de la bicouche. Pour réduire au mieux toute ségrégation d'un type de lipide par rapport à l'autre, on choisit une même longueur de chaîne pour les deux. Plusieurs lipides sont possibles en fonction de la longueur des chaînes et du nombre d'insaturations (voir tableau).

Lipides :	Chaînes :	Τ _m :
D O P C D O T A P (+)	18:1	-20 °C ~ 0 °C
D M P C D M T A P (+)	14:0	2 3 °C 3 8 °C
DPPC DPTAP (+)	16:0	4 1 °C ~ 4 2 - 5 2 °C

Tableau des lipides

Remarque : dans la colonne - Chaînes - le nombre de gauche représente le nombre de carbones et le nombre de droite le nombre d'insaturations. Signification des sigles :

DOPC : 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine DOTAP : 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propane DMPC : 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine DMTAP : 1,2-Dimyristoyl-3-Trimethylammonium-Propane DPPC : 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine DPTAP : 1,2-Dipalmitoyl-3-Trimethylammonium-Propane

La présence d'insaturations au milieu des chaînes aliphatiques des DOTAP et DOPC est responsable de leur température de transition de phase assez basse. Ces lipides sont donc dans la phase fluide à température ambiante. Nous ne sommes pas parvenu à obtenir des images d'AFM de cette bicouche, bien que la QCM confirme sa formation sur la surface par un décalage en fréquence caractéristique. D'autres expérimentateurs ont eu le même problème (Clausen-Schaumann et al. 1999) : la fragilité de cette bicouche à température ambiante la rendrait quasiment impossible à imager par AFM.

La longueur réduite (14 carbones) des chaînes aliphatiques des DMTAP et DMPC leur confère une température de transition proche de l'ambiante. La bicouche est néanmoins en phase gel. Nous avons pu l'observer par AFM, bien qu'elle nous ait paru relativement fragile. En fin de compte, nous avons choisi d'utiliser exclusivement les lipides DPTAP et DPPC qui sont largement dans la phase gel à température ambiante, du fait d'une longueur de chaîne plus importante (16 carbones). La bicouche obtenue est ainsi plus résistante et permet donc d'atteindre une meilleure résolution. Les lipides choisis sont représentés sur la figure 4.4.



FIG. 4.4 Phospholipides choisis (Avanti Polar Lipids)

4.2.2 Préparation d'une bicouche par fusion de vésicules

Pour former les bicouches lipidiques supportées nous avons utilisé exclusivement la méthode de fusion de vésicules (et non la technique de Langmuir-Blodgett). Derrière ce choix se cachent des raisons d'ordre pratique. Lorsqu'on veut réaliser une bicouche lipidique par Langmuir-Blodgett pour pouvoir ensuite l'imager par AFM, il faut déplacer l'échantillon d'un appareil à l'autre tout en le maintenant immergé et en évitant les secousses : dans le cas contraire, on détruirait la bicouche qui est très fragile. Ensuite, il faut mettre en place et sceller la cellule fluide de l'AFM sur l'échantillon (par l'intermédiaire d'un joint en silicone). Or, cette opération est délicate car elle peut détruire la bicouche, causer la fuite du liquide et se solder par une mauvaise étanchéité de la cellule. Enfin, il y a presque inévitablement des bulles dans la cellule, ce qui nuit à la qualité du signal et à l'imagerie. La fusion de vésicules permet de contourner ces difficultés en formant la bicouche directement dans la cellule de l'AFM.

Pour préparer la solution de lipides, on dissout d'abord ces derniers dans du chloroforme et on les mélange dans les proportions désirées. Puis, la solution est séchée sous un flux d'azote, avant d'être mise sous vide pendant une nuit de façon à enlever les traces de solvant résiduel. Les lipides secs sont ensuite dissous dans un tampon (10 mM Tris HCl, pH=7.4). La solution obtenue contient des vésicules multilamellaires qu'il faut encore soniquer pour obtenir des microvésicules unilamellaires. Enfin, on dilue une dernière fois avant utilisation.

Le processus de fusion de vésicule sur la surface requiert une température supérieure à la température de transition de phase des lipides. Il faut en effet que l'agitation thermique des lipides soit suffisante pour permettre aux vésicules de se casser. Une étude montre que la fusion est quand même possible, mais plus lente, sur du mica à une température légèrement inférieur à T_m (Santier et al. 2004). Nous chauffons donc la solution de microvésicules à une température supérieure d'une dizaine de degrés à la transition de phase : 59°C, avant de l'injecter à l'intérieur de la cellule liquide de l'AFM (ou de la QCM). Or, la cellule liquide de l'AFM que nous utilisons n'est par conçue pour avoir un système de chauffage. Par suite, la température des lipides décroît rapidement dans la cellule à température ambiante. Néanmoins, nous avons vérifié par QCM que la bicouche parvient quand même à se former.



FIG. 4.5 Formation d'une bicouche lipidique DPTAP/ DPPC 1 : 1 par fusion de vésicules

La méthode employée est schématisée à gauche. La courbe de QCM obtenue est représentée à droite. Au moment de l'injection des vésicules, on observe un décalage en fréquence qui se stabilise moins de 10 minutes plus tard. Ce décalage : $\Delta f \sim 30$ Hz, est caractéristique de la formation d'une bicouche sur la surface (silice).

Lorsque l'on injecte les vésicules dans la cellule de la QCM, on observe un décalage en fréquence qui correspond à l'adsorption des vésicules sur la surface (voir figure 4.5 de droite). Le décalage se stabilise moins de 10 minutes plus tard. Au total on a : $\Delta f \sim 30$ Hz, une valeur caractéristique de la formation d'une bicouche sur la surface. Peu après, on rince la cellule par 10 fois son volume de tampon de façon à éliminer les vésicules non fusionnées de la solution. La fréquence reste stable, ce qui indique que la bicouche n'est pas détruite par ce rinçage.

L'un des facteurs les plus importants dans la formation de la bicouche est l'interaction des lipides cationiques avec la surface chargée négativement du mica (ou de la silice). Un autre élément important est le tampon utilisé. Le Tris HCl est protoné à un pH inférieur à 8, si bien que les molécules de Tris s'adsorbent sur les surfaces de mica et de silice. Une fois là, elles

favorisent l'adsorption des phospholipides par le biais de liaisons hydrogènes avec les groupes phosphates (Rapuano et al. 2000). L'adjonction de sel mono ou divalent au tampon utilisé peut, selon les cas, favoriser ou non la fusion de vésicules (Ohki et al. 1999). Par exemple, les cations divalents peuvent former des pontages entre les groupes phosphates des lipides, ce qui facilite la fusion entre vésicules (Wilschut et al. 1981). Pour notre étude, nous avons choisi de ne pas ajouter de sel pour ne pas affecter la conformation des polyélectrolytes sur la bicouche.

4.2.3 Morphologie des bicouches par AFM en solution

Dans le cas d'une solution contenant uniquement des lipides DPPC neutres, la formation de la bicouche sur le mica est incomplète. C'est en effet ce que montrent les images d'AFM : la bicouche est séparée en îlots et on trouve de nombreuses vésicules non fusionnées adsorbées par-dessus (voir figure 4.6). Les vésicules ont une forme très écrasée probablement à cause de l'adsorption sur la surface.



FIG. 4.6 Image AFM d'une bicouche lipidique DPPC avec des vésicules adsorbées (liquide)

On observe que la bicouche est incomplète et que des vésicules non fusionnées sont adsorbées dessus. Une section d'une vésicule (flèche) est représentée à droite. Dans le cas de mélanges lipidiques contenant entre 10 et 50% de lipides cationiques, on observe des bicouches relativement complètes avec néanmoins toujours quelques trous et craquelures (voir figure 4.7). Ces dernières résultent du contact entre des disques lipidiques qui se sont rejoints sans fusionner complètement. Ces défauts subsistent encore après plusieurs heures, mais ils ne posent pas de problème pour l'étude de l'adsorption des polyélectrolytes. Quand les trous sont suffisamment grand pour que la pointe de l'AFM puisse atteindre le mica, on peut mesurer une profondeur : 4.8 +/- 0.5nm en accord avec l'épaisseur d'une bicouche (voir section de la figure 4.7). Sur la surface lisse de la bicouche, la rugosité moyenne est inférieure à 0.5 angströms : un atout pour atteindre une excellente résolution à l'AFM par la suite.



FIG. 4.7 Image AFM d'une bicouche lipidique DPTAP/DPPC 1 :1 (liquide) On observe des trous et des craquelures. Les trous permettent de mesurer l'épaisseur de la bicouche (voir section).

Pour des fractions de lipides cationiques supérieures à 50%, les images montrent que la bicouche présente systématiquement une structure à deux étages (voir figure 4.8). Des domaines « hauts » qui apparaissent en clair ont la même hauteur qu'une bicouche normale (~4.8nm). Ils sont séparés par une zone « basse » qui apparaît plus sombre. La différence de hauteur entre les domaines « hauts » et la zone « basse » est environ 1.7 nm. McKiernan et al. (2000) ont observé la présence de domaines similaires pour des bicouches composées uniquement de lipides cationiques. Ils observent par microscopie de fluorescence qu'un

traitement par chauffage et refroidissement lent permet à des domaines fractales macroscopiques de se former. L'origine des domaines serait la répulsion électrostatique entre les lipides chargés. Pour minimiser ces interactions, les lipides adopteraient une position penchée résultant en domaines plus fins et moins denses (la zone « basse »).



FIG. 4.8 Image AFM d'une bicouche lipidique DPTAP/DPPC 65 : 35 (liquide) On observe la présence de domaines « hauts » séparés par une zone « basse ». Les domaines « hauts » ont la même hauteur qu'une bicouche normale tandis que la bicouche « basse » est située 1.7nm plus bas (voir section).

De tels domaines lipidiques présentent un intérêt propre qui n'est pas sans rappeler certaines structures appelées « radeaux » que l'on observe sur les membranes cellulaires. Toutefois, notre but est ici d'éviter la plupart du temps leur formation de façon à garder une bicouche plane et une résolution élevée. Aussi, sauf mention du contraire, on se restreint généralement dans la suite à des bicouches contenant entre 10 et 50% de lipides chargés.

4.3 Adsorption des chaînes de PSS fortement chargées sur la bicouche lipidique

Dans cette partie, on s'intéresse uniquement aux chaînes de PSS fortement chargées les linéaires : f = 0.92 et les anneaux : f = 1. Une fois la bicouche formée et rincée, on injecte le PSS à la concentration de 10⁻⁵ M dans la cellule liquide (de l'AFM ou de la QCM).

4.3.1 Cinétique d'adsorption des chaînes linéaires

On forme à l'intérieur de la cellule QCM une bicouche lipidique DPTAP/DPPC 1 : 1 selon la méthode décrite précédemment, puis on injecte les chaînes linéaires dans la cellule. On observe alors un décalage en fréquence d'abord assez brusque puis qui diminue rapidement pour se stabiliser au bout d'une dizaine de minutes (voir figure 4.9). Le décalage en fréquence total : Δf fait environ 3 Hz.



FIG. 4.9 Courbe QCM montrant l'adsorption des chaînes linéaires : f = 0.92sur la bicouche lipidique DPTAP/DPPC 1 : 1

L'adsorption est d'abord rapide puis diminue pour se stabiliser au bout d'une dizaine de minutes. Le décalage en fréquence total : $\Delta f \sim 3$ Hz.

En supposant que la couche adsorbée est fine et rigide, on peut appliquer la relation de Saueurbrey pour calculer la masse adsorbée (cf chapitre 2.5). On trouve alors une masse : $\Delta m \sim 0.05 \mu g$ qui correspond à 5% de la masse des polymères présents en solution au départ. Les images AFM réalisées sur le même type d'échantillon montrent qu'une monocouche de polymères s'est effectivement adsorbée sur la bicouche (voir figure 4.10).



FIG. 4.10 Image AFM des chaînes linéaires : f = 0.92 sur la bicouche lipidique DPTAP/DPPC 1 : 1 (liquide)

On observe une monocouche dense de chaînes fortement ordonnée.

La résolution temporelle de l'AFM n'est pas assez rapide pour observer la cinétique de formation de cette couche. Quand on baisse la charge de la bicouche (DPTAP/DPPC 3 : 7), la cinétique d'adsorption est plus lente et on peut observer la couche qui se complète progressivement en l'espace d'une vingtaine de minutes. Au bout de quelques heures, on observe un autre phénomène : des globules apparaissent au sein de la couche (voir figure 4.11). On peut éviter l'apparition de ces globules en rinçant la cellule juste après l'adsorption de la monocouche, ce qui montre qu'ils résultent de l'adsorption de chaînes sur la surface. Ainsi, les globules résultent probablement de parties de chaînes (boucles, queues) qui restent en solution car la chaîne entière n'a pas trouvé de place (ou de sites d'adsorption) sur la surface.





Cette image a été obtenue 2 heures après l'injection du PSS dans la cellule. On observe l'apparition de globules par-dessus la couche initiale.

Sur une bicouche neutre (DPPC 100%), on peut observer les chaînes au fur et à mesure qu'elles se déposent (voir figure 4.12). La raison de l'adsorption est probablement l'interaction des monomères chargés avec les petits dipôles que constituent les têtes des lipides zwiterioniques. On remarque une stagnation du nombre de chaînes sur la surface environ une heure après l'injection.





FIG. 4.12 Adsorption des chaînes linéaires : f = 0.92 sur une bicouche neutre (100% DPPC)

Sur une série d'images AFM, on peut compter les chaînes au fur et à mesure qu'elles se déposent sur la surface. On observe une stagnation de l'adsorption environ une heure après l'injection (voir courbe).

4.3.2 Conformation des chaînes individuelles

Dans cette partie, on se place à une concentration plus faible que précédemment $(10^{-7} \text{ à} 10^{-6} \text{ M})$ de manière à pouvoir observer des chaînes individuelles séparées sur la surface. Pour les chaînes linéaires : f = 0.92, on observe la plupart du temps des conformations étendues à plat sur la surface, ainsi que de rares globules (voir figure 4.13).



FIG. 4.13 Image AFM des chaînes linéaires : f = 0.92 sur la bicouche lipidique DPTAP/DPPC 1 : 9

Les chaînes, qui paraissent assez raides, sont étendues à plat sur la bicouche en évitant la plupart du temps de se superposer.

Comme sur le mica (cf 3.2.2), les chaînes étendues ont une épaisseur latérale presque constante (~10nm) et une hauteur égale à : 0.6 + - 0.15 nm (voir figure 4.14). Ainsi, il s'agit de chaînes pratiquement tendues. De plus, on note que les chaînes paraissent particulièrement raides et présentent relativement peu de courbures. Cependant, en de rares occasions, on peut aussi voir des chaînes qui se superposent en formant des boucles (voir figure 4.15).



FIG. 4.14 Image AFM d'une chaîne linéaire : f = 0.92 étendue sur la bicouche lipidique DPTAP/DPPC 1 : 9

Certaines chaînes, comme celle qui est visible ici au centre, sont presque rectilignes. La hauteur de la chaîne : 0.62nm (voir section à droite de l'image) est compatible avec la distance entre le squelette et les groupes sulfonates du PSS (0.72nm)



FIG. 4.15 Image AFM d'une chaîne linéaire : f = 0.92 faisant une boucle sur la bicouche lipidique DPTAP/DPPC 1 : 1

Nous voyons que la chaîne fait un petit « pont » (en clair) au niveau d'un croisement.

Enfin, à côté des chaînes étendues, on trouve parfois des globules assez gros (d'une hauteur de 4 +/- 1 nm) ou des globules plus petits reliés à des parties de chaînes étendues comme sur la figure 4.16.



FIG. 4.16 Image AFM d'une chaîne linéaire : f = 0.92 avec un globule

Quand on considère seulement les conformations aplaties sur la surface, on voit à l'œil nu que les chaînes linéaires : f = 0.92 présentent une polydispersité importante. Nous pouvons évaluer cette polydispersité en mesurant la longueur des chaînes sur la surface pour un ensemble statistique. Pour cela, on effectue un traitement et une analyse d'image à l'aide du programme Visilog (voir annexe). On obtient alors l'histogramme des longueurs des chaînes représenté sur la figure 4.17.



FIG. 4.17 Histogramme des longueurs pour environ 300 chaînes linéaires : *f* = 0.92 sur la bicouche DPTAP/DPPC 1 : 9

Nous voyons qu'il y a un grand nombre de petits fragments de chaînes de taille inférieure à 10nm et que ce nombre décroît à mesure que la longueur des chaînes augmente. Les chaînes plus longues sont assez rares et ont des tailles variables. Ce résultat confirme que les chaînes de polystyrène initiales ont été coupées en petits fragments. Cependant, l'analyse des courbes de chromatographie FFF (cf 2.1.1) indique qu'il devrait subsister un nombre important de chaînes longues possédant la même taille (pic de la courbe) et que les fragments plus petits sont apparemment répartis de façon aléatoire (présence d'un plateau). L'explication de cette divergence peut provenir d'une adsorption plus rapide des fragments de chaînes de petite taille sur la surface, lesquels laissent moins de place aux chaînes longues qui arrivent ensuite. Les chaînes à topologie cyclique présentent des conformations analogues aux chaînes linéaires. On observe encore une fois des chaînes étendues sur la surface ainsi qu'un petit nombre de globules (voir figure 4.18).



FIG. 4.18 Image AFM d' anneaux : f = 1 sur la bicouche lipidique DPTAP/DPPC 3 : 7

La plupart des chaînes sont étendues sur la surface. On observe également un petit nombre de globules.

Les anneaux étendus paraissent assez raides et présentent peu de courbures comme on le voit sur l'exemple de la figure 4.19. Parfois, la chaîne se superpose et l'anneau est croisé (voir figure 4.20). Enfin, de rares anneaux présentent une partie en globule comme sur la figure 4.21.



FIG. 4.19 Image AFM d' un anneau : f = 1 étendu

On remarque que la chaîne présente peu de tournants en dehors de ceux qui lui sont imposés par sa topologie.



FIG. 4.20 Image AFM d'un anneau : f = 1 croisé

Ici encore, la chaîne fait un « pont » (en clair) au niveau du croisement.



FIG. 4.21 Image AFM d'un anneau : *f* = 1 présentant une partie globulaire

Quand la bicouche présente des trous relativement larges (en particulier pour les faibles proportions de lipides cationiques), on peut observer que les chaînes (linéaires et cycliques) s'adsorbent aussi sur le mica (voir figure 4.22). Ici, leur conformation est étendue mais la couche qui en résulte paraît plus dense et plus désordonnée que sur la bicouche.



FIG. 4.22 Image AFM de chaîne linéaires : f = 0.92 sur une bicouche lipidique de DPPC et sur le mica

La couche de polymères ne présente pas la même organisation sur les deux substrats : la densité de chaînes est plus grande sur le mica (à gauche) et la couche semble plus désordonnée que sur la bicouche (à droite).

Pourtant, on a vu au chapitre 3 que les chaînes de PSS ne pouvaient pas s'étaler sur la surface du mica dans l'eau, à moins d'ajouter des cations divalents. Ici, l'adsorption peut être rendue possible par les molécules du tampon utilisé pour les lipides (Tris). Ces dernières sont en effet chargées positivement et s'adsorbent sur le mica. A partir de là, elles peuvent jouer le rôle de pontages électrostatiques entre les chaînes et la surface.

Pour clore cette partie, nous voulons faire quelques remarques sur la dynamique des systèmes observés. Dans toutes les expériences précédentes, les chaînes individuelles sont immobiles sur la surface. On n'observe quasiment aucun changement même après une heure passée à balayer la même zone à l'AFM. Néanmoins, nous avons été témoins d'une situation où les chaînes sont déplacées par la bicouche qui se transforme.

Quand la bicouche possède des domaines hauts et bas (pour une proportion en lipides cationiques supérieure à 50%), on observe des chaînes sur les deux niveaux sans qu'il y ait de différence notable dans leur conformation. Or, on observe parfois que les domaines changent de forme au cours du temps, ce qui peut avoir pour conséquence de déplacer les chaînes qui s'y trouvent déposées. Ainsi, sur la figure 4.23, on assiste à la croissance de domaines « hauts » (en clair) sur une série d'images consécutives. Les domaines semblent se former à partir des bords d'un îlot de bicouche pour rejoindre le centre. Une chaîne située initialement sur la bicouche « basse » (voir la zone encerclée) disparaît alors au moment où un domaine « haut » se forme au même endroit. On peut penser que la chaîne a été poussée par le front du domaine « haut » bien que nous ne sachions pas de quelle manière.





On observe que les domaines « hauts » croissent à partir des bords des îlots de bicouche pour rejoindre le centre. Il en résulte qu'une chaîne adsorbée sur la bicouche « basse » (voir zone encerclée) est apparemment déplacée par les domaines « hauts » puisqu'elle disparaît sur la quatrième image.

4.3.3 Formation de monocouches ordonnées

On utilise maintenant une concentration plus élevée que dans la partie précédente (de 10^{-6} g/L à 10^{-5} M). Dans ce cas, les chaînes forment une couche qui recouvre la surface de façon homogène. On constate qu'il y a moins de globules et que toutes les chaînes tendent à être étendues à plat sur la surface. D'autre part, on observe cette fois des changements de conformation qui semblent résulter des interactions entre molécules voisines. Les chaînes s'arrangent de telle sorte qu'elles restent séparées par un espacement approximativement constant. Ce dernier diminue quand on augmente la proportion de lipides chargés (DPTAP) dans la bicouche (voir la figure 4.24). La conséquence pour les chaînes voisines est de tendre progressivement à s'orienter dans la même direction (voir figure 4.24b). Lorsque la proportion en lipides cationiques atteint 50%, on observe des domaines de plusieurs centaines de nanomètres de longs qui contiennent un grand nombre de chaînes alignées dans la même direction (voir figure 4.24c). Ici, les chaînes sont immobiles car elles disposent d'un espace très restreint sur la surface. Finalement, quand l'espacement entre chaînes descend en-dessous de 10nm (au-delà de 50% de lipides cationiques), la pointe de l'AFM y pénètre moins bien de telle sorte que la couche de polymère paraît presque lisse (voir figure 4.24d).

On peut remarquer au passage que le fait qu'on observe ce type de couche dense avec très peu de défauts montre que la variation du taux de sulfonation d'une chaîne à l'autre n'est pas très importante. En effet, il n'y a pas de globules qui résulteraient de chaînes très peu sulfonées.





Les proportions en lipides cationiques utilisées sont : a) 0%, b) 30%, c) 50% et d) 65%. On observe la diminution progressive de l'espacement entre les chaînes, ce qui les conduit à être alignées dans la même direction (c). Quand l'espacement entre les chaînes descend en dessous de 10nm, la pointe de l'AFM y pénètre moins bien et la couche paraît presque lisse (d).

Le comportement observé est tel que celui décrit par le modèle théorique de Dobrynin et al. (voir 1.3.1). Ici, dans le régime semi-dilué de l'adsorption, l'espacement entre chaînes varie comme l'inverse de la densité surfacique de charge. Pour le vérifier, nous déterminons la distance moyenne entre les chaînes sur la surface pour des bicouches ayant différentes proportions de lipides cationiques. Pour cela, on utilise l'outil d'analyse de densité spectrale du programme Nanoscope (cf 2.4.3). Les valeurs obtenues sont moyennées sur plusieurs images pour chaque proportion de lipides cationiques. Le résultat est représenté sur la figure 4.25.



FIG. 4.25 Variation de l'espacement entre les chaînes linéaires : f = 0.92 en fonction de la proportion en lipides cationiques

On observe que l'espacement varie approximativement comme l'inverse de la fraction de lipides cationiques (courbe en rouge).

On constate que la variation de l'espacement est assez bien décrite par une loi de type : σ^{-1} . Notons que d'autres expériences (Clausen-Schaumann et al. 1999, Rädler et al. 1997) ont relevé la même loi pour l'ADN adsorbé sur une bicouche cationique ou encore confiné entre deux bicouches (lipoplexes – voir 1.4).

Considérons à présent les chaînes à topologie cyclique. Comme pour les chaînes linéaires, on observe un espacement approximativement constant entre les molécules sur la surface (voir la figure 4.26). Puis, lorsque la proportion en lipides cationiques atteint 50%, la couche est tellement dense qu'on ne discerne plus les anneaux individuels. On observe comme pour les chaînes linéaires des domaines où les chaînes sont orientées (voir la figure 4.27). Ici, on ne peut pas dire si les chaînes forment des croisements (dans la direction perpendiculaire à l'orientation) ou si les anneaux forment des ovales très écrasés, car la résolution ne nous permet pas de le voir.


FIG. 4.26 Image AFM d'anneaux : f = 1 sur une bicouche lipidique DPTAP/DPPC 35 : 65

Les anneaux sont ici assez régulièrement espacés sur la surface. On remarque au passage qu'ils évitent de se placer sur les failles de la bicouche.



FIG. 4.27 Image AFM d'anneaux : f = 1 sur une bicouche lipidique DPTAP/DPPC 1 : 1

Sur cette image la couche est tellement dense qu'on ne distingue pas les anneaux individuels. Cependant, on voit des domaines orientés.

Pour une charge surfacique très élevée, la théorie prédit l'existence d'un régime d'adsorption où les chaînes forment une sorte de tapis moléculaire (couche 3D). Cependant dans nos expériences les choses se passent différemment à cause de l'apparition de domaines dans la bicouche pour des proportions en lipides cationiques supérieures à 50% (cf 4.2.3). Dans ce cas, il apparaît que les chaînes s'adsorbent de préférence sur les domaines « hauts » en formant une monocouche dense et ordonnée tandis que la bicouche « basse » reste vide (voir figure 4.28). Cependant, sur certaines images, on observe également l'adsorption des chaînes sur la bicouche « basse » mais avec une densité plus faible que sur les domaines « hauts ». Ainsi, tout se passe comme si la densité surfacique de charge était plus faible pour la bicouche « basse». Ce résultat est compatible avec l'explication avancée par McKiernan et al. (2000) selon laquelle les lipides sont penchés au sein d'une couche moins dense (pour réduire les

interactions répulsives entre lipides chargés).

FIG. 4.28 Images AFM de chaîne linéaires : f = 0.92 sur une bicouche DPTAP/DPPC 65 : 35 – adsorption sur les domaines « hauts »

Ici, les chaînes sont adsorbées exclusivement sur les domaines « hauts » et la bicouche « basse » reste vide. La section à droite de l'image permet de mesurer la différence de hauteur entre les domaines « hauts » et la bicouche « basse ».

Il faut noter que suite à l'injection du PSS sur des bicouches contenant entre 40 et 50% de lipides cationiques, nous avons souvent observé l'apparition d'îlots de multicouches pardessus la bicouche. Ces multicouches sont faciles à identifier car elles forment des terrasses à intervalles réguliers (voir figure 4.29). La hauteur entre deux multicouches varie entre 5 et 7nm (un peu plus que l'épaisseur d'une bicouche : 4.8nm).





Sur cette image, on compte plus de 5 terrasses empilées par-dessus la bicouche. La première terrasse mesure 6.7nm de hauteur, soit ~2nm de plus qu'une bicouche normale. On remarque que les polyélectrolytes sont adsorbés sur la bicouche et également sur ces multicouches.

Les multicouches apparaissent malgré l'étape de rinçage de la bicouche qui élimine les vésicules non fusionnées de la solution. Par conséquent, on peut penser que les lipides qui forment les multicouches ont été arrachés à la bicouche par les polyélectrolytes. Il a été montré en effet que des polymères peuvent parfois venir s'intercaler entre la surface et une bicouche lipidique supportée en soulevant cette dernière (Majewski et al. 1998). Cela se produit en particulier quand les polymères ont une plus grande affinité avec la surface qu'avec la bicouche. Ici, les polyélectrolytes s'adsorbent aussi bien sur la bicouche que sur le mica. Cependant, les observations semblent indiquer que les polymères ne se glissent pas sous la bicouche. Ainsi, lorsque les chaînes sont adsorbées sur la bicouche, elles évitent de pénétrer dans les trous en préférant les contourner comme le montre la figure 4.30.



FIG. 4.30 Image AFM de chaîne linéaires : f = 0.92 sur une bicouche DPTAP/DPPC 1 : 1 – contournement des trous de la bicouche

Les chaînes à proximité des trous sont obligées de les contourner, de telle sorte que l'orientation des chaînes est modifiée dans un voisinage autour des trous.

De plus, lorsque les chaînes s'adsorbent sur le mica, elles semblent s'arrêter à la frontière où commence la bicouche sans passer en dessous. Ainsi, on observe parfois que la membrane se retire légèrement d'une partie de la surface de mica au bout d'un certain temps. Or, il n'y a pas de chaînes sur le mica à ces endroits découverts, alors qu'il y en a partout ailleurs (voir figure 4.31).



FIG. 4.31 Image AFM montrant un îlot de bicouche DPPC qui s'est retiré d'une partie de la surface

Cette image a été obtenue environ 2h après injection des polymères dans la cellule liquide. La bicouche s'est retirée à un endroit, dévoilant une portion de mica lisse (voir flèche) : il n'y a apparemment pas de chaînes sous la bicouche.

Malgré tout, on est tenté de penser que d'une manière ou d'une autre, des multicouches : bicouches cationiques – PSS peuvent se former. Après tout, des structures semblables ont été observées pour l'ADN, l'actine ou encore le virus M13 (Koltover et al. 2000, Wong et al. 2000, Yang et al. 2004). Ce sujet pourrait faire l'objet d'une étude approfondie en volume (par diffusion de rayons X et de neutrons).

Avant de refermer cette partie, nous mentionnons brièvement des expériences où on a introduit une solution contenant du sel monovalent (NaCl) ou divalent (MgCl₂) dans la cellule liquide après qu'une couche de polymères ait été préalablement formée. L'idée était d'observer des changements de structure de la couche ou encore une désorption des chaînes. Cependant, pour les concentrations en sel étudiées (entre 0.5 et 5mM), nous n'avons observé aucun changement de la monocouche.

4.3.4 Adsorption des chaînes par-dessus la monocouche ordonnée

Lorsque la monocouche de PSS est particulièrement dense et ordonnée et qu'elle ne présente pas de défauts, on peut parfois observer des chaînes adsorbées par-dessus. C'est le cas des anneaux de la figure 4.32. Ici, la bicouche est chargée à 50% et la concentration en PSS est : 10⁻⁶ M. Les anneaux adsorbés par-dessus la monocouche sont visibles peu de temps après l'injection des polymères dans la cellule. On remarque que les chaînes paraissent plus floues que sur la bicouche et semblent d'avantage capables de fluctuer. Ainsi au début, les chaînes présentent différentes conformations qui semblent indépendantes de la structure de la monocouche inférieure.





Puis, au bout d'un certain temps, on observe que les chaînes tendent à s'orienter dans la direction des chaînes de la monocouche (voir figure 4.33).



FIG. 4.33 Orientation des anneaux par la monocouche

Ainsi, on voit que les interactions entre les chaînes et la monocouche ordonnée sont très différentes du cas où les chaînes sont adsorbées sur la bicouche. Il pourra être intéressant à l'avenir d'étudier les propriétés d'un tel substrat, notamment à l'aide d'un modèle théorique.

4.4 Structure des chaînes de PSS en fonction de leur taux de charge

Dans cette partie, on s'intéresse à la structure des chaînes de PSS en fonction de leur taux de charge. Pour cela, on utilise des concentrations en polymères comprises entre 10^{-7} M et 10^{-5} M (nous avons vérifié que les résultats sont indépendants de la concentration). Pour les chaînes faiblement chargées (linéaires 32% et anneaux 40%) on observe uniquement des globules, comme sur le mica (voir figure 4.34). Aussi, la hauteur moyenne est approximativement la même que sur la surface précédente : 3nm (voir figure 4.35).



FIG. 4.34 Image AFM des chaînes linéaires : f = 0.32 sur la bicouche lipidique DPTAP/DPPC 1 : 1



FIG. 4.35 Histogramme des hauteurs de 100 globules

On peut profiter de la géométrie relativement sphérique des globules pour calculer leur fonction de distribution radiale. On utilise la même méthode que décrite précédemment (cf 3.3). Le résultat est représenté sur la figure 4.36 pour la concentration 10^{-6} M (calculs effectués sur environ 2000 globules).





La fonction de distribution radiale présente un pic dont la position (r~30nm) et l'intensité sont caractéristiques des corrélations entre colloïdes chargés (Hayter et al. 1981).

Observons ce qui se passe quand on augmente le taux de charge des chaînes. La figure 4.37 montre une image d'AFM des chaînes linéaires : f = 0.67 adsorbées sur la bicouche. La conformation de ces chaînes est similaire aux chaînes linéaires fortement chargées : f = 0.92.



FIG. 4.37 Image AFM des chaînes linéaires : f = 0.67 sur la bicouche lipidique DPTAP/DPPC 3 : 7

La conformation est semblable aux chaînes linéaires : f = 0.92 : la plupart des chaînes sont étendues et paraissent assez raides.

On peut calculer les longueurs des chaînes étendues sur la surface à l'aide de la procédure décrite en annexe (programme Visilog). L'histogramme obtenu est représenté sur la figure 4.38.



FIG. 4.38 Histogramme des longueurs des chaînes : f = 0.67 (1500 chaînes) On observe une décroissance du nombre de fragments de chaînes quand la taille augmente.

La présence d'un grand nombre de petits fragments témoigne d'une destruction des chaînes de polystyrène initiales. La distribution est comparable à celle des chaînes linéaires : f = 0.92 et conduit aux mêmes remarques : la décroissance du nombre de fragments quand la longueur augmente peut provenir d'une adsorption plus rapide des petits fragments sur la surface. Dans le cas des anneaux : f = 0.6, on n'observe pas de petits globules sur les chaînes comme

sur le mica. La conformation de ces chaînes sur la bicouche est semblable aux anneaux fortement chargés : f = 1 (voir figure 4.39).



FIG. 4.39 Image AFM d'anneaux : f = 0.6 sur la bicouche lipidique DPTAP/DPPC 35 : 65

La conformation est semblable aux anneaux : f = 1. La plupart des chaînes sont étendues à plat et côte à côte. On observe également quelques globules et des croisements de chaînes.

Sur cette image, les anneaux sont clairement visibles malgré leur densité. La plupart des chaînes évitent de se superposer. Aussi, il est remarquable qu'on observe occasionnellement des anneaux disposés les uns à l'intérieur des autres (voir figure 4.40).



FIG. 4.40 Image AFM d'anneaux inclus l'un dans l'autre

Ces configurations (flèches) s'expliquent par l'adsorption d'un anneau qui n'a pas de meilleur choix (la surface étant relativement saturée) que de se mettre dans l'espace laissé vacant au centre d'un autre anneau déjà sur la surface. On note que les anneaux externes sont tendus pour former pratiquement des cercles.

Nous pouvons mesurer la longueur des anneaux : f = 0.6 (à l'aide de l'outil de mesure de longueurs du programme Nanoscope) pour la comparer à celle des anneaux : f = 1. Les histogrammes obtenus sont représentés sur la figure 4.41. Les longueurs moyennes des deux types d'anneaux sont toutes deux en accord avec la longueur calculée à partir de la masse moléculaire des précurseurs (160nm). Cela signifie que les chaînes sont tout à fait tendues.



FIG. 4.41 Histogrammes des longueurs des anneaux : f = 0.6 (a) et f = 1 (b) Les longueurs moyennes des deux types d'anneaux (100 chaînes) sont en accord avec la longueur calculée à partir de la masse moléculaire des précurseurs (160nm).

Avant d'analyser ces résultats pour les anneaux : f = 0.6 en comparaison avec les observations sur le mica, il faut encore examiner l'adsorption des chaînes par-dessus la monocouche de chaînes. En effet, dans ce cas, nous observons à nouveau des petits globules sur la plupart des chaînes (voir figure 4.42).



FIG. 4.42 Image AFM d'anneaux : f = 0.6 sur la monocouche dense de chaînes (DPTAP/DPPC 1 : 1)

On observe des petits globules, 1 ou 2 par chaîne. Remarque : on ne voit pas la structure de la monocouche de chaînes sur cette image car elle est si compacte que la pointe de l'AFM y pénètre très peu. Cependant, la monocouche est visible sur des tailles de scan plus petites.

Ces globules ont une hauteur moyenne de 1nm (voir la figure 4.43) comme sur le mica.



FIG. 4.43 Image AFM d'un anneau : f = 0.6 sur la monocouche dense de chaînes (DPTAP/DPPC 1 : 1) – présence de globules sur la chaîne

A l'aide de sections telles que celle représentée à droite, on mesure la hauteur d'une centaine de globules (voir histogramme).

Cette fois, on observe que les petits globules peuvent changer de taille, disparaître ou apparaître sur des images consécutives (voir figure 4.44).



FIG. 4.44 Images AFM d'un anneau : f = 0.6 – fluctuations des globules Sur ces deux images consécutives, on observe l'apparition d'un globule supplémentaire sur l'anneau. L'intervalle entre les deux images est de 7 minutes.

Enfin, du fait de la présence des globules, on observe, comme sur le mica, une réduction de la longueur moyenne des anneaux : f = 0.6 (voir figure 4.45).



FIG. 4.45 Histogramme des longueurs des anneaux : f = 0.6 sur la monocouche dense de chaînes

A cause de la présence des globules sur les chaînes, la longueur des anneaux (ici une cinquantaine de chaînes) est réduite d'une vingtaine de nanomètres par rapport à la conformation tendue.

Comme dans le chapitre précédent, on peut supposer que les globules correspondent à des sphères condensées par l'attraction hydrophobe de manière à calculer, à partir de la réduction de longueur observée ($\delta = 20$ nm), le rayon des globules qu'on doit obtenir. On trouve ainsi :

$$R_{\text{globule}} \sim [\delta / (2b)]^{1/3} b \sim 0.8 \text{nm}.$$

Ce résultat est cohérent avec la hauteur que nous mesurons pour les globules (1nm).

Aussi, il n'y a pas de raison pour que les structures observées soient des morceaux de chaînes qui formeraient des petites boucles au-dessus de la surface uniquement pour les anneaux : f = 0.6 (on n'observe pas de globules sur les anneaux : f = 1 adsorbés sur la monocouche – cf 4.3.4). Par ailleurs, les expériences de diffusion de neutrons (Spiteri et al.) et de rayons X (Combet et al.) sur les anneaux : f = 0.6 en volume montrent que le facteur de forme est différent de celui des anneaux : f = 1 et qu'il peut s'expliquer si on considère l'existence de zones condensées sur la chaîne en volume. On en déduit que les structures observées par AFM existent déjà sur les chaînes en solution.

De plus, à la différence de la configuration rencontrée sur le mica, les globules peuvent ici fluctuer tout comme dans le modèle du collier de perles ce qui montre qu'ils ne résultent pas de blocs non sulfonés sur les chaînes. On pense que la dynamique des globules est rendue possible par une interaction plus faible des chaînes avec la monocouche dense. Nous avons vu en effet au chapitre 4.3.4 que les chaînes qui s'adsorbent sur ce substrat semblent d'avantage capables de changer de conformation au cours du temps que sur la bicouche.

Enfin, la disparition des petits globules des anneaux : f = 0.6 adsorbés sur la bicouche n'est pas surprenante si on considère la nature fluctuante et fragile du collier de perles. Sur cette surface en effet, la conformation des chaînes tend à être particulièrement étendue (4.3.2). Aussi, Borisov et al. (2001) ont montré que les perles du polyélectrolyte hydrophobe peuvent s'étaler sur une surface chargée, ce qui pourrait avoir pour conséquence de déstabiliser la structure en volume.

4.5 Adsorption de l'ADN circulaire sur la bicouche lipidique

Dans cette partie on s'intéresse à l'adsorption de l'ADN circulaire sur la bicouche lipidique. Cela nous permet notamment de voir si le comportement de ce polyélectrolyte naturel présente des spécificités par rapport au PSS. Lorsqu'on utilise une concentration de 10⁻⁵ M (tampon - 10mM Tris-Hcl pH 7.6, 1mM EDTA) et une bicouche contenant 50% de lipides cationiques, on obtient une couche dense sur la surface au sein de laquelle les chaînes sont essentiellement étendues à plat (voir figure 4.46). On observe aussi de rares globules de tailles variables. Ici, la longueur importante des molécules (940nm) les a visiblement contraintes à se croiser en de multiples points (points clairs sur les chaînes). On note que les chaînes tendent à se croiser perpendiculairement, sans doute pour réduire les interactions répulsives (voir figure 4.47). La couche est donc enchevêtrée et pour cette raison il est difficile d'isoler une molécule d'ADN parmi les autres.







FIG. 4.47 Image AFM d'anneaux d'ADN formant des intersections On remarque qu'au niveau des intersections, les chaînes ont tendance à se chevaucher dans des directions perpendiculaires ce qui s'explique par la nécessité de minimiser les interactions répulsives.

Lorsque la fraction de lipides cationiques est supérieure à 50% et qu'il y a des domaines sur la bicouche, on observe que la couche d'ADN a une densité plus importante sur les domaines « hauts » que sur la bicouche « basse » (voir figure 4.48)



FIG. 4.48 Image AFM d'anneaux d'ADN sur une bicouche DPTAP/DPPC 65 : 35 Sur la bicouche « basse » (voir flèche), la densité de chaînes est moins importante que sur les domaines « hauts ».

On voit également sur cette image que les mêmes chaînes d'ADN sont adsorbées simultanément sur les deux étages de la bicouche.

Nous avons ensuite voulu observer ce qui se passe quand on ajoute du sel (monovalent et divalent) à l'intérieur de la cellule liquide après que la couche d'ADN se soit formée. A partir d'une certaine concentration en sel monovalent, on s'attend à ce que les interactions électrostatiques au niveau de la surface soient écrantées et que les chaînes se désorbent. Par ailleurs, en présence de sel divalent, l'apparition d'interactions attractives peut conduire à un phénomène de condensation des chaînes sur la surface. Ainsi, Fang et al. (1997) observent que l'espacement entre les chaînes d'ADN sur la bicouche cationique varie continûment avec la concentration de Mg²⁺, en atteignant un minimum (pour 50mM). Par ailleurs, koltover et al. (2000) observent une condensation brutale de l'ADN au sein de lipoplexes, à partir d'une certaine quantité de sel divalent (voir 1.4).

Lorsque nous ajoutons une faible concentration de NaCl (0.1 à 0.9mM) dans la cellule liquide, il ne se passe apparemment rien : la structure de la couche d'ADN est identique et les chaînes n'ont pas bougé. Puis, quand on atteint une concentration environ égale à 1mM, on observe que les chaînes se sont brutalement condensées sur la surface pour former des agrégats (voir figure 4.49).



FIG. 4.49 Condensation d'anneaux d'ADN sur la bicouche après addition de sel monovalent (1mM NaCl)

Sur l'image de droite, après l'addition du sel, on observe des agrégats connectés les uns aux autres en une sorte de réseau sur la bicouche.

Nous obtenons un résultat similaire lorsqu'on ajoute du sel divalent (MgCl₂) dans la cellule liquide. En effet, en dessous de 1mM, il ne se passe rien. Puis, à la concentration de 1mM, les chaînes se condensent sur la surface (voir figure 4.50).



FIG. 4.50 Condensation d'anneaux d'ADN sur la bicouche après addition de sel divalent (1mM MgCl₂)

En conclusion, contrairement à Fang et al. nous n'observons pas de réduction continue de l'espacement entre les chaînes mais une désorption et une agrégation brutale, dès 1mM de sel ajouté. Cette divergence pourrait provenir de l'utilisation d'un ADN circulaire à la place de l'ADN Lambda employé dans les expériences précédentes. En particulier, notre ADN circulaire est surenroulé et adopte par suite une conformation vrillée en solution. Or, Lyubchenko et al. (1997) montrent par AFM que la conformation de ce type d'ADN adsorbé sur une surface de mica silanisée dépend de façon dramatique de la concentration en sel. Lorsque cette dernière augmente, les anneaux deviennent d'avantage vrillés et on observe des zones où les brins d'une même chaîne sont en contact. Pour mieux comprendre le rôle joué par le surenroulement, des expériences supplémentaires sur des molécules individuelles sont nécessaires.

4.6 Résumé des principaux résultats

Dans ce chapitre, nous avons préparé des bicouches lipidiques supportées contenant différentes proportions de lipides cationiques à l'aide de la méthode de fusion de vésicules. Puis, nous avons étudié l'adsorption des chaînes de PSS (linéaires et cycliques) fortement chargées sur la bicouche par AFM en solution. Les chaînes tendent à s'étaler à plat sur la surface avec une conformation relativement étendue. Pour une concentration suffisante, il se forme une monocouche dont la densité croît avec la proportion de lipides cationiques. Lorsque la densité est élevée, la couche devient très ordonnée et on observe des domaines où les chaînes sont alignées dans la même direction. Des chaînes peuvent également s'adsorber par-dessus la monocouche en s'orientant dans la direction des chaînes inférieures.

Nous avons ensuite étudié comment la structure des chaînes de PSS varie en fonction de leur taux de charge. Comme sur le mica, les chaînes faiblement chargées (f = 0.32, f = 0.4) sont condensées en globules par l'attraction hydrophobe. Aussi, les chaînes fortement chargées (f = 0.92, f = 1) sont étendues, de même que pour le taux de charge plus faible : f = 0.67. En revanche, la structure des anneaux chargés à 60% dépend du substrat. Lorsque les anneaux sont adsorbés par-dessus la monocouche dense de chaînes, ils portent des petits globules de 1 nanomètre de diamètre qui peuvent fluctuer. Ce résultat confirme le caractère dynamique des structures observées, en accord avec le modèle du collier de perles du polyélectrolyte hydrophobe. Quand les anneaux s'adsorbent sur la bicouche, les globules disparaissent et les chaînes sont aussi étendues que pour les anneaux fortement chargée (Borisov et al. 2001). Enfin, nous avons étudié l'adsorption d'ADN circulaire sur la bicouche lipidique. Une monocouche se forme où les chaînes, du fait de leur taille importante, se croisent souvent. Ici, l'addition de sel monovalent ou divalent provoque la condensation brutale des chaînes.

5 Etude de la longueur de persistance des chaînes de PSS sur la surface

5.1 Introduction : principe de l'analyse de $\langle R^2 \rangle$

Dans cette partie on s'intéresse à la longueur de persistance des chaînes de PSS adsorbées sur le mica et la bicouche lipidique. Nos analyses se basent sur le modèle du ver (Worm Like Chain - Kratky et Porod, 1949). Ici, le polymère est considéré comme une chaîne isotrope semi-flexible caractérisée par sa longueur de persistance qui est définie comme la longueur au bout de laquelle les corrélations sur la direction sont perdues. Pour une longueur de polymère *L*, on paramètre la trajectoire (voir figure 5.1) par l'abscisse curviligne $s \in [0, L]$, le vecteur unitaire tangent à la trajectoire u(s) et l'angle $\theta(s)$ entre le vecteur tangent à la trajectoire et une direction de référence (ici Ox). De plus, R est le vecteur distance bout à bout de la chaîne.



FIG. 5.1 Paramétrisation de la chaîne polymère dans le modèle du ver

En théorie élastique linéaire, l'énergie élastique de courbure E_{el} , dans le cas où le désordre structurel est absent (pour un polymère intrinsèquement droit), est donnée par :

$$\frac{E_{el}}{kT} = \frac{A}{2} \int_{s}^{s'} \left[\frac{\partial}{\partial s} \theta(v) \right]^{2} dv$$

où A désigne le module élastique de courbure.

Aussi, dans le modèle du ver, la fonction de corrélation à 2 points entre les vecteurs tangents suit une loi de décroissance exponentielle avec une longueur caractéristique l_p qui est la longueur de persistance :

$$< u(s).u(o) > = < \cos \theta(s) > = e^{-\frac{s}{l_p}},$$

avec $l_p = A$ module élastique de courbure.

Il est également possible d'accéder à la longueur de persistance en calculant la valeur moyenne de R^2 sur les différentes configurations de la chaîne.

$$\mathbf{u}_{R} = \int_{0}^{L} \frac{\mathbf{r}}{u(s)ds} \text{ d'où, si on considère des configurations en 3D :}$$

$$\langle \mathbf{R}^{2} \rangle_{3D} = \int_{0}^{L} ds \int_{0}^{L} \langle \mathbf{u}(s) . \mathbf{u}(s') \rangle ds$$
$$= \int_{0}^{L} ds \int_{0}^{L} e^{-\frac{|s-s'|}{l_{p}}}$$
$$= 2l_{p} L \left(1 - \frac{l_{p}}{L} \left(1 - e^{-\frac{L}{l_{p}}} \right) \right)$$

Ainsi, dans la limite $L >> l_p$, on a :

$$< R^2 >_{3D} \sim 2l_p L$$

Pour des chaînes polymères à l'équilibre en 2 dimensions, on obtient de la même manière :

$$\langle \mathbf{R}^2 \rangle_{2D} = 4 l_p L \left(1 - \frac{2l_p}{L} \left(1 - e^{-\frac{L}{2l_p}} \right) \right)$$

Dans la limite $L >> l_p$, on a cette fois :

$$< R^2 >_{2D} \sim 4 l_p L$$

Pour des chaînes polymères cinétiquement piégées sur une surface au lieu d'être à l'équilibre, Rivetti et al. (1996) proposent de considérer la projection sur la surface de la conformation dans le volume :

$$< R^2 >_{\text{proj}} = < Rx^2 > + < Ry^2 > = \frac{2}{3} < R^2 >_{3D}$$

Dans la limite $L >> l_p$, on a par conséquent :

$$\langle R^2 \rangle_{\rm proj} = \frac{4}{3} l_{\rm p} L$$

Cependant, il faut remarquer que la projection considérée implique une perte conséquente de la longueur du contour de la chaîne.

Dans la suite, on analyse les valeurs de $\langle R^2 \rangle$ pour les chaînes de PSS sur le mica et la bicouche lipidique en se basant sur les modèles présentés.

5.2 Longueur de persistance des chaînes de PSS sur le mica

On considère ici les chaînes linéaires : f = 0.92 étendues à plat sur le mica (en présence de 2mM d'ions divalents Mg²⁺ - cf 3.2.2). Nous pouvons mesurer la distance bout à bout : Ret la longueur curviligne : L à l'aide de l'outil de mesure de longueur du programme Nanoscope. On procède de la sorte pour 400 chaînes. Puis, on calcule $\langle R^2 \rangle$ en fonction de Len considérant les chaînes dont les longueurs sont comprises dans des intervalles de 10nm (cela revient à moyenner sur une vingtaine de valeurs de R). Le résultat est représenté sur la figure 5.2 (cercles).



FIG. 5.2 Variation de $\langle R^2 \rangle$ en fonction de *L* pour 400 chaînes linéaires : f = 0.92Les valeurs mesurées sont représentées par des cercles. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur type. La courbe continue (rouge) représente une interpolation par le modèle du ver pour des chaînes à l'équilibre thermodynamique en 2D. On trouve de cette façon : $l_{p \text{ WLC}} = 12 +/-1$ nm. Enfin, la courbe en pointillées représente $\langle R^2 \rangle_{\text{proj}}$ calculé pour $l_p = 12$ nm (cf discussion ci-après).

L'interpolation des valeurs obtenues par l'équation du modèle du ver pour des chaînes à l'équilibre thermodynamique en 2D ($\langle R^2 \rangle_{2D}$ – cf 5.1) donne : $l_{p WLC}$ = 12 +/- 1nm (courbe en rouge).

Parallèlement, nous pouvons calculer la longueur de persistance des chaînes en solution à l'aide du modèle d'Odijk, Skolnick et Fixman (modèle « OSF » - cf 1.1) :

$$l_{\rm p \ OSF} = l_0 + \frac{\eta^2 \ l_{\rm b}}{4\kappa^2},$$

avec $l_0 \sim 10$ angströms la longueur de persistance du polystyrène, η la densité de charge par unité de longueur de la chaîne, l_b (= 7.12 angströms) la longueur de Bjerrum et κ^{-1} la longueur de Debye-Hückel. La longueur de Debye-Hückel est par ailleurs donnée par :

$$\kappa^{-1} = (4 \pi l_b I)^{-1/2}$$

avec $I = \sum_{i} z_i^2 c_i$ où z_i et c_i sont respectivement la valence et la concentration de l'espèce i.

Ici on suppose que les contreions sont condensés sur la chaîne, par conséquent : $\eta = \eta_c = l_b^{-1}$ (cf 1.1). Pour le calcul de κ , on tient compte de la concentration en contreions d'origine (C_{Na+} = C_{polymères} = 10⁻⁵ M) ainsi qu'en ions divalents libres dans la solution (2mM MgCl₂, concentration à laquelle il faut soustraire les ions divalents condensés sur les chaînes : C_{polymères} × $\eta_c \times b$). On trouve alors : l_p OSF ~ 12 +/- 1 nm.

Ainsi, nous voyons que la conformation des chaînes de PSS sur la surface est comparable à une situation d'équilibre thermodynamique avec la longueur de persistance en solution déterminée par le modèle OSF.

Toutefois, il faut émettre deux remarques importantes. Tout d'abord, le modèle OSF est normalement conçu pour des polyélectrolytes rigides à longueur de persistance sans les charges (l_0) assez élevée (tel que l'ADN). En effet, la formule utilisée n'est applicable que sous la condition : l_p OSF × κ >> 1. Or ici, on est à la limite du domaine de validité car :

$$l_p \text{ OSF} \times \kappa \sim 2.4.$$

Par ailleurs, nos observations de chaînes sur la surface révèlent qu'elles sont quasiment immobiles (même après plusieurs heures), ce qui signifie qu'elles ne sont pas rigoureusement à l'équilibre thermodynamique. Néanmoins, nous avons constaté que les chaînes se superposent rarement (cf 3.2.2). De plus, $\langle R^2 \rangle$ ne correspond pas à $\langle R^2 \rangle_{proj}$ calculé pour $l_p = l_p$ _{OSF} =12nm (voir figure 5.2). Ainsi, on peut penser que les chaînes ont été capables de relaxer pour atteindre une position proche de l'équilibre avant de se retrouver immobilisées sur la surface.

Il faut remarquer que Rivetti et al. (1996) ont observé un comportement similaire pour des chaînes d'ADN adsorbées sur le mica dans les même conditions (en présence de 2mM MgCl₂). Les chaînes sont en effet étendues sur la surface sans se croiser, et la variation de $\langle R^2 \rangle$ en fonction de *L* correspond à la fonction $\langle R^2 \rangle_{2D}$ avec la longueur de persistance de l'ADN en solution (53nm – cette valeur étant déterminée par des expériences indépendantes). Les auteurs en concluent que les molécules sont dans une conformation telle qu'à l'équilibre en 2D. L'explication proposée pour cette conformation est que l'interaction des chaînes avec la surface (via les ions Mg²⁺) est suffisamment faible pour autoriser la relaxation des molécules dans le plan.

En revanche, les auteurs montrent que quand la surface est rincée abondamment à l'eau avant d'y déposer l'ADN (en l'absence de Mg^{2+}), les chaînes s'adsorbent avec des conformations plus compactes et de nombreux croisements. Dans ce cas, les valeurs de $\langle R^2 \rangle$ obtenues sont proches de $\langle R^2 \rangle_{proj}$, ce qui montre que la conformation résulte cette fois d'une projection brutale sur la surface qui ne laisse aucune possibilité de relaxation dans le plan. L'explication de ce comportement proviendrait du remplacement des contreions de la surface par des ions H⁺ lors du rinçage. Les ions H⁺ étant plus petits que les ions Mg²⁺, ils se fixent mieux aux cavités hexagonales du mica avec pour conséquence une interaction ADN-surface plus forte. Par conséquent, la cinétique de relaxation des molécules sur la surface est bloquée.

Ainsi, il pourra être intéressant à l'avenir d'étudier le comportement des chaînes de PSS sur le mica lorsqu'un tel traitement (rinçage de la surface à l'eau) est employé.

5.3 Longueur de persistance des chaînes de PSS sur la bicouche lipidique

La conformation des chaînes de PSS sur la bicouche lipidique (quelle que soit la fraction de lipides cationiques de cette dernière) est plus étendue que lors des expériences sur le mica, comme le montre la figure 5.3.



FIG. 5.3 Comparaison des chaînes de PPS fortement chargées sur le mica (a et c) et sur la bicouche lipidique (b et d)

Sur le mica, les chaînes font de nombreux détours alors qu'elles sont au contraire relativement droites localement sur la bicouche.

Il est important de remarquer qu'on observe la même différence de comportement quand les chaînes s'adsorbent simultanément sur la bicouche et sur le mica (dans les trous de la bicouche) pour un seul et même échantillon (cf 4.3.2). Par conséquent, même en partant d'une situation identique en volume, les chaînes s'adsorbent avec une conformation plus étendue sur la bicouche que sur le mica.

Nous pouvons mesurer $\langle R^2 \rangle$ et *L* (cette fois à l'aide du programme Visilog - voir annexe) pour un ensemble statistique de chaînes linéaires étendues à plat sur une bicouche : DPTAP/DPPC 1 : 9. Cette fois, on considère d'une part les chaînes linéaires : f = 0.92, d'autre part les chaînes linéaires : f = 0.67. Comme précédemment, $\langle R^2 \rangle$ est calculé en considérant les chaînes dont les longueurs sont comprises dans des intervalles de 10nm. Cela revient à moyenner sur une quinzaine de valeurs de *R* pour les chaînes : f = 0.92 (300 chaînes) et sur 20 à 300 valeurs de *R* pour les chaînes : f = 0.67 (1500 chaînes). Le résultat est représenté sur la figure 5.4.





Les courbes de couleur correspondent aux interpolations par le modèle du ver pour des chaînes à l'équilibre thermodynamique en 2D. On trouve ainsi : $l_{p \text{ WLC}}(0.92) = 34 \text{ +/- }1 \text{ nm et } l_{p \text{ WLC}}(0.67) = 19 \text{ +/- }1 \text{ nm}$

On interpole dans chaque cas les valeurs obtenues par le modèle théorique des chaînes à l'équilibre en 2D (la fonction $\langle R^2 \rangle_{2D}$), ce qui donne deux valeurs de persistance différentes : $l_p (f = 0.92) = 34 + l - 1$ nm et $l_p (f = 0.67) = 19 + l - 1$ nm.

Une fois encore, il faut noter que les polymères ne sont pas strictement à l'équilibre thermodynamique car les chaînes isolées sont relativement immobiles sur la surface (cf 4.3.2). Cependant, on observe des changements de conformation sous l'effet d'interactions intermoléculaires (cf 4.3.3), ce qui montre que les chaînes ont la possibilité de relaxer pour adopter une conformation proche de l'équilibre à 2D.

Ici, l'absence de sel ajouté en solution, et la présence de molécules de Tris et de contreions des lipides font qu'on ne peut pas calculer la longueur de persistance des chaînes en volume de façon fiable. On est donc ramené à la seule comparaison de la conformation des chaînes sur la bicouche et sur le mica. Si on suppose que la conformation sur le mica est toujours proche de l'équilibre thermodynamique à 2D avec la longueur de persistance en solution (cf 5.2), cela signifie que l'adsorption sur la bicouche a pour effet d'augmenter la longueur de persistance des chaînes.

Un tel phénomène peut résulter de la discontinuité de la constante diélectrique entre la solution ($\mathcal{E} \sim 80$) et la surface ($\mathcal{E}' \sim 2$). En effet, le potentiel électrostatique des polyélectrolytes à proximité de la surface peut dans ce cas être calculé en tenant compte des charges des chaînes plus des charges images (de même signe) qui leurs sont symétriques par rapport à la surface. Il en résulte que les interactions électrostatiques sont multipliées par un facteur 2, de telle sorte que la courbure des chaînes requiert une énergie double. Netz et al. (1999) ont calculé explicitement la longueur de persistance effective l_{eff} dans un tel cas de figure :

$$l_{eff} \sim 2l_{pOSF} \left(1 - \frac{\varepsilon'}{6\varepsilon} + \frac{\varepsilon'}{\varepsilon} \ln(2l_{pOSF}\kappa) \right).$$

On trouve une multiplication de la longueur de persistance en solution (l_p OSF) par un facteur 2 lorsque les termes correctifs sont négligés (pour $C'/C \ll 1$).

Par ailleurs, la différence observée entre les longueurs de persistance des chaînes : f = 0.92 et f = 0.67 est en accord avec un phénomène de relarguage des contreions condensés dans la solution au moment où les chaînes s'adsorbent sur la surface chargée. En effet, en l'absence des contreions condensés, la longueur de persistance des deux types de chaînes est proportionnelle au carré de leur taux de charge (d'après le modèle OSF). Pour les chaînes : f = 0.92 et f = 0.67, il en résulte un facteur environ égal à 2 entre les longueurs de persistance, proche du facteur ~1.8 obtenu.

5.4 Résumé des principaux résultats

Dans cette étude, nous voyons que la connaissance de la longueur de persistance des chaînes adsorbées peut nous renseigner sur la nature des interactions avec la surface. Ainsi, en présence de MgCl₂, le PSS s'adsorbe sur le mica avec une conformation proche d'une situation d'équilibre avec la longueur de persistance des chaînes dans le volume : $l_p = 12nm$ (d'après le modèle OSF). Ce comportement est comparable à celui de l'ADN dans les mêmes conditions (Rivetti et al. 1996).

Sur la bicouche lipidique en revanche, les chaînes sont plus étendues que sur le mica. On propose que l'augmentation de la longueur de persistance soit due à la faible constante diélectrique de la surface, laquelle impose de prendre en compte les charges images dans la détermination de la courbure des chaînes. Il en résulte que la longueur de persistance peut être multipliée par un facteur 2. Par ailleurs, on remarque que la longueur de persistance augmente avec le taux de charge des chaînes, en accord avec un phénomène de relarguage des contreions condensés dans la solution. Ce phénomène pourrait conduire à une augmentation encore plus importante de la longueur de persistance des chaînes.

Conclusion générale et perspectives

Nous avons étudié l'adsorption et la conformation de chaînes de PSS linéaires et cycliques sur une membrane lipidique cationique et sur le mica par AFM en solution. Sur le mica, les chaînes s'adsorbent en s'étendant à plat sur la surface en présence d'ions Mg²⁺. L'analyse statistique des chaînes suggère que, bien qu'étant immobilisées sur la surface, leur conformation est telle qu'à l'équilibre thermodynamique en 2D avec la longueur de persistance en solution (12nm – calculée d'après le modèle d'Odijk, Skolnick et Fixman). Quand la concentration augmente, on n'observe aucune organisation de la couche adsorbée. Les chaînes s'adsorbent sur la bicouche lipidique avec une conformation plus étendue que sur le mica, ce qui peut résulter d'un effet de charge image dû à la discontinuité des constantes diélectriques entre le solvant et la surface, ainsi que du phénomène de relarguage des contreions condensés dans la solution. Pour une concentration suffisante en polymères, il se forme une monocouche dont la densité est proportionnelle à la fraction en lipides cationiques. Lorsque la densité est élevée, on observe des domaines très ordonnés où les chaînes (linéaires ou cycliques) sont alignées dans la même direction. De plus, des chaînes peuvent s'adsorber par-dessus la monocouche en s'orientant dans la direction des chaînes inférieures. Nous avons étudié en parallèle l'adsorption d'ADN circulaire sur la bicouche lipidique. On montre notamment qu'en présence d'une certaine quantité de sel (monovalent ou divalent) la couche d'ADN se condense brutalement, ce que nous n'avons pas observé pour le PSS.

Une partie importante de ce travail consistait à observer comment la structure des chaînes de PSS change en fonction de leur fraction de charge (sur le mica et sur la bicouche lipidique). On observe que, quand on augmente le taux de charge, les chaînes passent d'une conformation en globule à une conformation étendue avec, pour une fraction intermédiaire (les anneaux : f = 0.6), une conformation en collier de perles. Les perles sont piégées sur le mica mais peuvent fluctuer sur une monocouche dense de chaînes. Aussi, cette structure disparaît sur la bicouche en laissant les anneaux étendus, ce qui peut être causé par un phénomène d'étalement sur la surface chargée (Borisov et al. 2001). Ainsi, ces observations sont en accord avec le modèle du collier de perles tout en montrant le rôle important joué par les interactions avec la surface. Ces dernières peuvent en effet selon les cas maintenir la dynamique de la structure (sur la monocouche dense de chaînes), conduire à son piégeage (sur le mica) ou encore provoquer la disparition des perles (sur la bicouche lipidique).

Suite à ce travail, on peut envisager plusieurs perspectives. Tout d'abord, on pourra compléter l'étude du PSS et de l'ADN en s'intéressant par exemple aux aspects suivants :

- L'effet d'un changement de solvant (mauvais solvant) sur la structure des chaînes de PSS.
- Le comportement d'anneaux d'ADN individuels et de leurs propriétés de surenroulement.
- L'adsorption des polyélectrolytes sur une bicouche lipide cationique réalisée par la technique de Langmuir Blodget (cette technique pourrait permettre d'étudier des densités de charge plus élevées que celles que nous avons utilisées en contournant le problème de la formation de domaines dans la bicouche).
- La formation de complexes : PSS bicouches cationiques en volume.

Aussi, en utilisant les connaissances acquises, on pourra étudier le comportement en surface de molécules présentant d'autres géométries :

- Des polyélectrolytes en anneaux noués.
- Des polyélectrolytes en peigne ou en étoile.

Enfin, nous citons un travail commencé dans le cadre d'une coopération avec l'université de Constance mais qui n'a pas donné suffisamment de résultats pour figurer dans cette thèse. Le sujet pourra être approfondi ultérieurement :

 La visualisation par microscopie de fluorescence confocale de l'ADN adsorbé sur un colloïde chargé positivement (ceci permettrait d'étudier l'adsorption de polyélectrolyte sur une surface chargée de géométrie sphérique).

Bibliographie

- Baigl D. **1996**. Etude Expérimentale de polyélectrolytes hydrophobes modèles. Thèse de doctorat.
- Bezanilla M, Drake B, Nudler E, Kashlev M, Hansma PK, Hansma HG. **1994**. Motion and enzymatic degradation of DNA in the atomic force microscope. *Biophys. J.* 67 : 2454-2459
- Binning G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E. 1982. Surface Studies by Scanning Tunneling *Microscopy. Phys. Rev. Lett.* 49:57
- Binning G, Quate CF, Geber C. 1986. Atomic Force Microscope. Phys. Rev. Letters. 56: 930

Bloomfield VA. 1998. DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers*. 44: 269-282

- Bonekamp BC, Alvarez RH, Nieves FJD, Bijsterbosch BH. **1987**. TheEffect of Adsorbed Charged Polypeptides on the Electrophoretic Mobility ofPositively and Negatively Charged Polystyrene Lattices. *Journal of Colloid and Interface Science* 118 : 366-371
- Borisov OV, Hakem F, Vilgis TA, Joanny J-F, Johner A. **2001**. Adsorption of hydrophobic polyelectrolytes onto oppositely charged surfaces. *Eur. Phys. J. E* 6 : 37-47
- Bornside D, Macosko CW, Scriven LEJ. 1987. On the modeling of spin coating. *Imaging Technol.* 13:122
- Borukhov I, Lee KC, Bruinsma RF, Gelbart WM, Liu AJ, Stevens MJ. **2002**. Association of two semiflexible polyelectrolytes by interchain linkers : Theory and simulations. *Journal of Chemical Physics* 117 : 462-480
- Boué F, Cotton J-P, Lapp A, Jannink G. **1994**. A direct measurement of the polyion conformation in aqueous solutions at différent temperatures. Small angle neutron scattering of PSSNa using zero average and full contrast. *J. Chem. Phys.* 101 : 2562
- Brown S, Szamel G. **1998**. Structure and dynamics of ring polymers. *Journal of Chemical Physics* 108 : 4705 ; 109 : 6184
- Buikema AL. 2004. Image trouvée sur le site internet :

http://www.bioinquiry.vt.edu/bioinquiry/water/waterpaid/waterhtmls/main.html

- Chodanowski P, Stoll S. **1999**. Monte-Carlo Simulations of hydrophobic Polyelectrolyte. Evidence of complex configurational transitions. *J. Chem. Phys.* **111** : 6969-6081
- Clausen-Schaumann H, Gaub HE. **1999**. DNA Adsorption to Laterally Structured Charged Lipid Membranes. *Langmuir* 15 : 8246-8251
- Combet J, Rawiso M, Boué F. Article à paraître sur les résultats des expériences aux rayons X et aux neutrons pour la structure en collier de perles du PSS.
- Cowman MK, Spagnoli C, Kudasheva D, Li M, Dyal A, Kanai S, Balazs EA. 2005. Hyaluronan Conformations by AFM. *Biophysical Journal* 88: 590–602
- Crothers DM, Zimm BH. **1965**. Viscosity and sedimentation of the DNA from bacteriophages T2 and T7 and the relation to molecular weight. *J. Mol. Biol.* 12 : 525-536
- de Gennes P–G. **1971**. Concept de reptation pour une chaîne polymérique. *J. Chem. Phys.* 55 : 572
- de Gennes P-G. **1979**. Scaling concepts in polymer physics. Ithaca, NY: Cornell University Press
- de la Cruz MO, Belloni L, Delsanti M, Dalbiez JP, Spalla O, Drifford M. **1995**. Precipitation of highly charged polyelectrolyte solutions in the presence of multivalents salts. *J. Chem. Phys.* 103 : 5781
- Decher G. **1997**. Fuzzy nanoassemblies : toward layered polymeric moticomposites. *Science* 277 : 1232-7

- Dobrynin AV, Colby RH, Rubinstein M. **1995**. Scaling theory of polyelectrolyte solutions. *Macromolecules* 28 : 1859–71
- Dobrynin AV, Rubinstein M, Obukhov SP. **1996**. Cascade of Transitions of Polyelectrolytes in Poor Solvent. *Macromolecules* 29 : 2974-2979
- Dobrynin AV, Rubinstein M. **1999**. Hydrophobic Polyelectrolytes. *Macromolecules* 32 : 915-922
- Dobrynin AV, Deshkovski A, Rubinstein M. 2000. Adsorption of Polyelectrolytes at an Oppositely Charged Surface. *Physical Review Letters*. 84 : 3101-3104
- Dobrynin AV, Rubinstein M. 2002. Adsorption of Hydrophobic Polyelectrolytes at Oppositely Charged Surfaces. *Macromolecules* 35 : 2754-2768
- Doi M, Edwards SF. 1986. The Theory of Polymer Dynamics. Oxford University Press, Oxford
- Douglas JF, Schneider H, Frantz P, Lipman R, Granick S. **1997**. Origin and Characterization of Conformational Heterogeneity in Adsorbed Polymer Layers. *J. Phys. Condens. Matter* 9 : 7699
- Ederle Y, Naraghi KS, Lutz PJ. **1999**. Synthesis of Cyclic Macromolecules. In : *Synthesis of Polymers Materials Science and Technology. A Comprehensive Treatment*. Edited by Cahn RW, Haasen P, Kramer EJ
- Essafi W, Lafuma F, Williams CE. **1993**. Structure of polyelectrolytes solutions at intermediate charge densities. *Macroion characterization from dilute solutions to complex fluids*. ACS Symposium Series 548. K.S. Schmitz Ed. chp. 21
- Essafi W, Lafuma F, Williams CE. **1995**. Effect of solvent quality on the behaviour of highly charged polyelectrolytes. *J. Phys. II* 5 : 1269
- Essafi W. 1996. Structure des polyélectrolytes fortement chargés. Thèse de doctorat
- Essafi W, Lafuma F, Baigl D, Williams CE. **2005**. Anomalous couterion condensation in saltfree hydrophobic polyelectrolyte solutions : Osmotic pressure measurements. *Europhysics Letters* 71 : 938-944
- Evenstein Y, Nahum E, Banin U. **2002**. Tapping Mode Atomic Force Microscopy for Nanoparticle Sizing : Tip-Sample Interaction Effects. *Nano Letters* 2 : 945-950
- Fang Y, Yang J. **1997**. Effect of Catonic Strength and Species on 2D Condensation of DNA. *The Journal of Physical Chemistry B*. 101 : 18
- Fang Y, Yang J. 1997. Two-dimensional Condensation of DNA Molecules on Cationic Lipid Membranes. J. Phys. Chem. B 101: 441-449
- Giessible FJ. **1995**. Atomic Resolution of the Silicon (111) (7x7) Surface by Atomic Force Microscopy. *Science* 267 : 68
- Ha BY, Thirumalai D. **1995**. Electrostatic Persistence Length of a Polyelectrolyte Chain. *Macromolecules* 28: 577
- Hansma HG, Laney DE. **1996**. DNA binding to mica correlates with cationic radius : assay by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 70 : 1933-1939
- Haralick RM, Sternberg SR, Zhuong X. **1987**. Image Analysis using Mathematical Morphology. *IEEE PAMI* 9 : 532-550
- Hayter JB, Penfold J. **1981**. An analytic structure factor for macroion solutions. *Molecular Physics* 42 : 109-118
- Hud NV, Downing KH. **2001**. Cryoelectron microscopy of lambda phage DNA condensates in vitreous ice : The fine structure of DNA toroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 : 14925-14930
- Jass J, Tjärnhage T, Puu G. 2000. From Liposomes to Supported, Planar Bilayer Structures on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces: An Atomic Force Microscopy Study. *Biophys.* J. 79 : 3153-3163

Bibliographie

- Johnson JM, Ha T, Chu S, Boxer SG. **2002**. Early steps of supported bilayer formation probed by single vesicle fluorescence assays. *Biophys. J.* 83 : 3371-3379
- Kantor Y, Kardar M. 1994. Excess Charge of Polyampholytes. Phys. Rev. E 49: 1383
- Kantor Y, Kardar M. 1995. Instabilities of Charged Polymers. Phys. Rev. E 51: 1299
- Kiriy A, Gorodyska G, Minko S, Jaeger W, Stepanek P, Stamm M. 2002. Cascade of Coil-Globule Conformational Transitions of Single Flexible Polyelectrolyte Molecules in Poor Solvent. J. Am. Chem. Soc. 124 : 13454-13462
- Kirwan LJ, Papastavrou G, Borkovec M, Behrens SH. **2004**. Imaging the Coil-to-Globule Conformational Transition of a Weak Polyelectrolyte by Tuning the Polyelectrolyte Charge Density. *Nano Letters* 4 : 149-152
- Koltover I, Wagner K, Safinya CR. 2000. DNA condensation in two dimensions. *PNAS* 97 : 14046–14051
- Kratky O, Porod G. **1949**. Röntgenuntersuchung gelöster Fadenmoleküle. *Rec. Trav. Chim.* 68 : 1106-1123.
- Kuhle A, Sorensen AH, Bohr JJ. **1997**. Role of attractive forces in tapping tip force microscopy. J. Appl. Phys. 81 : 6562
- Kumaki J, Nishikawa Y, Hashimoto T. **1996**. Visualization of single-chain conformations of a synthetic polymer with atomic force microscopy. *JACS* 118 : 3321
- Lecuyer S. **2006.** Fluctuation et déstabilisation d'une bicouche lipidique supportée. Thèse de doctorat.
- Levy D, Chami M, Rigaud J-L. **2001**. Two-dimensional crystallization of membrane proteins : the lipid layer strategy. *FEBS Letters* 504 : 187-193
- Limbach H-J, Holm C, Kremer K. 2002. Structure of polyelectrolytes in poor solvent. *Europhys. Lett.* 60 : 566
- Limbach H-J, Holm C. 2003. Single chain properties of polyelectrolytes in poor solvent. J. *Phys. Chem. B.* 107: 8041-8055
- Lord Rayleigh. 1882. Philos. Mag. 14: 182
- Lyubchenko YL, Gall AA, Shlyakhtenko L, Harrington RE, Jacobs BL, Oden PI, Linday SJ **1992**. Atomic force microscopy imaging of double stranded DNA and RNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 10 : 589-606
- Lyubchenko YL, Shlyakhtenko LS. **1997.** Visualization of supercoiled DNA with atomic force microscopy in situ. *Biophysics.* 94 : 496-501
- Lyulin AV, Dünweg B, Borisov OV, Darinskii AA. **1999**. Computer Simulation Studies of a Single Polyelectrolyte Chain in Poor Solvent. *Macromolecules* 32 : 3264
- Magonov S, Yerina N. Modern Trends in Atomic Force Microscopy of Polymers. Veeco Instruments.
- Mahoney W, Schaefer DM, Patil A, Andres RP, Reifenberger R. **1994**. Substrate Induced Deformation of Nanometer Size Gold Clusters Studied by Non Contact AFM and TEM. *Surf. Sci.* 316 : 383
- Maier B, Rädler JO. **1999.** Conformation and Self-Diffusion of Single DNA Molecules Confined to Two Dimensions. *Physical Review Letters*. 82 : 1991-1914
- Majewski J, Wong JY, Park CK, Seitz M, Israelachvili JN, Smith GS. **1998**. Structural studies of polymer-cushioned lipid bilayers. *Biophys. J.* 75 : 2363-2367
- Makowski HS, Lundberg RD, Singhal GS. **1975**. U.S. Patent 3870841 to Exxon Research and Engineering Company
- Manning GS. **1969**. Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions. *J. Chem. Phys.* 51 : 924-939
- Martin Y, Williams CC, Wickramasinghe HK. **1987**. Atomic Force Microscope Force Mapping and Profiling on a sub 100Å scale. J. Appl. Phys. 61 : 4723

- McConnell HM, Watts TH, Weis RM, Brian AA. **1986**. Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system. *Biochim. Biophys. Acta*. 864
- McKenna GB, Flynn KM, Chen YH. **1989**. Experiments on the Elasticity of Dry and Swollen Networks. *Macromolecules* 22 : 1834
- McKiernan AE, Ratto TV, Longo ML. **2000**. Domain Growth, Shapes, and Topology in Cationic Lipid Bilayers on Mica by Fluorescence and Atomic Force Microscopy. *Biophys J* 79 : 2605-2615
- McLeish T. 2002. Polymers without beginning or end. Science 297
- Michael SF. **2006**. More than a feeling : the AFM is enabling engineers to understand mechanical systems at the most basic level. *Mechanical Engineering* CIME
- Micka U, Holm C, Kremer K. **1999**. Strongly charged, flexible polyelectrolytes in poor solvents a molecular dynamics study. *Langmuir* 15 : 4033
- Micka U, Kremer K. 2000. Strongly Charged Flexible Polyelectrolytes in Poor Solvents from Stable Spheres to Necklace Chains. *Europhys. Lett.* 49 : 189
- Miranda PB, Xu L, Shen YR, Salmeron M. **1998**. Icelike Water Monolayer Adsorbed on Mica at Room Temperature. *Phys. Rev. Letters* 81 : 5876-5879
- Mou J, Czajkowsky DM, Zhang Y, Shao Z. **1995**. High-resolution atomic-force microscopy of DNA : the pitch of the double helix. *FEBS Letters* 371: 279-282
- Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Wescott WC. **1962**. Reconstitution of Cell Membrane Structure *in vitro* and its Transformation into an Excitable System. *Nature* 194
- Netz RR, Joanny J-F. **1999**. Adsorption of Semiflexible Polyelectrolytes on Charged Planar Surfaces : Charge Compensation, Charge Reversal, and Multilayer Formation. *Macromolecules* 32 : 9013-9025
- Netz RR, Orland H. **1999.** Variational Theory for a Single Polyelectrolyte Chain. *European Physical Journal B.* 8 : 81
- Nguyen TT, Rouzina I, Shklovskii BI. **2000.** Reentrant Condensation of DNA induced by Multivalent Counterions. J. Chem. Phys. 112 : 2562
- Nishimura S, Biggs S, Scales PJ, Healy TW, Tsunematsu K, Tateyama T. **1994**. Molecular-Scale Structure of the Cation Modified Muscovite Mica Basal Plane. *Langmuir* 10 : 4554-4559
- O'Shaughnessy B, Vavylonis D. 2003. Irreversibility and Polymer Adsorption. *Physical Review Letters* 90:5
- Odijk TJ. 1977. Polyelectrolytes near the rod limit. Polym. Sci. Polym. Phys. 15: 477-483
- Ohki S, Ohshima H. **1999**. Interaction and aggregation of lipid vesicles (DLVO theory vs Modified DLVO theory). *Colloid Surf. B : Biointerfaces* 14
- Oosawa, F. 1971. Polyelectrolytes. Dekker, New York
- Pashley RM. **1981.** DLVO and hydration forces between mica surfaces in Li+, Na+, K+ and Cs+ electrolyte solutions: A correlation of double-layer and hydration forces with surface cation exchange properties. *Journal of Colloid and Interface Science*. 83 : 531-546
- Rädler JO, Koltover I, Jamieson A, Salditt T, Safinya CR. **1998**. Structure and Interfacial Aspects of Self-Assembled Cationic Lipid-DNA Gene Carrier Complexes. *Langmuir* 14 : 4272-4283
- Rädler JO, Koltover I, Salditt T, Safinya CR, **1997**. DNA Intercalation in Multilamellar Membranes in Distinct Interhelical Packing Regimes. *Science* 275
- Ragnetti M, Geiser D, Höcker H, Oberthür RC. **1985**. Small angle neutron scattering (SANS) of cyclic and linear polystyrene in toluene. *Makromol. Chem.* **186** : 1701
- Rapuano R, Carmona-Ribeiro AM. 2000. Supported Bilayers On Silica. J. Colloid Interface Sci. 226
Rasa M, Kuipers BWM, Philipe AP. **2002**. Atomic force microscopy and magnetic force microscopy study of model colloids. *J. Colloid Interface Sci.* 250 : 303

- Reif L, Höcker H. **1984**. Kinetics and thermodynamics of the metathesis reaction of cycloolefins. II: Molecular weight distribution. *Macromolecules* 17:952
- Reimhult E, Höök F, Kasemo B. **2003**. Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: Influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure. *Langmuir* 19 : 1681-1691
- Rempp P, Strazielle C, Lutz PJ. **1987**. Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 2nd ed. 9 : 183
- Reviakine I, Brisson A. **2000**. Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir* 16 : 1806-1815
- Richter R, Mukhopadhyaya A, Brisson A. **2003**. Pathways of Lipid Vesicle Deposition on Solid Surfaces: A Combined QCM-D and AFM Study. *Biophys. J.* 85 : 3035-3047
- Rivetti C, Guthold M, Bustamante C. 1996. Scanning Force Microscopy of DNA Deposited onto Mica : Equilibration versus Kinetic Trapping Studied by Statistical Polymer Chain Analysis. J. Mol. Biol. 264 : 919-932
- Sackmann E. 1996. Supported membranes : scientific and practical applications. Science 271
- Santier B, Breffa C, Félix O, Decher G. **2004**. In Situ Investigations of the Formation of Mixed Supported Lipid Bilayers Close to the Phase Transition Temperature. *Nano Letters* 4
- Sauerbrey G. **1959**. The use of quartz oscillators for weighing thin layers and formicroweighing. *Zeitschrift fuer Physik* 155: 206-222
- Schmalz G. **1929**. Uber Glätte und Ebenheit als Physikalisches und physiologishes Problem. *Zeitschrift des Vereines deutscher Ingenieure*. 1461-1467
- Schneider HM, Frantz P, Granick S. **1996**. The bimodal energy landscape at polymer-solid interfaces. *Langmuir* 12 : 994
- Schosseler F. Module de corrélation spatiale sur les pixels développé dans le programme publique Image J
- Schumann GL. Image trouvée sur le site internet : http://www.apsnet.org/education/K-12PlantPathways/TeachersGuide/Activities/DNA_Easy/exercisepg1.htm
- Serra J. 1983. Image Analysis and Mathematical Morphology. Academic Press.
- Shaughnessy BO, Vavylonis D. 2003. Irreversibility and Polymer Adsorption. *Phys. Rev. Lett.* 90:0561031
- Singh S, Keller DJ. **1991**. Atomic force microscopy of supported planar membrane bilayers. *Biophys. J.* 60 : 1401-1410
- Skolnick J, Fixman M. **1977**. Electrostatic persistence length of a wormlike polyelectrolyte. *Macromolecules* 10: 944-948
- Spagnoli C, Loos K, Ulman A, Cowman MK. **2003**. Imaging Structured Water and Bound Polysachharide on Mica Surface at Ambiant Temperature. J. Am. Chem. Soc. 125 : 7124-7128
- Spiteri M-N. **1997**. Conformation et arrangement des polyélectrolytes en solution semi-diluée. Etude par diffusion des neutrons aux petits angles. Thèse de doctorat.
- Sukhishvili SA, Joachim YC, Müller D, Gratton E, Schweizer KS, Granick S. **2000**. Diffusion of a polymer "pancake". *Nature* 406
- Tanigawa M, Machida M, Okada T. **1997**. Hi Resolved AFM Measurement of DNA and DNA-protein complex. Mini Review. CCAB
- Villarubia JS. **1994.** Morphological Estimation of Tip Geometry for Scanned Probe Microscopy. *Surf. Sci.* 321 : 287

Rayleigh. 1882. Philos. Mag. 14: 185

- Weill A, Dechenaux E. **1988**. The spin-coating process mechanism related to polymer solution properties. *Polym. Eng. Sci.* 28 : 945
- Wilschut J, Düzgünes N, Papahadjopoulos D. **1981**. Studies on the mechanism of membrane fusion: Kinetics of Ca²⁺-induced fusion of phosphatidylserine vesicles followed by a new assay for mixing of aqueous vesicle contents. *Biochemistry* 19 : 6021-6029
- Wong GCL, Tang JX, Lin A, Li Y, Janmey PA, Safinya CR. **2000**. Hierarchical Self-Assembly of F-Actin and Cationic Lipid Complexes : Stacked Three-Layer Tubule Networks. *Science* 288
- Yang J, Wang L, Camerini-Otero RD. **1996**. The close-packing and the pitch-variance of membrane-bound DNA in solution. *Nanobiology* 4 : 93-100
- Yang L, Liang H, Angelini TE, Butler J, Coridan R, Tang JX, Wong GCL. 2004. Selfassembled virus-membrane complexes. *Nature Letters*. 3 : 615-9
- Young R, Ward J, Scire F. **1971**. The Topografiner : An Instrument for Measuring Surface Microtopography. *Rev. Sci. Inst.* 43 : 999
- Zhong Q, Innis D, Kjoller K, Elings VB. 1993. Surf. Sci. Lett. 290 : L688

Annexe 1 : quelques précisions sur le matériel et les méthodes

Cette annexe contient certaines informations sur le matériel utilisé et la préparation des échantillons que l'on a retiré du texte principal par soucis de clarté. Les informations sont rassemblées par instruments ou méthode de préparation.

Spin Coating :

Les paramètres utilisés dans la plupart des expériences sont les suivants : l'accélération est de 2500 tr.min⁻¹.s⁻¹, la vitesse de 2500 tr.min⁻¹ et la durée de rotation de 5 minutes.

QCM :

Pour préparer les cristaux, on les rince successivement à l'eau et à l'éthanol avant de les traiter aux ultra-violets.

AFM :

Pour préparer la cellule liquide, on la rince plusieurs fois à l'eau et l'éthanol puis on la sèche sous un flux d'azote. On fait de même avec le joint en silicone.

Préparation des Bicouches lipidiques :

Pour obtenir des microvésicules, la solution de lipides dissous dans le tampon est soniquée pendant 10 minutes en mode continu (Branson Sonifier B15 cell disrupter, Danbury, CT). Le résidu de titane provenant du sonicateur est retiré par centrifugation à 5000 tr/min pendant 10 minutes.

Annexe 2 : traitement et analyse d'image avec Visilog

Nous avons utilisé le programme Visilog pour effectuer un traitement d'image nous permettant de mesurer automatiquement les longueurs et les distances bouts-à-bouts des chaînes étendues sur la surface (travail effectué avec la collaboration de Pascal Marie). Nous résumons seulement les principales étapes du traitement (la liste détaillée des fonctions utilisées est reportée en fin d'annexe). Il s'agit dans un premier temps de reconnaître sur l'image (bitmap) les régions de pixels correspondant à des chaînes et d'éliminer tous les autres détails (globules, trous dans la bicouche etc.). Ceci est effectué à l'aide de la transformation : « TopHat ». On obtient alors une image bichrome où les chaînes sont d'une certaine couleur sur un fond d'une autre couleur (l'information en 3D est perdue). Ensuite, on utilise la fonction de morphologie mathématique : « Skeletton » pour rétrécir les régions chaînes à partir de leurs bords jusqu'à atteindre des lignes d'un pixel d'épaisseur. Un exemple illustrant le résultat obtenu est montré sur la figure A.



FIG. A Exemple de squelettisation des chaînes sur une image d'AFM Ces images illustrent le remplacement des régions correspondant aux chaînes par des courbes (ou squelettes) de un pixel d'épaisseur qui en préservent la géométrie.

Parfois, les squelettes obtenus ne sont pas linéaires mais présentent des embranchements qui proviennent de chaînes superposées ou presque en contact. La fonction : « LinkChain » permet de reconnaître chaque chaîne individuellement en séparant les branches comme des

chaînes distinctes (lorsqu'elles sont supérieures à une certaine taille). Finalement, chacun des objets chaînes est interpolé par une suite de petits segments à l'aide de la fonction : « Polyg Approx ». Ici, il faut choisir des segments suffisamment petits pour suivre correctement le contour des objets (on vérifie visuellement que l'interpolation est satisfaisante). De cette manière, on peut calculer automatiquement la longueur et la distance bout-à-bout de chaque chaîne dans l'espace 2D.

Ce traitement n'a pas été utilisé pour les polymères adsorbées sur le mica, car la conformation très sinueuse des chaînes conduisait alors à des erreurs d'interpolation des contours. Sur la bicouche, cependant, le contour est bien interpolé à cause de la conformation relativement étendue des chaînes (cf 4.3.2). Les mesures de la longueur et de la distance bout-à-bout sont alors d'une précision comparable aux mesures effectuées manuellement (à l'aide de l'outil de mesure de longueur du programme Nanoscope). Les erreurs résultent d'une reconnaissance imparfaite du contour de certaines chaînes. Ceci peut provenir, par exemple, de parties de chaînes qui apparaissent floues sur l'image AFM, ou du problème de la distinction de plusieurs chaînes superposées. L'influence de ces obstacles ponctuels devient négligeable quand on fait des statistiques sur un grand nombre de chaînes.

Liste des opérations appliquées dans Visilog :

Point Operations > Grey Scale Transform > Normalize Filter > Smoothing > Median Morphology > Tophat (white 22,255) Morphology > Classical Algorythm > Border Kill Morphology > Erode (1) Morphology > Classical Algorythm > Reconstruct Morhpology > Skeleton Edge Detection > Edge Linking > Link Chains Edge Detection > Edge Linking > Polyg Approx Edge Detection > Edge Linking > Save Seg

Pour finir, nous avons parfois utilisé la fonction : « Centroid » de manière analogue à : « Skeleton » pour déterminer les centres de gravité des globules sur la surface (en 2D). Centroid est semblable à une transformation : « Skeleton » qui ne conserverait qu'un seul point dans des objets dépourvus de trous. Or, pour des objets convexes, ce point est assimilable au centre de gravité.