

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS VI

Ecole doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris-Centre

Spécialité :

Matière Condensée : Chimie et Organisation

présentée par

Laetitia COHEN-TANNOUDJI

Pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS VI

**CINETIQUE DE REACTIONS LIGAND-RECEPTEUR EN SURFACE
- étude fondée sur l'utilisation de colloïdes magnétiques -**

Soutenue publiquement le 8 Septembre 2006

Devant le jury composé de :

M. Christian AMATORE
M. Pierre BONGRAND
M. Fernando LEAL-CALDERON
M. Ajay SOOD
M. Jérôme BIBETTE
M. Emanuel BERTRAND

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

A Mamie

Remerciements

En tout premier lieu je tiens à remercier Pierre Turq et Valérie Cabuil pour m'avoir accueillie dans le laboratoire « Liquides Ioniques et Interfaces Chargées » pendant ces trois années de thèse. Je remercie également Valérie avec qui j'ai eu la chance de partager mon expérience d'enseignement à l'université Pierre et Marie Curie.

Christian Amatore a présidé mon jury de thèse. Je voudrais qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour avoir accepté cette tâche mais aussi pour la vision passionnée de la science qu'il donne à tous ses étudiants et pour les encouragements qu'il m'a apportés.

Je souhaite témoigner de ma sincère reconnaissance à Fernando Leal-Calderon et à Pierre Bongrand qui ont assumé le rôle de rapporteur de mon manuscrit. Je remercie également Ajay Sood pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je remercie chaleureusement mes deux directeurs de thèse : Jérôme Bibette et Emanuel Bertrand. Jérôme, pour l'enthousiasme avec lequel il m'a accueillie au laboratoire puis accompagnée tout le long de ce travail. Il a su garder le cap de l'optimisme pendant ces années et m'a accordé sa confiance. Emanuel, pour avoir toujours été présent à mes côtés, pour toutes nos discussions scientifiques que ce soit pendant la conduite et interprétation des expériences ou pendant la rédaction du manuscrit. J'ai énormément appris de toi et je t'en remercie aussi pour cela, d'autant plus que l'humour était toujours là...

J'en viens maintenant à remercier les personnes qui ont directement participé à ce travail.

Je commence par le fameux « club des 4 » : Manu, Caro, Cecile (et moi). Merci pour les réunions qui, certes, commençaient toujours par un quart d'heure de fou rire mais qui finissaient en discussions passionnantes et fructueuses. Je sais aussi que j'ai gagné trois amis. Manu, je te remercie ici encore pour tout. Si tout s'est bien passé c'est grâce à toi... Caroline Robic, tu as été là pour mettre au point cette méthode, merci pour tout ce travail, merci aussi pour ton soutien et ton éternelle bonne humeur... Cecile Goubault, tu as été une grande sœur pour moi pendant tout ce temps. Pour chacun de tes précieux conseils que ce soit les astuces pour les manips, les questions fondamentales pendant l'interprétation ou tes remarques (et blagues aussi) pendant la rédaction, je tiens à te dire merci. Enfin, je voudrais aussi te remercier au nom du labo et de tous ceux qui ont travaillé sur les particules magnétiques, et qui ont tendance à oublier que tu as totalement porté tous ces sujets... et puis n'oublions pas FKB !

Je souhaiterais également exprimer ma sincère reconnaissance pour les autres acteurs de ce travail.

Jean Baudry qui a participé depuis le tout début à ces questions et qui a contribué de près à ce travail, alors ces billes elles tournent ou pas ?, Catherine Rouzeau merci pour tes doigts de fée d'expérimentatrice..., Isabelle Génois pour ton aide efficace sur le greffage..., Olivier Greffier pour la détection optique...

Je voudrais aussi remercier Rémi Dreyfus pour avoir « ressuscité » la machine de force, mais aussi pour les deux ans passés dans le même bureau où nous avons tant rigolé.

Je tiens à remercier également Carlos Marques et son équipe à Strasbourg, Fabrice Thalmann et Albert Johner, pour la collaboration sur les questions théoriques. Les discussions ont toujours été passionnantes.

Je souhaite remercier Paul Fannin et ses étudiants pour la collaboration sur les mesures de susceptibilité magnétique dynamique.

Bien sûr de nombreux étudiants sont passés dans le laboratoire et ont donné un sérieux coup de main pour l'avancement de ce travail, je souhaite ici les remercier chaleureusement. Je pense à Vincent Popof, à Kalina Razkin, et Alexandre Franceschini et évidemment à Marie Pélissier qui a passé de longs mois sur le difficile greffage des PEG.

Je voudrais ici faire une mention spéciale à Pierre Henri Puech. Un énorme merci pour avoir été un véritable coach pour moi, merci pour ton aide (agrémentée d'humour) en particulier sur les cadhérines et sur la soutenance!!!

Je souhaite aussi remercier tous ceux avec qui j'ai eu la chance de discuter pendant ces trois années et qui m'ont éclairée : Frédéric Pincet, Cheng Zhu, Fernando Leal-Calderon, Olivia du Roure, Charlie Gosse, Philippe Monod, Elisabeth Tronc...

Pendant ces trois ans de thèse, de nombreuses personnes m'ont entourée.

Julie, ma co-bureau préférée !!, merci pour ta joie de vivre, merci d'avoir toujours été là, d'avoir partagé les hauts et les bas de la thèse, et puis pour tous nos délires de pauvres petites thésardes : Paul, Brad & A et les autres ☺, ... j'en garderai de bons souvenirs...

Evidemment merci à tous les autres membres, passés et présents, du laboratoire : Jak, merci pour ta bonne humeur, d'avoir été toujours prêt à m'aider. Un grand merci à Abdes, Audrey, Coraline, Djamal, Florence, Geneviève, Julien, Nicolas, Nicolas Lequeux, Sébastien, ...et à Lise pour son aide précieuse.

Bien sur à côté de la thèse il y a une vie, je pense aux amis, à ceux qui se sont aussi embarqués dans l'aventure thèse, je les remercie pour les soirées « on se remonte le moral », et en particulier pour les soirées « girls ». Merci à Milou, Laure, Céline, Cyril, Cécile, Geo, Quentin, Muriel, Kevin, Laure-Marie. Pour ceux qui n'ont pas choisi l'aventure, je les remercie pour leur soutien et pour leurs tentatives « au fait c'est quoi ton sujet de thèse ? », mes pensées vont à la Kir Family, merci Eric pour l'anim Flash, merci Anne-sophie pour tes bonnes ondes de Dakar, je pense aussi aux amis de longue date : Constance, Florian, Anne-Julie, May ... Merci aussi à Bernie, Bernard et Jérémy.

Enfin la famille, un grand merci à Maman, Papa, Evelyne et Benoit, Denis et Elisabeth, Rémi et Kabira, et Mathilde et Stéphane, qui m'ont toujours soutenue...Merci aussi aux chers oncles et tantes : Ghislaine et Marc, Josselyne et André, Claude et Jacqueline, Alain et Antoinette, Dominique et Marie-Noël et aussi à ma chère Mamie qui était fière de savoir sa petite-fille future docteur.

Et pour finir je voudrais faire une spéciale dédicace à Florent : merci pour tout et tout le reste et plus encore...

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	13
---------------------------	-----------

BIBLIOGRAPHIE	15
---------------------	----

1- RÉACTIONS LIGAND-RÉCEPTEUR ENTRE SURFACES EN REGARD..... **17**

1-1- Les interactions biospécifiques ou interactions ligand-récepteur	17
---	----

1-1-1- Les interactions ligand-récepteur : implication et enjeux	17
--	----

1-1-2- Exemples d'interactions ligand-récepteur	20
---	----

1-1-3- Nature de l'interaction ligand-récepteur	23
---	----

1-1-4- Apport de la Biophysique dans l'étude des interactions ligand-récepteur	26
--	----

1-2- Cinétique de réaction en solution	29
--	----

1-2-1- Cinétique chimique – constantes cinétiques empiriques	29
--	----

1-2-2- Cinétique « physique » - Diffusion dans un potentiel d'interaction	34
---	----

1-3- Cinétique de réactions ligand-récepteur en solution.....	38
---	----

1-3-1- Détermination expérimentale de constantes d'association et de dissociation pour des réactions ligand-récepteur en solution	38
---	----

1-3-2- Modélisation de l'étape de diffusion pour des réactions ligand-récepteur.....	41
--	----

1-4- Cinétique de réactions entre ligands et récepteurs situés sur des surfaces en regard ...	47
---	----

1-4-1- Enjeux et formalisme des réactions dites « 2D »	47
--	----

1-4-2- Méthodes pour mesurer des constantes de dissociation	50
---	----

1-4-3- La technique des micropipettes pour mesurer des constantes d'association.....	59
--	----

1-4-4- Lien entre cinétique d'association en solution et cinétique d'association « 2D ». 63	
---	--

1-5- Un couple modèle : streptavidine-biotine	64
---	----

1-5-1- Le couple streptavidine-biotine	65
--	----

1-5-2- Caractéristiques biophysiques	66
--	----

1-6- Conclusion	70
-----------------------	----

BIBLIOGRAPHIE	72
---------------------	----

2- LES PARTICULES MAGNÉTIQUES POUR L'ÉTUDE DE RÉACTIONS LIGAND-RÉCEPTEUR..... **79**

2-1- Particules magnétiques : propriétés	79
--	----

2-1-1- Particules superparamagnétiques : de leur composition à leurs propriétés magnétiques.....	80
--	----

2-1-2- Particules superparamagnétiques : fabrication	81
2-1-3- Taille des particules	84
2-1-4- Susceptibilité magnétique statique	87
2-1-5- Susceptibilité magnétique dynamique	88
2-2- Particules magnétiques : application à l'étude des interactions colloïdales	95
2-2-1- La « machine de force » (Magnetic Chaining Technique)	95
2-2-2- Cinétique d'adhésion non spécifique	100
2-3- Particules magnétiques et réactions ligand-récepteur	102
2-3-1- Greffage des particules magnétiques	102
2-3-2- Assemblages spécifiques : application au diagnostic immunologique	108
2-4- Conclusion	115
BIBLIOGRAPHIE	116

3- UNE NOUVELLE MÉTHODE D'ÉTUDE DE CINÉTIQUES DE RÉACTIONS LIGAND-RÉCEPTEUR ENTRE SURFACES EN REGARD 119

3-1- Cadre général de l'utilisation de particules magnétiques pour l'étude expérimentale de cinétiques de réactions ligand-récepteur	119
3-1-1- Description d'une réaction ligand-récepteur entre deux particules magnétiques	119
3-1-2- Chaînes magnétiques en « régime doublets » : un grand nombre de réactions ligand-récepteur en parallèle	123
3-2- Conditions expérimentales et validation de la méthode	125
3-2-1- Mesure d'une cinétique de réaction « 2D » : conditions expérimentales	126
3-2-2- Mesure d'une cinétique de réaction « 2D » : validation	130
3-3- Étude du couple streptavidine-biotine	136
3-3-1- Détermination d'une constante cinétique d'association	136
3-3-2- Influence de la nature de la liaison entre réactifs et surfaces	140
3-3-3- Effet du champ magnétique et de la nature de la surface	146
3-4- Interprétation	152
3-4-1- Interprétation des constantes d'association expérimentales au vu des données de la littérature	152
3-4-2- Estimation théorique de la constante cinétique de diffusion : Rotation des particules	155
3-4-3- Points faibles de l'approche théorique précédente et raffinements possibles	161
3-4-4- Discussion sur la notion de cinétique d'association en « 2D »	164
3-5- Bilan sur la méthode	167
3-6- Conclusion	169

BIBLIOGRAPHIE	170
4- ÉTUDE DE MOLÉCULES IMPLIQUÉES DANS L'ADHÉSION CELLULAIRE : LES CADHÉRINES.....	173
4-1- État de l'art sur les interactions entre cadhérines	173
4-1-1- Implications et structure	174
4-1-2- Les différents scénarios d'interactions.....	177
4-1-3- Force et cinétique d'interaction entre cadhérines.....	180
4-1-4- Bilan de l'état de l'art sur l'interaction entre cadhérines	185
4-2- Adhésion entre particules magnétiques induite par les cadhérines	186
4-2-1- Greffage des cadhérines sur les particules magnétiques	186
4-2-2- Spécificité de l'adhésion	189
4-2-3- Caractérisation des particules recouvertes de cadhérines	196
4-2-4- Cinétique d'agrégation : vers une étude de la cinétique de reconnaissance entre cadhérines.....	199
4-3- Profils de forces entre particules liées par des cadhérines.....	200
4-3-1- Détermination expérimentale des profils de force	200
4-3-2- Influence des conditions de formation des liens cadhérines	203
4-4- Détermination expérimentale des constantes cinétiques de reconnaissance entre cadhérines.....	208
4-4-1- Conditions expérimentales requises pour un couple homotypique.....	208
4-4-2- Évaluation de la constante d'association entre cadhérines.....	211
4-4-3- Évaluation de constantes de dissociation de liens cadhérines.....	214
4-4-4- Conclusions et confrontation avec l'art antérieur	216
4-5- Conclusion.....	218
BIBLIOGRAPHIE	219
CONCLUSION.....	221
ANNEXE – A Propriété intrinsèque magnétique : mesure de χ_{\perp} à hautes fréquences ..	225
ANNEXE – B Protocole de greffage de la streptavidine sur les particules magnétiques	226
ANNEXE – C Protocole de dosage de la streptavidine sur les particules magnétiques ..	228
ANNEXE – D Potentiel d'interaction entre particules magnétiques	230
ANNEXE – E Protocole de dosage des chimères de cadhérine sur les particules magnétiques.....	231

INTRODUCTION

Les colloïdes *superparamagnétiques* sont des objets aux propriétés particulièrement originales, mises à profit dans de nombreuses applications. La majeure partie de ces applications repose sur la possibilité de manipuler à distance ces particules colloïdales, par l'intermédiaire d'un champ magnétique contrôlé. Ainsi, elles sont utilisées pour concentrer, purifier, détecter, transporter diverses espèces, telles que des molécules, des cellules, des bactéries (Goubault, 2004). Les secteurs concernés sont donc principalement les biotechnologies, et notamment le domaine du diagnostic immunologique.

Une connaissance précise des propriétés magnétiques individuelles et collectives de tels objets a permis l'élaboration de nouveaux outils expérimentaux destinés à des études plus fondamentales. Ainsi, les particules magnétiques ont été exploitées pour étudier, entre autres, les interactions colloïdales répulsives (Leal-Calderon et al., 1994), la flexibilité de polymères ou de protéines (Goubault et al., 2003), ou encore la cinétique de phénomènes physiques d'adhésion (Bressy, 2003).

C'est dans ce contexte général qu'a émergé ce travail de thèse. Profitant d'un savoir-faire unique sur les colloïdes magnétiques, nous avons élaboré une nouvelle méthode de mesure de cinétiques de réactions ligand-récepteur entre surfaces en regard. Ce travail se situe à la croisée de deux applications des colloïdes magnétiques : le diagnostic immunologique et l'étude de cinétiques d'adhésion physique. La méthode introduite dans cette thèse repose sur les propriétés des particules magnétiques mais son intérêt dépasse largement le cadre de la physico-chimie des colloïdes. C'est dans la compréhension des interactions ligand-récepteur que cette approche est en mesure d'apporter de nouveaux éclairages.

Toute fonction biologique implique, à des degrés divers, la reconnaissance spécifique entre des protéines et les molécules qui les entourent, c'est-à-dire des interactions ligand-récepteur (Creighton, 1993). Ces interactions interviennent, par exemple, dans la structure de la cellule, dans l'organisation et la signalisation entre cellules, ou encore dans les processus de défense immunitaire. Ainsi, les interactions ligand-récepteur suscitent de nombreuses recherches, dans différentes disciplines et avec des approches très variées (Lauffenburger & Linderman, 1993). Notre étude aborde un cas original. Il s'agit d'appréhender la vitesse d'association entre ligands et récepteurs dans une géométrie particulière : en surface. Ce champ d'investigation,

INTRODUCTION

bien qu'il exige une mise en œuvre expérimentale délicate, est en plein essor car il permet de dépasser les approches classiques de mesures de cinétiques en solution. En effet, ces dernières se sont avérées insuffisantes dans le cadre complexe de l'étude des mécanismes biologiques qui, comme l'adhésion cellulaire, ont lieu entre surfaces en regard. En dépit de sa pertinence biologique, notre méthode expérimentale permet d'étudier les interactions ligand-récepteur avec une méthodologie plus physicienne que biologiste.

Ce manuscrit se décompose en quatre chapitres. Le premier chapitre aborde les particularités des interactions ligand-récepteur. Les caractéristiques des cinétiques d'association entre ligands et récepteurs sont détaillées, d'abord en solution, puis en surface. Dans le second chapitre, nous nous attachons à présenter les propriétés des particules magnétiques nécessaires à l'élaboration de notre méthode. Les utilisations des particules magnétiques dont découle notre approche expérimentale sont aussi exposées. Le troisième chapitre est consacré à la description de notre méthode et à sa validation sur un couple ligand-récepteur modèle : le couple streptavidine-biotine. Enfin, le dernier chapitre étend notre approche à l'étude d'un couple ligand-récepteur directement impliqué dans l'adhésion cellulaire : les cadhérines.

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIE

- BRESSY, L. (2003). *Elasticité et Adhésion du Caséinate Adsorbé aux Interfaces*. —, Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI.
- CREIGHTON, T. E. (1993). *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2nd edition). — W. H. Freeman, New - York.
- GOUBAULT, C. (2004). *Colloïdes magnétiques : auto-organisation et applications biologiques*. —, Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI.
- GOUBAULT, C., JOP, P., FERMIGIER, M., BAUDRY, J., BERTRAND, E. & BIBETTE, J. (2003). Flexible magnetic filaments as micromechanical sensors. — *Physical Review Letters* 91, N° 260802.
- LAUFFENBURGER, D. A. & LINDERMAN, J. J. (1993). *Receptors - Models for binding, trafficking, and signaling*. — oxford university press.
- LEAL-CALDERON, F., STORA, T., MONVAL, O. M., POULIN, P. & BIBETTE, J. (1994). Direct Measurement of Colloidal Forces. — *Physical Review Letters* 72, 2959-2962.

1- RÉACTIONS LIGAND-RÉCEPTEUR ENTRE SURFACES EN REGARD

L'interaction ligand-récepteur, tant elle est complexe et incontournable dans la nature, suscite un vif intérêt où se croisent bon nombre de disciplines scientifiques, allant de la biologie cellulaire à la physique statistique. En ce qui concerne la cinétique de réaction entre un ligand et un récepteur, le cas où les molécules sont libres en solution est aujourd'hui bien compris. La cinétique d'association est décrite en considérant l'étape physique de diffusion des réactifs avec des contraintes liées à la nature de l'interaction ligand-récepteur.

Une nouvelle approche s'est imposée dans le cadre de l'étude de l'adhésion cellulaire et a ouvert un nouveau champ d'étude : considérer les réactions ligand-récepteur sur des surfaces en regard.

Ce chapitre a pour but de présenter l'interaction ligand-récepteur, dans le cadre d'une approche plus physico-chimique que biologique. Nous nous concentrerons, tout particulièrement, sur les caractéristiques cinétiques de cette interaction, bien connues en solution mais explorées seulement depuis peu en surface.

1-1- Les interactions biospécifiques ou interactions ligand-récepteur

1-1-1- Les interactions ligand-récepteur : implication et enjeux

Le terme d'interaction biospécifique est couramment employé dans divers domaines, que ce soit à propos de processus d'adhésion, de séparation ou de détection (Emneus & Markovarga, 1995). Cette notion permet de distinguer des processus induits par la reconnaissance spécifique entre molécules biologiques des processus dits « non spécifiques ». On entend par processus non spécifiques des phénomènes résultant d'interactions attractives « globales », ne dépendant pas du détail moléculaire. On parle ainsi d'adhésion non spécifique entre surfaces ou d'adsorption non spécifique de protéines aux interfaces. Les phénomènes non spécifiques découlent entre autres d'interactions de van der Waals, d'interactions électrostatiques ou

encore peuvent être provoqués par le pontage via des macromolécules adsorbées (Israelachvili, 1992; Evans, 1995). Dans tous les cas, l'attraction qui en suit résulte d'interactions impliquant l'ensemble de la surface ou du volume des objets considérés. En revanche, la notion d'interaction biospécifique renvoie à une notion moléculaire, qui fait intervenir un certain nombre d'interactions, précisément localisées, entre couple de molécules biologiques (figure-1-1). Autrement dit, **un processus biospécifique est gouverné par des « interactions ligand-récepteur »**, c'est-à-dire par **la reconnaissance moléculaire entre un récepteur et un ligand qui lui est spécifique**. En biologie, on a l'habitude de définir un récepteur comme une protéine, ou un groupe de protéines, qui se trouve dans ou à la surface de cellules et qui se lie de façon sélective à une autre molécule appelée ligand (Lauffenburger & Linderman, 1993). La nature des ligands est très diverse et peut consister en toute sorte de molécule.

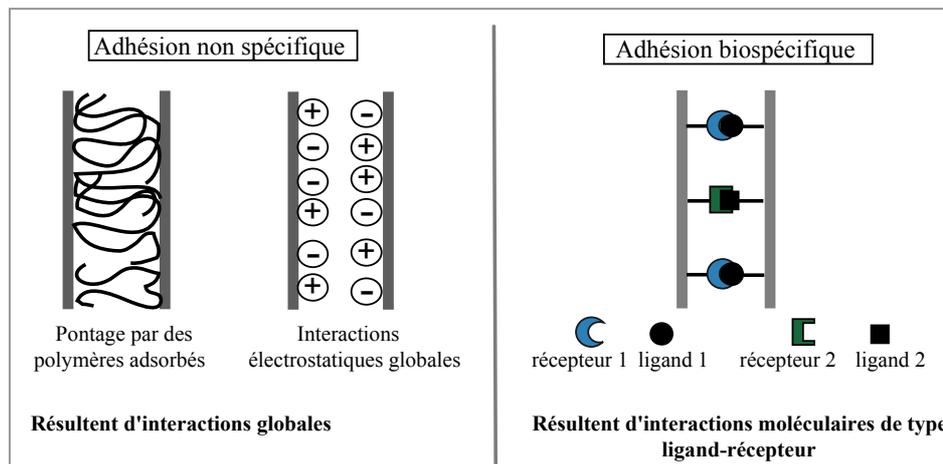


Figure-1-1 : Adhésion non spécifique et Adhésion biospécifique entre deux surfaces.

Un exemple fondamental de processus biospécifique est l'adhésion cellulaire. Cette adhésion ne peut pas être expliquée en termes d'adhésion colloïdale reposant sur un équilibre entre interactions attractives et répulsives : elle est directement gouvernée par des interactions moléculaires spécifiques (Pierres et al., 1998a). Un exemple célèbre d'interaction ligand-récepteur est l'interaction antigène-anticorps, dont la spécificité est bien connue.

La nature de l'interaction ligand-récepteur est complexe et multiple, et sera décrite dans un paragraphe suivant. Sa particularité réside dans son caractère non covalent et réversible. Comprendre et caractériser ces interactions s'avère fondamental tant ces interactions sont présentes partout en biologie. Les fonctions biologiques dépendent toujours d'interactions spécifiques entre des protéines et les molécules qui les entourent (Creighton, 1993). De la

CHAPITRE I

structure de la cellule (Pollard et al., 1994) à l'organisation, la signalisation entre cellules, la migration des cellules, la réponse cellulaire à un stimulus (Bongrand, 1999), chacune de ces manifestations biologiques est pilotée par des interactions ligand-récepteur.

Depuis des décennies, on cherche à décrire et caractériser de telles interactions. Pendant longtemps, l'étude des interactions ligand-récepteur se résumait principalement à l'étude de l'affinité et de la spécificité, autrement dit, il s'agissait de déterminer la force du lien entre récepteur et ligand (affinité) et de mesurer cette intensité pour des molécules de structures relativement proches (spécificité). Pour rendre compte de la « force » du lien ligand-récepteur, on s'attachait à évaluer les constantes thermodynamiques et cinétiques d'association et de dissociation, pour des molécules biologiques en solution (Williams, 1991; Kubi, 1994). Dans ce cadre, on définit simplement la réaction d'association entre un ligand L et un récepteur R , donnant un complexe C , par l'équilibre suivant :



avec k_+ la constante cinétique d'association, k_- la constante cinétique de dissociation, qui sont reliées à la vitesse de réaction v par :

$$v = \frac{d[C]}{dt} = k_+[L][R] - k_-[C] \quad (I-2)$$

Les crochets font référence aux concentrations exprimées en mol.L⁻¹. Le système évolue vers un état d'équilibre, où les concentrations à l'équilibre vérifient :

$$\frac{[R]_{eq}[L]_{eq}}{[C]_{eq}} = \frac{k_-}{k_+} = K_D = \frac{1}{K_A} \quad (I-3)$$

où K_D est la constante thermodynamique de dissociation, exprimée en mol.L⁻¹, et K_A est la constante thermodynamique d'association en mol⁻¹.L, aussi appelée « affinité ».

Outre les techniques de calorimétrie et de marquage des molécules, la technique de résonance plasmonique de surface (SPR), ou « Biacore », a permis de déterminer les constantes thermodynamiques et cinétiques grâce à une méthode de mesure « non intrusive », en temps réel et sans marquage des molécules (Liedberg et al., 1983). Cette technique s'est ainsi introduite dans de nombreux laboratoires comme technique de référence. Cependant, depuis les années 1970, la description des interactions ligand-récepteur a engendré un champ d'étude beaucoup plus large et très varié (Lauffenburger & Linderman, 1993). Ainsi, de nombreux éclairages ont pu être apportés grâce à divers outils. La cristallographie fait partie de ces outils

CHAPITRE I

depuis les années 80. Elle permet de reconstruire, avec une résolution atomique, la structure des molécules, prises indépendamment mais aussi dans l'état lié, au sein du complexe ligand-récepteur (Braden et al., 1994). La biologie moléculaire, grâce à la maîtrise et l'orientation des mutations, permet de déterminer l'influence de chaque acide aminé sur l'interaction globale. Cette technique s'est donc vue souvent couplée à d'autres outils de caractérisation. La modélisation moléculaire (Janin, 1995; Deremble & Lavery, 2005) contribue à la compréhension des interactions fondamentales qui aboutissent à la formation d'un complexe ligand-récepteur. Elle peut avoir un caractère prédictif et/ou explicatif (Janin, 1995).

Enfin, depuis plus de deux décennies, la biophysique vise à caractériser les propriétés physiques de macromolécules biologiques, en général, et des complexes ligand-récepteur, en particulier. Un des objectifs de cette discipline consiste à relier structures moléculaires et fonctions biologiques par l'étude de leurs comportements physiques dans des environnements modèles. Ainsi, en biophysique, on cherche, par exemple, à reproduire et modéliser des environnements qui miment les milieux biologiques, comme les membranes cellulaires. De nombreux outils ont aussi été mis au point pour reconstruire le type de contraintes mécaniques rencontrées dans la nature. Ces outils, comme les pinces optiques, l'AFM, la chambre à flux ou les micropipettes, permettent d'étudier l'effet d'une force sur les caractéristiques des liens ligand-récepteur. En outre, dans une grande partie des cas, ces études sont conduites sur des molécules individuelles (Lavery et al., 2002; Zhu et al., 2002), ce qui permet des interprétations à priori plus simples et sans ambiguïté. Les techniques utilisées pour caractériser les liens ligand-récepteur seront détaillées dans la suite de ce chapitre (§-1-4). Nous nous attarderons sur les techniques permettant de mesurer des constantes cinétiques.

1-1-2- Exemples d'interactions ligand-récepteur

Comme nous l'avons déjà mentionné, les interactions ligand-récepteur sont cruciales en biologie, ayant un rôle clé dans des processus aussi fondamentaux que le métabolisme, la régulation ou l'immunité. Citons dans ce paragraphe quelques exemples de couples ligand-récepteur. La liste n'a pas pour but d'être exhaustive (la figure-1-2 en avance un certain nombre) mais d'introduire des couples que nous allons aborder au cours de ce travail de thèse.

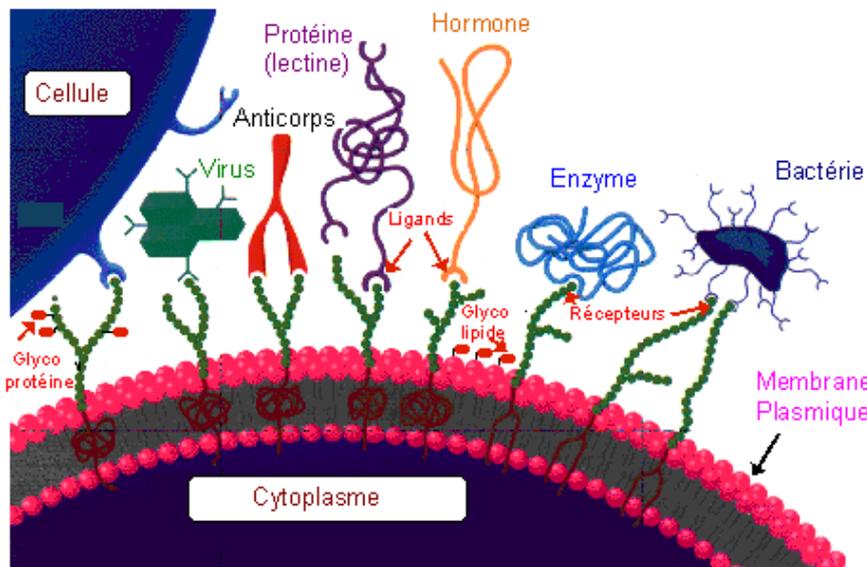


Figure-1-2- Exemples d'interactions ligand-récepteur à la surface de cellules (image issue du site : <http://membres.lycos.fr/jjww/comm.gif>)

Un des exemples le plus représentatif de l'interaction ligand-récepteur est sans doute l'interaction antigène-anticorps. On conçoit aisément la nécessité d'établir une reconnaissance forte et spécifique entre les molécules de surveillance du système immunitaire, les anticorps, et des substances étrangères voire pathogènes, les antigènes. Les anticorps forment une famille remarquable de protéines appelées *immunoglobulines* (Ig). Elles partagent des caractéristiques structurales, que l'on peut décrire succinctement pour la classe d'immunoglobuline la plus abondante, l'IgG. Les IgG sont composées de quatre chaînes peptidiques formant la célèbre structure en Y, représentée en figure-1-3. Pour une IgG, on discerne 12 domaines, appelés *domaines Ig*, qui sont proches par leur nature et leur structure. A un autre niveau, pour une IgG, on distingue les régions dites variables, impliquées dans l'interaction avec l'antigène, des régions dites constantes, qui sont engagées dans la communication avec les autres intervenants du système immunitaire. Plus précisément, une IgG présente deux sites identiques de reconnaissance de l'antigène, situés sur deux fragments analogues, appelés Fab (*antigen binding*). Le reste forme le fragment Fc (*crystallisable*), qui présente aussi des sites de reconnaissance mais avec des molécules du système immunitaire. La définition d'un antigène est beaucoup plus large, cela regroupe toute substance capable d'induire une réponse immunitaire spécifique. Bien que le système immunitaire soit amené à détecter des espèces aussi diverses que des bactéries, des parasites, des virus ou encore des champignons, la reconnaissance est toujours réalisée au niveau de macromolécules : de protéines, dans la majeure partie des cas. Les antigènes sont donc dans la plupart des cas des protéines ou complexes protéiques de structures très variables. Les régions directement impliquées dans l'interaction avec l'anticorps sont appelées *épitopes*, ou déterminants antigéniques. Un même antigène présente habituellement plusieurs types d'épitopes.

CHAPITRE I

Généralement, un antigène induit la production d'anticorps hétérogènes, qui présentent une spécificité et une affinité variable pour les différents épitopes. Cependant, aujourd'hui, des anticorps monoclonaux, c'est-à-dire dirigés contre un unique épitope et avec une affinité importante, sont largement produits et commercialisés.

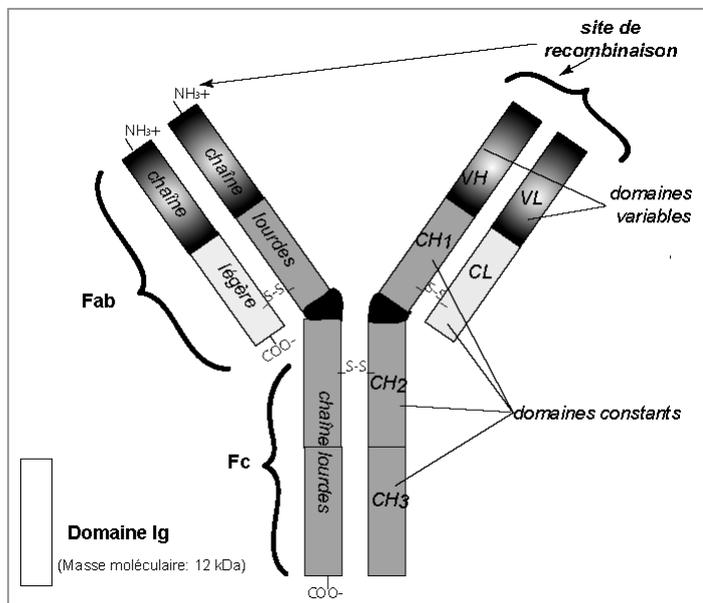


Figure-1-3 : Structure d'une immunoglobuline G.

Enfin, pour les couples antigène-anticorps, les constantes thermodynamiques d'association ont été largement étudiées. L'ordre de grandeur varie généralement entre 10^8 et 10^{10} $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$, voire, dans certains cas, entre 10^6 et 10^{12} $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$.

Comme autre classe de couples ligand-récepteur, citons les molécules intervenant dans l'adhésion cellulaire. Ces molécules se regroupent principalement en quatre grandes familles suivant leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles : les cadhérines, la superfamille des immunoglobulines (SFIg), les intégrines et les sélectines (figure-1-4). Elles peuvent interagir avec une molécule de même type (interaction *homotypique*) ou non (interaction *hétérotypique*) et entre cellules de même nature (*homophile*) ou non (*hétérophilique*) (Chothia & Jones, 1997).

La superfamille des immunoglobulines se définit surtout par sa similarité de structure, avec la présence d'au moins un domaine Ig. Ces molécules participent à des fonctions aussi diverses que l'adhérence, la reconnaissance ou la signalisation entre cellules (défense immunitaire, développement embryonnaire, organisation et stabilité des synapses).

Les cadhérines présentent également des ressemblances de structure mais, en outre, elles jouent des rôles similaires. Elles engagent des liens homotypiques et homophiles, qui permettent la cohésion des tissus et participent à la signalisation cellulaire. Il est à noter que

CHAPITRE I

cette adhésion est dépendante de la concentration en calcium du milieu. Nous nous intéresserons à cette famille de molécules au cours du chapitre 4.

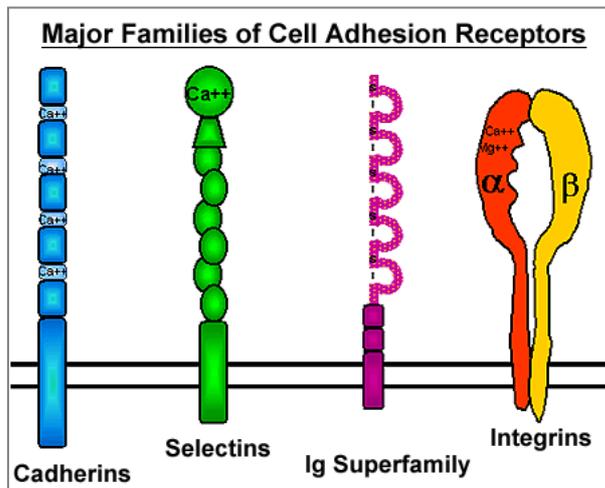


Figure-1-4 : Les principales familles de molécules d'adhésion cellulaire.

Les sélectines sont aussi conditionnées par la concentration en calcium, elles se lient avec des sucres présentés par une molécule porteuse. Les intégrines présentent la particularité d'être actives sous la forme d'un cluster de deux protéines différentes. La plupart d'entre elles se lient aux molécules de la matrice extracellulaire et au cytosquelette (aux microfilaments d'actine). Certaines intégrines jouent aussi un rôle dans l'adhésion cellule-cellule. Le calcium et le magnésium agissent sur leur capacité d'adhésion.

Enfin, il est également important de citer ici le couple ligand-récepteur présentant l'affinité la plus grande recensée à ce jour, à savoir le couple streptavidine-biotine, véritable « colle biologique ». Sa constante d'association est de $10^{14} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ (Miyamoto & Kollman, 1993), et le temps de vie du complexe d'environ 45 heures. Ce couple est, de ce fait, abondamment utilisé dans de nombreux domaines. Il est employé, par exemple, comme moyen pour fonctionnaliser des surfaces. Il s'est aussi imposé en biophysique comme le couple ligand-récepteur modèle. Une quantité d'informations et de caractérisations se sont accumulées ces dernières années pour ce couple (§-1-5). Ce couple sera étudié au chapitre 3.

1-1-3- Nature de l'interaction ligand-récepteur

Une des principales caractéristiques de l'interaction ligand-récepteur est son caractère non covalent : aucune liaison covalente n'est formée entre les deux molécules. Relier des macromolécules par des liaisons non covalentes constitue aussi un domaine de recherche en

CHAPITRE I

chimie (Lehn et al., 1990; Mihailescu & Gilson, 2004). L'interaction ligand-récepteur fait appel à différents types d'interactions à l'échelle moléculaire : interactions de van der Waals, hydrophobes, liaisons hydrogène et électrostatiques. Il est intéressant de noter que ce sont des interactions de même nature qui interviennent dans les phénomènes non spécifiques et dans les phénomènes spécifiques, mais à des échelles et avec des amplitudes différentes. Le concept d'interaction hydrophobe, bien qu'il soit employé en physicochimie, notamment dans la terminologie du mouillage, est difficile à transposer au niveau moléculaire (Bongrand, 1999). On préfère parler d'interactions non polaires, autrement dit d'interactions qui prennent part entre résidus (groupement caractéristique d'un acide aminé) non polaires, c'est-à-dire aromatiques ou aliphatiques. Les interactions électrostatiques et les liaisons hydrogène sont, elles, de nature polaire, faisant intervenir des résidus polaires et/ou chargés. Quelle que soit la nature des interactions, les molécules d'eau jouent un rôle primordial. Les interactions non polaires conduisent à la libération de molécules d'eau qui permettaient la solvatation. Dans ce cas, le système y gagne d'un point de vue entropique, en relâchant plusieurs molécules d'eau, mais aussi énergétiquement car les interactions entre molécules d'eau et résidus non polaires ne sont pas favorables. Pour les interactions polaires, les molécules d'eau peuvent, dans certains cas, directement relier ligand et récepteur, en engageant des liaisons hydrogène. Il est généralement proposé que les interactions de plus longue portée (électrostatiques) interviennent surtout dans le caractère spécifique de l'interaction ligand-récepteur, et que les interactions de courte portée soient responsables de la stabilité du complexe.

En 1890, Emil Fisher proposait le modèle "**clé-serrure**" pour expliquer comment les systèmes biologiques interagissent. Aujourd'hui cette image s'est imposée pour décrire l'interaction ligand-récepteur avec l'idée de **complémentarité des structures**. L'interaction globale ligand-récepteur résulte de plusieurs interactions qui interviennent sur une aire allant d'une centaine à quelques milliers d'Å². La complémentarité des surfaces au contact a été démontrée tant en termes d'affinité chimique et physique, qu'en termes de forme géométrique. En outre, cette complémentarité est très fine : les interactions et l'aire de contact sont précisément ajustées, les attractions et les répulsions intervenant à l'échelle d'un résidu. Notons aussi que de façon générale les macromolécules ne sont que légèrement déformées. La conformation globale a également son importance : des mutations opérées sur des résidus situés loin de l'interface ont parfois abouti à des changements radicaux de la formation du complexe. Enfin, il faut imaginer la liaison ligand-récepteur comme étant susceptible d'évoluer avec le temps, avec plusieurs phases successives de complexation.

CHAPITRE I

La caractérisation cristallographique par rayons X est à l'origine d'une grande partie de la compréhension de la nature de l'interaction ligand-récepteur. En effet, elle permet de reconstruire les structures atomiques des complexes ligand-récepteur avec une résolution qui va de 3 à 1.6 Å (Braden & Poljak, 1995; Davies & Cohen, 1996). Un exemple d'une étude cristallographique, menée sur divers couples, est résumé à titre d'illustration (Lo Conte et al., 1999). D'un point de vue pratique, les auteurs mesurent l'aire accessible aux molécules d'eau pour le complexe et pour les molécules individuelles et ils en déduisent l'aire interfaciale. La taille et la composition chimique de l'aire interfaciale ont attesté d'une complémentarité des surfaces. Dans cette étude, l'aire interfaciale varie entre 1150 Å² et 4660 Å², avec une valeur caractéristique de 1700 Å². La structure atomique étant connue pour le complexe et pour les molécules individuelles, il est possible d'apprécier l'amplitude des déformations causées par la complexation. Il s'avère que la grande majorité des couples ne subit que de très faibles déformations. Seuls les couples présentant les aires interfaciales les plus grandes connaissent des déformations relativement importantes. Pour donner une idée du nombre d'atomes impliqués dans une liaison ligand-récepteur, chaque protéine apporte dans l'aire interfaciale en moyenne 87 atomes de 27 résidus différents. Parmi ces résidus, en moyenne, 57% d'entre eux sont de nature non polaire, aromatique (Histidine, Tryptophane, Phénylalanine et Tyrosine) ou aliphatique (Leucine, Valine, isoleucine), 24% sont polaires mais neutres et 19% sont chargés. Ces chiffres sont évidemment très variables d'un complexe à l'autre. Comme nous l'avons déjà évoqué, les molécules d'eau peuvent participer à la liaison entre ligand et récepteur, en formant des liaisons hydrogène avec chacune des molécules du complexe. On compte en moyenne 18 molécules d'eau qui réalisent ce genre de pont, ce qui est plus important que le nombre moyen de liaisons hydrogène (9) directement réalisées entre les deux protéines. La figure-1-5 donne un exemple de structure de complexe ligand-récepteur reconstruit à l'aide de données cristallographiques.

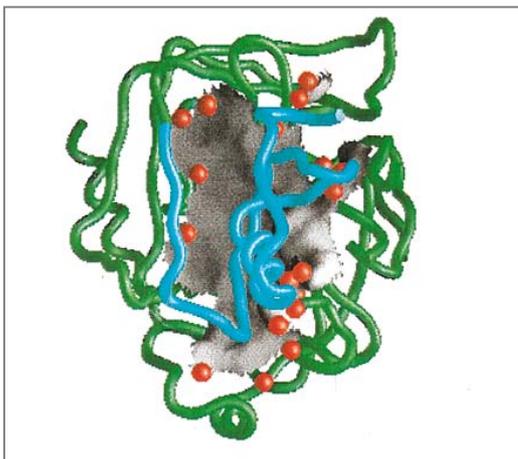


Figure-1-5 : Reconstruction d'un complexe ligand-récepteur (1 CHO Chymotrysin-ovomucoïd) à partir de données cristallographiques, l'aire de contact apparaît en gris et les molécules d'eau sont représentées en rouge (Lo Conte et al., 1999).

Pour résumer, nous pouvons dire que l'interaction ligand-récepteur est le résultat de quelques interactions fortes, majoritairement non polaires, entre des surfaces ajustées et complémentaires, et qu'elles n'engendrent pas de grande déformation.

1-1-4- Apport de la Biophysique dans l'étude des interactions ligand-récepteur

Pour illustrer la pertinence biologique d'étudier les interactions ligand-récepteur, en particulier avec une approche de biophysique, prenons ici l'exemple de l'adhésion de leucocytes à la surface des vaisseaux sanguins en réponse à une inflammation. Cet exemple permet de montrer un cas où l'adhésion est réalisée par l'intermédiaire de deux couples ligand-récepteur, qui, bien qu'ils affichent des constantes d'affinité similaires, ont des rôles et des implications très distincts.

Des expériences de biologie cellulaire réalisées par deux équipes distinctes et menées *in vivo* (von Andrian et al., 1991) et *in vitro* (Lawrence & Springer, 1991) ont apporté une description précise de l'adhésion des leucocytes sur la paroi des vaisseaux sanguins. D'un point de vue phénoménologique, les leucocytes, migrant à des vitesses de quelques centaines de micromètres par seconde, sont, dans un premier temps, ralentis : ils roulent alors de façon adhérente sur la paroi des vaisseaux. Puis, soit ils se décrochent de la surface, soit ils y sont stoppés. Dans ce dernier cas, ils se déforment et passent entre les cellules endothéliales pour atteindre le tissu périphérique infecté. D'un point de vue moléculaire, il a été démontré que les différentes étapes de cette adhésion sont attribuées à des molécules distinctes. Les sélectines, exprimées à la surface des cellules endothéliales pendant l'inflammation, interviennent uniquement dans la première phase de roulement. Les intégrines, présentes à la surface des leucocytes, et activées pendant l'inflammation, sont responsables de la phase d'arrêt et de perméation des leucocytes (figure-1-6). Ces rôles sont bien indépendants puisque, en inhibant sélectivement les sélectines, le roulement disparaît mais une capture des leucocytes est observée en régime statique. Inversement, l'inhibition des intégrines annule l'arrêt et le maintien ferme des leucocytes sur la paroi. Quand on prête attention, maintenant, aux caractéristiques thermodynamiques de ces récepteurs, à savoir leur affinité, un même ordre de grandeur, de 10^6 - 10^7 mol⁻¹.L, est avancé. Cette donnée ne rend donc pas compte de leur différence de fonctionnalité.

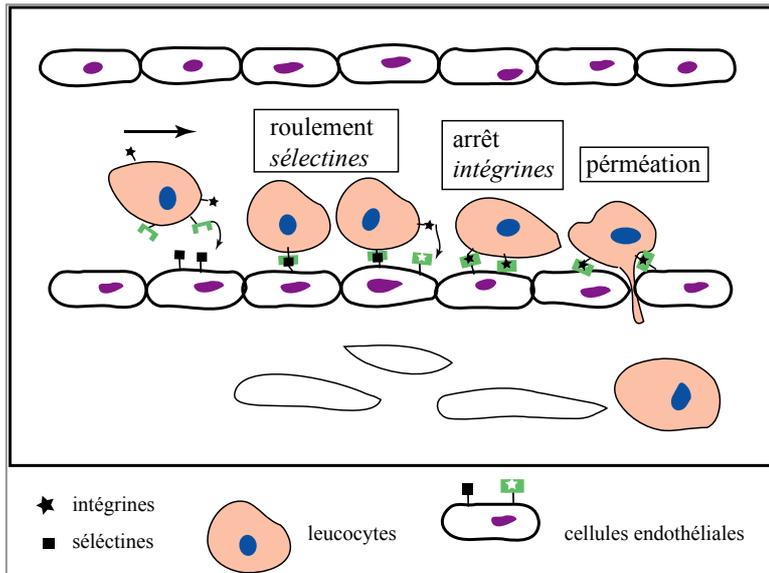


Figure-1-6 : Interaction entre un leucocyte et la paroi d'un vaisseau sanguin en réponse à l'inflammation d'un tissu.

Cet exemple illustre combien les interactions ligand-récepteur sont complexes et que leur description ne peut se limiter à la détermination des constantes d'affinité ou à la seule donnée des structures moléculaires.

Comme nous venons de le voir, la seule connaissance des structures moléculaires et des paramètres thermodynamiques ne permet pas de rendre compte des fonctions biologiques des différents couples ligand-récepteur. Les études biophysiques, qui visent à caractériser les molécules du vivant au moyen de techniques physiques et chimiques, peuvent apporter des précisions remarquables sur les différents modes d'interaction entre un ligand et un récepteur.

Ces dernières années, beaucoup d'informations ont été apportées sur l'interaction ligand-récepteur, et dans la majorité des cas, grâce à des études en biophysique. Sans rentrer ici dans les détails des techniques utilisées, nous pouvons illustrer quelques propriétés pertinentes enseignées par la biophysique, en revenant sur le cas des séllectines et les intégrines (Fritz et al., 1998; Evans et al., 2001-a; Irvine et al., 2002; Evans et al., 2004; Vitte et al., 2004). Entre autres, il a été démontré que l'adhésion induite par les séllectines dépend fortement du taux de cisaillement (Chen & Springer, 2001) : augmenter le taux de cisaillement améliore l'adhésion induite par les séllectines. La mesure de la constante cinétique d'association, dans des géométries mimant l'adhésion cellulaire, a abouti à une valeur relativement élevée pour la séllectine, en comparaison à d'autres récepteurs (Long et al., 2001). Il a aussi été révélé que les séllectines établissaient des liens très originaux, appelés « catch bonds » ou liaisons

CHAPITRE I

accrocheuses, c'est-à-dire des liens qui se renforcent avec l'application d'une force (Marshall et al., 2003; Yago et al., 2004). Enfin, leur architecture moléculaire, notamment leur taille, joue également un rôle dans leur capacité d'adhésion (Huang et al., 2004). Ainsi, les sélectines se sont révélées avoir des propriétés dynamiques remarquables, que l'on peut relier à leur fonctionnalité : permettre une capture rapide et efficace de cellules migrant à des vitesses élevées. En ce qui concerne les intégrines, l'interaction avec leur ligand est complexe. Les intégrines montrent diverses affinités régulées par des changements de conformation (Chigaev et al., 2001; Zhang et al., 2005). Leur interaction est associée à la formation de plusieurs liens avec l'idée d'interactions coopératives. Ces interactions coopératives ou « clustering interaction » semblent intervenir pour des temps de contact plus longs (Vitte et al., 2004). Ces études, qui vont au delà de la détermination de constantes d'affinité brutes, révèlent une nette différence de comportements entre sélectines et intégrines.

Une sous-discipline entière de la biophysique vise à *mesurer les forces* qui contrôlent les interactions entre ligand et récepteur. Les forces interviennent à plusieurs niveaux : les forces de courte portée participent à la stabilité des liens et les forces de longue portée agissent sur la vitesse d'association. Plusieurs techniques, qui étaient dédiées aux mesures de forces entre surfaces ou de forces colloïdales, ont connu une nouvelle application dans l'étude des interactions ligand-récepteur. C'est le cas, par exemple, du « Surface Force Apparatus » (SFA) ou de la microscopie à force atomique (AFM) (Leckband, 2000). Ces méthodes reconstruisent des profils force-distance, en caractérisant l'amplitude et la portée des interactions. Les profils permettent par exemple de « visualiser » différents états d'adhésion et de caractériser la nature des forces qui sont impliquées. Il est ensuite pertinent de confronter ces informations avec les structures moléculaires et les fonctions *in vivo*.

Dans le cadre de mesure de forces, une approche consiste à déterminer la force qui faut appliquer pour *rompre* un lien ligand-récepteur. En effet, par leur caractère non covalent, les liens ligand-récepteur sont plus ou moins « fragiles ». D'un point de vue expérimental, il faut être capable de détecter des liens uniques et d'appliquer des forces contrôlées entre 0.01 pN et 1 nN. Ainsi, l'AFM est utilisée à cette fin mais d'autres méthodes ont été mises au point. C'est le cas de la chambre à flux, des micropipettes et des pinces optiques. La contrainte mécanique exercée sur un lien va affecter son temps de vie, et va renseigner sur sa *constante cinétique de dissociation* (§1-4-2). Les liens ligand-récepteur sont aussi caractérisés par la nature de leur réponse aux contraintes mécaniques : on distingue les « slip bonds » (liaisons glissantes) pour des liens qui se cassent plus vite sous l'action d'une force et les « catch

CHAPITRE I

bonds » (liaisons accrocheuses) pour des liens qui se renforcent avec l'application d'une force.

La détermination de *constantes cinétiques d'association* entre molécules *attachées* sur des surfaces est aussi une caractérisation fondamentale. En effet, cette détermination permet d'étudier des molécules biologiques directement dans l'environnement où elles sont actives, comme, par exemple, les molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire. Mais, aujourd'hui, encore peu d'outils expérimentaux sont dédiés à ce genre de caractérisation. Néanmoins, les premières études tendent toutes à montrer une certaine variabilité de ces constantes d'association en surface.

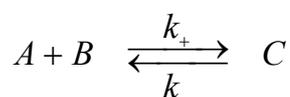
Ce travail de thèse s'inscrit précisément dans le cadre de cette problématique car il s'attache à mesurer des constantes cinétiques d'association entre molécules attachées sur des surfaces et à comprendre les sources de la variabilité observée. La suite du chapitre est consacrée aux constantes cinétiques de réaction ligand-récepteur, des valeurs en solution jusqu'aux tendances en surface.

1-2- Cinétique de réaction en solution

Nous nous intéressons, dans ce travail de thèse, aux mesures de constantes cinétiques pour des réactions ligand-récepteur dans le cas particulier où les réactifs sont reliés à des surfaces. Avant d'être étudiées en surface, les constantes cinétiques ont été largement mesurées pour des molécules en solution. C'est pourquoi nous rappellerons, dans un premier temps, le formalisme des réactions chimiques en solution. Puis, nous aborderons les approches théoriques cherchant à modéliser la partie diffusive des constantes d'association, concepts qui seront ensuite appliqués au cas particulier des réactions ligand-récepteur.

1-2-1- Cinétique chimique – constantes cinétiques empiriques

Nous considérons la réaction entre deux entités réactives, *A* et *B*, conduisant à un produit *C*.



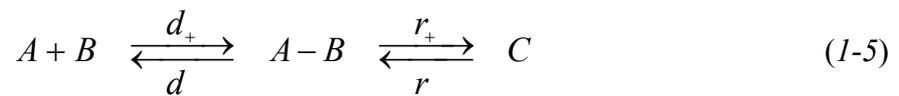
CHAPITRE I

Nous supposons que les entités A et B diffusent dans un même volume. La réaction est dite « 3D », ou « en solution », pour la distinguer des réactions où les réactifs ont perdu un ou plusieurs degrés de liberté de diffusion. Les objets appelés « entités réactives » peuvent être des molécules, des macromolécules de type protéines, ou encore des particules. La vitesse, ou cinétique, de cette réaction dépend du nombre de collisions entre les différentes entités. La fréquence des collisions dépend directement des concentrations en A et B . Même si chaque collision n'aboutit pas forcément à une réaction, la vitesse de réaction dépend, d'un point de vue macroscopique, des concentrations en chacune des entités A , B et C . L'écriture la plus simple de la vitesse de réaction v est :

$$v = k_+ [A].[B] - k_- [C] \quad (I-4)$$

où k_+ et k_- sont les constantes cinétiques d'association et de dissociation.

Dans la description d'une cinétique de réaction, on distingue deux phénomènes : le phénomène de transport physique ou *diffusion*, et le phénomène purement chimique de transformation ou *réaction*. Pour séparer ces deux phénomènes, la notion de *complexe de rencontre* a été introduite. Le complexe de rencontre, ou paire prééactive, est un intermédiaire dans le processus de réaction. Il est défini quand les entités sont suffisamment proches pour réagir : quand le couplage réactionnel, ou capacité à réagir, a atteint son maximum. Le processus d'association est alors séparé en deux étapes : formation du complexe de rencontre et transformation du complexe (ou activation). La réaction se décompose en :



où $A - B$ est le complexe de rencontre, et d_+ et d_- sont les constantes cinétiques de l'étape de diffusion et enfin r_+ et r_- sont les constantes cinétiques de l'étape de réaction. Si on suppose que le complexe de rencontre est dans un état quasi-stationnaire, avec $\frac{d[A - B]}{dt} = 0$, les constantes globales, k_+ et k_- , s'écrivent alors en fonction des constantes de chaque étape comme :

$$k_+ = \frac{r_+ d_+}{r_+ + d_-} \quad (I-6)$$

$$k_- = \frac{r_- d_-}{r_+ + d_-} \quad (I-7)$$

CHAPITRE I

Remarquons que k_+ et d_+ sont exprimées en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ (ou $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) et k_- , d_- , r_+ et r_- en s^{-1} . Les constantes thermodynamiques d'association K_A ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ ou m^3) et de dissociation K_D ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ou m^{-3}) sont alors définies par :

$$K_A = \frac{1}{K_D} = \frac{k_+}{k_-} = \frac{r_+ d_+}{r_- d_-} \quad (I-8)$$

Sachant que c'est le phénomène le plus lent qui impose la vitesse de réaction, on peut distinguer une réaction « limitée par la réaction » d'une réaction « limitée par la diffusion ». Pour cela, c'est l'évolution du complexe $A-B$ qui est considérée. Dès que A et B se rencontrent et forment le complexe $A-B$, il faut déterminer si ce complexe a une plus grande chance de réagir ou de se séparer. Les deux grandeurs à comparer sont donc r_+ et d_- : il s'agit de comparer, en quelque sorte, un temps de réaction avec le temps de vie du complexe.

Ainsi, une réaction est *limitée par la diffusion* quand $d_- \ll r_+$. Dès qu'il y a rencontre il y a réaction, puisque le temps de réaction est beaucoup plus petit que le temps de vie du complexe. Dans ce cas, la constante cinétique globale d'association est directement la constante d'association de l'étape de diffusion :

$$k_+^{\text{lim diff}} = d_+ \quad (I-9)$$

Et la constante globale de dissociation est :

$$k_-^{\text{lim diff}} = \frac{d_- r_-}{r_+} \quad (I-10)$$

Inversement, la réaction est dite *limitée par l'étape de réaction* quand $d_- \gg r_+$ et la constante globale d'association s'écrit alors :

$$k_+^{\text{lim react}} = \frac{r_+ d_+}{d_-} \quad (I-11)$$

La constante cinétique globale de dissociation est directement r_- :

$$k_-^{\text{lim react}} = r_- \quad (I-12)$$

Nous résumons cela par les expressions suivantes :

$$\frac{1}{k_+} = \frac{1}{k_+^{\text{lim react}}} + \frac{1}{k_+^{\text{lim diff}}} \quad \text{et} \quad \frac{1}{k_-} = \frac{1}{k_-^{\text{lim react}}} + \frac{1}{k_-^{\text{lim diff}}} \quad (I-13)$$

Revenons désormais sur les caractéristiques de ces deux étapes. La diffusion est le phénomène de transport qui permet les rencontres entre A et B . La constante de cinétique associée à cette étape dépend de la taille respective des molécules ainsi que des propriétés

CHAPITRE I

physiques du milieu, telles que la viscosité η et la température T , moteur de la diffusion. En 1917, Smoluchowski (Smoluchowski, 1917) a décrit les phénomènes de diffusion, qui ont été traduits en termes de constantes de vitesse. La constante d'association, appelée « constante de Smoluchowski », notée k_{smolu} , est donnée par la résolution d'une équation de diffusion (§ 1-2-2-a). Pour des sphères isotropiquement réactives, elle est exprimée par :

$$d_+ = k_{smolu} = 4\pi DR \quad (1-14)$$

où $D = D_A + D_B$ est la somme des coefficients de diffusion de translation de A et de B , exprimés en $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, et R est la somme des rayons de A et B . Le coefficient de diffusion s'écrit :

$$D_A = \frac{kT}{6\pi\eta R_A} \quad (1-15)$$

Pour des sphères de mêmes rayons, on a alors :

$$k_{smolu} = \frac{2kT}{3\eta} \quad (1-16)$$

Ainsi, à température ambiante, en milieu aqueux ($\eta = 10^{-3}$ Pa.s), k_{smolu} est évalué à environ $210 \cdot 10^{-18} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ soit environ $10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$. Notons que dans ce cas cette constante est indépendante de la taille des objets. En effet, pour des sphères plus grosses, la diffusion est ralentie mais compensée par une « cible plus large ». Cette constante k_{smolu} est donc une limite pour toute cinétique concernant des objets isotropiquement réactifs, de même taille et sans interaction. Nous reviendrons en détail sur cette approche et les raffinements qui peuvent être apportés.

Pour décrire d_- , Bell propose l'expression suivante (Bell, 1978) :

$$d_- = 3[D_A + D_B] \cdot R^{-2} \quad (1-17)$$

L'étape de réaction à proprement parler concerne la transformation de la paire prééactive en produit C . Pour chaque collision, ou formation du complexe de rencontre, la réaction peut se faire avec une probabilité « de type Boltzmann », en comparant l'énergie de la collision kT avec l'énergie nécessaire pour réaliser la réaction, appelée *énergie d'activation*, et notée $\Delta E^\#$. Les constantes cinétiques associées à cette étape peuvent être décrites, au niveau moléculaire, de la façon suivante :

$$r_+ = \frac{kT}{h} \exp\left(-\frac{\Delta E^\#}{kT}\right) \quad (1-18)$$

$$r_- = \frac{kT}{h} \exp\left(\frac{-(\Delta E^\ddagger + \Delta E^0)}{kT}\right) \quad (I-19)$$

avec $\frac{kT}{h}$ la fréquence de vibration élémentaire, ayant pour ordre de grandeur 10^{13} s^{-1} , h la constante de Planck, ΔE^\ddagger l'énergie d'activation, et ΔE^0 l'énergie de réaction (prise positive), définies sur la figure-1-7.

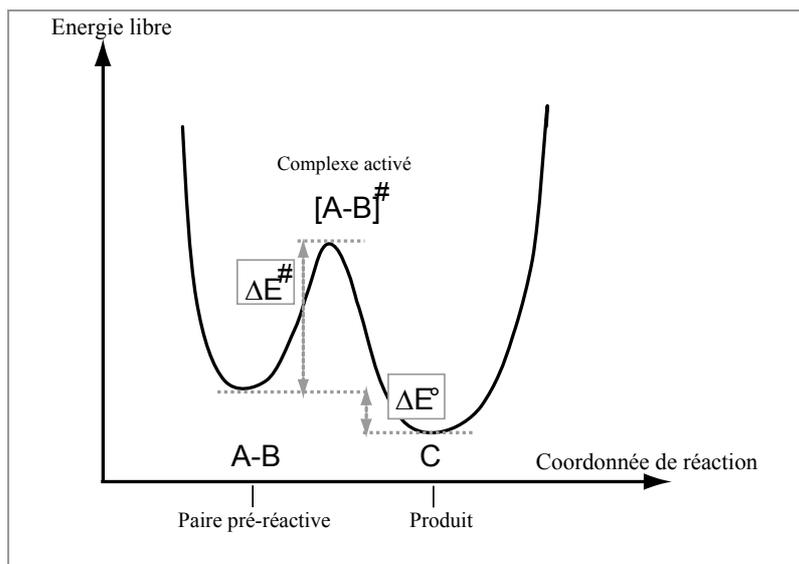


Figure-1-7 : Etape de réaction (transformation chimique), définition du complexe activé, de l'énergie d'activation et de l'énergie de réaction. La coordonnée de réaction permet de caractériser de façon générale l'évolution d'une réaction (distance, angle de liaison...).

En reprenant les expressions de d_+ , d_- , et celles de r_+ et r_- , l'expression suivante de la constante thermodynamique d'association K_A est déduite :

$$K_A = \frac{r_+ d_+}{r_- d_-} = \frac{4\pi R^3}{3} \exp\left(\frac{\Delta E^0}{kT}\right) \quad (I-20)$$

(Notons que K_A et K_D ne dépendent pas des coefficients de diffusion).

L'énergie d'activation dépend certes du gain d'énergie ΔE^0 mais aussi de l'énergie de réorganisation du système, dont témoigne l'allure des profils énergétiques. Pour l'énergie de réorganisation, on distingue la partie concernant la sphère interne, c'est-à-dire les réactifs eux-mêmes, et la partie concernant la sphère externe, comme par exemple l'organisation du solvant. Quand il y a formation de liaison, covalente par exemple, le terme de la sphère interne est important. Pour les réactions biologiques, c'est surtout la sphère externe qui est sollicitée. Nous ne nous attarderons pas davantage sur la description de cette partie chimique. Elle est très bien décrite dans le cas de certaines réactions chimiques, comme le transfert d'électron avec la théorie de Marcus (Marcus, 1964). Mais, pour des associations ligand-

récepteur, l'étape chimique d'activation ne fait pas encore l'objet de descriptions avancées. Les études sur la réaction ligand-récepteur se concentrent davantage sur l'étape de diffusion : comment les macromolécules amènent au contact et dans la bonne orientation leurs « patches réactifs ». Le prochain paragraphe est dédié à une description plus précise de l'étape de diffusion.

1-2-2- Cinétique « physique » - Diffusion dans un potentiel d'interaction

Nous nous attachons ici à décrire succinctement comment les cinétiques de réactions sont abordées par les physiciens et comment nous pouvons faire le lien avec les constantes cinétiques définies précédemment.

1-2-2-a- Approche Smoluchowski-Debye-Collins-Kimball

Nous avons introduit, dans le paragraphe précédent, le travail de Smoluchowski sur la description des phénomènes de diffusion. Attardons-nous ici sur les conditions et hypothèses de cette approche. La constante d'association est calculée pour deux sphères isotropiquement réactives A et B qui sont sans interactions et soumises au seul processus de diffusion. Une particule A est placée fixe en $r = 0$, puis le flux de particules de B est calculé en résolvant une équation de diffusion de la forme :

$$\frac{\partial c}{\partial t} + D\Delta c = 0 \quad (I-21)$$

avec c la concentration en B . Les conditions limites sont:

$$c(R, t) = 0 \quad \text{et} \quad c(\infty, t) = c_0 \quad (I-22)$$

où R est toujours la somme des rayons des deux espèces et c_0 la concentration initiale en B . On parle ici d'une condition d'absorption totale : une fois arrivées en $r = R$ les sphères « disparaissent », c'est-à-dire que l'étape de réaction est immédiate et irréversible. Le flux à la distance $r = R$, donne la constante de vitesse de Smoluchowski k_{smolu} :

$$k_{smolu} = \frac{4\pi DR^2}{c_0} \left. \frac{\partial c}{\partial r} \right|_{r=R} = 4\pi DR \quad (I-23)$$

Debye a gardé les mêmes conditions limites mais a ajouté un potentiel d'interaction $V(r)$ entre A et B (Debye, 1942). En résolvant l'équation de diffusion, la constante k_{SD} « de Smoluchowski-Debye » généralisée vaut :

$$\frac{1}{k_{SD}} = \frac{1}{4\pi D} \int_R^\infty \frac{e^{V(r)/kT}}{r^2} dr \quad (I-24)$$

Puis, Collins et Kimball ont étendu la théorie de Smoluchowski en envisageant des conditions limites plus vraisemblables (Collins & Kimball, 1949). Ils considèrent qu'il peut y avoir ou non réaction à la distance $r = R$, c'est-à-dire que les particules peuvent réagir et être « absorbées » ou ne pas réagir et être « réfléchies ». Ils introduisent ainsi un paramètre κ , constante dite « intrinsèque », qui délimite l'étendue du phénomène de diffusion. La nouvelle condition en $r = R$ s'exprime par un flux au contact proportionnel à la concentration qui réagit :

$$4\pi R^2 D \left. \frac{\partial c}{\partial r} \right|_{r=R} = \kappa c(R) \quad (I-25)$$

Quand $\kappa = 0$ il n'y a pas de réaction ($k_+ = 0$), et quand $\kappa \rightarrow \infty$ la réaction est limitée par la diffusion ($c(R) = 0$ est nécessaire pour avoir k_+ fini). Le problème consiste désormais à résoudre une équation de réaction-diffusion, et la constante cinétique de Collins-Kimball, k_{CK} , qui en découle, est :

$$\frac{1}{k_{CK}} = \frac{1}{\kappa} + \frac{1}{k_{smolu}} \quad (I-26)$$

Enfin, on peut aussi généraliser dans le cas où il existe un potentiel d'interaction, avec la constante de Collins-Kimball-Debye k_{CKD} :

$$\frac{1}{k_{CKD}} = \frac{1}{\kappa e^{-V(R)/kT}} + \frac{1}{k_{SD}} \quad (I-27)$$

1-2-2-b- Lien avec les constantes cinétiques chimiques

Relions maintenant les constantes explicitées par Collins et Kimball avec les constantes du formalisme de cinétique chimique. Comme nous l'avons déjà mentionné, la constante cinétique de l'étape de diffusion d_+ est décrite par l'approche Smoluchowski (avec ou non l'apport de Debye) :

$$k_+^{\text{limdiff}} = d_+ = k_{SD} \quad (I-28)$$

Puis, en rapprochant les équations (I-11) et (I-27) nous pouvons écrire que :

$$k_+^{\text{limreact}} = \frac{r_+ d_+}{d_-} = \kappa e^{-V(R)/kT} \quad (I-29)$$

CHAPITRE I

Pour passer aux constantes de dissociation, la constante d'équilibre thermodynamique définie à l'équation (I-20) est exprimée par :

$$K_A = \frac{4\pi R^3}{3} e^{-V(R)/kT} \quad (I-30)$$

en considérant que l'énergie de réaction n'est autre que l'énergie d'interaction pour $r = R$, autrement dit que l'on prendra $V(r = R) = -\Delta E^0$. Cela revient à dire que $V(R)$ est l'énergie d'interaction quand le complexe C est formé, et que $|V(R')| \ll |V(R)|$. En confrontant cette dernière relation avec l'équation (I-29), on obtient :

$$k_-^{\text{lim react}} = r_- = \frac{\kappa}{\frac{4\pi}{3} R^3} \quad (I-31)$$

Et enfin, on en déduit :

$$k_-^{\text{lim diff}} = \frac{d_- r_-}{r_+} = \frac{4\pi}{3} R^3 \frac{e^{-V(R)/kT}}{k_{SD}} \quad (I-32)$$

1-2-2-c- Lien avec l'approche de Kramers

On peut réconcilier les travaux de Collins et Kimball avec ceux de Smoluchowski et Debye, en montrant que la constante k_{CKD} est un cas particulier de l'approche Smoluchowski-Debye pour un profil d'interaction $V(r)$ approprié et pour une condition d'absorption totale à une distance pertinente (Shoup & Szabo, 1982).

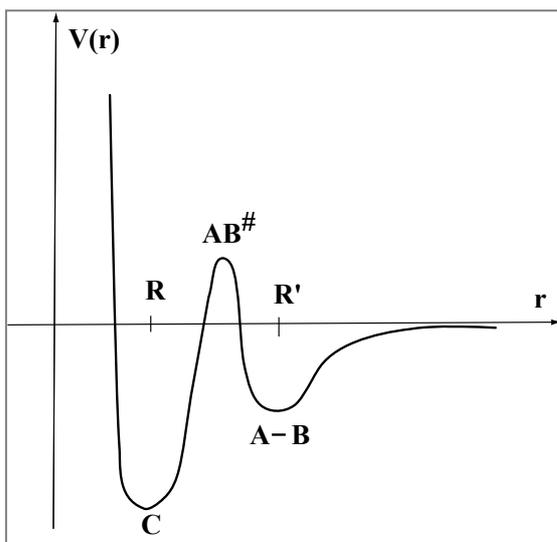


Figure-1-8 : Potentiel d'interaction $V(r)$ considéré pour harmoniser l'approche de Collins-Kimball-Debye avec celle de Smoluchowski-Debye. L'abscisse est la distance r entre les deux objets interagissant. (Le produit est à gauche, à ne pas confondre avec la représentation de la figure-1-7)

Ce profil $V(r)$, présenté en figure-1-8, comprend un minimum local pour $r = R'$, correspondant à la formation de la paire préreactive $A-B$ et un minimum absolu pour $r = R$

CHAPITRE I

correspondant au produit C . Il fait intervenir aussi une barrière d'énergie entre paire $A-B$ et produit C , qui correspond à une barrière d'activation. Considérant ce profil d'interaction $V(r)$, les deux approches sont conciliées en écrivant l'égalité entre la constante de Smoluchowski-Debye avec la condition d'absorption totale pour $r = R$ et la constante de Collins-Kimball-Debye avec la condition d'absorption partielle à $r = R'$:

$$k_{SD} [\rightarrow R] = k_{CKD} [\rightarrow R'] \quad (I-33)$$

Il est légitime de poser une condition d'absorption totale pour un minimum global et une condition d'absorption partielle pour un minimum local. En reprenant l'expression (I-24), la condition limite d'absorption totale s'écrit pour $r = R$, puis le chemin d'intégration est séparé en $r = R'$. On écrit ainsi :

$$\frac{1}{k_{SD}} = \frac{1}{4\pi D} \int_R^\infty \frac{e^{V(r)/kT}}{r^2} dr = \frac{1}{4\pi D} \int_R^{R'} \frac{e^{V(r)/kT}}{r^2} dr + \frac{1}{4\pi D} \int_{R'}^\infty \frac{e^{V(r)/kT}}{r^2} dr \quad (I-34)$$

Pour l'approche Collins-Kimball-Debye, la condition limite d'absorption partielle s'écrit pour $r = R'$ et d'après (I-27), on a :

$$\frac{1}{k_{CKD}} = \frac{1}{\kappa e^{-V(R)/kT}} + \frac{1}{k_{SD} [\rightarrow R']} = \frac{1}{\kappa e^{-V(R)/kT}} + \frac{1}{4\pi D} \int_{R'}^\infty \frac{e^{V(r)/kT}}{r^2} dr \quad (I-35)$$

Ainsi, (I-34) et (I-35) donnent :

$$\kappa e^{-V(R)/kT} = \left(\frac{1}{4\pi D} \int_R^{R'} \frac{e^{V(r)/kT}}{r^2} dr \right)^{-1} \quad (I-36)$$

Enfin, on peut identifier ici la constante intrinsèque introduite par Collins et Kimball à celle obtenue par la théorie de Kramers de franchissement de barrière d'énergie par diffusion, pour des objets colloïdaux (Kramers, 1940). Sans rentrer dans les détails, la théorie de Kramers tient compte des phénomènes de friction et de la forme du potentiel d'interaction, en particulier de la courbure locale du potentiel au niveau du minimum d'énergie ainsi qu'au niveau du maximum.

1-3- Cinétique de réactions ligand-récepteur en solution

Dans un premier temps, nous donnerons les ordres de grandeur des constantes cinétiques mesurées pour des réactions ligand-récepteur en solution. Dans un second temps, nous nous intéresserons aux concepts introduits pour modéliser l'étape de diffusion de telles réactions, sachant que cette démarche est généralement pertinente pour décrire les cinétiques d'association.

1-3-1- Détermination expérimentale de constantes d'association et de dissociation pour des réactions ligand-récepteur en solution

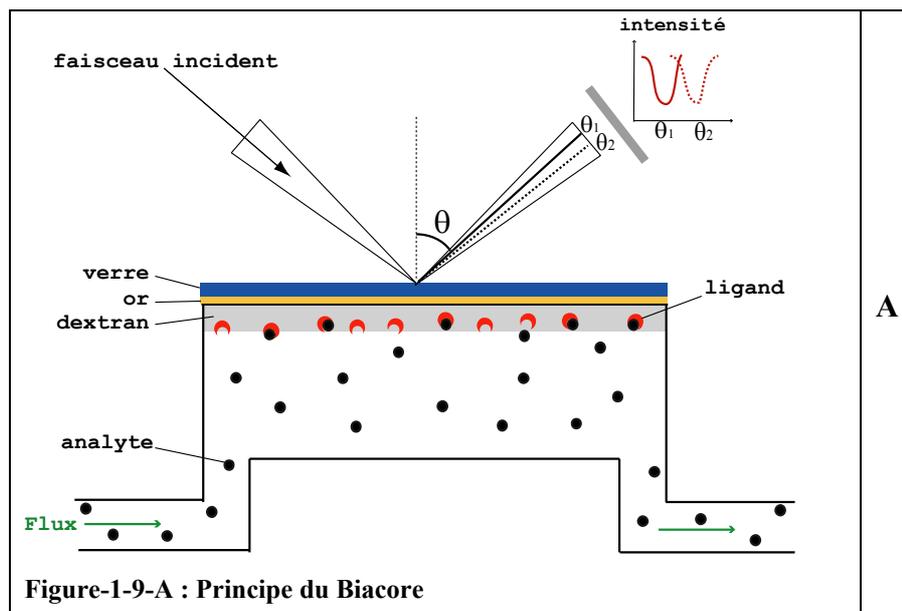
La plupart des réactions ligand-récepteur présentent une constante cinétique d'association de l'ordre de $10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, que ce soit pour des couples anticorps-antigène ou des réactions de dimérisation, par exemple de l'hémoglobine (Northrup & Erickson, 1992; Voss, 1993). Remarquons que cette valeur est bien plus faible que la constante de Smoluchowski, de $10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$, qui caractérise l'association entre sphères isotropiquement réactives et de même taille. En ce qui concerne les constantes cinétiques de dissociation des couples ligand-récepteur, elles sont beaucoup plus variables, avec des valeurs comprises entre 10^{-5} et 6000 s^{-1} (Bongrand, 1999). Ainsi, la diversité des affinités est attribuée en grande partie à la diversité des constantes cinétiques de dissociation.

Pour évoquer les ordres de grandeur des constantes cinétiques et thermodynamiques des interactions ligand-récepteur, il est nécessaire de s'arrêter un temps sur la technique de résonance plasmonique de surface (SPR), ou technologie « Biacore ». Car, depuis près de 15 ans, cette technologie s'est imposée, dans les laboratoires, comme la technique standard pour l'étude des interactions entre macromolécules biologiques (Fivash et al., 1998). Le Biacore a permis d'étudier une grande quantité de couples ligand-récepteur mais a aussi trouvé d'autres applications comme dans l'analyse ou la séparation des analytes.

Un Biacore est un appareil constitué, à la fois, d'un circuit microfluidique, avec système d'injection, canaux et cellules de mesure, et d'une détection optique sur les cellules de mesure. La technique consiste à suivre les interactions entre des ligands fixés sur une surface

et des analytes circulant. C'est par une détection optique qu'est réalisé ce suivi d'interactions. Il s'agit plus précisément de mesurer l'indice de réfraction au voisinage de la surface de chaque cellule microfluidique. Cette surface est appelée « sensorchip » (ou puce) et est constituée d'un support de verre recouvert d'une fine couche d'or et d'un gel réticulé de dextran carboxyméthylé. Les ligands sont attachés de façon covalente au gel de dextran. La couche d'or est nécessaire pour la mesure de résonance plasmonique de surface. En ce qui concerne la détection optique, un faisceau lumineux monochromatique et polarisé est envoyé sur la surface de la puce. Pour une certaine incidence, il n'y a pas de rayon réfracté et seule une composante de l'onde électromagnétique, l'onde évanescente, se propage dans le milieu sur une distance de l'ordre de sa longueur d'onde. Sur cette distance, qui correspond à la couche d'or, les électrons « métalliques » libres rentrent en résonance avec les photons de l'onde évanescente. Ce phénomène a alors une influence sur le faisceau réfléchi. En effet, son intensité chute à un angle bien défini appelé angle de résonance. Cet angle de résonance varie avec l'indice de réfraction du milieu (figure-1-9-A).

L'association des analytes aux ligands de la surface change l'indice de réfraction du milieu, et ceci se répercute sur l'angle de résonance. Ainsi, le suivi, en temps réel, de l'angle de résonance donne directement la quantité d'analytes qui se sont liés. La variation de l'angle de résonance, exprimée en unité de résonance, RU, en fonction du temps constitue le sensorgramme (figure-1-9-B) (une variation de 1000 RU correspond à une déviation de l'angle de résonance de $0,1^\circ$, ainsi qu'à une fixation de 1 ng de protéine par mm^2 de surface).



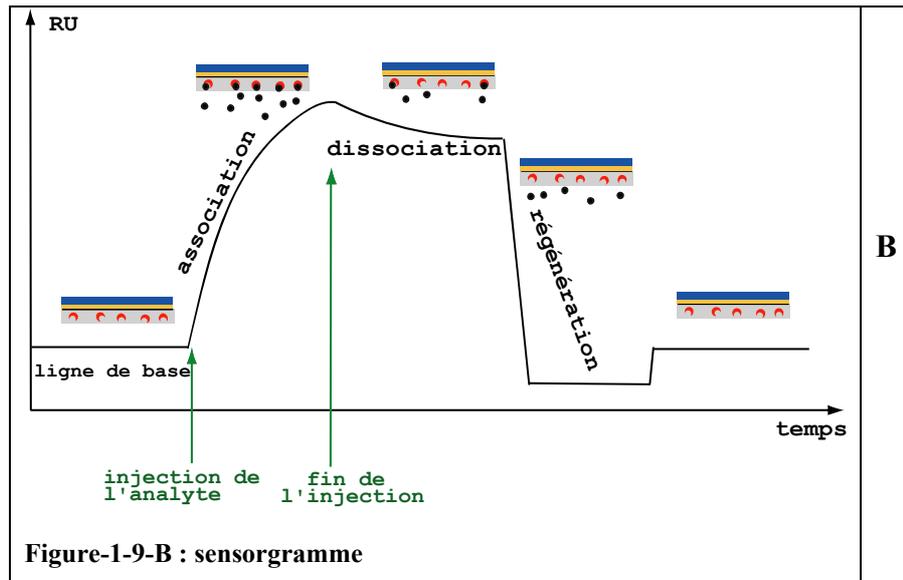


Figure-1-9 : Le Biacore : A- principe. B- allure d'un sensorgramme

Un exemple de sensorgramme réalisé sur un Biacore (modèle « X ») est donné en figure-1-10. L'exploitation d'un sensorgramme donne les constantes cinétiques et thermodynamiques d'un couple ligand-analyte. L'avantage de cette technique est l'observation en temps réel de la réaction, et sans marquage, donc sans altération des molécules.

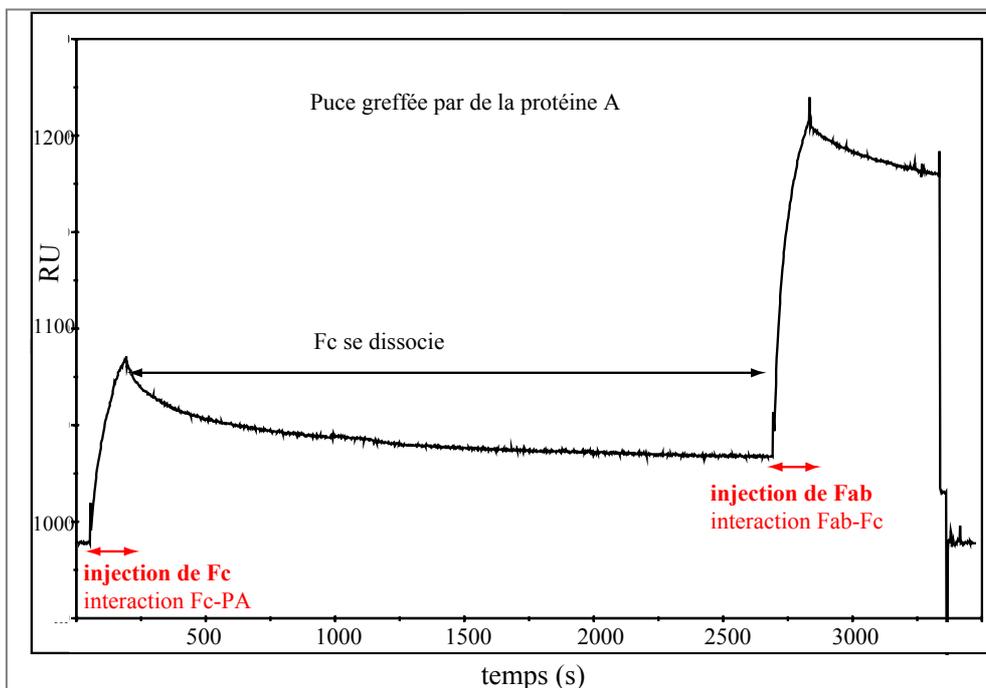


Figure-1-10 : Exemple d'un sensorgramme réalisé sur un Biacore X, chez stago R&D en collaboration avec C. Goubault. La puce, CM5, recouverte de dextran a été greffée avec de la protéine A (PA) à $\mu\text{g/mL}$ à un pH de 4.5. Une injection de fragment Fc à 0.002 g.L^{-1} est observée suivie d'une injection de fragment Fab dirigé contre les fragments Fc d'origine humaine (Jackson Immunology).

CHAPITRE I

Etant donnée la géométrie du Biacore, où le ligand est relié à une surface via une molécule de dextran, on est en droit de se demander si les constantes thermodynamiques et cinétiques sont affectées par cette configuration. D'une part, le simple fait que l'un des acteurs de la réaction soit lié peut gêner l'association, et d'autre part la réaction n'ayant lieu que dans une couche proche de la surface, les concentrations en analytes sont hétérogènes et les phénomènes de transport peuvent biaiser les interprétations des sensorgrammes. Day *et al.* se sont concentrés sur cette problématique et ont comparé les résultats obtenus avec le Biacore avec ceux obtenus par calorimétrie, pour les constantes thermodynamiques, et par « stopped flow fluorescence », pour les constantes cinétiques (Day et al., 2002). Ces auteurs ont montré que, dans des conditions appropriées d'utilisation du Biacore, les constantes thermodynamiques et cinétiques correspondent à celles mesurées directement en solution. Les conditions appropriées sont l'utilisation de molécules de dextran pour éloigner les ligands de la surface et l'utilisation de flux hydrodynamiques suffisamment importants pour homogénéiser les concentrations en analytes au niveau de la surface pendant la phase d'association et pour évacuer les analytes rapidement pendant la phase de dissociation.

L'ordre de grandeur des constantes cinétiques d'association pour les couples antigène-anticorps a été confirmé par la technique de résonance plasmonique par Drake *et al.*, avec des valeurs comprises entre $5 \cdot 10^5$ et $3 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ (Drake et al., 2004).

Les ordres de grandeur des constantes cinétiques d'association sont donc très proches pour des molécules très différentes. Ceci appuie l'idée que la diffusion est le processus limitant dans une majorité des cas. Cependant, il est tout de même important de noter qu'au regard des nombreuses études en Biacore, les constantes d'association recouvrent une gamme plus large (Dmitriev et al., 2003). Il ne faut donc pas exclure l'existence d'interactions ligand-récepteur plus complexes, où l'étape de réaction proprement dite est limitante, avec l'existence de barrières énergétiques plus ou moins importantes.

1-3-2- Modélisation de l'étape de diffusion pour des réactions ligand-récepteur

Une grande partie des couples ligand-récepteur affichent des constantes cinétiques d'association autour de $10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, et ce pour des molécules très différentes. Il est donc légitime de penser que ces interactions sont souvent limitées par l'étape de diffusion, et de chercher à modéliser ce phénomène. Nous nous concentrons donc ici sur le cas où l'étape de

diffusion impose la vitesse globale d'association, c'est-à-dire qu'une fois formées, les paires préreactives réagissent « instantanément ».

Dans le cas d'interactions ligand-récepteur, où les macromolécules interagissent via des surfaces réduites et ajustées, appelées ici « patch réactifs ». Les paires préreactives sont les paires de molécules correctement orientées et prédisposées à réagir (figure-1-11). Un critère de distance n'est plus suffisant pour décrire la formation des paires préreactives.

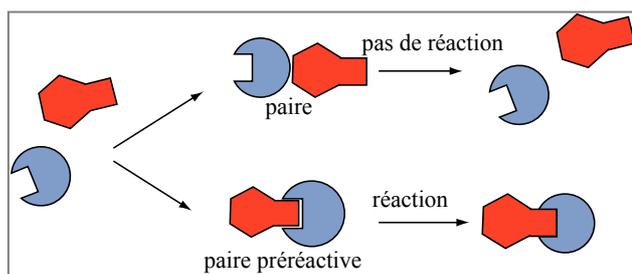


Figure-1-11 : Notion de Spécificité stérique.

Cette particularité ajoute donc une complexité dans la modélisation de la diffusion. Il ne s'agit plus de traiter, comme dans l'approche de Smoluchowski, l'association de sphères isotropiquement réactives, mais de prendre en compte l'orientation relative des macromolécules. On parle ici de *spécificité stérique*. Nous exposons donc ici les principales idées qui ont été avancées pour modéliser cette étape de diffusion et pour expliquer les ordres de grandeur mesurés.

1-3-2-a- Influence de la taille des molécules

Berg *et al.* se sont penchés sur le cas particulier d'une réaction entre des ligands, libres en solution, et des cellules portant des récepteurs à leur surface (Berg & Purcell, 1977). Dans cette problématique, les auteurs ont traité, dans un premier temps, l'association entre objets de taille différente, puis, dans un second temps, l'association entre objets qui ne sont pas isotropiquement réactifs. Quand les réactifs ont des tailles différentes, l'objet le plus petit (appelé A), de rayon R , diffuse plus vite et impose son coefficient de diffusion D_A . Le réactif le plus gros, de rayon a , fixe la taille de la cible à atteindre par le réactif le plus petit. La constante d'association d_+^\ddagger s'écrit alors :

$$d_+^\ddagger = 4\pi a D_A = \frac{2kT}{3\eta} \frac{a}{R} \quad (1-37)$$

Dans ce cas, la constante cinétique d'association est plus grande que celle de Smoluchowski.

1-3-2-b – Influence de la taille et du nombre de patches réactifs

En ce qui concerne le cas de sphères non isotropes, les mêmes auteurs analysent la situation suivante. Un ligand de taille R (espèce A) est toujours envisagé, mais cette fois, la seconde entité réactive (espèce B), sphère de rayon a , présente un certain nombre n de sites (ou patch réactifs) de taille s , petite devant a . Dans le cas limite où il n'existe qu'un seul site ($n = 1$), l'expression précédente (1-37) est appliquée, mais avec une cible de taille s . Ainsi, la constante d'association s'écrit :

$$d_+^{\#}(s) = 4\pi s D \quad (1-38)$$

Dans le second cas limite où le nombre de sites est très grand, on retrouve l'expression (1-37). Entre ces deux cas, la progression n'est pas linéaire et les auteurs proposent l'évolution suivante :

$$d_+^{patch} = 4\pi D \frac{nas}{(ns + \pi a)} \quad (1-39)$$

On rappelle ici que $D = D_A + D_B$.

1-3-2-c- Orientation des patches réactifs

Pour prendre en compte l'aspect géométrique de la formation des paires préreactives, Janin *et al.* propose de rajouter un paramètre d'orientation dans l'écriture de la constante d'association (Janin, 1997). Dans la description de Smoluchowski, la formation de paire est le résultat de diffusion translationnelle, mais l'orientation relative des molécules n'est pas prise en compte. A cette constante k_{smolu} il faut donc multiplier la probabilité p_r d'obtenir une paire correctement orientée et la constante d'association s'écrit :

$$d_+ = k_{smolu} p_r \quad (1-40)$$

Cette probabilité p_r tient compte de la taille du patch réactif, comme Berg l'a introduit, mais aussi de l'orientation relative des patches ; ceci est illustré en figure-1-12. On peut exprimer p_r en considérant un vecteur r , distance centre à centre des objets, et en écrivant la probabilité de trouver l'orientation à $\delta\alpha$ et $\delta\beta$ près, avec un angle de torsion $\delta\chi$. Cela conduit à l'expression suivante pour p_r :

$$p_r = \frac{1}{2}(1 - \cos \delta\alpha)(1 - \cos \delta\beta) \frac{\delta\chi}{\pi} \approx \frac{1}{16\pi} \delta\alpha^2 \delta\beta^2 \delta\chi \quad (1-41)$$

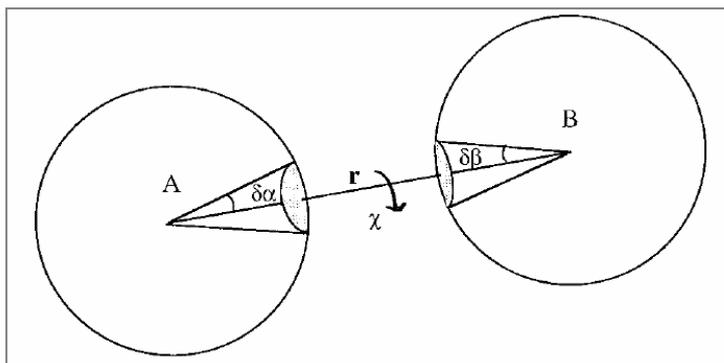


Figure-1-12 : Rôle de l'orientation relative des réactifs dans le processus d'association (Janin, 1997).

Pour des paramètres angulaires fixés à 14° , p_r est évaluée à 10^{-5} . Cette contrainte géométrique diminue donc considérablement les constantes d'association.

1-3-2-d- Influence des interactions à longue portée

Les facteurs géométriques ne peuvent pas toujours expliquer les ordres de grandeur des constantes d'association, surtout pour les plus élevées. En effet, dans le cas de l'interaction Barnase-Barstar, qui a été largement étudiée (Schreiber & Fersht, 1993), la constante d'association peut atteindre $10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$. De plus, cette constante varie avec la force ionique et le pH du milieu : elle est élevée pour les forces ioniques les plus basses. Cet exemple laisse penser que les interactions électrostatiques peuvent jouer un rôle non négligeable dans le processus d'association (Schreiber & Fersht, 1996). Dans ce contexte, certains suggèrent que les interactions à longue portée interviennent dans la constante d'association, et ce à deux niveaux (Janin, 1997). Ces interactions ont à la fois une contribution translationnelle (q_t) et rotationnelle (q_r), q_t et q_r étant des facteurs multiplicatifs sans dimension. Ainsi, la constante cinétique d'association s'écrit :

$$d_+ = k_{smolu} q_t p_r q_r \quad (1-42)$$

En ce qui concerne la contribution translationnelle, des interactions à longue portée peuvent accélérer la formation de la paire dans le cas d'interactions attractives, ou la ralentir dans le cas d'interactions répulsives. La figure-1-13 schématise les profils d'interaction pour les différents cas. Pour des interactions électrostatiques, on peut considérer simplement que les molécules portent une charge globale et diffusent dans un milieu homogène de constante diélectrique connue. On peut modéliser q_t comme étant reliée au rapport de l'énergie d'interaction coulombienne, à la distance de plus grande approche, U_{elect} , sur kT :

$$q_t = \exp\left(\frac{-U_{elect}}{kT}\right) \quad (1-43)$$

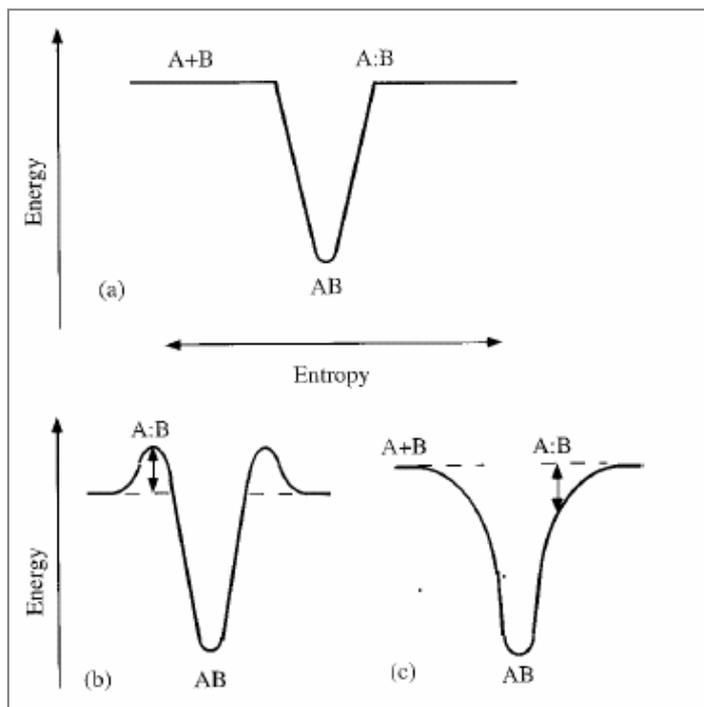


Figure-1-13 : Profil d'énergie pour la formation du complexe (noté AB) où la formation de la paire préreactive (A:B) peut être (a) sans interaction de longue portée, (b) avec des interactions de longue portée répulsives et (c) avec des interactions de longue portée attractives (Janin, 1997).

Pour la contribution orientationnelle, ce sont les interactions à longue portée de type dipôle-dipôle qui vont favoriser certaines orientations plutôt que d'autres, par leur caractère anisotrope. On peut imaginer de telles situations si les charges sont, par exemple, réparties de façon asymétrique sur les molécules. Pour revenir sur l'exemple du couple Barnase-Barstar, pour une force ionique de $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, la constante d'association vaut $10^9 \text{ mol}^{-1}.\text{L.s}^{-1}$, et le produit $q_r.q_t$ est estimé à 10^5 et s'explique par des interactions électrostatiques.

1-3-2-e- Simulations de dynamique brownienne

Les différents aspects géométriques ne peuvent pas toujours expliquer l'ordre de grandeur des constantes cinétiques d'association. Si la formation d'un complexe ligand-récepteur requiert un alignement ou un ajustement des molécules avec une tolérance de 1 à 2 Å, la probabilité qu'un contact ait lieu dans la bonne orientation est très faible, comme nous l'avons vu avec la relation (1-41). En multipliant directement cette probabilité avec la constante d'association de Smoluchowski, on obtient des valeurs autour de $10^2-10^4 \text{ mol}^{-1}.\text{L.s}^{-1}$, ce qui est bien en deçà des valeurs mesurées. Comme nous venons de l'aborder, pour expliquer cet écart, l'accélération observée peut être attribuée aux interactions à longue portée. Tout se passe comme si elles augmentaient la tolérance sur l'ajustement des orientations, avec l'idée de *rencontres prolongées* entre réactifs.

Northrup *et al.* avancent, quant à eux, une autre interprétation basée sur des simulations numériques de dynamique brownienne (Northrup & Erickson, 1992). Ils tendent à démontrer

CHAPITRE I

que c'est la nature même du phénomène de diffusion, en phase condensée, qui est responsable des ordres de grandeur mesurés.

La simulation de dynamique brownienne est couramment employée comme alternative aux résolutions analytiques d'équations de diffusion. Ici, elle consiste en la simulation des trajectoires de deux protéines dans un milieu aqueux. Les mouvements des protéines sont décomposés en déplacements élémentaires stochastiques. Pour rendre compte des contraintes de spécificité stérique, les protéines sont modélisées comme des sphères dures de 18 Å de rayon et interagissant suivant 1 à 4 points de contact regroupés sur une face, avec une tolérance de 2 Å. Si aucune interaction à longue portée n'est ajoutée, les constantes cinétiques d'association déduites des simulations sont de $3.8 \cdot 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ pour un unique point de contact, de $4 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ pour deux points de contact et de $10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ pour trois. Ils retrouvent ici des valeurs cohérentes avec les données expérimentales.

Pour expliquer comment la diffusion, sous contrainte de spécificité stérique, aboutit à de telles vitesses, ils proposent la description suivante. Ils définissent deux concepts distincts : *collision* et *rencontre*. Une *collision* est un événement bref, estimé à 0.38 ns, qui commence quand deux sphères sont proches de 2 Å et se termine quand elles sont séparées de 4 Å. D'après le caractère stochastique du déplacement, juste après une collision il existe une très grande probabilité de refaire une collision. Ceci n'a lieu que par la nature même du mouvement brownien en phase condensée, et n'aurait pas lieu en phase gazeuse. Bien entendu, les sphères finissent, tôt ou tard, par se séparer, et se retrouver si éloignées que la probabilité de refaire une collision est très faible. Ceci permet de définir la *rencontre* comme la suite d'événements entre la collision initiale et la séparation totale. Les simulations montrent qu'une rencontre contient plusieurs collisions, 9 en moyenne, et qu'elle dure 6.3 ns, ce qui est plus grand que le temps de corrélation rotationnelle de 5.3 ns (temps nécessaire pour que deux configurations rotationnelles ne soient plus corrélées). Ainsi, au cours d'une rencontre, les molécules rentrent en collision un certain nombre de fois et entre chaque collision elles changent légèrement d'orientation. *De ce fait, les molécules essaient différentes orientations au cours d'une seule rencontre, c'est la raison pour laquelle le processus d'association est « accéléré »*. Les auteurs reprennent donc l'idée de rencontre prolongée, mais c'est la nature même du processus de diffusion qui est à la source de cette prolongation. Ceci expliquerait donc comment des réactions ligand-récepteur peuvent être aussi rapides, même en l'absence d'interaction à longue portée.

CHAPITRE I

En solution, l'association entre ligands et récepteurs n'est pas évidente à décrire mais, comme nous venons de le voir au cours de ce paragraphe, les grandes lignes d'explication sont désormais posées et approuvées. En revanche, l'association entre ligands et récepteurs liés à des surfaces demande une description encore plus avancée, et de nombreuses questions fondamentales subsistent.

1-4- Cinétique de réactions entre ligands et récepteurs situés sur des surfaces en regard

L'étude des constantes cinétiques des couples ligand-récepteur situés sur des surfaces en regard n'est considérée que depuis peu comme une façon de caractériser ces couples pour appréhender leur fonctionnalité. Cette approche est particulièrement pertinente dans le cadre de l'étude biologique de l'adhésion cellulaire : adhésion cellule-cellule ou cellule-substrat. Mais cette caractérisation prend aussi un sens à part entière dans le domaine des biotechnologies, et, par exemple, dans le cas du tri cellulaire.

1-4-1- Enjeux et formalisme des réactions dites « 2D »

Si on se concentre sur des phénomènes qui sont réalisés entre surfaces, on est amené à définir une phénoménologie à deux dimensions. Bell, en 1978, rentre dans de telles considérations en traitant le cas général de la reconnaissance entre cellules (Bell, 1978). Plus tard, cette vision sera souvent reprise, notamment par Dustin *et al.*, qui arrivent à des conclusions similaires, en abordant le cas particulier des synapses (Dustin *et al.*, 2001). Dans de telles situations, des interactions interviennent entre molécules confinées entre deux membranes, dans des espaces aux dimensions nanométriques. On s'intéresse, dans ce cadre, à des réactions dites « 2D » entre ligands et récepteurs situés sur deux surfaces en regard et qui ne peuvent diffuser que sur ces surfaces. Les réactifs ont perdu certains degrés de liberté de diffusion par rapport au cas où ils diffusaient librement en solution. La distinction avec les réactions en solution s'est avérée nécessaire car de nombreux paramètres se voient physiquement changés. C'est le cas du coefficient de diffusion ou des concentrations en ligands et récepteurs, ces dernières étant, dès lors, exprimées dans des dimensions différentes.

CHAPITRE I

Bell a introduit le concept de réaction « 2D » avec une description calquée sur le formalisme de la cinétique chimique en solution, introduit au paragraphe 1-2-1 (Bell, 1978). La vitesse globale de formation s'écrit :

$$v = k_+^{2D} [A]_{surf} [B]_{surf} - k_-^{2D} [C]_{surf} \quad (1-44)$$

La réaction est, ici aussi, séparée en deux étapes : formation de la paire préréactive par diffusion et transformation de la paire en complexe. Les constantes cinétiques globales k_+^{2D} et k_-^{2D} et l'affinité K_A^{2D} s'expriment donc en fonction des constantes d_+^{2D} , d_-^{2D} , r_+^{2D} et r_-^{2D} de chacune des étapes selon :

$$k_+^{2D} = \frac{r_+^{2D} d_+^{2D}}{r_+^{2D} + d_-^{2D}} \quad (1-45)$$

$$k_-^{2D} = \frac{r_-^{2D} d_-^{2D}}{r_+^{2D} + d_-^{2D}} \quad (1-46)$$

$$K_A^{2D} = \frac{r_+^{2D} d_+^{2D}}{r_-^{2D} d_-^{2D}} \quad (1-47)$$

Il faut mentionner ici le fait que les constantes d'association k_+^{2D} et d_+^{2D} sont exprimées maintenant en $m^2 \cdot s^{-1}$.

En ce qui concerne l'étape de diffusion, Bell écrit :

$$d_+^{2D} = 2\pi [D^{2D}(A) + D^{2D}(B)] \quad (1-48)$$

$$d_-^{2D} = \frac{2}{R^2} [D^{2D}(A) + D^{2D}(B)] \quad (1-49)$$

avec D^{2D} le coefficient de diffusion translationnelle des réactifs (dans une membrane cellulaire, il est estimé à $10^{-14} m^2 \cdot s^{-1}$) et R la somme des rayons. Bell considère que la seconde étape, dite de « réaction », n'est pas modifiée par le changement de géométrie, et que seuls les coefficients de diffusion sont transformés. Il en découle une relation simple entre les constantes d'équilibre « 2D » et « 3D » qui est :

$$K_A^{3D} = \frac{4}{3} K_A^{2D} \cdot R \quad (1-50)$$

Dans cette approche, il suffit simplement de connaître les constantes de réaction en solution et les coefficients de diffusion translationnelle dans la géométrie « 2D » pour prévoir la vitesse d'association entre ligands et récepteurs.

CHAPITRE I

Cependant, ici, certains aspects ne sont pas pris en compte, et nous verrons par la suite leur importance. Par exemple, l'orientation des molécules sur la surface importe beaucoup et peut affecter l'association. Le traitement de la diffusion par le seul coefficient de diffusion translationnelle est sans doute insuffisant dans cette approche. Comme nous l'avons mentionné au paragraphe précédent, la description de la diffusion peut être beaucoup plus complexe. Dans ce cadre, Dustin *et al.* supposent que c'est essentiellement la constante d'association qui est affectée par la géométrie et la « dimensionnalité » de la réaction, contrairement à la constante de dissociation qui dépendrait surtout de la stabilité de la liaison, et serait la même en solution et en « 2D » (Dustin *et al.*, 2001).

Une des principales difficultés rencontrées dans l'étude expérimentale des réactions « 2D » est l'observation et la détermination du nombre de liens ligand-récepteur formés en fonction du temps, ce qui est loin de se limiter à repérer l'adhésion entre deux surfaces. En effet, on peut détecter facilement, et sans ambiguïté, l'adhésion entre deux surfaces en observant par exemple leur déformation, leur immobilisation ou leur résistance face à une contrainte mécanique. Mais établir la relation entre adhésion et le nombre de liens ligand-récepteur n'est pas aisé. Pour résoudre ce problème, le recours à de faibles concentrations en ligands et/ou récepteurs est souvent employé pour avoir l'équivalence entre adhésion et formation d'un lien unique. Notons aussi que la définition de l'adhésion, ou du moins de son observation, dépend fortement de l'outil expérimental utilisé. Cette dépendance repose sur la résolution et la sensibilité de la technique. La résolution temporelle va déterminer la limite des temps de vie observables : seules les adhésions qui durent suffisamment longtemps sont détectées. Par conséquent, les méthodes qui ont une faible résolution temporelle ne recensent pas les adhésions les plus courtes, qui correspondent, par exemple, à des états transitoires. De plus, seules les adhésions suffisamment fortes, susceptibles de maintenir les surfaces au contact, sont détectées.

Une difficulté expérimentale supplémentaire qui concerne l'étude des constantes cinétiques d'association pour les réactions « 2D » réside dans le contrôle du contact entre surfaces. En effet, le contact doit être maîtrisé et sa description précise. La taille de l'aire de contact, aire où les réactifs ont la possibilité de réagir, doit être contrôlée, mais aussi le temps de contact, la distance entre les surfaces, les densités surfaciques en récepteurs et en ligands, et les contraintes susceptibles de s'exercer sur les molécules. Enfin, toujours pour l'étude des constantes cinétiques d'association, les modes et les coefficients de diffusion des réactifs doivent aussi être connus ou du moins modélisés. Ainsi, nous verrons qu'il existe beaucoup

CHAPITRE I

plus de méthodes dédiées à l'étude de constantes cinétiques de dissociation qu'à l'étude de constantes cinétiques d'association.

Enfin, notons que la majorité des réactions « 2D » se rapporte aux interactions entre cellules, où les surfaces caractéristiques sont de l'ordre du μm^2 , ce qui fait souvent intervenir un faible nombre de molécules. Les déviations par rapport à la description phénoménologique classique de la cinétique, dite déterministe, sont à prendre en compte quand il n'intervient que peu d'événements. Ainsi, les réactions « 2D » sont parfois mieux décrites par une approche probabiliste. Dans cette approche, on définit à chaque instant la probabilité d'avoir un certain nombre de liens. McQuarries *et al.*, puis Cozens-Roberts *et al.*, ont établi les équations maîtresses pour une réaction réversible (McQuarrie, 1962; McQuarrie, 1964; Cozens-Roberts *et al.*, 1990). Ces auteurs ont montré que la résolution de ces équations permet de déterminer un nombre de liens moyen à l'équilibre, qui est identique à celui trouvé par une approche classique déterministe. En revanche, dans le cadre probabiliste, une fluctuation du nombre de liens est définie. C'est dans cette notion de fluctuation que réside la principale différence avec l'approche déterministe qui décrit les réactions classiques, où un grand nombre de molécules intervient.

1-4-2- Méthodes pour mesurer des constantes de dissociation

On compte beaucoup de techniques dédiées à l'étude des constantes cinétiques de dissociation entre molécules attachées à des surfaces. Ces techniques mesurent en fait, directement ou indirectement, le temps de vie d'un lien récepteur-ligand soumis à une contrainte mécanique. Ces mesures rendent compte aussi de la fragilité d'un lien ligand-récepteur. Le comportement d'un lien face à une force est une caractéristique qui peut éclairer la relation entre un couple ligand-récepteur et sa fonction. Des complexes peuvent, par exemple, avoir des constantes de dissociation équivalentes au repos, mais afficher des comportements différents lorsqu'ils sont soumis à une force.

Il est « plus facile » techniquement de mesurer des constantes de dissociation que d'association, car le contrôle de la formation des liens importe peu. C'est la détection du temps d'adhésion et la connaissance des forces qui sont les paramètres importants. Dans ce paragraphe, quatre dispositifs expérimentaux mesurant des constantes de dissociation ligand-récepteur sont présentés : une méthode basée sur la technique des micropipettes (BFP), la

CHAPITRE I

microscopie à force atomique (AFM), les pinces optiques et la chambre à flux. Ces méthodes sont parmi les plus utilisées mais ne sont pas les seules qui existent (pinces magnétiques...). Dans la plupart des cas, la mesure des forces appliquées est déduite du déplacement d'une surface, assimilable à un ressort. Pour remonter aux constantes de dissociation, ces techniques reposent sur des théories de rupture de liens soumis à une contrainte mécanique, qui sont introduites brièvement ici avant de détailler les méthodes expérimentales.

Mesure directe du temps de vie

La mesure de constantes de dissociation peut reposer sur la détermination directe du temps de vie du lien ligand-récepteur soumis à une force *constante*. Bell suggère que l'application d'une force f modifie le potentiel d'interaction, entre ligand et récepteur, en ajoutant une contribution énergétique $-fx_\beta$ (Bell, 1978), où x_β est une coordonnée spatiale, nulle, par convention, pour l'état lié (figure-1-14). La barrière d'énergie nécessaire pour défaire le lien est ainsi abaissée : le lien se rompt plus facilement sous l'effet d'une force.

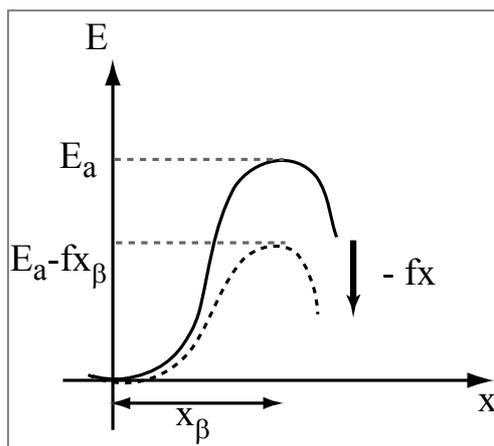


Figure-1-14 : Effet de l'application d'une force extérieurs sur le profil d'énergie de l'état lié. E_a est la hauteur de la barrière énergétique à franchir pour que le lien se défasse, en l'absence de force.

Aussi, le temps de vie suit une loi exponentielle décroissante en fonction de la force appliquée f . Autrement dit, la constante de dissociation k_-^f en présence d'une force f , qui est l'inverse du temps de vie, s'écrit :

$$k_-^f = k_-^0 \exp\left(\frac{f x_\beta}{kT}\right) = k_-^0 \exp\left(\frac{f}{f^0}\right) \quad (1-51)$$

où k_-^0 est la constante de dissociation intrinsèque, en l'absence de force extérieure, et x_β est le « paramètre de force », ou coordonnée du maximum d'énergie, et correspond à une « force critique » f^0 (si x_β est de l'ordre de 0.5 nm, f^0 vaut environ 20 pN).

D'un point de vue pratique, le temps de vie est mesuré pour différentes forces et le logarithme du temps de vie est tracé en fonction de la force. La pente donne le paramètre de force et

CHAPITRE I

l'ordonnée à l'origine le temps de vie à force nulle. Notons ici que Bell n'avait envisagé que le cas $x_\beta \geq 0$, qui correspond à des liaisons dites « glissantes » (« slip bonds »). Mais, depuis, des liaisons accrocheuses (« catch bonds », (Marshall et al., 2003)) avec $x_\beta \leq 0$ ont été observées expérimentalement, ce que l'on peut interpréter dans le cadre d'un profil énergétique à plusieurs dimensions d'espace.

Mesure de force de rupture (mesure indirecte du temps de vie)

Une autre démarche consiste à appliquer une rampe de force et à déterminer la force pour laquelle le lien se rompt. Nous allons voir que déterminer des forces de rupture renseigne sur le temps de vie du lien.

Du fait des fluctuations thermiques, un lien ne se casse pas toujours pour la même force. La robustesse d'un lien est mieux caractérisée par une distribution de forces de rupture. La force de rupture la plus probable f^* dépend de la vitesse à laquelle est appliquée la rampe de force et renseigne sur le caractère labile du lien. Pour remonter aux constantes de dissociation à partir de f^* , Evans *et al.* proposent une approche conciliant ce caractère stochastique de rupture et la loi de Bell (I-51) (Evans et al., 1991). La densité de probabilité $p(t, f)$ (par unité de temps) d'avoir une rupture au temps t , en présence d'une force $f(t)$, est donnée par :

$$p(t, f) = k_-^f \exp \left\{ - \int_0^t k_-(f(t')) dt' \right\} \quad (I-52)$$

où k_-^f est la constante de dissociation en présence d'une force f . La force de rupture la plus probable f^* correspond au maximum de probabilité de rupture, c'est-à-dire quand :

$$\left. \frac{\partial p}{\partial f} \right|_{f^*} = 0 \quad (I-53)$$

Pour une rampe de force avec un taux de charge r_f ($f = r_f t$), (I-53) s'écrit simplement :

$$k_-(f^*) = r_f \left. \frac{\partial \ln k_-(f)}{\partial f} \right|_{f^*} \quad (I-54)$$

Cette relation aboutit à une expression reliant la force de rupture f^* , mesurée, au taux de charge r_f , imposé, et qui fait intervenir les caractéristiques du lien, à savoir la constante de dissociation à force nulle k_-^0 et le paramètre de force x_β :

$$f^* = \frac{kT}{x_\beta} \ln \left(\frac{x_\beta}{k_-^0 kT} \right) + \frac{kT}{x_\beta} \ln(r_f) \quad (I-55)$$

CHAPITRE I

Un régime linéaire pour f^* en fonction de $\ln(r_f)$ correspond à une barrière d'énergie que doit franchir le lien pour se rompre. Cette barrière est caractérisée par x_β (position) et k_-^0 (hauteur). L'observation de plusieurs régimes linéaires sera attribuée à l'existence de plusieurs barrières d'énergie (figure-1-15-B).

1-4-2-a- Biomembrane Force Probe (BFP)

Cet outil pour l'étude des constantes de dissociation a été mis au point par Evans *et al.*. Il consiste à approcher deux micropipettes montées sur des micromanipulateurs qui présentent des vésicules (ou des cellules) recouvertes de ligands et de récepteurs (figure-1-15) (Evans *et al.*, 1991). Les vésicules sont amenées au contact pour permettre la formation des liens. Une des vésicules joue le rôle de ressort, dont la constante de raideur dépend de l'aspiration de la vésicule par la micropipette. Son déplacement donnera l'amplitude des forces appliquées. Après contact, lors du retrait de la pipette, une force est transmise sur les liens jusqu'à rupture. Le retrait peut se faire à vitesse constante ou suivant une rampe de vitesse, appliquant ainsi une force constante ou une rampe de force. Un avantage de cette méthode repose sur l'amplitude des forces accessibles, de 0.01 pN à 1000 pN, grâce au contrôle de la tension de la vésicule. Généralement une microbille est reliée à la vésicule, pour éviter d'arracher les récepteurs de la vésicule. La technique donne accès à une large gamme de taux de charge, de 0.05 à 60 000 pN.s⁻¹. Sa limite inférieure est intéressante pour étudier des liens relativement faibles.

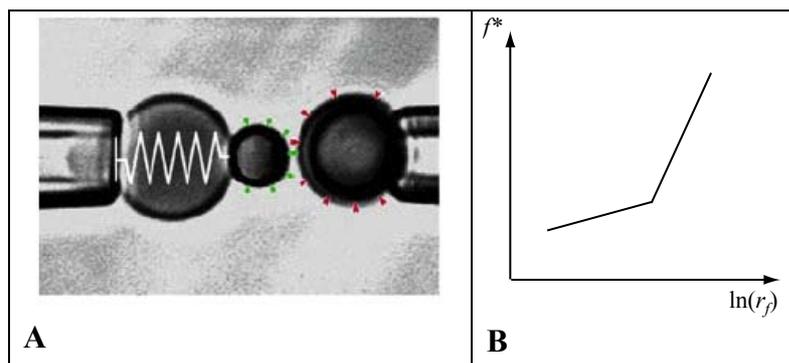


Figure-1-15 : A- Principe de la BFP pour déterminer des temps de vie et des forces de rupture de liens (Evans *et al.*, 2004). B- Allure des courbes obtenues pour la force de rupture la plus probable f^* en fonction du taux de charge r_f (cas de deux barrières d'énergie).

Merkel *et al.* ont été les premiers à utiliser l'approche d'Evans, qui exploite la force de rupture en fonction du taux de charge, pour l'étude du couple streptavidine-biotine (§ 1-5) (Merkel *et al.*, 1999). Des couples de type antigène-anticorps ont également été caractérisés (Schwesinger *et al.*, 2000). C'est le cas du couple protéine A- IgG (Simson *et al.*, 1999). Simson *et al.* ont été capables de mesurer la dissociation spontanée de tels liens. En regardant les fluctuations de la particule liée à la vésicule, ils détectent quand le lien se forme et

mesurent son temps de vie sans force extérieure. Ainsi, une constante de dissociation sans force est directement mesurée (0.1 s^{-1}). Pour le même couple, ils appliquent une rampe de force et retrouvent une constante de dissociation de 0.12 s^{-1} et une force critique f^0 de 5.6 pN. Ils vérifient, ainsi, avec une même méthode et sur un même couple, la loi de Bell et l'analyse d'Evans.

Nous verrons dans le prochain paragraphe (1-4-3) que cette méthode a aussi été adaptée pour mesurer directement des constantes d'association.

1-4-2-b- Microscopie à force atomique (AFM)

Une surface recouverte de ligands est amenée au contact d'une pointe nanométrique décorée de récepteurs. La pointe est montée sur un microlevier, sur lequel un faisceau laser est réfléchi (figure-1-16-A). La déflexion du levier est directement mesurée par la déviation du faisceau laser réfléchi et correspond à une force appliquée. Après contact avec la pointe, où un lien ligand-récepteur peut se former, la surface est éloignée avec une vitesse connue (constante ou suivant une rampe). Les forces ainsi appliquées vont de 1 à 1000 pN. La rupture du lien résulte en un saut du microlevier, dont l'amplitude permet une mesure directe de la force de rupture f^* . De plus, la position de la surface est maîtrisée et connue au nanomètre près et des profils force-distance sont donc réalisables (figure-1-16-B).

Pour l'AFM, les taux de charge vont de 100 à 10^5 pN.s^{-1} . La résolution spatiale est très fine (1.5 nm en latéral et 5 nm en perpendiculaire) et peut combiner aux mesures de force une imagerie des surfaces et donc une localisation des récepteurs. L'AFM permet également d'étudier des surfaces en conditions physiologiques (Kienberger et al., 2006).

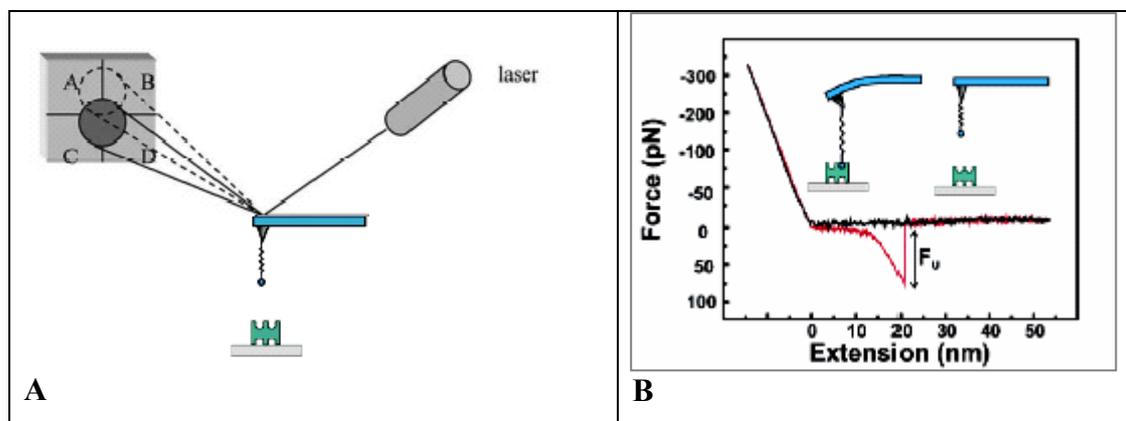


Figure-1-16 : A- Principe de l'AFM pour l'étude des interactions ligand-récepteur. B- Détermination de la force de rupture f^* (F_v). (Kienberger et al., 2006)

Florin *et al.* sont parmi les premiers à avoir utilisé l'AFM pour mesurer des forces de rupture de liens ligand-récepteur. Leur étude du couple streptavidine-biotine, soumis à des forces constantes, sera abordée en détail au paragraphe 1-5. En ce qui concerne les liens antigène-anticorps, Hinterdorfer *et al.* ont caractérisé le lien HSA (human serum albumine) -anti HSA (Hinterdorfer *et al.*, 1996). Ils ont mesuré une force de rupture de 244 pN, et ce pour deux longueurs de liens, attribuées à deux sites de liaison. Pour d'autres couples, des forces de rupture de 60 pN (Dammer *et al.*, 1996) et 49 pN (Allen *et al.*, 1997) ont été déterminées. Ceci illustre les ordres de grandeur des forces de rupture pour divers couples ligand-récepteur. La détermination d'une force de rupture ne suffisant pas pour déduire des données dynamiques, ces couples antigène-anticorps ont été étudiés pour différents taux de charge (Kienberger *et al.*, 2006). Les forces de rupture ainsi évaluées vont de 70 à 170 pN pour des taux de charge de 2000 à 50000 pN.s⁻¹, ce qui donne un paramètre de force, x_β , de 0.12 nm et une constante de dissociation de 6 s⁻¹. Ces auteurs montrent également que les forces de rupture de liens antigène-anticorps sont nettement plus faibles que les forces nécessaires pour déplier des protéines, ou que celles nécessaires pour extraire des protéines d'une membrane cellulaire.

1-4-2-c- Pinces optiques

Les pinces optiques ont été mises au point au milieu des années 1990, et ont été beaucoup utilisées pour étudier les propriétés mécaniques de polymères biologiques comme l'ADN. Elles ont aussi été utilisées pour déterminer des forces de rupture de liens ligand-récepteur, dans une gamme de 1 à 200 pN (Stout, 2001). La focalisation d'un faisceau laser permet de piéger une particule. Ce faisceau sert également à imager la particule et donc à suivre ses déplacements. Les premières mesures de forces de rupture ont été réalisées sur des moteurs moléculaires et des molécules d'actine (Nishizaka *et al.*, 1995).

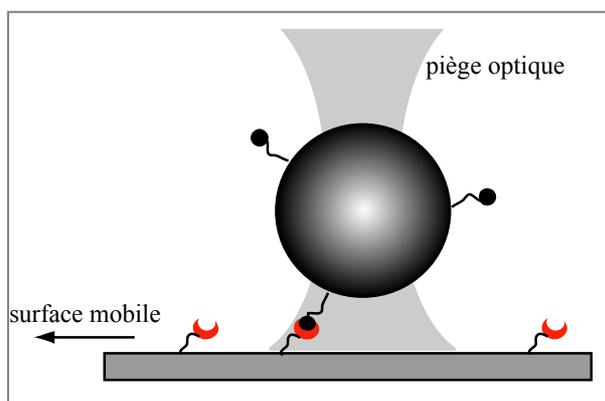


Figure-1-17 : Principe des pinces optiques pour l'étude des liens ligand-récepteur.

CHAPITRE I

Stout reporte une étude sur l'interaction entre la protéine A et différents types d'immunoglobulines (Stout, 2001). Dans cette étude, une particule de polystyrène est recouverte d'un faible nombre d'IgG. Une surface greffée de protéines A est placée à proximité de la particule, permettant la formation d'un lien spécifique. La surface est déplacée latéralement (figure-1-17). La formation d'un lien est repérée par le déplacement de la particule. Du déplacement de la particule, la force exercée sur le lien est déduite puisque la particule est assimilée à un ressort. Sa constante de raideur dépend de la puissance du laser et de la taille de la particule. Cette technique est assez fine pour différencier des IgG de diverses origines. Ainsi, les forces de rupture mesurées sont de 44 pN, 35 pN et 25 pN pour les différentes IgG, ce qui est en accord avec leurs affinités relatives. Dans d'autres études, les taux de charge ont été imposés par la vitesse de déplacement de la surface, et vont de 20 à 500 $\text{pN}\cdot\text{s}^{-1}$ (Rinko et al., 2004).

Une étude menée par Kulin *et al.* a été réalisée dans une géométrie légèrement différente où les forces appliquées sont encore plus faibles (Kulin et al., 2002). Une particule de polystyrène est recouverte de ligands et une seconde de récepteurs, puis elles sont chacune placées dans un piège optique, l'un étant fixe et l'autre mobile. Les particules sont amenées à proximité pour permettre la formation de liens. Le contact est repéré par l'observation des fluctuations de position de la particule fixe, dont l'amplitude diminue dès qu'il y a formation d'un lien. La force qui s'applique sur le lien est estimée à 1 pN. Dans cette configuration, le temps de vie du lien est donc étudié sous une force constante et faible. Ainsi, les auteurs parlent de dissociation spontanée. Ils mesurent une constante de dissociation de 1.58 s^{-1} .

1-4-2-d- Chambre à flux

La technique de la chambre à flux, où sont observées des cellules ou des particules dans un flux hydrodynamique, date du milieu des années 1980 (Tha et al., 1986). Une des principales utilisations de la chambre à flux consiste à suivre la trajectoire des particules décorées de ligands à proximité d'une surface recouverte de récepteurs, dans un flux laminaire contrôlé (figure-1-18-A) (Kaplanski et al., 1993). De telles trajectoires sont reconstruites par acquisition d'images, avec des résolutions temporelle et spatiale de l'ordre de 10 ms et de $0.23 \mu\text{m}$. En suivant ces trajectoires, les arrêts des particules sont comptabilisés. Pour des faibles taux de couverture en ligands, un arrêt est associé à la formation d'un unique lien ligand-récepteur entre une particule et la surface. Cette méthode a sans doute été la première à mettre en évidence le caractère statistique de la rupture de liens.

CHAPITRE I

La constante de dissociation du lien est déterminée en reportant le nombre de particules $N(t)$ qui restent liées après un temps t (figure-1-18-B). Pour des liens uniques, $N(t)$ suit une exponentielle décroissante et la constante de dissociation est facilement déduite puisque :

$$N(t) = N_0 \exp(-k_-^f t) \quad (I-56)$$

où N_0 est le nombre de liens recensés initialement. Ces expériences étant conduites pour un flux hydrodynamique donné, une force constante est exercée sur le lien, et est estimée à :

$$f = \eta a^2 \dot{\gamma} \quad (I-57)$$

où η est la viscosité du milieu (10^{-3} Pa.s pour l'eau), a le rayon de la particule et $\dot{\gamma}$ le taux de cisaillement. En faisant varier le taux de cisaillement, la force appliquée change. Pour des taux de cisaillement de 10 à 100 s^{-1} , les forces obtenues pour des particules de 10 μm vont de 1 à 10 pN. Ainsi, la constante de dissociation à force nulle et le paramètre de force sont extrapolés en exploitant la loi de Bell (I-51).

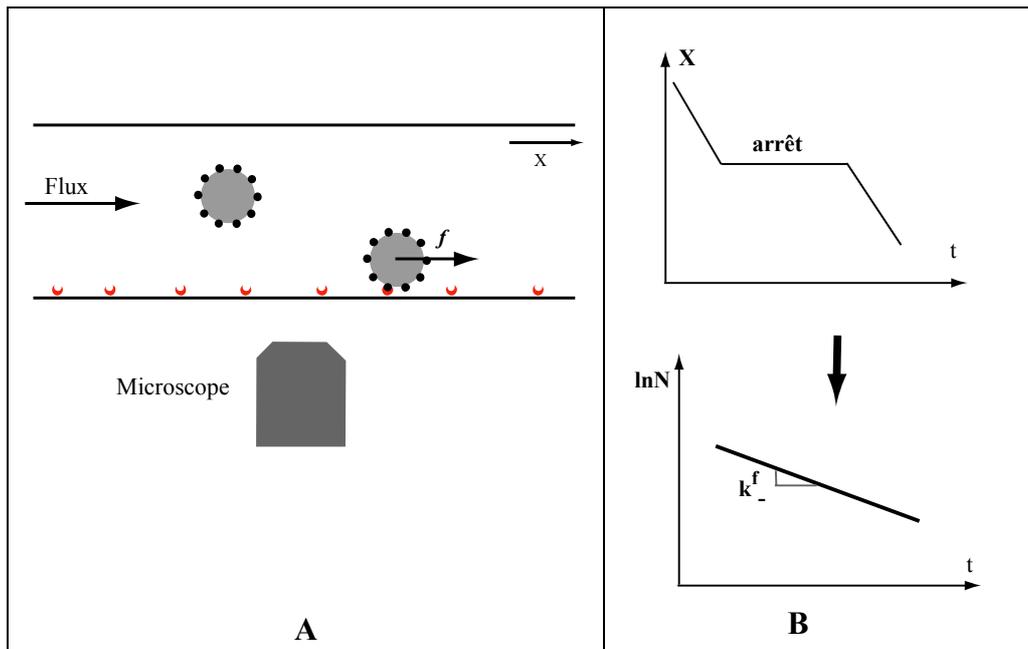


Figure-1-18 : A- Principe de la chambre à flux. B- Trajectoire des particules et détermination de la constante de dissociation sous contrainte.

A titre d'exemple, le couple CD48-CD2 a été étudié avec cette méthode, et présente une constante de dissociation de $7.8 s^{-1}$ et une force critique f^0 de 32 pN (Pierres et al., 1996). Pour le couple protéine G- IgG, un état transitoire a été décelé avec une constante de dissociation de $0.9 s^{-1}$ et une force critique f^0 de 53 pN, l'état « stable » présentant une constante de dissociation de $0.01 s^{-1}$.

CHAPITRE I

Grâce à une bonne résolution temporelle et à des forces appliquées relativement faibles, cette technique est très pertinente pour déterminer des constantes de dissociation et pour repérer des états transitoires. Cette méthode a permis de révéler que les interactions ligand-récepteur peuvent impliquer un certain nombre d'états intermédiaires, avec un large spectre de temps de vie. En effet, la description de la réaction ligand-récepteur en tant que « état lié » / « état libre » ne suffit sans doute pas, car il existe plusieurs états d'adhésion. Notons que cette méthode est moins adaptée aux couples de très forte affinité, les surfaces étant rapidement saturées en particules.

Cette technique n'est pas encore adaptée à la détermination des constantes d'association. Des tentatives ont néanmoins permis de déterminer la portée d'une interaction ligand-récepteur et un temps de formation (Pierres et al., 1998b). Mais la fréquence de collision entre particule et surface reste difficile à évaluer. Le contact même entre particules et surface est mal défini : l'aire de contact, le temps de contact, et la distance ne sont pas contrôlés. Les déterminations des constantes d'association restent donc encore ambiguës, mais de nombreux efforts sont menés pour modéliser les interactions entre particules et surface dans un écoulement hydrodynamique.

Pour conclure sur les méthodes de mesure de constantes de dissociation, nous pouvons noter que, dans les conditions de vitesses accessibles expérimentalement, les forces nécessaires pour rompre des liens ligand-récepteur varient entre 10 et 300 pN. Ces méthodes ont permis de montrer qu'un lien ligand-récepteur peut passer par plusieurs états liés. Des études récentes (détaillées au § 1-5) montrent que ces différents états liés sont empruntés au cours de l'histoire du lien, ce qui renvoie à une notion de mûrissement du lien (Pincet & Husson, 2005). Les valeurs des constantes de dissociation à force nulle sont cohérentes entre les différentes techniques. Par contre, elles ne sont pas toujours consistantes avec les constantes de dissociation en solution (biacore). En effet, dans certains cas, les valeurs en surface semblent plus élevées, avec des valeurs comprises entre 0.01 et 10 s⁻¹, que les valeurs en solution qui peuvent être de l'ordre de 10⁻⁴ s⁻¹. Pour expliquer cette divergence, Evans suggère que l'application de forces, même faibles et inférieures au pN, éliminent certains chemins énergétiques, par ailleurs accessibles en solution (Evans, 2001). En effet, de faibles interactions attractives, s'exerçant entre molécules en solution, peuvent ralentir leur dissociation spontanée (sans aucune force exercée).

1-4-3- La technique des micropipettes pour mesurer des constantes d'association

Comme nous l'avons mentionné au paragraphe 1-4-1, la mesure de constantes d'association entre molécules diffusant sur des surfaces représente un défi expérimental. Dépendant des conditions de contact entre les surfaces et des modes de diffusion des molécules, la détermination expérimentale d'une telle constante d'association est plus délicate que celle d'une constante de dissociation. L'association est largement influencée par l'environnement des réactifs, imposé par l'outil expérimental. Dans ce cadre, il est problématique de tirer des conclusions sur un hypothétique comportement moléculaire intrinsèque et général du couple étudié. La méthode de la chambre à flux reste ambiguë dans la détermination d'une constante d'association, le contact entre les deux surfaces n'étant pas contrôlé. Pour l'AFM et les pinces optiques, c'est la diffusion des réactifs, considérablement ralentie par les conditions expérimentales, qui est sans aucun doute le facteur limitant et rend la détermination d'une constante d'association assez problématique. En revanche, la technique des micropipettes a été remarquablement bien adaptée pour l'étude des constantes d'association (Chesla et al., 1998).

Directement issue de la technique des micropipettes présentée précédemment, cette technique permet un contact entre surfaces sur une aire maîtrisée et constante. La philosophie de cette approche repose sur la mesure de probabilités d'adhésion (ou fréquences d'adhésion) entre les deux surfaces. De cette probabilité d'adhésion et de la quantification du nombre de réactifs, il est possible de remonter aux constantes cinétiques d'un couple ligand-récepteur. Plus précisément, une cellule, dont la densité surfacique en récepteurs est connue, est maintenue fixe. En face de cette cellule est amenée une vésicule décorée de ligands, par une micropipette actionnée par un système piézoélectrique. Les surfaces sont mises en contact pendant un certain temps et sur une certaine aire, tous deux contrôlés. Le contact prend fin quand la vésicule est éloignée. L'expérience est suivie par microscopie optique, ce qui est illustré en figure 1-19. L'adhésion et le nombre de liens sont repérés par la forme que prend la vésicule au cours de l'éloignement et avant rupture. Cette démarche est légitime quand les densités en ligands sont faibles, ce qui conduit à la formation de liens isolés et non à des patches adhésifs. Pour parler de probabilités d'adhésion, un nombre significatif de cycles d'accrochage est réalisé, entre 100 et 200, pour une même paire cellule-vésicule et pour le même temps de contact. Pendant l'accrochage, il est considéré qu'aucune force n'est exercée sur les liens. Le temps de contact t minimum est de 0.25 s, l'aire de contact est de $3 \mu\text{m}^2$, et la durée du retrait

CHAPITRE I

de la vésicule est petite devant le temps de contact. La probabilité P_a d'adhésion est donnée par :

$$P_a = \frac{N_{adhésion}}{N_{cycles}} \quad (I-58)$$

où $N_{adhésion}$ est le nombre de cycles où l'adhésion a été repérée sur un nombre total de cycles N_{cycles} . Pour remonter aux constantes cinétiques du couple ligand-récepteur la probabilité d'adhésion est étudiée en fonction du temps de contact t . Cette démarche repose sur la théorie probabiliste qui suit. La probabilité d'adhésion P_a est directement reliée au nombre moyen de liens $\langle n \rangle$ formés entre les deux surfaces. Ici, récepteurs et ligands sont en concentrations comparables (pas plus d'un facteur 2 entre les deux concentrations) et relativement faibles. Ainsi, plusieurs liens peuvent être formés, mais de façon isolée. De plus, les phénomènes de déplétion des réactifs libres sont aussi écartés. En supposant que le nombre de liens reste faible devant le nombre de récepteurs et de ligands, la probabilité $p_n(t)$ de former n liens suit une loi de Poisson :

$$p_n(t) = \frac{\langle n \rangle^n}{n!} \exp(-\langle n \rangle) \quad (I-59)$$

Dans une approche probabiliste de cinétique chimique, le nombre moyen de liens $\langle n \rangle$ est directement relié aux constantes de dissociation k_- et d'association k_+ , via l'affinité K_A (Cozens-Roberts et al., 1990; Chesla et al., 1998) par :

$$\langle n \rangle = A_C m_R m_L K_A [1 - \exp(-k_- t)] \quad (I-60)$$

où m_R est la densité surfacique en récepteurs, m_L celle en ligands et A_C l'aire de contact. La probabilité d'adhésion est directement « 1 moins la probabilité de n'avoir aucun lien » soit d'après (I-59) :

$$P_a = 1 - p_0 = 1 - \exp(-\langle n \rangle) \quad (I-61)$$

d'où :

$$P_a(t) = 1 - \exp\left(-A_C m_R m_L K_{eq} [1 - \exp(-k_- t)]\right) \quad (I-62)$$

Ainsi, la détermination de la probabilité d'adhésion P_a en fonction du temps de contact permet de remonter directement aux constantes cinétiques.

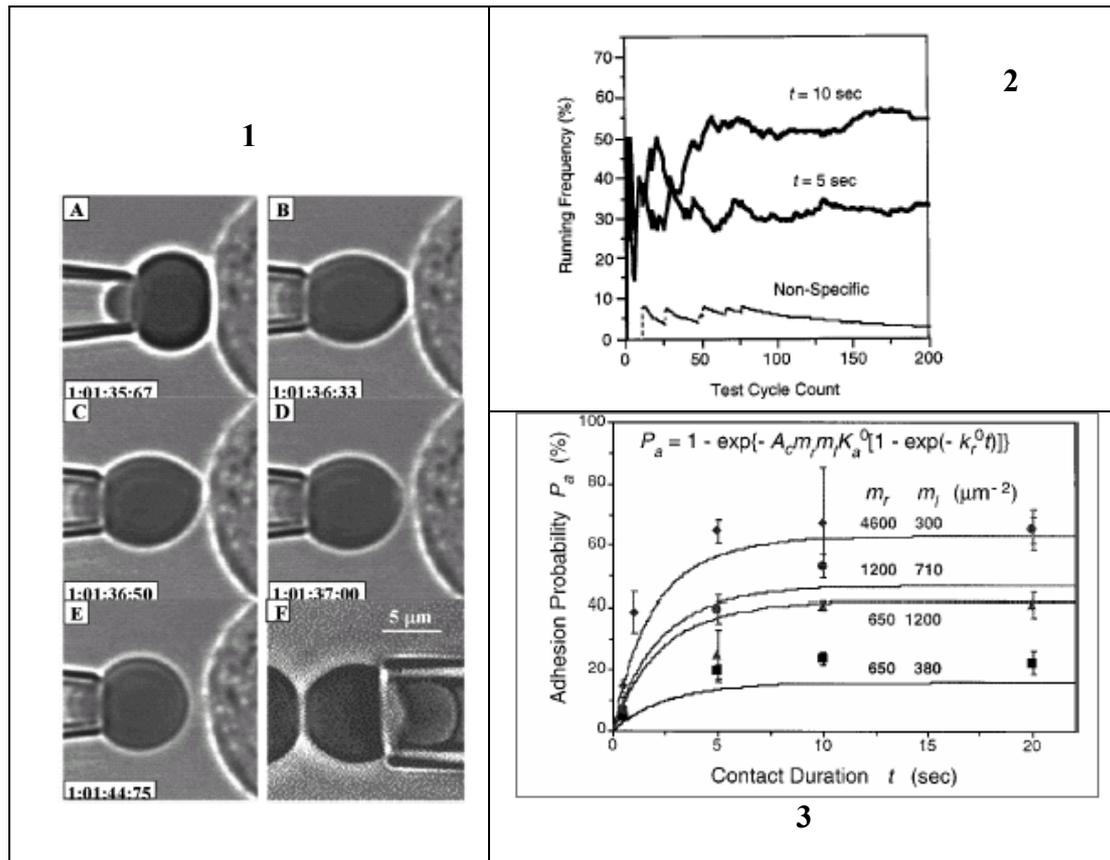


Figure-1-19 : 1-Utilisation des micropipettes pour déterminer des constantes cinétiques. A- contact entre les deux surfaces ($3\mu\text{m}^2$), trois liens sont formés et se défont successivement de B à E. L'image F correspond au cas de fortes densités de récepteurs et ligands, formant un patch adhésif entre les surfaces (l'expérience F n'est donc pas exploitable) (Long et al., 2001). 2 - Probabilités d'adhésion (Chesla et al., 1998). 3 - Evolution de la probabilité d'adhésion en fonction du temps de contact (Chesla et al., 1998).

Cette méthode a été validée par Chesla *et al* sur les récepteurs CD16A se liant aux IgG de deux origines différentes : humaine ou de lapin (Chesla et al., 1998). La probabilité d'adhésion est reportée en fonction du temps de contact pour différentes densités en récepteurs et en ligands (figure-1-19). En ajustant les courbes expérimentales d'après (1-62), les constantes k_{-} et K_{AAC} sont déterminées. De ces deux paramètres, k_{+AC} est déduit. La variation des densités en ligands et récepteurs permet de confirmer les approches théoriques et d'affiner la détermination des constantes. L'aire de contact est estimée à $3\mu\text{m}^2$ par observation microscopique, ce qui permet d'évaluer les constantes cinétique et thermodynamique d'association. Ainsi, pour l'IgG d'origine humaine, k_{-} est estimé à 0.37 s^{-1} , K_{AAC} à $0.72 \cdot 10^{-6}\mu\text{m}^4$, ce qui donne environ $10^{-7}\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ pour k_{+} . Pour l'IgG de lapin, k_{-} est estimé à 0.20 s^{-1} , K_{AAC} à $2.8 \cdot 10^{-6}\mu\text{m}^4$, ce qui donne environ $2 \cdot 10^{-7}\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ pour k_{+} . Long *et al.* ont suivi la même méthodologie pour mesurer l'association des sélectines avec leur ligand carbohydrate (Long et al., 2001). La constante d'association est estimée à $2\text{-}3 \cdot 10^{-4}\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, et est donc plus grande de 3 ordres de grandeur que celles trouvées pour les couples

CHAPITRE I

CD16A-IgG. Mais cette tendance est cohérente si l'on garde à l'esprit le rôle des sélectines responsables de la capture des leucocytes pour des temps de contact réduits (figure-1-6), Cet outil est aussi capable de mesurer des constantes d'association entre molécules liées sur des surfaces avec une précision qui permet, par exemple, de distinguer l'association de différentes IgG (IgG1 et IgG2) avec un même récepteur, le CD16 (Williams et al., 2001).

Différents paramètres susceptibles d'influencer les constantes d'association ont été considérés. Williams *et al.* ont étudié l'influence de l'état de surface sur la constante d'adhésion effective, c'est-à-dire k_{+A_C} . Pour cela, ces auteurs ont mené une série d'études sur le même couple ligand-récepteur (CD16-IgG) pour trois types de cellules : des globules rouges, des cellules ovariennes d'hamster et des cellules « K562 », cellules d'origine humaine. Ils ont montré que la constante de dissociation k reste invariante quel que soit le type de cellules supportrices alors que la constante d'association effective change significativement. Ainsi, k_{+A_C} est 50 fois plus grande quand les récepteurs sont supportés par un globule rouge que quand ils le sont par les deux autres types de cellules. Cette différence a pu être attribuée à la rugosité ou microtopologie de la surface, qui a été observée à l'aide de clichés de microscopie électronique. Les globules rouges ayant un état de surface beaucoup plus lisse, l'aire de contact effective est plus grande et explique probablement l'amplitude du k_{+A_C} mesuré.

Des études récentes (Huang et al., 2004) ont prouvé l'influence de la longueur et de l'orientation des molécules sur l'association. L'analyse de la longueur de la molécule s'est posée pour le cas des sélectines. En effet, les sélectines présentent une portion de leur partie extracellulaire qui n'est pas directement impliquée dans l'adhésion, et qui peut être plus ou moins longue. Des études en biologie cellulaire avaient déjà révélé que des sélectines raccourcies induisaient des adhésions différentes (Patel et al., 1995). Ici, Huang *et al.* montrent que raccourcir la P-sélectine diminue d'un facteur 2 la constante d'association sans altérer la constante de dissociation. Par ailleurs, ces mêmes auteurs étudient l'adhésion de globules rouges recouverts de sélectines « complètes », orientées ou non sur la membrane. Ils montrent que l'orientation a un effet sur la constante d'association et non sur la constante de dissociation. La dissociation n'étant pas influencée par le mode d'ancrage des molécules, les conformations des réactifs ne semblent donc pas être altérées. L'orientation aléatoire diminue la constante d'association d'un facteur 3. Pour un couple de type antigène-anticorps, les auteurs relèvent une diminution d'un facteur 5. L'impact de l'orientation semble donc être plus fort pour des petites molécules. Cette étude révèle donc l'importance du mode de fixation

CHAPITRE I

des molécules lors de l'adhésion spécifique entre deux surfaces. *C'est vers les processus de rencontre entre réactifs que les auteurs orientent leurs interprétations du rôle de l'ancrage des molécules.*

Cette technique, issue des micropipettes, s'est donc révélée pertinente pour l'étude des constantes cinétiques d'association. C'est la première méthode qui a pu déterminer sans ambiguïté de telles caractéristiques, avec un contrôle précis du contact. L'ordre de grandeur des constantes d'association mesurées n'a pas été discuté en profondeur dans la littérature. Mais des sources de variabilité ont été étudiées, comme l'aire de contact, l'orientation et la longueur des molécules. En ce qui concerne les constantes de dissociation, cette technique est également originale puisqu'elle évalue ces constantes en l'absence de force extérieure et donc sans extrapolation à force nulle. Elle est adaptée aux constantes de dissociations les plus élevées, car pour des temps de vie « longs », les expériences deviennent sensiblement longues et beaucoup moins précises (Zhang et al., 2005).

1-4-4- Lien entre cinétique d'association en solution et cinétique d'association

« 2D »

La question du lien entre les constantes en solution et en « 2D » a souvent été posée (Dustin et al., 2001). Il est cependant intéressant de savoir si trouver ce lien est vraiment pertinent ou si, finalement, les études en « 2D » ne sont pas déjà une caractérisation à part entière. En effet, les études en « 2D » cherchent directement à comprendre comment les cellules utilisent les récepteurs pour adhérer. La question du lien entre « 2D » et solution se pose surtout pour les constantes qui s'expriment dans des unités différentes, à savoir les constantes d'association, qui, de plus, semblent être très sensibles à l'environnement des molécules en surface.

Une relation entre constantes d'équilibre « 3D » et « 2D » a été énoncée par Bell (1-50). Pour les constantes cinétiques d'association, la différence étant, là encore, uniquement dimensionnelle, on peut les relier, de façon très générale, par un seul paramètre d , homogène à une distance (Dustin et al., 1997), c'est-à-dire :

$$k_+^{3D} \approx k_{+eq}^{2D} d \quad (1-63)$$

CHAPITRE I

Ce paramètre d , purement dimensionnel, peut être perçu comme la portée de l'interaction ligand-récepteur, ou encore peut représenter le confinement, c'est-à-dire que d est la longueur qui permet de reconstruire un volume d'interaction. Dans le cas où d représente une portée d'interaction, il est de l'ordre de 1 nm. Dans le cas où d reflète une longueur de confinement, il correspond à la distance entre les surfaces, c'est-à-dire au plus à une dizaine de nanomètres, dans la majorité des cas. Cette description est donc ambiguë car le paramètre d n'est pas clairement défini. Si l'on essaie d'appliquer cette approche aux couples étudiés en micropipettes et précédemment évoqués (Chesla et al., 1998; Long et al., 2001), en prenant k_+^{3D} de l'ordre de $10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ et d de l'ordre de 1 nm, on trouve $k_{+eq}^{2D} \approx 1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Cette constante cinétique équivalente, k_{+eq}^{2D} , est beaucoup plus grande que celles obtenues expérimentalement, comprises entre $10^{-7} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Si l'on veut que la formule (I-63) permette de retrouver ces résultats expérimentaux, il faut prendre une distance de plus de 10 μm , ce qui n'est pas une longueur caractéristique du système. Cette différence signifie que les réactions en surface sont beaucoup plus « lentes » que les réactions en solution.

Notons également que les molécules ne sont pas toutes « ralenties » de la même façon quand elles sont accrochées à des surfaces. C'est ce qui a été révélé par une étude menée en micropipettes pour les couples CD16-IgG1 et CD16-IgG2 (Williams et al., 2000), dont les différences sont très marquées en solution et relativement faibles sur des surfaces. La connaissance des constantes d'association en solution ne semble donc pas suffire pour prédire le comportement des couples ligand-récepteur sur des surfaces. D'autres paramètres sont susceptibles d'intervenir quand les réactifs sont supportés par des surfaces.

L'étude expérimentale que nous présenterons au chapitre 3 abordera cette problématique et s'attachera notamment à élucider l'origine du ralentissement observé lorsqu'un ligand et un récepteur réagissent en surface.

1-5- Un couple modèle : streptavidine-biotine

Du fait de sa remarquable affinité et stabilité, le couple streptavidine-biotine représente le couple modèle pour l'étude de l'interaction ligand-récepteur et est donc largement étudié en biophysique. L'étude de ce couple permet de comparer différentes techniques et de comprendre des caractéristiques fondamentales des couples ligand-récepteur. Il sera d'ailleurs

le couple ligand-récepteur utilisé pour valider notre méthode expérimentale. Nous citons donc ici quelques unes de ses caractéristiques, et en particulier, celles qui ont été apportées par les outils présentés dans le paragraphe précédent, et qui illustrent les particularités des interactions ligand-récepteur.

1-5-1- Le couple streptavidine-biotine

La liaison streptavidine-biotine est la liaison non covalente, d'origine biologique, la plus forte recensée à ce jour. Elle reste stable pour des conditions très variables en pH, salinité ou température (Gonzalez et al., 1999). Sa constante d'association est de l'ordre de 10^{14} - 10^{15} mol⁻¹.L (Miyamoto & Kollman, 1993) ce qui correspond à une énergie de liaison de près de 30 *kT*. La biotine est une petite molécule, la vitamine H, avec une masse moléculaire de 244 g.mol⁻¹. La streptavidine est une protéine de masse moléculaire de 60 000 g.mol⁻¹ environ. Elle est composée de 4 unités identiques. Chaque unité a un site de fixation de la biotine (figure-1-20).

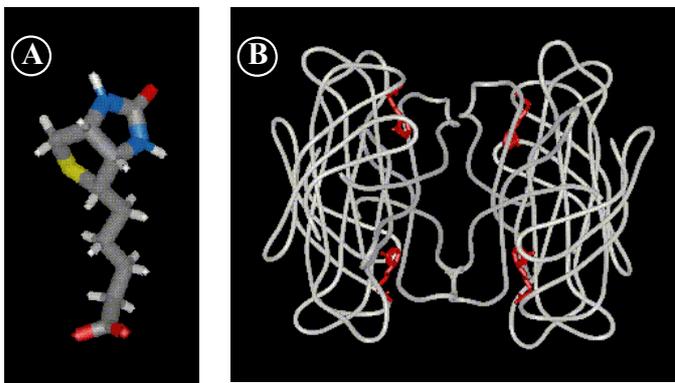


Figure 1-20 : A- Structure de la biotine. B- Structure de la streptavidine se liant à 4 biotines, placées de façon antiparallèle. (<http://amber.scripps.edu/tutorial/streptavidin/index.html>)

D'après les structures cristallographiques (Weber et al., 1992), les sites de liaison présentent une grande complémentarité de géométrie et de nature. Ces structures révèlent que la biotine réalise des liaisons hydrogène plus stables avec la streptavidine qu'avec les molécules d'eau, grâce à des phénomènes de résonance. On compte, par biotine, 7 liaisons hydrogène engagées avec la streptavidine. Bien que la formation de telles liaisons relâche 5 molécules d'eau, apportant un gain entropique, la contribution prépondérante est d'origine enthalpique. Les interactions non polaires participent aussi à la stabilité de la liaison streptavidine-biotine. En effet, des protéines mutantes, où des tryptophanes, acides aminés non polaires, sont enlevés, affichent des constantes de dissociation jusqu'à 100 fois plus grandes (Chilkoti & Stayton, 1995). La localisation de ces tryptophanes et leur influence sur la dissociation laissent

CHAPITRE I

envisager que la liaison streptavidine-biotine emprunte différents états d'adhésion, un état très stable où participent les tryptophanes Trp120, Trp108 et Trp79 et un état transitoire où seul le Trp108 intervient. La troisième caractéristique de la liaison streptavidine-biotine est le déplacement d'une boucle flexible (résidus 45 à 50) sur la biotine.

La biotine étant une molécule bien plus petite qu'une protéine, on peut la considérer comme isotropiquement réactive, et son association avec la streptavidine peut être modélisée par une approche de « type Smoluchowski » (§ 1-2-2), qui donne une valeur d'environ $10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$. Cette valeur a été retrouvée expérimentalement par Perez-Luna *et al.* par des mesures en biacore (Perez-Luna *et al.*, 1999). Cette étude donne pour la constante de dissociation une valeur de $6 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ correspondant à des temps de vie de plusieurs heures, voire des jours.

1-5-2- Caractéristiques biophysiques

1-5-2-a- Paysage énergétique

Ce couple a fait l'objet de très nombreuses études en biophysique, qui ont mesuré le temps de vie du complexe et caractérisé son comportement face à une force. La confrontation de ces différentes études a permis de reconstruire le paysage énergétique du lien streptavidine-biotine.

Une des premières études a été menée par Florin *et al.* en AFM (Florin *et al.*, 1994). Le couple considéré n'est pas streptavidine-biotine mais avidine-biotine, sachant que la streptavidine et l'avidine ont des structures et affinités très proches. Les auteurs mesurent une force de rupture f^* de 160 pN. La même année, Lee *et al.* étudient directement le couple streptavidine-biotine, également en AFM (Lee *et al.*, 1994). Ils mesurent des forces de rupture autour de 200 pN. Ils vérifient la loi de Bell quantitativement, en mesurant un temps de vie de 0.34 s pour une force de 300 pN et un temps de vie de 0.04 s pour 400 pN. Dans ces premières études, l'approche d'Evans sur la dépendance des forces de rupture avec les vitesses de déplacement n'est pas encore exploitée.

Merkel *et al.* reprennent la théorie d'Evans (§ 1-4-2) sur la dépendance des forces de rupture avec la vitesse des forces appliquées (Merkel *et al.*, 1999). Ils reconstruisent un paysage énergétique de la liaison grâce à une étude menée en BFP, en faisant varier le taux de charge sur 6 ordres de grandeur (0.05 à 60 000 pN.s⁻¹). Ils ont mené ces études sur les deux couples avidine-biotine et streptavidine-biotine. Ils observent ainsi un temps de vie qui chute de 1 min à 0.001s et pour des forces de rupture allant de 5 pN à 170 pN. Ils reportent la force de rupture

la plus probable f^* en fonction du taux de charge r_f (figure 1-21). Il apparaît des régimes linéaires sur plusieurs ordres de grandeur, qui sont attribués à différentes barrières d'énergie, localisables sur le chemin énergétique (équation (1-55)).

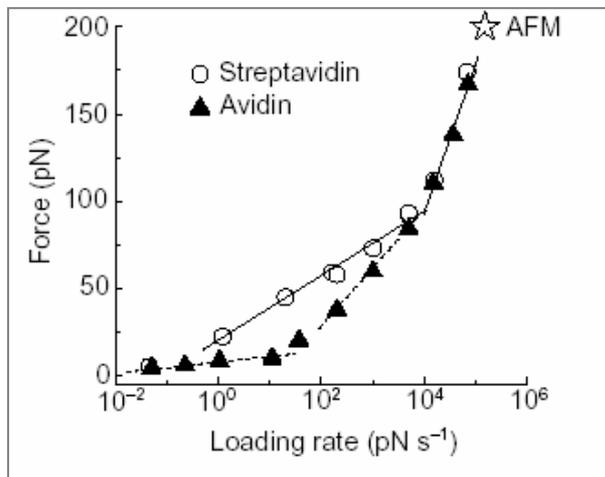


Figure-1-21 : Spectres de la force de rupture la plus probable en fonction du taux de charge, révélant deux barrières d'énergie pour le couple streptavidine-biotine car deux régimes linéaires sont observés (Merkel et al., 1999).

Pour le couple streptavidine-biotine, deux régimes sont observés correspondant à deux barrières d'énergie localisées en $x_\beta = 0.12$ nm et $x_\beta = 0.5$ nm. Pour le couple avidine-biotine, trois régimes apparaissent ($x_\beta = 0.12$ nm, 0.3 nm et 3 nm). Les deux couples diffèrent donc surtout par leurs états transitoires. Le couple streptavidine-biotine peut donc explorer différents états d'adhésion avant une séparation totale, ce qui est en accord avec l'étude de Chikoti *et al.* (Chilkoti & Stayton, 1995). Ces travaux sont cohérents avec les valeurs trouvées précédemment en AFM, dont les mesures sont réalisées pour des taux de charge de l'ordre de 10^5 pN.s⁻¹.

Yuan *et al.* reprennent cette méthodologie en AFM. Ils font varier le taux de charge en changeant la vitesse de séparation et la constante de raideur de la pointe (Yuan et al., 2000). Ils reconstruisent alors le paysage énergétique à partir des différents régimes observés dans le spectre de f^* en fonction du taux de charge, resserrés entre 100 et 5000 pN.s⁻¹. Ils confirment que le couple streptavidine-biotine possède deux états liés, mais leurs résultats diffèrent de ceux de Merkel *et al.* en ce qui concerne l'état le plus profond.

Pierres *et al.* observent également des états transitoires en chambre à flux pour le couple streptavidine-biotine (Pierres et al., 2002), sans avoir recours à une variation du taux de charge. Pour des taux de cisaillement faibles, ils observent des temps de vie très différents, les plus brefs sont reliés à des états transitoires. La distribution des temps de vie peut s'interpréter avec deux constantes : une de 5.3 s⁻¹ qui concerne le dépeuplement de l'état transitoire vers l'état dissocié et une constante de 1.3 s⁻¹ qui traduit le passage de l'état de transition vers un état lié profond et plus stable.

Récemment, en 2005, Pincet *et al.* réconcilient les études menées en micropipettes et en chambre à flux avec d'autres observations expérimentales du temps de vie du lien streptavidine-biotine (Pincet & Husson, 2005). En effet, dans les études d'étirement de l'ADN (Baumann *et al.*, 1997), l'ADN est reliée à une particule via un unique lien streptavidine-biotine. Les expériences montrent que pour une force de 80 pN, le lien est stable sur une minute et que pour 100 pN le lien ne dure quelques secondes. Ces observations sont en contradiction avec les résultats de Merkel *et al.*, qui reportent des temps de vie de 75 ms pour une force de 75 pN. Cela semble dire que la stabilité du lien dépend de la technique utilisée. En s'appuyant sur des simulations de dynamique moléculaire (Izrailev *et al.*, 1997), Pincet *et al.* abordent le paysage énergétique du couple streptavidine-biotine avec 3 minima d'énergie, ou trois états d'adhésion, et avec trois barrières d'énergie. Ils appliquent alors la théorie de Kramers à ce profil d'énergie et montrent que Merkel *et al.* ont observé les deux états d'adhésion les plus externes en BFP. L'état le plus profond n'était pas atteint pour ces études en BFP contrairement aux expériences d'étirement de l'ADN. Pincet *et al.* attribuent cette différence d'observation à l'histoire qu'a subi le lien, avant d'être soumis à une force. En utilisant les micropipettes, ces auteurs confirment, expérimentalement, l'existence de trois barrières d'énergie en accord avec les simulations et les expériences précédentes de BFP et de chambre à flux. Les caractéristiques de ce paysage énergétique sont présentées dans la figure-1-22.

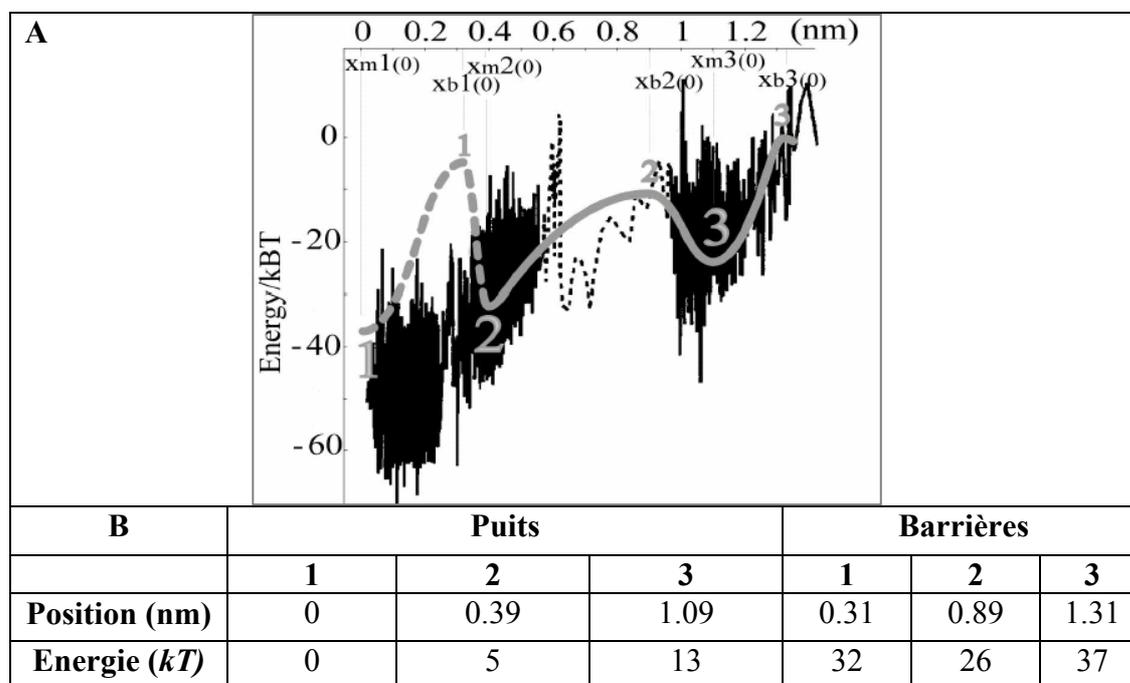


Figure-1-22 : A- Profil d'énergie du lien streptavidine-biotine, présentant trois états d'adhésion. B- Caractéristiques des trois états d'adhésion. (Pincet & Husson, 2005)

CHAPITRE I

Enfin, ces auteurs montrent que les conditions de formation du lien sont cruciales. Le lien connaît, en fait, des réarrangements moléculaires pour atteindre son état le plus profond et ces réarrangements prennent un certain temps. Cette étude est fondamentale : elle montre pour la première fois de façon expérimentale l'importance du mûrissement des liens ligand-récepteur.

Les résultats avancés ici sont en accord avec le temps de vie au repos de plusieurs dizaines d'heures évoqué précédemment.

1-5-2-b- Association à « 2D »

En ce qui concerne la cinétique d'association entre la streptavidine et la biotine, quand elles sont liées sur des surfaces, deux principales études sont à reporter ici. L'affinité de ce couple étant tellement importante, l'influence des paramètres physiques sur l'association entre ligand et récepteur peut être étudiée. Notamment, les molécules « espaceur », qui relient surface et réactifs, semblent jouer un rôle crucial sur la cinétique d'association entre surfaces.

Jeppesen *et al.* ont étudié l'adhésion entre une surface recouverte de streptavidines et une surface biotinylée via des polymères, utilisés donc comme « espaceur » (Jeppesen et al., 2001) (figure-1-23). Ils considèrent la distance entre surfaces à partir de laquelle l'adhésion est effective. En ayant recours à des simulations, à la théorie de la diffusion et aux données expérimentales fournies par la SFA, ils quantifient l'impact de la dynamique des chaînes de polymères sur l'adhésion.

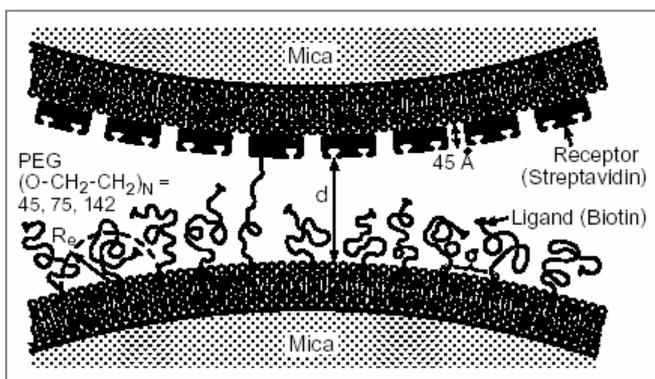


Figure-1-23 : Etude de l'influence des molécules « espaceurs » réalisée par SFA. (Jeppesen et al., 2001)

L'adhésion est observée pour des distances de séparation plus grandes que le rayon de giration des polymères, qui correspond à leur configuration d'équilibre. La seule extension des chaînes de polymères suffit pour induire l'association entre la streptavidine et la biotine et de ce fait l'adhésion entre surfaces. Ils montrent ainsi que les « espaceurs » étendent

CHAPITRE I

l'exploration spatiale du ligand. De plus, la dynamique d'exploration du ligand ne peut être simplement décrite comme une diffusion de particule mais fait également intervenir la dynamique du polymère espaceur. Cette étude montre donc l'influence des « espaceurs » sur l'association, aussi bien sur sa portée que sur sa dynamique.

Une étude conduite par Cuvelier *et al.* montre également le rôle des molécules « espaceur » sur l'adhésion induite par le couple streptavidine-biotine (Cuvelier & Nassoy, 2004). Ces auteurs mesurent la vitesse d'étalement de vésicules décorées de streptavidines sur une surface recouverte de biotines. Deux types de surfaces sont étudiées : des surfaces biotinylées via des protéines globulaires (caséinate) ou via des polymères (PEG 3400). Pour des taux de couverture en biotines équivalents, les vésicules affichent des cinétiques d'étalement radicalement différentes : quelques secondes suffisent quand les biotines sont présentées par des polymères et une dizaine de minutes sont nécessaires quand elles sont présentées par des protéines. Ils attribuent la diminution de la cinétique d'étalement au changement de la constante d'association du couple streptavidine-biotine, qui passerait d'une constante quasiment « 3D », quand la biotine est liée à un polymère, à une constante « 2D », quand la biotine est attachée à une protéine.

La nature de la liaison entre réactifs et surfaces est donc un paramètre physique qui influence fortement la cinétique d'association.

1-6- Conclusion

Pour clôturer ce chapitre, résumons les principales idées qui ont été avancées concernant les réactions ligand-récepteur dans le cas particulier où les molécules sont attachées à des surfaces.

L'interaction ligand-récepteur peut se concevoir comme un ajustement entre surfaces complémentaires. Dans ce cadre, en solution, les cinétiques d'association entre un ligand et un récepteur sont majoritairement décrites par une étape de diffusion sous contrainte de spécificité stérique. En surface, l'étude des constantes cinétiques représente une nouvelle forme de caractérisation des interactions ligand-récepteur. Cette caractérisation est pertinente

CHAPITRE I

pour comprendre l'adhésion cellulaire mais aussi d'un point de vue conceptuel puisque la relation entre constantes en solution et constantes en surface s'avère complexe. L'interaction ligand-récepteur passe souvent par plusieurs états d'adhésion successifs. Les constantes de dissociation peuvent justement rendre compte de l'évolution du lien, c'est-à-dire de son état de mûrissement. La variation des constantes de dissociation avec les forces appliquées renseigne également sur la nature des liens. Mais les constantes de dissociation semblent peu sensibles à la liaison entre molécules et surface. En ce qui concerne les constantes d'association, leur détermination est délicate et dépend de l'outil de mesure. En outre, elles semblent particulièrement sensibles à la présence de la surface, notamment à l'orientation des molécules, à leur liaison avec la surface, à l'aire de contact...

C'est sur ces derniers points que notre méthode de mesure de constantes d'association entre un ligand et un récepteur situés sur des surfaces en regard, que nous proposons au chapitre 3, apporte un contrôle accru. Nous étudierons en détail l'influence de la liaison entre molécule et surface. En effet, la structure de la liaison et sa dynamique sont des paramètres clés à considérer pour étudier l'association en surface. Jusqu'à présent, on ne recense, dans la littérature, aucune mesure expérimentale et quantitative de l'influence de la liaison entre molécule et surface sur la cinétique d'association entre un ligand et un récepteur, à l'échelle de molécules uniques.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN, S., CHEN, X. Y., DAVIES, J., DAVIES, M. C., DAWKES, A. C., EDWARDS, J. C., ROBERTS, C. J., SEFTON, J., TENDLER, S. J. B. & WILLIAMS, P. M. (1997). Detection of antigen-antibody binding events with the atomic force microscope. — *Biochemistry* 36, 7457-7463.
- BAUMANN, C. G., SMITH, S. B., BLOOMFIELD, V. A. & BUSTAMANTE, C. (1997). Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 6185-6190.
- BELL, G. (1978). Models for the Specific Adhesion of Cells to Cells. — *science* 200, 618-627.
- BERG, H. & PURCELL, E. (1977). Physics of chemoreception. — *Biophysical Journal* 20, 193-219.
- BONGRAND, P. (1999). Ligand-receptor interactions. — *Reports on Progress in Physics* 62, 921-968.
- BRADEN, B. C. & POLJAK, R. J. (1995). Structural Features of the Reactions - between Antibodies and Protein Antigens. — *Faseb Journal* 9, 9-16.
- BRADEN, B. C., SOUCHON, H., EISELE, J. L., BENTLEY, G. A., BHAT, T. N., NAVAZA, J. & POLJAK, R. J. (1994). 3-Dimensional Structures of the Free and the Antigen-Complexed Fab from Monoclonal Antilysozyme Antibody-D44.1. — *Journal of Molecular Biology* 243, 767-781.
- CHEN, S. & SPRINGER, T. (2001). Selectin receptor - ligand bonds : Formation limited by shear rate and dissociation governed by the Bell model. — *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 950-955.
- CHESLA, S. E., SELVARAJ, P. & ZHU, C. (1998). Measuring two-dimensional receptor-ligand binding kinetics by micropipette. — *Biophysical Journal* 75, 1553-1572.
- CHIGAEV, A., BLENC, A. M., BRAATEN, J. V., KUMARASWAMY, N., KEPLEY, C. L., ANDREWS, R. P., OLIVER, J. M., EDWARDS, B. S., PROSSNITZ, E. R., LARSON, R. S. & SKLAR, L. A. (2001). Real time analysis of the affinity regulation of alpha(4)-integrin - The physiologically activated receptor is intermediate in affinity between resting and Mn²⁺ or antibody activation. — *Journal of Biological Chemistry* 276, 48670-48678.
- CHILKOTI, A. & STAYTON, P. S. (1995). Molecular-Origins of the Slow Streptavidin-Biotin Dissociation Kinetics. — *Journal of the American Chemical Society* 117, 10622-10628.
- CHOTHIA, C. & JONES, E. Y. (1997). The molecular structure of cell adhesion molecules. — *Annual Review of Biochemistry* 66, 823-862.
- COLLINS, F. C. & KIMBALL, G. E. (1949). Diffusion-Controlled Reaction Rates. — *Journal of Colloid Science* 4, 425-437.
- COZENS-ROBERTS, C., LAUFFENBURGER, D. A. & QUINN, J. A. (1990). Receptor-Mediated Cell Attachment and Detachment Kinetics .1. Probabilistic Model and Analysis. — *Biophysical Journal* 58, 841-856.
- CREIGHTON, T. E. (1993). *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2nd edition). — W. H. Freeman, New - York.
- CUVELIER, D. & NASSOY, P. (2004). Hidden dynamics of vesicle adhesion induced by specific stickers. — *Physical Review Letters* 93.
- DAMMER, U., HEGNER, M., ANSELMETTI, D., WAGNER, P., DREIER, M., HUBER, W. & GUNTHERODT, H. J. (1996). Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy. — *Biophysical Journal* 70, 2437-2441.

- DAVIES, D. R. & COHEN, G. H. (1996). Interactions of protein antigens with antibodies. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7-12.
- DAY, Y. S. N., BAIRD, C. L., RICH, R. L. & MYSZKA, D. G. (2002). Direct comparison of binding equilibrium, thermodynamic, and rate constants determined by surface- and solution-based biophysical methods. — *Protein Science* 11, 1017-1025.
- DEBYE, P. (1942). Reaction Rates in Ionic Solutions. — *Transactions of the Electrochemical Society* 82, 265-272.
- DEREMBLE, C. & LAVERY, R. (2005). Macromolecular recognition. — *Current Opinion in Structural Biology* 15, 171-175.
- DMITRIEV, D. A., MASSINO, Y. S. & SEGAL, O. L. (2003). Kinetic analysis of interactions between bispecific monoclonal antibodies and immobilized antigens using a resonant mirror biosensor. — *Journal of Immunological Methods* 280, 183-202.
- DRAKE, A., MYSZKA, D. & KLAKAMP, S. (2004). Characterizing high-affinity antigen/antibody complexes by kinetic- and equilibrium-based methods. — *analytical biochemistry* 328, 35-43.
- DUSTIN, M. L., BROMLEY, S. K., DAVIS, M. M. & ZHU, C. (2001). Identification of self through two-dimensional chemistry and synapses. — *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17, 133-157.
- DUSTIN, M. L., GOLAN, D. E., ZHU, D. M., MILLER, J. M., MEIER, W., DAVIES, E. A. & VAN DER MERWE, P. A. (1997). Low affinity interaction of human or rat T cell adhesion molecule CD2 with its ligand aligns adhering membranes to achieve high physiological affinity. — *Journal of Biological Chemistry* 272, 30889-30898.
- EMNEUS, J. & MARKOVARGA, G. (1995). Biospecific Detection in Liquid-Chromatography. — *Journal of Chromatography A* 703, 191-243.
- EVANS, E. (1995). *Physical Actions in Biological Adhesion*. — Elsevier, Amsterdam.
- (2001). Probing the relation between force - Lifetime - and chemistry in single molecular bonds. — *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 30, 105-128.
- EVANS, E., BERK, D. & LEUNG, A. (1991). Detachment of Agglutinin-Bonded Red-Blood-Cells .1. Forces to Rupture Molecular-Point Attachments. — *Biophysical Journal* 59, 838-848.
- EVANS, E., LEUNG, A., HAMMER, D. & SIMON, S. (2001-a). Chemically distinct transition states govern rapid dissociation of single L-selectin bonds under force. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 3784-3789.
- EVANS, E., LEUNG, A., HEINRICH, V. & ZHU, C. (2004). Mechanical switching and coupling between two dissociation pathways in a P-selectin adhesion bond. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 11281-11286.
- FIVASH, M., TOWLER, E. & FISHER, R. (1998). BIAcore for macromolecular interaction. — *current opinion in biotechnology* 9, 97-101.
- FLORIN, E. L., MOY, V. T. & GAUB, H. E. (1994). Adhesion Forces between Individual Ligand-Receptor Pairs. — *Science* 264, 415-417.
- FRITZ, J., KATOPODIS, A., KOLBINGER, F. & ANSELMETTI, D. (1998). Force-mediated kinetics of single P-selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy. — *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 12283-12288.
- GONZALEZ, M., ARGARANA, C. E. & FIDELIO, G. D. (1999). Extremely high thermal stability of streptavidin and avidin upon biotin binding. — *Biomolecular Engineering* 16, 67-72.
- HINTERDORFER, P., BAUMGARTNER, W., GRUBER, H. J., SCHILCHER, K. & SCHINDLER, H. (1996). Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events

- by atomic force microscopy. — Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 3477-3481.
- HUANG, J., CHEN, J., CHESLA, S. E., YAGO, T., MEHTA, P., MCEVER, R. P., ZHU, C. & LONG, M. (2004). Quantifying the effects of molecular orientation and length on two-dimensional receptor-ligand binding kinetics. — Journal of Biological Chemistry 279, 44915-44923.
- IRVINE, D. J., HUE, K. A., MAYES, A. M. & GRIFFITH, L. G. (2002). Simulations of cell-surface integrin binding to nanoscale-clustered adhesion ligands. — Biophysical Journal 82, 120-132.
- ISRAELACHVILI, J. (1992). Intermolecular and Surface Forces. — Academic Press, London.
- IZRAILEV, S., STEPANIANTS, S., BALSERA, M., OONO, Y. & SCHULTEN, K. (1997). Molecular dynamics study of unbinding of the avidin-biotin complex. — Biophysical Journal 72, 1568-1581.
- JANIN, J. (1995). Protein-protein recognition. — Progress in Biophysics & Molecular Biology 64, 145-166.
- . (1997). The kinetics of protein-protein recognition. — Proteins-Structure Function and Genetics 28, 153-161.
- JEPPESEN, C., WONG, J., KUHL, T., ISRAELACHVILI, J., MULLAH, N., ZALIPSKY, S. & MARQUES, C. (2001). Impact of polymer tether length on multiple ligand-receptor bond formation. — science 293, 465-468.
- KAPLANSKI, G., FARNARIER, C., TISSOT, O., PIERRES, A., BENOLIEL, A. M., ALESSI, M. C., KAPLANSKI, S. & BONGRAND, P. (1993). Granulocyte Endothelium Initial Adhesion - Analysis of Transient Binding Events Mediated by E-Selectin in a Laminar Shear-Flow. — Biophysical Journal 64, 1922-1933.
- KIENBERGER, F., EBNER, A., GRUBER, H. J. & HINTERDORFER, P. (2006). Molecular recognition imaging and force spectroscopy of single biomolecules. — Accounts of Chemical Research 39, 29-36.
- KRAMERS, H. A. (1940). Brownian Motion in a Field of Force and the Diffusion Model of Chemical Reactions. — Physical Review E 7, 284-304.
- KUBI, J. (1994). Immunology. — W. H. Freeman and Company, New York.
- KULIN, S., KISHORE, R., HUBBARD, J. B. & HELMERSON, K. (2002). Real-time measurement of spontaneous antigen-antibody dissociation. — Biophysical Journal 83, 1965-1973.
- LAUFFENBURGER, D. A. & LINDERMAN, J. J. (1993). Receptors - Models for binding, trafficking, and signaling. — oxford university press.
- LAVERY, R., LEBRUN, A., ALLEMAND, J. F., BENSIMON, D. & CROQUETTE, V. (2002). Structure and mechanics of single biomolecules: experiment and simulation. — Journal of Physics-Condensed Matter 14, R383-R414.
- LAWRENCE, M. B. & SPRINGER, T. A. (1991). Leukocytes Roll on a Selectin at Physiological Flow-Rates - Distinction from and Prerequisite for Adhesion through Integrins. — Cell 65, 859-873.
- LECKBAND, D. (2000). Measuring the forces that control protein interactions. — Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 29, 1-26.
- LEE, G. U., KIDWELL, D. A. & COLTON, R. J. (1994). Sensing Discrete Streptavidin Biotin Interactions with Atomic-Force Microscopy. — Langmuir 10, 354-357.
- LEHN, J. M., MASCAL, M., DECIAN, A. & FISCHER, J. (1990). Molecular Recognition Directed Self-Assembly of Ordered Supramolecular Strands by Cocrystallization of Complementary Molecular-Components. — Journal of the Chemical Society-Chemical Communications, 479-481.
- LIEDBERG, B., NYLANDER, C. & LUNDSTROM, I. (1983). Surface-Plasmon Resonance for Gas-Detection and Biosensing. — Sensors and Actuators 4, 299-304.

CHAPITRE I

- LO CONTE, L., CHOTHIA, C. & JANIN, J. (1999). The atomic structure of protein-protein recognition sites. — *Journal of Molecular Biology* 285, 2177-2198.
- LONG, M., ZHAO, H., HUANG, K. & ZHU, C. (2001). Kinetic measurement of cell surface E-Selectin/Carbohydrate Ligand Interactions. — *Annals of biomedical engineering* 29, 935-946.
- MARCUS, R. A. (1964). Chemical + Electrochemical Electron-Transfer Theory. — *Annual Review of Physical Chemistry* 15, 155-&.
- MARSHALL, B., LONG, M., PIPER, J., YAGO, T., MCEVER, R. & ZHU, C. (2003). Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. — *Nature* 423, 190-193.
- MCQUARRIE, D. A. (1962). Kinetics of Small Systems. I. — *The Journal of Chemical Physics* 38, 433-436.
- . (1964). Kinetics of Small Systems. II. — *The Journal of Chemical Physics* 40, 2914-2921.
- MERKEL, R., NASSOY, P., LEUNG, A., RITCHIE, K. & EVANS, E. (1999). Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. — *Nature* 397, 50-53.
- MIHAILESCU, M. & GILSON, M. K. (2004). On the theory of noncovalent binding. — *Biophysical Journal* 87, 23-36.
- MIYAMOTO, S. & KOLLMAN, P. A. (1993). Absolute and Relative Binding Free-Energy Calculations of the Interaction of Biotin and Its Analogs with Streptavidin Using Molecular-Dynamics Free-Energy Perturbation Approaches. — *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 16, 226-245.
- NISHIZAKA, T., MIYATA, H., YOSHIKAWA, H., ISHIWATA, S. & KINOSITA, K. (1995). Unbinding Force of a Single Motor Molecule of Muscle Measured Using Optical Tweezers. — *Nature* 377, 251-254.
- NORTHRUP, S. & ERICKSON, H. (1992). Kinetics of protein-protein association by Brownian dynamics computer simulation. — *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 3338-3342.
- PATEL, K. D., NOLLERT, M. U. & MCEVER, R. P. (1995). P-selectin must extend a sufficient length from the plasma membrane to mediate rolling of neutrophils. — *Journal of Cell Biology* 131, 1893-1902.
- PEREZ-LUNA, V. H., O'BRIEN, M. J., OPPERMAN, K. A., HAMPTON, P. D., LOPEZ, G. P., KLUMB, L. A. & STAYTON, P. S. (1999). Molecular recognition between genetically engineered streptavidin and surface-bound biotin. — *Journal of the American Chemical Society* 121, 6469-6478.
- PIERRES, A., BENOLIEL, A. M. & BONGRAND, P. (1998a). Interactions between biological surfaces. — *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 3, 525-533.
- PIERRES, A., BENOLIEL, A. M., BONGRAND, P. & VANDERMERWE, P. A. (1996). Determination of the lifetime and force dependence of interactions of single bonds between surface-attached CD2 and CD48 adhesion molecules. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 15114-15118.
- PIERRES, A., FERACCI, H., DELMAS, V., BENOLIEL, A. M., THIERY, J. P. & BONGRAND, P. (1998b). Experimental study of the interaction range and association rate of surface-attached cadherin 11. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9256-9261.
- PIERRES, A., TOUCHARD, D., BENOLIEL, A. M. & BONGRAND, P. (2002). Dissecting streptavidin-biotin interaction with a Laminar flow chamber. — *Biophysical Journal* 82, 3214-3223.

- PINCET, F. & HUSSON, J. (2005). The solution to the streptavidin-biotin paradox: The influence of history on the strength of single molecular bonds. — *Biophysical Journal* 89, 4374-4381.
- POLLARD, T. D., ALMO, S., QUIRK, S., VINSON, V. & LATTMAN, E. E. (1994). Structure of Actin-Binding Proteins - Insights About Function at Atomic-Resolution. — *Annual Review of Cell Biology* 10, 207-249.
- RINKO, L. J., LAWRENCE, M. B. & GUILFORD, W. H. (2004). The molecular mechanics of P- and L-selectin lectin domains binding to PSGL-1. — *Biophysical Journal* 86, 544-554.
- SCHREIBER, G. & FERSHT, A. R. (1993). Interaction of Barnase with Its Polypeptide Inhibitor Barstar Studied by Protein Engineering. — *Biochemistry* 32, 5145-5150.
- . (1996). Rapid, electrostatically assisted association of proteins. — *Nature Structural Biology* 3, 427-431.
- SCHWESINGER, F., ROS, R., STRUNZ, T., ANSELMETTI, D., GUNTHERODT, H. J., HONEGGER, A., JERMUTUS, L., TIEFENAUER, L. & PLUCKTHUN, A. (2000). Unbinding forces of single antibody-antigen complexes correlate with their thermal dissociation rates. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 9972-9977.
- SHOUP, D. & SZABO, A. (1982). Role of diffusion in ligand binding to macromolecules and cell-bound receptors. — *Biophysical Journal* 40, 33-39.
- SIMSON, D. A., STRIGL, M., HOHENADL, M. & MERKEL, R. (1999). Statistical breakage of single protein A-IgG bonds reveals crossover from spontaneous to force-induced bond dissociation. — *Physical Review Letters* 83, 652-655.
- SMOLUCHOWSKI, M. V. (1917). Versuch einer Mathematischen Theorie der Koagulationkinetik Kolloider Lösungen. — *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 92, 129-1689.
- STOUT, A. L. (2001). Detection and characterization of individual intermolecular bonds using optical tweezers. — *Biophysical Journal* 80, 2976-2986.
- THA, S. P., SHUSTER, J. & GOLDSMITH, H. L. (1986). Interaction Forces between Red-Cells Agglutinated by Antibody .2. Measurement of Hydrodynamic Force of Breakup. — *Biophysical Journal* 50, 1117-1126.
- VITTE, J., BENOLIEL, A. M., EYMERIC, P., BONGRAND, P. & PIERRES, A. (2004). beta-1 integrin-mediated adhesion may be initiated by multiple incomplete bonds, thus accounting for the functional importance of receptor clustering. — *Biophysical Journal* 86, 4059-4074.
- VON ANDRIAN, U. H., CHAMBERS, J. D., MCEVOY, L. M., BARGATZE, R. F., ARFORS, K. E. & BUTCHER, E. C. (1991). 2-Step Model of Leukocyte Endothelial-Cell Interaction in Inflammation - Distinct Roles for Lcam-1 and the Leukocyte Beta-2 Integrins In vivo. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 7538-7542.
- VOSS, E. W. (1993). Kinetic Measurements of Molecular Interactions by Spectrofluorometry. — *Journal of Molecular Recognition* 6, 51-58.
- WEBER, P. C., WENDOLOSKI, J. J., PANTOLIANO, M. W. & SALEMME, F. R. (1992). Crystallographic and Thermodynamic Comparison of Natural and Synthetic Ligands Bound to Streptavidin. — *Journal of the American Chemical Society* 114, 3197-3200.
- WILLIAMS, A. F. (1991). Cellular Interactions - out of Equilibrium. — *Nature* 352, 473-474.
- WILLIAMS, T., NAGARAJAN, S., SELVARAJ, P. & ZHU, C. (2001). Quantifying the Impact of Membrane Microtopology on Effective Two-dimensional Affinity. — *Journal of Biological Chemistry* 276, 13283-13288.

CHAPITRE I

- WILLIAMS, T. E., SELVARAJ, P. & ZHU, C. (2000). Concurrent binding to multiple ligands: Kinetic rates of CD16b for membrane-bound IgG1 and IgG2. — *Biophysical Journal* 79, 1858-1866.
- YAGO, T., WU, J. H., WEY, C. D., KLOPOCKI, A. G., ZHU, C. & MCEVER, R. P. (2004). Catch bonds govern adhesion through L-selectin at threshold shear. — *Journal of Cell Biology* 166, 913-923.
- YUAN, C. B., CHEN, A., KOLB, P. & MOY, V. T. (2000). Energy landscape of streptavidin-biotin complexes measured by atomic force microscopy. — *Biochemistry* 39, 10219-10223.
- ZHANG, F., MARCUS, W. D., GOYAL, N. H., SELVARAJ, P., SPRINGER, T. A. & ZHU, C. (2005). Two-dimensional kinetics regulation of alpha(L)beta(2)-ICAM-1 interaction by conformational changes of the alpha(L)-inserted domain. — *Journal of Biological Chemistry* 280, 42207-42218.
- ZHU, C., LONG, M., CHESLA, S. E. & BONGRAND, P. (2002). Measuring receptor/ligand interaction at the single-bond level: Experimental and interpretative issues. — *Annals of Biomedical Engineering* 30, 305-314.

2- LES PARTICULES MAGNÉTIQUES POUR L'ÉTUDE DE RÉACTIONS LIGAND-RÉCEPTEUR

Dans l'ensemble de cette thèse, nous appellerons « particule magnétique » la sphère superparamagnétique solide de composition complexe, qui sera notre matériau de base. On trouve une grande diversité de particules magnétiques dans diverses applications. Une grande partie de ces applications se rencontre en biologie et en médecine, où différents objets biologiques sont fixés sur les particules magnétiques (Goubault, 2004). Ainsi fixés, ces objets peuvent être purifiés, concentrés, détectés, ou déplacés. Les particules magnétiques sont utilisées, entre autres, pour des tests de diagnostic immunologique, à des fins thérapeutiques (Kim et al., 2002), comme agents de contraste en IRM (Pankhurst et al., 2003), ou encore pour le tri cellulaire. Par ailleurs, les particules magnétiques se rencontrent aussi dans des études fondamentales : par exemple, dans la caractérisation des propriétés mécaniques de molécules biologiques (Allemand et al., 1996; Gosse & Croquette, 2002), ou pour mesurer des interactions colloïdales (Leal-Calderon et al., 1994).

Dans ce travail de thèse, la méthode élaborée pour étudier des réactions ligand-récepteur sur des surfaces en regard repose sur l'utilisation de particules magnétiques. Le chapitre qui s'ouvre ici vise à présenter les propriétés de ces particules, tant magnétiques que physico-chimiques, et dont la connaissance est essentielle pour notre étude. Les applications des particules magnétiques, dont découle notre approche expérimentale, et les outils empruntés au cours de ce travail de thèse, sont également introduits ici. Enfin, la chimie développée sur les particules magnétiques pour l'étude de réactions ligand-récepteur est aussi abordée dans ce chapitre.

2-1- Particules magnétiques : propriétés

Les particules magnétiques utilisées tout au long de ces travaux de thèse sont distribuées par la société *Ademtech*. Elles ont été choisies, avant tout, pour leurs propriétés magnétiques : leur

caractère *superparamagnétique* est fondamental pour l'ensemble des études de cette thèse. Nous verrons également que la taille, autour de 100 nm de rayon, a été un critère important dans le choix de ces particules.

2-1-1- Particules superparamagnétiques : de leur composition à leurs propriétés magnétiques

Ces particules sont appelées *superparamagnétiques* car elles acquièrent une aimantation uniquement en présence d'un champ magnétique extérieur, d'où le terme de *paramagnétique*, et car, pour un champ donné, cette aimantation est beaucoup plus grande que celle d'un matériau paramagnétique classique, d'où le préfixe *super*. Autrement dit, ces particules répondent à un champ magnétique avec une susceptibilité magnétique, χ , proche de 1, ce qui est à comparer à la valeur des corps les plus paramagnétiques, soit $\chi \approx 10^{-3}$ pour le $\text{Ho}(\text{No}_3)_3$.

C'est de leur constitution, et donc de leur fabrication, que proviennent ces propriétés magnétiques. En effet, ces particules sont des matériaux composites. Elles sont constituées d'une matrice complexe contenant des grains d'oxyde de Fer, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghémite). Ces grains étant des monodomaines d'un matériau ferrimagnétique, ils portent un moment magnétique permanent orienté suivant un axe principal d'aimantation facile. En l'absence de champ magnétique, les moments magnétiques de ces grains sont orientés de manière aléatoire au sein de la particule, et aucun moment global n'apparaît au niveau de la particule. Les particules sont alors soumises au mouvement brownien. Sous l'action d'un champ magnétique extérieur, tous les moments magnétiques des grains s'alignent dans la direction du champ, conférant à la particule un moment dipolaire magnétique global (figure 2-1).

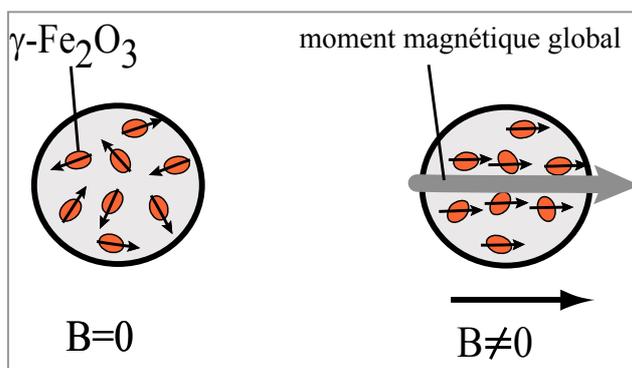


Figure-2-1 : Particules superparamagnétiques répondant à un champ magnétique. Avec l'application du champ magnétique B , il apparaît un moment magnétique au niveau de la particule (flèche grise).

CHAPITRE II

Les interactions dipolaires magnétiques sont anisotropes : dans la direction du champ, les interactions sont attractives, et perpendiculairement au champ, elles sont répulsives. Ainsi, pour minimiser l'énergie magnétique totale du système, les particules s'auto-organisent sous forme de chaînes dans la direction du champ magnétique extérieur (figure 2-2).

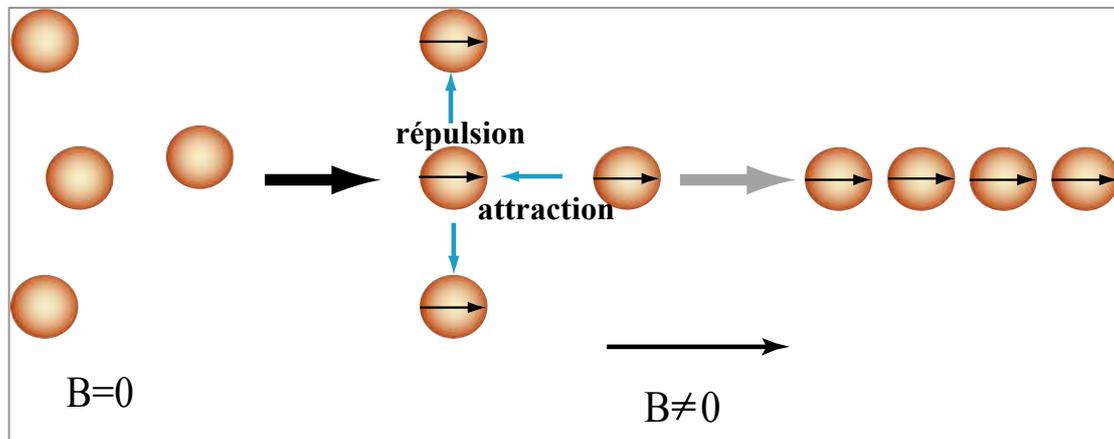


Figure-2-2 : Auto-organisation des particules superparamagnétiques sous champ.

Après interruption du champ magnétique, les moments magnétiques des grains retrouvent une orientation aléatoire, les particules perdent donc leur moment magnétique global et se redispersent.

2-1-2- Particules superparamagnétiques : fabrication

Ces particules magnétiques sont fabriquées à partir de l'émulsification d'un ferrofluide organique dans une phase aqueuse (Bibette, 1993). Le ferrofluide utilisé est une dispersion dans l'octane de grains de maghémite monodomaines, légèrement anisotropes, très polydisperses, de 10 à 20 nm de diamètre, et stabilisés par de l'acide oléique en excès (Montagne et al., 2002). L'émulsification est réalisée en appliquant un cisaillement contrôlé pour obtenir des gouttelettes de ferrofluide de taille calibrée (Mason & Bibette, 1996). Puis, l'émulsion subit un traitement thermique, à l'issue duquel la totalité de l'octane des gouttelettes est évaporée, mais au cours duquel l'acide oléique n'est pas évaporé. Ce traitement thermique se fait en l'absence de champ magnétique, les grains sont ainsi concentrés dans des orientations aléatoires et décorréliées. Après cette série d'étapes, des particules *solides* et *superparamagnétiques* sont récupérées.

CHAPITRE II

Les particules ainsi obtenues peuvent ensuite être recouvertes d'une couche de polymère. Cette couche de polymère peut améliorer la stabilité des particules, en apportant une contribution stérique aux répulsions colloïdales. Elle peut permettre également de fonctionnaliser les particules grâce à des couplages via des fonctions réactives du polymère. Dans notre cas, les particules sont enrobées d'une couche de polymère, composée de polystyrène, de PolyNipam et d'acide polyacrylique, dans des proportions non communiquées par le fournisseur. D'après les images de microscopie électronique à transmission (TEM) (figure-2-3), cette couche de polymère est relativement épaisse, allant de 10 à 20 nm d'épaisseur. Cette couche peut être considérée comme une couche dense de polymère réticulé avec, à la périphérie de cette couche dense, des chaînes de polymère diluées et étendues dans la solution.

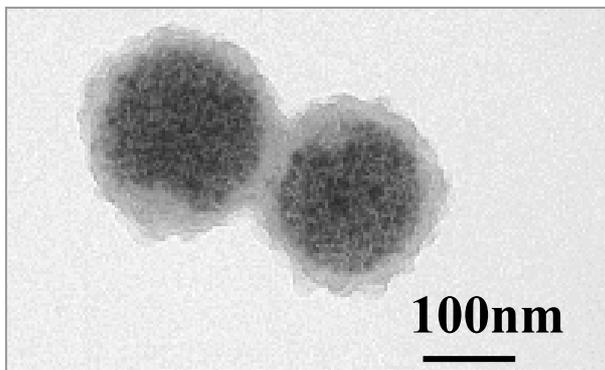


Figure-2-3 : Cliché de microscopie électronique à transmission réalisé au service de microscopie électronique de Paris 6.

Dans la suite, c'est principalement ces particules polymérisées que nous considérerons. Cependant les particules non polymérisées seront parfois employées pour vérifier que nos résultats sont indépendants de l'état de surface des particules. Pour chaque type de particules, le fournisseur donne la densité des particules, ce qui permet de connaître la quantité d'oxyde de fer, d'acide oléique ou de polymère contenue dans une particule. Pour un mélange de deux milieux, notés 1 et 2, la fraction volumique en 1, ϕ_{V1} , est donnée par :

$$\frac{1}{\phi_{V1}} = \frac{d_1 - d_2}{d_{mel} - d_2} \quad (2-1)$$

avec d_1 la densité du milieu 1, d_2 la densité du milieu 2 et d_{mel} la densité du mélange (ou de la particule). La composition de chaque type de particule est donnée en table-2-1.

CHAPITRE II

Particules	Densité (donnée du fournisseur)	Oxyde de fer ($d \approx 5.1$)		Acide oléique ($d \approx 0.9$)		Polymère ($d \approx 1$)	
		Fraction volumique	Fraction massique	Fraction volumique	Fraction massique	Fraction volumique	Fraction massique
Non polymérisées	2.35	34.5%	75%	65.5%	25%		
Polymérisées	1.77	19.7%	56.8%	37.3%	19%	43%	24.2%

Table-2-1 : Composition des particules polymérisées et non polymérisées. D'après les données du fournisseur (densité des particules) et de la densité des milieux, les fractions volumiques et massiques en chacun des milieux sont calculées (2-1).

En ce qui concerne les particules polymérisées, au vu des clichés de TEM, l'oxyde de fer semble n'être concentré que dans un cœur magnétique qui a une constitution très proche de celle des particules non polymérisées. En émettant cette hypothèse, pour des particules polymérisées ayant un rayon total (cœur magnétique + couche de polymère) de 100 nm, l'épaisseur de la couche de polymère est estimée à 18 nm. Ceci est, là encore, cohérent avec l'observation des clichés de TEM (figure-2-3).

A l'issue de ces étapes de fabrication, il est souvent nécessaire de trier les particules afin d'affiner leur distribution en taille. Ce tri exploite les propriétés magnétiques des particules pour les séparer suivant leur taille. En effet, les particules sont triées suivant leur moment magnétique qui est proportionnel à leur volume. Ce tri repose sur une sédimentation magnétique fractionnée. Pour cela, on applique à la suspension de particules, un champ magnétique B , d'intensité « intermédiaire », c'est-à-dire pour laquelle les particules les plus petites ne participent aux chaînes, leur moment magnétique étant trop faible. En effet, le moment magnétique, qui intervient au carré dans l'amplitude des interactions dipolaires, est proportionnel à l'intensité du champ magnétique et au volume de la particule (§-2-2-1-b relation (2-22)). Ainsi, seules les particules les plus grosses forment des chaînes. Pour un échantillon assez concentré en particules, de 1 à 3%, ces chaînes s'agrègent latéralement et forment ainsi des « colonnes ». Ce sont ces colonnes qui sédimentent. Cette sédimentation sépare donc l'échantillon en une phase inférieure concentrée (phase S), contenant les plus grosses particules et une phase supérieure diluée (phase L), comportant les particules les plus petites. Dans certains cas, une interface entre ces deux phases est clairement visible. Une fois séparées, les deux phases peuvent être soumises à une ou plusieurs autres étapes de tri, avec des intensités de champ magnétique ajustées. Le nombre d'étapes de tri est à ajuster en faisant un compromis entre finesse de la distribution en taille et quantité de particules triées.

A titre d'exemple, un échantillon, appelé « LSL » et que nous considérerons dans la suite du chapitre, a subi trois étapes de tri. Une première phase diluée L est extraite après 30 min à 11 mT. Puis, cette phase est soumise à une étape d'une heure à 28 mT, et cette fois la phase S est récupérée. Enfin, lors d'une dernière étape de 30 min à 15 mT, la phase L est récupérée (figure-2-4).

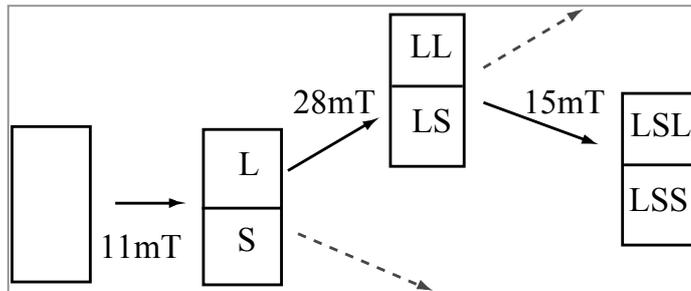


Figure-2-4 : Illustration d'un tri magnétique

2-1-3- Taille des particules

Après les étapes successives de tri, la taille des particules est caractérisée par différentes méthodes, à savoir par diffusion dynamique de la lumière et par centrifugation sur gradient de sucrose.

2-1-3-a- Par diffusion dynamique de la lumière

La suspension de particules magnétiques, à une fraction massique de 10^{-4} % en masse, est éclairée par un laser, et la lumière qu'elle diffuse est détectée à un angle $\theta=90^\circ$ par rapport au faisceau incident. Cette mesure est réalisée avec un spectromètre *Malvern CGS-3*. L'intensité diffusée $I(t)$ est mesurée sur quelques minutes, ce qui permet de déterminer la fonction d'autocorrélation $g_2(t)$, qui a l'expression suivante :

$$g_2(t) = \frac{\langle I(t')I(t+t') \rangle_{t'}}{\langle I(t') \rangle_{t'}^2} \quad (2-2)$$

Pour une suspension de particules sphériques et monodisperses, la fonction d'autocorrélation décroît exponentiellement suivant :

$$g_2(t) \propto e^{-Dq^2t} \quad (2-3)$$

avec q le vecteur d'onde diffusé qui s'écrit :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2-4)$$

où n est l'indice du milieu, λ la longueur d'onde du laser soit 634.8 nm. Le coefficient de diffusion des particules, D , qui apparaît dans cette expression est le paramètre qui est déterminé au cours d'une expérience de diffusion dynamique de la lumière. D est directement relié au rayon hydrodynamique des particules, r_H , par la relation de Stokes-Einstein :

$$r_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (2-5)$$

k étant la constante de Boltzmann, T la température absolue et η la viscosité du milieu. De la mesure de D , on en déduit le rayon hydrodynamique r_H .

Ce rayon hydrodynamique tient compte de la couche de polymère mais aussi des chaînes de polymère qui s'étendent dans la solution. Connaître la valeur du rayon hydrodynamique renseigne sur l'extension des chaînes de polymère. A titre d'exemple, pour l'échantillon LSL, un rayon hydrodynamique de 105 nm est mesuré.

2-1-3-b- Par centrifugation sur gradient de sucrose

La centrifugation à disque est une autre technique pour mesurer des tailles de particule. Cette technique permet de séparer des objets soumis à une force centrifuge suivant leur vitesse de migration. Cette vitesse V dépend de la taille et de la densité des objets : connaissant la densité, la taille est déterminée, ou inversement. La centrifugeuse est constituée d'un disque creux et transparent qui tourne à vitesse constante, jusqu'à 18 000 tr.min⁻¹. Le disque est rempli d'une solution de sucrose. Les particules sont injectées au centre du disque puis migrent vers l'extérieur sous l'effet de la force centrifuge. Un faisceau laser traverse le disque à l'extérieur et permet de mesurer l'absorbance de la solution à ce niveau et ainsi de détecter le passage des particules. Suivre l'absorbance en fonction du temps t après injection de l'échantillon permet de reconstruire la distribution en taille des particules, car l'équilibre entre la force visqueuse et la force centrifuge s'écrit :

$$6\pi\eta r V = \frac{\pi}{6} (2r)^3 (\rho_{part} - \rho_{milieu}) g \quad (2-6)$$

où apparaissent la vitesse des particules V , leur rayon r , leur densité ρ_{part} , la densité ρ_{milieu} et la viscosité η du milieu, g la constante de pesanteur. Ainsi, le temps de sortie t , déduit de la vitesse de migration, est directement lié à r par :

$$t \propto \frac{1}{(2r)^2(\rho_{part} - \rho_{milieu})} \quad (2-7)$$

Le fournisseur *Ademtech* spécifie la densité des particules, qui, pour les particules polymérisées, correspond à la somme « cœur magnétique et couche dense de polymère ». La figure-2-5 montre les distributions mesurées avec cette méthode, dans le cas d'un échantillon de particules non triées et dans le cas de l'échantillon LSL, ayant subi 3 étapes de tri.

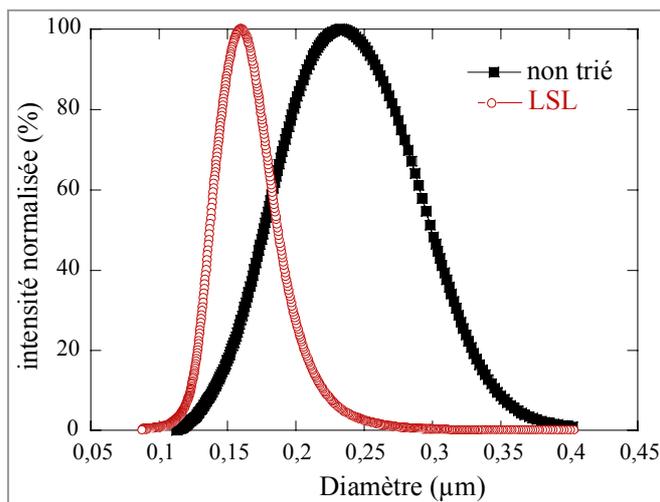


Figure-2-5 : Exemple de distributions de taille pour des particules polymérisées, avant et après trois étapes de tri (LSL). Distributions obtenues avec une centrifugeuse à disque CPS.

Pour l'échantillon LSL, un rayon de 80 nm est mesuré. Il faut être prudent avec cette détermination du rayon car elle est très sensible à la densité des particules. Ce rayon est notablement plus petit que le rayon hydrodynamique déterminé en diffusion de la lumière, ce dernier tient compte des chaînes de polymères qui s'étendent dans la solution. La cohérence entre ces deux méthodes est néanmoins réelle dans la mesure où, pour des particules non polymérisées, on obtient deux rayons identiques.

La figure-2-6 illustre la structure des particules magnétiques polymérisées. Nous verrons par la suite un autre moyen d'évaluer la taille moyenne des particules.

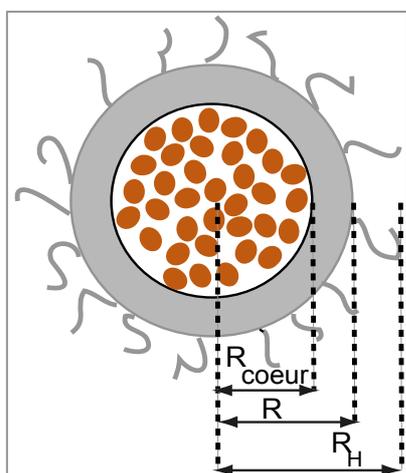


Figure-2-6 : Particule magnétique polymérisée. Définition des différents rayons de la particule : rayon du cœur magnétique $R_{\text{cœur}}$ (déduit des clichés de TEM), rayon du cœur magnétique avec la couche dense de polymère R (mesuré en CPS), et rayon hydrodynamique R_H (mesuré en diffusion dynamique de la lumière). Pour des particules non-polymérisées les trois rayons sont identiques.

2-1-4- Susceptibilité magnétique statique

Il est fondamental de connaître la valeur de la susceptibilité magnétique des particules car elle intervient dans l'amplitude des interactions magnétiques. Connaissant la composition des particules en grains de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, la susceptibilité magnétique est déterminée en caractérisant les grains de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, autrement dit en caractérisant le ferrofluide initial. Pour cela, un échantillon de ferrofluide a été analysé à l'aide d'un magnétomètre SQUID (*superconducting quantum interface device*) en collaboration avec P. Monod au *Laboratoire de Physique du Solide* à l'ESPCI. L'échantillon à étudier est déplacé dans un champ magnétique, créé par des bobines supraconductrices. La variation du moment magnétique qui en résulte est mesurée via la variation d'intensité qu'elle induit dans les bobines. Le moment total de l'échantillon en est alors déduit et ce pour différentes valeurs de champ magnétique, allant de 0 à 5 T. L'allure de l'aimantation de l'oxyde de fer $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $M_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3}$, sous forme de grains mono-domaine a été déterminée grâce à la mesure d'un échantillon de 20 μL de ferrofluide à 14.4% en masse, soit une masse de 2.9 mg ou un volume de $5.8 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3$ d'oxyde de fer $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Le moment total mesuré en *emu* (*electromagnetic unit* = 10^{-3} A.m^2) peut être rapporté à une aimantation, c'est-à-dire à un moment par unité de volume. L'évolution de l'aimantation en fonction du champ magnétique B est ainsi obtenue (figure-2-7). On se concentre sur une fenêtre de champ entre 0 et 100 mT, gamme de champ utilisée par la suite.

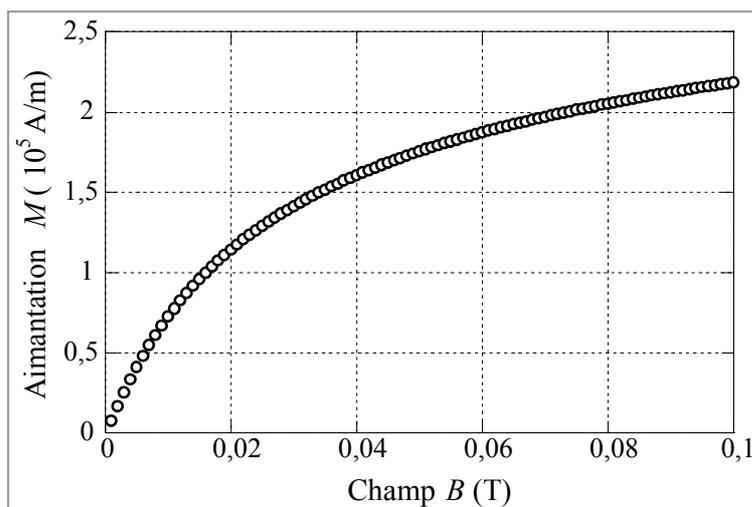


Figure-2-7 : Courbe d'aimantation de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, réalisée à partir d'expériences de SQUID sur le ferrofluide initial fourni par Ademtech.

CHAPITRE II

De la valeur de cette aimantation et connaissant les fractions volumiques de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ $\phi_{vol,\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3}$ dans les particules (table-2-1), la susceptibilité χ_{mat} du matériau constituant les particules peut être déduite, en considérant :

$$\chi_{mat} = \frac{M_{mat}}{H} = \frac{\phi_{vol,\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3} \cdot M_{\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3}}{H} \quad (2-8)$$

avec M_{mat} , l'aimantation du matériau contenu dans les particules et H , l'excitation magnétique ($B = \mu_0 H$).

Enfin, pour conclure sur la susceptibilité des particules χ_{part} , il faut tenir compte de leur sphéricité via la relation (Leal Calderon et al., 1994) :

$$\chi_{part} = \frac{\chi_{mat}}{1 + \frac{\chi_{mat}}{3}} \quad (2-9)$$

Pour les deux types de particules, les susceptibilités sont ainsi déterminées et données en figure-2-8.

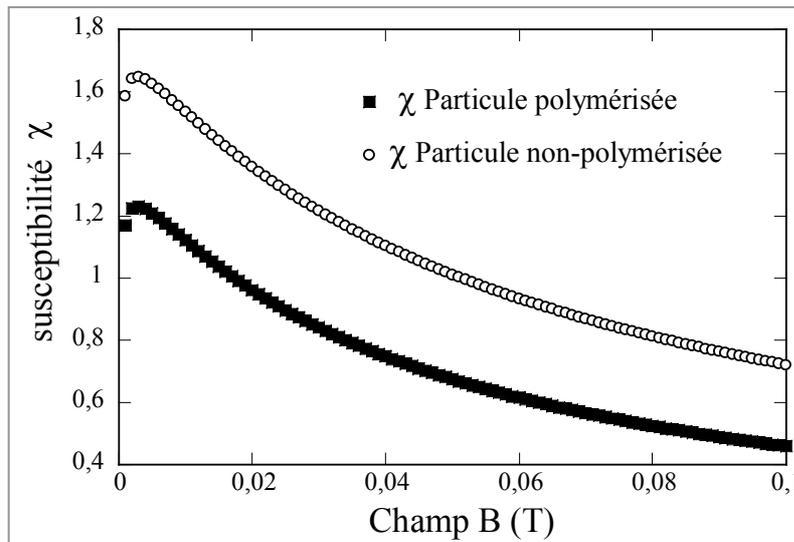


Figure-2-8 : Susceptibilité magnétique des particules polymérisées et non polymérisées, déduites de la Figure 2-7 avec comme fractions volumiques $\phi_{poi}=18.8\%$ et $\phi_{nonpoi}=34.5\%$.

2-1-5- Susceptibilité magnétique dynamique

La détermination de la susceptibilité magnétique dynamique $\chi(\omega)$ d'un fluide magnétique, en réponse à un champ oscillant, renseigne sur la dynamique des particules magnétiques qui le composent et sur leurs propriétés magnétiques intrinsèques. La susceptibilité magnétique se décompose en une composante parallèle $\chi_{||}$ et une composante perpendiculaire χ_{\perp} au champ

CHAPITRE II

oscillant. La composante χ_{\parallel} est reliée, à basse fréquence, aux phénomènes de relaxation. Sa mesure constitue un outil pertinent pour identifier les mécanismes de relaxation des moments magnétiques d'une assemblée de particules. La composante χ_{\perp} est reliée aux phénomènes de résonance magnétique, qui ont lieu à haute fréquence. Sa mesure permet de caractériser des propriétés magnétiques intrinsèques des particules. Pour mesurer une susceptibilité magnétique dynamique, le fluide magnétique est généralement introduit dans une bobine, d'inductance L et de résistance R , parcourue par un courant électrique alternatif, qui crée le champ magnétique oscillant. Les variations ΔL et ΔR , paramètres directement reliés à $\chi(\omega)$, sont alors mesurées.

L'étude de la susceptibilité dynamique est conduite sur nos particules pour comprendre certaines propriétés dynamiques, qui seront utiles pendant la description de notre méthode d'étude de réactions ligand-récepteur. Pour mener cette étude, nous avons collaboré avec Paul Fannin, au « *Department of Electronic and Electrical Engineering* » du *Trinity College* à Dublin. Pour mesurer des susceptibilités dynamiques, P. Fannin a mis au point la « toroidal technique » (Fannin et al., 1986) pour les études à basses fréquences, entre 100 Hz et 1 MHz, et la « short-circuit transmission line technique » (Fannin et al., 1995) pour les mesures à hautes fréquences, entre 100 MHz et 6GHz. Une suspension de particules polymérisées et une suspension de particules non-polymérisées ont fait l'objet d'une étude à basse fréquence. Le ferrofluide initial a été caractérisé à haute fréquence (annexe-A).

Relaxation magnétique

Deux mécanismes de relaxation du moment magnétique sont envisageables. D'une part, le moment peut relaxer **au sein** de la particule via **une relaxation de Néel** (Néel, 1949). D'autre part, il peut relaxer avec la particule, c'est-à-dire que le moment relaxe grâce **au mouvement brownien de la particule**. Cette dernière relaxation est dite **brownienne** (Brown, 1979).

Nous nous attachons ici à identifier le mécanisme prépondérant de relaxation de nos particules magnétiques parmi ceux qui sont envisageables, à savoir : la relaxation brownienne des particules, la relaxation de Néel des grains de maghémite, ou la relaxation brownienne des grains. La relaxation brownienne des grains est peu probable car les grains, anisotropes et très concentrés, sont encombrés dans la particule, voire au « close packing ». Notons aussi que la relaxation de Néel pour des particules superparamagnétiques n'a pas vraiment de sens, car elles n'ont pas de moment permanent.

CHAPITRE II

A chaque mécanisme de relaxation est associé un temps caractéristique (Fannin, 1998). Le temps de relaxation brownienne, τ_B , est défini par :

$$\tau_B = \frac{4\pi r_H^3 \eta}{kT} \quad (2-10)$$

où r_H est le rayon hydrodynamique de l'objet soumis au mouvement brownien, η la viscosité du milieu, T la température absolue et k la constante de Boltzmann.

Dans le cas de la relaxation de Néel, le moment magnétique bascule au sein de la particule en franchissant une barrière énergétique ΔE , qui dans le cas d'une particule anisotrope uniaxiale est donnée par Kv , où K est la constante d'anisotropie de la particule et v son volume. Le temps associé à ce phénomène est estimé à :

$$\tau_N = \tau_0 \exp(Kv/kT) \quad (2-11)$$

avec τ_0 valant approximativement 10^{-9} s (Kneller & Wohlfarth, 1966).

De façon globale, une assemblée de particules relaxe suivant un temps effectif τ_{eff} donné par :

$$\tau_{eff} = \frac{\tau_N \tau_B}{\tau_B + \tau_N} \quad (2-12)$$

A titre d'illustration, on retrouve ce temps effectif quand on suit l'aimantation $M(t)$ (initialement M_0) d'une assemblée de particules après interruption d'un champ magnétique extérieur (Tronc & Fiorani, 2002), avec :

$$M(t) = M_0 \exp(-t/\tau_{eff}) \quad (2-13)$$

Si les deux mécanismes de relaxation ont des temps caractéristiques très différents, c'est le mécanisme le plus rapide qui impose le temps effectif de relaxation. Le temps de Néel croît beaucoup plus vite avec la taille des particules que le temps brownien. Pour la plupart des matériaux et pour une viscosité proche de l'eau, le temps brownien impose le temps de relaxation à partir d'un rayon d'environ 5 nm (Fannin, 1998).

Propriété dynamique : mesure de $\chi_{||}$ à basses fréquences (100Hz-1MHz)

En mesurant la susceptibilité magnétique dynamique $\chi_{||}(\omega)$, nous déterminons le temps effectif de relaxation, et nous en déduisons le processus qui l'impose.

La susceptibilité magnétique dynamique s'écrit :

$$\chi_{||}(\omega) = \chi'(\omega) - i\chi''(\omega) \quad (2-14)$$

CHAPITRE II

$\chi'(\omega)$ est la réponse en phase avec le champ appliqué, $\chi''(\omega)$ la réponse en quadrature de phase et ω est la pulsation d'excitation du champ magnétique. A basse fréquence, la susceptibilité tend vers sa valeur χ_0 en champ statique. Selon la théorie de Debye (Debye, 1929), la susceptibilité dépend de la pulsation d'excitation selon l'expression suivante :

$$\chi_{\parallel}(\omega) - \chi_{\infty} = \frac{(\chi_0 - \chi_{\infty})}{(1 + i\omega\tau_{eff})} = \frac{\chi_0 - \chi_{\infty}}{1 + \omega^2\tau_{eff}^2} - i \frac{\omega\tau_{eff}(\chi_0 - \chi_{\infty})}{1 + \omega^2\tau_{eff}^2} \quad (2-15)$$

Les tendances théoriques pour $\chi'(\omega)$ et $\chi''(\omega)$ sont données en figure 2-9. La composante réelle $\chi'(\omega)$ décroît de façon monotone alors que la composante imaginaire $\chi''(\omega)$ passe par un maximum en ω_{max} qui dépend du temps effectif de relaxation :

$$\omega_{max} = 2\pi f_{max} = \frac{1}{\tau_{eff}} \quad (2-16)$$

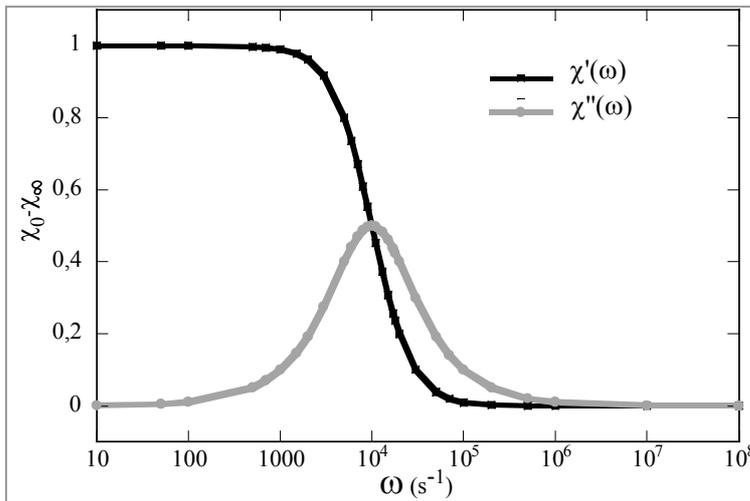


Figure-2-9 : Allure des spectres attendus (pour $\chi_0 = 1$ et $\chi_{\infty} = 0$).

Pour le dispositif expérimental de la « toroidal technique », un champ magnétique alternatif est créé dans un tore métallique, de haute perméabilité, par un bobinage de fils traversés par un courant électrique alternatif (figure-2-10) (Fannin et al., 1986). Ce tore est fendu sur une fine épaisseur pour y placer le fluide magnétique. L'inductance L et la résistance R du tore sont mesurées, avant et après introduction de l'échantillon, en fonction de la fréquence du champ magnétique. Le rapport $\Delta L/L$ est proportionnel à $\chi'(\omega)$ et $\Delta R\omega L$ à $\chi''(\omega)$. Un champ permanent, appelé « polarisant », peut être ajouté au dispositif expérimental pour étudier son influence sur le temps de relaxation.

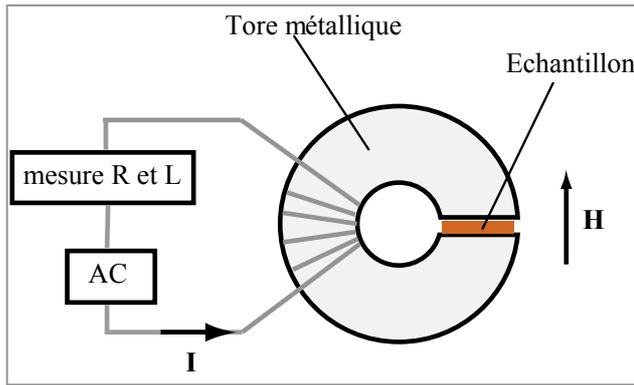


Figure-2-10 : Dispositif expérimental de la « toroïdal technique ».

Les suspensions de particules magnétiques ont été étudiées avec cette méthode. Deux phases continues ont été utilisées successivement : de l'eau puis du glycérol, pour étudier l'influence de la viscosité du milieu sur le temps de relaxation mesuré, sachant que l'eau a une viscosité de 1 mPa.s et le glycérol une viscosité mille fois supérieure.

Les spectres obtenus pour $\chi'(\omega)$ et $\chi''(\omega)$ sont donnés en figure-2-11 dans le cas de l'eau. $\chi''(\omega)$ passe par un maximum pour une fréquence f_{max} qui varie entre 1 kHz et 1.9 kHz, pour des champs polarisants de 2 mT à 17 mT. Pour l'échantillon dispersé dans le glycérol, la fréquence f_{max} varie entre 0.9 kHz et 2 kHz, ce qui est sensiblement la même chose. Enfin, pour des particules non polymérisées, les mêmes fréquences sont mesurées. Cette gamme de fréquences correspond à des temps effectifs de relaxation compris entre 0.08 ms et 0.16 ms (relation (2-16)).

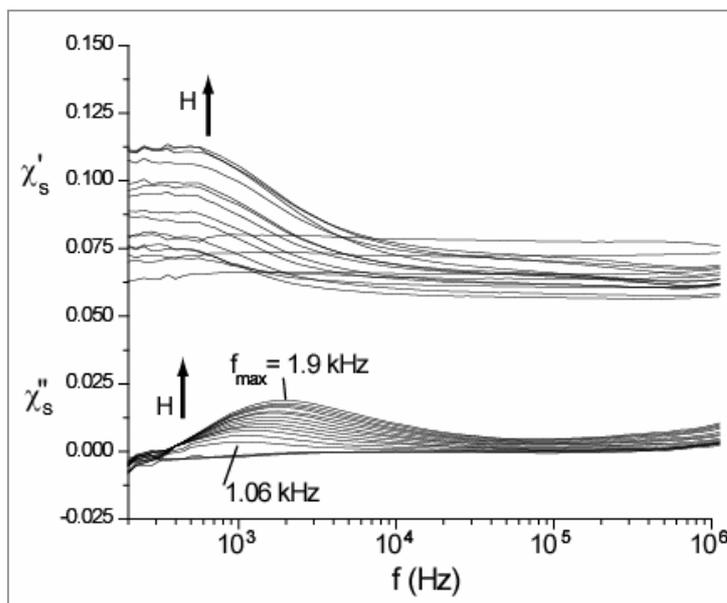


Figure-2-11 : Spectre en fréquence pour la susceptibilité magnétique dynamique, partie réelle et partie imaginaire, obtenues avec la « toroïdal technique » sur un échantillon de particules magnétiques polymérisées dispersées dans l'eau (à 3% en masse) (Fannin et al., 2006).

CHAPITRE II

Dynamique des particules sous champ

Il s'agit, désormais, d'interpréter les résultats précédents pour identifier le mécanisme de relaxation de nos particules.

Récapitulons les temps de relaxation que l'on pourrait attendre, d'après la composition de notre système et d'après les tailles caractéristiques (table-2-2). La valeur de la constante d'anisotropie K de la maghémite est mesurée par résonance magnétique, dont la méthode est détaillée en annexe-A. Elle est évaluée à 10^4 J.m^{-3} , ce qui est comparable aux valeurs trouvées dans la littérature (Tronc et al., 2000).

Relaxation brownienne des particules $r = 100\text{nm}$		Relaxation brownienne des grains $r = 10\text{nm}$		Relaxation de Néel des grains $K = 10^4 \text{ J/m}^3$		Mesures	
temps (ms)	f_{max}	temps (ms)	f_{max}	temps (ms)	f_{max}	temps (ms)	f_{max}
3ms	50 Hz	$3 \cdot 10^{-3}$ ms	50 kHz	0.04 ms	4kHz	0.08-0.16	1-2kHz

Table-2-2 : Temps caractéristiques des différentes relaxations envisageables.

Les mesures à des viscosités significativement différentes (d'un facteur 1000) permettent d'affirmer que la relaxation brownienne des particules n'intervient pas dans notre système. En effet, le temps caractéristique de la relaxation brownienne, explicité en (2-10), est directement proportionnel à la viscosité du milieu. Or pour des viscosités différentes de 3 ordres de grandeur, le même temps de relaxation est mesuré. Ceci exclu donc le processus de relaxation brownienne des particules. Le temps mesuré est d'ailleurs beaucoup plus petit que le temps attendu pour une relaxation brownienne (table-2-2). D'autre part, la relaxation brownienne des grains au sein des particules est difficilement envisageable. Comme nous l'avons déjà évoqué, les grains étant anisotropes et très concentrés (35% en volume), leur relaxation brownienne est probablement très ralentie, voire rendue impossible (Bertrand et al., 2002). Le mécanisme de relaxation le plus convaincant est donc la relaxation de Néel des grains (table 2-2). Le temps mesuré correspond à un temps de relaxation de Néel de grains de 12 nm de rayon. En outre, les mesures sur des particules non-polymérisées, dont la seule similitude avec les particules polymérisées est la présence des grains de maghémite de même nature, donnent, une fois de plus, la même gamme de temps de relaxation. Cette mesure confirme que l'on est sensible ici à un temps caractéristique relié aux grains de maghémite. *Les particules voient donc leur moment magnétique relaxer via un processus interne relié aux grains de maghémite.* Tout se passe comme si la particule relaxait suivant un processus de type Néel à l'échelle de la particule, c'est-à-dire que la particule présenterait une constante

d'anisotropie K_{part} , que l'on peut déduire du temps de relaxation caractéristique mesuré précédemment, en l'injectant dans l'équation (2-11) avec V le volume de la particule. Ainsi, la constante d'anisotropie K_{part} est estimée à 11 J/m^3 , ce qui est très faible.

La conclusion selon laquelle les particules ne relaxent pas par mouvement brownien global mais par une relaxation « au sein » de la particule s'avère cruciale. Elle permet de comprendre comment les particules réagissent en présence d'un champ magnétique. La figure-2-12 schématise la réponse des particules à l'application d'un champ magnétique et à une fluctuation globale de la particule.

Comme le montre la figure-2-12, *particule magnétique et moment magnétique global de la particule sont décorrélés*. En effet, d'après les études précédentes, les moments des grains basculent plus vite que la particule elle-même. Ainsi, c'est par le basculement des moments des grains que le moment global suit la direction du champ magnétique, après fluctuation de rotation de la particule. Le moment magnétique global n'est donc pas bloqué suivant une direction dans la particule. Autrement dit, d'un point de vue phénoménologique, « les états d'orientation » successifs de la particule (avant et après les parenthèses sur la figure-2-12) ont tous le même niveau énergétique. Tous les états d'orientation de la particule sous champ magnétique sont donc équivalents. La particule est donc libre de tourner sous l'effet de l'agitation thermique, même en présence d'un champ magnétique.

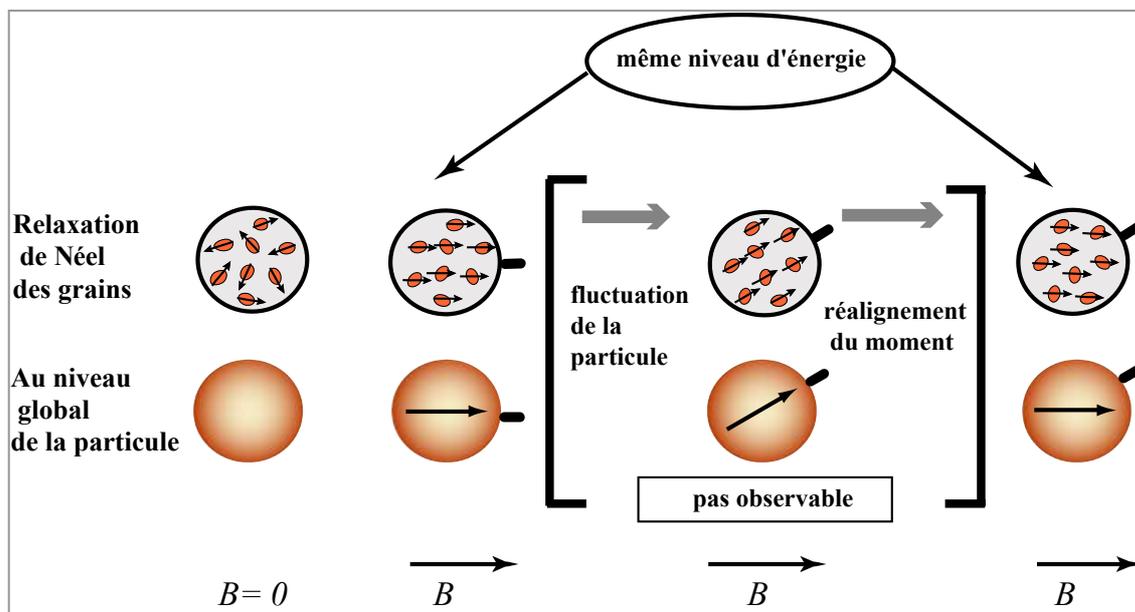


Figure-2-12 : Relaxation du moment magnétique après une fluctuation de la particule

Cette libre rotation brownienne des particules sous champ magnétique sera mise à profit au chapitre 3, lors de l'interprétation de nos résultats expérimentaux.

2-2- Particules magnétiques : application à l'étude des interactions colloïdales

Au cours de ces dernières années, deux outils, destinés à l'étude des interactions colloïdales, ont été élaborés à partir de ces particules magnétiques : « la machine de force », qui sonde les forces répulsives s'exerçant entre particules colloïdales, et le suivi de cinétique d'adhésion sous champ, qui permet de caractériser la cinétique d'adhésion entre surfaces colloïdales. Le premier outil est devenu, au laboratoire, une technique de « routine », que nous avons exploitée au cours de ce travail. Le second est à l'origine de la méthode de mesure de constantes cinétiques d'association entre réactifs situés sur des surfaces en regard, qui sera présentée au chapitre 3.

2-2-1- La « machine de force » (*Magnetic Chaining Technique*)

2-2-1-a- Principe

La machine de force a été mise au point par Leal-Calderon *et al.* en 1994 (Leal Calderon *et al.*, 1994). Elle repose sur les propriétés superparamagnétiques des particules et plus précisément sur les caractéristiques des chaînes qu'elles forment sous champ. En effet, dès l'application d'un champ magnétique, les particules s'organisent sous forme de chaînes au sein desquelles elles sont régulièrement espacées, d'une distance centre à centre d . Cette organisation résulte d'un équilibre entre forces colloïdales répulsives et forces colloïdales attractives. Les forces répulsives comprennent les forces électrostatiques, si les particules sont chargées, et/ou les forces stériques si les particules sont recouvertes de polymères. La force magnétique est la principale contribution aux forces attractives. Elle dépend de l'intensité du champ magnétique B , des caractéristiques des particules et de la distance d . L'autre composante attractive est la force de van der Waals, interaction attractive qui intervient toujours entre deux objets colloïdaux de même composition. Ces deux composantes peuvent être calculées connaissant les propriétés des particules et la distance d (le calcul est donné un peu plus loin). De l'équilibre mécanique, on déduit l'amplitude des forces répulsives pour la distance d puisque :

$$F^{att}(d) = F_{magn}^{att}(d) + F_{vdW}^{att}(d) = F^{rep}(d) \quad (2-17)$$

CHAPITRE II

Si l'intensité du champ magnétique augmente, la force attractive augmente, un nouvel équilibre est atteint, où d est plus petit. A chaque valeur de B , si on mesure d , on peut alors calculer $F^{att}(d)$ et en déduire $F^{rep}(d)$. On reconstruit ainsi le profil des forces répulsives entre particules en fonction de d . La principale difficulté réside dans la détermination expérimentale de la distance d . C'est grâce aux propriétés optiques des chaînes de particules que cette distance peut être mesurée. L'origine de cette méthode réside dans l'observation des suspensions magnétiques qui changent de couleur avec l'intensité du champ appliqué. En effet, les chaînes de particules régulièrement espacées créent un réseau qui diffracte la lumière, ce qui est illustré par la figure-2-13. La longueur d'onde diffractée λ vérifie la condition de Bragg :

$$d = \frac{k\lambda}{n(1 + \cos \theta)} \quad (2-18)$$

où k est un entier positif, n est l'indice du milieu et θ l'angle entre la direction de la lumière incidente et la direction de la lumière diffractée (figure-2-13). Ainsi, un détecteur, relié à un analyseur de spectre, est placé à un angle θ précis. La longueur d'onde diffractée à l'angle θ est déterminée et la distance d entre particules en est déduite. Pour des particules de 200 nm de diamètre, pour des angles proche de 0° , la longueur d'onde diffractée est dans le visible.

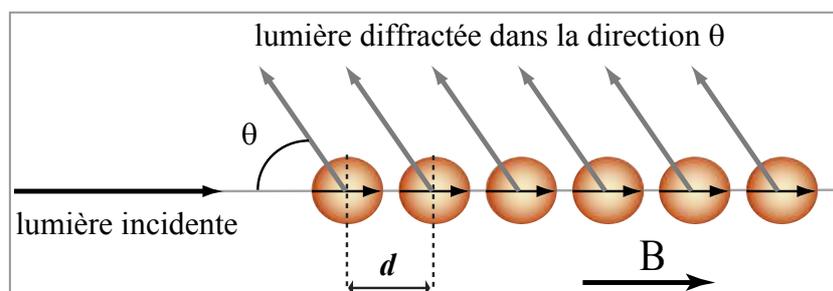


Figure-2-13 : Les particules organisées sous chaînes dans la direction du champ diffractent la lumière.

Cette technique a permis de vérifier expérimentalement la théorie DLVO sur des particules chargées par un tensioactif ionique (Leal Calderon et al., 1994), grâce à la construction de profils de force répulsive d'origine électrostatique. Elle a également abouti à la compréhension de la répulsion induite par des polymères adsorbés (Mondain Monval et al., 1998). Il a été montré que cette interaction suit une loi exponentielle décroissante avec une portée proportionnelle au rayon de giration du polymère. Enfin, plus récemment, la machine de force a permis de sonder les propriétés mécaniques de molécule d'ADN reliant les particules magnétiques (Koenig et al., 2005).

CHAPITRE II

2-2-1-b- Calcul des forces attractives

La force magnétique a été modélisée par Zhang et Widom (Zhang & Widom, 1995) pour des particules espacées de d dans une chaîne infinie et connaissant le champ extérieur appliqué B_e . Au niveau d'une particule dans une chaîne, il faut distinguer champ extérieur et champ local, qui résulte de la présence des autres particules. Chaque particule ressent donc un champ total B_T qui est la somme de ces deux contributions :

$$B_T = B_e + 1.202 \frac{4\mu_0 m}{4\pi d^3} \quad (2-19)$$

Le préfacteur 1.202 provient de la somme des contributions de chacune des particules dans la chaîne, et le moment magnétique m d'une particule s'écrit :

$$m = \frac{4\pi}{3} r^3 \chi_{part} \frac{B_T}{\mu_0} \quad (2-20)$$

Des deux équations précédentes, on en déduit l'écriture du moment m :

$$m = \frac{4\pi r^3 \chi_{part} B_e}{3\mu_0 \left(1 - \frac{1.202 \cdot 4 \chi_{part} r^3}{3d^3} \right)} \quad (2-21)$$

Finalement, la force magnétique dépend de m et de d et a pour expression :

$$F_{magn}^{att} = -1.202 \frac{3\mu_0 m^2}{2\pi d^4} \quad (2-22)$$

La force attractive de van der Waals doit aussi être calculée. Concentrons nous sur le cas des particules polymérisées, que l'on peut décrire par un système à 5 couches comme cela est illustré en figure-2-14.

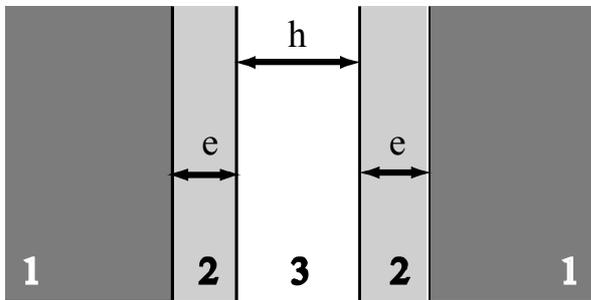


Figure-2-14 : Modèle à cinq couches pour définir les interactions de van der Waals, le milieu 1 correspond au cœur magnétique, le milieu 2 à la couche de polymères réticulée et le milieu 3 à la solution aqueuse.

Pour une telle situation la force de van der Waals est donnée par (Israelachvili, 1992) :

$$F_{vdW}^{att} = -\frac{r}{12} \left(\frac{A_{232}}{h^2} - \frac{2A_{123}}{(h+e)^2} + \frac{A_{121}}{(h+2e)^2} \right) \quad (2-23)$$

CHAPITRE II

r est le rayon des particules, h et e sont définis sur la figure-2-14. A_{ijk} est la constante de Hamaker dépendant des milieux concernés (i, j, k). Plus précisément ces constantes dépendent des indices de réfraction n et des constantes diélectriques statiques ε de chacun des milieux :

$$A_{232} = \frac{3}{4}kT \left(\frac{\varepsilon_2 - \varepsilon_3}{\varepsilon_2 + \varepsilon_3} \right)^2 + \frac{3h\nu_e}{16\sqrt{2}} \frac{(n_2^2 - n_3^2)^2}{(n_2^2 + n_3^2)^{3/2}} \quad (2-24)$$

$$A_{121} = \frac{3}{4}kT \left(\frac{\varepsilon_1 - \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} \right)^2 + \frac{3h\nu_e}{16\sqrt{2}} \frac{(n_1^2 - n_2^2)^2}{(n_1^2 + n_2^2)^{3/2}} \quad (2-25)$$

$$A_{123} = \frac{3}{4}kT \left(\frac{\varepsilon_1 - \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} \right) \left(\frac{\varepsilon_3 - \varepsilon_2}{\varepsilon_3 + \varepsilon_2} \right) + \frac{3h\nu_e}{8\sqrt{2}} \frac{(n_1^2 - n_2^2)(n_3^2 - n_2^2)}{(n_1^2 + n_2^2)^{1/2} (n_3^2 + n_2^2)^{1/2} \left\{ (n_1^2 + n_2^2)^{1/2} + (n_3^2 + n_2^2)^{1/2} \right\}} \quad (2-26)$$

où h est la constante de Planck et ν_e la fréquence de plasma d'un gaz d'électrons libres c'est-à-dire environ 3.10^{15} s^{-1} .

Pour le milieu 1 correspondant au cœur magnétique, l'indice de réfraction a été mesuré sur des particules non polymérisées par R. Dreyfus à l'aide d'un spectrophotomètre à sphère intégratrice (Dreyfus, 2005). Pour une longueur d'onde de 500 nm, n_1 vaut 1.73 et $\varepsilon_1 \approx 3$ sachant ici que $\varepsilon = n^2$, dans la mesure où le cœur dur absorbe peu la lumière aux longueurs d'onde considérées. Pour le milieu 2, on fait l'approximation qu'il s'agit uniquement de polystyrène avec n_2 valant 1.6 et $\varepsilon_2 \approx 2.6$. Enfin, pour l'eau, n_3 vaut 1.33 et $\varepsilon_3 = 80$. Ainsi, le calcul des constantes de Hamaker donne :

$$A_{232} = 2.4.10^{-20} \text{ J}, \quad A_{121} = 3.2.10^{-21} \text{ J} \text{ et } A_{123} = 8.2.10^{-21} \text{ J}.$$

2-2-1-c- Dispositif expérimental et exemple

Le dispositif expérimental que nous utilisons a été mis au point par R. Dreyfus, il est décrit sur la figure-2-15 (Dreyfus, 2005). Une bobine, parcourue par un courant électrique piloté par ordinateur, crée le champ magnétique dans l'échantillon. Une lampe à vapeur de Xénon sert de source lumineuse « blanche ». Une fibre optique permet d'acheminer cette lumière incidente sur l'échantillon parallèlement au champ magnétique. Une seconde fibre optique est placée à un angle de 17° pour récupérer la lumière diffractée, puis pour la guider vers le spectromètre qui sépare les différentes longueurs d'onde. Les longueurs d'onde diffractées sont renvoyées sur une caméra refroidie, puis analysées.

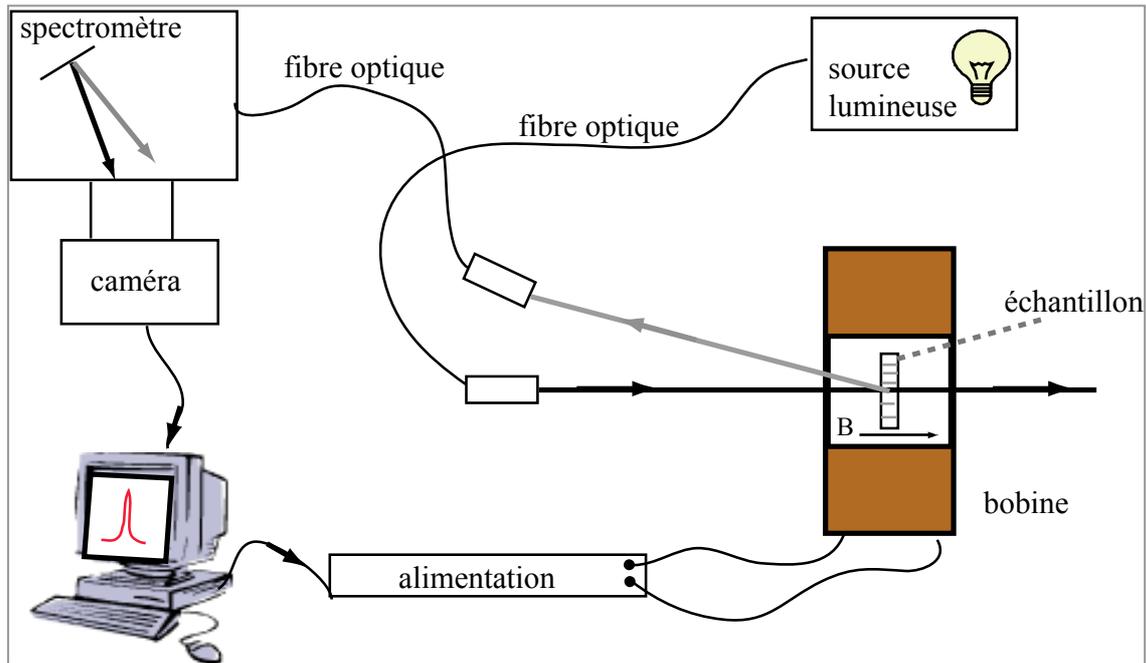


Figure-2-15 : Montage expérimental de la « machine de force ».

La réflectance, R , est utilisée pour remonter au pic de Bragg :

$$R = \frac{I - I_{noir}}{I_{ref} - I_{noir}} \quad (2-27)$$

I est l'intensité mesurée quand un champ magnétique est appliqué, I_{noir} représente l'intensité rémanente ou irréductible quand la source lumineuse est éteinte, et I_{ref} correspond à l'intensité captée en l'absence de champ, quand la source lumineuse est allumée.

La figure-2-16-A montre un exemple de suivi de pic de Bragg en fonction du champ appliqué. Le maximum du pic de Bragg donne la longueur d'onde diffractée et donc la distance entre particules. Le profil de force est déduit d'après les considérations précédentes (figure-2-16-B).

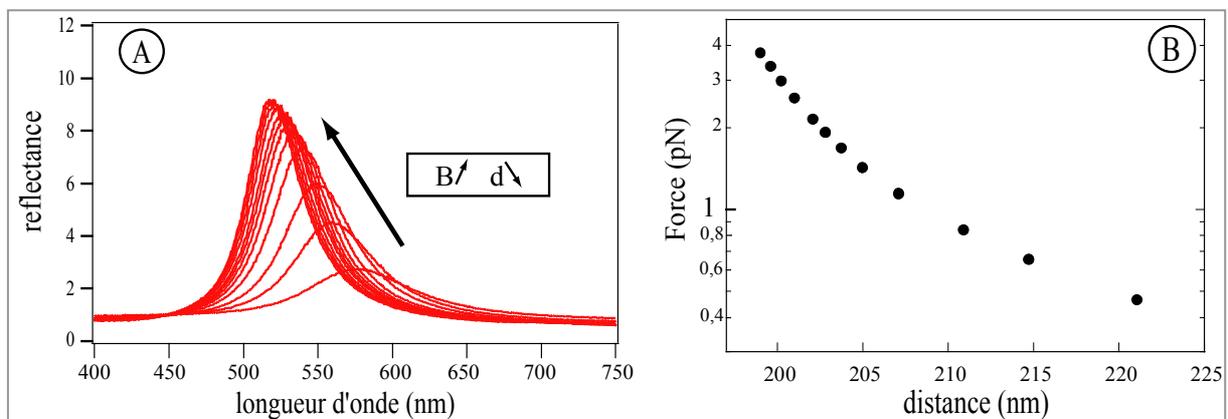


Figure-2-16 : A- Evolution de la réflectance en fonction de l'intensité du champ magnétique. B- Profil de force déduit de l'évolution de la réflectance. (Exemple d'un échantillon de particules polymérisées triées LSL, pour une force ionique de 10mM).

CHAPITRE II

La technique de la machine de force est un outil accessible au laboratoire, qui permet de caractériser les forces colloïdales stabilisant nos particules magnétiques. Cet outil permet également de renseigner sur la taille des particules. Dans le cas de l'échantillon LSL de particules polymérisées et chargées, les répulsions mesurées ont deux origines : stérique et électrostatique. Les distances mesurées en « machine de force » sont cohérentes avec la valeur du rayon hydrodynamique (105 nm), dans la mesure où les particules sont si proches que les « cheveux » de polymères interagissent entre eux. Avec les particules polymérisées, il est difficile de mesurer une distance au contact car la couche dense de polymères est déformable et change en fonction des conditions physico-chimiques.

2-2-2- Cinétique d'adhésion non spécifique

Un second outil élaboré à l'aide de particules magnétiques est abordé ici. Il s'agit d'une méthode pour l'étude d'adhésion non spécifique, comme l'adhésion de van der Waals ou l'adhésion induite par des polymères adsorbés. Cette méthode consiste à suivre le nombre de liens permanents « particule – particule » en fonction du temps passé sous champ magnétique. Ce suivi de la cinétique d'adhésion a été réalisé par analyse d'image sur des particules non polymérisées et suffisamment grosses, d'environ 1 μm de diamètre, dans une géométrie de capillaire qui fixe le nombre maximal de liens réalisables (figure-2-17). Le temps caractéristique d'adhésion entre deux particules est ainsi évalué.

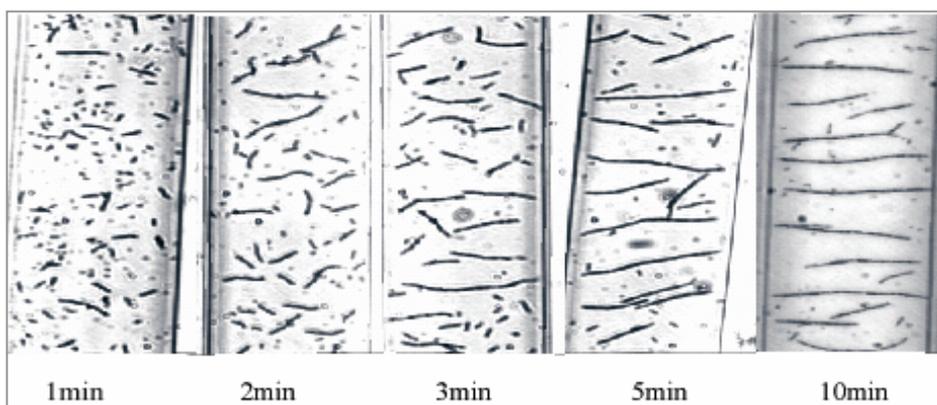


Figure-2-17 : Suivi du nombre de liens particule-particule en fonction du temps passé sous champ, dans un capillaire de 50 μm de largeur.

L'influence de la température et de l'intensité du champ magnétique sur ce temps caractéristique a fait l'objet d'une étude approfondie pour les deux exemples d'adhésion cités précédemment. Il a ainsi été révélé que les deux types d'adhésion sont thermiquement et « magnétiquement » activés (figure-2-18).

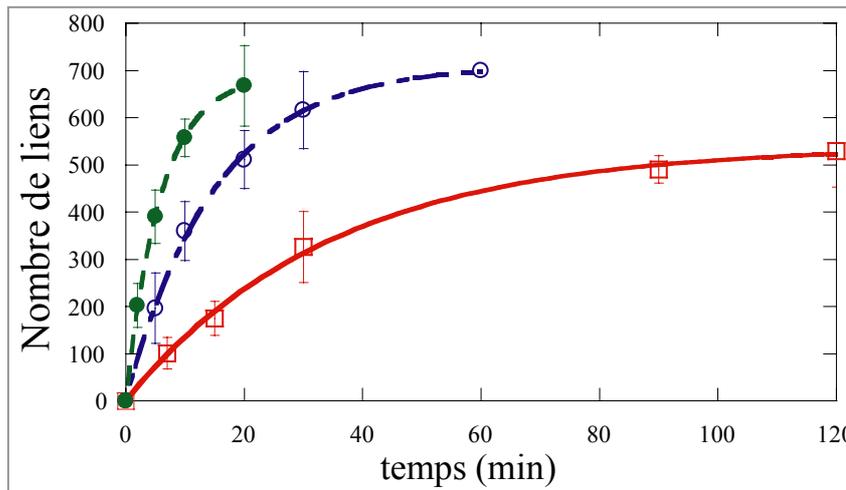


Figure-2-18 : Exemple de cinétique d'adhésion induite par du PAA adsorbés. Influence du champ magnétique (□ 9.4 mT, ○ 11 mT, ● 14.5 mT)

L'activation thermique démontre qu'il existe une barrière d'énergie à franchir pour conduire à l'adhésion entre surfaces. L'activation magnétique montre que le champ magnétique contribue à abaisser cette barrière en ajoutant une composante attractive. Ce scénario est développé en figure-2-19 en termes de profils énergétiques.

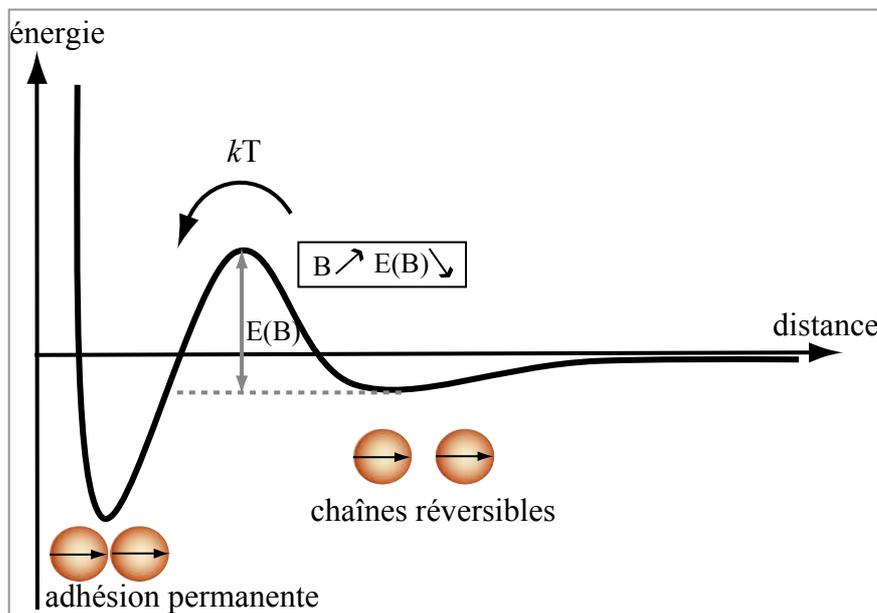


Figure-2-19 : Profil énergétique : l'adhésion est thermiquement et magnétiquement activée.

L'étude de l'adhésion via des interactions de van der Waals a permis de valider cette approche. Dans ce cas, le temps caractéristique suit une loi d'Arrhenius et la barrière d'énergie à franchir peut être calculée en considérant un profil de type DLVO et en connaissant les caractéristiques des particules. En revanche, pour le cas de l'adhésion induite par des polymères adsorbés (PAA) ou pontage par des polymères, la compréhension du temps caractéristique ne peut pas se faire uniquement en termes d'interactions colloïdales simples,

CHAPITRE II

avec une activation thermique d'Arrhenius (Cohen-Tannoudji et al., 2005). La dynamique de l'adhésion est ainsi largement gouvernée par la dynamique moléculaire des polymères. Plus précisément, à proximité de la surface des particules, les polymères adsorbés sont proches de l'état vitreux, ce qui diminue fortement leur dynamique.

Cette approche est à l'origine de la méthode permettant de suivre des cinétiques de réactions ligand-récepteur sur des surfaces en regard. Cette méthode, qui constitue le cœur expérimental de cette thèse, sera décrite en détail au cours du chapitre 3.

2-3- Particules magnétiques et réactions ligand-récepteur

Nous souhaitons exploiter les particules magnétiques pour étudier des réactions ligand-récepteur sur des surfaces. Il convient donc, dans un premier temps, de greffer les acteurs de telles interactions à la surface des particules. Dans ce paragraphe, nous décrivons les méthodes empruntées pour observer une adhésion biospécifique entre particules. Nous présentons également leur utilisation pour améliorer la sensibilité de tests de diagnostic immunologique.

2-3-1- Greffage des particules magnétiques

2-3-1-a- Principes

Le greffage consiste à fixer des protéines à la surface des particules tout en conservant leur fonctionnalité, c'est-à-dire sans altérer leur structure, qui est à l'origine de leur fonction (Vikholm & Albers, 1998). Pour un greffage, nous souhaitons également contrôler la quantité greffée et maîtriser la stabilité du greffage au cours du temps. Notons également que nous travaillons sur des particules colloïdales et que les étapes conduisant au greffage, et le greffage lui-même, ne doivent pas perturber la stabilité colloïdale. Manipuler des objets biologiques demande aussi quelques précautions particulières, comme travailler dans un milieu aqueux et dans des conditions bien contrôlées (pH, tensioactifs non ioniques...).

CHAPITRE II

Deux principales voies s'offrent à nous pour accrocher des protéines à la surface de nos particules : un greffage par adsorption physique ou un greffage par couplage covalent. Les principes du greffage se révèlent être très empiriques et reposent souvent sur des « recettes », car ils restent fortement dépendants des surfaces et des protéines considérées. On peut cependant dégager quelques voies pour optimiser les conditions de greffage.

Les protéines sont des objets qui présentent une certaine affinité pour les interfaces (Dalglish & Leaver, 1991; Fang & Dalglish, 1993), car elles ont à la fois des domaines hydrophiles, des domaines hydrophobes, des domaines chargés... Elles jouent d'ailleurs parfois le rôle de tensioactifs (Bressy, 2003), un tel exemple est le cas du lait, émulsion stabilisée par des protéines. C'est pour ces raisons que les protéines sont souvent simplement adsorbées sur des particules. C'est par exemple le cas dans les tests d'agglutination à base de particules de latex, sur lesquelles les anticorps sont le plus fréquemment adsorbés (Ortega-Vinuesa & Bastos-Gonzalez, 2001). Les conditions d'adsorption sont fortement influencées par les conditions physicochimiques du milieu, comme la force ionique, le pH ou la présence de tensioactifs. La quantité adsorbée dépend ensuite principalement de la concentration en protéines. La température et le temps d'incubation sont des paramètres plus ou moins secondaires car ils se situent toujours dans une même fenêtre ($T < 45^{\circ}\text{C}$, le temps d'adsorption se situe entre quelques minutes et quelques heures). Le pH est sans aucun doute le paramètre clé car il joue sur la charge globale des protéines, et dans le cas où les surfaces sont chargées, les interactions électrostatiques peuvent être le moteur ou le frein à l'adsorption. Choisir un greffage par adsorption peut être intéressant car la mise en œuvre est assez simple : lorsque l'on connaît les conditions expérimentales, l'adsorption consiste en une étape unique. En revanche, cette voie n'assure pas un greffage irréversible dans le temps et ne permet pas d'orienter des protéines ni d'éviter leur dénaturation.

La seconde voie de greffage est de créer une liaison chimique entre la protéine et la surface. Il s'agit de déclencher une réaction entre une fonction chimique de la surface et une fonction de la protéine, et le plus souvent en utilisant un agent de couplage. Une infinité de réactions de couplage peuvent être imaginées (Hermanson, 1996). La nature de la surface fixe généralement la réaction empruntée. Les paramètres jouant sur le greffage covalent sont principalement les concentrations relatives en réactifs, le temps et la température de réaction, mais les conditions physicochimiques sont aussi à considérer car l'on travaille sur des objets colloïdaux. Dans le cas de nos particules magnétiques polymérisées, des fonctions

carboxyliques sont présentes à la surface de la couche dense de polymère. Nous utilisons donc ces fonctions pour former des liaisons peptidiques avec les fonctions amines des protéines. L'agent de couplage utilisé est un mélange d'EDC (N'-3-diméthylaminopropyl)-N-éthylcarbodiimide) et de NHSS (N-hydroxysulfosuccinimide). Le principe de ce greffage est présenté en figure-2-20.

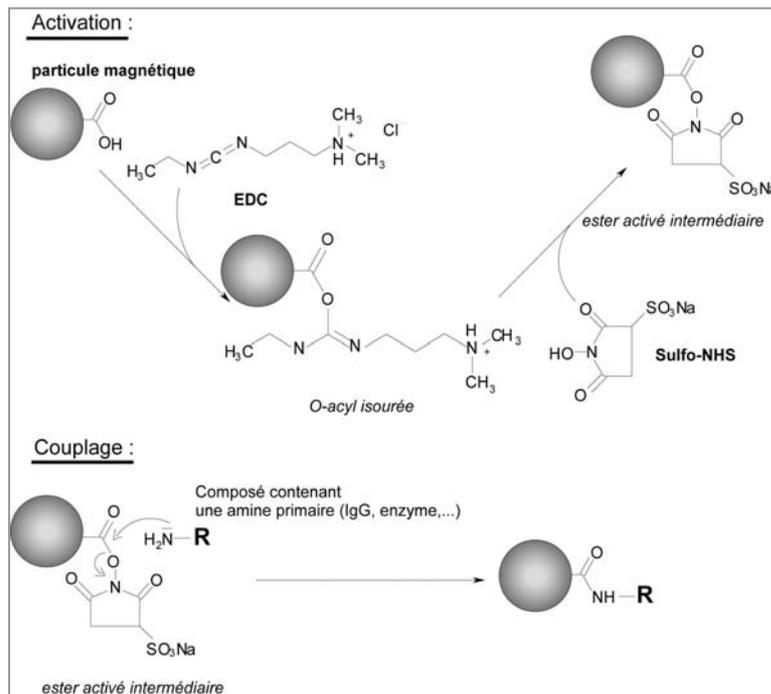


Figure-2-20 : Formation d'une liaison peptidique entre particule magnétique et protéine.

Le greffage se décompose en deux étapes. Une première étape consiste à activer les fonctions carboxyliques avec les agents de couplage, le pH étant maintenu à 5.5. Cette étape est identique quelle que soit la protéine que l'on désire greffer. Après lavage, une seconde étape permet le couplage proprement dit entre protéines et surfaces. Cette étape dépend de la nature de la protéine : de son nombre de fonctions amines, de sa taille, de son point isoélectrique, le pH étant ajusté en conséquence. Séparer le protocole en deux étapes permet d'éviter des réactions inter ou intra protéines induites par les agents de couplage. Une troisième étape est souvent ajoutée pour désactiver les fonctions carboxyliques qui n'ont pas réagi. Pour cela, un milieu tamponné avec de la glycine est utilisé. Le principal avantage du greffage covalent est la stabilité dans le temps.

La caractérisation du greffage consiste à doser le nombre de protéines fixées sur les particules. Deux méthodes sont envisagées : un dosage direct ou un dosage indirect. Par un dosage direct, la quantité de protéine est mesurée sans intermédiaire. Généralement, ces méthodes sont basées sur des réactifs qui interagissent avec différents acides aminés, et la fonctionnalité de

la protéine n'intervient pas. Pour les dosages indirects, on détecte une protéine marquée qui réagit spécifiquement avec la protéine à doser. Par ce biais, la quantité de protéines *actives* est déterminée.

2-3-1-b- Caractérisation d'un greffage covalent : exemple de la protéine A

Pour illustrer les considérations précédentes, le greffage de la protéine A a été caractérisé et est présenté dans ce paragraphe. La protéine A sera utilisée au chapitre 4 dans le cadre du travail sur l'adhésion induite par des cadhérines (des chimères de cadhérines seront accrochées sur les particules grâce à l'interaction protéine A – fragment Fc). La protéine A est greffée selon le principe de couplage covalent présenté ci-dessus. La technique employée pour doser la quantité de protéines A fixée sur les particules magnétiques est une méthode directe : le test μ BCA (Micro Bicinchonic Acid Assay). Ce test consiste à mélanger à la solution à doser une solution de BCA, une solution de sulfate de cuivre et une solution saline d'hydroxyde de sodium (micro BCA Protein Assay Kit, Pierce Perbio). En milieu basique, le cuivre Cu^{2+} est réduit en Cu^+ en présence de protéines. Le Cu^+ se complexe alors à deux molécules de BCA, et ce complexe a la propriété d'absorber la lumière à 562 nm (figure-2-21). Après calibration avec des solutions de protéine A de concentration connue, la mesure de l'absorbance du mélange à 562 nm renseigne sur la quantité de molécules complexées et donc sur la quantité de protéines. Pour une mesure en présence de particules magnétiques, le mélange de solutions est incubé avec les particules greffées pendant une heure à 60°C. Après cette étape d'incubation, les particules sont éliminées par sédimentation sous aimant. Pour chaque échantillon analysé, un échantillon témoin de particules non greffées est testé.

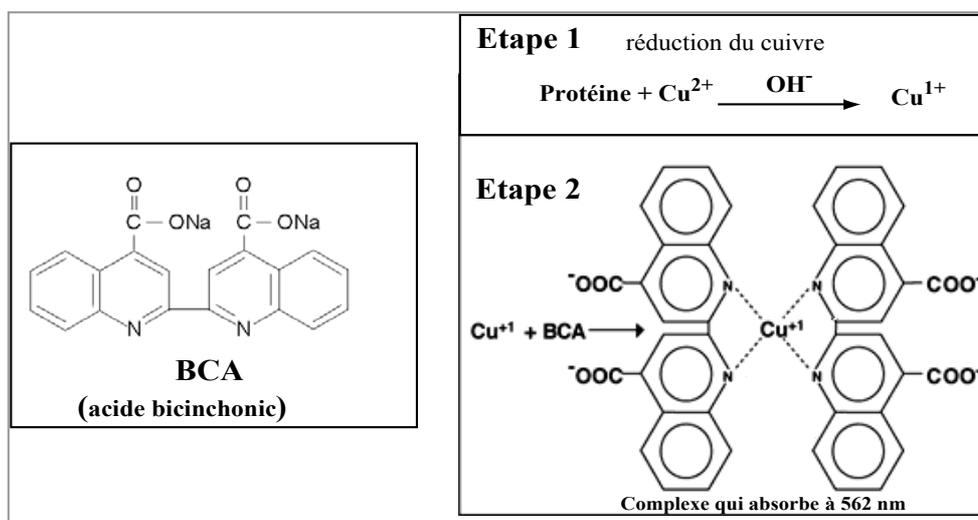


Figure-2-21 : Principe du test BCA (en μ BCA on dose entre 0.5 et 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de protéines).

CHAPITRE II

Pour évaluer la part de greffage covalent par rapport à la part d'adsorption, des échantillons témoins sont réalisés. Ils subissent les mêmes étapes, mais l'étape d'activation se fait sans agent de couplage. En ce qui concerne l'exemple du greffage de la protéine A, le pH est un paramètre clé, comme nous l'avons mentionné. En effet, toutes conditions expérimentales conservées, passer d'un pH de 7 à un pH de 6 améliore le taux de greffage d'un facteur 2. Descendre à 5.1 n'apporte pas d'amélioration supplémentaire. En revanche, passer en dessous du point isoélectrique de la protéine A, qui est de 5.1, diminue le taux de greffage.

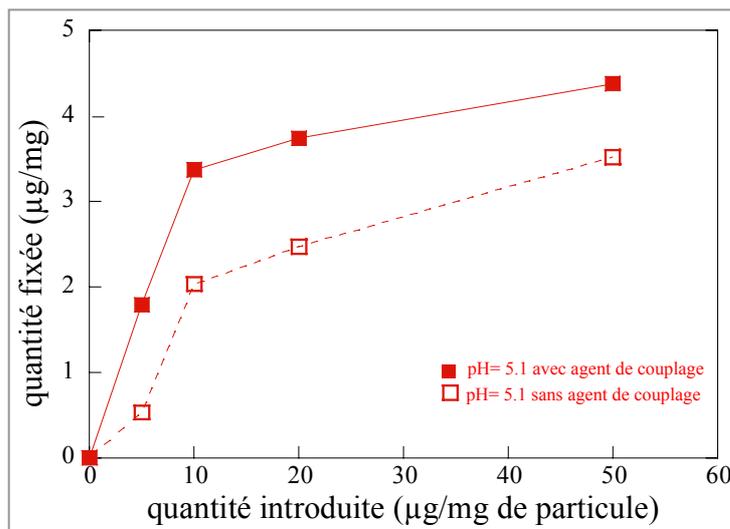


Figure-2-22 : Evolution du taux de greffage de la protéine A en fonction de la quantité de protéines A introduite pour un pH =5.1 (■ avec agent de couplage, □ sans agent de couplage). 1µg de protéine A par mg de particules correspond à une centaine de protéines par particule.

Il est aussi pertinent de suivre l'influence de la concentration en protéine A ajoutée lors de l'étape de couplage, aussi bien dans le cas covalent que dans celui de l'adsorption. La quantité greffée sature rapidement, à partir de 10 µg de protéine A par mg de particules (figure-2-22). La proportion d'adsorption est importante quand on compare les taux de greffage avec et sans agent de couplage (entre 25% et 75%). Un dosage effectué une semaine après le couplage montre une diminution de 30 à 40% du taux de greffage, ce qui confirme qu'il y a bien une part d'adsorption réversible de la protéine A sur les particules. La force ionique du milieu continu a été fixée à 20 mM, valeur optimum comparée à 1 et 100 mM. Augmenter la température améliore sensiblement le greffage, mais, pour ne pas altérer la structure des protéines on se placera au maximum à 44°C. Enfin, au-delà de 30 min de couplage, le greffage semble avoir atteint son maximum.

2-3-1-c- Détermination d'une « binding capacity » : exemple de particules greffées avec de la streptavidine

La méthode que nous employons pour déterminer la quantité de protéines actives, ou « binding capacity », est un dosage en retour par spectrophotométrie de fluorescence.

CHAPITRE II

L'exemple du greffage de la streptavidine est considéré dans ce paragraphe, car l'optimisation du protocole de dosage est simple. D'une part, le couple streptavidine-biotine étant largement utilisé, on trouve facilement ces molécules marquées avec divers fluorophores. D'autre part, ce couple est très stable, avec une constante thermodynamique d'association de $10^{14} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$. Les limitations thermodynamiques que l'on pourrait rencontrer dans le domaine de concentrations où l'on travaille ($10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) sont alors écartées. La streptavidine peut être greffée par un couplage covalent, le protocole précis étant donné en annexe (annexe-B), ou adsorbée, dans le cas des particules non polymérisées. Pour réaliser ce dosage indirect, une solution de biotine marquée par une sonde fluorescente, la FITC, est considérée initialement. Sa concentration est prise dans une gamme où l'intensité de fluorescence reste directement proportionnelle à la concentration en biotine-FITC. A cette solution est ajoutée une quantité connue de particules recouvertes de streptavidine. Après incubation d'une dizaine de minutes, les particules sont sédimentées avec un aimant, et le surnageant est récupéré. Enfin, on détermine la quantité de biotine-FITC qui reste dans ce surnageant, en mesurant l'intensité de fluorescence (figure-2-23).

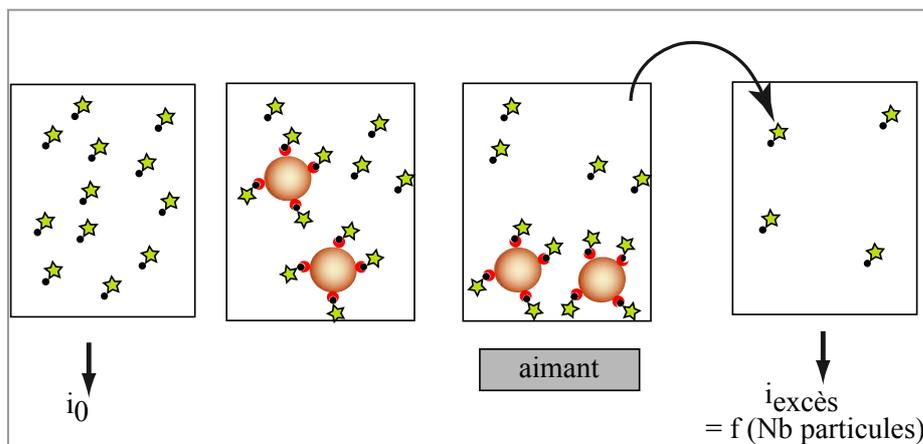


Figure-2-23 :
Principe du dosage
en retour par
fluorimétrie pour
déterminer le
nombre de sites actifs
à la surface des
particules.

En mesurant la quantité de biotine restante et connaissant sa quantité initiale et la quantité de particules incubées, on en déduit le nombre de biotines qui se sont fixées par particule. La mesure est réalisée pour différentes quantités de particules, ce qui améliore la précision sur la détermination du taux de greffage. Si l'on n'est pas en défaut de biotine pour les différents échantillons, l'intensité de fluorescence décroît linéairement avec la quantité de particules (figure-2-24). De la valeur de la pente α et de la valeur de l'intensité à l'origine i_0 , on en déduit le taux de greffage. Plus précisément, le nombre de sites actifs par particule n est évalué par:

$$n = \frac{\alpha n_1 v_b d}{i_0 \phi_m} \quad (2-28)$$

avec n_1 la quantité initiale de biotine-FITC (en mol), v_b le volume d'une particule, d la densité des particules, et ϕ_m la fraction massique en particules dans le volume de suspension ajouté. Le protocole de dosage est donné en annexe-C. Pour des quantités de streptavidines de 25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de particule, 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mg}$ introduites lors du greffage, on dose respectivement 50, 125, et 190 sites actifs par particule (figure-2-24).

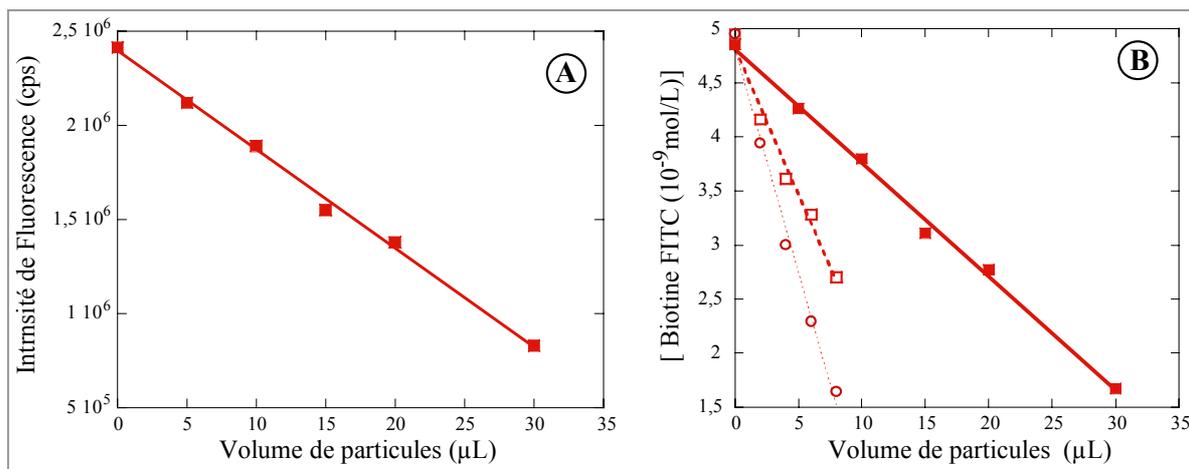


Figure-2-24 : Dosage du nombre de sites actifs par de la biotine FITC ($\lambda_{excitation} = 492 \text{ nm}$ et $\lambda_{emission} = 518 \text{ nm}$). A- Intensité de fluorescence en fonction du nombre de particules pour un échantillon greffé à 25 μg de streptavidine par mg de particule. B- Comparaison de 3 greffages ■ 25 $\mu\text{g}/\text{mg}$, □ 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$, ○ 200 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ce qui donne ■ 50 sites par particule, □ 125 sites par particule et ○ 190 sites par particule.

Cette approche peut être utilisée pour d'autres couples. Si la constante thermodynamique d'association est relativement faible, l'étape d'incubation entre particules et sonde fluorescente est réalisée à des concentrations plus importantes, puis les solutions sont diluées uniquement pour la mesure de fluorescence.

2-3-2- Assemblages spécifiques : application au diagnostic immunologique

La méthode mise au point pour étudier des réactions ligand-récepteur entre surfaces en regard est issue, entre autres, de l'utilisation des particules magnétiques pour des tests de diagnostic immunologiques, dits « tests d'agglutination ». Ainsi, de nombreux principes énoncés ici seront repris au chapitre 3, qui présentera notre méthode.

2-3-2-a- Formation de chaînes permanentes spécifiques

En mélangeant des particules, décorées de récepteurs (ex : Anticorps), et des ligands (ex : Antigène), au moins divalents, on est capable de former des liens spécifiques ligand-récepteur qui relient les particules magnétiques entre elles. Si cette reconnaissance spécifique est déclenchée uniquement en appliquant un champ magnétique, on forme des chaînes permanentes, qui persistent après interruption du champ. Ce principe est illustré en figure-2-25.

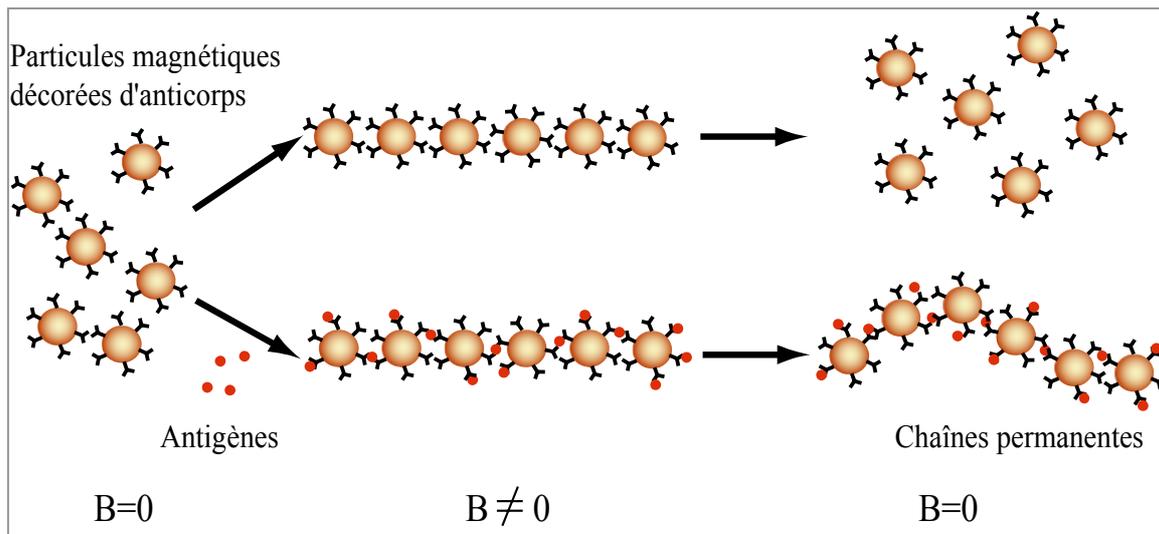


Figure-2-25 : Principe de formation de chaînes permanentes spécifiques.

Des chaînes permanentes suffisamment longues peuvent être observées par microscopie optique (figure-2-26).



Figure-2-26 : Cliché de microscopie optique (grossissement x 100) de chaînes permanentes spécifiques, obtenues avec des particules magnétiques *Adembeads*, greffées avec de la streptavidine, à une fraction massique de 0.05%, en ajoutant $5 \cdot 10^{-9}$ mol/L de BSA biotinylée et après une étape de 5 min sous un champ magnétique de 30 mT.

Ce principe de formation d'agrégats linéaires spécifiques a été appliqué au diagnostic immunologique, c'est-à-dire à la détection de molécules biologiques. Prenons ici l'exemple de la détection d'un antigène par des particules greffées d'anticorps spécifiques. Cette méthode

n'est autre qu'un test d'agglutination de latex magnétiques sous champ. Le principe d'agglutination sous champ a été élaboré au laboratoire et sa faisabilité a été démontrée. La taille des agrégats formés dépend de la quantité d'antigènes présents en solution. Comme dans les tests classiques d'agglutination (Price & Newman, 1997), un phénomène de « courbe en cloche » est observé. En effet, la taille des agrégats ne sature pas avec la concentration en antigène, mais augmente et passe par un maximum dans la zone d'équivalence, puis décroît. Ce phénomène est détaillé en figure-2-27.

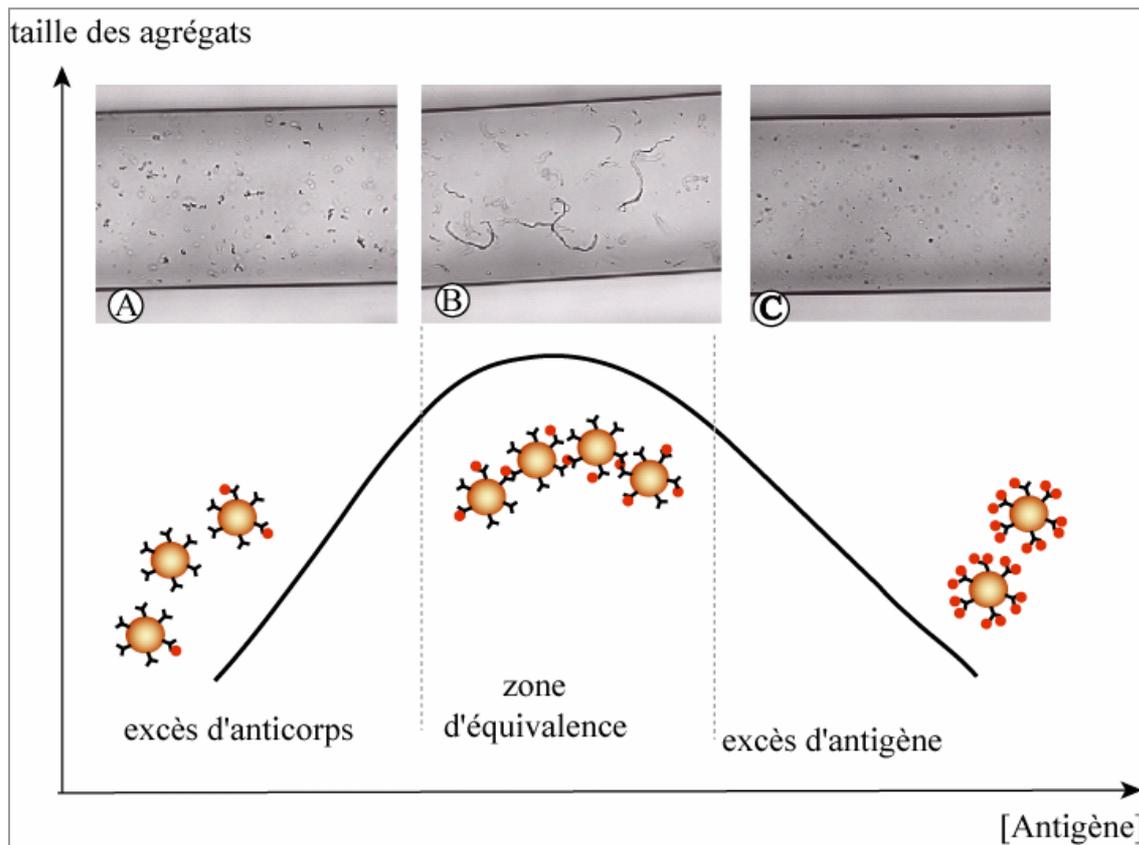


Figure-2-27 : Test d'agglutination sous champ magnétique. Evolution de la taille des agrégats en fonction de la concentration en antigène : définition de la zone d'équivalence. Les clichés de microscopie optique sont obtenus pour des particules magnétiques à 0.05% en masse décorées de biotines en présence de streptavidines aux concentrations : A- $5.10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$, B- $10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$, C- $2.10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$. Les suspensions sont observées dans des capillaires de 50 μm de largeur, après avoir été incubées 5 min sous un champ magnétique de 30 mT.

2-3-2-b- Suivi de l'état d'agrégation d'une suspension de particules magnétiques par turbidimétrie

L'analyse d'image, qui avait permis de suivre la taille des chaînes permanentes pour des particules de 1 μm (§ 2-2-2), est fastidieuse et finalement peu précise pour des particules de 200 nm. Nous faisons donc appel à un autre outil pour remonter à la taille des chaînes permanentes, ou du moins, à l'état d'agrégation de la suspension de particules magnétiques. Pour suivre cet état d'agrégation, nous nous sommes inspirés de ce qui est couramment utilisé

CHAPITRE II

dans le cadre des tests classiques d'agglutination, c'est-à-dire des mesures de turbidimétrie (Price & Newman, 1997). La turbidimétrie est simplement une mesure d'absorbance de l'échantillon. Un faisceau de longueur d'onde λ et d'intensité I_0 est envoyé sur l'échantillon et l'intensité transmise est mesurée. L'intensité transmise, I_T , dépend directement de l'intensité incidente I_0 , de l'intensité absorbée I_A , et de l'intensité diffusée I_D suivant l'expression :

$$I_T(\lambda) = I_0(\lambda) - I_A(\lambda) - I_D(\lambda) \quad (2-29)$$

Au cours d'un processus d'agrégation, l'intensité absorbée ne change pas : il y a toujours la même quantité de matière qui absorbe la lumière. En revanche, l'intensité diffusée augmente avec la taille caractéristique et le nombre d'agrégats. Une mesure de turbidimétrie est donc une mesure indirecte de la lumière diffusée à la longueur d'onde λ , et dans toutes les directions. La mesure consiste à suivre la densité optique (DO) de la suspension (fonction croissante de l'intensité diffusée et définie plus tard), qui augmente avec l'état d'agrégation des particules. Dans le cas des tests classiques d'agglutination, cette mesure est réalisée initialement et après une incubation de quelques minutes. Pour les tests d'agglutination sous champ, l'expérience consiste à mesurer la différence de DO avant et après application du champ magnétique. Pour une suspension composée d'agrégats de tailles différentes, il est difficile de modéliser et de prévoir l'intensité diffusée, mais cette intensité a un sens à titre comparatif et permet de suivre l'évolution de l'agrégation. En pratique, pour les tests classiques d'agglutination, une courbe de calibration permet de construire la courbe de DO en fonction de la concentration en antigène, pour une suspension donnée à une concentration en particule donnée. Les paramètres à optimiser sont la longueur d'onde de l'intensité incidente, pour minimiser l'absorption et maximiser la diffusion, et la concentration en particules pour avoir assez d'amplitude de DO entre l'état initial et l'état agrégé.

Dans un cas très particulier, nous sommes en mesure de décrire quantitativement le signal diffusé par la suspension et donc la variation de DO . Il s'agit du cas où l'on passe d'une suspension composée uniquement de particules dispersées, autrement dit de « singulets », à la même suspension composée uniquement de « singulets » et de « doublets » de particules.

De façon générale, pour un échantillon traversé sur une longueur l par un faisceau incident d'intensité I_0 , l'intensité diffusée s'écrit (Bohren & Huffman, 1998) :

$$I_D = I_0 \rho C_{DIFF} l \quad (2-30)$$

CHAPITRE II

où C_{DIFF} est la section efficace de diffusion, qui est homogène à une surface, et ρ la densité d'objets diffusants. La section efficace de diffusion dépend de la taille des objets, de leur forme, de leur indice de réfraction et de la longueur d'onde. De même, on peut définir l'intensité absorbée I_A comme suit :

$$I_A = I_0 C_{ABS} l \quad (2-31)$$

où C_{ABS} est la section efficace d'absorption.

Pour un échantillon relativement concentré, ce qui est le cas dans nos expériences, l'intensité diffusée et l'intensité absorbée sont relativement importantes. Ainsi, les objets ne se sont pas soumis à la même intensité incidente suivant leur position dans l'échantillon. Mais, sur un élément d'épaisseur infinitésimale dz , l'échantillon étant homogène, l'intensité perdue par diffusion et absorption est :

$$dI = -I(z)(C_{DIFF} + C_{ABS}) \rho dz \quad (2-32)$$

où $I(z)$ est l'intensité reçue par l'échantillon en z (figure-2-28).

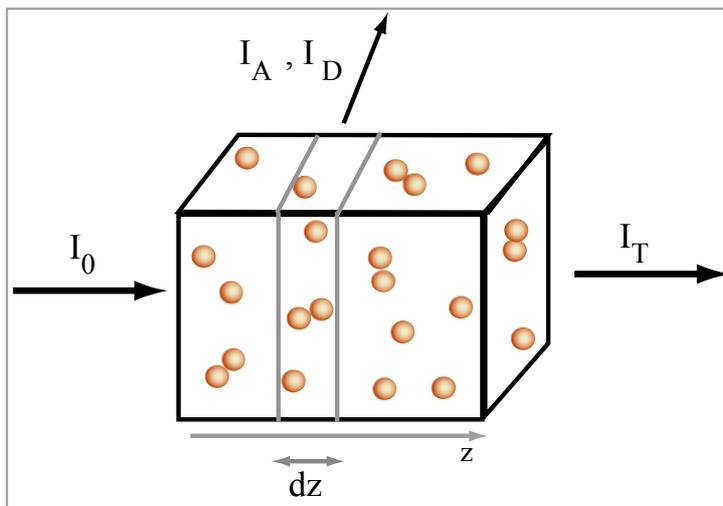


Figure-2-28 : Principe de la turbidimétrie.

En intégrant sur l'épaisseur de l'échantillon, on obtient :

$$\ln\left(\frac{I_T}{I_0}\right) = -(C_{DIFF} + C_{ABS}) \rho l \quad (2-33)$$

En turbidimétrie, on considère plutôt la densité optique DO , qui vaut par définition et dans le cas considéré ici :

$$DO = -\log\left(\frac{I_T}{I_0}\right) = \frac{1}{2.3} (C_{DIFF} + C_{ABS}) \rho l \quad (2-34)$$

CHAPITRE II

D'après l'expression précédente, la DO est linéaire avec la densité de particule (figure-2-29). Cette caractéristique a été vérifiée expérimentalement dans le domaine de concentration utilisé, ce qui nous permet de dire que la diffusion multiple, phénomène qui apparaît aux concentrations trop élevées et qui invalide l'approche précédente, est négligeable ici.

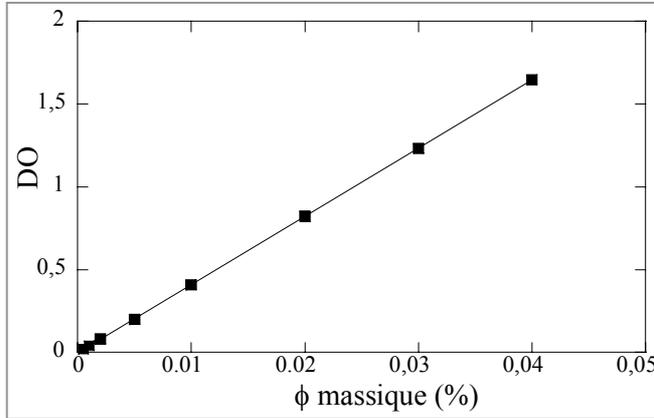


Figure-2-29 : Evolution de la DO à 700 nm, en fonction de la fraction massique en particules : vérification de l'expression (2-34).

Considérons désormais le cas où initialement une suspension est composée uniquement de singulets à la densité ρ_1 . Puis, à l'instant t , des doublets ont été formés et sont présents en densité ρ_2 . La DO initiale, DO_0 , est :

$$DO_0 = \frac{1}{2.3} (C_{DIFF}^1 + C_{ABS}^1) \rho_1 l \quad (2-35)$$

Puis, à l'instant t on a :

$$DO_t = \frac{1}{2.3} (C_{DIFF}^1 + C_{ABS}^1) (\rho_1 - 2\rho_2) l + \frac{1}{2.3} (C_{DIFF}^2 + C_{ABS}^2) \rho_2 l \quad (2-36)$$

Les grandeurs indicées par « 1 » sont relatives aux singulets et celles indicées par « 2 » aux doublets. Une approximation légitime consiste à dire que $C_{ABS}^2 = 2C_{ABS}^1$ comme nous l'avons remarqué plus haut. En revanche, en ce qui concerne les sections efficaces de diffusion, un calcul de Mie est nécessaire pour évaluer C_{SCAT}^2 à partir de C_{SCAT}^1 en fonction de la longueur d'onde du faisceau incident (Bohren & Huffman, 1998). Pour une longueur d'onde donnée, une relation de proportionnalité entre les deux grandeurs est vérifiée :

$C_{DIFF}^2 = \alpha C_{DIFF}^1$ (avec $\alpha > 2$). Ainsi, l'expression précédente est simplifiée par :

$$DO_t = \frac{1}{2.3} (C_{DIFF}^1 + C_{ABS}^1) \rho_1 l + \frac{1}{2.3} (\alpha - 2) C_{DIFF}^1 \rho_2 l \quad (2-37)$$

Au cours de la formation de doublets, la DO varie donc de :

$$\Delta DO = \frac{1}{2.3}(\alpha - 2)C_{DIFF}^1 \rho_2 l \quad (2-38)$$

Notons ici que **la variation de DO est directement proportionnelle au nombre de doublets formés après un temps t.**

En pratique, la longueur d'onde optimale pour la diffusion de doublets serait de 400 à 500 nm, les objets diffusant majoritairement à une longueur d'onde égale à leur taille caractéristique. Pour nos suspensions, nous nous plaçons néanmoins à une longueur d'onde de 700 nm, car les particules magnétiques absorbent majoritairement vers 400 nm. Le calcul de Mie donne pour une longueur d'onde de 700 nm et pour un rayon de particule de 100 nm : $\alpha = 2.7$ et $\frac{C_{DIFF}^1}{\pi r^2} = 0.175$. (http://omlc.ogi.edu/calc/mie_calc.html)

Notons que pour des particules de 100 nm de rayon, la turbidimétrie est une méthode bien adaptée au suivi de formation de doublets.

Cette méthode de turbidimétrie, qui permet de suivre le nombre de doublets formés au cours du temps, est l'outil expérimental qui sera utilisé dans la suite de cette thèse pour mesurer des cinétiques de réactions ligand-récepteur.

2-3-2-c- Test d'agglutination sur particules magnétiques : intérêt du champ magnétique

La question est de savoir si l'utilisation d'un champ magnétique apporte une amélioration sur la sensibilité ou sur la conception du test par rapport aux tests classiques d'agglutination de latex. Dans les tests classiques, la stabilité colloïdale est un paramètre crucial. En effet, les particules de latex doivent être suffisamment stables pour ne pas s'agréger en l'absence d'antigène. Mais elles ne doivent pas être « trop » stables pour autoriser les particules à s'approcher suffisamment, pour permettre la formation du « sandwich » récepteur-ligand-récepteur. Les suspensions sont alors en « limite de stabilité colloïdale ». Cette dernière contrainte n'apparaît plus dans le cas des particules magnétiques, puisque le champ magnétique déclenche la rencontre entre particules et la formation du sandwich, en s'affranchissant des barrières colloïdales. Outre ces problèmes de répulsion colloïdale, le champ magnétique permet de concentrer les particules, et d'augmenter la probabilité de former un sandwich (Baudry et al., 2004). Dans le cas en solution, sans champ magnétique, les particules doivent d'abord se rencontrer : cette étape peut être assez lente, considérant les concentrations caractéristiques en particules et les constantes de diffusion (Baudry et al.,

2006). Ce temps caractéristique est détaillé au chapitre suivant (§ 3-2-1-a). Un exemple d'étude de l'influence du champ magnétique sur l'agrégation spécifique est donné en figure-2-30, pour le cas de l'ovalbumine.

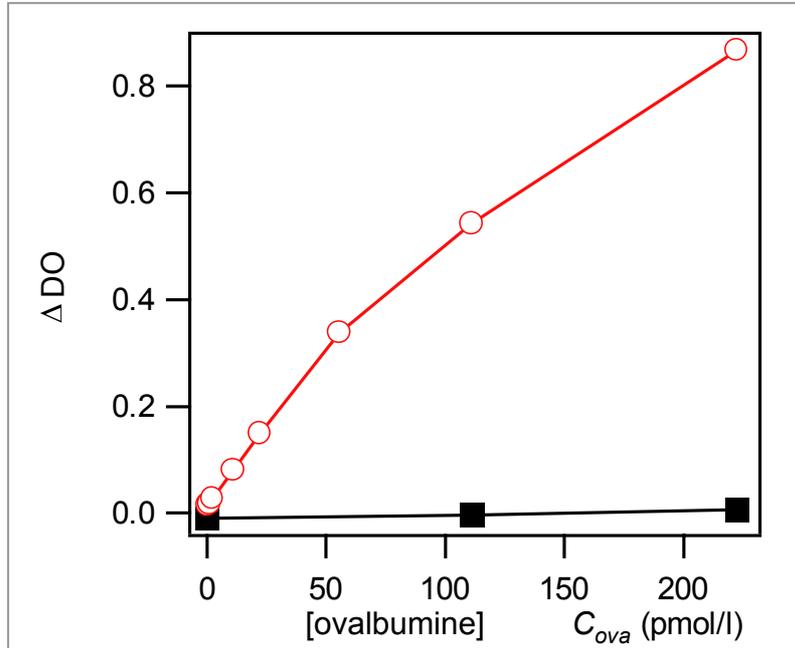


Figure-2-30 : Influence du champ magnétique sur l'agrégation spécifique. Evolution du ΔDO en fonction de la concentration en ovalbumine dans le cas sans champ magnétique (■) et dans le cas où l'on applique un champ de 20 mT pendant 5 min. Expériences réalisées par C. Rouzeau (Baudry et al., 2006).

2-4-Conclusion

Un savoir-faire indiscutable a été acquis au laboratoire au cours de ces dernières années et a abouti à diverses utilisations des particules magnétiques. L'étude des interactions colloïdales et l'application au diagnostic immunologique en sont quelques exemples. Dans ce contexte, forts de la connaissance des propriétés de ces particules magnétiques, nous avons élaboré une nouvelle méthode d'étude de réactions entre un ligand et un récepteur situés sur des surfaces en regard. Le principe et la validation de cette méthode sont présentés dans le chapitre qui suit.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEMAND, J. F., BENSIMON, D. & CROQUETTE, V. (1996). The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. — *Science* 272, 797-797.
- BAUDRY, J., BERTRAND, E., ROUZEAU, C., GREFFIER, O., KOENIG, A., DREYFUS, R., COHEN-TANNOUJJI, L., GOUBAULT, C., BRESSY, L., VINCENT, L., LEQUEUX, N. & BIBETTE, J. (2004). Colloids for studying molecular recognition. — *Annales De Chimie-Science Des Materiaux* 29, 97-106.
- BAUDRY, J., ROUZEAU, C., GOUBAULT, C., ROBIC, C., COHEN-TANNOUJJI, L., KOENIG, A., BERTRAND, E. & BIBETTE, J. (2006). Tuning the recognition rate between grafted ligands and receptors with magnetic forces. — soumis à publication.
- BERTRAND, E., BIBETTE, J. & SCHMITT, V. (2002). From shear thickening to shear-induced jamming. — *Physical Review E* 66.
- BIBETTE, J. (1993). Monodisperse Ferrofluid Emulsions. — *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 122, 37-41.
- BOHREN, C. F. & HUFFMAN, D. R. (1998). Absorption and Scattering of Light by Small Particles. — John Wiley and sons, INC.
- BRESSY, L. (2003). Elasticité et Adhésion du Caséinate Adsorbé aux Interfaces. — Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI.
- BROWN, W. F. (1979). Thermal Fluctuations of Fine Ferromagnetic Particles. — *Ieee Transactions on Magnetics* 15, 1196-1208.
- COHEN-TANNOUJJI, L., BERTRAND, E., BRESSY, L., GOUBAULT, C., BAUDRY, J., KLEIN, J., JOANNY, J. F. & BIBETTE, J. (2005). Polymer bridging probed by magnetic colloids. — *Physical Review Letters* 94, N° 038301.
- DALGLEISH, D. G. & LEAVER, J. (1991). The Possible Conformations of Milk-Proteins Adsorbed on Oil-Water Interfaces. — *Journal of Colloid and Interface Science* 141, 288-294.
- DEBYE, P. (1929). Polar Molecules. — Chemical Catalog Compagny.
- DREYFUS, R. (2005). Filaments magnétiques : application à la conception de capteurs de forces et de nageurs microscopiques artificiels. — Université Paris VI.
- FANG, Y. & DALGLEISH, D. G. (1993). Dimensions of the Adsorbed Layers in Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Caseins. — *Journal of Colloid and Interface Science* 156, 329-334.
- FANNIN, P. C. (1998). Wideband measurement and analysis techniques for the determination of the frequency-dependent, complex susceptibility of magnetic fluids. — *Advances in Chemical Physics* 104, 181-292.
- FANNIN, P. C., COHEN-TANNOUJJI, L., BERTRAND, E., GIANNITSIS, A. T., MAC OIREACHTAIGH, C. & BIBETTE, J. (2006). Investigation of the complex susceptibility of magnetic beads containing maghemite nanoparticles. — *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 303, 147-152.
- FANNIN, P. C., RELIHAN, T. & CHARLES, S. W. (1995). Investigation of Ferromagnetic-Resonance in Magnetic Fluids by Means of the Short-Circuited Coaxial Line Technique. — *Journal of Physics D-Applied Physics* 28, 2003-2006.
- FANNIN, P. C., SCAIFE, B. K. P. & CHARLES, S. W. (1986). New Technique for Measuring the Complex Susceptibility of Ferrofluids. — *journal of Physics E-Scientific Instruments* 19, 238-239.
- GOSSE, C. & CROQUETTE, V. (2002). Magnetic tweezers: Micromanipulation and force measurement at the molecular level. — *Biophysical Journal* 82, 3314-3329.

CHAPITRE II

- GOUBAULT, C. (2004). Colloïdes magnétiques : auto-organisation et applications biologiques. — Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI.
- HERMANSON, G. T. (1996). Bioconjugate techniques. — Academic Press, London.
- ISRAELACHVILI, J. (1992). Intermolecular and Surface Forces. — Academic Press, London.
- KIM, J. H., KWON, S. K. & KIM, C. O. (2002). Adhesion of photosensitizer to ferrofluids for use in photodynamic therapy. — *Nanotechnology* 13, 610-614.
- KNELLER, N. & WOHLFARTH, E. P. (1966). Effect of Thermal Fluctuations on the An hysteretic Process in Ferromagnetic Fine-Particle Assemblies. — *Journal of Applied Physics* 37, 4816-4818.
- KOENIG, A., HÉBRAUD, P., GOSSE, C., DREYFUS, R., BAUDRY, J., BERTRAND, E. & BIBETTE, J. (2005). Magnetic Force Probe for Nanoscale Biomolecules. — *Physical Review Letters* 95, N° 128301.
- LEAL CALDERON, F., STORA, T., MONDAIN MONVAL, O., POULIN, P. & BIBETTE, J. (1994). Direct Measurement of Colloidal forces. — *Physical Review Letters* 72, 2959-2962.
- MASON, T. G. & BIBETTE, J. (1996). Emulsification in viscoelastic media. — *Physical Review Letters* 77, 3481-3484.
- MONDAIN MONVAL, O., ESPERT, A., OMARJEE, P., BIBETTE, J., LEAL CALDERON, F. & JOANNY, J. F. (1998). Polymer-Induced Repulsive Forces: Exponential Scaling. — *Physical Review Letters* 80, 1778-1781.
- MONTAGNE, F., MONDAIN-MONVAL, O., PICHOT, C., MOZZANEGA, H. & ELAISSARI, A. (2002). Preparation and characterization of narrow sized (o/w) magnetic emulsion. — *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 250, 302-312.
- NEEL, L. (1949). Théorie du traînage magnétique des ferromagnétiques en grains fins avec application aux terres cuites. — *Annales de Géophysique* 5, 99-136.
- ORTEGA-VINUESA, J. L. & BASTOS-GONZALEZ, D. (2001). A review of factors affecting the performances of latex agglutination tests. — *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* 12, 379-408.
- PANKHURST, Q. A., CONNOLLY, J., JONES, S. K. & DOBSON, J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. — *Journal of Physics D-Applied Physics* 36, R167-R181.
- PRICE, C. P. & NEWMAN, D. J. (1997). Principles and Practice of immunoassay (second edition). — Macmillan Reference LTD, London.
- TRONC, E., EZZIR, A., CHERKAoui, R., CHANEAC, C., NOGUES, M., KACHKACHI, H., FIORANI, D., TESTA, A. M., GRENECHE, J. M. & JOLIVET, J. P. (2000). Surface-related properties of gamma-Fe₂O₃ nanoparticles. — *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 221, 63-79.
- TRONC, E. & FIORANI, D. (2002). Ferrofluids: Magnetic Properties. — *Encyclopaedia of Materials: Science and Technology*, 1-6.
- VIKHOLM, I. & ALBERS, W. M. (1998). Oriented Immobilization of Antibodies for Immunosensing. — *Langmuir* 14, 3865-3872.
- ZHANG, H. & WIDOM, M. (1995). Field-Induced Forces in Colloidal Particle Chains. — *Physical Review E* 51, 2099-2103.

3- UNE NOUVELLE MÉTHODE D'ÉTUDE DE CINÉTIQUES DE RÉACTIONS LIGAND-RÉCEPTEUR ENTRE SURFACES EN REGARD

Ce chapitre est consacré à la présentation et à la validation d'une nouvelle méthode de mesure de cinétiques de réactions ligand-récepteur entre surfaces en regard. Dans un premier temps, nous décrirons l'élaboration de cette méthode grâce à une utilisation adéquate des particules magnétiques. Dans un second temps, en étudiant le couple streptavidine-biotine, nous chercherons à valider les principes généraux de notre méthode. Enfin, dans un dernier temps, nous discuterons les résultats obtenus qui apportent un certain éclaircissement sur les paramètres pertinents qui régissent les cinétiques de réactions en « 2D ».

3-1- Cadre général de l'utilisation de particules magnétiques pour l'étude expérimentale de cinétiques de réactions ligand-récepteur

Dans ce paragraphe, nous nous concentrons sur les concepts généraux sur lesquels repose la méthode, qui exploite les propriétés magnétiques des particules et le formalisme des réactions entre surfaces en regard.

3-1-1- Description d'une réaction ligand-récepteur entre deux particules magnétiques

Nous décrivons, dans un premier temps, la réaction entre un ligand L et des récepteurs R qui sont liés à la surface de particules magnétiques, dans le cas où un champ magnétique est appliqué. Nous considérons un système constitué d'un couple de particules voisines, l'une portant un unique ligand, l'autre présentant un certain nombre de récepteurs. Cette situation est schématisée en figure-3-1. Dans la suite, un tel couple de particules sera appelé un « couple de particules réactives ».

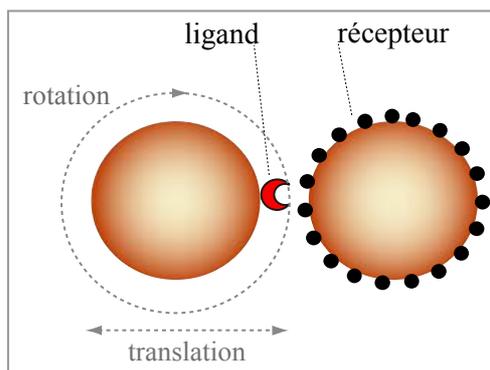


Figure 3-1 : Réaction entre un ligand et des récepteurs situés sur des particules magnétiques voisines, en présence d'un champ magnétique. Définition d'un « couple de particules réactives ».

La compréhension de la réaction entre L et R s'inscrit dans le cadre d'une réaction dite « 2D ». En effet, les deux entités réactives sont attachées à des surfaces en regard. Ce sont les densités surfaciques en ligand et récepteurs qui sont pertinentes pour la description de la cinétique de réaction. Les constantes cinétiques considérées seront donc des constantes dites « 2D ».

Les coefficients de diffusion des réactifs sont intimement liés à la liberté de mouvement des particules et à la manière dont les molécules sont accrochées aux surfaces. En imposant un champ magnétique, les particules sont maintenues en moyenne à une distance fixe l'une de l'autre, mais, elles ne sont pas pour autant privées de tout mouvement. Elles conservent une liberté de rotation et de translation. Les degrés de liberté de translation sont donnés par les fluctuations dans un puits de potentiel colloïdal unidimensionnel. Les degrés de liberté rotationnels sont fixés par les propriétés magnétiques des particules, plus précisément par la nature des mécanismes de relaxation de leur moment magnétique (chapitre 2 § 2-1-5) (Fannin et al., 2006). Nous avons vu que, les particules et leur moment magnétique étant complètement décorrélés, les particules étaient soumises à un mouvement brownien de rotation. Sous champ, les particules ont donc un coefficient de diffusion rotationnelle brownienne, noté D_{rot} . En ce qui concerne la diffusion des réactifs, tout se passe donc comme si les réactifs diffusaient sur la surface des particules avec leur propre coefficient de diffusion bidimensionnel imposé par D_{rot} . L'aire dans laquelle les réactifs « diffusent » est donc l'aire d'une particule, notée A_b . Nous verrons plus loin l'influence de ces degrés de liberté de rotation et de translation des particules sur la fréquence de rencontre entre ligand et récepteur.

Du fait de la géométrie du système, composé de deux surfaces *sphériques* en regard, le ligand et les récepteurs ne peuvent se rencontrer sur la totalité de l'aire accessible par la diffusion. Une aire de contact, notée A_C , est alors définie. Il s'agit de l'aire dans laquelle les réactifs

peuvent se rencontrer et réagir, cette aire est une portion de l'aire totale où les réactifs peuvent diffuser (figure-3-2). Cette aire de contact sera estimée par la suite.

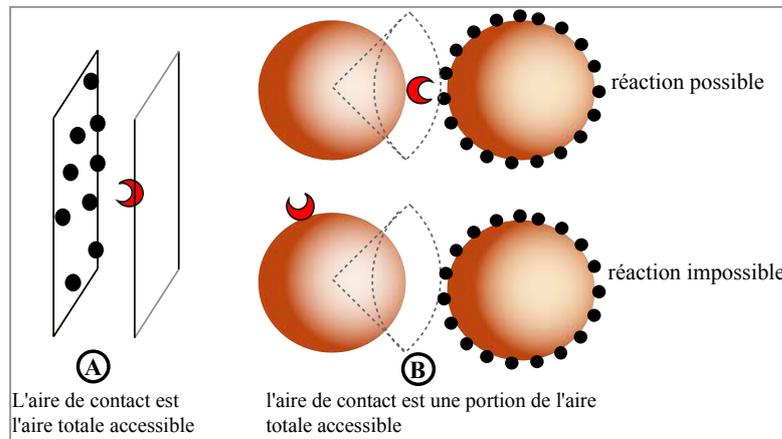


Figure-3-2 : Comparaison de l'aire de contact dans le cas où les surfaces sont planes et entièrement en regard (A) et dans le cas où les surfaces sont sphériques (B).

Pour un couple de particules réactives, nous cherchons à écrire la probabilité d'adhésion entre particules. Cette probabilité d'adhésion dépend de la réaction entre les entités L et R :



où C est le complexe ligand-récepteur.

Nous avons considéré, ici, un unique ligand par couple de particules réactives. Ainsi, la probabilité d'adhésion est directement l'évolution du nombre de complexe puisqu'il varie entre 0 et 1. L'évolution temporelle du nombre de complexe (ou lien) est facilement déduite de la cinétique de réaction. En effet, avec un faible nombre de réactifs, la vitesse de formation du lien s'écrit :

$$\frac{1}{A_C} \frac{dN_C}{dt} = k_+^{2D} \frac{N_L}{A_b} \cdot \frac{N_R}{A_b} - k_-^{2D} \frac{N_C}{A_C} \quad (3-2)$$

où A_b est l'aire d'une particule, N_R est le nombre total de récepteurs par particule, N_L est le nombre total de ligand par particule, égal à 1, N_C est le nombre de complexe. Le lien ne pouvant être réalisé que dans l'aire de contact, le nombre de complexe formé est rapporté à l'aire de contact A_C . Nous considérons le cas où le nombre de récepteurs est relativement grand, c'est-à-dire que $N_R \gg N_L$. Ainsi, N_R reste constant et N_L varie de la façon suivante :

$$N_L(t) = 1 - N_C(t) \quad (3-3)$$

On pose $m_R = \frac{N_R}{A_b}$, m_R est donc la densité en récepteurs et l'équation (3-2) s'écrit :

$$\frac{dN_C}{dt} = k_+^{2D} m_R \frac{A_C}{A_b} - \left[k_+^{2D} m_R \frac{A_C}{A_b} + k_-^{2D} \right] \cdot N_C(t) \quad (3-4)$$

Pour intégrer cette équation, on pose les conditions aux limites suivantes:

$$N_C(0) = 0 \quad \text{et} \quad \frac{dN_C}{dt}(\infty) = 0 \quad (3-5)$$

Ainsi, on peut déterminer l'évolution temporelle du nombre de complexe, donnée par :

$$N_C(t) = N_C(\infty) \cdot [1 - \exp(-k_1 t)] \quad (3-6)$$

avec k_1 la constante cinétique apparente et $N_C(\infty) = \frac{1}{1 + \left(K_A^{2D} m_R \frac{A_C}{A_b} \right)^{-1}}$

où K_A est l'affinité du couple considéré.

La constante cinétique apparente vaut :

$$k_1 = \left[k_+^{2D} m_R \frac{A_C}{A_b} + k_-^{2D} \right] \quad (3-7)$$

La probabilité de former un lien, $p(t)$, est donc :

$$p(t) = N_C(t) = p_\infty [1 - \exp(-k_1 t)] \quad (3-8)$$

avec la probabilité p_∞ égale à $N_C(\infty)$, qui est bien inférieur à 1. $p(t)$ est directement la probabilité d'adhésion entre particules.

Cas où il y a plus d'un ligand par couple de particules réactives

L'expression de la probabilité d'adhésion $p(t)$ peut être généralisée dans le cas où il y a plusieurs ligands, avec une densité m_L , mais où le nombre de ligands reste petit devant le nombre de récepteurs. La probabilité d'adhésion entre particules est **la probabilité de former le premier complexe C**. En effet, les autres liens n'ont que très peu de chance de se former car les molécules ne diffusent pas vraiment sur la surface des particules. Contrairement au cas des membranes liquides, les molécules ne diffusent pas indépendamment les unes des autres mais en « bloc », car elles sont fixées à des endroits précis de la surface. De ce fait, dans le cas d'un faible nombre de ligands, il y a peu de chance que plusieurs ligands puissent se trouver simultanément dans l'aire de contact.

CHAPITRE III

La probabilité de former le premier lien $p_1(t)$ a été calculée par Chesla *et al.*, dans le cas où le nombre de récepteurs est grand devant le nombre de ligands (Chesla *et al.*, 1998), et d'après la résolution des équations maîtresses établies par Cozens-Roberts *et al.* (Cozens-Roberts *et al.*, 1990). La probabilité d'adhésion entre particules $p(t)$ est donnée par la probabilité de former le premier lien qui s'écrit :

$$p(t) = p_1(t) = p(1 - \exp(-kt)) \quad (3-9)$$

où p est la valeur limite :

$$p = \frac{1}{1 + (m_R m_L A_C K_A^{2D})^{-1}} \quad (3-10)$$

et où k est la constante cinétique apparente :

$$k = m_R m_L A_C k_+^{2D} + k_-^{2D} \quad (3-11)$$

Cette expression est analogue à celle calculée dans le cas limite où $N_L = 1$ (3-7). *C'est cette constante qui sera la principale mesure expérimentale accessible avec notre méthode.*

Notons ici que le premier lien se forme d'autant plus vite que l'aire de contact est grande et qu'il y a de récepteurs et de ligands à la surface des particules. Cette dernière remarque sera vérifiée expérimentalement. Nous remarquons également qu'il s'agit bien d'une probabilité comprise entre 0 et 1, dont la valeur limite aux temps longs dépend des conditions expérimentales et de l'affinité du couple ligand-récepteur considéré.

3-1-2- Chaînes magnétiques en « régime doublets » : un grand nombre de réactions ligand-récepteur en parallèle

En pratique, nous travaillons avec des suspensions de particules magnétiques, soit avec un grand nombre de particules. Nous ne pouvons pas considérer un unique couple de particules réactives, présenté au paragraphe précédent. Mais, nous cherchons à réaliser des conditions expérimentales où un grand nombre de couples de particules réactives peut être envisagé de façon indépendante. Pour des couples indépendants, la réaction entre ligand et récepteurs au niveau d'un couple n'a pas d'influence sur les autres couples et la description proposée précédemment reste valide. Pour se placer dans une telle situation, des conditions expérimentales précises sont imposées.

Toutes les particules magnétiques sont recouvertes uniquement de récepteurs, et est ajouté à cette suspension un faible nombre, noté N , de ligands « divalents », c'est-à-dire capables de s'accrocher avec deux récepteurs. En solution, les ligands se fixent rapidement sur les particules. Le temps caractéristique de cette étape sera estimé plus loin (§ 3-2-2). Le nombre total de ligands introduits (N) est fixé inférieur au nombre total de particules. Ainsi, statistiquement, seules quelques particules vont fixer à leur surface un unique ligand qui ne présentera alors plus qu'un seul site libre d'accrochage avec un récepteur. Après cette étape d'incubation entre ligands et particules, un champ magnétique est appliqué. Les particules s'organisent alors sous forme de chaînes au sein desquelles les quelques particules portant un unique ligand sont voisines de particules portant des récepteurs. Encore une fois, si le nombre total de ligands introduits est petit devant le nombre total de particules, statistiquement une particule portant un ligand est entourée de 2 particules portant uniquement des récepteurs. Autrement dit, dans ces conditions expérimentales, des « couples de particules réactives » sont répartis indépendamment dans les chaînes (figure-3-3).

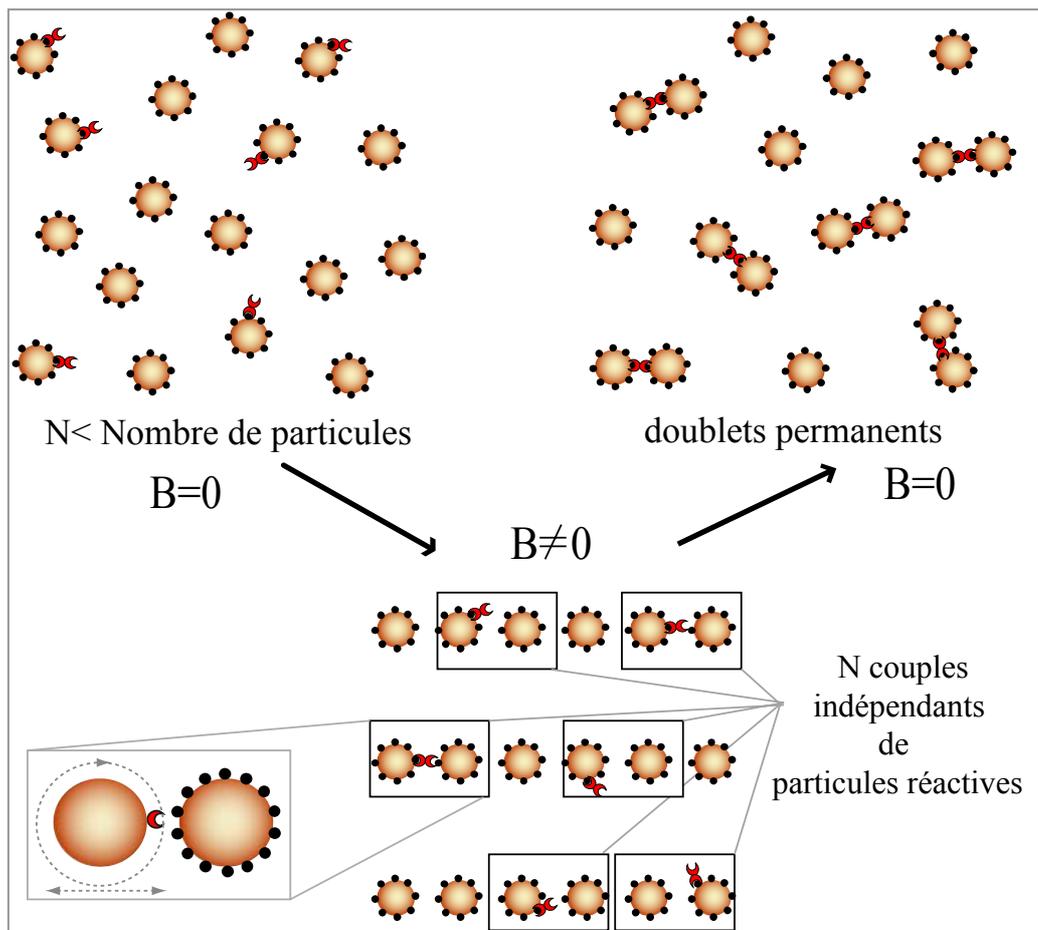


Figure-3-3 : Définition du « régime doublets »

CHAPITRE III

Ces conditions expérimentales sont appelées conditions de « régime doublets ». En effet, après réaction et une fois le champ magnétique interrompu, la suspension consiste en un mélange de particules individuelles et de doublets, liées de façon spécifique. Cette démarche est résumée par la figure-3-3.

Le nombre de doublets formés après une étape de champ magnétique peut être déterminé par turbidimétrie, c'est-à-dire par la mesure de la variation de densité optique, méthode détaillée au chapitre 2 (§ 2-3-2). Si la suspension colloïdale de particules magnétiques est suffisamment stable, les doublets ne se forment que pendant l'application du champ magnétique. En mesurant le nombre de doublets formés, noté $D(t)$, en fonction du temps t passé sous champ, nous sommes en mesure de suivre une cinétique de formation de doublets spécifiques.

A présent, nous cherchons à relier la cinétique de formation de doublets à la probabilité d'adhésion pour un couple de particules réactives, et donc à la cinétique de la réaction entre ligands et récepteurs. Comme nous venons de le remarquer, sous champ et dans les conditions de « régime doublets », les couples de particules réactives sont indépendants. Leur nombre est proche du nombre N de ligands introduits initialement. Pour un couple, la probabilité d'adhésion est $p(t)$, probabilité établie préalablement. Les couples étant indépendants, chacun peut former un doublet avec cette même probabilité $p(t)$. Ainsi, au niveau de la suspension de particules, le nombre total de doublets formés, après une étape de champ magnétique, est directement N , le nombre de couples, multiplié par la probabilité d'adhésion $p(t)$. Il existe donc un lien direct entre l'évolution du nombre de doublets et les constantes cinétiques de la réaction ligand-récepteur, intervenant dans $p(t)$:

$$D(t) = Np(t) = \frac{N}{1 + (m_R m_L A_C K_A^{2D})^{-1}} \left(1 - \exp\left(- (m_R m_L A_C k_+^{2D} + k_-^{2D}) t\right) \right) \quad (3-12)$$

3-2- Conditions expérimentales et validation de la méthode

Nous présentons ici les conditions expérimentales et les modes opératoires nécessaires au bien fondé de cette méthode. Nous verrons ensuite comment il est possible d'en valider les principes.

3-2-1- Mesure d'une cinétique de réaction « 2D » : conditions expérimentales

3-2-1-a- Évaluation des temps caractéristiques

Nous souhaitons mesurer des cinétiques de réactions ligand-récepteur en mesurant des cinétiques de formation de doublets. Les temps caractéristiques des autres phénomènes pouvant limiter notre méthode sont évalués ici.

Temps de capture des ligands

Le temps nécessaire pour que les particules recouvertes de récepteurs capturent les ligands est estimé pour déterminer la durée requise pour l'étape d'incubation. Pour cela, nous estimons le temps de réaction entre des ligands et des récepteurs libres en solution. En effet, bien que les récepteurs soient liés aux particules, les ligands libres imposent la cinétique (comme dans le cas du biacore (§ 1-3-1)). Pour la constante de réaction, $k_{capture}$, nous prenons la valeur caractéristique des constantes d'association entre protéines, c'est-à-dire $10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$.

Les récepteurs étant majoritaires, leur concentration $[R]$ reste constante et le temps caractéristique de capture est le temps de demi réaction, $\tau_{1/2}$, qui s'écrit :

$$\tau_{1/2} = \frac{1}{k_{capture} [R] \cdot \ln 2} \quad (3-13)$$

La concentration en récepteurs est donnée par le nombre total de récepteurs. Pour une concentration caractéristique en particules de $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, et pour une centaine de récepteurs par particule, le temps de demi réaction est estimé à 2.5 min.

Ainsi, pour les protocoles expérimentaux, les ligands sont incubés entre 5 et 10 minutes avec les particules.

Temps d'agrégation entre particules sans champ magnétique

Nous estimons ici, de façon simplifiée, le temps caractéristique de réaction entre des particules recouvertes d'un ligand et des particules recouvertes de récepteurs en l'absence de champ magnétique. Les particules sont assimilables à des « grosses » protéines qui doivent réagir sous contrainte de spécificité stérique (§ 1-3-2). La valeur caractéristique de la constante de réaction est prise égale à la valeur « classique » de $10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$. La concentration de l'espèce réactive est de l'ordre de $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Nous reprenons l'expression (3-13) pour le temps demi réaction, avec $[R]$ égale à $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Le temps caractéristique de formation de doublets sans champ est estimé à 4 heures.

CHAPITRE III

De plus, les interactions colloïdales répulsives, responsables de la stabilité de la suspension, diminuent la fréquence de rencontre entre ligands et récepteurs à la surface des particules. En tenant compte de ces répulsions colloïdales, le temps caractéristique de formation de doublets sans champ est encore beaucoup plus grand.

Ces remarques permettent de justifier que les processus de formation de doublets avec et sans champ sont découplés (nous verrons dans la suite que le temps de réaction sous champ est de l'ordre de quelques minutes). La figure-2-30 du paragraphe 2-3-2-c illustre bien ce découplage. *Le temps de réaction considéré par la suite est donc uniquement le temps sous champ.*

Temps de formation des chaînes sous champ

L'organisation des particules sous champ magnétique peut être une étape limitante. La réaction ligand-récepteur ne commence que lorsque les particules forment des couples de particules réactives, c'est-à-dire dès que les particules forment des dimères résultant de l'attraction magnétique. Après la formation des dimères les chaînes grandissent. Cette croissance n'a pas de réelle influence dans le cadre de notre approche. Cela engendre une certaine incertitude aux temps courts, instants où les particules sont entourées majoritairement que d'une seule particule et non de deux. Le temps caractéristique de cette étape est donc le temps moyen de formation de dimères, noté τ_D .

Ce temps τ_D a été évalué par Prosmislow *et al.*, en l'interprétant comme le temps nécessaire pour que deux particules se rencontrent sous l'effet de la diffusion et avec une composante attractive (Promislow et al., 1995). Un volume de capture est défini pour rendre compte de la composante attractive. Ce volume correspond à une sphère de rayon r_C , distance inter particule à partir de laquelle l'énergie magnétique est dominante, c'est-à-dire supérieure à l'énergie thermique kT . Le calcul de la diffusion des particules en présence d'une attraction magnétique fait alors intervenir une fraction volumique effective, ϕ_{eff} , qui inclut le volume de capture. Le temps de formation de dimère est donné par :

$$\tau_D = \frac{1}{6} \frac{R^2}{D\phi_{eff}} = \frac{R^2}{24 \left[\left(\frac{1}{3}\right)^{1/2} - \left(\frac{1}{3}\right)^{3/2} \right] \lambda D \phi} \quad (3-14)$$

où R est le rayon des particules et D leur coefficient de diffusion. λ est le rapport de l'énergie magnétique sur l'énergie thermique qui s'écrit :

$$\lambda = \frac{E_{magn}}{kT} = \frac{\pi R^3 \chi^2 B^2}{9kT \mu_0} \quad (3-15)$$

Pour des particules de 100 nm de rayon à un champ de 20 mT, λ vaut environ 25. Pour une fraction volumique caractéristique de $4 \cdot 10^{-4}$, le temps caractéristique de formation des dimères est d'environ 50 ms. Ce temps est d'autant plus petit que le champ magnétique est grand. D'un point de vue pratique, les temps d'incubation sous champ seront largement supérieurs à τ_D . Le temps de formation des chaînes sous champ ne sera donc jamais limitant dans nos expériences.

3-2-1-b- Protocole expérimental dans le cas où la constante de dissociation est négligeable

Dans le cas où le temps de vie du complexe C est long devant le temps caractéristique d'observation, c'est-à-dire quand il n'y a pas de dissociation des liens pendant le temps de détection des doublets, nous allons montrer qu'un **même** échantillon de particules magnétiques peut être utilisé pour suivre une cinétique. Le protocole de mesure est alors le suivant. On impose à un échantillon, dont les concentrations en particules et en ligands vérifient les conditions de « régime doublets », un champ magnétique pendant un certain temps. Après interruption du champ, on mesure le nombre de doublets formés au cours de cette étape. Pour suivre une cinétique de formation de doublets, on réalise cette manipulation un certain nombre de fois pour le **même** échantillon (figure-3-4).

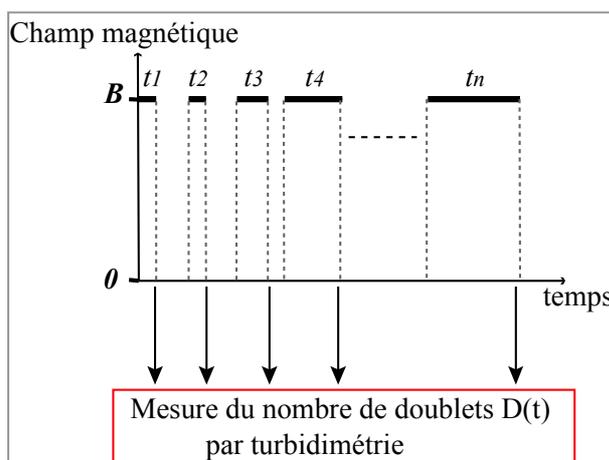


Figure-3-4 : Protocole suivi pour mesurer une cinétique de formation de doublets, dans le cas où le complexe ligand-récepteur a une durée de vie grande devant le temps de détection.

Montrons ici que ce protocole de mesure ne « perturbe » pas la cinétique de formation de doublets, et que nous avons une relation simple entre cette cinétique et la probabilité d'adhésion $p(t)$.

CHAPITRE III

Le nombre de doublets formés, $D(t)$, est une fonction du temps t , temps cumulé sous champ ($t = t_1 + \dots + t_i + \dots + t_n$, où t_i est la durée de la $i^{\text{ème}}$ étape). Nous avons vu que la probabilité d'adhésion entre particules suit une loi du « premier ordre » : $p(t) = p(1 - \exp(-kt))$. Initialement, il y a N couples indépendants, le nombre de doublets formés pendant la première étape sous champ est :

$$D(t_1) = Np(t_1) = N(1 - \exp(-kt_1)) \quad (3-16)$$

Pour le second intervalle de temps, on forme $D(t_2)$ doublets de plus, c'est-à-dire :

$$D(t_2) = (N - D(t_1)).p(t_2) = (N - D(t_1)).p(t - t_1) \quad (3-17)$$

En effet, pour cette seconde étape, il n'y a que $N - D(t_1)$ couples réactifs en parallèle et la réaction est « reprise initialement », on considère donc la probabilité sur un temps $t_2 = t - t_1$. Si les doublets ne se défont pas pendant le temps de mesure, le nombre total de doublets après la seconde étape est $D(t) = D(t_1) + D(t_2)$, d'où :

$$D(t) = N - N \exp(-kt_1) + [N - N + N \exp(-kt_1)].[1 - \exp(-k(t - t_1))]$$

soit $D(t) = N - N \exp(-kt_1) + N \exp(-kt_1) - N \exp(-kt_1) \exp(-k(t - t_1))$

puis $D(t) = N(1 - \exp(-kt)) = Np(t) \quad (3-18)$

Après une seconde étape, le nombre total de doublets s'écrit encore $D(t) = Np(t)$. De la même façon, cette relation peut être établie après chaque intervalle t_i , et elle est vérifiée quel que soit le choix des intervalles de mesure. Cette propriété est caractéristique du fait que $p(t)$ soit associée à une cinétique du premier ordre (une exponentielle). Pour une autre expression de $p(t)$, le choix des intervalles de mesure conduirait à différentes expressions pour $D(t)$. La propriété d'indépendance des mesures vis-à-vis de l'échantillonnage, c'est-à-dire du choix des intervalles de mesure, est donc une façon de vérifier que l'on a bien affaire à une cinétique du 1^{er} ordre. L'effet de l'échantillonnage sera vérifié expérimentalement.

Nous en concluons ici que déterminer $D(t)$, la cinétique de formation de doublets, conduit directement à déterminer $p(t)$, qui dépend des constantes cinétiques k_-^{2D} et k_+^{2D} du couple ligand-récepteur.

CHAPITRE III

3-2-1-c Protocole expérimental dans le cas où la constante de dissociation n'est plus négligeable

Dans le cas où les liens se dissocient sur un temps comparable au temps caractéristique de détection des doublets, le protocole de mesure de cinétique est modifié pour conserver une relation simple entre $D(t)$ et $p(t)$. La mesure de cinétique n'est plus réalisée avec un même échantillon car l'échantillonnage et le temps de mesure ont, dans ce cas, une influence sur l'allure de $D(t)$. Ainsi, une suspension de particules magnétiques vérifiant les conditions de « régime doublets » est divisée en autant d'échantillons qu'il faut d'étapes sous champ. Chaque échantillon i contenant N_i ligands ne reste qu'un temps t_i sous champ, qui permet la mesure de $D(t_i)$ égal à $N_i \cdot p(t_i)$. En divisant *une même solution*, on veille à ce que les N_i restent identiques pour tous les échantillons ($N_i = N$). Avec un échantillon par point de mesure, le nombre de doublets mesuré s'écrit aussi sous la forme : $D(t) = N p(t)$. Ce protocole n'est pas plus lourd que le premier mais, en revanche, beaucoup de produit est consommé.

3-2-2- Mesure d'une cinétique de réaction « 2D » : validation

3-2-2-a- Construction d'une cinétique de formation de doublets et premières validations

Ce paragraphe a pour but de présenter un exemple d'étude de cinétique. Le protocole expérimental est détaillé en décrivant les différentes étapes qui conduisent à la mesure d'une cinétique de formation de doublets. Une série de mesures est donnée pour l'étude d'un couple ligand-récepteur modèle : le couple streptavidine-biotine. Afin de valider les principes de cette nouvelle méthode, nous discuterons des caractéristiques des courbes obtenues.

Greffage des particules et dosage (connaissance de m_R)

La streptavidine est greffée de façon covalente à la surface des particules suivant le principe détaillé au paragraphe 2-3-1 et suivant un protocole donné en annexe-B. Le nombre de sites réactifs, ou la « binding capacity », est déterminé par un dosage en retour par fluorimétrie, en utilisant de la biotine-FITC (annexe-C). Dans la suite, on parlera du nombre de streptavidines par particule, qui correspond directement au **nombre de sites réactifs dosés**.

La biotine étant une petite molécule « monovalente », on utilise comme ligand de la BSA (*bovine serum albumine*) biotinyllée plusieurs fois. Le nombre de biotines par molécule de

CHAPITRE III

BSA est déterminé par un dosage par HABA-avidine (*EZ-Biotin quantification kit*, <http://www.piercenet.com/files/1423dh5.pdf>). Il est estimé à 12 biotines par BSA, ce qui est en accord avec les données du fournisseur (Sigma Aldrich).

Incubation des particules avec les ligands

Les particules recouvertes de streptavidines sont dispersées dans un tampon phosphate à 10mM et avec 0.4 % de F127, un tensioactif non ionique (annexe-B). A cette étape, la fraction massique en particules est de 0.08% ce qui correspond à une concentration en particules de près de $2 \cdot 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$. A 300 μL de suspension, on ajoute 300 μL d'une solution de BSA biotinylée (BSAb) de concentration connue. Dans l'exemple rapporté ici, trois échantillons sont étudiés en parallèle. Un premier échantillon est un « échantillon témoin », où de la BSA est ajoutée à la place de la BSA biotinylée. Les deux autres échantillons sont obtenus en ajoutant une solution de BSAb à $10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$ et une solution à $6 \cdot 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$. Dans ces conditions, le nombre N de ligands est inférieur au nombre total de particules : il y a entre deux et trois fois moins de ligands que de particules. Ainsi, on pense respecter les conditions de « régime doublets », sachant que la précision sur des concentrations aussi faibles en BSA est limitée. Les concentrations « effectives » en ligands sont sans doute plus faibles que celles estimées, d'autant plus que la BSA a tendance à s'adsorber aux interfaces, et donc aux parois des divers récipients utilisés au cours des différentes manipulations. Cette étape d'incubation est réalisée à température ambiante et dure une dizaine de minutes. Cette étape est réalisée en mélangeant des solutions de concentrations faibles et proches pour assurer une répartition homogène des ligands, c'est-à-dire pour éviter que des particules captent plus d'une BSAb.

Mesure de cinétique d'adhésion sous champ

Après l'étape d'incubation, la densité optique initiale (DO_i) des suspensions est mesurée à 700 nm, en utilisant un spectrophotomètre (Perkin Elmer). Puis, les échantillons sont placés dans un champ magnétique de 30 mT pendant un temps t (supérieur à τ_D). Le champ magnétique est créé par une bobine parcourue par un courant électrique. A l'issue de l'étape de champ magnétique, la densité optique des suspensions est mesurée ($DO(t)$). Une nouvelle étape de champ est imposée aux mêmes échantillons, et ainsi de suite. On procède de la sorte car le temps de vie du complexe streptavidine-biotine est estimé à plusieurs dizaines d'heures, ce qui est beaucoup plus grand que le temps caractéristique de mesure de densité optique, qui est d'une dizaine de secondes (§ 3-2-1-b). L'évolution des différences de densités optiques,

$\Delta DO(t) = DO(t) - DO_i$, est reportée sur la figure-3-5 pour les trois échantillons. Les échantillons ont été étudiés en parallèle, le spectrophotomètre étant adapté pour une lecture sur plusieurs voies.

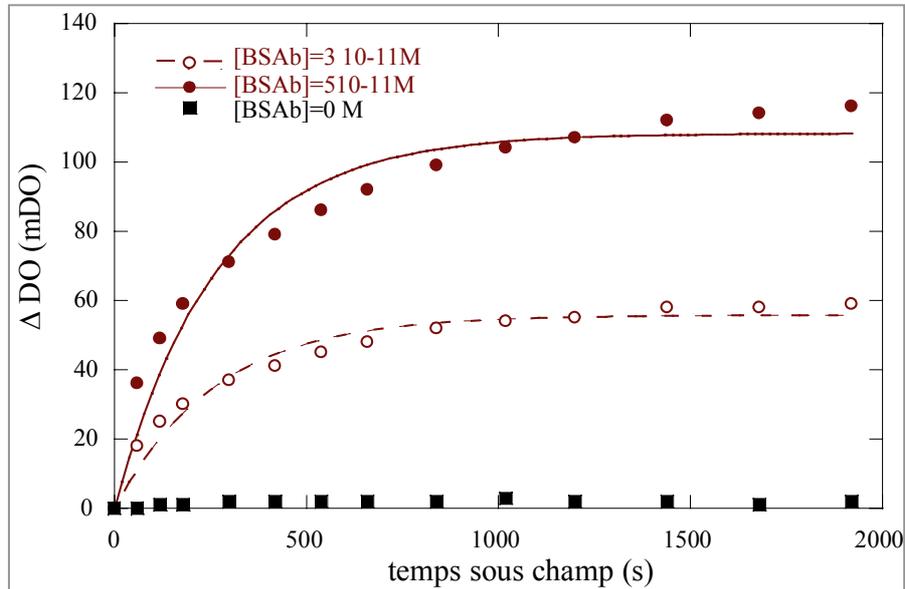


Figure-3-5 : Evolution de la différence de densité optique en fonction du temps passé sous un champ magnétique de 30 mT pour des suspensions de particules (greffées avec 90 streptavidines par particule) à une fraction massique de 0.04%. ■ Pour un échantillon sans biotine. ○ Pour un échantillon avec 3 BSAb pour 10 particules. ● Pour un échantillon avec 1 BSAb pour 2 particules.

La densité optique de l'échantillon témoin reste stable après les étapes successives de champ magnétique. La variation de DO fluctue entre 0 et 3 mDO. En revanche, les échantillons incubés avec de la BSAb voient leur DO augmenter de façon significative au cours du temps passé sous champ. Ainsi, l'adhésion sous champ est un phénomène spécifique, réalisé par la reconnaissance entre une streptavidine et une biotine. Bien que le BSA soit biotinylée 12 fois, il n'y a aucune chance que plusieurs biotines se lient à des streptavidines, car les streptavidines sont trop espacées les uns des autres sur la surface des particules. L'agrégation de l'échantillon témoin donne l'amplitude des adhésions d'origine non spécifique et rend compte d'une des sources d'incertitude dans nos mesures. Ceci fixe la valeur minimale des barres d'erreur, pour chaque point, à 3 mDO.

Ajustement des cinétiques : détermination d'une constante cinétique apparente

Pour les adhésions spécifiques, l'évolution temporelle de la différence de DO est ajustée par une mono exponentielle de la forme $n(1 - \exp(-kt))$. Les paramètres ajustables sont n , la valeur au plateau, ou de saturation, et k , la constante cinétique apparente. Avec une

CHAPITRE III

concentration finale de $5 \cdot 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$ en BSAb, la différence de DO saturée à 115 mDO et la constante cinétique est de $3.7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Pour une concentration en BSAb de $3 \cdot 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$, la saturation est à 60 mDO et la constante cinétique est de $3.8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

Validation : mesure d'une cinétique de formation de doublets indépendants

Dans les conditions de « régime doublets », la différence de DO est directement proportionnelle au nombre de doublets formés (chapitre 2, § 2-3-2). On peut traduire la quantité ΔDO en un nombre de doublets. En effet, nous avons vu au chapitre 2 que

$$\Delta DO = \frac{1}{2.3} (\alpha - 2) C_{DIFF}^1 \rho_2 l \quad (\rho_2 \text{ est une densité volumique en doublets, } \alpha \text{ est donné par un}$$

calcul de Mie et caractérise la diffusion d'un doublet à partir de la diffusion d'un singulet).

Ce calcul est très sensible à la valeur de α . Pour $\alpha = 2.7$, le nombre de doublets formés correspond à 25% du nombre de ligands introduits. Nous trouvons donc moins de doublets qu'attendus, sachant que pour le couple streptavidine-biotine il n'y a pas de limitation

thermodynamique ($p = \frac{1}{1 + (m_R m_L A_C K_A^{2D})^{-1}} \sim 1$). Les sources d'incertitude résident, entre

autres, dans la détermination de α et dans la connaissance exacte de la concentration effective de BSAb, qui est, comme nous l'avons déjà mentionné, plus faible que celle réellement introduite. Par ailleurs, la polydispersité de la suspension représente une autre source d'incertitude. En effet, pour des concentrations comparables en BSAb, un signal de différence de DO n'est mesuré que si la suspension est assez monodisperse et a subi plusieurs étapes de tri. Ceci révèle l'importance de la distribution de la taille des particules sur la sensibilité de la détection des doublets. Dans l'exemple reporté ici, la suspension est triée mais la polydispersité « résiduelle » peut expliquer en partie la limitation de la sensibilité accessible.

Malgré ces incertitudes, nous remarquons que *la valeur de saturation, caractéristique du nombre de doublets formés, est bien proportionnelle, en première approximation, au nombre N de ligands introduits*. Cette observation valide le respect de la condition de « régime doublets » (relation (3-12)) pour laquelle le nombre de couples réactifs indépendants est proportionnel à N . Pour des concentrations plus importantes en ligands, la relation de proportionnalité n'est plus vérifiée car, statistiquement, des triplets sont aussi formés.

Nous remarquons également que la constante cinétique apparente est similaire pour les deux concentrations en BSAb. *Le temps caractéristique de l'adhésion ne dépend donc pas du*

CHAPITRE III

nombre de couples de particules réactives. Les couples sont donc bien indépendants. Cette deuxième observation valide aussi le respect de la condition de « régime doublets ». Nous en concluons que **la constante cinétique apparente est bien relative à la formation d'un doublet spécifique.**

Nous avons vérifié ici dans quelles mesures les conditions de « régime doublets » sont respectées et énoncé les deux raisons pour lesquelles nous pouvons attribuer la cinétique d'adhésion sous champ à la cinétique de formation d'un doublet spécifique de la réaction ligand-récepteur étudiée : **une valeur de saturation proportionnelle à la quantité de ligands introduits N** et **une constante cinétique apparente indépendante** de cette quantité N . Dans la suite, nous nous placerons à des concentrations en ligands autour de $3 \cdot 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$, pour une concentration en particules de $10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$. Des concentrations plus petites donnent des rapports signal sur bruit trop faibles. Pour des concentrations plus grandes, des triplets de particules sont formés : c'est certainement déjà un peu le cas pour l'échantillon avec $5 \cdot 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$ de BSAb, où la cinétique n'est pas parfaitement ajustée par une mono-exponentielle.

3-2-2-b- Influence de l'échantillonnage de la mesure sur l'allure des cinétiques de formation de doublets

Nous cherchons à valider la description de la probabilité d'adhésion par une mono-exponentielle (caractéristique d'une cinétique du 1^{er} ordre), et à vérifier l'hypothèse énoncée dans le cas où la constante de dissociation du complexe est négligeable. Avec ces deux conditions, nous avons établi que le choix des intervalles de mesure n'a pas d'influence sur les cinétiques mesurées (§ 3-2-1-b).

Cinq mesures de cinétique ont été réalisées pour cinq échantillonnages différents mais pour des conditions par ailleurs identiques. L'incubation sous champ magnétique a été réalisée par intervalles de 30 s, 1 min, 2 min, et 3 min. Une mesure de cinétique a également été conduite en prenant un nouvel échantillon par point de mesure (§ 3-2-1-b). Les cinétiques mesurées sont présentées en figure-3-6.

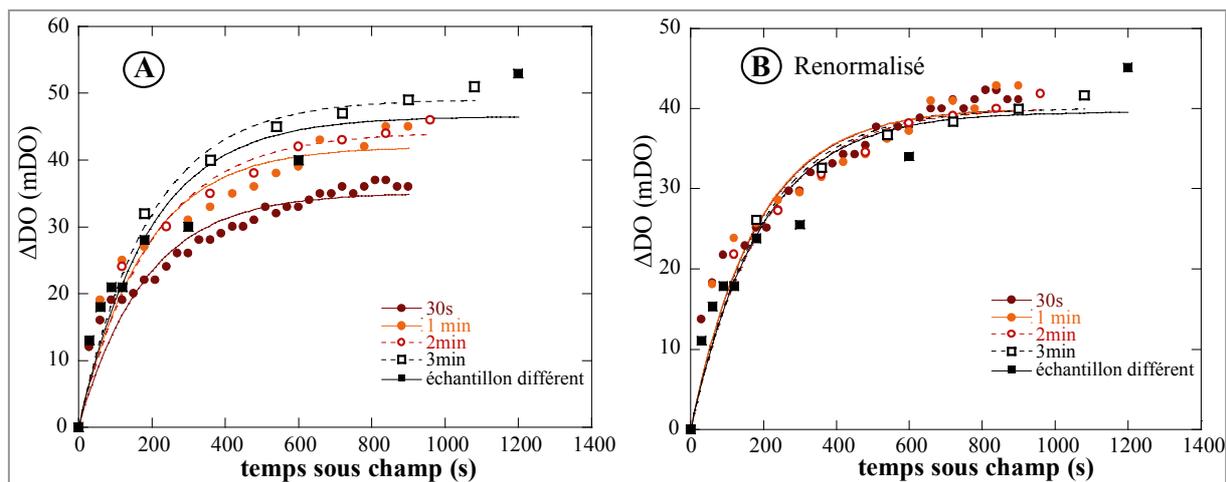


Figure-3-6 : Influence de l'échantillonnage de la mesure sur l'allure des cinétiques mesurées. La fraction massique des particules est de 0.04%, le taux de greffage de 125 streptavidines, la concentration en BSAb de $2 \cdot 10^{-11}$ mol.L⁻¹ et l'amplitude du champ magnétique de 30 mT. A- Les cinétiques brutes sont représentées. B- Les cinétiques sont renormalisées par la valeur au plateau.

Les valeurs aux plateaux varient entre 35 mDO et 49 mDO, soit avec 30% de variabilité. La valeur au plateau représente le nombre total de doublets formés et dépend directement du nombre de ligands introduits. Cette variabilité montre que la fabrication de solutions de BSAb à des concentrations de l'ordre de 10^{-11} mol.L⁻¹ est source de fluctuations importantes. En ce qui concerne la constante cinétique apparente, elle vaut en moyenne $5.3 \cdot 10^{-3}$ s⁻¹ et varie entre $5 \cdot 10^{-3}$ s⁻¹ et $5.6 \cdot 10^{-3}$ s⁻¹. Pour un même lot de particules, la constante cinétique apparente est donc déterminée à 12 % près. Cette variabilité est identique à celle observée pour un même échantillonnage mais avec différents échantillons. La différence de lot de particules (distribution de taille et variabilité de greffage) pourra constituer une autre source d'incertitude. Il y a plus de variabilité sur la valeur au plateau, représentant le nombre de doublets formés, que sur la constante cinétique apparente, qui témoigne de la vitesse de formation d'un doublet et qui est la grandeur pertinente que nous voulons interpréter. Notons également qu'il n'y a pas de corrélation entre l'échantillonnage et les valeurs observées. L'échantillonnage n'est donc pas un paramètre qui perturbe la mesure de la cinétique.

Cette série d'expériences permet de valider que la cinétique de formation de doublets est bien une cinétique du 1^{er} ordre. Cette étude a aussi permis d'illustrer la variabilité des mesures. Dans la suite, nous ne discuterons pas de la variabilité des valeurs aux plateaux. En effet, la grandeur qui nous intéresse est la constante cinétique apparente. Cette constante est directement reliée aux constantes cinétiques du couple ligand-récepteur présent à la surface des particules et fait l'objet des études suivantes.

3-3- Étude du couple streptavidine-biotine

3-3-1- Détermination d'une constante cinétique d'association

Nous étudions la constante cinétique apparente de formation de doublets pour en déduire des paramètres relatifs au couple ligand-récepteur. Ces paramètres seront dans la suite reliés aux caractéristiques physiques du système. Comme nous l'avons vu, la constante cinétique apparente dépend des constantes cinétiques du couple ligand-récepteur selon :

$$k = m_R m_L A_C k_+^{2D} + k_-^{2D}$$

Les influences de la densité en récepteurs et de la densité en ligands sont étudiées expérimentalement, et l'aire de contact sera évaluée afin de déterminer la constante cinétique d'association k_+^{2D} . Pour illustrer la démarche, la constante cinétique d'association du couple streptavidine-biotine est déterminée dans le cas où la streptavidine et la biotine sont directement accrochées à des surfaces colloïdales.

3-3-1-a- Influence de nombre de récepteurs (m_R)

Des cinétiques de formation de doublets sont conduites pour des particules greffées avec différentes quantités de streptavidines. Le nombre de streptavidines varie entre 30 et 200 par particule. Des taux de greffage plus grands sont difficiles à obtenir avec un couplage covalent. Comme nous l'avons déjà mentionné, le ligand est de la BSA biotinylée 12 fois. Un exemple de cinétiques obtenues pour trois taux de greffage est donné en figure-3-7.

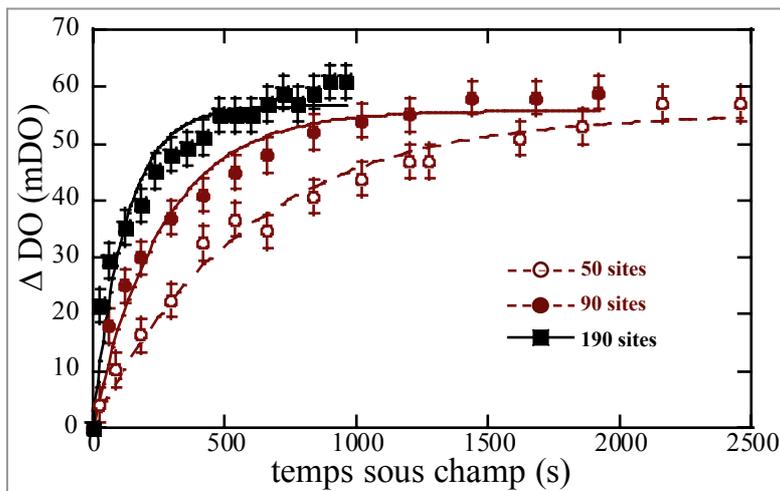


Figure-3-7 : Cinétique de formation de doublets pour trois taux de greffage : ○ 50 streptavidines par particules, ● 90 streptavidines par particules, ■ 190 streptavidines par particules. La concentration en BSA_b (12 biotines) est de $3 \cdot 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$, la fraction massique en particules de 0.04% et le champ magnétique de 30 mT.

La constante cinétique apparente est déterminée pour chaque cas. L'erreur sur le taux de greffage a été estimée d'après les courbes de dosage (§ 2-3-1). L'erreur sur la détermination de la constante cinétique apparente est évaluée en répétant les cinétiques sur différents échantillons. L'allure de la constante cinétique apparente en fonction du nombre de streptavidines par particule est reportée sur la figure-3-8.

Plus il y a de streptavidines à la surface des particules, plus les doublets se forment rapidement. Dans le domaine de taux de greffage considéré, la dépendance est linéaire comme la description de la méthode l'annonçait (figure-3-8).

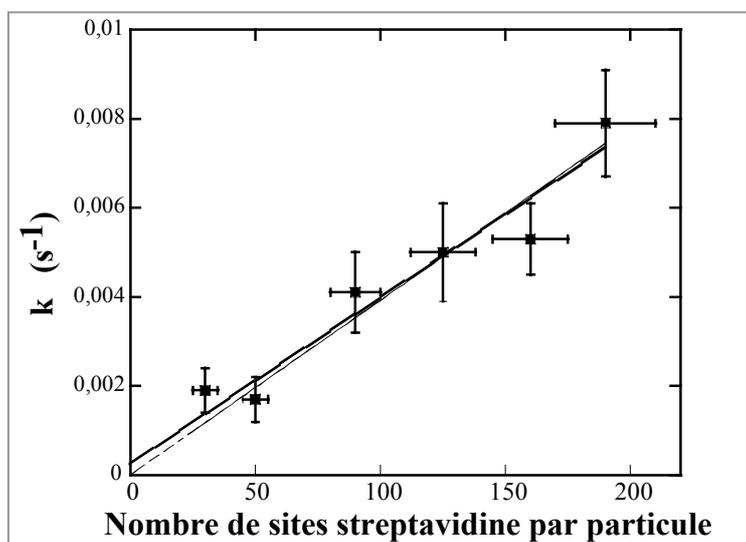


Figure-3-8 : Evolution de la constante cinétique apparente en fonction du nombre de streptavidines par particule (cas BSA_b 12 biotines). (---ajustement linéaire, — ajustement affine).

L'allure de la courbe conforte l'idée que la constante de dissociation est négligeable, avec une valeur maximale de $2 \cdot 10^{-4} s^{-1}$, déduite de l'ordonnée à l'origine. Cette valeur est tout de même trop faible pour être significative étant données les barres d'erreur.

3-3-1-b- Influence de la densité en « sites ligand » (m_L)

Il s'agit ici de vérifier que la quantité de biotines a aussi une influence sur la cinétique de formation de doublets. L'influence de m_L n'est pas aussi détaillée que celle de m_R , mais l'aspect qualitatif est abordé. Des cinétiques de formation de doublets sont réalisées pour de la BSA biotinylée 12 fois et de la BSA biotinylée 4 fois, toutes choses égales par ailleurs (figure-3-9).

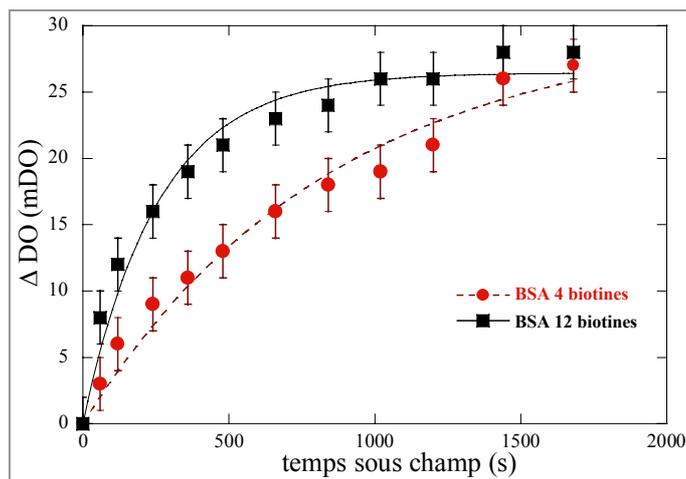


Figure-3-9 : Influence du nombre de sites réactifs du ligand. Les particules sont greffées avec 100 streptavidines, les solutions de BSA (avec 4 et 12 biotines) sont introduites pour une concentration finale de $2 \cdot 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$, la fraction massique des particules est de 0.04% et le champ magnétique de 30 mT.

Pour la BSA biotinylée 12 fois, la constante cinétique apparente est de $3.9 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, et pour la BSA biotinylée 4 fois elle est de $1.2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, pour des particules recouvertes de streptavidine identiques. Après avoir répété cette expérience, on peut établir qu'un doublet se forme près de 3 fois (entre 3 et 3.8) plus vite avec de la BSA biotinylée 12 fois ($m_L = 11/\text{particule}$) qu'avec de la BSA biotinylée 4 fois ($m_L = 3/\text{particule}$).

La relation de proportionnalité entre la constante cinétique apparente et le nombre de sites réactifs du ligand est donc confirmée. En revanche, le nombre absolu des sites réactifs du ligand n'est pas rigoureusement connu : pour une BSA biotinylée 12 fois, il n'est pas certain que l'ensemble des 11 sites libres soit accessible.

La dépendance de la constante cinétique apparente vis-à-vis des densités en ligands et en récepteurs (3-11) est donc bien vérifiée expérimentalement. Nous verrons par la suite (§ 3-4-2) une autre façon de la justifier théoriquement dans le cadre d'une réaction limitée par la diffusion.

3-3-1-c- Estimation de l'aire de contact

Comme nous l'avons évoqué au paragraphe 3-1-1, l'aire de contact est une portion de l'aire de la particule qui correspond à l'aire où les réactifs peuvent se rencontrer. Pour estimer cette aire, nous considérons les particules au contact. Cette situation permet d'estimer l'aire de contact maximale qui dépend alors de la taille du sandwich récepteur-ligand-récepteur. Cette configuration est dessinée en figure-3-10.

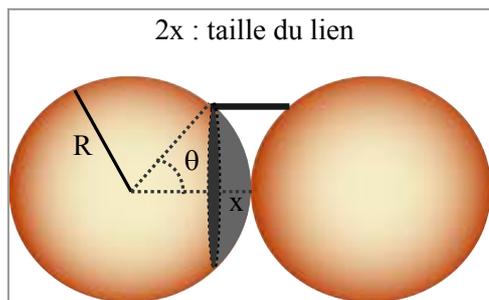


Figure-3-10 : Estimation de l'aire de contact quand les particules sont au contact, pour un lien (sandwich récepteur-ligand-récepteur) de taille $2x$ et des particules de rayon R .

L'aire de contact est le double de la calotte sphérique qui apparaît en grisée sur la figure-3-10, car les particules sont prises dans des chaînes et ont deux voisines. L'aire de contact est donc :

$$A_c = 2 \times 2\pi R^2 (1 - \cos \theta) = 4\pi R x \quad (3-19)$$

Dans le cas d'un sandwich streptavidine-BSA-streptavidine, le lien a une taille caractéristique de 15 nm. L'aire de contact représente alors 7% de l'aire de la particule. Les particules ayant été considérées au contact lors de cette estimation, cette valeur de 7% représente **la borne supérieure** pour la valeur de l'aire de contact.

3-3-1-d- Détermination de la constante cinétique d'association pour le couple streptavidine-biotine quand les réactifs sont directement fixés sur des surfaces en regard

D'après la pente de la courbe donnant la constante cinétique apparente en fonction du nombre de streptavidines, ou de m_R (figure-3-8), le paramètre $m_L A_c k_+^{2D}$ est estimé à $5 \cdot 10^{-6} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Comme nous l'avons remarqué, bien que nous sachions que la BSA utilisée est biotinylée 12 fois, la valeur exacte de la densité en biotine accessible n'est pas connue. Nous considérons alors deux cas limites. D'une part, si toutes les biotines sont accessibles ($m_L = 11$ /particule), alors cela donne comme limite : $A_c k_+^{2D} \approx 6 \cdot 10^{-8} \mu\text{m}^4 \cdot \text{s}^{-1}$. D'autre part, d'après la relation de proportionnalité entre la cinétique et le nombre de sites ligands, confirmée au paragraphe 3-3-1-b, on peut considérer que l'autre cas limite est le suivant : il s'agit du cas où l'on considère que, pour la BSA biotinylée 4 fois, il n'y a qu'une seule biotine accessible, ce qui correspond à $m_L = 4$ / particule pour le cas de la BSA biotinylée 12 fois. Cela donne comme limite : $A_c k_+^{2D} \approx 1.6 \cdot 10^{-7} \mu\text{m}^4 \cdot \text{s}^{-1}$.

CHAPITRE III

Nous pourrions arrêter la description de la constante cinétique d'association à ce paramètre. Il est cependant intéressant d'estimer la valeur de k_+^{2D} , ce qui permettra la comparaison aux valeurs mesurées avec les micropipettes (§ 1-4-3). Avec une aire de contact estimée à 7 % de l'aire d'une particule, soit environ $9 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2$, la constante cinétique d'association du couple streptavidine-biotine, directement fixé sur des surfaces colloïdales en regard, varie dans l'intervalle :

$$\underline{0.7 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} < k_+^{2D} < 1.8 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}}$$

L'absence de détermination expérimentale de A_C empêche d'obtenir une valeur absolue pour k_+^{2D} . Par contre, nous verrons que, si l'on garde cette aire A_C constante, notre méthode permet de comparer les valeurs de k_+^{2D} obtenues dans différentes configurations. A cet effet, nous retiendrons $1.3 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ comme valeur moyenne pour la présente configuration. Mais, plus généralement, nous considérerons que l'ordre de grandeur de la constante cinétique d'association pour le couple streptavidine-biotine, directement fixé sur les particules magnétiques, est de $10^{-5} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

3-3-2- Influence de la nature de la liaison entre réactifs et surfaces

Jusqu'à présent les récepteurs et les ligands étaient intimement liés à la surface des particules : soit directement par un couplage covalent, soit via une protéine rigide, la BSA, dont les « fluctuations » de mouvement par rapport à la surface sont extrêmement réduites. Cette configuration sera ainsi appelée « configuration symétrique rigide » en référence à la nature « rigide » de la liaison entre réactifs et surfaces. Nous nous penchons désormais sur des cas où les liaisons entre réactifs et surfaces sont sensiblement différentes. Ainsi, nous avons étudié des cas symétriques, où les deux entités sont reliées à la surface via une même molécule flexible, appelée « espaceur », et des cas asymétriques où seul le ligand est ainsi écarté de la surface. Les différentes configurations considérées sont schématisées en figure-3-11.

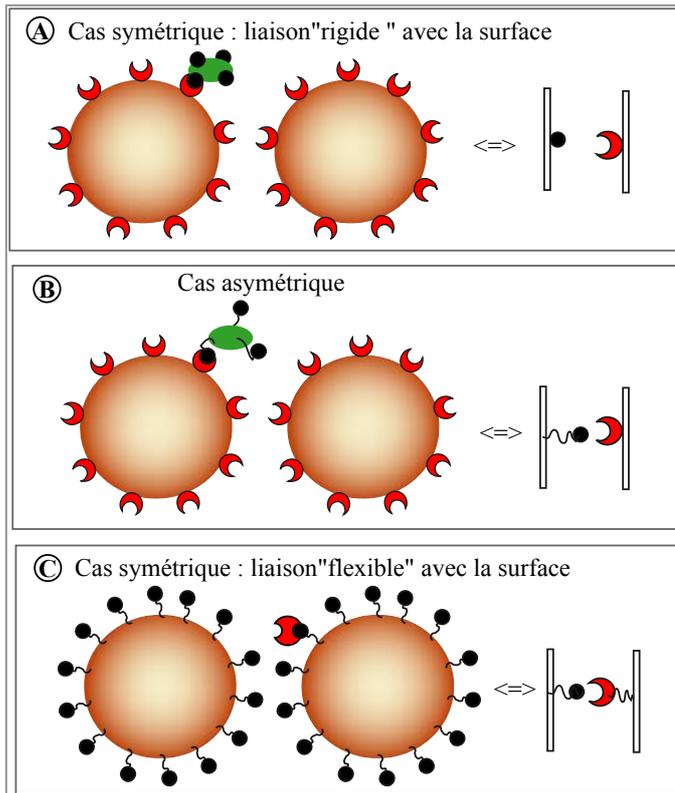


Figure-3-11 : Les différentes configurations étudiées en ce qui concerne la nature de la liaison entre les réactifs et la surface des particules. A- Situation symétrique avec des liaisons rigides. B- Situation asymétrique. C- Situation symétrique avec liaisons flexibles.

Cas asymétrique

Dans cette configuration, les streptavidines sont greffées de la même façon que précédemment, c'est-à-dire directement à la surface des particules. En revanche, les biotines sont présentées par des protéines via un petit polymère flexible. Ici, les ligands sont des protéines, des fragments Fc, biotinyllés via un polymère (figure-3-12-A). Deux types de polymères ont été étudiés : un PEG 3400 (polyéthylène glycol) et un polymère appelé LC-LC. Leur formule est donnée en figure-3-12.

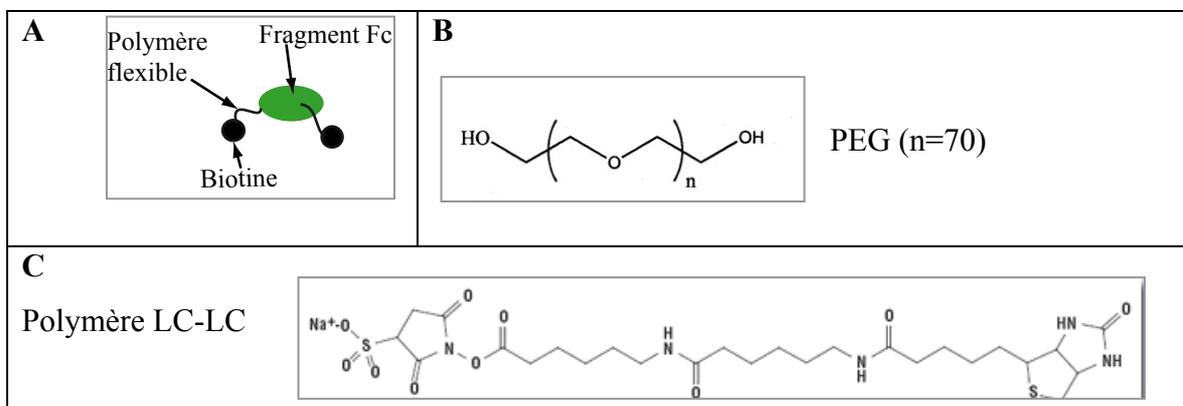


Figure-3-12 : A- Représentation d'un fragment Fc biotinyllé via un polymère flexible. B- Le polyéthylène glycol. C- Composition des polymères « LC-LC-biotines » qui sont à la surface des fragments Fc. (figure extraite de <http://www.piercenet.com>).

CHAPITRE III

Les polymères diffèrent essentiellement par leur longueur. La longueur d'extension totale est de 3 nm pour le « LC-LC-biotine » et d'environ 15 nm pour le « PEG-3400-biotine ». Les rayons de giration correspondants sont respectivement de 1 nm et de 2.5 nm (Zitserman et al., 2005). Les fragments Fc portant des biotines via des PEG ont été biotinylés via un protocole standard (EZ-link Sulfo-NHS-Biotinylation-Kit de chez *Pierce*). Les fragments Fc portant des LC-LC-biotines sont distribués par *Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC*. Le nombre de biotines par fragment Fc a été déterminé par un dosage HABA-avidine (respectivement 7 et 6). Cette fois, les biotines étant « éloignées » du fragment Fc, nous pouvons considérer qu'elles sont toutes accessibles.

Pour étudier l'influence de la nature de la liaison entre la biotine et la surface des particules, des cinétiques de formation de doublets pour des BSA « classiques » et pour des fragments Fc biotinylés via un polymère flexible sont mesurées en parallèle, toutes choses égales par ailleurs. Le nombre de streptavidines par particule est choisi relativement faible (50 par particule) pour **éviter les phénomènes de « rebouclage »**. On entend par « rebouclage » le fait qu'une biotine puisse se lier avec une streptavidine portée par la même particule au lieu de se lier avec celles portées par la particule voisine.

En considérant une même aire de contact que précédemment (7% de l'aire de la particule), la constante cinétique d'association k_+^{2D} est estimée à environ $2.9 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ dans le cas du LC-LC-biotine et à environ $4.2 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ pour le PEG-3400-biotine (courbes non montrées).

L'éloignement de seulement l'un des deux réactifs par une liaison flexible accélère donc l'adhésion, mais cet effet est relativement faible et dépend peu de la taille du polymère flexible utilisé.

Cas symétrique avec des liaisons flexibles

Pour réaliser cette « configuration symétrique flexible », nous avons choisi de recouvrir les particules avec la biotine via un polymère flexible. La biotine joue désormais le rôle de récepteur et la streptavidine le rôle de ligand. La streptavidine est incubée avec les particules et se fixe à une biotine de la particule. Ainsi, au niveau d'un couple de particules réactives, ligand et récepteurs sont éloignés de la surface via le même type de molécule dite « espaceur ».

Pour greffer la biotine à la surface des particules, nous avons exploité les propriétés des fragments Fc, qui s'adsorbent à la surface des particules pour des conditions de concentration

précises (figure-3-13). Nous avons utilisé le même type de fragments Fc biotinylés que précédemment (figure-3-12), mais le nombre de biotines par fragment Fc est plus faible (autour de 2).

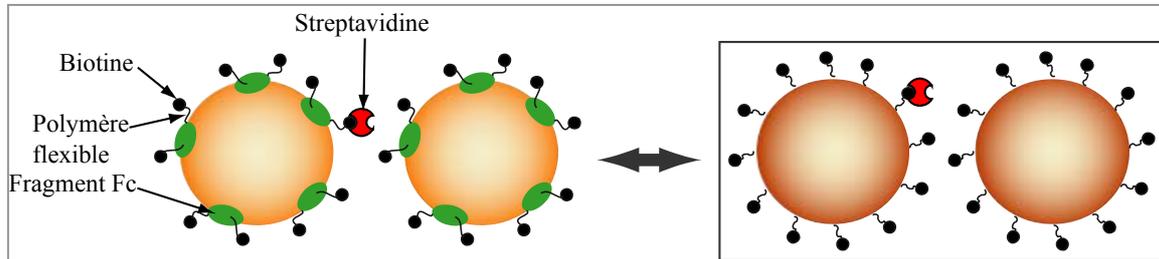


Figure-3-13 : Voie de greffage utilisée pour obtenir le cas symétrique où récepteurs et ligand sont reliés à la surface des particules par un polymère flexible.

Pour adsorber les fragments Fc biotinylés, les particules magnétiques sont incubées avec les fragments pendant une heure à température ambiante. La fraction massique en particules est fixée à 1% et la concentration en protéines à $1.5 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, soit 600 protéines par particule. Le milieu continu est un tampon phosphate à 10 mM, à un pH de 7.4, avec 0.4% de F127. Après incubation, les particules sont lavées et ne sont pas conservées plus d'une demi-journée car au delà les fragments Fc se désorbent (sur une demi-journée il n'y a pas de désorption significative). Le nombre de biotines présentes à la surface des particules est dosé en utilisant de la streptavidine fluorescente. Ce dosage permet de déterminer la quantité m_R . Puis, pour déterminer la valence de la streptavidine après accrochage avec une biotine de la particule, un deuxième dosage est réalisé. Pour ce deuxième dosage, les particules recouvertes de fragments Fc biotinylés sont saturées avec des streptavidines et le nombre de sites streptavidine accessibles est dosé par de la biotine FITC (figure-3-14). Ce second dosage permet alors d'estimer la quantité m_L .

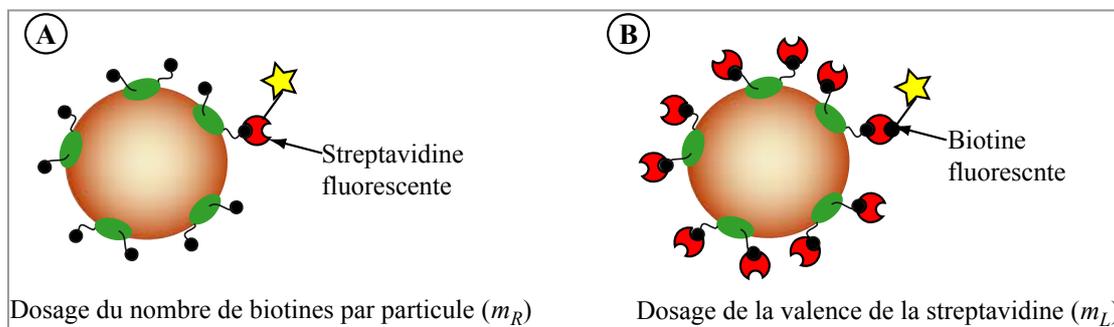


Figure-3-14 : A- Dosage du nombre de biotines par particule par de la streptavidine fluorescente (alexa 554). B- Détermination de la valence de la streptavidine une fois liée à une biotine de la particule. Pour cela, les particules sont saturées avec des streptavidines avec $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de streptavidines pour 1% de particules. Puis les particules sont lavées et le nombre de sites streptavidine est déterminé par un dosage en utilisant de la biotine FITC (§ 2-3-1-c).

CHAPITRE III

Expérimentalement, les deux dosages donnent le même nombre, ce qui prouve que la streptavidine n'a plus qu'un seul site accessible une fois capturée par les particules (table-3-1).

Nature des Fragments Fc	Nombre de streptavidines qui se fixent par particule	Nombre de biotines qui se fixent après saturation en streptavidines	Nombre de récepteurs par particule (m_R)	Nombre de ligands accessibles par particule (m_L)
LC-LC-biotine	70	60-70	70	1
PEG-3400-biotine	20	20-25	20	1

Table-3-1- Résultats des deux types de dosage pour déterminer m_R et m_L .

Pour cette configuration, les courbes de cinétique de formation de doublets sont réalisées suivant la même procédure (la spécificité de la formation de doublets est également vérifiée). Un exemple de courbes de cinétique est donné en figure-3-15, qui compare les configurations symétriques avec liaisons flexibles et avec liaisons rigides.

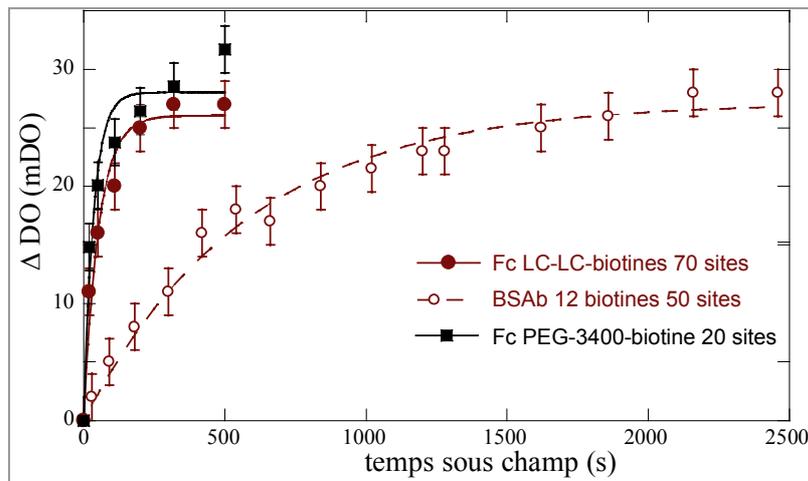


Figure-3-15 : Cinétique de formation de doublets avec 0.04% de particules sous un champ de 30 mT, pour différentes configurations symétriques. ■ Avec liaison à la surface par un PEG 3400, avec 20 biotines par particule et $3 \cdot 10^{-11}$ mol.L⁻¹ de streptavidines. ● Avec liaison à la surface par un « LC-LC » avec 70 biotines par particule et $5 \cdot 10^{-11}$ mol.L⁻¹ de streptavidines. ○ Avec la streptavidine directement greffée sur la surface des particules (50 sites) et avec $2 \cdot 10^{-11}$ mol.L⁻¹ de BSA biotinylée 12 fois.

D'après les valeurs de m_R et m_L , nous estimons la constante d'association k_+^{2D} pour chaque polymère utilisé (A_C toujours égale à 7% de l'aire d'une particule). Pour des liaisons via des PEG-3400, k_+^{2D} vaut $2.6 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Pour des liaisons via des polymères « LC-LC », k_+^{2D} vaut $4.7 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

CHAPITRE III

Relier les **deux** réactifs à la surface par une liaison **flexible** accélère donc fortement l'adhésion entre particules. De plus, cet effet est très **sensible à la taille du polymère flexible** utilisé pour la liaison.

Conclusion sur l'influence de la liaison entre réactifs et surfaces

Les constantes d'association mesurées dans les différentes configurations sont résumées dans la table-3-2. Les paramètres $A_c k_+^{2D}$ et k_+^{2D} sont donnés en considérant que l'aire de contact est identique, et égale à 7% de l'aire totale, dans chacun des cas. Notons que, dans la mesure où le lien varie grossièrement entre 15 nm et 20 nm entre les différentes configurations, l'aire de contact varie elle aussi très faiblement. Pour comparer les différentes constantes entre elles, nous avons attribué arbitrairement la valeur 1 à la configuration symétrique rigide, qui correspond au cas le plus lent.

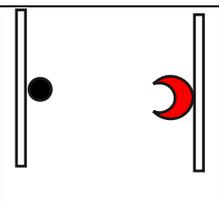
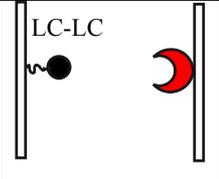
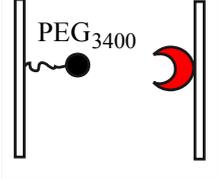
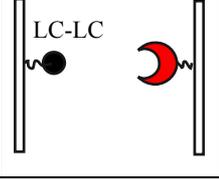
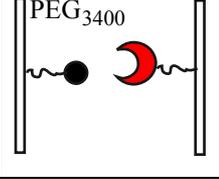
Configuration	pour un récepteur et un ligand	$A_c k_+^{2D}$	k_+^{2D}
	$k = 0.7 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $t = 1.9 \cdot 10^5 \text{ s}$	$1.1 \cdot 10^{-7} \mu\text{m}^4 \cdot \text{s}^{-1}$	$1.3 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 1
	$k = 1.7 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $t = 6 \cdot 10^4 \text{ s}$	$2.6 \cdot 10^{-7} \mu\text{m}^4 \cdot \text{s}^{-1}$	$2.9 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 2
	$k = 2.4 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ $t = 5 \cdot 10^4 \text{ s}$	$3.8 \cdot 10^{-7} \mu\text{m}^4 \cdot \text{s}^{-1}$	$4.2 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 3
	$k = 2.7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ $t = 3.7 \cdot 10^3 \text{ s}$	$4.2 \cdot 10^{-6} \mu\text{m}^4 \cdot \text{s}^{-1}$	$4.7 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 36
	$k = 1.5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ $t = 6.8 \cdot 10^2 \text{ s}$	$2.3 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^4 \cdot \text{s}^{-1}$	$2.6 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 200

Table-3-2 : Comparaison des caractéristiques cinétiques des différentes configurations concernant la nature de la liaison entre les réactifs et la surface des particules.

CHAPITRE III

L'observation la plus remarquable est que **l'adhésion n'est sensiblement accélérée que lorsque les deux réactifs à la fois sont éloignés de la surface par des liaisons flexibles.**

3-3-3- Effet du champ magnétique et de la nature de la surface

3-3-3-a- Influence du champ magnétique

En étudiant l'influence du champ magnétique, c'est l'influence de la distance moyenne entre particules qui est considérée. Pour traduire le champ magnétique en distance inter-particules, nous avons recours à la « machine de force » qui permet de reconstruire des profils force-distance entre particules (§ 2-2-1). Ces profils renseignent à la fois sur la distance moyenne entre particules et sur l'amplitude des forces qui s'y exercent. Pour des particules « non liées », nous pouvons estimer la distance qui sépare les surfaces dans la configuration de mesure de la cinétique d'adhésion. Le profil de force des particules « liées » témoigne de la nature du lien, c'est-à-dire de sa taille ou de sa rigidité (Koenig et al., 2005).

Profil de Force

Le profil de force des particules liées résulte d'une moyenne sur toutes les particules présentes dans le volume de détection. La mesure n'a donc de sens que si toutes les particules sont liées au sein des chaînes. Ainsi, un profil pour des particules liées est réalisé dans des conditions favorables à un « chaînage » total des particules magnétiques, ce qui est très différent des conditions de « régime doublets ».

Les échantillons subissent, en premier lieu, une étape de champ magnétique constant pendant une dizaine de minutes. Puis, les profils de force sont réalisés en appliquant une rampe croissante de champ magnétique. Mais, avant cette mesure du profil de force, le champ magnétique est interrompu. Cette interruption permet de distinguer les échantillons de particules liées des échantillons de particules non liées. En effet, pour des particules liées, les pics de Bragg ont une intensité constante car les particules ne se sont pas redispersées pendant l'interruption du champ magnétique. Dès la première valeur du champ magnétique, toutes les particules participent à la diffraction. Au contraire, quand les particules ne sont pas liées, elles se redispersent pendant l'interruption du champ et quand le profil de force est réalisé l'intensité des pics de Bragg évolue : elle augmente avec l'intensité du champ (chapitre 2, figure-2-14-A). Notons que l'interruption du champ magnétique est cependant de courte

durée, pour éviter une trop grande désorientation des éventuelles chaînes permanentes lors de cette étape.

Des profils de force ont été réalisés pour des particules recouvertes de streptavidines et incubées avec 0, 10 ou 50 BSAb par particule. Le milieu continu est un tampon phosphate où la force ionique totale est maintenue à 10 mM. Les profils de force obtenus sont donnés en figure-3-16. Le profil obtenu pour les particules non liées, c'est-à-dire sans BSAb, est appelé « profil de référence ».

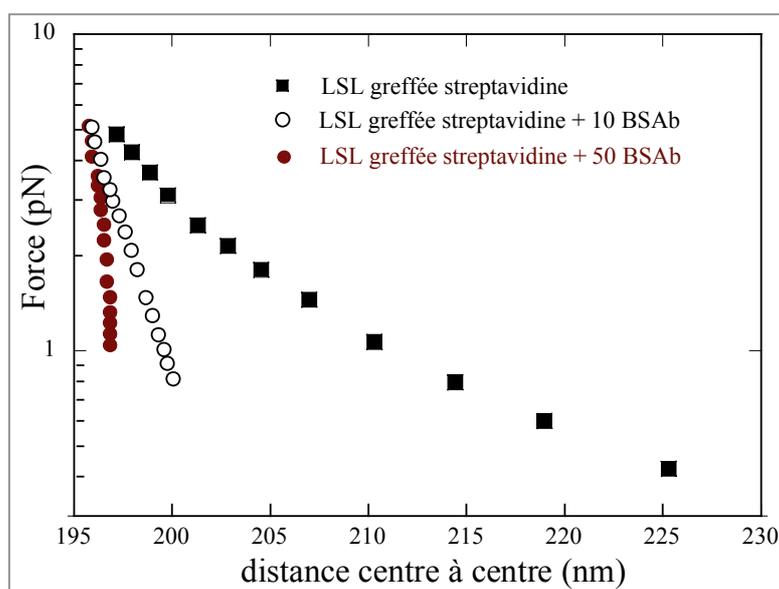


Figure-3-16 : Profil de force après une étape de 10 min sous 30 mT pour : ■ des particules recouvertes de streptavidines (160 par particule), ○ pour les mêmes particules incubées avec de la BSAb (12 biotines) avec un rapport de 10 BSAb par particule et ● avec un rapport de 50 BSAb par particule.

Comme nous l'avons déjà remarqué au chapitre 2, l'origine des répulsions du profil de référence est à la fois stérique et électrostatique. La force répulsive mesurée est proche d'une exponentielle, dont la portée est de 7 nm. Cette portée n'est pas assimilable à une longueur de Debye, qui vaut 3 nm pour une force ionique de 10 mM.

Pour 10 BSAb et 50 BSAb par particule, les particules forment de longues chaînes permanentes. Ceci a été vérifié par une observation par microscopie optique et conforté par l'observation des pics de Bragg, dont l'intensité reste constante pendant la mesure du profil.

D'après les travaux de Koenig *et al.* (Koenig et al., 2005), le profil entre particules liées témoigne de la nature du lien entre particules. Si le profil est « en dessous » du profil de référence, le lien entre particules est étiré (pour une même distance la force totale est moins

répulsive) et pour des profils « au dessus », le lien est comprimé (pour une même distance la force totale est plus répulsive). Le point de croisement entre les profils donne la configuration du lien au « repos ». Dans le cas considéré ici, le lien est toujours étiré. Les profils sont différents pour 10 BSAb et 50 BSAb, ce qui montre l'effet de la présence de liens multiples entre particules : plus il y a de liens, plus le profil est abrupt (plus il est difficile de les étirer). En prolongeant les trois profils, ils se croiseraient en un point à une distance centre à centre de 195 nm, qui correspond à la distance au repos des liens. Pour un sandwich streptavidine-BSA-streptavidine de 15 nm, on trouve un diamètre de particules (cœur magnétique + couche dense de polymère) de 180 nm, ce qui est cohérent avec les études précédentes (§ 2-1-3). Pour 5 BSAb par particule (courbe non montrée), les particules ne sont pas toutes liées, ainsi on attribue le profil pour 10 BSAb à environ un « unique lien » en moyenne entre particules.

Influence du champ magnétique sur la constante cinétique apparente

Jusqu'à présent les cinétiques de formation de doublets ont été réalisées pour un champ magnétique de 30 mT. Pour cette amplitude de champ magnétique, la distance centre à centre entre particules est de 205 nm en moyenne. Mais les particules fluctuent autour de leur position d'équilibre, ce qui rend la rencontre entre ligand et récepteur possible. L'influence du champ magnétique sur la constante cinétique apparente a fait l'objet d'une étude pour deux taux de greffage pour les configurations symétriques flexibles (figure-3-17).

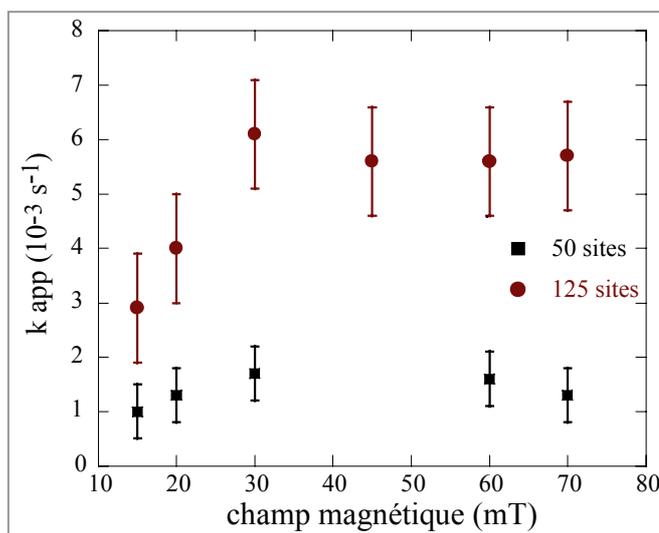


Figure-3-17 : Influence de l'intensité du champ magnétique sur la constante cinétique apparente pour deux taux de greffage : 50 et 125 sites streptavidines par particule.

Pour les faibles champs (entre 10 et 30 mT), les doublets se forment d'autant plus vite que le champ magnétique est fort. Puis, la constante cinétique apparente se stabilise à partir de 20-30 mT. Entre les champs faibles et les champs forts, la variation de la constante ne dépasse pas un facteur deux, ce qui est peu significatif, étant données les barres d'erreur.

L'intensité du champ magnétique n'est donc pas un paramètre crucial pour la réaction :

les particules sont assez proches pour réagir dès les premières valeurs de champ pour lesquelles les chaînes se forment. Cette tendance a été observée pour les différentes configurations étudiées

3-3-3-b- Influence de la nature de la surface

Les particules magnétiques sont recouvertes d'une couche de polymère, qui se divise en une couche dense et des cheveux de polymères étendus dans la solution. La nature exacte de cette couche n'a pas pu être caractérisée. Pour justifier le fait que les polymères n'interfèrent pas avec la reconnaissance entre ligand et récepteur, nous avons aussi étudié la cinétique de formation de doublets pour des particules non polymérisées.

Pour des particules non polymérisées, les streptavidines sont directement adsorbées à la surface des particules (annexe-B). Le dosage des sites streptavidine ainsi que la mesure de cinétique de formation de doublets sont conduits comme précédemment. Les configurations symétriques rigides et flexibles ont été étudiées.

Pour des particules non polymérisées dans une configuration symétrique avec liaisons rigides (BSA biotinyllée 12 fois), $m_L A_C k_+^{2D}$ vaut $5.9 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui est très proche de $5 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, valeur trouvée pour des particules polymérisées. De la même façon, pour une configuration symétrique avec liaisons flexibles, la constante d'association, k_+^{2D} , est estimée à $2.7 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ contre $2.6 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour des particules polymérisées.

Nous en concluons que la nature de la surface des particules, c'est-à-dire la présence ou non de chaînes de polymères, n'a pas d'influence sur la cinétique de formation de doublets. **Les chaînes de polymères ne perturbent donc pas la reconnaissance entre ligand et récepteur.**

3-3-3-c- Evaluation d'une constante cinétique de dissociation

Une valeur limite de la constante de dissociation, $2 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$, a été évaluée en considérant l'ordonnée à l'origine pour la courbe donnant la constante cinétique apparente k en fonction du nombre de récepteurs (figure-3-8). Cependant, cette détermination reste très imprécise étant données nos barres d'erreurs.

En suivant la densité optique après interruption du champ magnétique, nous pouvons également évaluer la constante de dissociation. La différence de DO mesurée après une étape de champ magnétique est proportionnelle au nombre de doublets formés, si les conditions de « régime doublets » ont été respectées. Une décroissance de la DO est attribuable à une séparation des doublets. Suivre la différence de DO en fonction du temps t , temps après interruption du champ, permet donc de suivre le nombre de doublets qui persistent après un temps t . Pour des liens uniques entre chaque doublet, cela revient à suivre le nombre de liens persistants après un temps t . Pour des liens uniques et indépendants, ce nombre suit une décroissance exponentielle (Zhu et al., 2002). Le temps caractéristique de la décroissance est l'inverse de la constante de dissociation du lien.

Les liens se défont alors qu'ils sont supportés par des particules magnétiques en l'absence de champ. Les particules sont répulsives, il s'exerce donc une force entre elles, dont l'amplitude peut être évaluée d'après les profils de force précédents. Pour connaître la force qui s'applique sur le lien après arrêt du champ, il suffit de connaître la distance, à champ nul, entre particules liées et de se reporter au profil de force de référence. Cette démarche est résumée sur la figure-3-18. La force qui s'exerce sur le lien pendant la mesure est estimée à 3 pN.

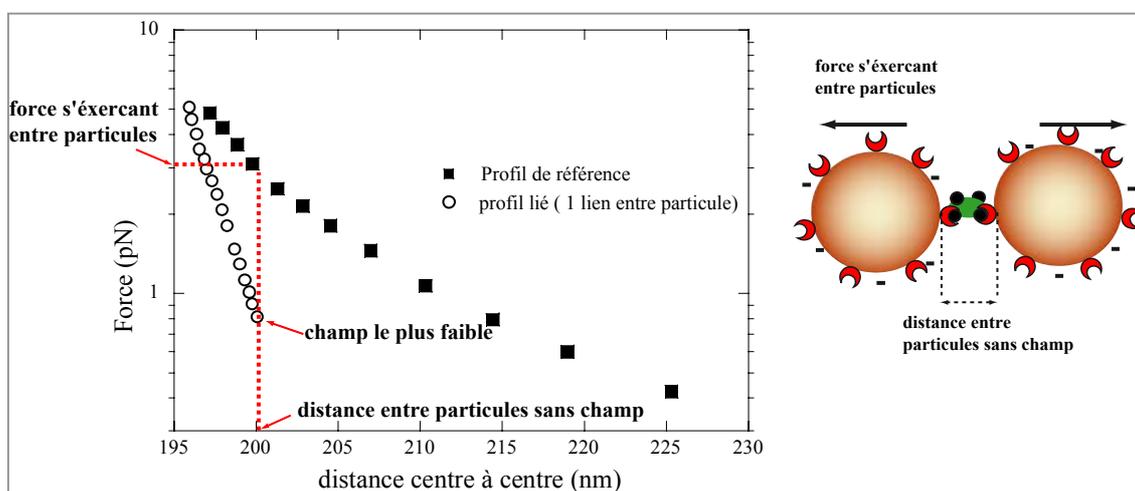


Figure-3-18 : Démarche pour déterminer la force caractéristique qui s'exerce sur le lien en l'absence de champ magnétique.

Pour déterminer la constante de dissociation du lien streptavidine-biotine, un exemple de suivi de DO après interruption du champ est donné en figure-3-19. La décroissance de DO est attribuée à la séparation des doublets car la sédimentation des particules, qui appauvrirait le volume diffusant en particules, est beaucoup plus lente (estimée à plusieurs heures). La

séparation des doublets est le reflet de la rupture de liens uniques en parallèle, car les doublets ont été formés dans les conditions de « régime doublets ».

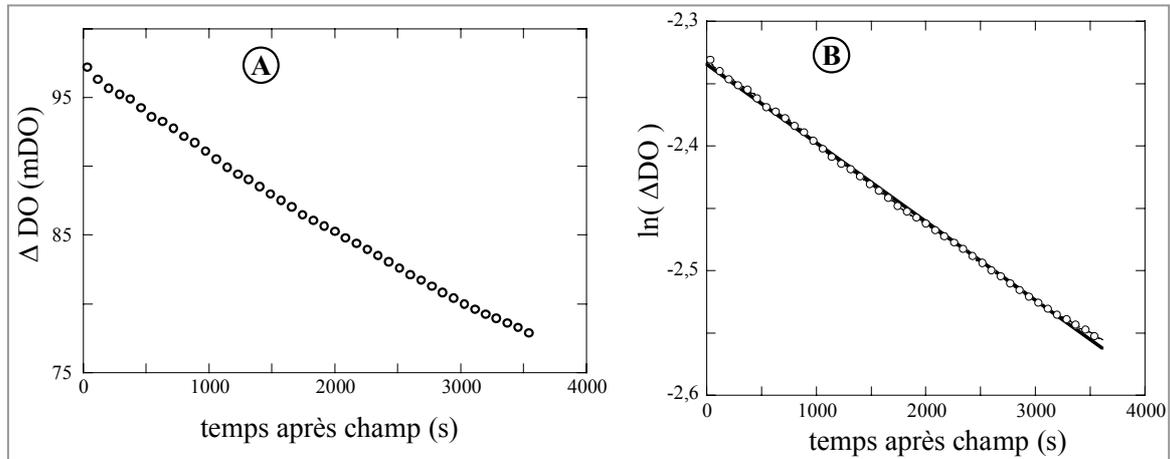


Figure-3-19 : A- Suivi de la différence de DO après interruption du champ magnétique (étape de 10 min) pour des particules recouvertes de streptavidines et reliées par de la BSAb (12 biotines) dans les conditions de régime doublets. B- Le logarithme du delta de DO est considéré pour évaluer la constante de dissociation du lien.

Une décroissance exponentielle est observée avec une constante de temps de $7 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, soit un temps caractéristique de $1.4 \cdot 10^4 \text{ s}$ pour la durée de vie du lien soumis à une force d'environ 3 pN. Nous retrouvons ici un ordre de grandeur cohérent avec les travaux de Pincet *et al.* (Pincet & Husson, 2005). Comme cette constante est évaluée pour une seule force, contrairement aux techniques qui mesurent des constantes de dissociation, il est difficile de comparer cette valeur avec les valeurs de la littérature, en effet, pour extrapoler à force nulle, il faudrait être capable de faire varier la force exercée. De plus, sans champ magnétique, rien ne nous assure que la force appliquée sur le lien soit colinéaire avec le lien. La force est dirigée selon un axe passant par les centres des particules, mais, les mouvements des particules l'une par rapport à l'autre sont soumis aux fluctuations thermiques dès que la champ est interrompu, rien ne garantit que le lien soit dans la même direction que la force. On peut très bien envisager que le lien soit sollicité en cisaillement, selon une sorte « d'effet levier ».

Cette méthode reste donc peu adaptée à la détermination précise de constantes de dissociation. Néanmoins, les valeurs qui en résultent ne sont pas pour autant aberrantes et donnent des ordres de grandeur cohérents avec la littérature.

3-4- Interprétation

Nous venons de présenter une nouvelle méthode pour déterminer une constante d'association entre un ligand et un récepteur, situés sur des surfaces en regard. Cette méthode repose sur la mesure de cinétiques de formation de doublets de particules sous champ magnétique.

Nous avons montré, d'une part, que la constante d'association n'est pas sensible à la présence de chaînes de polymères à la surface des particules magnétiques. D'autre part, elle n'est pas influencée par la distance moyenne qui sépare les surfaces, pourvu qu'elles soient suffisamment proches. **La constante d'association s'avère exclusivement sensible à la nature de la liaison entre réactifs et surface.** Elle est accélérée de plus de deux ordres de grandeur quand les deux réactifs sont reliés à la surface par des **liaisons flexibles** et suffisamment longues.

Nous cherchons maintenant à comprendre l'ordre de grandeur mesuré pour les constantes d'association. Après les avoir comparées aux valeurs de la littérature et interprétées avec les approches classiques, nous tenterons d'apporter un nouvel éclairage. Cette démarche reposera sur l'estimation théorique de la constante de diffusion relative à notre système.

Enfin, nous concluons sur l'intérêt de cette nouvelle méthode, sur ses limites et ses avantages, et surtout, nous montrerons qu'elle est susceptible d'apporter des éclaircissements sur la description des réactions ligand-récepteur entre surfaces en regard.

3-4-1- Interprétation des constantes d'association expérimentales au vu des données de la littérature

Dans un premier temps, il est intéressant de comparer les constantes d'association mesurées par notre méthode avec celles trouvées par la technique des micropipettes, dont le principe a été exposé au chapitre 1 (§ 1-4-3). Pour diverses études menées en micropipettes, les valeurs de k_+^{2D} varient entre $10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $10^{-7} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour, respectivement, les sélectines et des couples CD16-IgG (Chesla et al., 1998; Long et al., 2001). En ce qui concerne notre étude du couple streptavidine-biotine, l'ordre de grandeur trouvé pour k_+^{2D} est de $10^{-5} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, pour les

CHAPITRE III

cas symétriques rigides et asymétriques. Pour le cas symétrique flexible, l'ordre de grandeur est de $10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour la configuration la plus rapide. Les valeurs trouvées ici sont donc cohérentes avec celles mesurées en micropipettes, ce qui est remarquable car les réactions sont étudiées sur des surfaces totalement différentes. En effet, en micropipettes, les surfaces sont des membranes cellulaires, ou des surfaces les mimant, alors qu'avec notre technique les surfaces sont solides. Notons également que notre détermination de k_+^{2D} n'est pas extrêmement précise car nous n'avons pas accès à la valeur exacte de l'aire de contact. Cette limitation intervient aussi pour le cas des micropipettes : l'aire de contact est évaluée à $3 \mu\text{m}^2$ d'après des clichés de microscopie optique, mais l'aire de contact effective peut s'avérer très différente (Williams et al., 2001). Néanmoins, même si nous n'avons pas accès à une valeur absolue de l'aire de contact, la comparaison entre différentes configurations est tout à fait fiable.

Jusqu'à présent, les ordres de grandeur mesurés n'ont pas été interprétés. Une première analyse consiste à comparer les constantes d'association en surface aux constantes en solution. Au premier chapitre, nous avons évoqué le lien qui existe, *a priori*, entre une constante en solution, k_+^{3D} , et son équivalent en surface, noté k_{+eq}^{2D} , c'est-à-dire :

$$k_+^{3D} \approx k_{+eq}^{2D} d \quad (3-20)$$

où le paramètre d est homogène à une longueur. Cette longueur caractéristique peut être considérée soit comme la portée de l'interaction ligand-récepteur, soit comme la distance entre surfaces, ce qui permet de reconstruire un volume où les molécules réagissent. Ainsi, l'ordre de grandeur de d est le nanomètre. Avec cette approche, nous pouvons convertir les constantes d'association en solution, k_+^{3D} , en constantes « 2D » équivalentes, k_{+eq}^{2D} .

Les mesures effectuées en micropipettes correspondent à des couples dont la constante caractéristique d'association est de $10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ (soit environ $10^{-21} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$). La relation (3-20) donne donc, pour ces couples, une constante équivalente k_{+eq}^{2D} de l'ordre de $1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Les expériences correspondantes aboutissant à des valeurs comprises entre $10^{-7} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Chesla et al., 1998; Long et al., 2001), elles reflètent un « ralentissement » d'un facteur compris entre 10^4 et 10^7 .

CHAPITRE III

En ce qui concerne nos expériences sur le couple streptavidine-biotine, il est raisonnable de prendre la « constante de Smoluchowski », soit $10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ (soit environ $10^{-18} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$), pour l'association en solution (§ 1-5). La formule (3-20) donne donc, cette fois-ci, une constante équivalente de $10^3 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Les expériences correspondantes aboutissent à des valeurs comprises entre $10^{-5} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $3 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, selon la nature de la liaison entre réactifs et surface. Un ralentissement aussi dramatique est donc également observé dans le cas de nos expériences, avec un facteur compris entre $3 \cdot 10^5$ et 10^8 . Ce ralentissement est d'autant plus important que les réactifs sont fixés de façon rigide à la surface, c'est-à-dire confinés.

Dans tous les cas étudiés, **un ralentissement considérable est donc observé lorsque les réactifs sont fixés sur des surfaces**. De plus, nous avons montré que **ce ralentissement est d'autant plus fort que les réactifs sont « confinés » sur les surfaces**.

Nous souhaitons maintenant comprendre l'origine fondamentale de ce double ralentissement : un ralentissement général, lié à la configuration « 2D », et un ralentissement de « confinement », lié à la nature rigide de la liaison entre réactifs et surface. Ce ralentissement de « confinement » semble cohérent dans la mesure où les réactifs sont intimement et rigidement liés aux surfaces. Il peut donc être attribué à une gêne de type stérique ou, en d'autres termes, à une perte de degrés de liberté des réactifs.

Nous allons nous intéresser plus précisément à l'origine du ralentissement général des réactions en surface dans le cas de nos expériences. Dans ce cadre, il s'agit de modéliser et de comprendre l'ordre de grandeur des constantes d'association mesurées dans le cas des liaisons symétriques et flexibles entre réactifs et surface. En effet, dans ce cas, il semble raisonnable de considérer que le second ralentissement (de confinement) est négligeable. Notre démarche consiste à aborder la réaction comme limitée par la diffusion et à estimer la constante de diffusion de notre système. Pour cela, une « diffusion colloïdale » est décrite puisque les réactifs sont dépendants de supports colloïdaux. Notre approche se concentrera sur la diffusion rotationnelle des particules colloïdales. Nous montrerons que ce mode de diffusion permet d'expliquer l'essentiel du ralentissement général. Par la suite, nous aborderons la possibilité de raffiner encore cette approche en incluant l'influence des fluctuations de translation des particules dans la direction du champ magnétique.

3-4-2- Estimation théorique de la constante cinétique de diffusion : Rotation des particules

Cette étude théorique a été réalisée en collaboration avec Carlos Marques et Fabrice Thalmann de l'*Institut Charles Sadron* à Strasbourg.

Comme nous l'avons décrit au premier chapitre, l'étape physique de transport permettant la rencontre entre réactifs est une étape cruciale dans le processus de réaction. Pour les réactions de type ligand-récepteur en solution, la seule description de l'étape de diffusion rend compte, dans un grand nombre de cas, de l'ordre de grandeur des constantes d'association mesurées (§ 1-3-2). Dans ce cadre, nous cherchons à décrire la constante de diffusion correspondant à notre situation expérimentale afin de la comparer aux constantes mesurées.

De façon plus précise, notre démarche consiste à déterminer le temps caractéristique d'adhésion entre particules grâce à la résolution d'une équation de *diffusion-réaction* (§ 1-2-2), incluant la diffusion rotationnelle des particules. Pour décrire entièrement notre situation, deux cas particuliers sont étudiés. Le premier cas considère un couple de particules réactives constitué d'une particule entièrement recouverte de récepteurs et d'une particule présentant un unique ligand (figure-3-20). Dans le second cas, les deux particules n'ont qu'un réactif chacune (figure-3-22). Nous ne rentrerons pas dans le détail des calculs de résolution d'équations de diffusion-réaction. Mais nous présenterons la démarche générale employée pour déterminer le temps caractéristique de réaction, soit le temps caractéristique d'adhésion entre les deux particules.

Premier cas

Considérons un couple de particules réactives, dont les particules, notées 1 et 2 , ont leur centre de masse fixe. Le seul mouvement autorisé est le mouvement de rotation. Récepteurs et ligands sont fixés à la surface des particules magnétiques, et contrairement aux cas des vésicules et des cellules, les réactifs ne sont pas mobiles sur les surfaces. C'est le mouvement de rotation des particules qui permet la rencontre entre réactifs. La particule 1 étant totalement réactive, le système est entièrement décrit par l'orientation de la particule 2 , caractérisée par les angles θ et φ (ils correspondent également aux coordonnées du ligand) (figure-3-20). Le système présentant une symétrie cylindrique, la seule description par θ suffit.

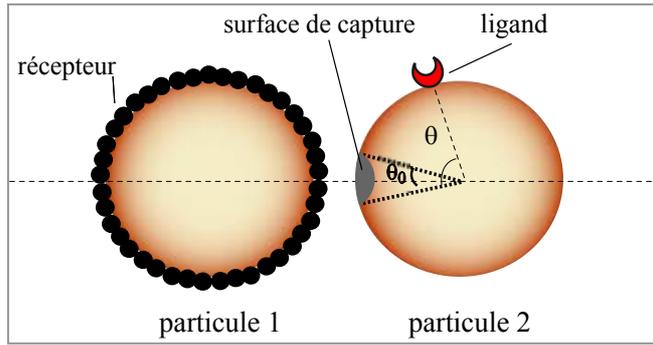


Figure-3-20 : Premier cas : la particule 1 est entièrement réactive. Définition de la coordonnée θ et de l'angle de capture θ_0 .

Le mouvement de rotation des particules est caractérisé par un coefficient de diffusion rotationnelle D_{rot} , homogène à une fréquence. D'après les études présentées au chapitre 2 (§ 2-4-5) (Fannin et al., 2006), nous avons établi que, sous un champ magnétique, le moment magnétique de la particule et la particule elle-même sont décorrélés. Ainsi, le coefficient de diffusion rotationnelle reste inchangé avec l'application d'un champ magnétique et s'écrit :

$$D_{rot} = \frac{kT}{8\pi\eta R^3} \quad (3-21)$$

avec R le rayon hydrodynamique de la particule, η la viscosité du milieu extérieur. Pour décrire la réaction, un angle θ_0 est défini tel que si $\theta \leq \theta_0$ la réaction entre ligand et récepteur est immédiate. On suppose qu'il n'y a pas de barrière d'activation, c'est-à-dire que l'étape de réaction proprement dite n'est pas limitante (§ 1-2-1). L'angle θ_0 définit une surface S_c , appelée surface de capture, de rayon r_c , qui vaut, pour une particule de surface S :

$$S_c = S \frac{1 - \cos \theta_0}{2} = \pi r_c^2 \quad (3-22)$$

L'équation de diffusion-réaction est appliquée à la densité de *probabilité de présence* du ligand, notée $\phi(\theta, t)$. En l'absence de réaction, par normalisation de la probabilité de présence sur l'aire accessible au ligand ($\int_0^\pi \sin \theta \phi(\theta, t) d\theta = 1$), on a : $\phi(\theta, t) = \frac{1}{2}$. Si une réaction est envisagée, la densité de probabilité $\phi(\theta, t)$ évolue au cours du temps. L'allure de cette évolution est représentée sur la figure 3-21-A.

La grandeur qui permet de déterminer un temps caractéristique de réaction est la « *probabilité de survie* », notée $\rho(t)$, qui représente la probabilité pour le ligand de ne pas encore avoir pénétré dans la surface de capture, et est définie par :

$$\rho(t) = \int_{\theta_0}^{\pi} d\theta \sin \theta \phi(\theta, t) \quad (3-23)$$

Son évolution au cours du temps est représentée en figure-3-21-B. Le temps de relaxation le plus long de $\rho(t)$ est considéré comme le temps caractéristique de réaction, noté τ .

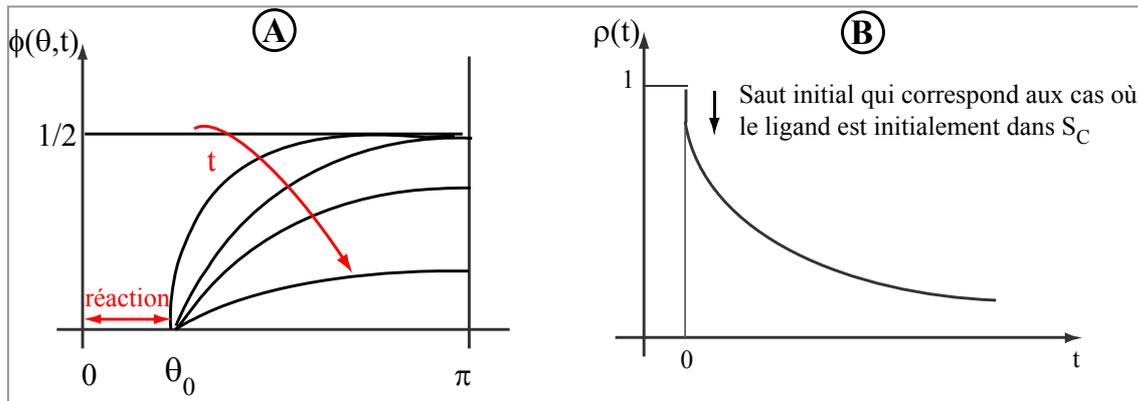


Figure-3-21 : A- Evolution de la densité de probabilité de présence avec le temps et avec une condition de réaction immédiate pour $\theta \leq \theta_0$. B- Evolution de la probabilité de survie avec le temps.

Ainsi, pour calculer le temps de relaxation, on écrit l'équation de diffusion-réaction suivante :

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} - D_{rot} \Delta_{\theta} \phi = -Q(\theta) \phi \quad (3-24)$$

Le second membre de cette équation rend compte de la réaction, d'où la forme suivante pour $Q(\theta)$: $Q(\theta) \rightarrow \infty$ pour $0 \leq \theta \leq \theta_0$ et $Q(\theta) = 0$ pour $\theta_0 \leq \theta \leq \pi$. La résolution de cette équation se fait dans l'espace de Laplace (Marques & Thalmann, 2006) et donne, pour le temps caractéristique de réaction τ :

$$\tau D_{rot} = \ln \frac{S}{S_c} = \ln \frac{2}{1 - \cos \theta_0} = \ln \frac{4R^2}{r_c^2} \quad (3-25)$$

Second cas

Le deuxième cas diffère du premier uniquement par la particule 1, qui porte un unique récepteur. La résolution de ce problème est similaire au premier cas. Mais, cette fois, les deux particules doivent être orientées de façon précise pour permettre la réaction (figure-3-22). Un degré de liberté supplémentaire est à considérer avec les angles θ_1 et θ_2 .

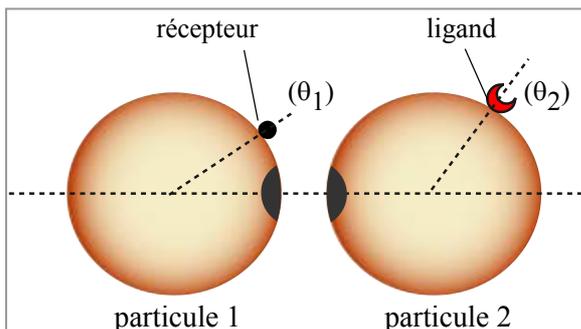


Figure-3-22 : Deuxième cas étudié : il y a un unique ligand et un unique récepteur.

L'équation de diffusion-réaction s'écrit maintenant :

$$\frac{\partial \phi(\theta_1, \theta_2, t)}{\partial t} - D_{rot} \Delta_{\theta_1, \theta_2} \phi(\theta_1, \theta_2, t) = -Q(\theta_1, \theta_2) \phi(\theta_1, \theta_2, t) \quad (3-26)$$

Deux conditions simultanées sont requises pour avoir réaction, c'est-à-dire que $Q \rightarrow \infty$ pour θ_1 et $\theta_2 \leq \theta_0$, sinon $Q = 0$.

De la même façon, le temps de relaxation le plus long est le temps caractéristique de réaction, noté ici τ_1 , et vaut :

$$\tau_1 D_{rot} \approx 1.4 \frac{S}{S_C} \quad (3-27)$$

Autrement dit, nous avons calculé ici, le temps pour que deux « marcheurs aléatoires » se retrouvent au même moment à un même endroit, avec la contrainte que le lieu de rencontre est unique et fixé. Il faut noter que cette situation est plus contraignante que celle qui consiste à réunir deux marcheurs au même moment en n'importe quel endroit dans l'aire de diffusion.

Lien entre les deux cas

Il s'agit maintenant de comparer les temps caractéristiques τ et τ_1 aux temps mesurés expérimentalement. On peut montrer (par des simulations numériques) que l'on passe de façon continue d'un cas à l'autre, en augmentant le nombre de récepteurs (figure-3-23).

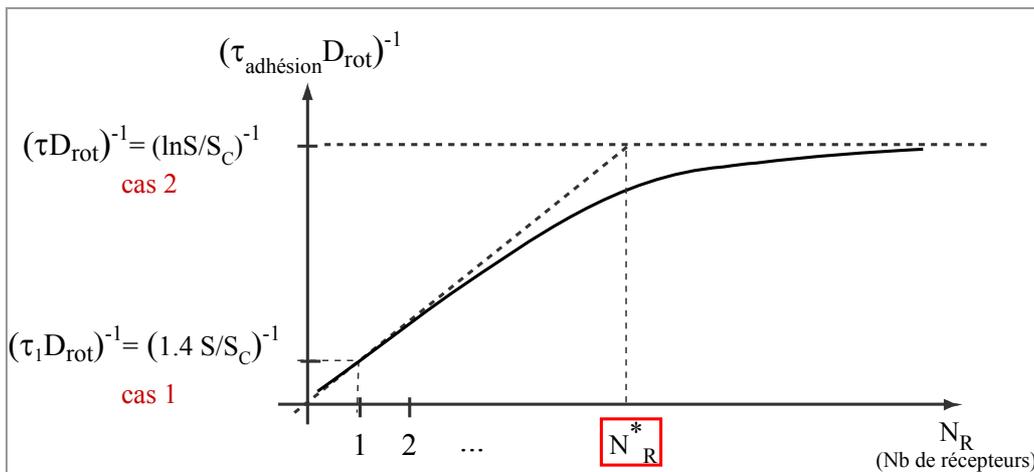


Figure-3-23 : Evolution de l'inverse des temps caractéristiques de réaction, adimensionnés par D_{rot} , en fonction du nombre de récepteurs. Lien entre les deux cas étudiés.

CHAPITRE III

Pour un nombre de récepteurs, N_R , suffisamment faible, le temps d'adhésion, $\tau_{adhesion}$, mesuré expérimentalement est proportionnel à τ_1 selon :

$$\tau_{adhesion} = \frac{\tau_1}{N_R} \quad (3-28)$$

Le nombre de récepteurs nécessaires pour « saturer » le temps caractéristique de réaction, noté N_R^* , vaut :

$$N_R^* = \frac{1.4S}{S_C} \frac{1}{\ln S/S_C} \quad (3-29)$$

Pour un nombre de récepteurs inférieur à N_R^* la relation de proportionnalité (3-28) est vérifiée (pour une surface de capture de 2.5 nm de rayon, $N_R^* \approx 1050$). Dans l'ensemble de nos expériences, le taux de greffage utilisé est toujours inférieur à cette valeur. Par conséquent, la relation (3-28) est valide dans notre approche expérimentale, *et le temps de formation de doublets mesuré expérimentalement, ramené à un ligand et à un récepteur, se compare directement au temps caractéristique de réaction τ_1 , que nous appellerons désormais « temps de diffusion rotationnelle ».*

Comparaison aux temps expérimentaux

Jusqu'ici, nous avons toujours comparé des constantes d'association entre elles. Par la suite, nous comparons des temps d'association entre un ligand et un récepteur, ce qui est équivalent, à aire de contact constante. Pour comparer les temps de diffusion théoriques et les temps expérimentaux, nous traitons le cas des configurations symétriques flexibles. Comme nous l'avons mentionné au paragraphe 3-4-1, dans ces configurations, on s'affranchit des perturbations de la réaction dues à la proximité immédiate de la surface, et qui sont difficiles à modéliser.

Pour mener la comparaison entre temps de diffusion et temps expérimentaux, il faut évaluer une surface de capture. La dynamique de polymères flexibles étant plus rapide que la dynamique colloïdale, ces deux dynamiques sont découplées. Les espaceurs explorent rapidement une surface caractéristique du polymère flexible considéré. Il nous semble raisonnable d'assimiler le rayon de cette surface à la seule dimension caractéristique du polymère en solution : son rayon de giration. Au niveau de la diffusion colloïdale, tout se

CHAPITRE III

passé comme si la surface explorée par le polymère était totalement réactive et correspondait à la surface de capture (figure-3-24).

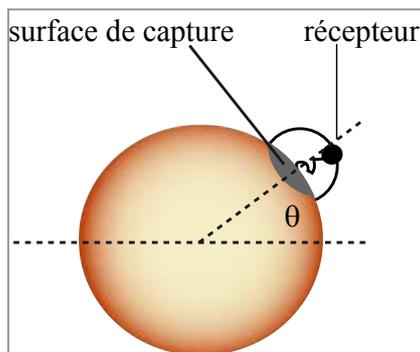


Figure-3-24 : Surface de capture dans le cas d'une liaison flexible entre réactif et surface. La surface de capture correspond à l'aire explorée par le polymère.

En considérant les rayons de giration des polymères, les temps de diffusion sont calculés d'après la relation (3-27) et sont comparés aux temps expérimentaux, c'est-à-dire aux temps de formation de doublets ramenés à un récepteur et à un ligand (table-3-3).

Polymère	$t.D_{rot}$ expérimental $D_{rot} = 140s^{-1}$	Surface de capture estimée	$t.D_{rot}$ de diffusion estimé d'après (3-27)
(PEG 3400)	$9.5 \cdot 10^4$	$r_c \approx 2.5 \text{ nm}$	$9.2 \cdot 10^3$ (déviaton d'un facteur 10)
(LC-LC)	$5.2 \cdot 10^5$	$r_c \approx 1 \text{ nm}$	$5.7 \cdot 10^4$ (déviaton d'un facteur 10)

Table-3-3 : Comparaison des temps mesurés expérimentalement aux temps de diffusion rotationnelle calculés.

Pour les deux types de polymères utilisés dans les configurations symétriques et flexibles, la comparaison entre les temps caractéristiques mesurés et les temps de diffusion rotationnelle calculés montre une divergence d'un même facteur 10. Le temps mesuré est, en effet, 10 fois plus grand que le temps calculé par une théorie de diffusion-réaction, sans barrière d'activation, dans le cadre d'une réaction limitée par la diffusion rotationnelle des particules.

Bien que cette étude théorique ne redonne pas exactement l'ordre de grandeur des temps caractéristiques mesurés, plusieurs conclusions peuvent déjà être tirées.

Ce calcul précis de diffusion dans les conditions appropriées à notre système permet d'appréhender la constante d'association mesurée d'une façon beaucoup plus convaincante que par une simple comparaison avec les constantes d'association en solution. En effet, l'écart

CHAPITRE III

n'est ici que d'un facteur 10, alors qu'elle était d'un facteur $3 \cdot 10^5$ pour une comparaison avec les constantes en solution (§ 3-4-1). De plus, bien qu'il reste encore une divergence d'un facteur 10 avec la valeur théorique, l'approche semble pertinente puisqu'elle permet de rendre compte de l'influence de la taille des deux polymères flexibles utilisés. Ceci montre que la prise en compte de **la diffusion rotationnelle colloïdale** permet d'expliquer **l'essentiel du ralentissement général** évoqué précédemment.

Si on voulait aussi interpréter ici le temps d'adhésion pour le cas symétrique rigide avec un même facteur 10 de divergence expérience-théorie, le temps de diffusion associé au temps expérimental ($t \cdot D_{rot} = 2 \cdot 10^7$) correspondrait à un rayon de capture de 0.3 Å. Cette valeur n'est pas envisageable, même pour une interaction aussi ajustée que streptavidine-biotine, où la taille caractéristique de l'aire interfaciale ne doit pas être loin de la taille d'une biotine (quelques Å). Donc, si l'approche présentée ici permet bien d'expliquer l'essentiel du ralentissement général, elle ne suffit pas, en l'état, pour rendre compte du second ralentissement, précédemment appelé « de confinement ».

3-4-3- Points faibles de l'approche théorique précédente et raffinements possibles

Nous venons de mettre en évidence une divergence d'un facteur 10 entre les résultats expérimentaux et l'approche théorique invoquée, pour les temps caractéristiques de réactions streptavidine-biotine, pour les configurations symétriques flexibles.

Dans un premier temps, intéressons-nous aux points faibles de cette approche théorique. Tout d'abord, se pose la question de savoir si l'évaluation du coefficient de diffusion rotationnelle des particules, D_{rot} , est correcte. Nous avons montré au paragraphe 2-4-5 que l'application d'un champ magnétique n'avait pas d'influence sur la rotation des particules. Par ailleurs, les cinétiques mesurées ici sont indépendantes de l'intensité du champ magnétique, ce qui confirme que la vitesse de rotation dans l'eau est une caractéristique intrinsèque des particules, et correspond bien à une rotation brownienne indépendante du champ magnétique. En outre, il faut préciser que les effets hydrodynamiques ne peuvent être à l'origine de la divergence expérience-théorie. En effet, une étude théorique de Stark *et al.* a montré que les effets hydrodynamiques, pour des particules distantes de quelques nanomètres, ne modifiaient

CHAPITRE III

pas le coefficient de diffusion de plus de 20% (Stark et al., 2005). Ceci est également confirmé par le fait que la distance moyenne entre particules, imposée par le champ magnétique, n'a pas d'influence significative sur les cinétiques mesurées.

Un autre point faible réside dans le choix de la surface de capture, qui constitue le seul paramètre ajustable de la théorie proposée. Nous avons choisi d'assimiler le rayon de cette surface à la seule dimension caractéristique du polymère en solution : son rayon de giration. Ce choix est arbitraire car le rayon de la surface de capture ne peut être déterminé expérimentalement. Néanmoins, il influence fortement le résultat de l'estimation théorique du temps de diffusion. En effet, ce rayon, via la surface de capture S_C , intervient au carré dans l'expression (3-27). Pour obtenir un meilleur accord expérience-théorie, il faudrait considérer des rayons de surface de capture près de trois fois plus petits que les rayons de giration des polymères, ce qui semble difficilement envisageable.

Dans un second temps, pour affiner l'estimation des temps caractéristiques de diffusion, une hypothèse consiste à prendre en compte la diffusion translationnelle des particules dans la direction du champ magnétique. Cette diffusion translationnelle est régie par la forme du potentiel d'interaction entre particules, qui est considérée, en première approximation, comme harmonique, et est caractérisée par une distance λ . Cette distance correspond à la longueur d'exploration pour $1 kT$ au-dessus du minimum d'énergie.

En incluant cette contribution translationnelle, on peut montrer que le temps global de diffusion dépend à la fois du temps de diffusion rotationnelle τ_1 , calculé précédemment, et du temps de diffusion translationnelle τ_T . Dans une première analyse, Marques *et al.* proposent d'écrire le temps global de diffusion τ_{diff} comme (Marques & Thalmann, 2006) :

$$\tau_{diff} = \tau_1 + \tau_T \sqrt{\frac{\pi}{u}} e^u \left(\frac{S}{S_C} \right)^2 \left[1 + \exp \left(- \left(4u \frac{S_C}{D_{rot} \tau_T S} \right)^{1/2} \right) - 2 \exp \left(- \left(2u \frac{S_C}{D_{rot} \tau_T S} \right)^{1/2} \right) \right] \quad (3-30)$$

où τ_T caractérise la diffusion translationnelle dans le puits de potentiel et vaut :

$$\tau_T = \frac{3\pi\eta R\lambda^2}{kT} \quad (3-31)$$

Le paramètre u qui intervient dans l'expression (3-30) caractérise la hauteur de la barrière d'énergie que les particules doivent franchir pour que la réaction ligand-récepteur puisse avoir lieu. Les deux termes de la somme du membre de droite de l'expression (3-30) correspondent respectivement au terme de rotation pure et au terme de translation couplée à la rotation.

CHAPITRE III

Notons que, dans nos conditions expérimentales, ces deux termes sont du même ordre de grandeur.

En présence d'un champ magnétique, les particules sont piégées dans un puits de potentiel, qui résulte des interactions répulsives, d'origine électrostatique et/ou stérique, et des interactions attractives, de van der Waals et magnétiques. La contribution énergétique répulsive est déduite des profils de force. Les attractions de van der Waals et magnétique sont calculées pour chaque intensité de champ magnétique. Le potentiel correspondant à un champ magnétique de 30 mT est donné en annexe-D. La validité d'un tel potentiel se trouve cependant limitée. En effet, malgré les étapes de tri mentionnées auparavant (§ 2-1-2), les particules restent polydisperses. Ceci implique aussi une « polydispersité » des distances entre particules au sein des chaînes. Cette « double » polydispersité se répercute à tous les niveaux dans le calcul du potentiel. De plus, la répulsion issue des profils de force est une moyenne statistique sur la distance interparticule. Il est donc illusoire de penser pouvoir reconstruire un potentiel d'interaction parfaitement représentatif de notre système.

D'après les résultats expérimentaux, le champ magnétique n'a pas d'influence significative sur le temps d'adhésion. Nous considérerons donc un potentiel d'interaction moyen, où la longueur d'exploration λ est indépendante du champ et a pour valeur caractéristique 5 nm, d'après le profil figurant en annexe-D. Pour la même raison expérimentale, le paramètre u doit aussi être considéré comme indépendant du champ. Si l'on prend u grand devant kT , l'expression (3-30) donne un temps global de diffusion très grand devant le temps expérimental, de plusieurs ordres de grandeur. En revanche, on note une nette amélioration de l'accord expérience-théorie pour un paramètre u proche de $1 kT$. En effet, pour une distance caractéristique λ de 5 nm et pour u égal à $1 kT$, le temps global de diffusion est estimé d'après la relation (3-30) à une valeur très proche du temps expérimental.

Les temps caractéristiques mesurés expérimentalement peuvent donc être interprétés en considérant un couplage entre les diffusions colloïdales rotationnelle et translationnelle. Néanmoins, une interprétation prenant en compte la translation nécessite un choix arbitraire d'une barrière énergétique proche de kT , qui ne découle pas directement de la forme du potentiel d'interaction. Cette interprétation reste donc une simple hypothèse de travail.

Pour conclure, la description théorique du paragraphe 3-4-2, qui repose sur la seule diffusion rotationnelle des particules, permet d'expliquer, pour l'essentiel, le temps de réaction. Pour affiner cette description théorique, nous avons vu que deux approches étaient envisageables.

CHAPITRE III

Une première consisterait à mettre en place une détermination expérimentale de la surface de capture, ce qui semble particulièrement délicat. Une seconde reposerait sur la prise en compte des fluctuations de translation, ce qui nécessite une poursuite de l'effort de modélisation, et surtout une amélioration de notre appréhension du potentiel d'interaction. Enfin, le fait que les réactifs ne soient pas complètement libres, mais liés à des espaceurs, ne garantit pas que leur nombre de degrés de liberté soit exactement le même qu'en solution. De ce fait, il n'est pas totalement exclu que, même dans les configurations symétriques flexibles, la réaction ligand-récepteur soit encore légèrement perturbée par la présence d'une liaison.

3-4-4- Discussion sur la notion de cinétique d'association en « 2D »

Cette étude a permis de révéler que deux phénomènes sont à l'origine du ralentissement observé pour les réactions ligand-récepteur entre surfaces en regard.

Un premier ralentissement peut être attribué à la nature des processus de diffusion propres à la configuration « 2D ». Que ce soit sur un support colloïdal ou sur des membranes fluides, comme dans le cas de l'adhésion entre cellules, la diffusion est plus « lente » qu'en solution et dépend fortement du type de support. Au contraire, en solution, des réactifs de même taille diffusent à la même vitesse.

En ce qui concerne notre système, les processus de diffusion ont été évalués de façon théorique, en considérant la diffusion rotationnelle des particules. Pour les configurations symétriques flexibles, les estimations théoriques qui en découlent ne diffèrent des temps mesurés que d'un facteur 10, ce qui représente une amélioration sensible au regard des interprétations proposées dans la littérature (un facteur $3 \cdot 10^5$). Nous avons également suggéré quelques pistes pour tenter d'améliorer l'accord entre l'estimation du temps global de diffusion et le temps expérimental.

Pour les expériences de micropipettes, le processus de diffusion translationnelle des réactifs sur les membranes fluides semble être le processus de diffusion pertinent, et peut être décrit par l'approche de Bell (§ 1-4-1). Cette approche considère le coefficient de diffusion de translation à « 2D », D^{2D} , et affirme que la constante d'association « 2D » limitée par la diffusion, k_{+diff}^{2D} , est directement reliée à ce coefficient de diffusion par $k_{+diff}^{2D} = d_+^{2D} = 2\pi D^{2D}$. Pour les membranes cellulaires, D^{2D} est estimé à $10^{-2} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui

CHAPITRE III

donne une constante d'association, k_{+diff}^{2D} , de $0.1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Cette valeur reste encore beaucoup plus grande que les valeurs mesurées expérimentalement ($10^{-7} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Cette description de la diffusion ne suffit donc pas pour expliquer les valeurs mesurées. Une hypothèse consiste à dire que la diffusion à la surface des membranes, et dans la géométrie des micropipettes, est plus complexe et demanderait une étude plus précise. Nous verrons plus tard une seconde interprétation possible.

Un second ralentissement se rapporte à la nature de la liaison entre réactifs et surface, qui prive les molécules de certains de leurs degrés de liberté, c'est-à-dire qui contraint les molécules. Ce second ralentissement est plus difficile à appréhender et à modéliser. On peut l'envisager soit par une approche purement physique, en considérant les processus de diffusion avec des contraintes supplémentaires, qui prennent en compte la spécificité stérique des réactions ligand-récepteur. Dans le cadre de notre description théorique de la diffusion, pour tenir compte de ces contraintes dans le cas symétrique rigide, on peut imaginer ajouter, par exemple, un ajustement angulaire des surfaces de capture. En effet, avec ce type de contrainte, les réactifs perdent certains degrés de liberté, comme ceux de rotation. Or, nous avons mentionné au paragraphe 1-3-2-e, d'après l'étude de Northrup *et al.*, l'importance des réorientations rotationnelles (Northrup & Erickson, 1992). Nous avons vu que le temps de décorrélation rotationnelle était de 5.3 ns en solution, ce qui permettait aux réactifs d'essayer un certain nombre de configurations au cours de chaque rencontre. Ce temps de décorrélation est sans doute beaucoup plus long dans le cas de molécules intimement fixées sur des surfaces. Ce second ralentissement n'est pas observé dans le cas de liaisons flexibles, car justement la liaison flexible « redonne » des degrés de liberté de rotation.

On peut également appréhender ce second ralentissement en d'autres termes, et invoquer l'émergence d'une barrière d'activation orientationnelle, voire configurationnelle, c'est-à-dire considérer que, pour les réactifs, le passage d'une orientation à l'autre requiert « une certaine énergie ».

Dans tous les cas, ce second ralentissement correspond à une diminution de l'efficacité de rencontre entre ligand et récepteur. Il dépend de la nature des molécules, de leur architecture moléculaire, et du niveau de contrainte « topologique », lié à la flexibilité de la liaison entre surface et réactifs. Plus les réactifs sont confinés par la présence de la surface, plus le ralentissement est important. Dans le cas des micropipettes aussi, le ralentissement peut être interprété en ces termes de diffusion sous contrainte, ou de barrière configurationnelle.

CHAPITRE III

Dans le cadre de cette interprétation, nous pouvons revenir sur l'étude de Huang *et al.*, qui considère la constante d'association pour des sélectines de tailles différentes (§ 1-4-3) (Huang et al., 2004). Cet exemple illustre l'influence de l'architecture moléculaire des réactifs sur les constantes d'association : raccourcir la partie des sélectines non impliquée dans l'adhésion réduit la constante d'association. En effet, schématiquement, l'architecture moléculaire des sélectines est constituée d'une tige flexible au bout de laquelle est située la partie réactive (lectine). La tige flexible joue donc un rôle de type « espaceur » analogue à celui des polymères flexibles utilisés dans notre étude.

Comme nous venons de le voir, la cinétique d'association **en surface** fait donc appel à de nombreux paramètres relatifs à la liaison entre réactifs et surface. On peut comprendre, dès lors, que la détermination des constantes d'association **en solution** ne soit pas pertinente pour rendre compte des comportements d'association en surface.

Cette étude de l'influence de la nature de la liaison entre réactifs et surface permet de comprendre *a posteriori* pourquoi le Biacore mesure effectivement des constantes « 3D ». Dans la mesure où le biacore est utilisé dans une configuration où des espaceurs flexibles relient les récepteurs à la surface (molécules de dextran, § 1-3-1), la reconnaissance, comme dans notre cas symétrique flexible, n'est pas perturbée par la présence de la surface. Ainsi, l'association mesurée en biacore est limitée par une « simple » étape de rencontre entre réactifs, qui est reliée à une diffusion en volume puisque le ligand est en solution. Pour ces deux raisons, bien que reposant sur une détection optique en surface, le biacore mesure bien des constantes « 3D ».

Les molécules « espaceur » ont déjà été largement utilisées par le passé, entre autres dans le domaine des biotechnologies, pour le « design » de surfaces réactives. Dans la majorité des cas recensés, l'espaceur utilisé est un polyéthylène glycol (PEG). Dans le cadre de la conception de puces à ADN, des espaceurs neutres et de petite taille (40 atomes) sont insérés pour améliorer l'hybridation de l'ADN (Shchepinov et al., 1997). L'utilisation d'un espaceur entre surfaces et anticorps a aussi été étudiée, notamment dans le domaine du diagnostic immunologique, et s'est avérée efficace pour faciliter la capture des antigènes correspondants (Weimer et al., 2000). De même, pour l'immobilisation d'enzymes, l'efficacité des espaceurs pour améliorer l'activité enzymatique a été démontrée (Weimer et al., 2000). Enfin, d'autres

CHAPITRE III

études montrent l'intérêt de l'utilisation d'un espaceur pour s'affranchir des problèmes d'adhésion non spécifique (Otsuka et al., 2004).

Dans la majorité des cas, l'amélioration consécutive à l'utilisation d'espaceurs, est interprétée comme une augmentation du nombre de réactifs accessibles. L'augmentation de la portée des interactions ligand-récepteur a aussi été invoquée (Jeppesen et al., 2001; Moreira & Marques, 2004). Mais l'influence de l'espaceur sur la cinétique de reconnaissance n'a été pour l'instant étudiée que qualitativement (Cuvelier & Nassoy, 2004). Avec notre étude, nous avons pu montrer que l'utilisation des espaceurs permettait d'accélérer la cinétique de reconnaissance entre ligand et récepteur, à l'échelle de couples individuels. Nous avons proposé un point de vue plus quantitatif pour expliquer l'amélioration qu'apportent les espaceurs dans bon nombre d'applications biotechnologiques.

3-5- Bilan sur la méthode

Ce paragraphe a pour but de discuter de la pertinence de la méthode élaborée pour mesurer des cinétiques de réaction ligand-récepteur entre surfaces, et plus précisément pour déterminer des constantes cinétiques d'association.

Dans un premier temps, nous considérons la sensibilité de la méthode. Un des points faibles de cette méthode est sa résolution temporelle. Les liens que l'on peut étudier doivent présenter des temps de vie relativement grands, c'est-à-dire au moins supérieurs au temps minimal de détection de l'adhésion. Dans le fonctionnement actuel de la méthode, un temps minimum d'une dizaine de secondes est nécessaire entre le moment où le champ magnétique est coupé et le moment où la première mesure de densité optique est réalisée. Ainsi, seuls des complexes aux temps de vie très supérieurs à 10 s sont détectables. Cela limite l'étude aux complexes de faibles constantes de dissociation, inférieures à 0.01 s^{-1} . Cette méthode ne peut donc pas explorer des états transitoires d'adhésion. En conséquence, contrairement à la technique des micropipettes, notre méthode est destinée à l'étude de liens « persistants ».

Comme nous l'avons déjà évoqué, notre méthode est peu adaptée à la mesure de constantes de dissociation. En effet, la force s'exerçant sur le lien au moment de la mesure de la dissociation, c'est-à-dire sans champ magnétique, est mal définie. Cette force dépend de la

CHAPITRE III

taille du lien et surtout sa direction n'est pas imposée. En outre, contrairement aux autres techniques en place aujourd'hui, nous sommes dans l'impossibilité de faire varier la force et donc d'extrapoler le comportement à force nulle.

L'un des atouts de cette nouvelle méthode est qu'elle fait appel à des outils simples, faciles à mettre en œuvre. De plus, l'obtention et l'analyse des résultats sont assez rapides. En « une seule manipulation », un grand nombre de réactions sont considérées en parallèle, ce qui aboutit directement à des statistiques significatives. Cette méthode est notamment plus simple que la technique des micropipettes, qui demande une instrumentation plus complexe, et, surtout, une répétition des manipulations pour aboutir à des résultats représentatifs (100 à 500 cycles par temps de contact, pour la même paire de cellules).

Un autre grand avantage de notre approche réside dans le contrôle du contact entre les surfaces pendant l'adhésion, ce qui rend cette méthode intéressante pour l'étude des constantes d'association. Le temps de contact est contrôlé par l'application du champ magnétique. La distance moyenne est imposée par l'intensité du champ magnétique. La force s'exerçant sur les liens pendant le contact est « nulle » car le système constitué des deux particules est à l'équilibre mécanique. En outre, la connaissance des paramètres physiques, comme le coefficient de diffusion rotationnelle des particules, permet une description précise des processus de rencontre entre réactifs. Remarquons aussi que, bien que notre méthode ne considère pas des membranes biologiques, elle a abouti à des valeurs de constantes d'association cohérentes avec celles trouvées avec les micropipettes. Ceci confirme qu'il est également pertinent d'étudier les réactions ligand-récepteur sur des supports solides.

Enfin, nous pouvons penser à des améliorations possibles. Pour étudier les réactions ligand-récepteur dans des conditions plus proches de celles rencontrées dans la nature, on pourrait imaginer adapter cette méthode avec des vésicules magnétiques, où les surfaces seraient plus proches des membranes cellulaires. Néanmoins, cela semble poser de nombreux problèmes expérimentaux. Une autre amélioration consisterait à diminuer le temps de détection, ce qui permettrait d'étendre la méthode à des couples aux temps de vie plus faibles.

3-6- Conclusion

Nous avons donc validé ici une nouvelle méthode d'étude des réactions ligand-récepteur entre surfaces en regard. Cette méthode s'est avérée pertinente pour décrire des constantes d'association et pour comprendre l'influence de certains paramètres physiques. En effet, en considérant le couple modèle streptavidine-biotine, nous avons pu mettre en évidence un ralentissement par rapport à ce que nous pouvions attendre des descriptions proposées dans la littérature à partir de la connaissance des constantes en solution. S'il est vrai que, comme en solution, les processus de diffusion sont fondamentaux pour appréhender la cinétique d'association, ils sont plus complexes en surface et présentent une variabilité accrue due à la diversité des environnements possibles.

Grâce à la connaissance précise de l'environnement de notre système, l'estimation théorique de la constante de diffusion rotationnelle a pu révéler l'origine du ralentissement observé. Ce ralentissement est à relier à la présence de surfaces colloïdales et à leur géométrie, qui imposent les processus de diffusion entre réactifs. L'observation d'une variabilité de la constante d'association pour un même couple a mis en évidence un second type de ralentissement, appelé « de confinement ». Ce second ralentissement varie avec la nature de la liaison entre réactifs et surface, qui contraint plus ou moins les molécules. Ce ralentissement peut être attribué à une diffusion avec des contraintes plus ou moins fortes, ou, en d'autres termes, à l'émergence d'une barrière configurationnelle.

Pour conclure, cette étude a permis de montrer que la constante d'association entre un ligand et un récepteur sur des surfaces en regard n'est pas une caractéristique intrinsèque d'un couple, mais dépend des paramètres physico-chimiques qui régissent la rencontre entre réactifs. En revanche, la détermination de la constante d'association « 2D » prend tout son sens lorsque l'on cherche à comprendre dans son ensemble « un système d'adhésion » défini comme un couple ligand-récepteur dans son environnement surfacique. En effet, pour un même couple ligand-récepteur, l'environnement a une influence déterminante sur la constante d'association « 2D », et donc sur les propriétés adhésives du système.

BIBLIOGRAPHIE

- CHESLA, S. E., SELVARAJ, P. & ZHU, C. (1998). Measuring two-dimensional receptor-ligand binding kinetics by micropipette. — *Biophysical Journal* 75, 1553-1572.
- COZENS-ROBERTS, C., LAUFFENBURGER, D. A. & QUINN, J. A. (1990). Receptor-Mediated Cell Attachment and Detachment Kinetics .1. Probabilistic Model and Analysis. — *Biophysical Journal* 58, 841-856.
- CUVELIER, D. & NASSOY, P. (2004). Hidden dynamics of vesicle adhesion induced by specific stickers. — *Physical Review Letters* 93.
- FANNIN, P. C., COHEN-TANNOUJJI, L., BERTRAND, E., GIANNITSIS, A. T., MAC OIREACHTAIGH, C. & BIBETTE, J. (2006). Investigation of the complex susceptibility of magnetic beads containing maghemite nanoparticles. — *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 303, 147-152.
- HUANG, J., CHEN, J., CHESLA, S. E., YAGO, T., MEHTA, P., MCEVER, R. P., ZHU, C. & LONG, M. (2004). Quantifying the effects of molecular orientation and length on two-dimensional receptor-ligand binding kinetics. — *Journal of Biological Chemistry* 279, 44915-44923.
- JEPPESEN, C., WONG, J., KUHL, T., ISRAELACHVILI, J., MULLAH, N., ZALIPSKY, S. & MARQUES, C. (2001). Impact of polymer tether length on multiple ligand-receptor bond formation. — *science* 293, 465-468.
- KOENIG, A., HÉBRAUD, P., GOSSE, C., DREYFUS, R., BAUDRY, J., BERTRAND, E. & BIBETTE, J. (2005). Magnetic Force Probe for Nanoscale Biomolecules. — *Physical Review Letters* 95, N° 128301.
- LONG, M., ZHAO, H., HUANG, K. & ZHU, C. (2001). Kinetic measurement of cell surface E-Selectin/Carbohydrate Ligand Interactions. — *Annals of biomedical engineering* 29, 935-946.
- MARQUES, C. M. & THALMANN, F. (2006). — résultats non publiés.
- MOREIRA, A. G. & MARQUES, C. M. (2004). The role of polymer spacers in specific adhesion. — *Journal of Chemical Physics* 120, 6229-6237.
- NORTHRUP, S. & ERICKSON, H. (1992). Kinetics of protein-protein association by Brownian dynamics computer simulation. — *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 3338-3342.
- OTSUKA, H., NAGASAKI, Y. & KATAOKA, K. (2004). Characterization of aldehyde-PEG tethered surfaces: Influence of PEG chain length on the specific biorecognition. — *Langmuir* 20, 11285-11287.
- PINCET, F. & HUSSON, J. (2005). The solution to the streptavidin-biotin paradox: The influence of history on the strength of single molecular bonds. — *Biophysical Journal* 89, 4374-4381.
- PROMISLOW, J., GAST, A. & FERMIGIER, M. (1995). Aggregation Kinetics of Paramagnetic Colloidal Particles. — *Journal of Chemical Physics* 102, 5492-5498.
- SHCHEPINOV, M. S., CASEGREEN, S. C. & SOUTHERN, E. M. (1997). Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. — *Nucleic Acids Research* 25, 1155-1161.
- STARK, H., REICHERT, M. & BIBETTE, J. (2005). Rotational diffusion in a chain of particles. — *Journal of Physics-Condensed Matter* 17, S3631-S3637.
- WEIMER, B. C., WALSH, M. K. & WANG, X. W. (2000). Influence of a poly-ethylene glycol spacer on antigen capture by immobilized antibodies. — *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 45, 211-219.

CHAPITRE III

- WILLIAMS, T., NAGARAJAN, S., SELVARAJ, P. & ZHU, C. (2001). Quantifying the Impact of Membrane Microtopology on Effective Two-dimensional Affinity. — *Journal of Biological Chemistry* 276, 13283-13288.
- ZHU, C., LONG, M., CHESLA, S. E. & BONGRAND, P. (2002). Measuring receptor/ligand interaction at the single-bond level: Experimental and interpretative issues. — *Annals of Biomedical Engineering* 30, 305-314.
- ZITSERMAN, V. Y., BEREZHKOVSII, A. M., PARSEGIAN, V. A. & BEZRUKOV, S. M. (2005). Nonideality of polymer solutions in the pore and concentration-dependent partitioning. — *Journal of Chemical Physics* 123.

4- ÉTUDE DE MOLÉCULES IMPLIQUÉES DANS L'ADHÉSION CELLULAIRE : LES CADHÉRINES

Nous souhaitons appliquer la méthode que nous avons mise en place et validée au chapitre à un couple directement impliqué dans l'adhésion cellulaire, et donc pour lequel la caractérisation en surface prend tout son sens. Etant donnée la sensibilité de notre méthode, nous nous sommes orientés vers un couple dont le temps de vie du complexe est présumé relativement important. Notre choix s'est ainsi porté sur les cadhérines. Les mécanismes d'adhésion associés aux cadhérines étant multiples et complexes, nous avons aussi cherché à valider certaines hypothèses proposées dans la littérature.

Ce chapitre s'ouvre avec un état de l'art sur les interactions entre cadhérines et permet de mettre en évidence la complexité de leur mode d'interaction. Puis, nous détaillons la voie expérimentale empruntée pour observer une adhésion induite par une interaction spécifique de la cadhérine. Enfin, après avoir étudié la cinétique d'adhésion et construit les profils de force des liens cadhérines, nous montrons que notre étude permet de confirmer certaines hypothèses proposées sur les modes de fonctionnement des cadhérines.

4-1- État de l'art sur les interactions entre cadhérines

Les cadhérines représentent une des principales familles de « molécules d'adhésion cellulaire », et sont impliquées dans de nombreux phénomènes comme le développement et le maintien de tissus cellulaires (figure-4-1). Les cadhérines sont à proprement parler des molécules d'adhésion, qui engagent des **interactions dépendant de la concentration en calcium** et qui sont de type **homophilique** et **homotypique** (cf. chapitre 1, §1-1-2), ce qui signifie qu'une cadhérine reconnaît une autre cadhérine.

Après avoir présenté brièvement les caractéristiques structurales et fonctionnelles des cadhérines, nous aborderons les principaux scénarios qui ont été proposés pour décrire l'adhésion qu'elles induisent. Puis, nous détaillerons les études récentes menées grâce à des

méthodes biophysiques qui ont révélé la complexité de ces molécules, tant pour leur **profil d'interaction** que pour leur **cinétique d'adhésion**. Ces deux composantes sont cruciales pour comprendre leur mode d'interaction. C'est sur ces caractéristiques que nous tenterons d'apporter de nouvelles informations avec notre étude.

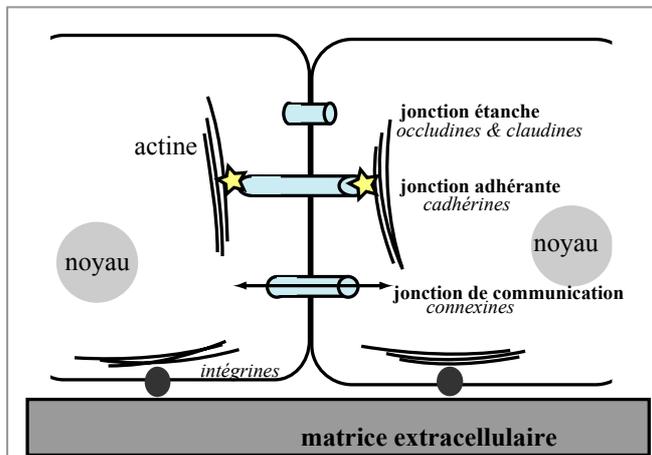


Figure-4-1 : Implication des cadhérines dans les jonctions adhérentes entre cellules. Exemple de cellules endothéliales

4-1-1- Implications et structure

L'adhésion homotypique entre cadhérines est un mécanisme simple pour que des cellules identiques s'associent et forment des tissus homogènes (Yagi & Takeichi, 2000; Ivanov et al., 2001). Les cadhérines interviennent, ainsi, directement dans la cohésion des tissus, en permettant un maintien solide de leur structure et donc la conservation de leur intégrité. Les cadhérines prennent également part aux processus de différenciation au cours de l'embryogenèse. La régulation temporelle et spatiale de leur expression aux différents stades du développement peut expliquer leur participation dans la structuration des tissus (Gumbiner, 1996). Outre ces capacités remarquables d'adhérence, les cadhérines jouent un rôle important dans la signalisation entre cellules (Steinberg & McNutt, 1999). Les dérégulations de leur expression ou de leur fonctionnement peuvent entraîner de nombreuses conséquences, comme la désorganisation des jonctions entre cellules (Rothen-Rutishauser et al., 2002). Ces dysfonctionnements sont d'ailleurs largement étudiés en oncologie, la déficience des cadhérines dans les cellules cancéreuses pouvant être à l'origine de la propagation des métastases (Shiozaki et al., 1996).

CHAPITRE IV

Les cadhérines sont des protéines transmembranaires caractérisées par trois parties distinctes : une partie intracellulaire, une « ancre » membranaire et une partie extracellulaire ou ectodomaine (figure-4-2). La partie intracellulaire est identique quelle que soit la famille considérée. Le segment extracellulaire consiste en une répétition de motifs de structure analogue, appelés *domaines cadhérine*, et notés EC. C'est la présence d'un tel motif qui est à l'origine de la définition de la super famille des cadhérines. Plus de 80 cadhérines différentes sont exprimées chez les mammifères (Yagi & Takeichi, 2000), on classe ces différentes molécules suivant plusieurs grandes familles.

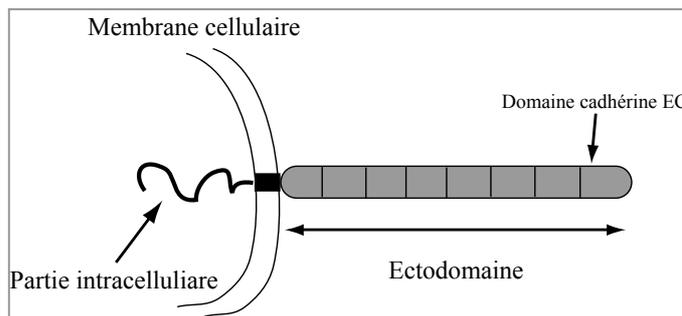


Figure-4-2 : Structure générale des cadhérines.

Nous nous concentrons ici sur les cadhérines dites « classiques », c'est-à-dire sur la famille la plus représentée et qui a été la plus étudiée. Cette famille a la particularité de présenter **cinq domaines** cadhérine notés EC1 à EC5, du plus éloigné au plus proche de la membrane (figure-4-3-A-i). Les protocadhérines et autres cadhérines qui possèdent plus de cinq domaines, en général, ne sont pas abordées ici. Au sein d'une même famille, on distingue les cadhérines suivant leur tissu cellulaire d'origine, ou le tissu où elles ont été identifiées pour la première fois, avec entre autres la E-cadhérine pour épithéliale, N-cadhérine pour neuronale. Les cadhérines d'origine différente n'adhèrent généralement pas entre elles, on parle ainsi d'interactions orthogonales (Patel et al., 2003).

Nous nous attachons ici à décrire la structure et les mécanismes d'adhésion des cadhérines classiques. La grande majorité des études recensées ici se rapporte à la E-cadhérine, car c'est sur ce type de molécules que se portent nos études.

Les cadhérines classiques ont donc une partie extracellulaire composée de cinq domaines de structure analogue (figure-4-3-A-i). Ces « unités cadhérine » sont directement impliquées dans la fixation du calcium et dans l'interaction entre cadhérines. Les domaines cadhérine sont composés de 110 acides aminés avec une masse moléculaire de $12\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. La structure cristallographique du premier domaine EC1, obtenue par Shapiro *et al.* (Shapiro et al., 1995), et confirmée en RMN par Overduin *et al.* (Overduin et al., 1995), révèle une unité

compacte aux dimensions $45 \times 25 \times 25 \text{ \AA}^3$. Le repliement de la chaîne peptidique est similaire à celui rencontré pour les domaines Ig (évoqué au § 1-1-2). Le domaine EC1 joue un rôle particulier : il est nécessaire à l'adhésion entre cadhérines. EC1 comprend une séquence HAV (histidine- alanine- valine) appelée *poche hydrophobe*, qui est reconnue pour participer directement aux interactions entre cadhérines. Cette interaction fait participer un acide aminé précis des cadhérines : le tryptophane en position 2 (Trp2).

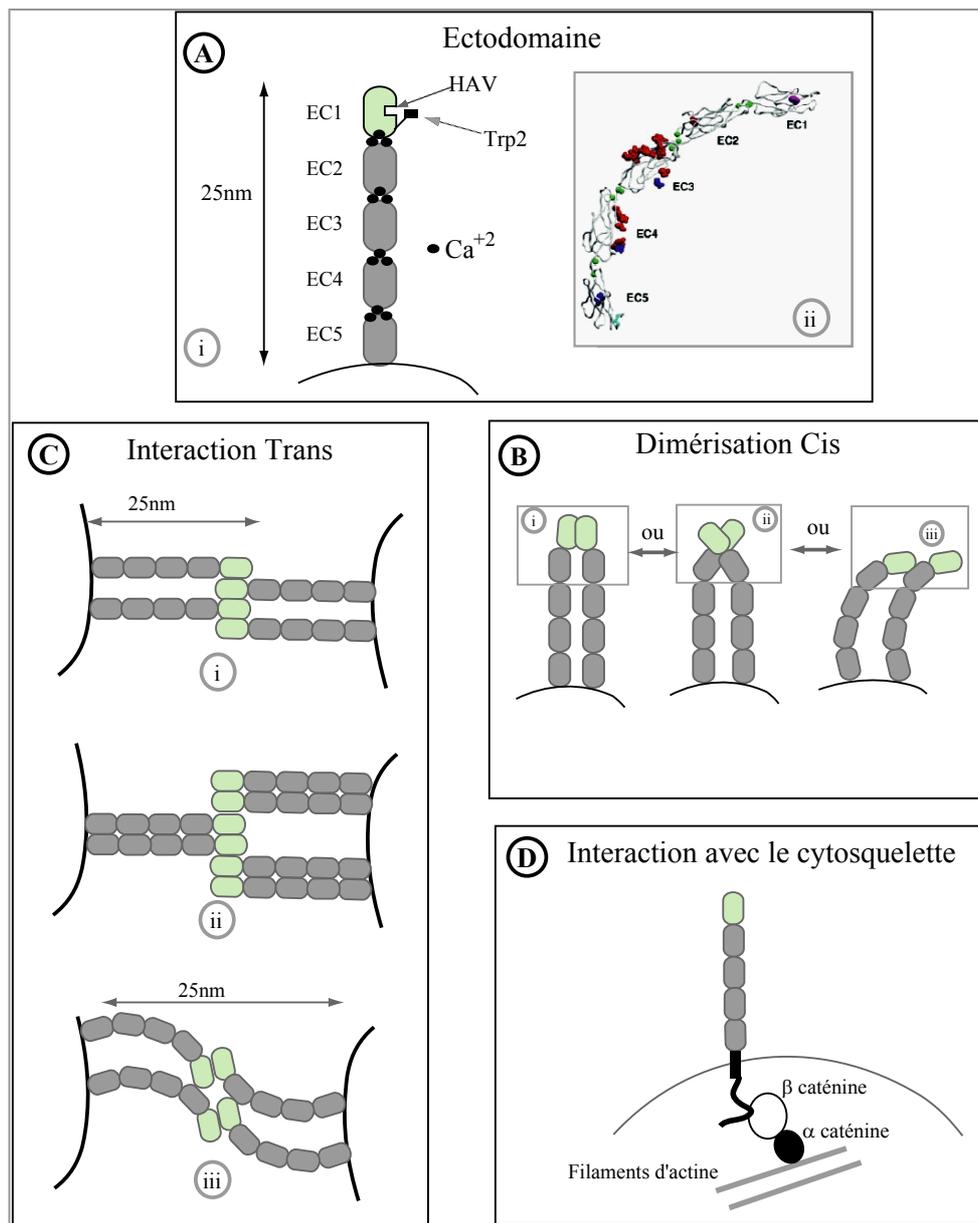


Figure-4-3 : Structure des cadhérines classiques et leurs différentes interactions. A- i- Structure de la partie extracellulaire : définition des domaines EC, des sites de fixation du calcium et de la poche hydrophobe HAV. EC1 apparaît dans une couleur différente car ce domaine est nécessaire à l'adhésion avec le rôle du Trp 2. ii- Structure cristallographique obtenue par Boggon *et al.* (Boggon et al., 2002). B- Formation des dimères cis entre cadhérines parallèles (i, ii, et iii étant les différents scénarios envisagés).

C- Les différents scénarios d'interaction trans entre cadhérines antiparallèles et hyperstructure en « zipper ». D- Interactions avec le cytosquelette d'actine.

CHAPITRE IV

En présence de **calcium**, l'ensemble de la partie extracellulaire adopte une structure droite et **rigide**, longue de 25 nm environ (Pokutta et al., 1994) ou rigide et courbée (Boggon et al., 2002) (figure-4-3-A-ii). Le calcium se fixe entre chaque domaine (Overduin et al., 1995; Shapiro et al., 1995), qui confirme le rôle structural du calcium. Nagar *et al.* ont montré que exactement trois ions calcium se fixent entre chaque domaine (figure-4-3-A) (Nagar et al., 1996). Enfin, plus récemment, Cailliez *et al.* ont, par des simulations, confirmé le rôle structural du calcium (Cailliez & Lavery, 2005).

D'après les structures cristallographiques, les cadhérines semblent s'assembler entre molécules **parallèles, portées par la même surface**. Ce type d'interaction est appelé **dimérisation cis**, plusieurs hypothèses d'interactions sont envisagées entre les domaines EC1-2 (figure-4-3-B).

L'interaction qui permet l'adhésion entre surfaces est appelée **interaction trans**. Des cadhérines **antiparallèles**, portées par des surfaces en regard, sont impliquées dans cette interaction « adhérente » (figure-4-3-C). Les structures cristallographiques montrent l'existence d'une organisation des cadhérines en hyperstructure de type « zipper » (figure-4-3-C). Cela annonce un mécanisme d'adhésion de type coopératif. Cependant, la formation de cette hyperstructure n'est pas encore claire : est-elle réalisée entre molécules individuelles (figure-4-3-C-i) ou entre dimères cis (figure-4-3-C-ii) ? Les interactions moléculaires entre les différents domaines EC ne sont pas clairement identifiées.

La partie intracellulaire des cadhérines est reliée au cytosquelette d'actine via des protéines intermédiaires : les caténines. Cette partie a, à la fois, un rôle mécanique et un rôle de communication (figure-4-3-D). La partie cytoplasmique présente un rôle non négligeable dans l'adhésion (Ozawa & Kemler, 1998), en soutenant, par exemple, la dimérisation des cadhérines (Ozawa, 2002). Cette partie a aussi une fonction de régulation de l'adhésion. Le rôle de cette partie intracellulaire ne sera pas plus détaillé ici.

4-1-2- Les différents scénarios d'interactions

Le calcium et le Trp2 sont deux paramètres nécessaires à l'adhésion induite par les cadhérines. Pour décrire leur participation exacte, plusieurs scénarios ont été proposés grâce,

entre autres, aux structures cristallographiques et aux études d'agrégation de cellules. On peut s'interroger sur la signification des structures cristallographiques : à savoir si elles reflètent réellement les processus qui rentrent en jeu *in vivo* et qui sont nécessaires pour l'adhésion effective entre cellules. L'implication des autres fragments, autres que EC1, a fait également le sujet de nombreuses études. Le rôle de la dimérisation *cis* des cadhérines dans l'adhésion reste aussi une question importante sur la compréhension des processus d'adhésion.

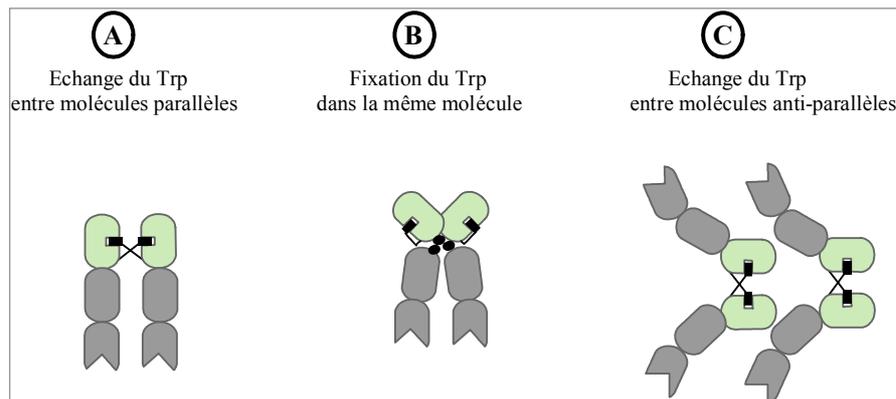


Figure-4-4 : Rôle du Trp2. A- échange du Trp2 entre cadhérines parallèles. B- Le Trp2 se fixe dans la poche hydrophobe de la même molécule de cadhérine. C- échange du Trp2 entre cadhérines antiparallèles.

Un premier scénario d'adhésion a été proposé d'après les structures cristallographiques obtenues par Shapiro *et al.* sur le fragment EC1 (Shapiro *et al.*, 1995). Ils ont mis en évidence l'existence de dimères *cis*. Une première étape du mécanisme d'adhésion consisterait en la formation de ces dimères entre cadhérines portées par la même cellule. Cette dimérisation semble être réalisée par l'intercalation du Trp2 d'une des cadhérines dans la poche hydrophobe HAV de l'autre et inversement (figure-4-4-A). L'interaction *trans* entre dimères *cis* est aussi observée dans cette étude. Une seconde étape dans l'adhésion est attribuée à cette interaction entre dimères initialement formés et portés par des cellules en vis-à-vis (figure-4-3-C-ii). Enfin, une organisation en « zipper » se met en place et permet l'adhésion entre surfaces opposées.

Tamura *et al.* ont étudié l'agrégation de cellules présentant des mutants de cadhérines (Tamura *et al.*, 1998). Ces auteurs mettent ainsi en évidence que le Trp2 est nécessaire à l'adhésion. D'après les structures cristallographiques qu'ils obtiennent sur EC1 et EC2, ils suggèrent que la dimérisation *cis* est initiée par un mécanisme différent. Les molécules de cadhérines semblent mettre en jeu la zone de fixation du calcium entre EC1 et EC2 et non une interaction via les tryptophanes (figure-4-3-B-ii et figure-4-4-B).

Pertz *et al.* ont décrit précisément, grâce à une étude en microscopie électronique, le rôle du calcium dans l'interaction entre cadhérines (Pertz *et al.*, 1999). Pour des concentrations en calcium comprises entre 50 et 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, les ions se fixent entre les motifs cadhérines et

donnent à la partie extracellulaire sa structure rigide. Pour des concentrations comprises entre 500 et 1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, la dimérisation *cis* rentre en jeu. Au-delà de 1 mmol.L^{-1} , les interactions *trans* se manifestent (figure-4-5). En outre, cette étude a montré que seule l'interaction *trans* fait participer le Trp2 et les poches hydrophobes HAV, puisqu'elle est inhibée par des molécules telles que le IAA ou I3A (acide 3-indole acétique), dont la structure est très proche du tryptophane. Toujours par cette même étude, une nouvelle structure cristalline montre que le tryptophane se fixe dans la poche hydrophobe de sa propre molécule, sans relier les cadhérines (figure-4-4-B).

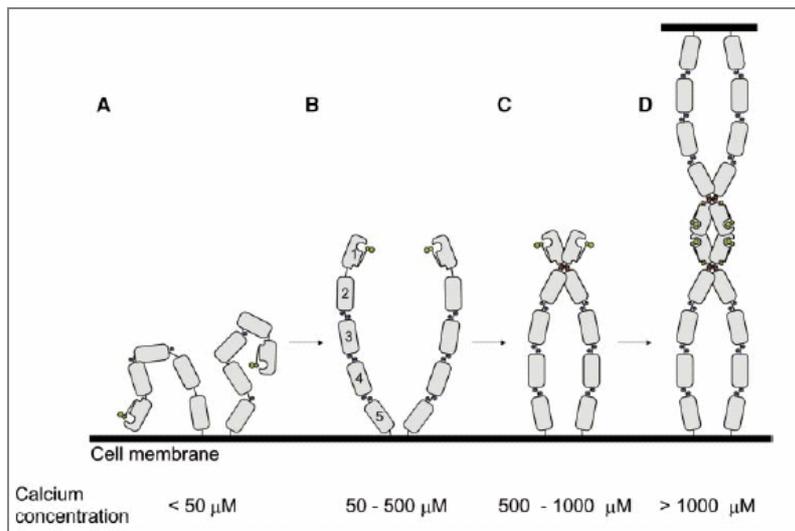


Figure-4-5 : Rôle du calcium : pour la structure des cadhérines, pour les processus de dimérisation *cis* et pour les interactions *trans* (Pertz *et al.*).

En 2003, Boggon *et al.* étudient en cristallographie les cinq fragments (Boggon *et al.*, 2002). Ils mettent en évidence une structure relativement différente car « courbe » où le domaine EC1 est presque perpendiculaire au domaine EC5 (figure-4-3-A-ii). Ces auteurs proposent un processus de dimérisation *cis* légèrement différent, ne faisant pas intervenir les mêmes interfaces. La dimérisation *cis* est réalisée via une interaction entre EC1 et EC2 (figure-4-3-C-iii). Ils attribuent la participation du Trp2 à l'interaction *trans*, mais avec une fixation dans la poche hydrophobe HAV de la molécule qui est en face (figure-4-4-C). Une hyperstructure en zipper est aussi proposée.

La spécificité de l'adhésion entre cadhérines est attribuée au fragment EC1 (Nose *et al.*, 1990). Mais les autres fragments ont une influence sur la force de l'adhésion. Chappuis-Flament *et al.* ont justement étudié le rôle de chacun des domaines sur l'agrégation entre cellules (Chappuis-Flament *et al.*, 2001). Ils ont, pour cela, utilisé des cellules présentant différents mutants de cadhérines, amputées de un ou plusieurs domaines. Ils montrent que les

CHAPITRE IV

fragments EC1 et EC2 sont nécessaires à l'adhésion. Ces deux fragments ne semblent pas suffisants pour induire une adhésion observable dans le cas de cette étude. Aucun des autres domaines ne semble spécifiquement indispensable à l'adhésion, car ils sont « interchangeables ». Mais la présence d'un troisième domaine s'avère nécessaire pour observer une adhésion, que ce soit pour augmenter le « nombre » d'interactions entre cadhérines ou pour jouer le rôle d'espaceur.

L'adhésion entre molécules de cadhérines est donc complexe, et présente plusieurs étapes (dimérisation cis, interaction trans). Le rôle majeur du calcium est admis à la fois dans la structuration de la partie extracellulaire, dans la construction des dimères cis et dans l'interaction trans. Le Trp2 et la poche hydrophobe HAV participent directement au processus d'adhésion mais divers scénarios sont envisagés pour expliquer leur implication. Le rôle exact de la dimérisation *cis* n'est pas encore admis : des études ne considèrent d'ailleurs que des monomères de cadhérines. Nous précisons ainsi dans la suite si les études se portent sur des monomères ou sur des dimères préformés. La spécificité semble être attribuée à EC1, mais la participation des autres domaines fait l'objet de nombreuses études, avec l'idée que les cadhérines peuvent être interdigitées sur différentes longueurs, où interagissent plusieurs domaines.

4-1-3- Force et cinétique d'interaction entre cadhérines

Les cadhérines sont des molécules permettant une adhésion stable et longue entre cellules au repos : des propriétés cinétiques particulières sont donc attendues. En outre, la complexité de la structure des cadhérines annonce une complexité de profils d'interactions.

Nous nous concentrons ici sur les études menées sur l'interaction *trans* entre cadhérines antiparallèles, portées sur des surfaces en regard.

4-1-3-a- Mesures de profils force-distance

Le SFA (surface force apparatus) a apporté des informations très précieuses sur les géométries d'interaction entre cadhérines. Des profils force-distance ont été réalisés entre deux surfaces recouvertes de cadhérines (des parties extracellulaires). La distance interfaciale est mesurée par une technique d'interférométrie optique et la force appliquée entre les surfaces est déduite de la déformation des ressorts sur lesquels sont montées les surfaces. Sivasankar *et al.* ont

montré que **tous les domaines EC** peuvent participer à l'interaction entre cadhérines (Sivasankar et al., 1999). Ces auteurs montrent, en outre, que **les états d'adhésion** accessibles **sont multiples**, et que l'existence de ces liens multiples ralentit le détachement des deux surfaces. En 2001, une seconde étude confirme l'existence d'états d'adhésion multiples (Sivasankar et al., 2001). Dans cette étude, les auteurs observent trois états d'adhésion distincts. Les différents états ont pu être distingués, en imposant des contacts entre surfaces à des distances différentes. Les distances pour lesquelles les trois ruptures sont observées renseignent sur la longueur des liens et donc sur le nombre de domaines intercalés. Ceci est illustré par la figure-4-6. L'état d'adhésion le plus stable correspond à la configuration où les cadhérines sont interdigitées sur leurs cinq domaines, avec une énergie d'adhésion de 19 kT par lien. Un second état est atteint quand les cadhérines recouvrent entre 3 et 4 domaines, une énergie d'adhésion de 12 kT est associée à cet état. Enfin, l'état le plus faible correspond au recouvrement des domaines EC1 et EC2 avec une énergie de 9 kT .

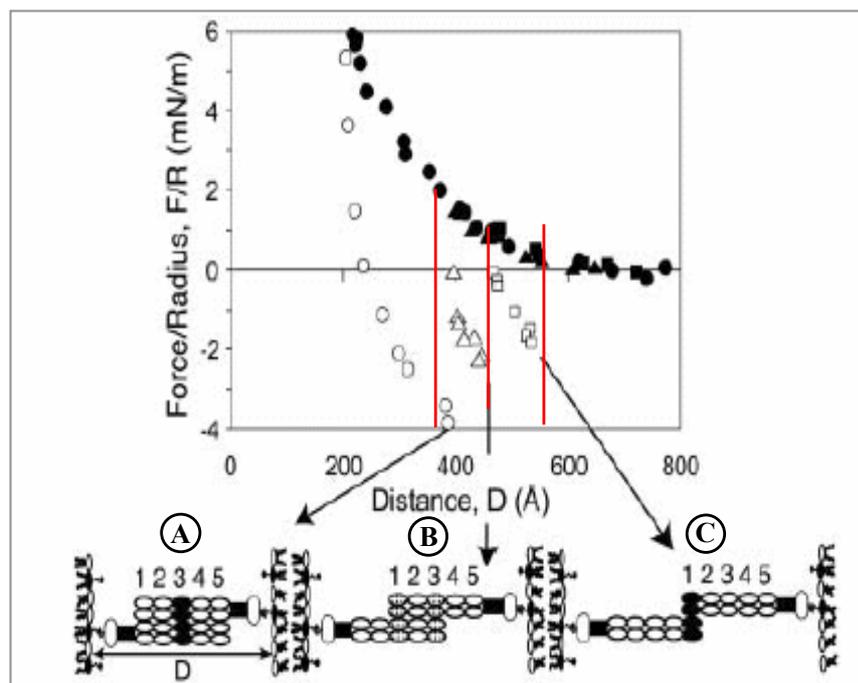


Figure-4-6 : Structures et intensités des trois états d'adhésion entre cadhérines, observés en SFA d'après la construction de profils de force – distance (Sivasankar et al., 2001; Zhu et al., 2003).

Zhu *et al.* ont poursuivi les études précédentes, en identifiant le rôle des différents domaines. Pour cela, les auteurs ont mesuré des profils de force pour des mutants de cadhérines, amputées de un ou plusieurs domaines (Zhu et al., 2003). Notons ici que l'étude se porte sur des dimères de cadhérines préformés. D'après l'allure des profils de force obtenus pour les

CHAPITRE IV

différents mutants, les auteurs identifient les domaines directement impliqués dans les trois états d'adhésion, ce qui apparaît en figure-4-6.

Ces différentes études en SFA ont permis de révéler une **multiplicité d'adhésion entre cadhérines, où varie le nombre de domaines directement impliqués**. Ces différents états d'adhésion sont accessibles en amenant les surfaces suffisamment proches, les cadhérines sont en quelques sortes « forcées » à s'interdigiter. Il reste à savoir si ces états sont atteints en conditions physiologiques.

L'interaction entre cadhérines a également été étudiée en AFM. Baumgartner *et al.* ont observé l'interaction *trans* entre les cinq domaines cadhérines avec des dimères de cadhérines préformés (Baumgartner et al., 2000). Les auteurs ont montré que les cadhérines peuvent s'associer en une hyperstructure de type zipper. En effet, ils détectent un large spectre de forces de rupture, de forme remarquable : un pic principal est observé pour 40 pN, puis d'autres pics sont repérés à des forces deux fois puis trois plus grandes. Une seule interaction *trans* se rompt donc pour une force de 40 pN. Il faut noter ici que la formation des liaisons entre molécules de cadhérines est opérée dans des conditions différentes que celles imposées en SFA. Les domaines directement impliqués dans l'interaction *trans* ne sont pas déterminés dans cette étude.

4-1-3-b- Constantes cinétiques

L'étude en AFM reportée précédemment (Baumgartner et al., 2000) a également conduit à la détermination d'une constante de dissociation à force nulle, k_-^0 , en considérant la force de rupture la plus probable en fonction du taux de charge (§ 1-4-2). Cette constante est estimée à 1.8 s^{-1} et la force critique f^0 à 14 pN. Par ailleurs, considérant la probabilité d'adhésion en fonction du temps de contact entre pointe et surface, les auteurs concluent que l'adhésion entre cadhérines est plus lente que l'adhésion entre les sélectines et leurs ligands. Les comparaisons restent qualitatives ici, mais sont cohérentes avec les fonctions des cadhérines, qui d'une part sont « fixées » au cytosquelette et qui d'autre part réalisent des liens entre cellules au repos, contrairement aux sélectines.

Une étude récente conduite en AFM s'est portée cette fois sur les interactions entre EC1 et EC2 uniquement (du Roure et al., 2006). En mesurant la force de rupture la plus probable en fonction du taux de charge, les auteurs déterminent un paramètre de force de 2.2 pN et une constante de dissociation à force nulle k_-^0 comprise entre 10^{-2} s^{-1} et 1 s^{-1} .

Pierres *et al.* ont étudié, en chambre à flux, l'adhésion de particules recouvertes des fragments EC1 et EC2 sur des surfaces décorées des ces mêmes fragments (Pierres et al., 1998). Ces auteurs mesurent la fréquence d'arrêt en fonction de la vitesse des particules. Comme cette vitesse dépend de la distance entre la particule et la surface, ils en déduisent une longueur d'interaction de 10 nm. De plus, ils estiment que le temps moyen d'association entre deux molécules est de 800 s.

Plus tard, Perret *et al.* ont mesuré, en chambre à flux, la constante de dissociation pour l'interaction entre les domaines EC1-EC2 (Perret et al., 2002), sous forme de monomères, en considérant le temps de vie d'un lien soumis à des forces constantes (§ 1-4-2-b). Les auteurs mettent en évidence une interaction labile et très sensible aux contraintes mécaniques. En effet, la constante de dissociation est de 0.5 s^{-1} et la force critique mesurée vaut 2.4 pN, ce qui est relativement faible.

En utilisant le BFP, (§ 1-4-2), Perret *et al.* ont caractérisé les propriétés dynamiques des liens entre E-cadhérines, pour des monomères (Perret et al., 2004). Pour des parties extracellulaires complètes EC1-5, ces auteurs mettent en évidence une multiplicité d'adhésions. Une hiérarchie de forces de rupture caractéristiques est observée en fonction du taux de charge, ce qui annonce l'existence de sous-populations. **Deux groupes de liens sont ainsi repérés** : un groupe présentant **une adhésion faible et labile** et un second réalisant une **adhésion forte et durable**. De façon plus précise, pour les domaines EC1-5, les forces de rupture montrent des distributions anormalement larges, surtout pour les taux de charges les plus faibles. Cette observation indique la présence de plusieurs types d'adhésion. Pour éliminer les liens les plus faibles, ils soumettent les liens à un saut de force puis à une rampe de force. Le saut élimine 33% des liens. Les liens qui persistent forment le groupe de liens forts et durables, dont deux sous-populations sont caractérisées par, d'une part, une force de rupture f^0 de 3-4 pN et une constante de dissociation à force nulle k_-^0 de 10^{-6} - 10^{-5} s^{-1} et, d'autre part, par f^0 égale à 5 pN et k_-^0 de 10^{-2} s^{-1} . Le groupe de liens faibles et labiles est attribué aux interactions via les fragments EC1 et EC2. En n'étudiant que ces domaines, ils aboutissent aux caractéristiques suivantes : deux sous populations peuvent être distinguées avec une même force critique de 6-7 pN et des k_-^0 de 8-11 s^{-1} et 0.5-1 s^{-1} . Ainsi, les liens les plus forts correspondent, sans doute, à des recouvrements plus larges entre cadhérines, comme ceux observés en SFA, mais ce n'est pas démontré via cette méthode. Les quatre états d'adhésion sont peuplés de façon

aléatoire. Cependant, augmenter le temps de contact augmente la proportion de liens forts et fait disparaître les états d'adhésion faible. La cinétique d'association semble donc aussi différente pour les divers états. Il est intéressant de noter ici que les conditions de formation de liens sont plus proches des conditions physiologiques, contrairement aux expériences de SFA. Ceci laisse penser que l'existence des états d'adhésion multiples est envisageable dans le cas d'adhésion entre cellules.

Bayas *et al.* ont mené le même type d'étude en BFP mais sur la C-cadhérine, avec des dimères préformés (Bayas *et al.*, 2006). Les auteurs observent également quatre états d'adhésion. Deux états labiles sont aussi attribués aux fragments EC1-EC2, par un fit continu les paramètres suivants sont trouvés : $f^0 = 5.27$ pN, $k_-^0 = 3.9$ s⁻¹ et $f^0 = 5.23$ pN, $k_-^0 = 0.02$ s⁻¹. Les deux états d'adhésion forte mettent en jeu les autres fragments et ont les caractéristiques suivantes : $f^0 = 4.2$ pN, $k_-^0 = 3.9 \cdot 10^{-4}$ s⁻¹ et $f^0 = 3.96$ pN, $k_-^0 = 10^{-5}$ s⁻¹.

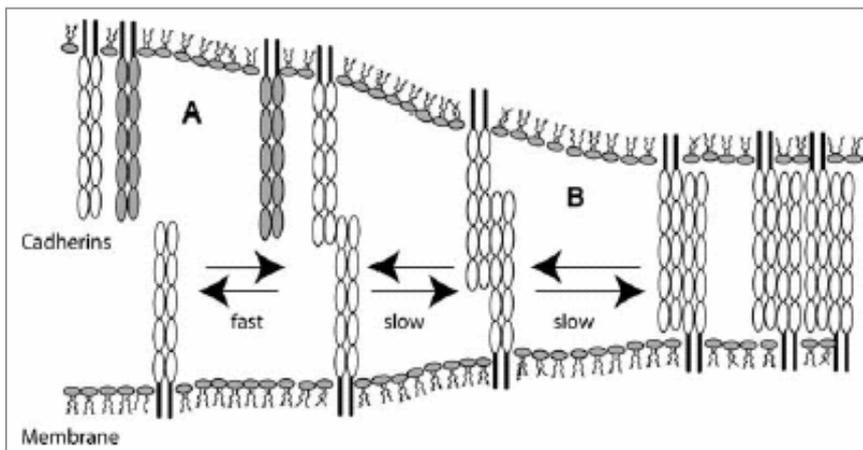


Figure-4-7 : Scénario d'adhésion entre cadhérines proposée par Bayas *et al.* (Bayas *et al.*, 2006).

Ces résultats sont donc très proches de ceux obtenus sur la E-cadhérine, mais les temps de vie sont sensiblement différents pour l'interaction entre EC1-2. Les auteurs proposent que cette différence de cinétique explique en partie l'origine de la sélectivité entre les différents types de cadhérines. Enfin, ils suggèrent le scénario suivant pour l'adhésion entre paires de cadhérines (figure-4-7). L'adhésion entre cadhérines débute par une interaction faible et rapide, à laquelle seuls les fragments EC1 et EC2 prennent part. Puis, les liens entre cadhérines se renforcent en recouvrant un plus grand nombre de domaines, et ce, suivant une cinétique plus lente, à la fois pour l'association et la dissociation. La dimérisation *cis* serait très rapide et n'est pas considérée ici.

4-1-4- Bilan de l'état de l'art sur l'interaction entre cadhérines

Pour résumer, d'après les diverses études présentées au paragraphe précédent, l'interaction entre cadhérines fait intervenir plusieurs états d'adhésion, aux temps de vie radicalement différents (table-4-1), rendant compte des fonctions multiples qu'endossent les cadhérines : une reconnaissance spécifique rapide et la formation de liaisons adhérentes et stables entre cellules.

Nombre de fragments	EC1 à EC5	EC1 et EC2
Energies d'adhésion	19 <i>kT</i> , 12 <i>kT</i> , 9 <i>kT</i>	1 <i>kT</i>
Constantes de dissociation	10^{-2} s^{-1}	8-11 s^{-1}
	$10^{-5} - 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	0.5-1 s^{-1}
Paramètre de force	3-4 pN et 5 pN	6-7 pN

Table-4-1 : Caractéristiques des interactions entre E-cadhérines, pour les parties extracellulaires entières ou pour les fragment EC1 et EC2 uniquement, d'après les études suivantes (Sivasankar et al., 2001),(Perret et al., 2004), (Bayas et al., 2006).

Les fragments EC1 et EC2 sont responsables de la spécificité de l'interaction et induisent une adhésion faible et labile. Cette adhésion n'est pas toujours observée, ceci dépendant de la sensibilité de la méthode de mesure. Les différentes études menées en AFM, chambre à flux et BPF convergent pour attribuer à l'interaction impliquant les fragments EC1 et EC2 des temps de vie faibles, avec des constantes de dissociation à force nulle proche de 1 s^{-1} . Les cadhérines peuvent aussi induire, en recouvrant davantage de domaines, une adhésion plus stable, avec des temps de vie qui varient entre 100 s et plusieurs heures. Le temps de contact et les contraintes exercées sur les molécules sont des paramètres fondamentaux qui peuvent conduire à observer ces différents modes d'interaction entre cadhérines.

Enfin, notons aussi que l'organisation en zipper et les interactions avec le cytosquelette peuvent également renforcer l'adhésion effective entre cellules.

Dans ce contexte, nous concentrons notre étude sur des dimères de cadhérines préformés (ectodomains uniquement), où les cinq domaines sont présents. Dans un premier temps, nous chercherons à déterminer l'état d'adhésion entre cadhérines accessible avec notre outil expérimental. Dans un second temps, nous nous attacherons à mesurer la constante d'association relative à l'état d'adhésion observé.

4-2- Adhésion entre particules magnétiques induite par les cadhérines

Nous cherchons à étudier l'adhésion induite par les cinq fragments de cadhérines et plus précisément à estimer la cinétique d'association entre ces cinq fragments. Pour cela, nous empruntons la démarche présentée aux chapitres 2 et 3 qui utilise les particules magnétiques pour sonder les cinétiques d'association entre un ligand et un récepteur. Dans ce cadre, nous cherchons à réaliser une adhésion entre particules magnétiques due à la reconnaissance spécifique entre cadhérines et déclenchée par l'application d'un champ magnétique extérieur.

Dans ce paragraphe, nous présenterons, dans un premier temps, la stratégie que nous avons adoptée pour accrocher des cadhérines à la surface des particules magnétiques. Dans un second temps, nous montrerons que nous sommes en mesure de déclencher, par une étape de champ magnétique, une adhésion entre particules, induite par des interactions entre cadhérines.

4-2-1- Greffage des cadhérines sur les particules magnétiques

4-2-1-a- Les chimères de cadhérines utilisées

Nous considérons des E-cadhérines d'origine humaine, distribuées par Sigma Aldrich, qui sont sous forme de chimères. Il s'agit donc d'assemblages moléculaires à base de cadhérines. Seule leur partie extracellulaire, composée des cinq fragments EC, est présente dans cet assemblage. Une chimère est composée de deux molécules de cadhérines, fixées par leur domaine EC5 à un même fragment Fc d'un IgG1 humain (figure-4-8). En outre, ce fragment Fc est lié par son extrémité C à une série d'histidines, appelé « tag histidine ». Cet assemblage présente ainsi deux fonctions : les dimères de cadhérines sont préformés et les cadhérines peuvent être facilement greffées et orientées sur des surfaces. Le greffage peut être réalisé suivant deux possibilités : via le fragment Fc ou via le tag histidine. Le fragment Fc peut être capturé de façon spécifique par une protéine anti-Fc, comme la protéine A. Le tag histidine peut chélater un ion métallique, comme le Nickel. Notons qu'une chimère de cadhérines a un poids moléculaire d'environ 150 000 g.mol⁻¹.

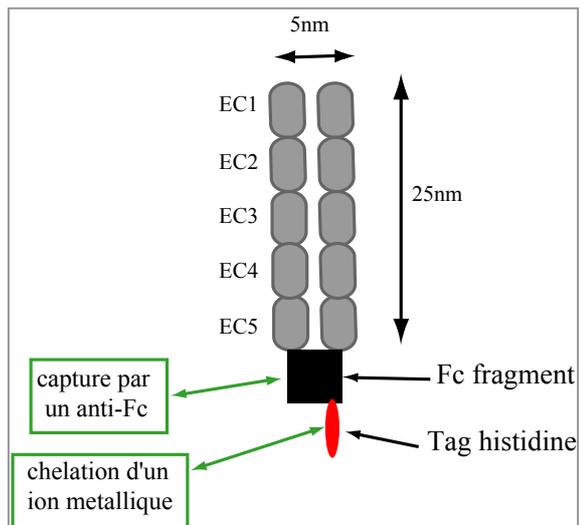


Figure-4-8 : Chimère de E-cadhérines utilisée (distribuées par Sigma Aldrich).

Ce produit est fourni sous la forme d'une poudre, obtenue après lyophilisation de 1 mL d'une solution de chimères en tampon Tris-citrate à 50 mM (pH = 6.5), avec 200 mM de NaCl et 2 mM de CaCl₂. Nous solubilisons cette poudre avec 500 µL d'eau milli-Q. La concentration en chimères est alors de $1.3 \cdot 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$. Par la suite, de tels échantillons sont dialysés pendant une nuit dans un tampon borate à 10 mM à pH=8.5. La solution récupérée est diluée d'environ un facteur deux. Nous expliquerons dans le paragraphe suivant la raison de cette étape de dialyse.

4-2-1-b- Fixation des cadhérines sur les particules magnétiques

L'étape de fixation de la cadhérine à la surface des particules est une étape critique, car l'adhésion entre particules va dépendre de la manière dont sont accrochées les cadhérines et de leur quantité. Nous choisissons une capture des chimères de cadhérines via leur fragment Fc, car le greffage de protéines anti-Fc est relativement « simple » sur nos particules, contrairement à une capture via le tag histidine. Pour cela, des protéines A, reconnaissant spécifiquement les fragments Fc d'origine humaine, sont greffées auparavant sur les particules. De cette manière, nous cherchons, d'une part, à contrôler la quantité de chimères de cadhérines accrochées par la quantité de protéines A greffées. D'autre part, nous souhaitons orienter les cadhérines à la surface des particules grâce à l'accrochage via le fragment Fc de la chimère.

La protéine A est greffée à la surface des particules, par un couplage covalent, dont le principe a été énoncé au paragraphe 2-3-1-a. Les protéines sont couplées aux fonctions carboxyliques présentées sur la couche dense de polymères. La quantité de protéines A ainsi greffées est dosée par la méthode µ-BCA (§ 2-3-1-b).

CHAPITRE IV

Après greffage de la protéine A, les chimères de cadhérines sont incubées avec les particules pour permettre leur capture spécifique. Les conditions d'incubation ont du être optimisées à plusieurs niveaux. D'une part, en ce qui concerne la salinité du milieu continu, la solution de chimère a été dialysée. En effet, sans cette étape de dialyse, une agrégation significative des particules magnétiques a lieu directement pendant l'étape d'incubation, ce qui est dû à la présence des ions calcium et à une forte concentration en NaCl (figure-4-9). La dialyse des chimères permet de se placer dans des conditions plus « douces ». D'autre part, une adsorption non spécifique des chimères sur les particules est à éviter pendant l'étape d'incubation. La quantité et surtout l'orientation des cadhérines ne seraient, en effet, plus maîtrisées. Pour éviter cette adsorption non spécifique, de la BSA et un tensioactif non ionique, le F127, sont introduits dans le milieu, après greffage de la protéine A et à des concentrations relativement importantes : 0.1 % en masse de BSA, soit $1.7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, et 0.4 % en masse de F127. La BSA joue le rôle « d'agent bloquant » pour saturer la surface des particules et empêcher l'adsorption non spécifique des chimères. Cette composition dans un tampon borate à 5 mM constitue le « tampon de référence » (nous avons choisi un tampon borate car les ions calcium y sont solubles).

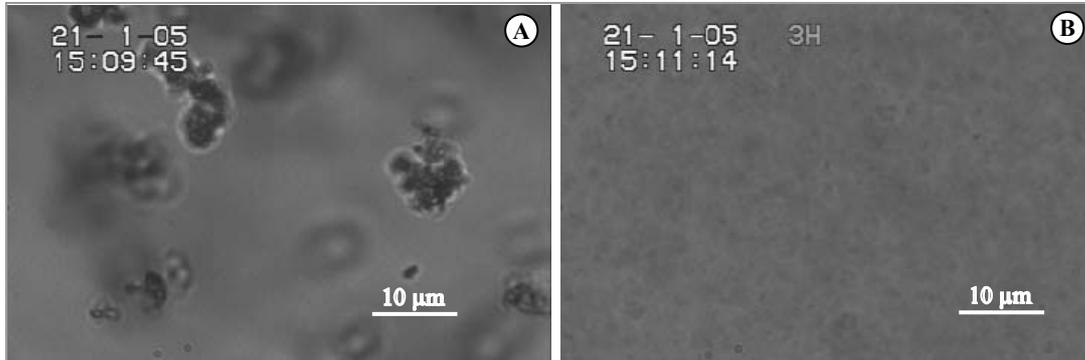


Figure-4-9 : A- Déstabilisation des particules pendant l'incubation avec les cadhérines dans le milieu directement reconstitué. B- Suspension stable dans un milieu dialysé.

L'étape d'incubation est réalisée à température ambiante pendant 20 minutes. La concentration de particules est maintenue à 1% en masse, la concentration de chimères varie entre 10^{-7} et $1.3 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, c'est-à-dire entre 30 et 400 chimères environ par particule. Après incubation, les particules sont « lavées » plusieurs fois, c'est-à-dire séparées par sédimentation magnétique et redispersées dans le tampon de référence, ce qui permet d'éliminer les chimères non capturées.

CHAPITRE IV

Après cette étape d'incubation, nous estimons avoir des particules recouvertes de cadhérines correctement orientées (figure-4-10). Cette configuration sera confirmée par plusieurs expériences que nous décrirons par la suite.

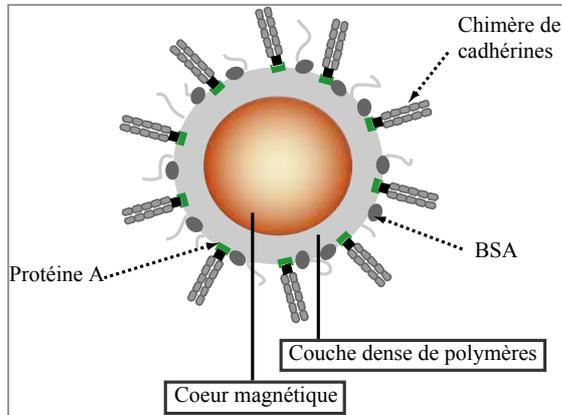


Figure-4-10 : Accrochage des chimères de cadhérines à la surface des particules magnétiques.

4-2-2- Spécificité de l'adhésion

Pour étudier l'adhésion entre particules magnétiques, spécifique de l'interaction entre cadhérines, et déclenchée par le champ magnétique, de nombreuses précautions sont à prendre. C'est l'application du champ magnétique qui doit permettre la rencontre entre cadhérines et initier l'adhésion entre particules. Mais la reconnaissance entre cadhérines requiert des conditions physico-chimiques particulières, en termes d'état de surface des particules et de composition du milieu continu, qui peuvent perturber la stabilité colloïdale. Dans un premier temps, nous étudions la stabilité des particules recouvertes de cadhérines dans des conditions favorables à la reconnaissance, mais sans champ magnétique. Puis, dans un second temps, nous comparons l'adhésion déclenchée par le champ avec ou sans cadhérines, toutes choses égales par ailleurs. Les principaux paramètres physico-chimiques jouant sur la stabilité colloïdale sont : la force ionique totale de la solution, la présence d'ions divalents (calcium) qui, outre d'augmenter davantage la force ionique, interagissent avec le polyélectrolyte à la surface des particules, le pH, et l'adsorption ou le greffage de protéines qui change l'état de surface des particules. L'intensité du champ magnétique est aussi un paramètre important : trop fort il peut induire davantage d'interactions non spécifiques. Ainsi, le champ magnétique utilisé sera optimisé, c'est-à-dire juste assez fort pour que toutes les particules s'assemblent en chaînes.

CHAPITRE IV

Pour étudier la stabilité des suspensions colloïdales sans champ magnétique, des observations en microscopie optique sont généralement suffisantes. En revanche, pour étudier l'état d'agrégation de la suspension après une étape de champ magnétique, nous avons recours aux méthodes de turbidimétrie présentées au paragraphe 2-3-2. Ainsi, la densité optique (DO) de la suspension est mesurée avant et après application d'un champ magnétique. L'augmentation de DO renseigne sur l'agrégation déclenchée par le champ magnétique. Notons ici que, pour cette partie de l'étude, nous ne sommes pas en condition de « régime doublets » (§ 3-1-2). La DO ne permet donc pas de suivre quantitativement un nombre de doublets mais permet de suivre qualitativement l'état d'agrégation de la suspension. Pour comparer une variation de DO entre différents échantillons, les DO initiales sont imposées identiques (par des concentrations identiques en particules) pour les différents échantillons.

Le suivi de la DO après champ, sur une certaine période de temps, renseigne sur la persistance de l'adhésion, c'est-à-dire sur sa réversibilité qui est reliée à la nature des liens entre particules. Les liaisons de type ligand-récepteur peuvent se défaire sur la durée de l'observation et conduire à la redispersion progressive des particules, et donc à une diminution de DO . Ainsi, pour caractériser la nature de l'adhésion entre particules, nous reportons dans les exemples donnés ici les mesures de DO sur quelques minutes.

L'adhésion induite par la reconnaissance entre cadhérines dépend, comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, de la concentration en calcium. De plus, elle est inhibée par des molécules se substituant au tryptophane. Ces deux paramètres seront considérés pour démontrer la spécificité de l'adhésion. Nous montrerons aussi l'influence de la quantité de cadhérines capturées.

4-2-2-a- L'adhésion dépend de la concentration en calcium

Plusieurs étapes dans la préparation des particules peuvent être source d'agrégation non spécifique (figure-4-11). La première étape qui consiste à greffer la protéine A change l'état de surface des particules et peut être source d'interactions non spécifiques entre particules. Les conditions de greffage sont fixées à 10 μg de protéine A (PA) par mg de particule, ce qui correspond à 280 protéines greffées par particule. La seconde étape est l'incubation des chimères de cadhérines avec les particules. Nous préciserons à chaque fois la quantité de chimères apportée par rapport au nombre de particules. A l'issue de cette incubation, nous parlerons de particules « recouvertes » de cadhérines. Enfin, la dernière étape consiste à se

placer dans des conditions favorables pour l'interaction entre cadhérines, c'est-à-dire en imposant une concentration en calcium de 2 mM.

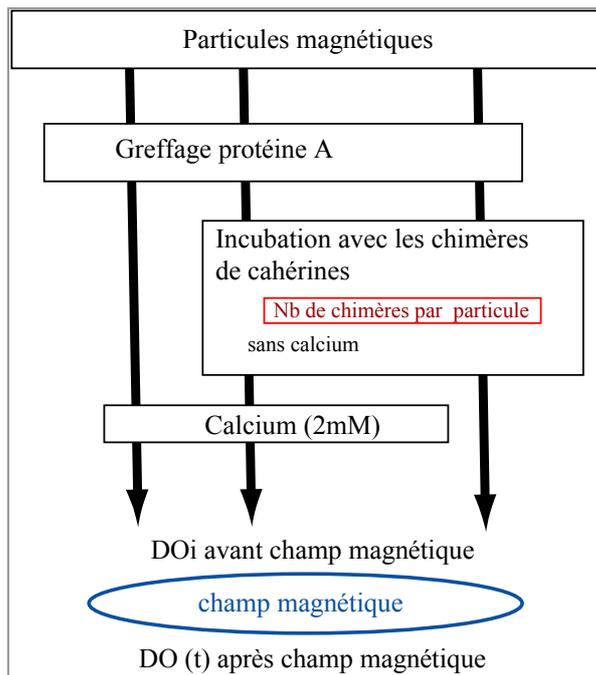


Figure-4-11 : protocole d'étude de l'agrégation entre particules magnétiques induites par les cadhérines.

Nous cherchons à montrer, en premier lieu, l'influence du calcium sur l'adhésion entre particules recouvertes de cadhérines. Dans la littérature, le rôle du calcium sur l'interaction entre cadhérines est généralement démontré en ajoutant des ions qui chélatent le calcium, tels que l'EDTA (l'acide éthylène diamine tétraacétique). Dans notre situation, nous évitons d'ajouter de tels ions car ils portent 4 charges négatives et déstabilisent immédiatement la suspension de particules.

Pour démontrer le rôle du calcium sur l'adhésion entre particules recouvertes de cadhérines, nous considérons des particules recouvertes de cadhérines mises en présence ou non de calcium à une concentration de 2 mM. Cette concentration est à priori suffisante pour induire une reconnaissance spécifique entre cadhérines (Pertz et al., 1999). Le calcium pouvant induire une agrégation non spécifique entre particules recouvertes uniquement de protéines A, un tel échantillon, témoin, est également étudié. Un exemple d'étude préliminaire est donné en figure-4-12-A. Dans cette étude, les particules sont fortement recouvertes de cadhérines et le milieu continu est un tampon borate à une concentration de 15 mM avec 0.4% en masse de F127. L'étape de champ magnétique est de 5 min à 15 mT. Les particules recouvertes uniquement de protéines A s'agrègent légèrement en présence de 2 mM de calcium puisqu'une différence de 35 mDO est mesurée après l'étape de champ magnétique (figure-4-

11). Notons que pour cet échantillon la densité optique reste stable après interruption du champ, ce qui traduit la présence d'une adhésion irréversible.

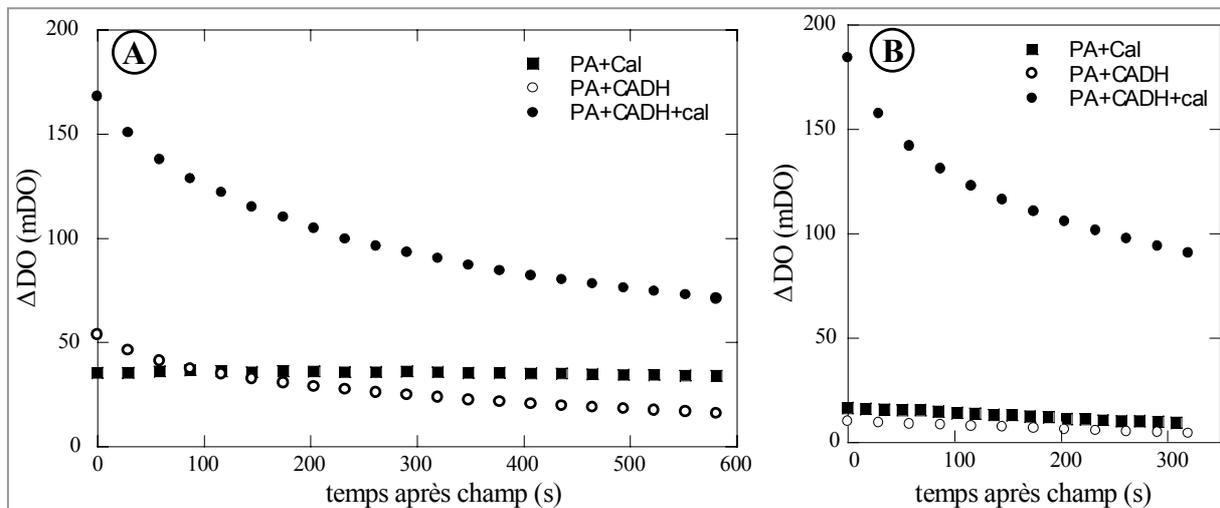


Figure-4-12 : Spécificité de l'adhésion due au calcium et à la présence de cadhérines sur les particules. Différence de densité optique, ΔDO , ($DO(t) - DO(\text{avant champ})$) en fonction du temps t , temps après champ, pour trois échantillons après 5 min à 15mT : ■ Particules greffées de protéines A et mises en présence de 2 mM de $CaCl_2$, ○ Particules greffées de protéines A et recouvertes de cadhérines sans $CaCl_2$, ● Particules greffées de protéines A et recouvertes de cadhérines avec 2mM de $CaCl_2$. A- Dans un tampon à 15 mM et sans BSA. B- Dans le tampon de référence (0.1% en masse de BSA)

Pour des particules recouvertes de cadhérines, une adhésion a lieu avec ou sans calcium. Cette agrégation est réversible puisque la densité optique diminue sur la période d'observation, après interruption du champ magnétique. L'adhésion entre particules recouvertes de cadhérines est cependant nettement supérieure en présence de calcium, puisqu'elle représente 170 mDO contre 50 mDO sans calcium (figure-4-12-A).

Cette première expérience montre qu'une adhésion significative, déclenchée par le champ magnétique, est observée entre particules recouvertes de cadhérines, où le calcium et les cadhérines sont nécessaires. Dans la suite, pour minimiser les interactions non spécifiques, la force ionique totale est diminuée et fixée à 5 mM et de la BSA est ajoutée à 0.1% en masse (figure-4-12-B). C'est ainsi que le « tampon de référence » a été mis au point. Dans ces conditions, l'agrégation, en présence de calcium, entre particules recouvertes de protéines A est diminuée (10 mDO). Pour réduire l'agrégation non spécifique entre particules recouvertes de cadhérines sans calcium, les quantités de cadhérines incubées sont abaissées. La BSA ajoutée dans le milieu permet aussi de diminuer l'adsorption non spécifique de cadhérines entre particules (ce qui correspond à moins de 10 mDO).

CHAPITRE IV

Notons qu'il est envisageable de considérer une adhésion non spécifique due à la cadhérine et renforcée par la présence du calcium. Pour écarter cette hypothèse, l'influence d'un inhibiteur spécifique de l'interaction entre cadhérines sera étudiée par la suite.

L'influence de la concentration en calcium a fait l'objet d'une étude plus précise. Toutes choses égales par ailleurs, l'adhésion observée augmente avec la concentration en calcium. A partir de 0.4 mM, une adhésion significative est mesurée. Puis, l'adhésion sature à partir d'une concentration de 2 mM en calcium (figure-4-13). Dans la suite, en milieu calcique, la concentration de calcium sera fixée à 2 mM.

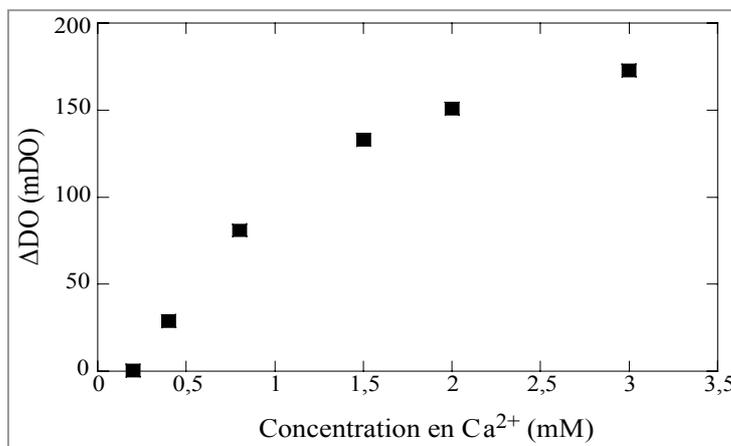


Figure-4-13 : Différence de *DO* (spécifique) après une étape de 5 min à 40 mT, pour des particules greffées en protéine A et incubées avec 150 chimères par particules. La *DO* initiale est autour de 0.7 pour chaque échantillon.

Cette étude démontre le rôle significatif du calcium sur l'adhésion entre particules recouvertes de cadhérines.

4-2-2-b- L'adhésion dépend de la quantité de cadhérines adsorbées

La quantité de chimères introduite pendant l'étape d'incubation est un paramètre important, qui joue sur la quantité de cadhérines présentes sur la surface des particules et donc sur l'efficacité de l'adhésion. Pour illustrer cette influence, une étude est présentée brièvement ici. Deux échantillons de particules greffées en protéine A sont incubés avec deux concentrations différentes en chimères de cadhérines : 100 et 200 chimères par particule. L'adhésion observée augmente avec la quantité de chimères de cadhérines introduites : une différence de 170 mDO est mesurée pour 200 chimères contre 67 mDO pour 100 chimères après une même étape de champ magnétique (figure-4-14).

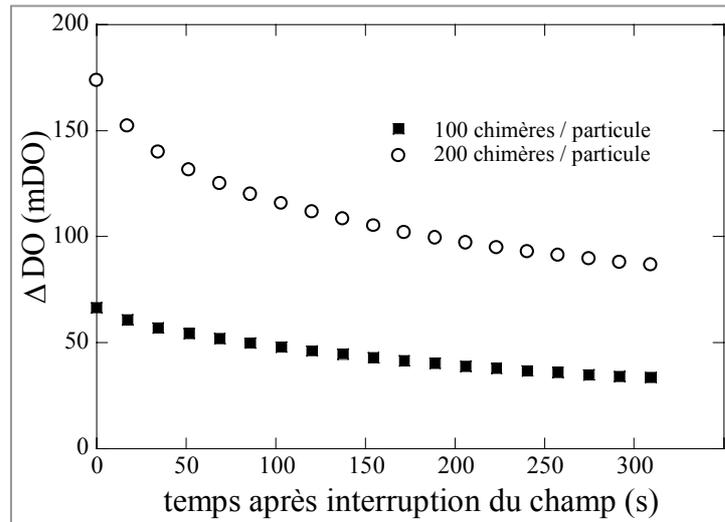


Figure-4-14 : Influence de la quantité de chimères introduite pendant l'étape d'incubation. Différence de DO après une étape de 5 min à 17 mT. ■ Particules greffées en protéines A et incubées avec 100 chimères par particules avec 2 mM de CaCl₂. ○ Particules greffées en protéines A et incubées avec 200 chimères par particules avec 2mM de CaCl₂. La DO initiale est autour de 0.6 pour chaque échantillon.

L'augmentation de l'adhésion par le nombre de cadhérines présentes à la surface des particules, dans des conditions expérimentales identiques, conforte l'idée que l'adhésion observée est spécifique de l'interaction entre cadhérines. Notons ici que les conditions de « régime doublets » n'étant pas respectées, les valeurs de différence de DO ne peuvent être directement reliées à des nombres d'agrégats.

4-2-2-c- L'adhésion est inhibée par le IAA

Pour confirmer que l'adhésion observée est induite par une reconnaissance entre cadhérines, l'influence d'un inhibiteur spécifique de cette interaction est étudiée. L'inhibiteur choisi est l'IAA, l'acide indole 3-acétique, dont la capacité d'inhibition a été démontrée par Pertz et *al.* (Pertz et al., 1999). Dans cette étude, il a été montré que l'inhibition dépend de la concentration en IAA, et que pour une concentration de 15 mM, l'inhibition est significative mais pas forcément totale.

Pour mettre au point cette expérience de contrôle, l'IAA (à 50 mM) est d'abord incubé pendant 1 heure à température ambiante avec les chimères de cadhérines. Puis, le mélange est mis en présence des particules magnétiques recouvertes de protéines A pendant 20 minutes, pour permettre la capture des chimères à la surface des particules. La suspension est ensuite lavée et remise dans une solution contenant 15 mM d'IAA et en présence de 2 mM de calcium. Pour démontrer l'inhibition, il faut comparer l'adhésion de cet échantillon à celle d'un échantillon témoin, c'est-à-dire sans IAA mais toutes choses égales par ailleurs.

L'échantillon témoin doit être incubé avec la même quantité de cadhérines et en présence d'une même force ionique totale, sachant que l'IAA, en tant qu'espèce chargée, y participe. Pour « matcher » la force ionique, 15 mM de NaCl est ajouté dans l'échantillon témoin. Notons de plus que, pour l'échantillon témoin, les chimères sont mélangées au préalable pendant une heure avec 50 mM de NaCl.

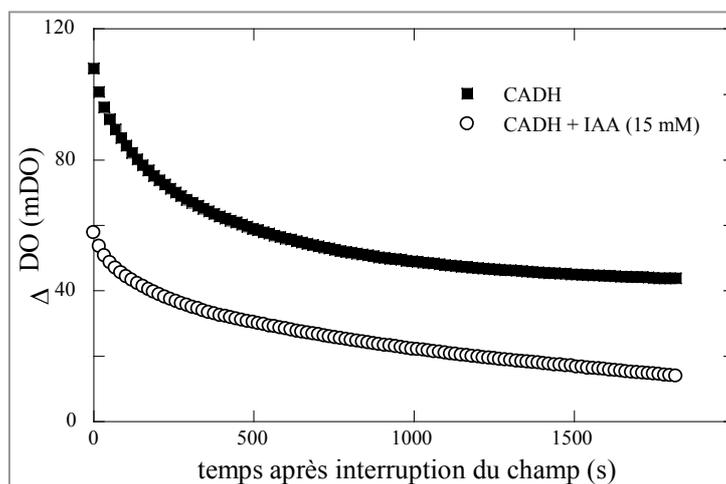


Figure-4-15 : Inhibition de l'adhésion par le IAA. Différence de DO après une étape de 3 min à 13 mT. ■ Particules greffées en protéines A et incubées avec 130 chimères par particule avec 2 mM de $CaCl_2$ et 15 mM de IAA. ○ Particules greffées en protéines A et incubées avec 130 chimères par particule avec 2 mM de $CaCl_2$ et 15 mM de NaCl. La DO initiale est autour de 0.7 pour chaque échantillon.

La figure-4-15 montre un exemple d'étude de l'inhibition par l'IAA. Dans cet exemple, l'IAA inhibe près de 50% de l'adhésion puisque la densité optique chute de 110 mDO à 60 mDO en présence d'IAA. Les conditions expérimentales imposent une force ionique totale de près de 20 mM, ce qui est plus élevé qu'en condition optimale de réduction du non spécifique. Ainsi, dans ces conditions, l'adhésion non spécifique est sans doute plus importante que dans les conditions normales d'étude.

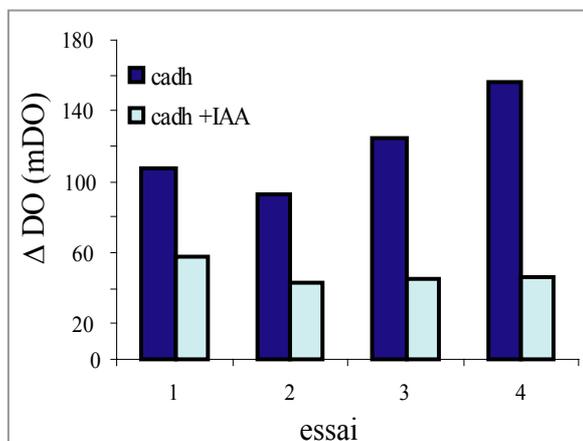


Figure-4-16 : Inhibition de l'adhésion par le IAA. Différence de DO après une étape de 3 min de champ magnétique à 13 mT pour différents échantillons en présence de 2 mM de $CaCl_2$. Dans le cas avec IAA une concentration de 15 mM est imposée, dans le cas sans IAA, 15 mM de NaCl est ajouté. Pour les essais 1 et 2 les particules ont été incubées avec 130 chimères par particule. Pour les essais 3 et 4 les particules sont incubées avec 150 chimères de cadhérines par particule.

CHAPITRE IV

L'IAA a donc un rôle d'inhibition sur l'adhésion entre particules recouvertes de cadhérines en présence de calcium. Dans nos expériences, une concentration de 15 mM en IAA inhibe entre 50% et 70% de l'adhésion entre particules recouvertes de cadhérines (figure-4-16). Ces observations nous confortent dans l'idée de suivre une adhésion spécifique de la cadhérine.

Nous sommes donc en mesure d'observer une adhésion entre particules magnétiques, déclenchée par une étape de champ magnétique et induite par des interactions spécifiques de la cadhérine. En effet, nous avons montré que cette adhésion dépend de la concentration en calcium, de la quantité de cadhérines capturées et qu'elle est inhibée par l'IAA.

4-2-3- Caractérisation des particules recouvertes de cadhérines

Avant d'étudier la cinétique d'adhésion entre particules induite par la reconnaissance entre cadhérines, il est indispensable de caractériser ces particules. Il s'agit, d'une part, de vérifier que l'image proposée pour décrire l'état de surface des particules est, à peu de chose près, correcte. D'autre part, il est nécessaire d'évaluer la quantité de cadhérines capturées à la surface des particules, car l'état d'adhésion après une étape de champ magnétique dépend de cette quantité. Dans la suite, la connaissance de cette quantité sera nécessaire pour estimer une constante cinétique d'association entre cadhérines.

4-2-3-a- La protéine A capture les chimères de cadhérines

Nous nous attachons ici à confirmer le fait que les cadhérines sont accrochées à la surface des particules avec une orientation effective, c'est-à-dire qu'elles sont capturées via leur fragment Fc et non par une adsorption non spécifique. Pour cela, nous cherchons à démontrer que la protéine A, présente à la surface des particules, permet de capturer les chimères de cadhérines. Ainsi, des échantillons de particules non greffées et greffées avec de la protéine A sont incubés avec une même quantité de chimères. Puis, leur adhésion, déclenchée par un champ magnétique et en présence de calcium, est étudiée (figure-4-17).

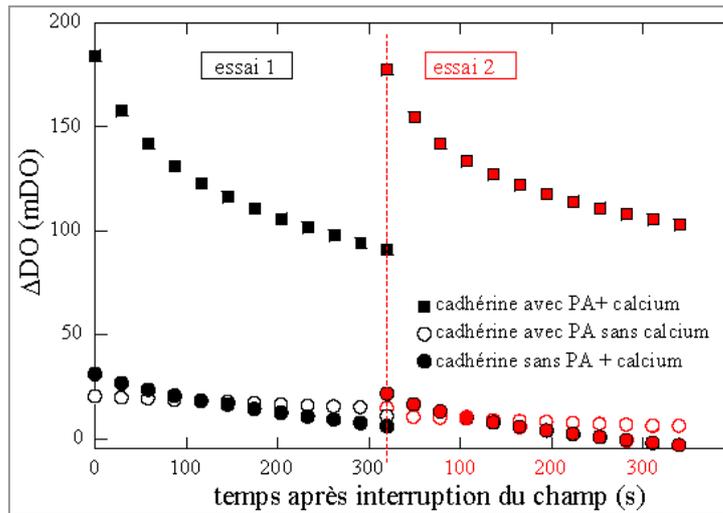


Figure-4-17 : Rôle de la protéine A. Différence de DO après une étape de 3 min de champ magnétique à 13 mT pour deux essais consécutifs. ■ Particules greffées avec de la protéine A et incubées avec 150 chimères par particule avec 2 mM de $CaCl_2$. ● Particules greffées avec de la protéine A et incubées avec 150 chimères par particule sans calcium. ○ Particules non greffées mais incubées avec 150 chimères par particule et avec 2 mM de $CaCl_2$. La DO initiale est autour de 0.7 pour chaque échantillon.

De l'observation des DO , il semble que beaucoup moins de chimères se soient adsorbées sur les particules sans protéine A. En effet, l'adhésion déclenchée par le champ magnétique en présence de calcium, est de 30 mDO pour des particules non greffées contre 180 mDO pour des particules greffées en protéines A (figure-4-17). La présence de la protéine A est donc nécessaire pour capturer efficacement les cadhérines. Cette expérience confirme également la spécificité de l'agrégation en présence de calcium.

En répétant l'expérience d'adhésion pour les mêmes échantillons et de façon consécutive, nous remarquons que l'adhésion induite par les cadhérines est réversible. Une fois les liens réalisés, ils se défont puisque la DO diminue après interruption du champ magnétique. Mais ces liens peuvent se former à nouveau, en quantité comparable, grâce à une nouvelle étape de champ magnétique. Sur la figure-4-17, les deux étapes consécutives et identiques de champ magnétique aboutissent à des DO comparables, témoignant d'un état d'agrégation comparable. Nous en concluons que les liens entre particules, attribués à l'interaction entre cadhérines, peuvent se reformer de manière comparable. **Cette observation suggère que les cadhérines ne se décrochent pas des particules pendant la durée de nos expériences et qu'elles restent « actives ».** Le temps de dissociation des fragments Fc sur la protéine A ne semble pas être un facteur limitant ici. La capture des chimères de cadhérines par la protéine A est donc une voie d'accrochage efficace.

4-2-3-b- Dosage des chimères de cadhérines capturées sur les particules

Pour évaluer le nombre de cadhérines capturées à la surface des particules, un dosage en retour par fluorimétrie est réalisé, dont le principe général a été décrit au paragraphe 2-3-1. Pour cela, nous avons recours à une molécule fluorescente qui se fixe de manière spécifique sur l'objet que nous voulons doser. Cette molécule peut être un anticorps dirigé contre la cadhérine (un anti-cadhérine) ou un anticorps dirigé contre le fragment Fc.

Ici, nous dosons les chimères de cadhérines via leur fragment Fc, en utilisant des protéines anti-Fc marquées par une sonde fluorescente : la FITC. Cette protéine est un fragment Fab de chèvre dirigé contre les fragments Fc humain (*Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC*). Nous considérons ici qu'une protéine anti-Fc ne reconnaît qu'une seule chimère de cadhérines. En effet, pour des raisons d'encombrement stérique, il est difficile d'envisager qu'un fragment Fc d'une chimère de cadhérine, capturé par une protéine A, puisse être reconnu par deux protéines anti-Fc. Par ailleurs, nous avons vérifié par une étude en Biacore que cette protéine anti-Fc ne se fixe pas sur la protéine A, mais qu'elle peut se fixer à un fragment Fc déjà relié à une protéine A (chapitre 1, figure-1-10).

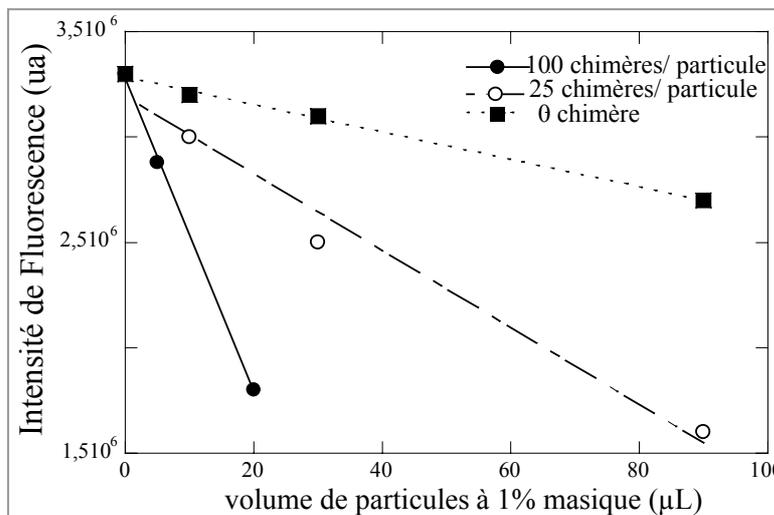


Figure-4-18 : Dosage des chimères de cadhérines sur les particules. L'intensité de fluorescence donne la quantité de protéines anti-Fc qui restent en solution après incubation avec les particules, pour trois échantillons : ■ des particules greffées en protéines A, ○ des particules greffées en protéine A et incubées avec 25 chimères par particule, ● des particules greffées en protéine A et incubées avec 100 chimères par particule.

La figure-4-18 montre un exemple de dosage en retour par fluorimétrie, dont le protocole est détaillé en annexe-E. La capture spécifique de protéines anti-Fc fluorescentes par des particules incubées avec des chimères est démontrée. Sans cadhérines capturées, un faible nombre de fragments Fc s'adsorbent de façon non spécifique sur les particules (figure-4-18). Par cette méthode de dosage en retour, on estime que 65 chimères sont capturées par particule, pour des particules incubées avec 100 chimères et que 10 chimères sont capturées pour une incubation avec 25 chimères par particule. Ainsi, nous avons montré que le nombre

CHAPITRE IV

de cadhérines fixées à la surface des particules peut être contrôlé par l'étape d'incubation (table-4-2).

Quantité de protéines A apportée	Quantité de protéines A greffée	Quantité de chimères apportée	Quantité de chimères capturées
850 PA/ particule	280 PA/ particule	100 / particule	60 / particule
(10µg/mg)		25 / particule	10 / particule

Table-4-2 : Quantités de chimères capturées pour différentes conditions

4-2-3-c- Conclusions

Le dosage des chimères sur les particules a permis de s'assurer que les cadhérines sont bien à la surface des particules. Le rôle de la protéine A a permis de vérifier l'orientation des cadhérines à la surface des particules. L'image proposée en figure-4-10 semble ainsi correcte pour décrire l'état de surface des particules recouvertes de cadhérines. Enfin, nous avons également montré que les cadhérines restent accrochées sur les particules sur des temps plus longs que nos temps caractéristiques d'observation.

4-2-4- Cinétique d'agrégation : vers une étude de la cinétique de reconnaissance entre cadhérines

Ce paragraphe a pour but de présenter quelques caractéristiques qualitatives sur la vitesse d'agrégation entre particules recouvertes de cadhérines. Les conclusions sont tirées à partir de l'observation de l'état d'agrégation de suspensions de particules recouvertes de cadhérines. Dans la suite, une partie entière de ce chapitre sera consacrée à la détermination d'une constante d'association de l'interaction entre cadhérines.

Pour suivre l'état d'agrégation de différentes suspensions, la différence de *DO* est reportée après diverses étapes sous champ magnétique (figure-4-19). Les conditions de « régime doublets » ne sont pas respectées, mais cette observation suffit pour comparer des états d'agrégation dans différentes conditions.

L'influence de la quantité de cadhérines est claire : la quantité de cadhérines accélère le processus d'agrégation (figure-4-19-B). En revanche, l'intensité du champ magnétique n'a pas d'influence sur la vitesse d'agrégation (figure-4-19-A).

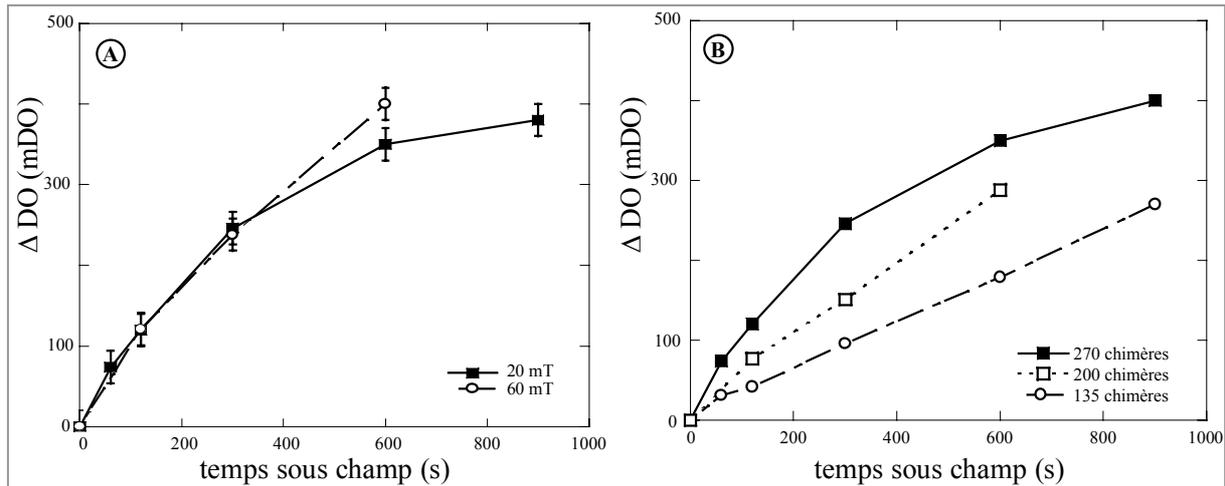


Figure-4-19 : Agrégation de suspensions de particules recouvertes de cadhérines en fonction du temps passé sous champ magnétique. A- Effet de l'intensité du champ magnétique, ■ pour un champ de 20 mT, ○ pour un champ de 60 mT. B- Effet de la quantité de chimères incubées (pour 20 mT), ■ pour 270 chimères par particule, □ pour 200 chimères par particule, ○ pour 135 chimères par particule. La DO initiale est proche de 0.9 pour chaque échantillon.

Cette brève étude de la vitesse d'agrégation permet, d'une part, de renseigner sur les conditions à remplir pour obtenir, en un certain temps sous champ, des chaînes de particules entièrement liées (qui correspond à la saturation de la cinétique). D'autre part, cette étude semble annoncer que la reconnaissance entre cadhérines est un processus relativement lent qui ne dépend pas de l'intensité du champ magnétique.

4-3- Profils de forces entre particules liées par des cadhérines

En réalisant des profils de force sur des particules liées par des cadhérines, nous cherchons à caractériser précisément ces liens. En effet, d'après les études bibliographiques, l'interaction entre cadhérines est multiple (§ 4-1-3) et présente plusieurs états d'adhésion. Le profil de force permet également de renseigner sur l'amplitude des forces qui s'exercent sur les liens.

4-3-1- Détermination expérimentale des profils de force

En premier lieu, la détermination des profils de force nous renseigne sur l'état de surface des particules dans nos conditions expérimentales. Ces profils vont aussi nous instruire sur les conditions de contact entre particules favorables à l'adhésion.

Dans un premier temps, les profils de force sont réalisés sans calcium (figure-4-20). Le profil de force est peu sensible à la présence de cadhérines : il est seulement légèrement plus répulsif. Cette faible composante répulsive supplémentaire peut résulter d'une composante stérique, due à la présence des cadhérines, ou d'un léger changement du potentiel de surface des particules. On pourra donc raisonnablement considérer que les interactions colloïdales entre particules ne sont pratiquement pas perturbées par la présence de cadhérines dans ces conditions.

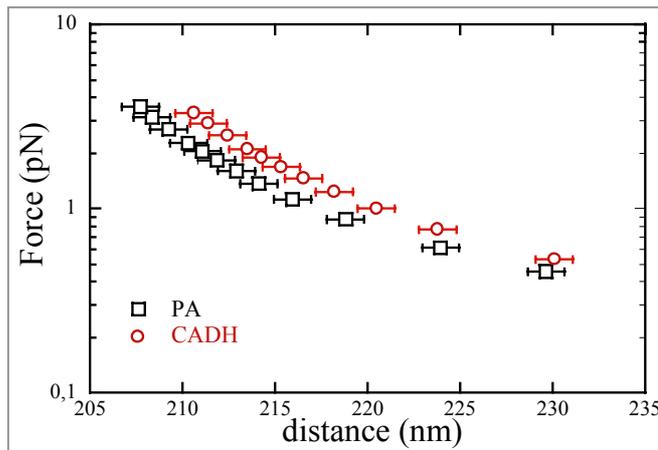


Figure-4-20 : Profil de force pour : ■ des particules recouvertes de protéine A (PA) dans un tampon borate à 10 mM (et sans calcium), ○ des particules incubées avec 200 cadhérines par particule dans un tampon borate à 10 mM (et sans calcium).

Dans un second temps, nous cherchons à réaliser les profils de force des particules liées par des cadhérines. Comme nous l'avons évoqué pour le cas du couple streptavidine-biotine, le profil de force n'a de sens que si toutes les particules sont liées au sein des chaînes. Ainsi, nous considérons des particules « fortement » recouvertes de cadhérines en présence de calcium. De plus, les échantillons subissent une première étape de champ magnétique constant pendant 10 min. D'après l'étude de l'agrégation reportée au paragraphe 4-2-4, dans ces conditions, 10 min de champ suffisent pour lier toutes les particules. Enfin, les profils de force sont mesurés pour une rampe croissante de champ magnétique (figure-4-21-A).

Nous vérifions que les particules sont liées en observant l'intensité des pics de diffraction (§ 3-3-3) qui reste constante pendant la mesure du profil (figure-4-21-B). Notons aussi que nous nous sommes placés dans des conditions expérimentales pour lesquelles les profils de force n'évoluent plus avec le nombre de ligands à la surface des particules. Ainsi, nous pouvons affirmer que les particules sont liées par plusieurs liens cadhérines, et que ce nombre de liens (que nous pouvons évaluer à cinq environ) n'évolue plus.

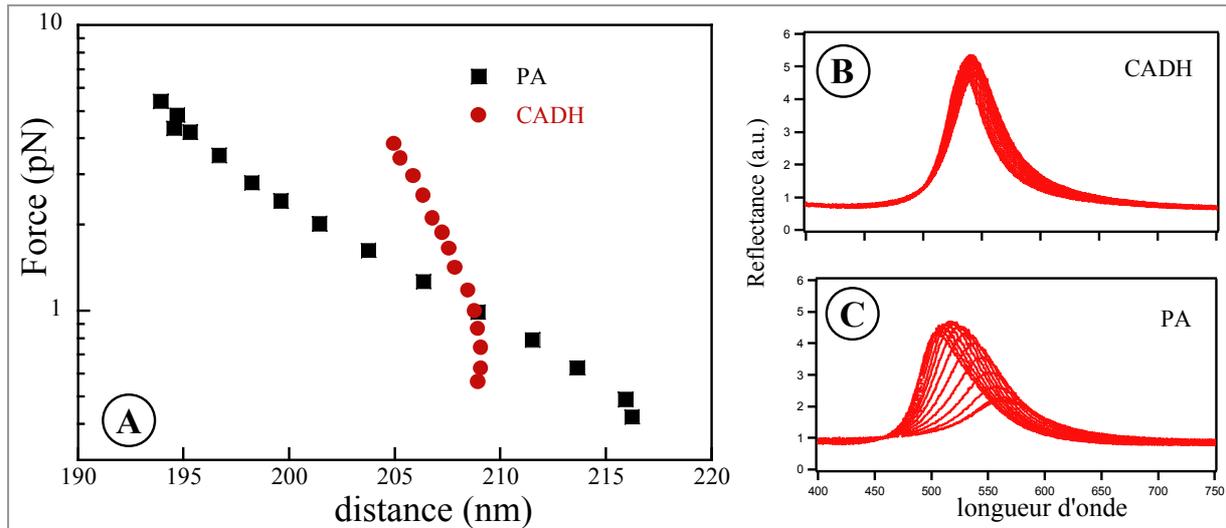


Figure-4-21 : A- Profil de force après une étape de 10 min à 25 mT pour : ■ des particules greffées avec de la protéine A uniquement, en présence de 2 mM de CaCl_2 , ● pour des particules incubées avec 270 cadhérines par particule et en présence de 2 mM de CaCl_2 . B- Intensité des pics de Bragg pour les particules liées par des cadhérines. C- Intensité des pics de Bragg pour les particules recouvertes de protéines A uniquement (non liées).

Le profil de force pour des particules greffées avec de la protéine A, sans cadhérine mais en présence de calcium, est considéré comme le profil de référence. Le profil de force des particules liées « croise » ce profil de référence : il y a donc un régime de compression et un régime d'étirement des « liens cadhérines » (§ 3-3-3). Remarquons ici que seule la compression engendre une « déformation » du lien : la distance varie davantage dans ce régime (de 4 nm), alors qu'elle reste constante dans le régime d'étirement (figure-4-22). L'origine de la déformation peut être attribuée à une courbure des molécules, à une compression pure des cadhérines ou à un glissement des cadhérines vers un état d'interdigitation plus grand, comme nous le verrons plus loin. En ce qui concerne l'hypothèse de compression, les déformations paraissent relativement importantes comparativement au cas des liens streptavidine-BSA-biotinylée (§ 3-3-3). L'hypothèse de compression ne semble donc pas expliquer, à elle seule, l'amplitude des déformations observées pour les cadhérines.

Quand le lien est « au repos », la distance centre à centre entre particules est d'environ 210 nm, et est caractéristique du lien sondé. Les particules ayant un diamètre de 175 nm (en présence de calcium), la taille totale du lien est donc proche de 35 nm. En prenant en compte la taille des sandwiches protéine A - fragment Fc (10 nm environ), la taille du lien « cadhérine » est proche de 25 nm.

Comme nous l'avons mentionné au début de ce chapitre, les cadhérines forment différents types de liens, caractérisés par le nombre de domaines cadhérine qui y participent. D'après la taille du lien mesurée dans nos expériences, le nombre de domaines impliqués peut être

estimé. Si les cadhérines sont strictement perpendiculaires à la surface des particules, le lien mesuré correspond à des cadhérines totalement interdigitées, c'est-à-dire où les cinq domaines sont impliqués (figure-4-6-A). En revanche, si les cadhérines ont une « structure courbe » (figure-4-3-A-ii) ou si elles ne sont pas « parfaitement » perpendiculaires à la surface des particules, on peut attribuer le lien formé à des cadhérines qui ne sont pas totalement interdigitées.

En tout état de cause, la configuration où les cadhérines interagissent uniquement via les fragments EC1-2 est exclue, car elle donnerait des liens de 40 à 50 nm.

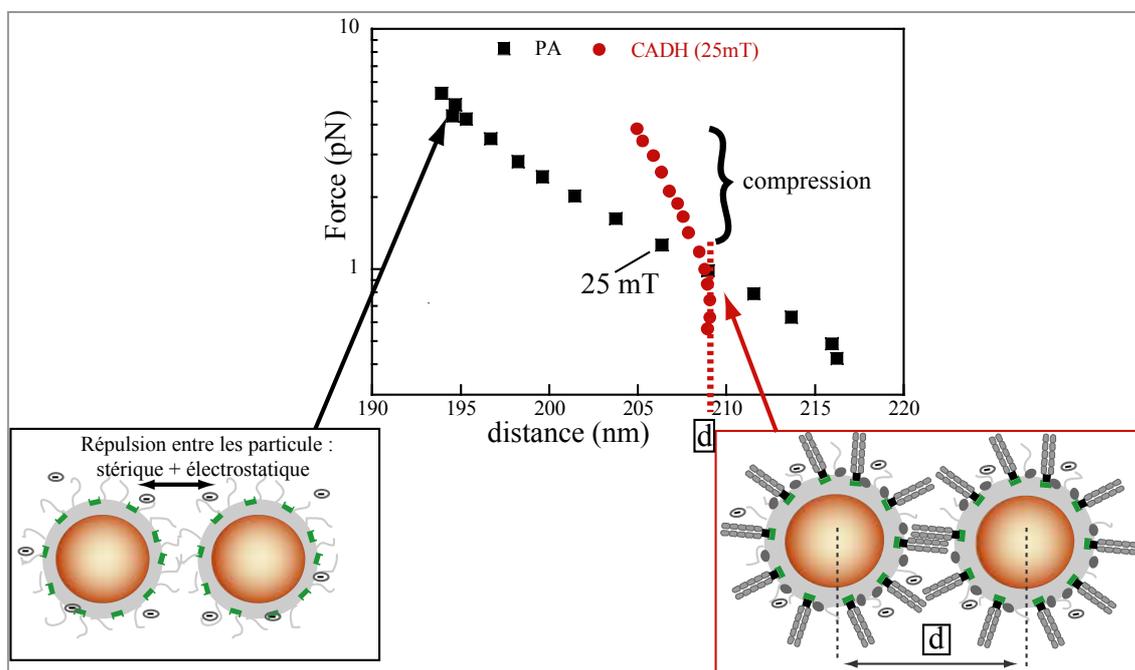


Figure-4-22 : Le lien entre particules est attribué à un état d'adhésion « profond » entre cadhérines.

Le profil de force mesuré est donc attribuable à un état d'adhésion « profond » entre cadhérines (§-4-1-3), c'est-à-dire avec une interdigitation au moins jusqu'à EC3 (figure-4-22).

4-3-2- Influence des conditions de formation des liens cadhérines

4-3-2-a- Influence de l'intensité du champ magnétique pendant la formation des liens

L'influence de l'étape de formation des liens a fait l'objet d'une étude en machine de force. Dans le cas des cadhérines, d'après la littérature, les liens entre cadhérines peuvent être multiples et semblent dépendre des conditions de contact entre surfaces. Ainsi, nous nous

intéressons à cette caractéristique spécifique aux cadhérines en réalisant des profils de force pour différentes conditions de formation des liens. Pour tenter de mettre en évidence une propriété propre aux cadhérines, l'étude des conditions de formation des liens est conduite en parallèle pour des liens cadhérines et pour des liens « classiques » à savoir des liens streptavidine-BSA-biotinylée. Dans la mesure où, comme nous l'avons évoqué au paragraphe précédent, nous sommes dans un régime de liens multiples entre particules, nous pouvons exclure la possibilité de passer d'un régime « lien unique » à un régime « lien multiple » par des conditions de contact différentes. Les profils de force de référence et ceux des particules liées sont donnés en figure-4-23. Les liens entre particules sont formés pendant une étape de 10 min pour différentes intensités de champ magnétique, entre 17 mT et 60 mT. Nous vérifions que les particules sont liées en considérant l'intensité des pics de Bragg.

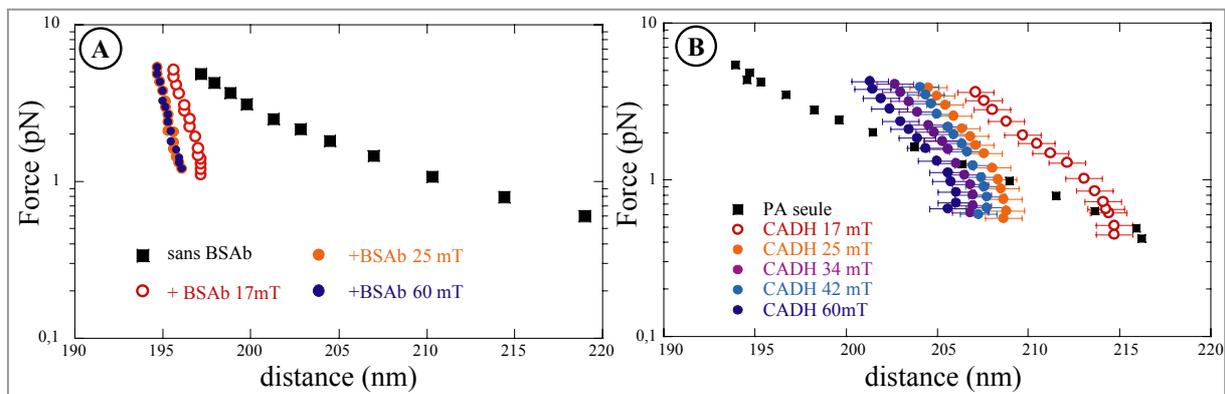


Figure-4-23 : Effet de l'étape de champ magnétique (ou de formation de liens) sur les profils de force des particules liées. A- Pour des liens streptavidine-BSA-biotinylée. B- Pour des liens entre cadhérines.

Pour les liens streptavidine-BSA-biotinylée, les profils de force des particules liées sont très proches quelle que soit l'intensité du champ magnétique de l'étape de formation. Nous en concluons que la distance moyenne entre surfaces au moment de la formation du lien n'a pas d'influence sur l'adhésion obtenue. La variabilité sur les profils de force est d'environ 2 nm, ce qui constitue à peu près la précision de cette technique, et sera utilisée comme barre d'erreur sur la distance dans la figure-4-23-B.

Pour les liens entre cadhérines, une grande variabilité de profils de force est observée en fonction de l'intensité du champ magnétique de l'étape de formation. Nous nous intéressons désormais à la distance centre à centre au « repos », définie au paragraphe précédent et caractéristique des liens observés. Cette distance varie ici sur une plage de 10 nm, ce qui ne peut être attribué à l'incertitude de la technique. Néanmoins, une tendance générale, caractéristique des liens cadhérines, se dégage. Au champ le plus faible (17 mT), la distance au repos est d'environ 215 nm, de façon très reproductible. Pour tous les autres champs (de 25

mT à 60 mT), cette distance est comprise entre 206 nm et 208 nm. Notons que la valeur de 206 nm obtenue à 60 mT est, elle aussi, une observation particulièrement reproductible. Pour tous les champs intermédiaires (25 à 42 mT) la variabilité est plus grande, la distance n'excédant toutefois jamais 210 nm. Deux groupes de profils « reproductibles » se distinguent : à champ faible et à champ fort.

L'existence de ces deux populations de distance au repos suggère la formation de deux états d'adhésion entre cadhérines. Etant donnée la valeur de ces distances au repos, nous pouvons affirmer que ces deux états d'adhésion correspondent à des états d'adhésion « profonds » entre cadhérines (figure-4-24). Cette observation est cohérente avec les études de Perret *et al.* et Bayas *et al.* qui, pour cette adhésion « forte » suggèrent l'existence de plusieurs états d'interdigitation des liens (Perret *et al.*, 2004; Bayas *et al.*, 2006). Dans le cas de notre étude, c'est la contrainte imposée par les conditions de contact qui détermine l'état d'adhésion observé. Pour les champs intermédiaires, une moyenne entre les deux états d'adhésion est sans doute obtenue sur les différentes particules au sein des chaînes. En effet, il faut garder à l'esprit que cette technique donne une distance moyennée sur un très grand nombre de liens.

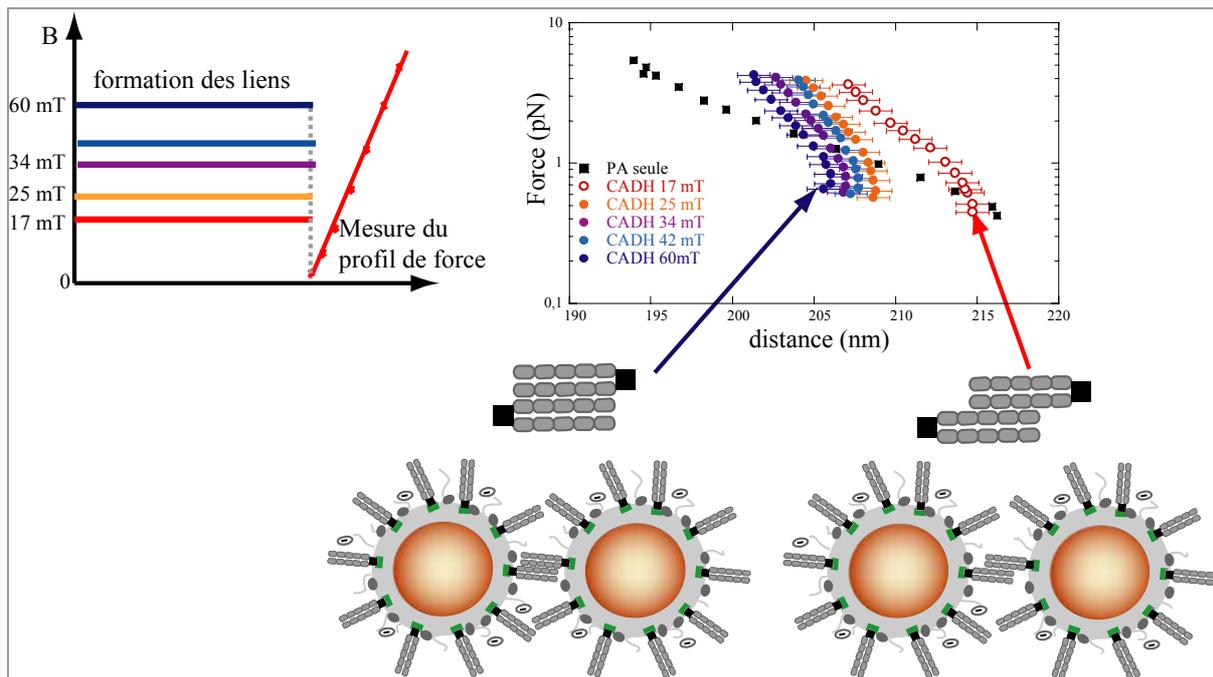


Figure-4-24 : Effet de l'intensité du champ magnétique de l'étape de formation des liens sur la taille des liens formés entre particules dans le cas de l'interaction entre cadhérines.

Pour le champ le plus fort, la distance centre à centre est de 206 nm, ce qui correspond à une taille de lien cadhérine d'environ 20 nm. Dans ce cas, il ne peut s'agir que de l'état d'adhésion où tous les domaines cadhérines sont impliqués. Dans la suite, cet état sera appelé l'état « d'interdigitation totale ». Pour le champ le plus faible, la distance centre à centre est

d'environ 215 nm, ce qui correspond à une taille de lien entre cadhérines d'environ 30 nm. Cet état se rapporte à une adhésion impliquant entre 3 et 4 domaines cadhérines. Cet état sera appelé l'état « d'interdigitation moyenne ».

De ces profils de force, nous pouvons estimer la force qui s'exerce entre des particules liées par des cadhérines quand le champ est interrompu. A 215 nm, pour l'état d'interdigitation moyenne, la force entre particules est de proche de 0.5 pN. A 206 nm, pour l'état d'interdigitation totale, la force est comprise entre 1 et 2 pN.

Notons, pour conclure, que le décalage des profils de force, entre le champ le plus faible et le champ le plus fort, est une observation reproductible, preuve expérimentale de l'observation de deux états d'adhésion différents, qui correspondent à deux états d'adhésion profonds.

4-3-2-b- Influence de « l'histoire » du lien

Nous poursuivons ici l'étude du processus de formation des liens. En particulier, nous nous concentrons sur l'évolution de l'état d'interdigitation moyenne, à savoir s'il peut « mûrir » vers l'état d'interdigitation totale.

Dans un premier temps, nous étudions l'effet d'une étape à champ fort sur l'état d'interdigitation moyenne. Ainsi, après la première étape de champ faible, une seconde étape à champ fort est directement appliquée (figure-4-25-A). Nous cherchons ici à tester la « plasticité » de cet état d'adhésion. La plasticité des liens est également testée en réalisant des profils de force via des rampes de champ croissantes puis décroissantes (figure-4-25-B).

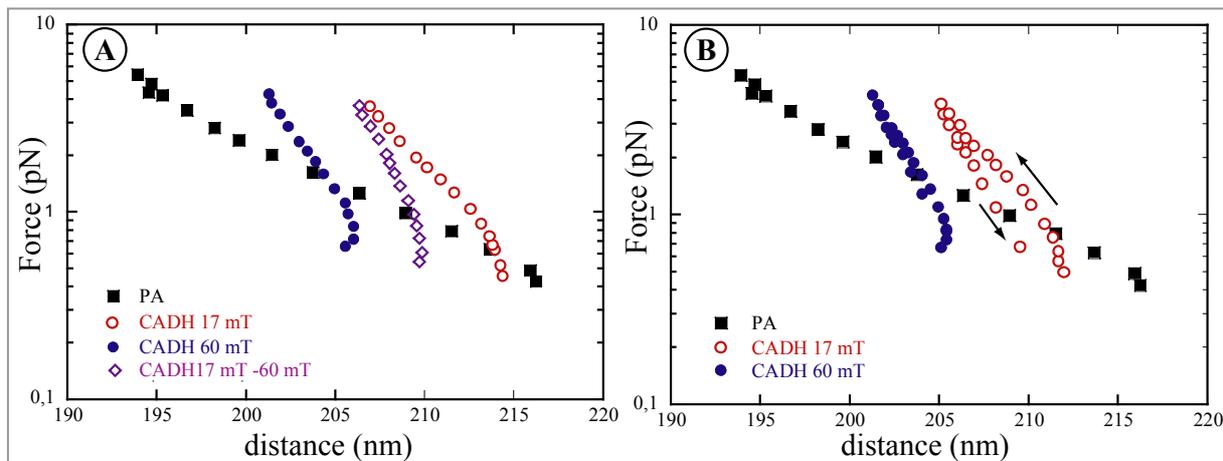


Figure-4-25 : Effet de l'histoire du lien. A- \diamond Profil de force pour des particules liées par des liens cadhérines après 10 min sous un champ faible de 17 mT et 10 min sous un champ fort de 60 mT, en comparaison avec des particules directement incubées à 60 mT (\bullet) et directement à 17mT (\circ). B- Profils de force mesurés pour des rampes croissantes puis descendantes de champ magnétique, pour \bullet un échantillon après une étape de 10 min à 60 mT, \circ pour un échantillon après une étape de 10 min à 17 mT.

L'état d'interdigitation totale est « stable » : les profils de force correspondants sont identiques quel que soit le protocole de mesure. En revanche, l'état d'interdigitation moyenne est légèrement « malléable ». En effet, le profil de force en rampe de champ décroissante ne coïncide pas avec le profil « aller » en rampe croissante : le profil est déplacé vers les faibles distances. De la même façon, ces liens évoluent après une seconde incubation sous un champ fort : le profil de force mesuré est compris entre les profils des deux états d'adhésion, résultant d'une moyenne entre les deux états d'adhésion.

Pour l'état d'interdigitation moyenne, ces caractéristiques témoignent donc d'un état susceptible d'évoluer par l'application d'un champ magnétique plus fort que le champ de formation. Cette tendance peut être interprétée par un glissement des cadhérines vers un état plus interdigité. L'histoire du lien a cependant son importance. En effet, on n'aboutit pas aux mêmes profils après 10 min à 60 mT si le lien a d'abord été formé à 17 mT. Ainsi, il semble plus difficile de « glisser » d'un état à l'autre que de former directement l'état d'interdigitation totale.

Dans un second temps, la durée de l'étape de formation a été étudiée pour une étape de champ magnétique faible (17 mT). Avec cette étude, nous cherchons à comprendre si l'état d'interdigitation moyenne évolue spontanément au cours du temps vers l'état d'interdigitation totale. Les profils de force après une étape de 10 min et après une étape d'une heure à 17 mT sont reportés en figure-4-26. Le profil de force ne semble pas évoluer avec la durée de l'étape de formation des liens. Pour ces conditions de contact, le lien formé ne semble pas mûrir spontanément. Cette étude confirme l'idée précédente que l'état d'adhésion d'interdigitation moyenne est stable et n'évolue pas spontanément.

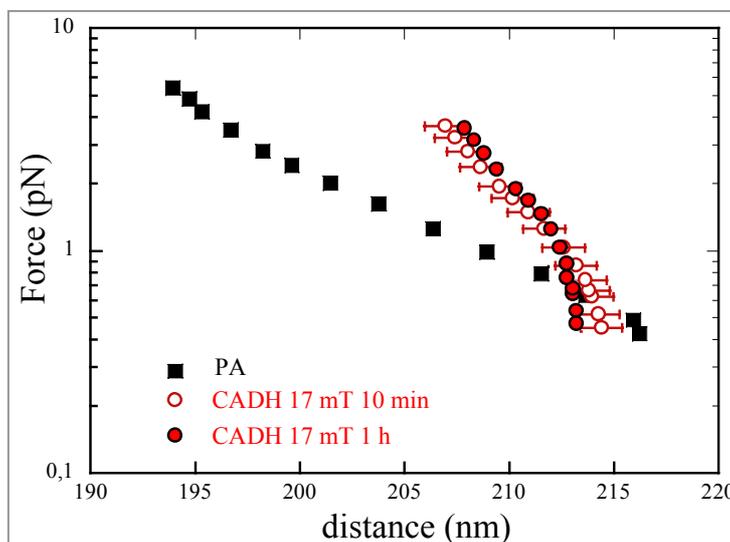


Figure-4-26 : Influence de la durée de l'étape de formation des liens cadhérines pour un champ magnétique constant de 17 mT ○ Pour une étape de 10 min. ● Pour une étape d'une heure.

CHAPITRE IV

Cette série d'études a permis de démontrer que nous observons des liens où plusieurs domaines cadhérines sont impliqués, autrement dit des états d'adhésion profonds entre cadhérines. Parmi ces liens, nous avons pu en distinguer deux, grâce à des conditions de contact différentes. Cette variabilité dans la formation des liens est caractéristique des liens entre cadhérines et confirme certaines hypothèses de la littérature (§ 4-1-2). De plus, nous avons pu montrer que l'état d'interdigitation moyenne est susceptible de mûrir, en évoluant vers l'état d'interdigitation totale, mais avec un certain hystérésis.

L'étude suivante de la cinétique d'adhésion entre particules s'inscrit dans le cadre de la description de ces états d'adhésion profonds entre cadhérines

4-4- Détermination expérimentale des constantes cinétiques de reconnaissance entre cadhérines

Nous souhaitons exploiter la méthode expérimentale basée sur les particules magnétiques, que nous avons présentée et validée au chapitre 3, pour mesurer les constantes cinétiques de reconnaissance entre cadhérines.

D'après les données de la littérature, les liens réalisés par EC1-2 sont trop « labiles », avec des temps de vie trop courts, pour être détectés par notre méthode, les temps de vie rapportés étant de quelques dixièmes de seconde (§ 4-1-2-b). L'étude cinétique de la reconnaissance entre cadhérines ne se rapporte donc pas à une interaction entre les fragments EC1-2. Par ailleurs, l'étude précédente confirme que nous n'observons pas ce type de liens, puisque nous avons montré que les liens formés dans nos conditions expérimentales sont réalisés par une interdigitation des cadhérines au moins jusqu'à EC3.

4-4-1- Conditions expérimentales requises pour un couple homotypique

Notre méthode expérimentale repose sur la mesure de cinétiques de formation de doublets indépendants. Dans le cas de couples ligand-récepteur classiques, c'est-à-dire « hétérotypiques », le protocole expérimental pour reconstruire des couples de particules réactives indépendantes est relativement simple. En revanche, dans le cas de couples

homotypiques, comme dans le cas des cadhérines, le mode opératoire doit être adapté. En effet, il doit répondre à deux conditions fondamentales : **obtenir uniquement des doublets** et des singulets après une étape de champ, et réaliser **un lien unique** au sein de chaque doublet. Etre en « régime doublets », régime où au maximum des doublets sont formés, est une condition essentielle pour pouvoir interpréter les signaux de turbidimétrie, et pour attribuer un temps caractéristique, spécifique de l'interaction étudiée, à la formation d'un doublet. Réaliser un unique lien entre doublets permet d'utiliser la description de la cinétique présentée au chapitre précédent pour interpréter les expériences.

Nous ne pouvons pas utiliser une seule population de particules recouvertes de cadhérines : des chaînes permanentes de différentes tailles seraient alors formées. A des particules recouvertes de cadhérines doivent être ajoutées des particules « nues » (ou non greffées), ce qui permet de « séparer » les particules recouvertes de cadhérines. En ajoutant suffisamment de particules nues, on peut se placer dans un régime où, statistiquement, des doublets seront majoritairement formés. Pour réaliser des liens uniques entre doublets permanents, nous devons même considérer trois populations de particules : des particules nues, des particules « peu recouvertes » de cadhérines et des particules « fortement recouvertes » de cadhérines. En jouant sur les quantités relatives des différentes populations, nous cherchons à former majoritairement des doublets, avec un unique lien, entre une particule fortement recouverte et une particule peu recouverte de cadhérines (doublets de type A). Les particules fortement recouvertes sont choisies pour que la formation des doublets pertinents ne soit pas trop longue.

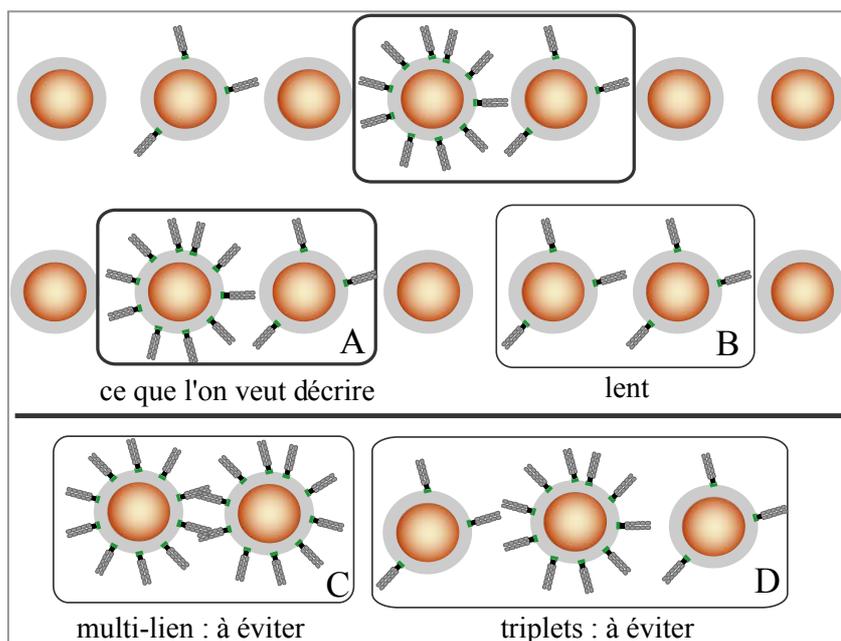


Figure-4-27 : Comment réaliser les conditions de « régime doublets » pour un couple homotypique.

CHAPITRE IV

Ainsi, avec un mélange de trois populations de particules, nous cherchons à réaliser un maximum de doublets de type A (figure-4-27), dont la cinétique de formation conduit aux constantes cinétiques de la reconnaissance entre cadhérines. Mais la formation d'objets différents (doublets B, C, triplets D) ne peut être complètement évitée. Les doublets de types B, entre particules peu recouvertes, se forment beaucoup plus lentement, et nous pouvons supposer que leur formation n'interfère pas avec la mesure de la formation des doublets A. En revanche, nous souhaitons minimiser la formation des doublets C, entre particules fortement recouvertes, car ils peuvent être reliés par plusieurs liens. Enfin, la formation de triplets D doit être minimisée, ce qui justifie aussi l'utilisation des particules nues. En considérant toutes ces contraintes, nous travaillons avec des échantillons « *mélange* », dont la composition a été optimisée à : 50% de particules nues, 40% de particules peu recouvertes (10 chimères dosées par particule) et 10% de particules fortement recouvertes (70 chimères dosées par particule). Dans de telles proportions, nous avons évalué, par une simulation numérique basique (logiciel Matlab), que statistiquement parmi les différents couples de particules, 8 % seront de nature A et 16 % de nature B (mais beaucoup plus lents). Les doublets C n'en représentent que 1% et les triplets D 1.6%.

Même dans ces conditions adaptées à la formation majoritaire de doublets A, la formation des autres doublets et de doublets non spécifiques intervient. Cela a pour conséquence de bruyier la cinétique qui nous intéresse et que l'on sait interpréter. Pour rendre compte de l'amplitude des différentes sources de bruit, divers échantillons témoins sont considérés. Un premier témoin est constitué entièrement de particules « nues ». Comme nous l'avons évoqué au paragraphe 4-2-2, des interactions non spécifiques ont lieu entre particules en présence de calcium. Les étapes sous champ magnétique pouvant être longues, il faut tenir compte de ces sources de bruit. Pour évaluer l'importance de la formation des doublets de type B, un échantillon témoin contenant des particules nues (60%) et des particules faiblement recouvertes (40%) est étudié. De la même façon, pour estimer l'influence de la formation des doublets C, un échantillon composé de particules nues (90%) et de particules fortement recouvertes (10%) est considéré.

Cela reste cependant encore difficile d'évaluer l'importance des interactions non spécifiques entre particules recouvertes de cadhérines. Ainsi, nous nous sommes assurés que, dans les conditions utilisées de mélanges de particules, la formation de doublets est majoritairement spécifique de l'interaction entre cadhérines. Ceci a été vérifié en étudiant l'influence de

l'inhibiteur IAA sur les échantillons *mélanges*. Pour 15 mM en IAA, l'inhibition est bien significative (4-2-2-c).

4-4-2- Évaluation de la constante d'association entre cadhérines

Nous avons remarqué que les liens entre cadhérines présentent la caractéristique de se défaire pendant la mesure de densité optique (§ 4-2-2). Dans ce cadre, pour suivre une cinétique de formation de doublets, un protocole avec un échantillon par point de mesure est adopté (chapitre 3, § 3-2-1-c).

4-4-2-a Mesure de cinétique de formation de doublets liés par des cadhérines

La mesure de cinétique de formation de doublets est beaucoup plus bruitée dans le cas de liens cadhérines que dans le cas de liens streptavidine-biotine. En effet, la formation des différents types de doublets et l'adhésion non spécifique perturbent la mesure. Un exemple de suivi de cinétique d'adhésion est donné en figure-4-28 pour un champ de 17 mT pour l'échantillon « mélange » et les échantillons témoins (figure-4-28-A). La cinétique de formation de doublets de type A est déduite de la différence entre la contribution du mélange et la somme des différentes contributions des témoins (figure-4-28-B).

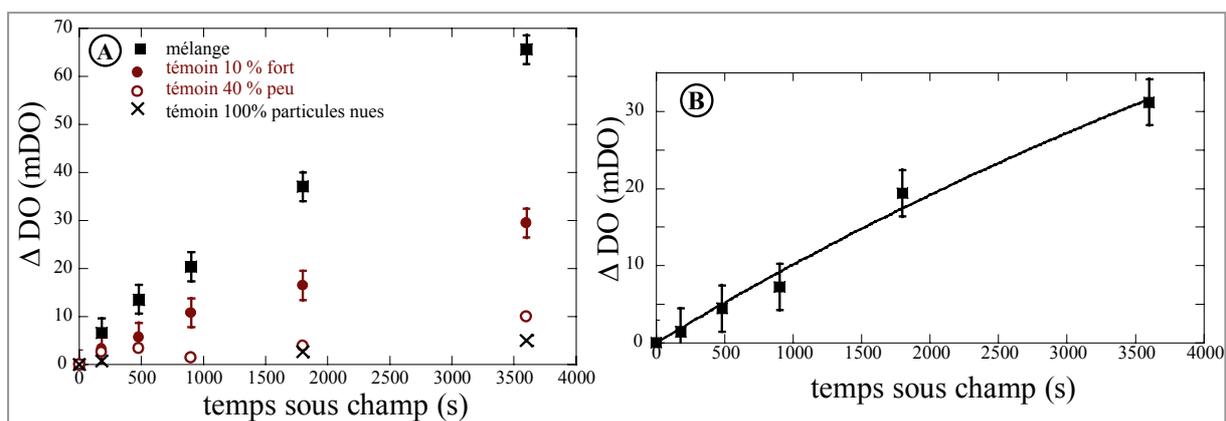


Figure-4-28 : A- Suivi de cinétique d'adhésion à 17 mT avec un échantillon par point de mesure, ■ pour un échantillon « mélange » avec 10% de particules fortement recouvertes de cadhérines (70 chimères par particule), 40% de particules peu recouvertes de cadhérines (10 chimères par particule) et 50% de particules non greffées, ● pour un échantillon témoin avec 10% de particules fortement recouvertes en cadhérines et 90% de particules non greffées, ○ pour un échantillon témoin avec 40% de particules peu recouvertes de cadhérines et 60% de particules non greffées, X pour un échantillon témoin avec 100% de particules non greffées. B- Dédution de la cinétique de formation de doublets de type A.

CHAPITRE IV

Pour l'échantillon de particules non greffées, l'amplitude de l'adhésion est minimale, même après une heure sous champ magnétique (5 mDO). L'amplitude de l'adhésion entre particules peu recouvertes de cadhérines, représentatif des doublets de type B, varie entre 3 et 10 mDO. Pour une densité optique initiale de 700 mDO, la formation de doublets de type A devrait représenter 65 mDO, et celle des doublets de type C 8 mDO. Cependant, le témoin avec 10% de particules fortement recouvertes en cadhérines, représentatif des doublets de type C, montre une variation de DO supérieure à 8 mDO, ce qui est plus important que prévu. Il semble donc que les cadhérines induisent des interactions non spécifiques avec les particules nues.

En déduisant la cinétique des doublets de type A, une constante cinétique apparente est estimée à $2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. En reproduisant ce type de mesure, la variabilité sur les témoins est relativement importante, mais la cinétique du mélange est toujours du même ordre de grandeur. Ainsi, la constante cinétique apparente est comprise entre $2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ et $5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, avec une valeur moyenne de $3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Les raisons de l'incertitude sur la constante cinétique sont multiples. La formation des doublets C et B et des triplets intervient. Les diverses adhésions non spécifiques, dont l'amplitude est difficile à estimer, interfèrent aussi. *C'est dans la détermination de l'amplitude des diverses adhésions non spécifiques que réside la principale difficulté de l'étude de la reconnaissance entre cadhérines.* C'est donc là que réside la principale source d'incertitude expérimentale.

Effet de la quantité de cadhérines (m_R):

Nous cherchons ici à vérifier que la constante cinétique apparente de formation de doublets augmente avec la quantité de cadhérines présentes à la surface des particules (c'est-à-dire avec m_R). Pour cela, nous considérons le même type de mélange que précédemment mais les particules fortement recouvertes de cadhérines possèdent près de deux fois plus de chimères (150 par particule contre 70). Dans ces conditions, le témoin avec 10 % de particules fortement recouvertes en cadhérines montre une adhésion plus importante. Le bruit est donc encore plus élevé dans ce cas. La constante de cinétique apparente est évaluée à $6 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. L'évolution générale de la constante cinétique apparente est respectée, ce qui est une preuve supplémentaire de la spécificité de l'adhésion. Mais les précisions sur l'évaluation de la constante et des taux de greffage ne permettent pas de démontrer rigoureusement une

dépendance linéaire entre constante apparente et nombre de récepteurs, comme dans le cas de l'interaction streptavidine-biotine (§ 3-3-1-a).

4-4-2-b Estimation de la constante cinétique d'association entre cadhérines

Pour estimer la constante d'association k_+^{2D} entre cadhérines, nous considérons la valeur caractéristique de $3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ pour la constante cinétique apparente, k . Après dosage des cadhérines capturées, la constante apparente correspond à un couple de particules réactives avec l'une portant 10 chimères et l'autre 70 chimères.

Dans l'expression de la constante apparente k intervient également la constante de dissociation k_-^{2D} ($k = m_R m_L A_C k_+^{2D} + k_-^{2D}$). Pour déterminer la constante d'association, k_+^{2D} , il faut donc estimer la constante de dissociation pour les liens formés, et à force nulle. En effet, pendant le contact entre cadhérines, c'est-à-dire sous champ, il y a un équilibre mécanique et aucune force extérieure ne s'exerce sur les molécules. D'après les études menées en machine de force et présentées précédemment, les liens formés ont été attribués à des états d'adhésion profonds. Leur constante de dissociation à force nulle est estimée à 10^{-5} s^{-1} , d'après l'étude de Perret *et al.* en BFP (Perret et al., 2004). Ainsi, il est raisonnable de négliger la constante de dissociation dans la constante cinétique apparente (qui vaut $3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Cette approximation est autorisée d'autant plus que la quantité de doublets formés, aux temps longs, est cohérente avec une constante de dissociation faible. En effet, la probabilité d'adhésion, pour des temps

infinis, est significative, la quantité $p = \frac{1}{1 + (m_R m_L A_C K_A^{2D})^{-1}} = \frac{m_R m_L A_C k_+^{2D}}{m_R m_L A_C k_+^{2D} + k_-^{2D}}$ est donc proche de 1.

Nous en concluons que la constante de temps ramenée à une chimère sur chaque particule est de $4 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$. Cette valeur correspond à une constante d'association de $7 \cdot 10^{-7} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, en considérant, comme au chapitre 3, une aire de contact de 7% de l'aire totale de la particule. Cet ordre de grandeur se différencie nettement du couple streptavidine-biotine pour les différentes configurations étudiées, même pour la configuration symétrique rigide (avec k_+^{2D} égale à $10^{-5} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). En effet, l'association est plus d'un ordre de grandeur plus lente pour les cadhérines que pour le couple streptavidine-biotine, pris dans sa configuration la plus lente.

Cette étude permet donc de donner un ordre de grandeur de la constante d'association entre dimères de cadhérines quand elles se lient dans un état d'adhésion « profond ».

Effet du champ magnétique sur la constante d'association

Les cinétiques de formation de doublets pour des liens cadhérines ont été réalisées pour des champs magnétiques de 17 mT et 45 mT. Aucune influence significative du champ magnétique n'a été révélée. Cette observation confirme ce qui avait été remarqué au paragraphe 4-2-4, par le suivi de l'état d'agrégation d'échantillons avec 100% de particules fortement recouvertes de cadhérines.

Bien que nous ayons montré l'existence de liens différents en machine de force, nous ne sommes pas en mesure, compte tenu de la résolution de notre méthode, de les distinguer par leur constante cinétique d'association.

4-4-3- Évaluation de constantes de dissociation de liens cadhérines

Pour interpréter la décroissance du signal de densité optique en termes de constante de dissociation, il faut considérer deux conditions. D'une part, il ne faut avoir formé que des doublets pour pouvoir interpréter les signaux. D'autre part, les particules doivent être reliées par un seul lien pour interpréter le temps de survie d'un doublet comme le temps de survie d'un lien. Comme nous l'avons vu au paragraphe 3-3-3-c, le nombre de liens, indépendants, persistants après un temps t suit une décroissance exponentielle, dont le temps caractéristique est l'inverse de la constante de dissociation d'un lien.

Nous concentrons donc notre étude sur des échantillons de particules vérifiant les conditions de « régime doublets ». La différence de DO après champ est suivie et sa décroissance temporelle est traduite en une constante de dissociation (figure-4-29).

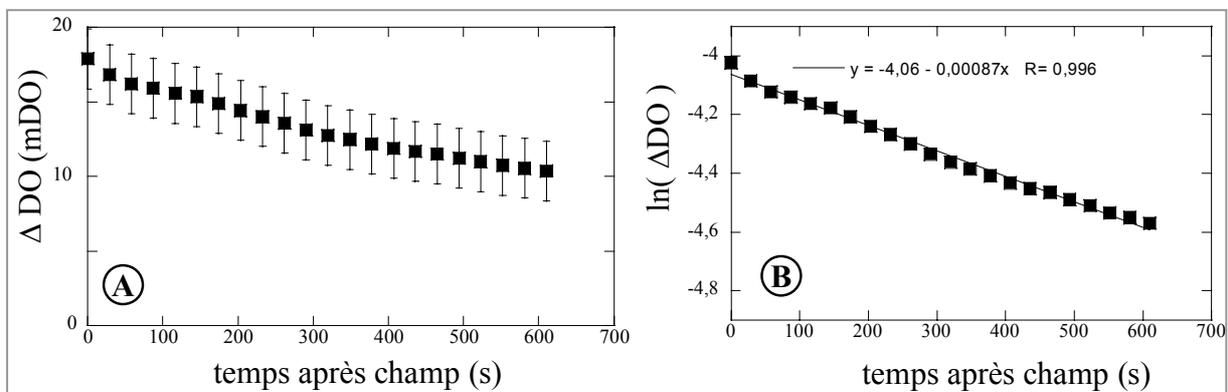


Figure-4-29 : Evaluation de la constante de dissociation des liens cadhérines. A- Evolution de la différence de DO après une étape de 30 min à 17 mT, pour un mélange classique de particules. B- Le logarithme du delta de DO est considéré pour évaluer la constante de dissociation du lien.

CHAPITRE IV

Une grande variabilité de la constante de dissociation est observée ici, comprise entre 10^{-4} s^{-1} et $2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Une valeur caractéristique moyenne de 10^{-3} s^{-1} est finalement considérée pour la constante de dissociation de l'interaction entre cadhérines.

Cette valeur est caractéristique d'un temps de vie relativement long. Considérant les constantes de dissociation mesurées dans la littérature, la valeur que nous mesurons se rapproche de celle relative à un état d'adhésion profond (table-4-1). Cette observation confirme la conclusion énoncée au paragraphe 4-3, à savoir que nous observons, dans nos expériences, des liens entre cadhérines totalement (ou fortement) interdigités.

La constante de dissociation mesurée ici est une constante de dissociation sous une force f . En se rapportant aux données de la littérature (Perret et al., 2004), pour un lien réalisé entre les cinq domaines cadhérine EC1-5, une constante de temps de 10^{-3} s^{-1} correspond à une force de 12 pN. Or, d'après nos considérations sur les profils de force mesurés, la force appliquée est estimée à 2 pN (§ 4-3-2-a).

Ceci nous amène à considérer la limitation de notre détermination de la constante de dissociation. Cette limitation réside principalement dans la mesure exacte de la force appliquée une fois le champ interrompu. De plus, nous sommes dans l'impossibilité de faire varier cette force, contrairement aux techniques classiques qui mesurent des constantes de dissociation (§ 1-4-2). Enfin, en interrompant le champ magnétique, la direction de la force appliquée sur le lien n'est pas contrôlée, contrairement aux techniques citées au chapitre 1. Au niveau des particules, la force est radiale, mais du fait des fluctuations thermiques, le lien n'est pas forcément colinéaire avec la force. Un « effet levier » est alors envisageable sur le lien. Cet effet pourrait expliquer une valeur de la constante de dissociation plus grande que prévue. On peut imaginer qu'un effet levier est d'autant plus important que l'interaction entre cadhérines implique des molécules fortement anisotropes.

Du fait de la grande variabilité observée sur la détermination de la constante de dissociation, il nous a été impossible de démontrer une quelconque influence de l'intensité du champ magnétique de l'étape de formation sur la constante de dissociation.

4-4-4- Conclusions et confrontation avec l'art antérieur

Notre étude confirme la complexité et la multiplicité des interactions entre cadhérines. Nous avons montré l'existence de deux états d'adhésion profonds entre dimères de cadhérines. Ces états sont relativement stables et font intervenir l'interdigitation d'au moins trois domaines cadhérine. Ces observations confirment les études en BFP de Perret *et al.* et de Bayas *et al.* (Perret *et al.*, 2004; Bayas *et al.*, 2006) et celles en SFA de Sivasankar *et al.* (Sivasankar *et al.*, 2001). Alors que dans les études en BFP, ces états étaient observés spontanément ou pour des temps de contact plus ou moins longs, nous les avons distingués en « contraignant » le contact entre surfaces, c'est-à-dire en imposant une distance moyenne différente. Nos conditions expérimentales se rapprochent davantage de celles imposées dans les études en SFA. Dans ces études, la distance initiale entre surfaces est aussi fixée, et permet de sonder les différents états d'adhésion entre cadhérines.

Nous confirmons que la distance entre surfaces est un paramètre important sur la formation des différents états d'adhésion profonds.

Enfin, l'observation d'états d'adhésion profonds entre cadhérines est raisonnable, considérant la fonction des cadhérines qui permet la réalisation de *jonctions adhérentes et stables* entre cellules.

En ce qui concerne la cinétique de formation de ces états d'adhésion profonds, nous avons mesuré une constante cinétique d'association relativement faible, de $7 \cdot 10^{-7} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Cette mesure est cohérente avec les hypothèses et les indices présents dans la littérature, mais cette constante cinétique n'avait jamais été mesurée auparavant. En effet, Pierres *et al.* avaient déduit un « temps d'association » de 800 s pour une paire de fragments EC1-2 maintenus suffisamment proches (à 10 nm) (Pierres *et al.*, 1998). Ce résultat est difficilement comparable avec nos expériences, dans la mesure où il ne s'agit pas des mêmes fragments et dans la mesure où ce temps de contact est difficile à traduire en constante d'association « 2D ». Cette étude suggère tout de même que l'interaction EC1-2 est relativement lente. En considérant les temps de contact entre surfaces, Baumgartner *et al.* avaient remarqué que l'association entre cadhérines (pour les cinq fragments) était plus lente que l'association entre la sélectine et ses ligands (Baumgartner *et al.*, 2000). Par ailleurs, Bayas *et al.* avaient aussi émis l'hypothèse d'une cinétique lente pour la formation d'états d'adhésion profonds entre

CHAPITRE IV

cadhérines (Bayas et al., 2006). En effet, ces auteurs détectaient davantage de liens associés à des états d'adhésion profonds pour les temps de contact les plus longs.

Enfin, une cinétique lente est également cohérente avec les fonctions attribuées aux cadhérines, qui, d'une part, sont *ancrées* au cytosquelette et qui, d'autre part, réalisent des jonctions entre cellules *au repos*, c'est-à-dire pour des temps de contact longs.

La constante d'association mesurée pour l'interaction entre cadhérines est significativement plus petite que celle mesurée pour l'interaction entre streptavidine et biotine, prises dans leur configuration la plus lente (chapitre 3). Cette différence peut être interprétée en invoquant, pour les cadhérines, un mécanisme de diffusion encore plus contraint que pour le couple streptavidine-biotine, c'est-à-dire avec un « ajustement » entre molécules plus complexe. Cette tendance ne serait pas surprenante car les cadhérines sont des « grosses » molécules rigides qui interagissent « en de nombreux points » et la spécificité stérique est sans aucun doute plus grande que dans le cas du couple streptavidine-biotine. Pour la reconnaissance entre cadhérines, nous pouvons également envisager l'existence d'une barrière d'activation, et interpréter la cinétique d'association comme limitée par une étape de réaction.

Cherchons désormais à interpréter l'influence de l'intensité du champ magnétique appliqué lors de la formation du lien sur l'état d'adhésion observé. De façon évidente, l'augmentation du champ magnétique permet de diminuer la distance entre cadhérines au moment de la formation du lien. De ce fait, il n'est pas étonnant qu'un lien formé à distance plus faible aboutisse à un état d'adhésion plus interdigité. La distance entre surfaces, contrôlée par l'intensité du champ, est donc un paramètre crucial, qui gouverne les interactions entre cadhérines. Par ailleurs, nous avons vu, au paragraphe 4-3-2-b, que l'état d'adhésion dépend aussi de l'histoire de la formation du lien : lorsqu'un champ faible est appliqué 10 min avant l'application d'un champ fort pendant 10 min, l'état d'adhésion est différent de celui obtenu après 10 min directement à champ fort. Il semble donc que le profil d'interaction entre surfaces recouvertes de cadhérines évolue au cours de la formation des liens. La formation d'un lien d'interdigitation moyenne engendre probablement une résistance mécanique qui s'oppose alors à l'effet du champ magnétique et donc à la formation d'un lien d'interdigitation totale. En effet, en considérant les profils de la figure-4-25-A, il apparaît que la création d'un lien d'interdigitation moyenne empêche d'accéder, pour les champs magnétiques réalisables expérimentalement, à des distances assez faibles pour former le lien

CHAPITRE IV

d'interdigitation totale. S'il était possible d'appliquer un champ magnétique beaucoup plus fort, il est probable que le lien d'interdigitation totale serait accessible.

Néanmoins, une interprétation en termes d'énergie d'interaction moléculaire entre cadhérines serait hasardeuse. De fait, il est difficile d'appréhender la distance entre surfaces comme l'unique dimension d'espace intervenant dans le profil d'interaction moléculaire. En effet, les cadhérines sont des molécules complexes et de « grande dimension », et des degrés de liberté latéraux et angulaires sont donc probablement nécessaires pour réaliser un ajustement des sites de reconnaissance.

4-5- Conclusion

Nous avons donc appliqué notre méthode de mesure de constantes d'association à l'étude de molécules biologiques impliquées dans l'adhésion cellulaire : les cadhérines. Concilier l'environnement des cadhérines et la stabilité colloïdale, liée à notre méthode, a exigé une mise en oeuvre délicate. Cette étude a néanmoins permis d'observer l'influence déterminante des conditions de contact entre surfaces sur l'interaction entre cadhérines. En jouant sur ces conditions de contact, deux états d'adhésion profonds différents, impliquant au moins trois domaines cadhérines, ont pu être mis en évidence. En outre, l'étude de la cinétique d'association entre cadhérines s'est révélée pertinente, notamment à travers la détermination expérimentale d'une constante d'association lente, et significativement différente des autres cas étudiés au cours de cette thèse. Cette caractéristique de l'interaction profonde entre cadhérines est à rapprocher de la fonctionnalité de ces molécules d'adhésion, qui maintiennent la cohésion des cellules au sein des tissus. En effet, cette fonction cohésive intervient entre cellules au repos, et ne nécessite pas une association rapide.

Par ailleurs, cette étude de l'interaction entre cadhérines nous a permis de démontrer la pertinence de la méthode introduite au chapitre 3 pour des couples ligand-récepteur d'intérêt biologique, et plus complexes à manipuler que le couple modèle streptavidine-biotine. A l'occasion de cette étude, nous avons pu constater que notre méthode de mesure de cinétique était capable de mesurer des constantes d'association « 2D » aussi faibles que $7 \cdot 10^{-7} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. La gamme de mesure accessible avec notre méthode est donc finalement au moins comprise entre $7 \cdot 10^{-7} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $3 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, valeur obtenue au chapitre 3.

BIBLIOGRAPHIE

- BAUMGARTNER, W., HINTERDORFER, P., NESS, W., RAAB, A., VESTWEBER, D., SCHINDLER, D. & DRENCKHALN, D. (2000). Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. — *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 4005-4010.
- BAYAS, M. V., LEUNG, A., EVANS, E. & LECKBAND, D. (2006). Lifetime measurements reveal kinetic differences between homophilic cadherin bonds. — *Biophysical Journal* 90, 1385-1395.
- BOGGON, T. J., MURRAY, J., CHAPPUIS-FLAMENT, S., WONG, E., GUMBINER, B. M. & SHAPIRO, L. (2002). C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. — *Science* 296, 1308-1313.
- CAILLIEZ, F. & LAVERY, R. (2005). Cadherin mechanics and complexation: The importance of calcium binding. — *Biophysical Journal* 89, 3895-3903.
- CHAPPUIS-FLAMENT, S., WONG, E., HICKS, L., KAY, C. & GUMBINER, B. (2001). Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. — *The Journal of Cell Biology* 154, 231-243.
- DU ROURE, O., BUGUIN, A., FERACCI, H. & SILBERZAN, P. (2006). Homophilic interactions between cadherin fragments at the single molecule level: An AFM study. — *Langmuir* 22, 4680-4684.
- GUMBINER, B. M. (1996). Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. — *Cell* 84, 345-357.
- IVANOV, D. B., PHILIPPOVA, M. P. & TKACHUK, V. A. (2001). Structure and functions of classical cadherins. — *Biochemistry-Moscow* 66, 1174-1186.
- NAGAR, B., OVERDUIN, M., IKURA, M. & RINI, J. M. (1996). Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. — *Nature* 380, 360-364.
- NOSE, A., TSUJI, K. & TAKEICHI, M. (1990). Localization of Specificity Determining Sites in Cadherin Cell-Adhesion Molecules. — *Cell* 61, 147-155.
- OVERDUIN, M., HARVEY, T., BAGBY, S., YAU, P., TAKEICHI, M. & IKURA, M. (1995). Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. — *science* 267, 386-389.
- OZAWA, M. (2002). Lateral dimerization of the E-cadherin extracellular domain is necessary but not sufficient for adhesive activity. — *Journal of Biological Chemistry* 277, 19600-19608.
- OZAWA, M. & KEMLER, R. (1998). The membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity. — *Journal of Cell Biology* 142, 1605-1613.
- PATEL, S., CHEN, C., BAHNA, F., HONIG, B. & SHAPIRO, L. (2003). Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. — *Current opinion in structural biology* 13, 690-698.
- PERRET, E., BENOLIEL, A. M., NASSOY, P., PIERRES, A., DELMAS, V., THIERY, J. P., BONGRAND, P. & FERACCI, H. (2002). Fast dissociation kinetics between individual E-cadherin fragments revealed by flow chamber analysis. — *Embo Journal* 21, 2537-2546.
- PERRET, E., LEUNG, A., FERACCI, H. & EVANS, E. (2004). Trans-bonded pairs of E-cadherin exhibit a remarkable hierarchy of mechanical strengths. — *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 16472-16477.

- PERTZ, O., BOZIC, D., KOCH, A., FAUSSER, C., BRANCACCIO, A. & ENGEL, J. (1999). A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. — *Embo Journal* 18, 1738-1747.
- PIERRES, A., FERACCI, H., DELMAS, V., BENOLIEL, A. M., THIERY, J. P. & BONGRAND, P. (1998). Experimental study of the interaction range and association rate of surface-attached cadherin 11. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9256-9261.
- POKUTTA, S., HERRENKNECHT, K., KEMLER, R. & ENGEL, J. (1994). Conformational-Changes of the Recombinant Extracellular Domain of E-Cadherin Upon Calcium-Binding. — *European Journal of Biochemistry* 223, 1019-1026.
- ROTHEN-RUTISHAUSER, B., RIESEN, F. K., BRAUN, A., GUNTHER, M. & WUNDERLI-ALLENSPACH, H. (2002). Dynamics of tight and adherens junctions under EGTA treatment. — *Journal of Membrane Biology* 188, 151-162.
- SHAPIRO, L., FANNON, A. M., KWONG, P. D., THOMPSON, A., LEHMANN, M. S., GRUBEL, G., LEGRAND, J. F., ALSNIELSEN, J., COLMAN, D. R. & HENDRICKSON, W. A. (1995). Structural Basis of Cell-Cell Adhesion by Cadherins. — *Nature* 374, 327-337.
- SHIOZAKI, H., OKA, H., INOUE, M., TAMURA, S. & MONDEN, M. (1996). E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. — *Cancer* 77, 1605-1613.
- SIVASANKAR, S., BRIEHER, W., LAVRIK, N., GUMBINER, B. & LECKBAND, D. (1999). Direct molecular force measurements of multiple adhesive interactions between cadherin ectodomains. — *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 11820-11824.
- SIVASANKAR, S., GUMBINER, B. & LECKBAND, D. (2001). Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains. — *Biophysical Journal* 80, 1758-1768.
- STEINBERG, M. S. & MCNUTT, P. M. (1999). Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. — *Current Opinion in Cell Biology* 11, 554-560.
- TAMURA, K., SHAN, W. S., HENDRICKSON, W. A., COLMAN, D. R. & SHAPIRO, L. (1998). Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. — *Neuron* 20, 1153-1163.
- YAGI, T. & TAKEICHI, M. (2000). Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. — *Genes & Development* 14, 1169-1180.
- ZHU, B., CHAPPUIS-FLAMENT, S., WONG, E., JENSEN, E., GUMBINER, B. & LECKBAND, D. (2003). Functional analysis of structural basis of homophilic cadherin adhesion. — *Biophysical Journal* 84, 4033-4042.

CONCLUSION

Au cours de ce travail de thèse, nous avons mis au point une nouvelle méthode pour l'étude de cinétiques de réactions ligand-récepteur, et plus précisément pour l'étude de constantes cinétiques d'association dans le cas où les réactifs sont fixés sur des surfaces en regard. Mesurer des constantes d'association pour des réactifs en surface et tenter de les interpréter est d'autant plus pertinent que peu d'interprétations de l'ordre de grandeur des rares constantes mesurées dans la littérature, et de leur variabilité, ont été proposées.

La méthode que nous proposons consiste à suivre la cinétique de formation de doublets de particules magnétiques. L'application d'un champ magnétique permet de contrôler le contact entre particules, autrement dit de connaître les conditions de rencontre entre ligands et récepteurs fixés sur ces particules. C'est dans ce contrôle du contact que réside la principale force de notre approche pour la détermination des constantes cinétiques d'association. En outre, cette méthode présente l'avantage d'étudier la même réaction ligand-récepteur un grand nombre de fois en parallèle, par l'intermédiaire d'un protocole et d'une analyse relativement simples.

En étudiant un couple ligand-récepteur modèle, le couple streptavidine-biotine, nous avons validé cette nouvelle méthode. Nous avons également mis en évidence une source de variabilité des constantes d'association : le degré de confinement des réactifs, conditionné par la nature de la liaison entre réactifs et surface. Grâce à la connaissance des paramètres physiques régissant la rencontre entre ligands et récepteurs, nous avons pu interpréter les valeurs mesurées pour les constantes d'association. Pour les configurations les plus rapides, où les réactifs sont séparés de la surface par des polymères flexibles, nous avons eu recours à une théorie de diffusion-réaction. Dans ce cadre, les constantes d'association ont été appréhendées comme limitées par des processus de diffusion, associés à la dynamique des particules colloïdales. Pour les configurations les plus lentes, où les réactifs sont les plus confinés en surface, le ralentissement supplémentaire observé est attribué à une diminution de l'efficacité des rencontres entre réactifs.

CONCLUSION

Cette méthode a également permis d'étudier des molécules directement impliquées dans l'adhésion cellulaire, les cadhérines. Nous avons mis en évidence l'influence des conditions de contact sur l'état d'adhésion observé entre cadhérines. Pour les deux états d'adhésion « profonds » observés, nous avons mesuré une cinétique d'association plus lente que celles précédemment évoquées (streptavidine-biotine). Cette caractéristique est cohérente avec la fonctionnalité adhésive statique des cadhérines, qui permettent un maintien ferme et stable entre cellules d'un même tissu.

Nous avons finalement été amenés à conclure que la constante cinétique d'association entre un ligand et récepteur sur des surfaces en regard ne constitue pas une caractéristique intrinsèque du couple. Elle dépend fortement, comme en solution, des processus de diffusion des réactifs. Or, en surface, ces processus de diffusion sont beaucoup plus complexes et font intervenir deux échelles distinctes. Le premier processus correspond à une diffusion globale, liée à la nature de la surface. Le second est associé à une dynamique « locale », imposée par la nature des molécules et par le niveau de contrainte des réactifs sur les surfaces. Ainsi, l'environnement surfacique et la nature des réactifs sont à l'origine d'une grande variabilité des constantes d'association en surface. Nous avons d'ailleurs mis en évidence cette variabilité, d'une part, pour un même couple avec des environnements surfaciques légèrement différents, et, d'autre part, pour un même support colloïdal avec des couples différents (streptavidine-biotine et cadhérines). Les phénomènes d'adhésion biospécifique entre surfaces sont donc très riches, ce qui rend compte de la grande diversité des fonctions biologiques impliquant des surfaces.

Pour conclure, il serait illusoire de croire que l'on peut comprendre la complexité des fonctions biologiques en se contentant d'étudier des molécules biologiques *in vitro*, hors de leur environnement physiologique. Certes, l'étude des constantes cinétiques d'association pour différents couples ligand-récepteur, pris dans un même environnement « artificiel », permet de comparer les propriétés adhésives que ces couples induisent. Mais, comme nous l'avons démontré, l'environnement surfacique des réactifs a une influence majeure sur les propriétés adhésives d'un système, et l'on ne peut donc se contenter d'étudier des environnements artificiels. Ainsi, l'avenir des travaux sur les constantes cinétiques d'association réside d'ores et déjà dans l'étude de systèmes « réels », proches de l'*in vivo*. Pour progresser dans la compréhension des fonctions impliquant des interactions ligand-récepteur, il est désormais indispensable d'étudier ces molécules dans leur environnement

CONCLUSION

biologique. Un premier pas consiste à étudier les molécules d'adhésion complètes, c'est-à-dire avec leurs parties transmembranaire et intracellulaire. Enfin, l'étude du rôle de l'ancrage des molécules d'adhésion au cytosquelette, et, entre autres, l'étude de la régulation biochimique de l'adhésion, constituent à l'évidence des perspectives incontournables.

ANNEXE – A***Propriété intrinsèque magnétique : mesure de χ_{\perp} à hautes fréquences***

La susceptibilité transverse χ_{\perp} traduit le phénomène de résonance magnétique. A l'équilibre le moment magnétique et le champ interne H_A sont parallèles le long d'un axe facile d'aimantation. Une déviation du moment magnétique entraîne une précession de celui-ci autour du champ H_A , à la fréquence ω_{res} , donnée par:

$$\omega_{res} = \gamma H_A \quad (a-1)$$

γ est le rapport gyromagnétique.

On ajoute un champ polarisant H , puis on mesure la fréquence de résonance en fonction du champ polarisant, on a :

$$\omega_{res} = \gamma(H_A + H) \quad (a-2)$$

La pente de cette droite donne γ et de l'extrapolation à $\omega_{res}=0$ on détermine H_A . Compte tenu des valeurs caractéristiques de γ et de H_A , ce phénomène est observé à haute fréquence, autour du GHz.

Le ferrofluide initial a fait l'objet d'une telle étude. Un champ interne de 45 kA/m, soit 57 mT, a été ainsi mesuré. Cela correspond à une constante d'anisotropie K de $9 \cdot 10^3 \text{ J/m}^3$.

ANNEXE – B

Protocole de greffage de la streptavidine sur les particules magnétiques

Préparation des Tampons de greffage

Tampon 1, tampon d'activation : Tampon MES à 20 mM et à un pH=5.5 (sans tensio-actif).

Tampon 2, tampon de couplage : Tampon Phosphate à 10 mM et à un pH=7.2 (sans tensio-actif).

Tampon 3, tampon de désactivation : Tampon glycine à 1.5 g.L^{-1} + 0.4% de F-127

Tampon 4, tampon de stockage : Tampon 2 + 0.4% de F-127

Préparation de solution de streptavidine

La streptavidine est distribuée par *Signa-Aldrich*. La streptavidine sous forme de poudre est reconstituée dans le tampon 2 à une concentration de 4g/L. La solution ainsi obtenue est aliquotée en échantillons de 105 μL et congelée. Avant le greffage, un lot est décongelé à température ambiante, 30 min avant utilisation.

Greffage covalent

Préparation des solutions des agents de couplage

Solution de s-NHS : Le s-NHS est dilué dans le tampon 1 à environ 2 g/L (10 mg dans 5 mL de tampon 1).

Solution de EDC : l'EDC est dilué dans le tampon 1 à environ 2 g/L (10 mg dans 5 mL de tampon 1).

Greffage des particules

100 μL de particules polymérisées à 1% en masse, c'est-à-dire 1mg de particules, sont considérées.

ANNEXE – C

Protocole de dosage de la streptavidine sur les particules magnétiques

Préparation des solutions

Tampon de dosage : Tampon borate à 10mM et à pH=8.2 avec 0.4% en masse de F-127.

Solution de biotine FITC : Biotine FITC diluée dans le tampon de dosage à la concentration $C = 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$.

Suspension de particules : La suspension de particules greffées (ou non pour un témoin) est lavée 3 fois dans le tampon de dosage, et sa fraction massique est fixée à $\phi_m = 1\%$.

Incubation des particules magnétiques

A ce stade, différents échantillons sont préparés pour les différentes quantités de particules incubées. A 1 mL de solution de biotine FITC est ajouté un volume v (μL) de suspension de particules à 1%. Pour que tous les échantillons aient une concentration, notée C_1 , de biotine FITC identique initialement, tous les volumes sont ajustés à $v_{\text{tot}} = 1\text{mL} + v_{\text{max}}$, avec du tampon de dosage. Un échantillon de référence est préparé sans particule, avec une concentration de biotine C_1 . L'incubation entre les particules et la biotine FITC est réalisée à température ambiante, sous agitation et pendant 10 min. Après incubation, pour chaque échantillon, les particules magnétiques sont sédimentées avec un aimant, et le surnageant, contenant la biotine FITC en excès, est récupéré.

Mesure de la fluorescence

Pour chaque surnageant de chaque échantillon, l'intensité de fluorescence est mesurée, en utilisant un spectrofluorimètre (*Spectrofluorometer Safas, flx-xenius*). Pour la FITC, la longueur d'onde d'excitation est de 492 nm, et la longueur d'onde d'émission est de 518 nm. Pour les divers échantillons considérés, l'intensité de fluorescence décroît alors linéairement avec le volume v de particules ajouté (si on n'est jamais en défaut de biotine). La pente de

ANNEXES

cette droite, α , et l'ordonnée à l'origine, i_0 , permettent de remonter au nombre de sites de fixation de la biotine par particule, noté n :

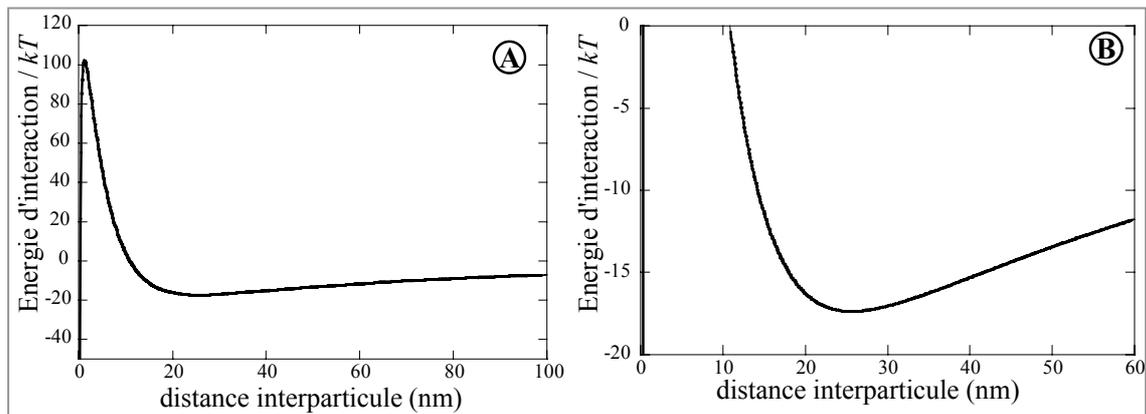
$$n = \frac{\alpha n_1 v_b d}{i_0 \phi_m}$$

avec n_1 est la quantité initiale de biotine-FITC ($= C_1 \cdot v_{\text{tot}}$), V_b le volume d'une particule, d la densité des particules, et ϕ_m la fraction massique en particules dans le volume de suspension ajouté.

La concentration C de biotine FITC et les volumes de particules ajoutés peuvent être ajustés en fonction du taux de greffage attendu.

ANNEXE – D***Potentiel d'interaction entre particules magnétiques***

Un exemple de potentiel d'interaction entre particules, au sein d'une paire de particules, est donné ici, pour un champ de 30 mT. Ce potentiel est représentatif de l'ensemble des champs magnétiques utilisés au cours de cette thèse (de 20 mT à 60 mT).



**Figure-D-1 : A- Profil d'interaction entre deux particules au sein d'une chaîne, sous un champ de 30 mT.
B- Zoom du profil précédent autour du minimum d'énergie.**

ANNEXE – E

Protocole de dosage des chimères de cadhérine sur les particules magnétiques

Les chimères de cadhérines sont dosées via leur fragment Fc par des protéines anti-Fc marquées avec de la FITC. Les protéines anti-Fc utilisées sont des fragments Fab dirigés spécifiquement contre les fragments Fc d'origine humaine, distribués par *Jackson ImmunoResearch Laboratories, INC*. Ces fragments Fab sont de plus couplés à de la FITC.

Préparation des solutions

Tampon de dosage : Tampon borate à 10 mM et à pH=8.2 avec 0.4% en masse de F-127 + 0.1% de BSA (tampon de référence).

Solution de Fab FITC : Les fragments Fab-FITC sont dilués dans tampon de dosage à une concentration de $C = 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$.

Incubation des particules magnétiques

Les particules sont au préalable greffées de protéine A (10 µg/mg), puis elles sont incubées avec des chimères de cadhérines dans le tampon de référence pendant 20 min. Deux quantités de chimères sont étudiées : 25 par particule et 100 par particule. Après capture des cadhérines, les particules sont lavées 4 fois dans le tampon de référence. Puis, le dosage à proprement parler est directement conduit pour les deux lots de particules recouvertes de cadhérines et pour un lot de particules « nues », qui constitue un lot témoin.

Pour chaque lot de particules, trois à quatre échantillons sont considérés, avec des volumes de 5 à 60 µL de particules à 1%. Pour chaque échantillon, les particules sont sédimentées, le surnageant est éliminé et est remplacé par 25 µL de solution de Fab-FITC à $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. Ainsi, la quantité de sonde fluorescente est la même pour chaque échantillon. Les échantillons sont incubés pendant 10 minutes, à température ambiante et sous agitation. Pour déplacer l'équilibre de fixation des Fab sur les fragments Fc, l'incubation est conduite dans des petits volumes (25µL) et pour des concentrations plus fortes ($2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$) que dans le cas d'un

ANNEXES

dosage de la streptavidine (1mL à 10^{-9} mol.L⁻¹). Après incubation, les particules sont sédimentées, le surnageant est récupéré et dilué 40 fois dans le tampon de référence pour la mesure de fluorescence.

Mesure de la fluorescence

Pour chaque surnageant de chaque échantillon, l'intensité de fluorescence est mesurée, en utilisant un spectrofluorimètre (*Spectrofluorometer Safas, flx-xenius*). La longueur d'onde d'excitation est de 492 nm, et la longueur d'onde d'émission est de 518 nm. Pour les divers échantillons considérés, l'intensité de fluorescence décroît alors linéairement avec le volume v de particules ajouté (si on n'est jamais en défaut de sonde fluorescente). La pente de cette droite, α , et l'ordonnée à l'origine, i_0 , permettent de remonter au nombre de fragments Fc (ou chimères de cadhérines), noté n :

$$n = \frac{\alpha n_1 v_b d}{i_0 \phi_m}$$

avec n_1 est la quantité initiale de Fab-FITC ($= 2 \cdot 10^{-7} * 25 \cdot 10^{-6}$), V_b le volume d'une particule, d la densité des particules, et ϕ_m la fraction massique en particules dans le volume de suspension ajouté.