

Etude des interactions biomoléculaires de protéines végétales : Greffage de pointes AFM et caractérisation par spectroscopie de force

Ahmad FAHS, Guy LOUARN, Olivier PIÈTREMMENT, Jacques GUÉGUEN, Cédric GAILLARD*

**U.R. Biopolymères, Interactions, Assemblages (BIA)
Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) – Centre de Nantes
*Rue de la Géraudière, 44316 Nantes Cedex 3, Nantes***

***cedric.gaillard@nantes.inra.fr ahmad.fahs@nantes.inra.fr**

Contexte scientifique

1

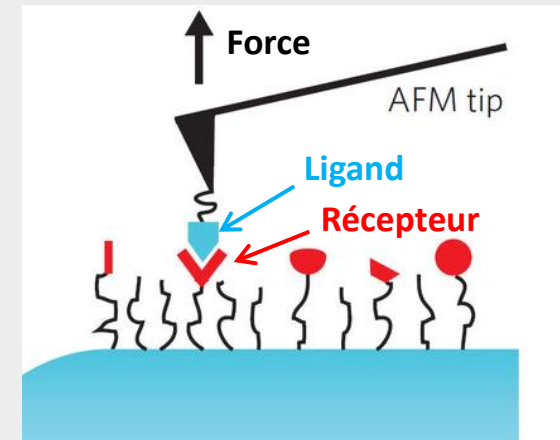
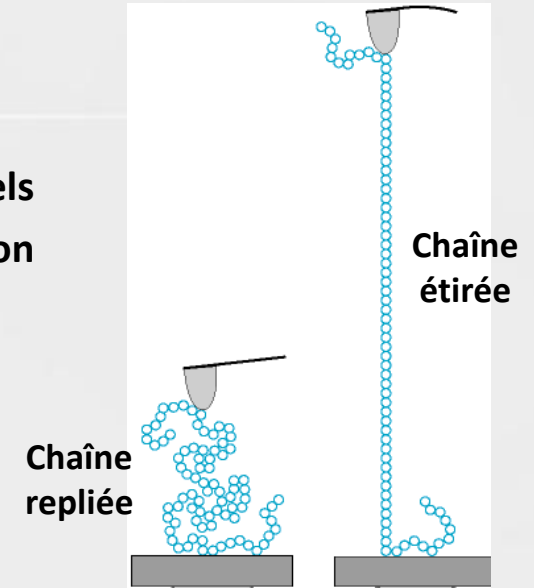
- Etude de la **nano-structuration** des biopolymères naturels présentant un fort potentiel de valorisation (application matériaux formulés, alimentaires et non-alimentaires)

2

- **Structure de protéines** : dépliement des chaînes peptidiques (mesure des longueurs, des forces intramoléculaires).
- **Mesure des propriétés physico-chimiques** à l'échelle nanoscopique (adhésion, comportement nano-mécanique: élasticité, forces d'interaction...).

3

- Etude d'**interactions (immuno)-spécifiques** par spectroscopie de force (ligand/récepteur, anticorps/antigène, ADN/protéine...).



Objectifs du projet

PLANNING

- Contexte
- Objectifs
- Les protéines
- Spectroscopie de force
- Surface d'or
- Imagerie AFM
- Influence de la nature de pointe
- Dépliement de protéine
- Interaction protéine-protéine
- Conclusion

Etudier la structuration et l'organisation des protéines et les relier à leur environnement (pH, force ionique)

Développer la spectroscopie de force pour évaluer les propriétés physico-chimiques des biopolymères issus des ressources agricoles

Trouver les conditions optimales pour fixer de façon covalente les protéines sur une surface et/ou sur une pointe AFM

1. Préparation d'un support adapté pour la fixation de protéines

2. Greffage chimique de protéines sur une surface et/ou sur une pointe AFM

3. Etude par AFM et Spectroscopie de Force

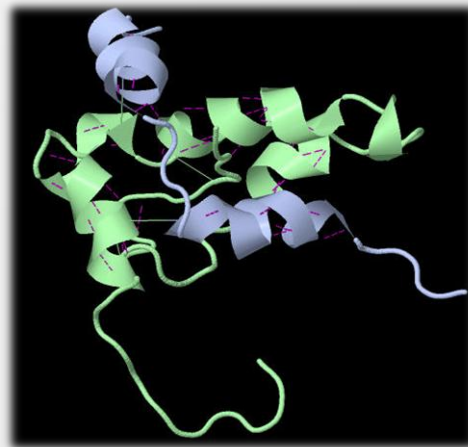
Les protéines végétales comme biopolymères modèles

PLANNING

- Contexte
- Objectifs
- Les protéines
- Spectroscopie de force
- Surface d'or
- Imagerie AFM
- Influence de la nature de pointe
- Déplieement de protéine
- Interaction protéine-protéine
- Conclusion

Napine 2S du Colza

- Mw \approx 12,5 -14,5 KDa
- Structure constituée de deux chaînes polypeptidiques liées par des ponts disulfures, liaisons hydrogènes, liaisons ioniques ...



Globuline 12S du Colza

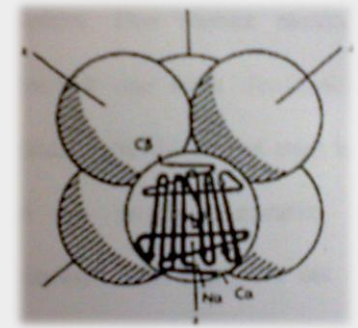
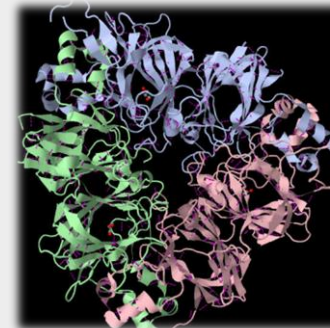
- Mw \approx 300 - 360 KDa
- Structure constituée de 6 sous-unités (antiprisme trigonal)
- formée par combinaison de 4 types de chaînes ayant des Mw différentes:

18,5 KDa

26,8 KDa

21,1 KDa

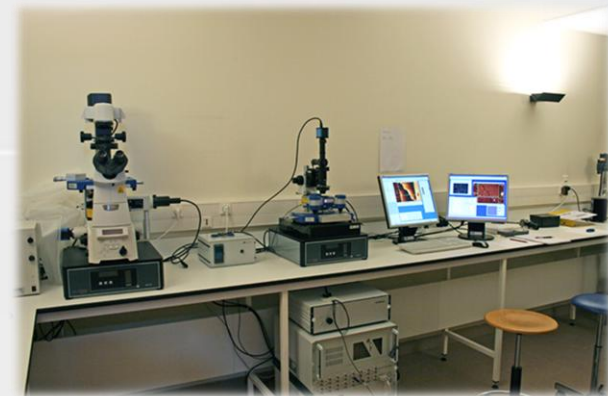
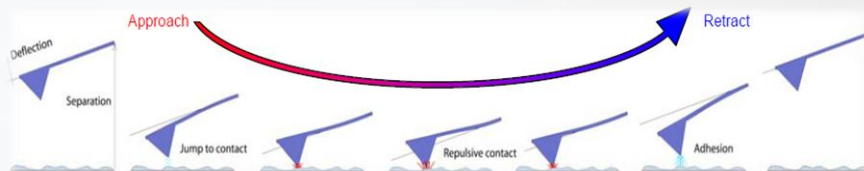
31,2 KDa



La spectroscopie de force

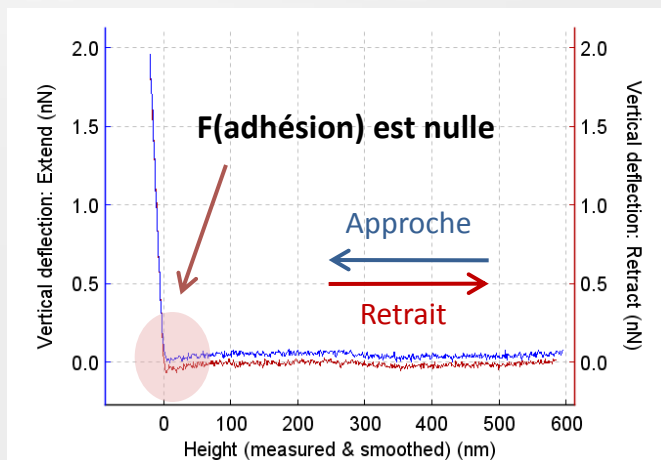
PLANNING

- Contexte
- Objectifs
- Les protéines
- Spectroscopie de force
- Surface d'or
- Imagerie AFM
- Influence de la nature de pointe
- Dépliement de protéine
- Interaction protéine-protéine
- Conclusion

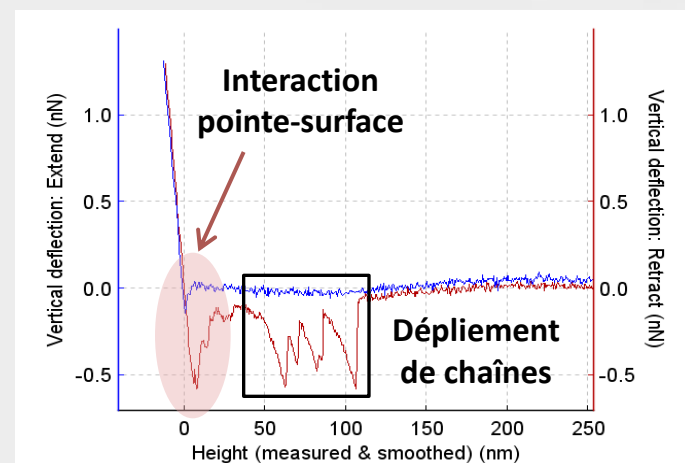


Courbe de force en milieu liquide

Surface non greffée



Surface greffée

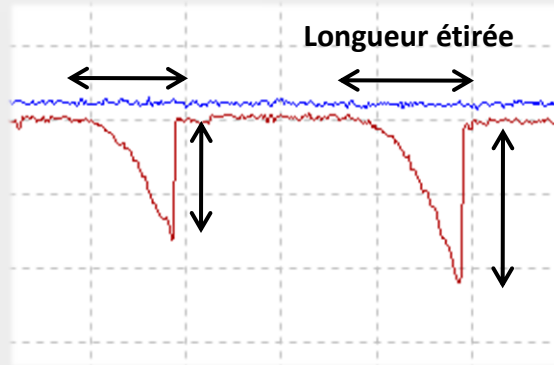
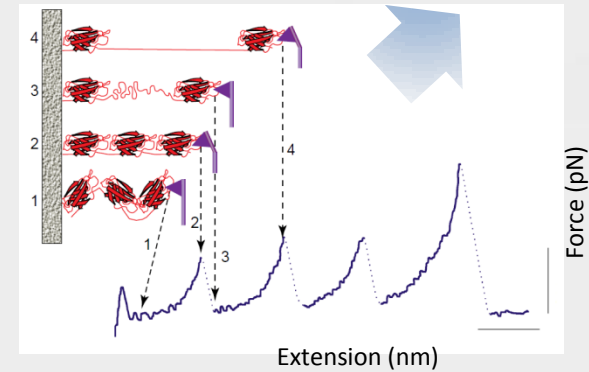
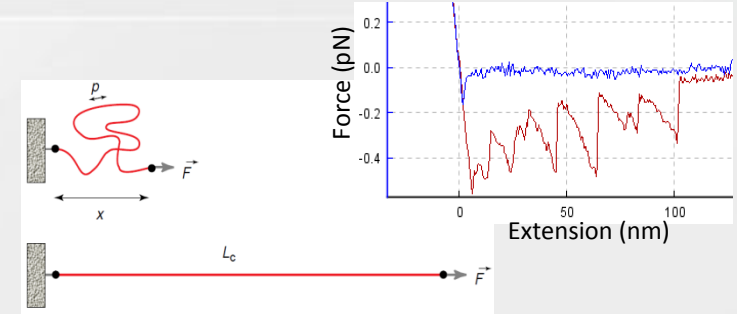
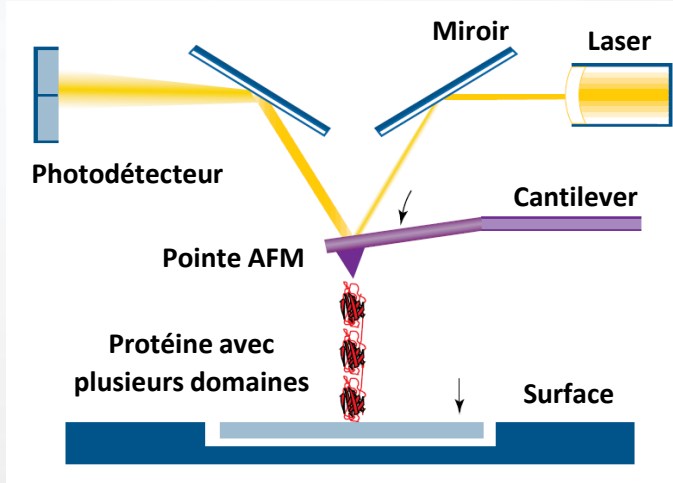


Pour obtenir le dépliement des chaînes:
Nécessité d'accrocher les biopolymères de part et d'autre sur une surface et sur la pointe

La spectroscopie de force: Déplie ment de protéines

PLANNING

- Contexte
- Objectifs
- Les protéines
- Spectroscopie de force
- Surface d'or
- Imagerie AFM
- Influence de la nature de pointe
- Déplie ment de protéine
- Interaction protéine-protéine
- Conclusion



Force (pN) pour déplier une chaîne polypeptidique

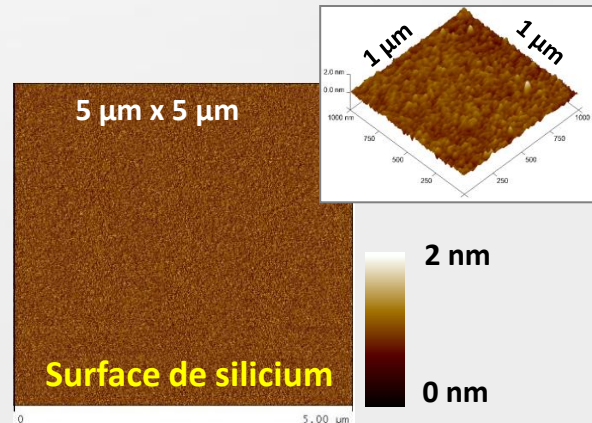
Propriétés nano-mécaniques des protéines (forces intra- et intermoléculaires: Liaisons H, interactions de van der Waals, ponts disulfures ...)

Surfaces d'or: Très efficace pour fixer les protéines végétales (thiolées)

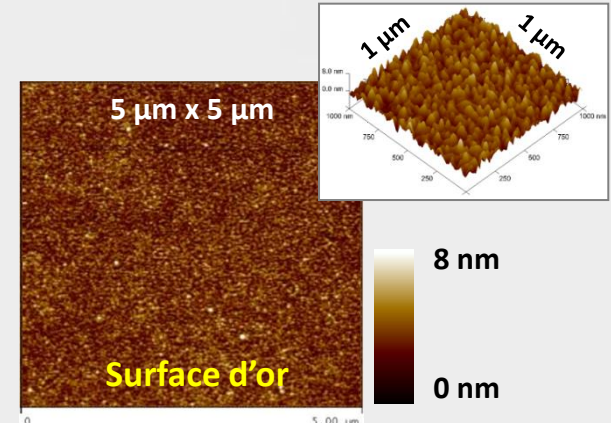
PLANNING

- Contexte
- Objectifs
- Les protéines
- Spectroscopie de force
- Surface d'or
- Imagerie AFM
- Influence de la nature de pointe
- Dépliement de protéine
- Interaction protéine-protéine
- Conclusion

▪ Préparation des surfaces d'or



Rugosité de la surface
(Si) < 0,15 nm

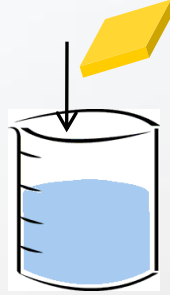


Rugosité de la surface
(Au) < 1 nm

Qualité des surfaces d'or adaptée à la fixation des protéines et à leur caractérisation

Fixation de protéines végétales sur la surface

■ Dépôt de la protéine sur la surface Au

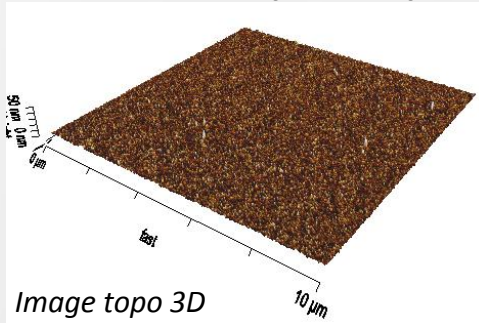


Immersion de la surface
d'or dans une solution
de protéine (25 μ g/ml)

Rinçage avec la solution
tampon puis caractérisation
par AFM

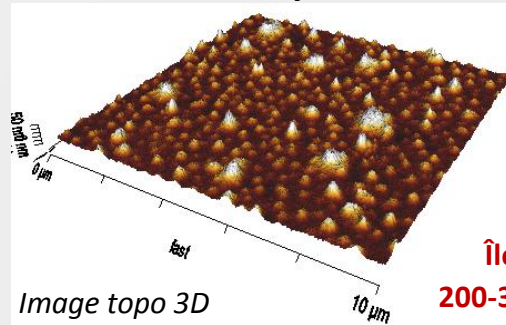
Caractérisation par imagerie AFM (pH = 7)

Au seul (témoin)



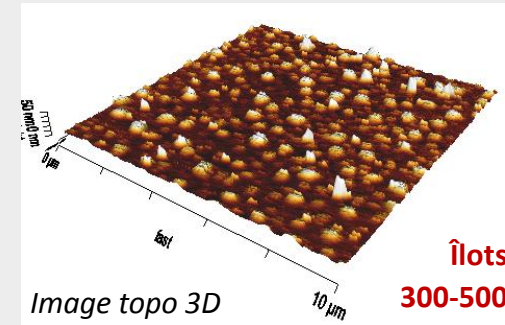
✓ La surface Au est lisse et
homogène (RMS=0,86)

Napine



Îlots
200-300 nm

Globuline



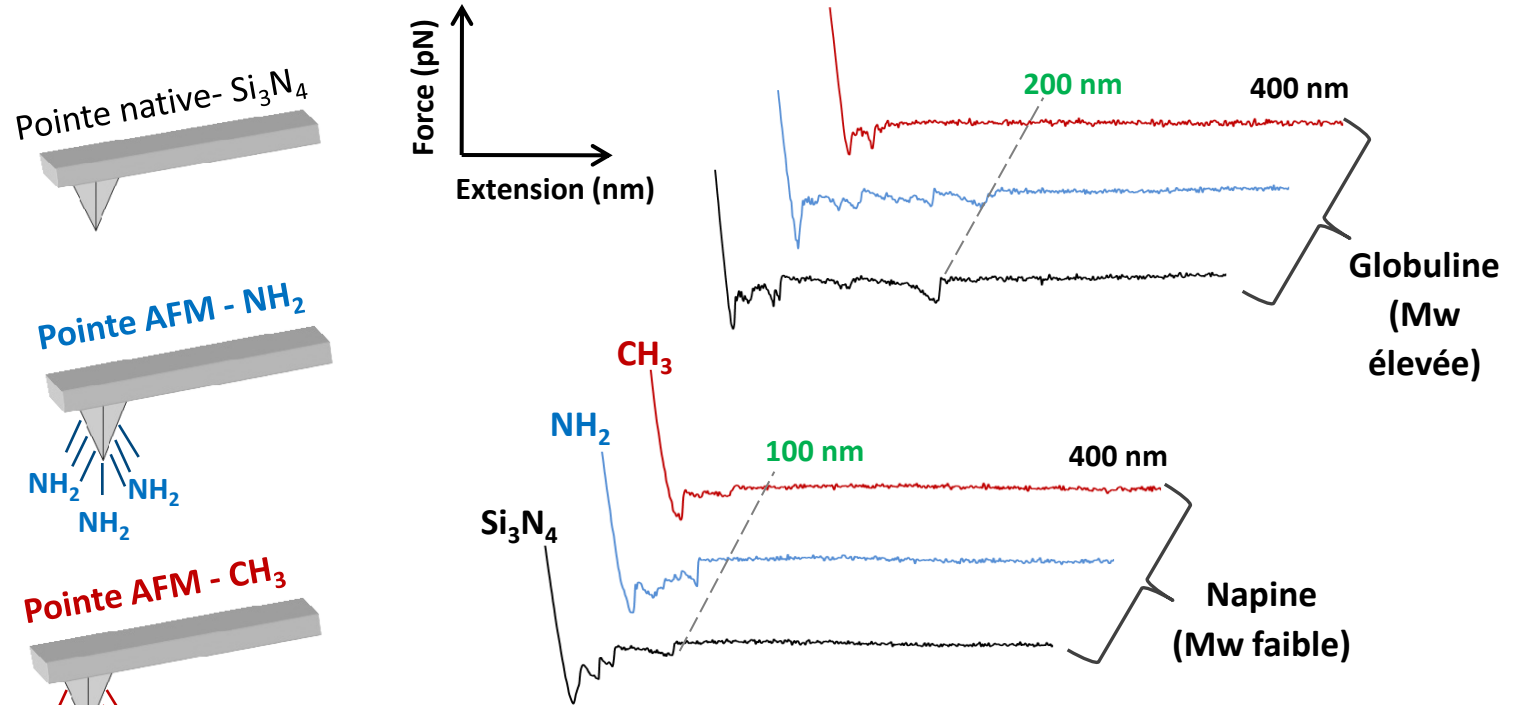
Îlots
300-500 nm

✓ La surface Au a une forte affinité chimique pour la protéine

La spectroscopie de force: Effet du traitement de surface de la pointe AFM sur la force d'adhésion

PLANNING

- Contexte
- Objectifs
- Les protéines
- Spectroscopie de force
- Surface d'or
- Imagerie AFM
- Influence de la nature de pointe
- Dépliement de protéine
- Interaction protéine-protéine
- Conclusion



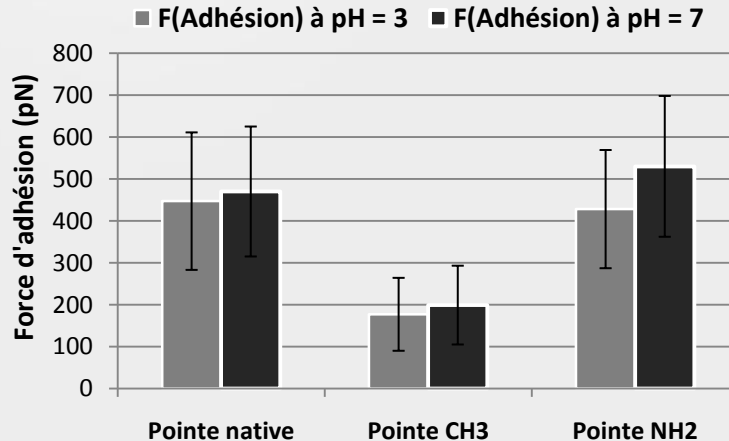
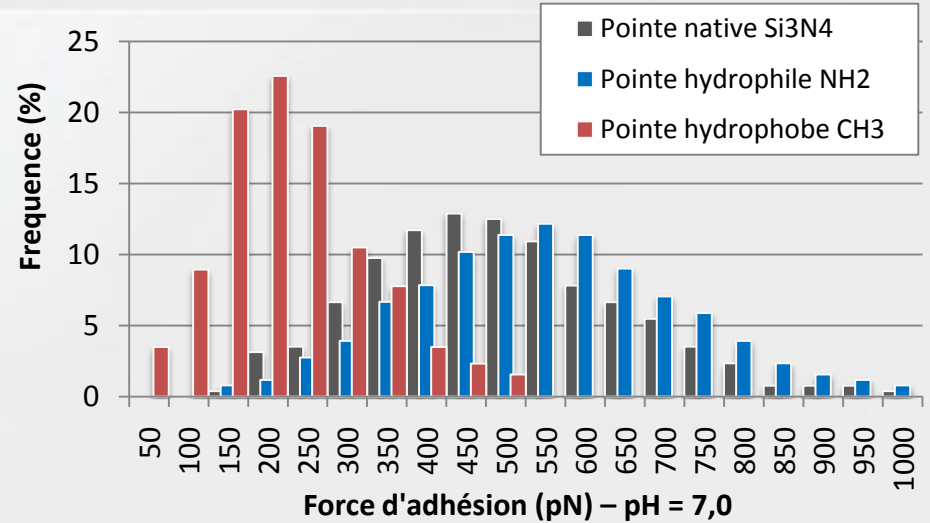
- La force d'adhésion est conditionnée par la nature hydrophile/hydrophobe du point de contact imposé (pointe traitée chimiquement).
- L'accrochage non covalent de la protéine par la pointe dépend fortement de la fonctionnalité de surface de la pointe: Compréhension des interactions dans différents environnements (aminés, hydrophobes, ...).

Effet du traitement de surface de la pointe AFM sur la force d'adhésion: Résultats

PLANNING

- Contexte
- Objectifs
- Les protéines
- Spectroscopie de force
- Surface d'or
- Imagerie AFM
- Influence de la nature de pointe
- Déplieement de protéine
- Interaction protéine-protéine
- Conclusion

Distribution des forces d'adhésion de **la globuline** selon le caractère hydrophile-hydrophobe de la pointe AFM.



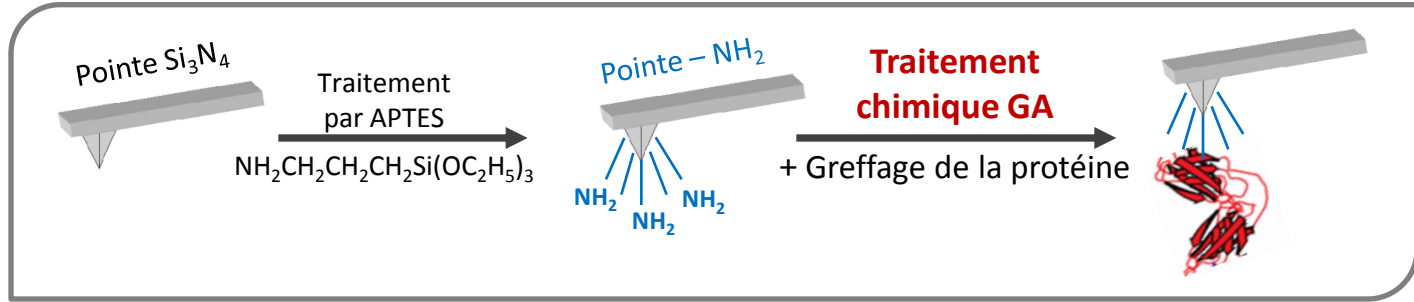
pH 3	Pointe SiO > 0 Pointe NH ₃ > 0	Protéine > 0 Protéine > 0
pH 7	Pointe SiO < 0 Pointe NH ₃ > 0	Protéine ≈ 0 Protéine ≈ 0

- La force d'interaction \searrow avec les pointes hydrophobes
- Faible influence du pH sur la force d'interaction

La spectroscopie de force: Dépliement de protéines

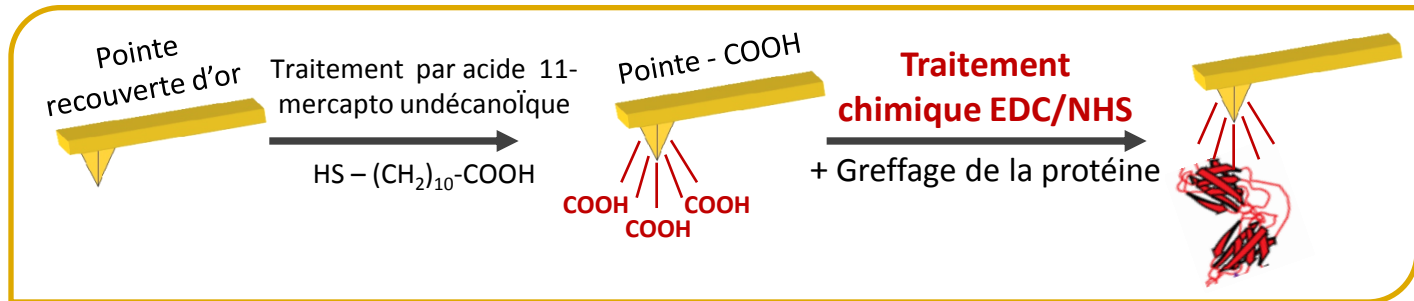
Méthodes de Greffage des protéines végétales sur une pointe AFM

1^{ère} voie GA



GA : Glutaraldéhyde

2^{ème} voie Thiolate



EDC: N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride

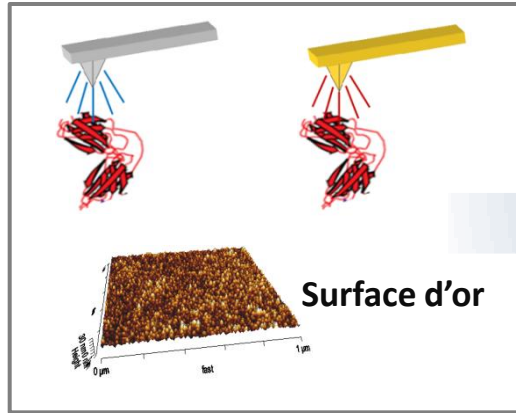
NHS: N-Hydroxysuccinimide

Déplie ment de la napine et de la globuline:

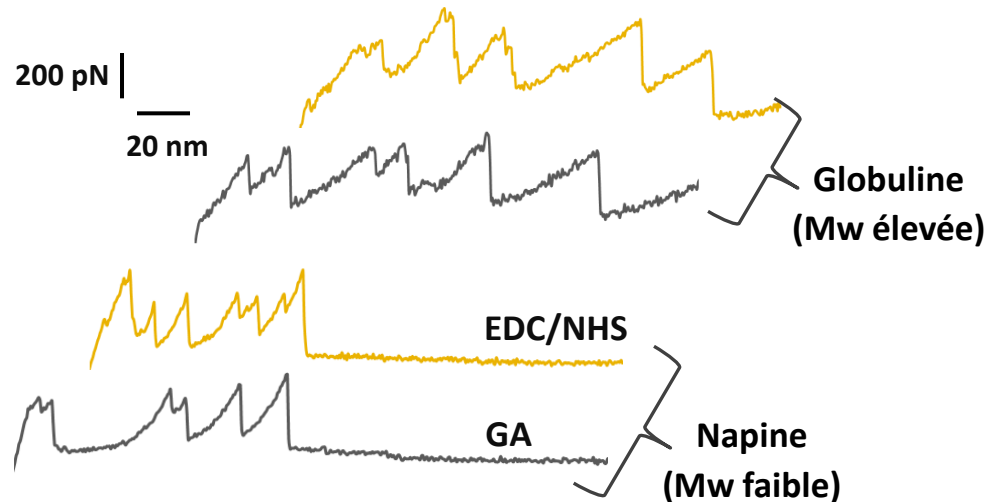
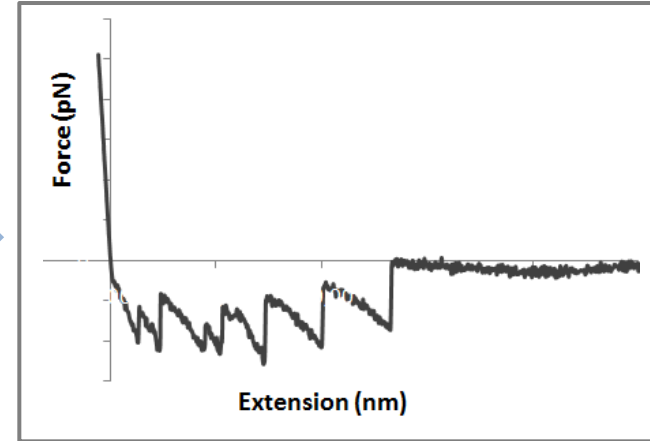
Résultats

PLANNING

- Contexte
- Objectifs
- Les protéines
- Spectroscopie de force
- Surface d'or
- Imagerie AFM
- Influence de la nature de pointe
- **Déplie ment de protéine**
- Interaction protéine-protéine
- Conclusion



Courbe de force

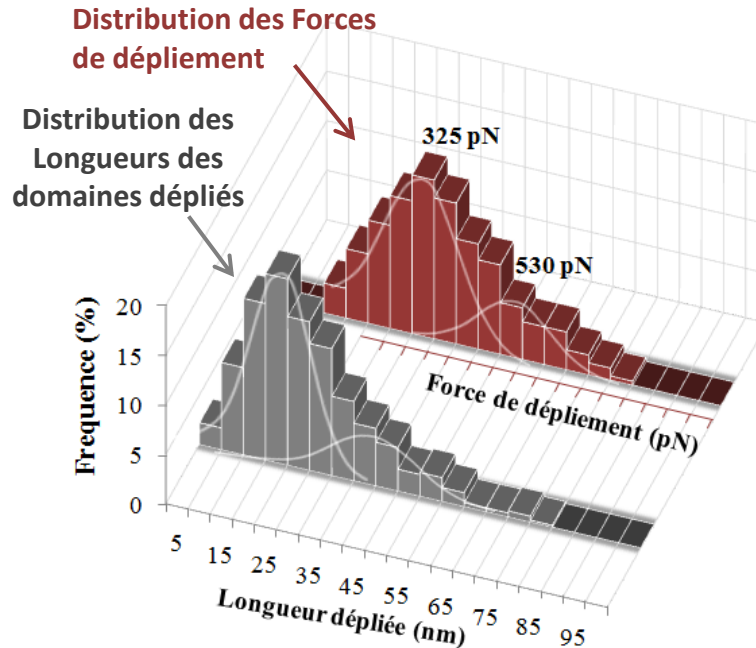


Déplieement de la **Napine**: Résultats

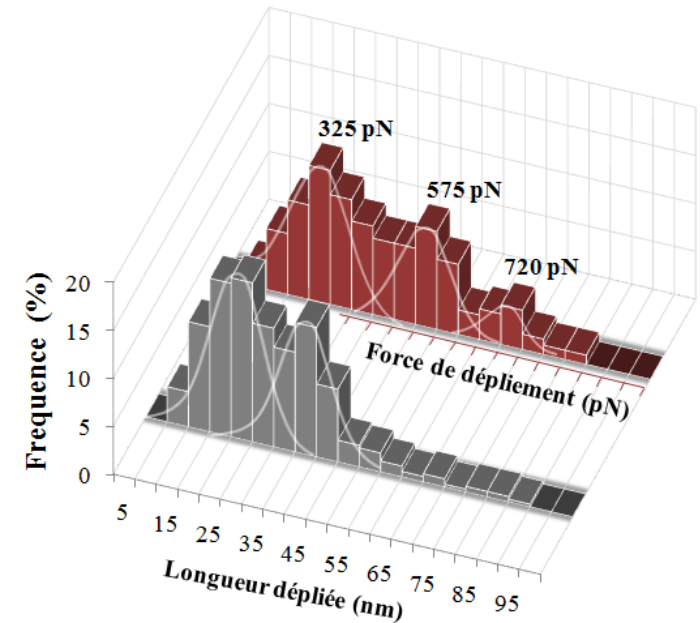
PLANNING

- Contexte
- Objectifs
- Les protéines
- Spectroscopie de force
- Surface d'or
- Imagerie AFM
- Influence de la nature de pointe
- **Déplieement de protéine**
- Interaction protéine-protéine
- Conclusion

Méthode Glutaraldéhyde



Méthode Thiolate



- On retrouve 2 longueurs de déplieement privilégiés:

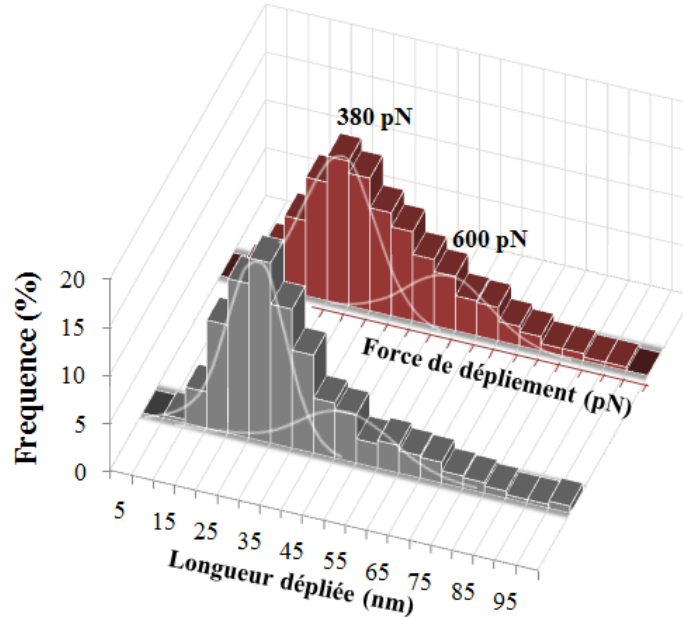
Compatible avec la structure de la napine sous forme de 2 chaînes polypeptidiques

Dépliement de la **Globuline**: Résultats

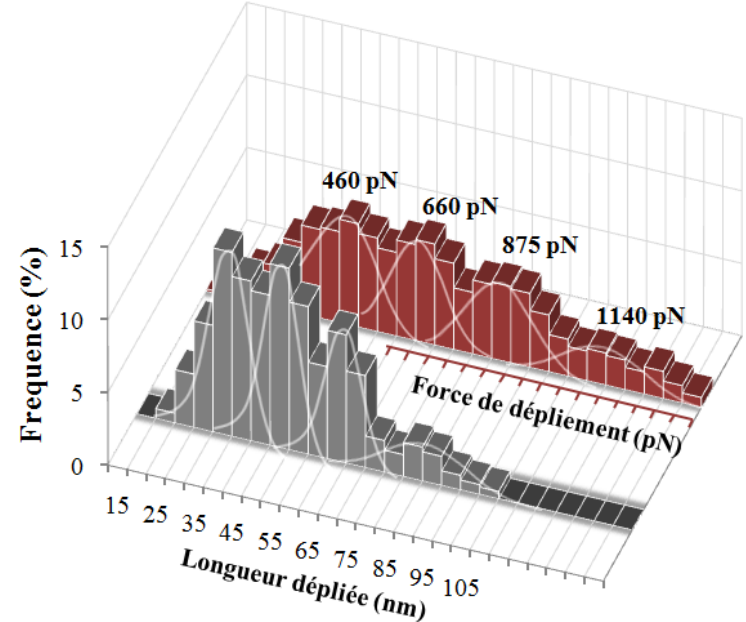
PLANNING

- Contexte
- Objectifs
- Les protéines
- Spectroscopie de force
- Surface d'or
- Imagerie AFM
- Influence de la nature de pointe
- **Dépliement de protéine**
- Interaction protéine-protéine
- Conclusion

Méthode Glutaraldéhyde



Méthode Thiolate



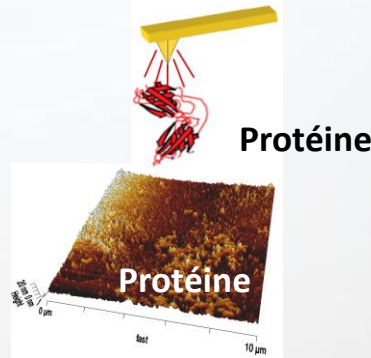
- On retrouve 4 longueurs de dépliement privilégiés:
Compatible avec la structure de la globuline sous forme de 4 chaînes polypeptidiques

La spectroscopie de force: Interaction entre 2 protéines

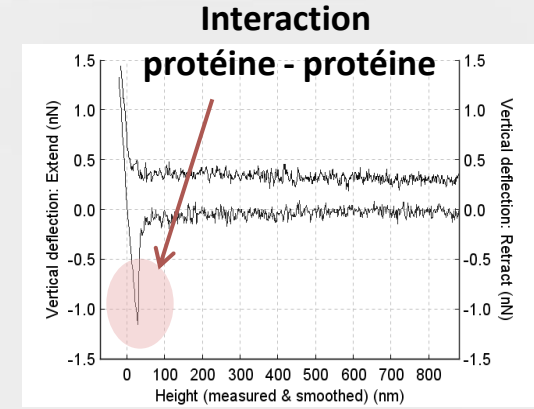
Résultats

PLANNING

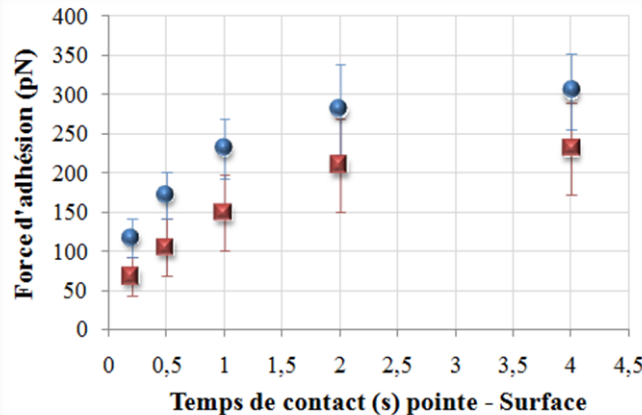
- Contexte
- Objectifs
- Les protéines
- Spectroscopie de force
- Surface d'or
- Imagerie AFM
- Influence de la nature de pointe
- Déplieement de protéine
- Interaction protéine-protéine
- Conclusion



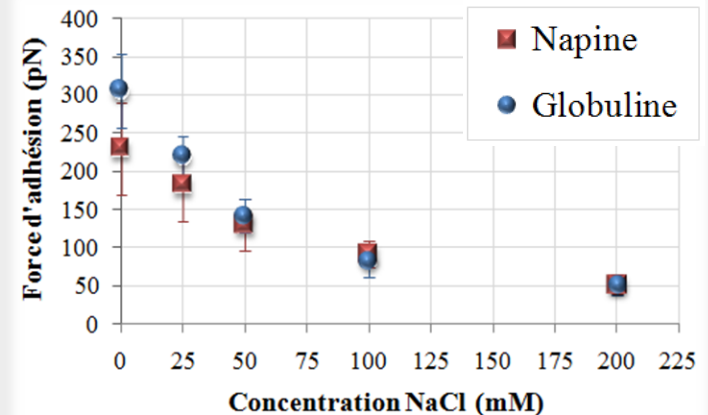
Courbe de force



▪ Effet du temps de contact



▪ Effet de la force ionique



Conclusion et perspectives

PLANNING

- Contexte
- Objectifs
- Les protéines
- Spectroscopie de force
- Surface d'or
- Imagerie AFM
- Influence de la nature de pointe
- Dépliement de protéine
- Interaction protéine-protéine
- Conclusion

- Les **surfaces d'or** sont des supports appropriés pour la fixation des protéines 12S et 2S du colza
- Possibilité de **modifier chimiquement la pointe AFM** pour contrôler la nature des interactions exercées (hydrophiles, hydrophobes ...)

- L'outil «Spectroscopie de force par AFM » a permis de :



1. Mesure des forces d'interactions des protéines modèles sous l'influence d'un contact hydrophobe, hydrophile, aminé,...

2. Mesure des forces de cohésion intrinsèques au cours du dépliement des protéines

3. Mesure des forces d'adhésion entre 2 protéines

.... Perspectives

- Appliquer cette méthodologie développée dans le cas des protéines à l'étude des **interactions spécifiques** (ligand/récepteur, anticorps/antigène)

PLANNING

- Contexte
- Objectifs
- Les protéines
- Spectroscopie de force
- Surface d'or
- Imagerie AFM
- Influence de la nature de pointe
- Dépliement de protéine
- Interaction protéine-protéine
- Conclusion

Remerciements

Cédric Gaillard (cedric.gaillard@nantes.inra.fr)

Guy Louarn (guy.louarn@cnrs-imn.fr)

Olivier Piètlement (olivier.pietrement@igr.fr)

Département CEPIA pour le financement

Merci pour votre attention !!