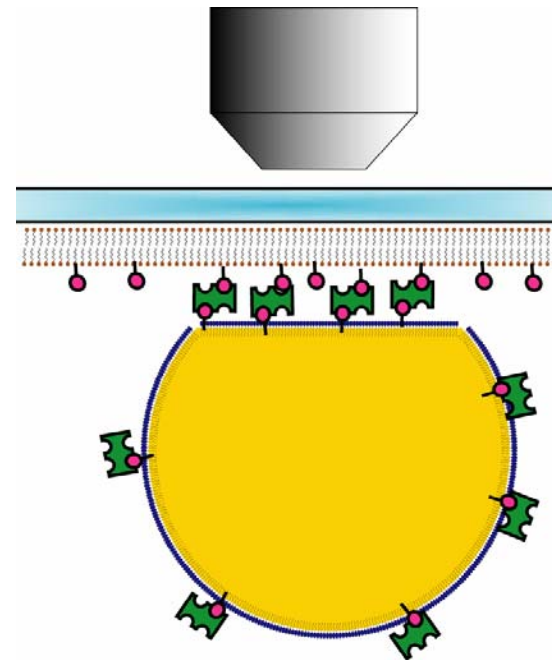
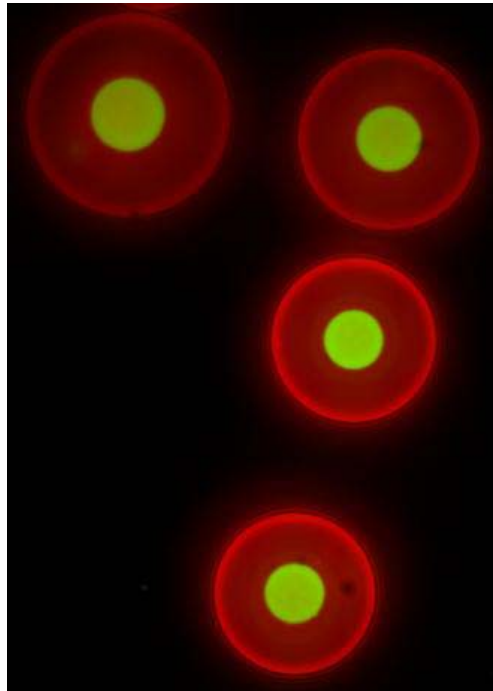


Soutenance de thèse de Jean-Daniel Emerard
Directeur Jérôme Bibette ; co-directeur Jean Baudry

Etude de l'adhésion spécifique entre surfaces fluides à l'aide de matériaux biomimétiques



Introduction

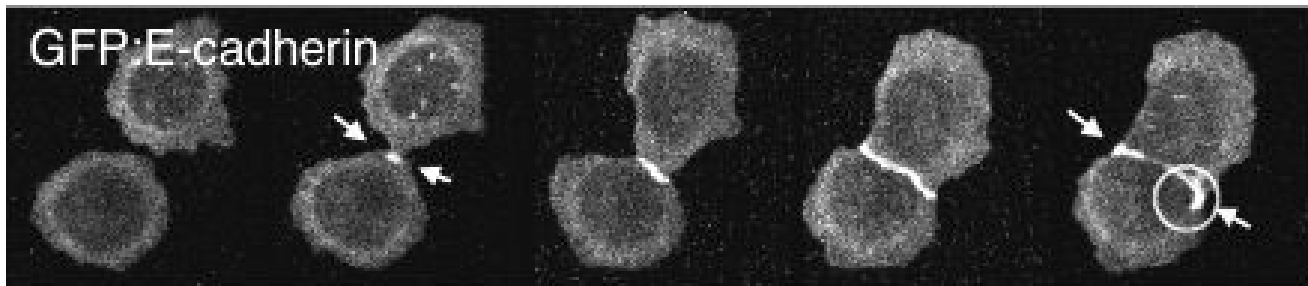
Adhésion cellulaire :

Physico-chimie :

- Protéines d'adhésion
« ligand-récepteur »
- diffusion en surface des matériaux.
- surfaces molles.

Physiologie:

- Réorganisation du cytosquelette.
- Cascades physiologiques?



Introduction

Approche réductionniste :

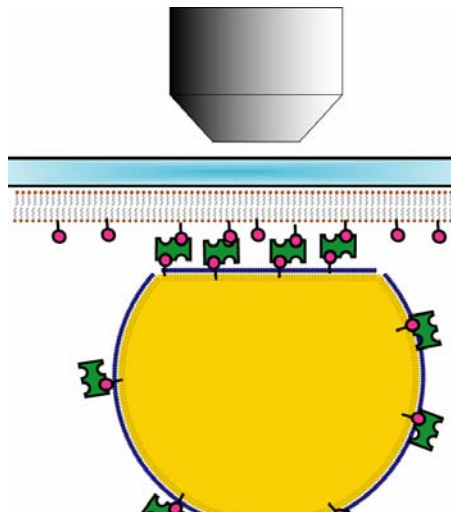
Physico-chimie :

- Gouttelettes d'émulsion : surfaces molles.
- Bicouches supportées : Observation pratique
- Protéines 'ligand/récepteur'.
- diffusion en surface des matériaux.

~~Physiologie:~~

- ~~Effets simultanés :~~
 - ~~adhésion de protéines/réorganisation du cytosquelette.~~
 - ~~Effets de cascades physiologiques?~~

→ **Systeme modèle**



Plan de l'exposé

Adhésion spécifique entre surface fluides et déformables:

Adhésion spécifique entre surfaces fluides et déformables

Equilibre : Modèles thermodynamiques

Adhésion spécifique de vésicules : cinétique et équilibre

Matériaux et caractérisation :

Gouttelettes d'émulsion fonctionnalisées

Bicouches lipidiques supportées

Résultats sur notre système d'adhésion spécifique

Cinétique

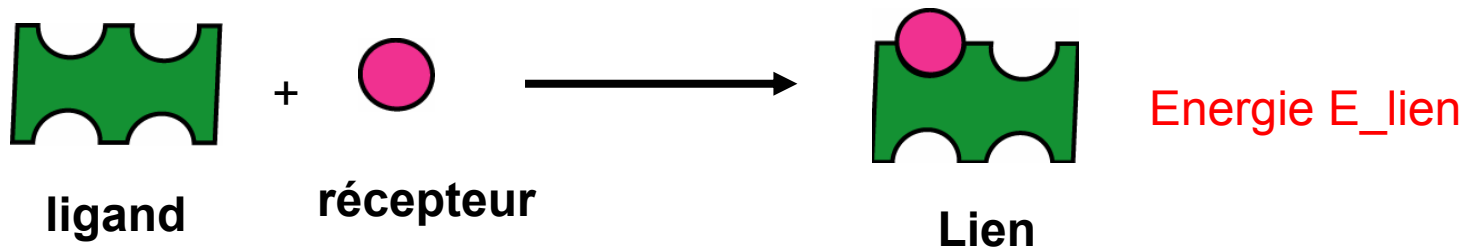
Equilibre

Adhésion spécifique entre surface fluides et déformables

Adhésion spécifique entre surfaces fluides et déformables

Le moteur de l'adhésion spécifique entre les cellules sont des protéines de type ligand/récepteur

- Association **spécifique** :

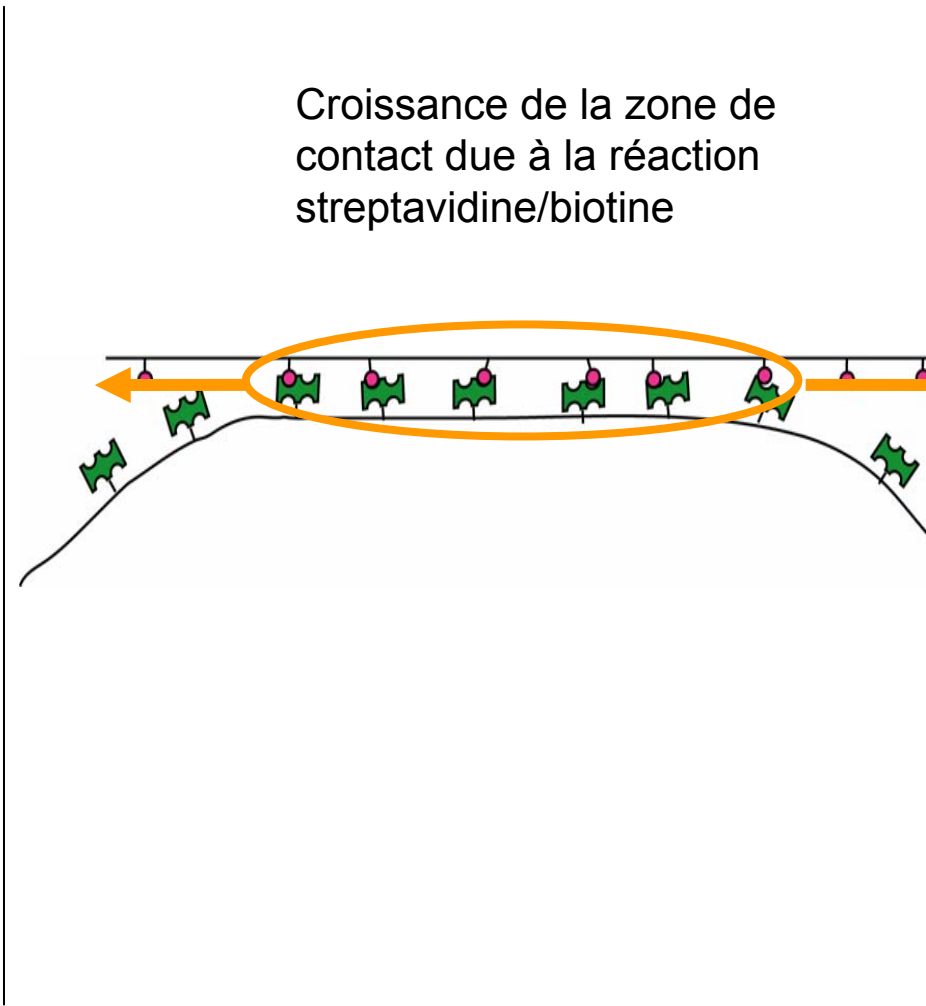
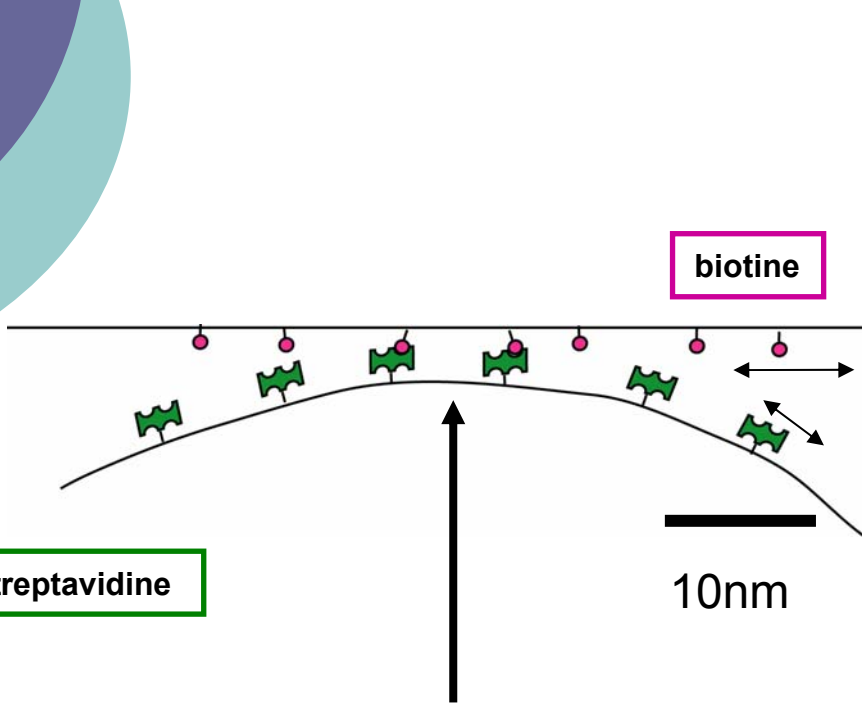


- Association **réversible** :

- Couple Streptavidine/biotine $E_{lien}=35 \text{ kT}$

Adhésion spécifique entre surface fluides et déformables

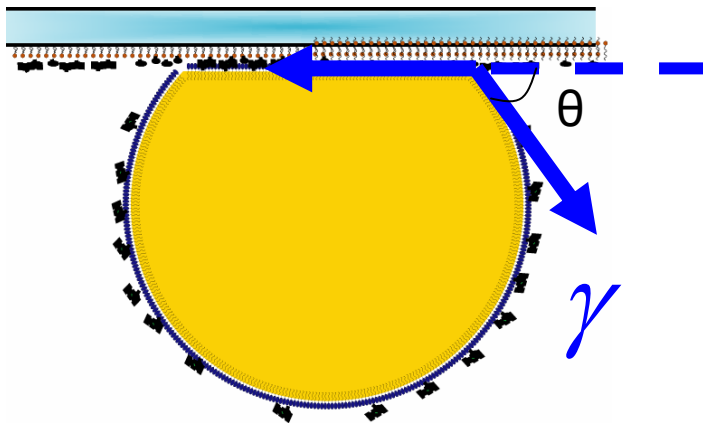
Adhésion spécifique entre surfaces fluides et déformables



Adhésion spécifique entre surface fluides et déformables

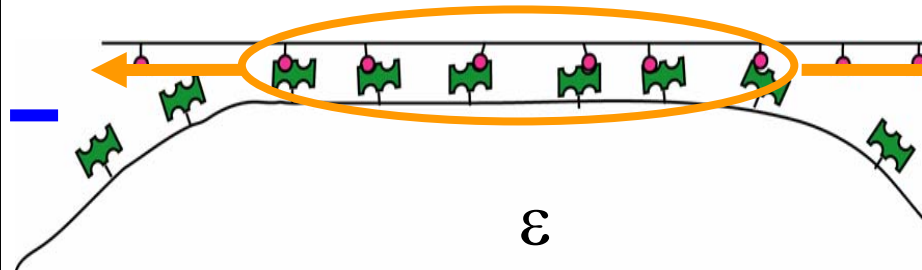
Adhésion spécifique entre surfaces fluides et déformables

Déformation des gouttes : la tension des gouttes limite la déformation



$$\varepsilon = 2\gamma(1 - \cos \theta)$$

Croissance de la zone de contact due à la réaction streptavidine/biotine

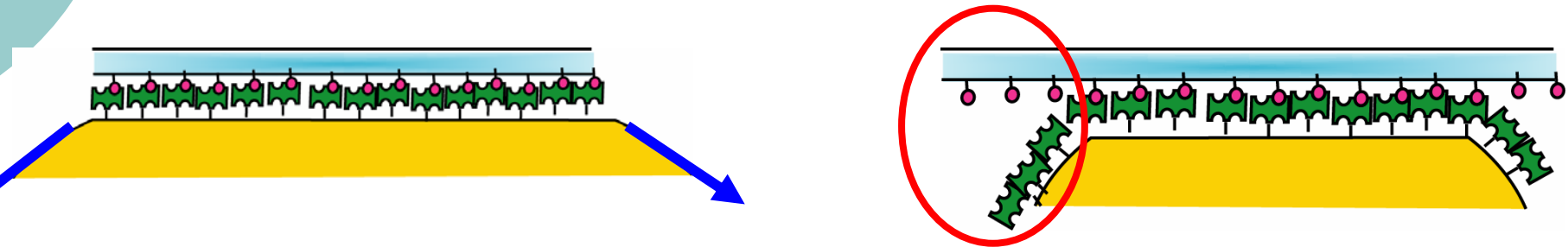


ε énergie d'adhésion par unité de surface

Adhésion spécifique entre surface fluides et déformables

Equilibre : Modèle thermodynamique

Energie d'adhésion
Adhésion sur substrat solide



Si on change l'aire de contact

Cela casse des liens

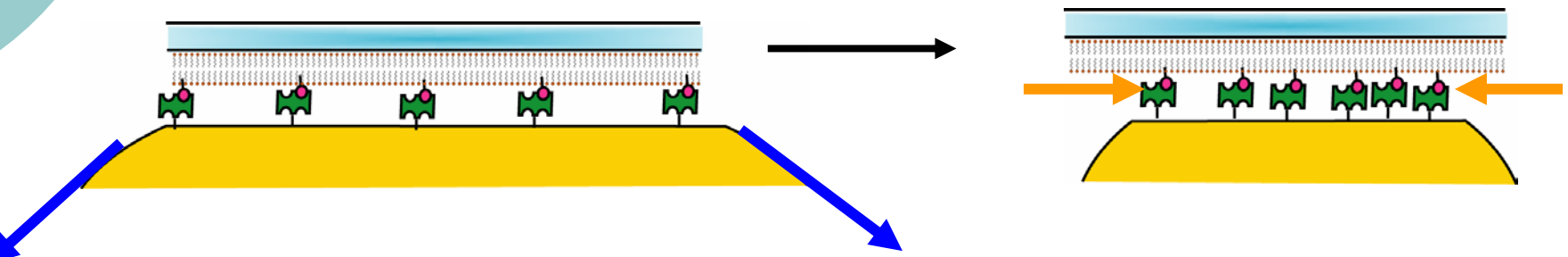
$$\varepsilon = [\textit{liens}] * E_{\textit{lien}}$$

$$([\textit{liens}] \propto \# / \mu m^2)$$

Adhésion spécifique entre surface fluides et déformables

Equilibre : Modèle thermodynamique

Adhésion entre surfaces fluides :



Si on change l'aire de la zone de contact

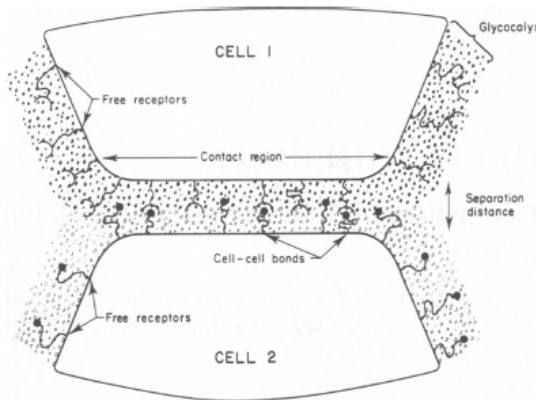
les liens se compressent

$\varepsilon ?$

Adhésion spécifique entre surface fluides et déformables

Equilibre : Modèle thermodynamique

Modèle en solution diluée (adapté de Bell et al. 1984) :



Bilan énergétique :

-Energie des liens.

-Déformation de la goutte.

-Entropie des ligands, des liens, des récepteurs

A l'équilibre, deux équations :

Constante de réaction

$$\frac{[\text{ligands_libres}][\text{récepteurs_libres}]}{[\text{liens}]} = \frac{1}{S_{\text{lien}}} e^{-\frac{E_{\text{lien}}}{kT}}$$

Energie d'adhésion :

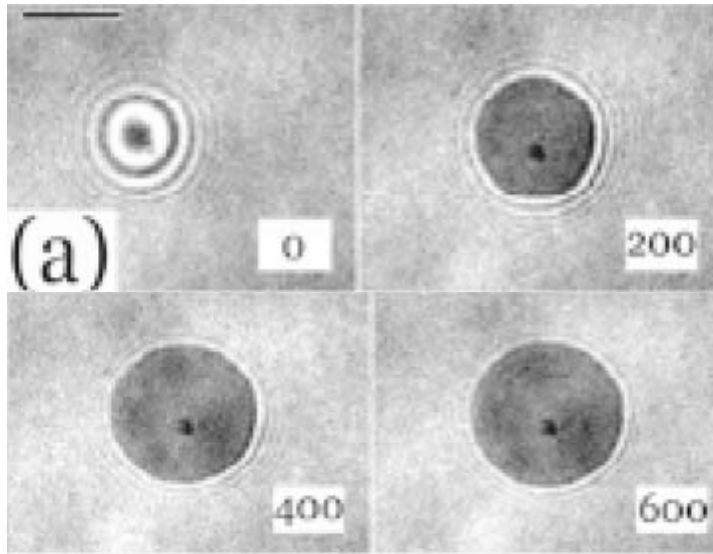
$$\varepsilon = kT [\text{liens}]$$

||

Π : Pression d'étalement

Adhésion de vésicules Cinétique

cinétique d'étalement (Microscopie interférentielle)



Cuvelier, D. and P. Nassoy, Physical Review Letters, 2004

- Cinétique limitée par :

- Dissipation visqueuse (non spécifique).

- Réaction.

- Diffusion

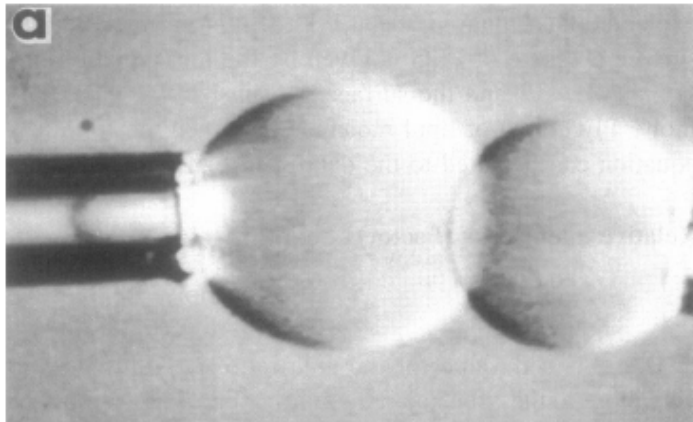
- Peu d'expériences d'adhésion spécifique.

- Expériences mal décrites par des modèles simples.

Adhésion spécifique entre surface fluides et déformables

Adhésion de vésicules Equilibre

Micropipettes :

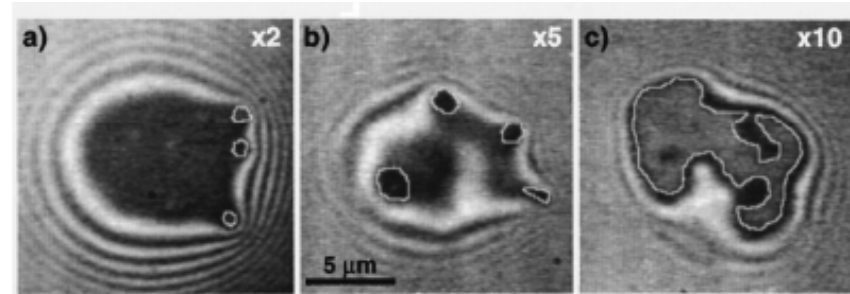


Noppl-Simson, D. and D. Needham, Biophysical journal, 1996

-Mesure de l'énergie d'adhésion

Substrats plans :

Microscopie interférentielle



Bruinsma et al. Physical Review E, 2000

-Observation de la zone de contact

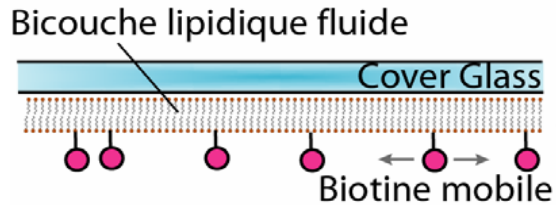
-Combien de liens sont créés?

Conclusion

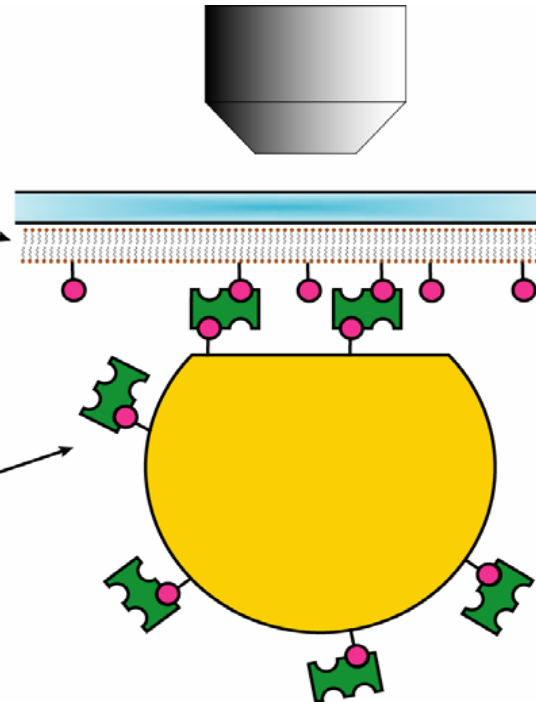
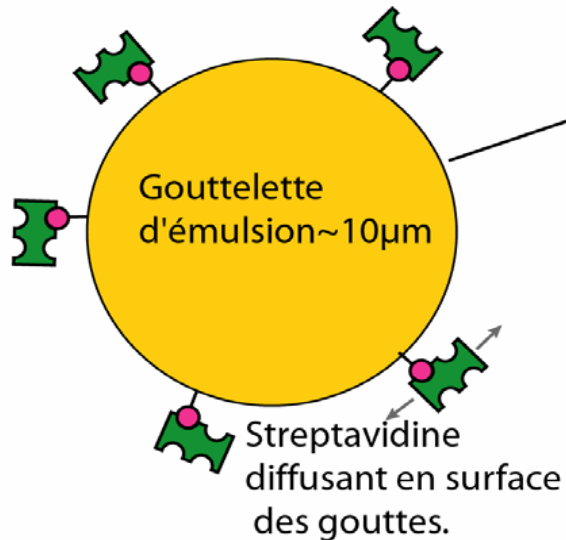
- o Comment relier les propriétés d'adhésion aux propriétés microscopiques des protéines ligand/récepteur?
- o Nécessité d'un système modèle simple bien contrôlé.

Notre système modèle :

Bicouches lipidiques supportées

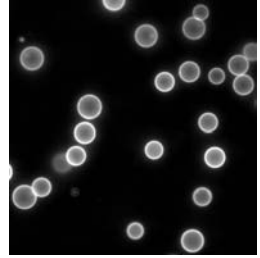


Gouttes d'émulsion fonctionnalisées



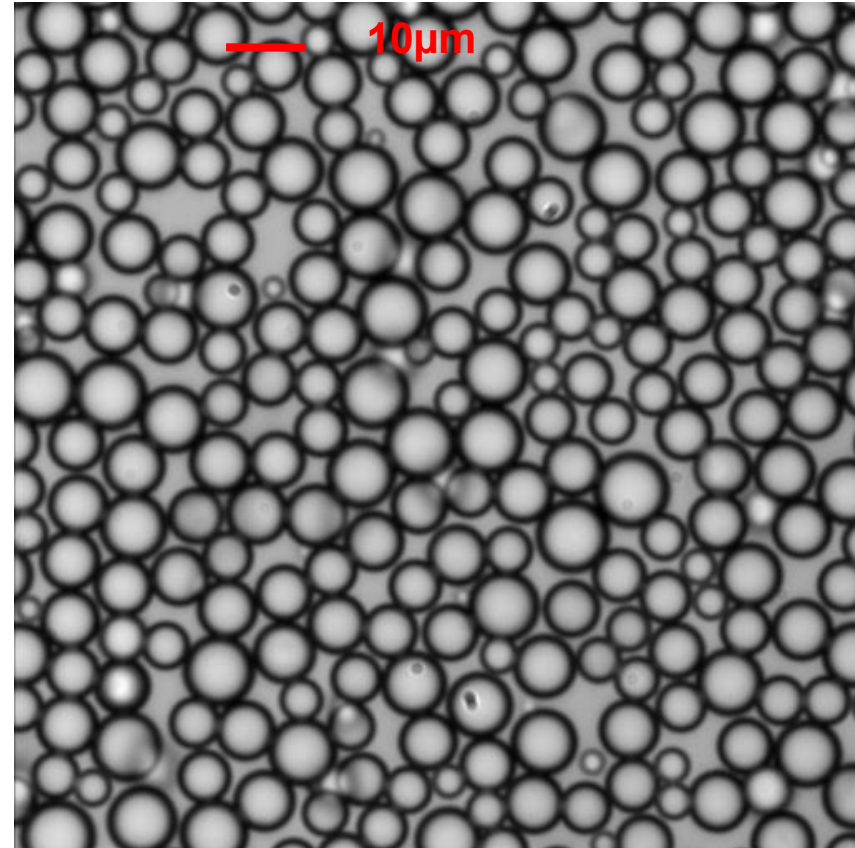
Expérience d'adhésion spécifique

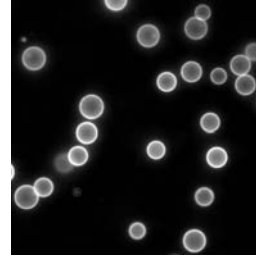
Gouttelettes d'émulsion



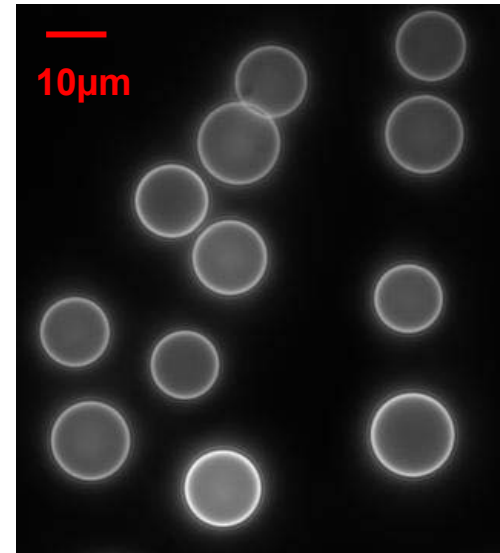
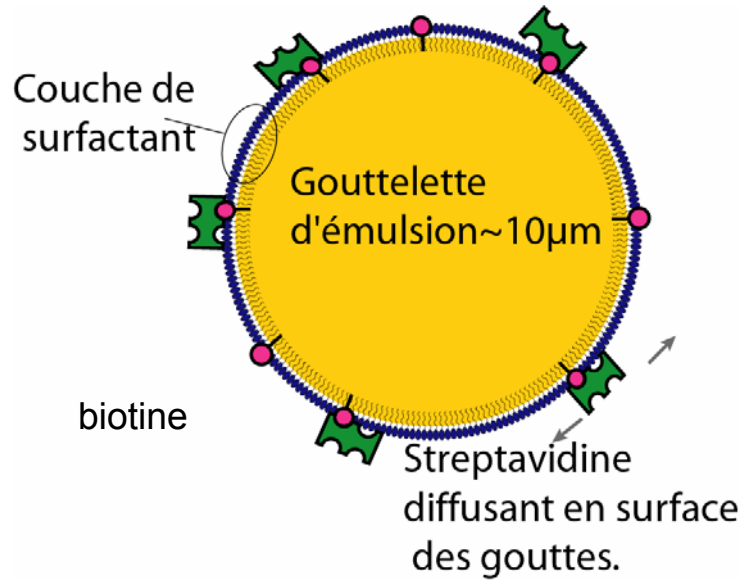
Formulation (J.Fattaccioli)

- Gouttes d'huile dans l'eau.
- Productibles en grandes quantités.
- Stables pendant plusieurs mois
- Taille contrôlée $R=\{3\mu\text{m}\rightarrow 10\mu\text{m}\}$
- Tension de surface mesurable et constante.



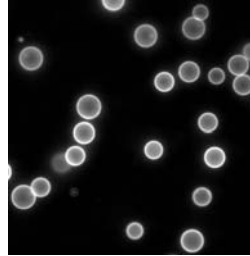


Fonctionnalisation de surface (J.Fattaccioli) :

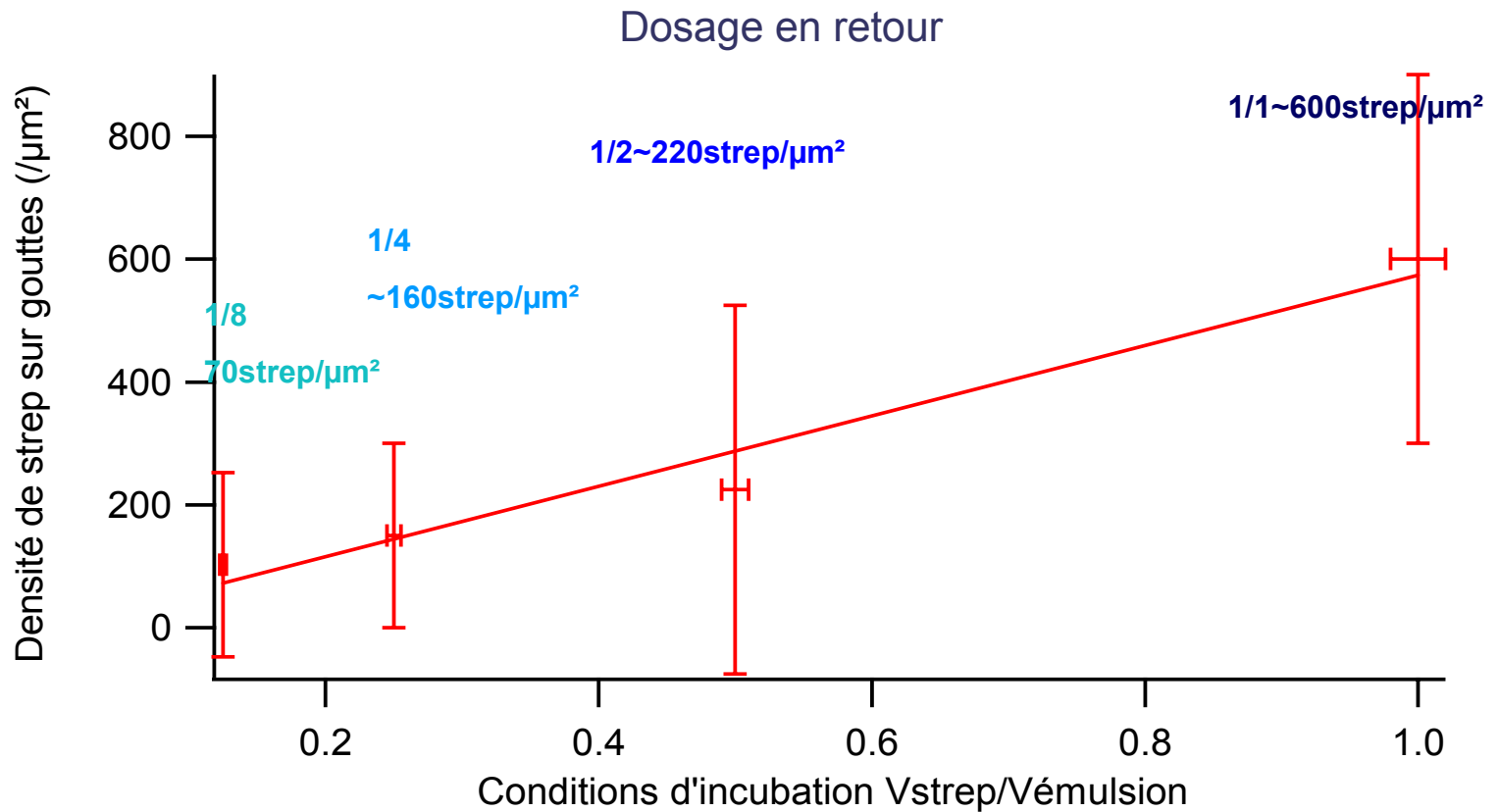


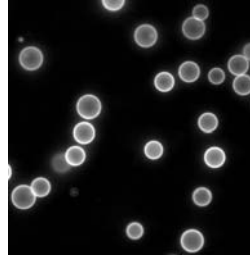
-Streptavidine fluorescente.

Caractérisation qualitative rapide : microscopie de fluorescence



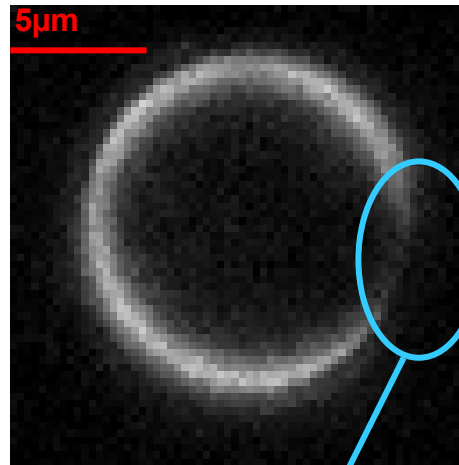
mesures quantitatives : Densité de streptavidine sur les gouttes.



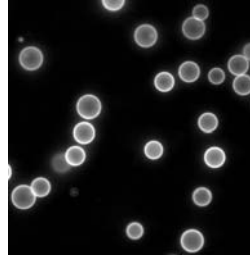


Gouttelettes d'émulsion

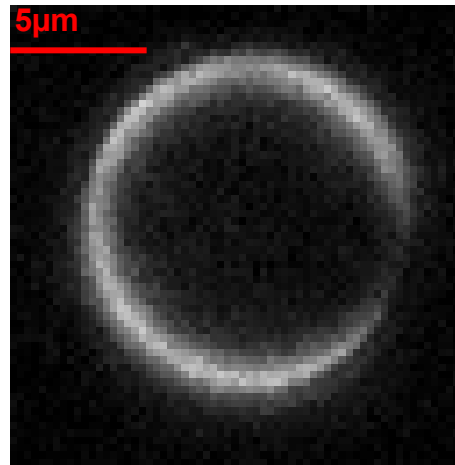
Diffusion des streptavidines sur les gouttes :
Expérience de Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)
(réalisée à l'institut Curie)



Zone bleachée.

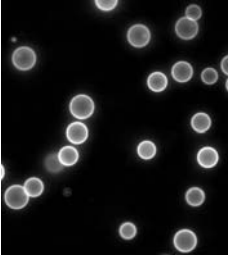


Diffusion des streptavidines sur les gouttes :
Expérience de Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)
(réalisée à l'institut Curie)



(durée réelle du film ~10 secondes)

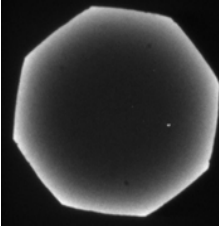
- Streptavidines diffusent à la surface des gouttes.
- Mesures quantitatives en Fluorescence Correlation Spectroscopy : $D_{\text{strep}} \sim 3 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$



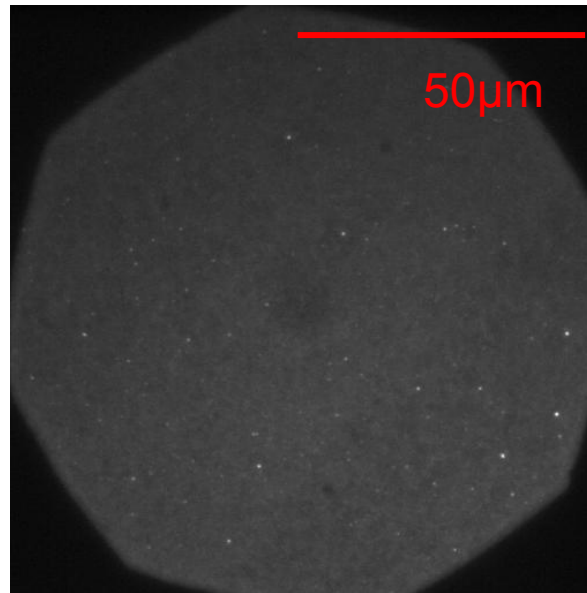
Conclusion :

- densité streptavidine gouttes : $\sim 50 \rightarrow \sim 500$ strep/ μm^2 .
- Steptavidine diffuse en surface des gouttes ($3\mu\text{m}^2/\text{s}$)
- Tension de surface constante $\sim 12\text{mN/m} \pm 4\text{mN/m}$

Bicouches lipidiques supportées :

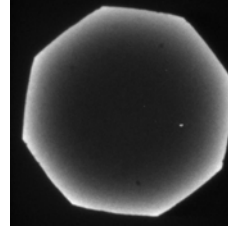


- Caractérisation rapide en microscopie de fluorescence :
 - o Streptavidine fluorescente adsorbée sur les biotines sur les bicouches.
 - o Homogène sur de grandes surfaces ($\sim 1\text{cm}^2$)
 - o Selon quantité de streptavidine sur les bicouches, l'intensité de fluorescence change.



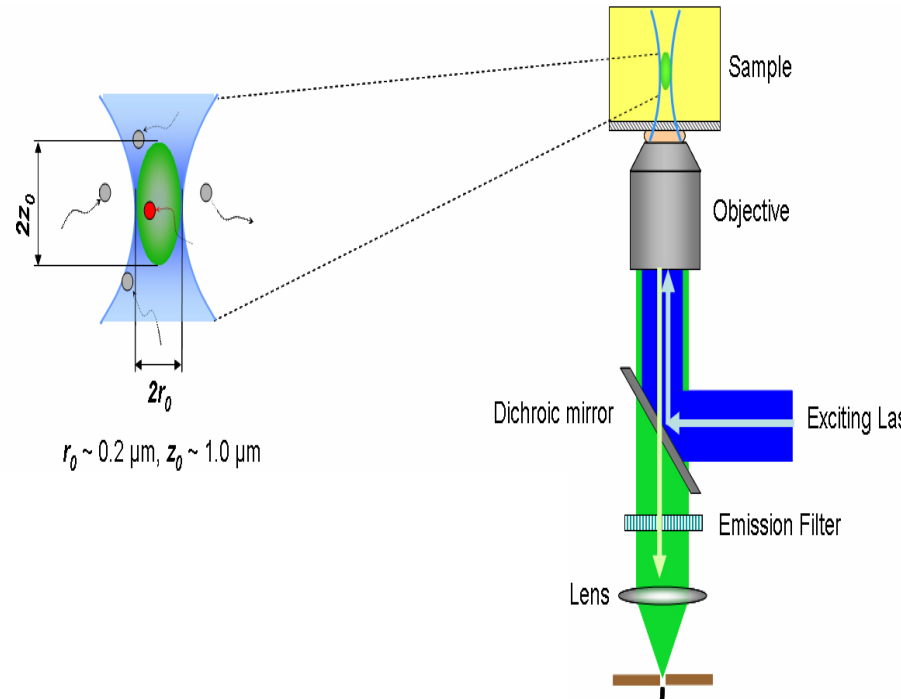
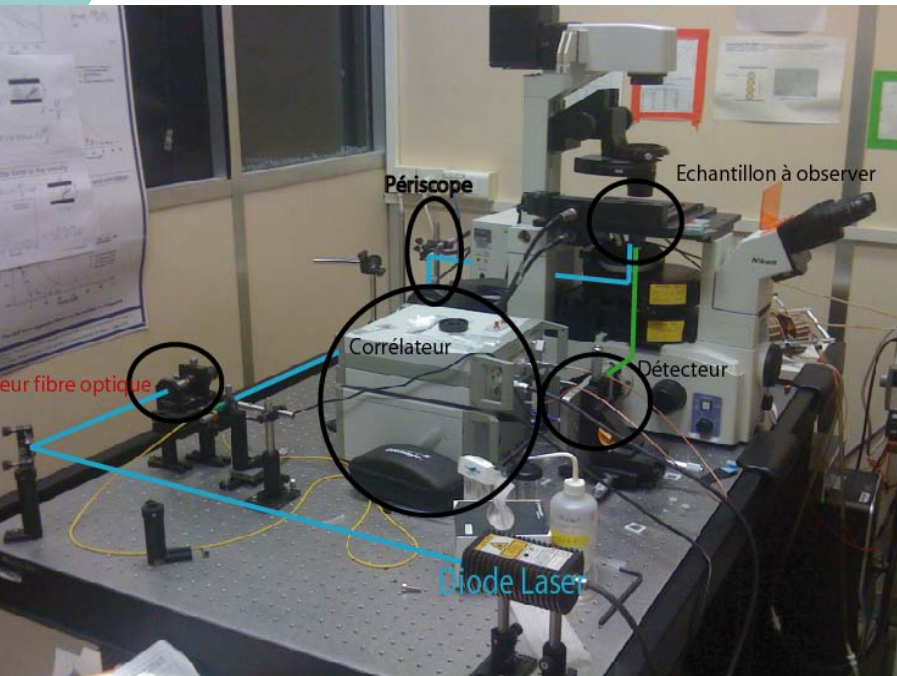
Bicouche lipidique en microscopie de fluorescence

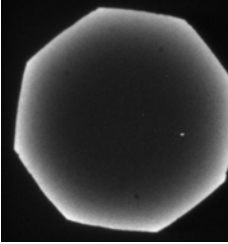
Bicouches lipidiques supportées :



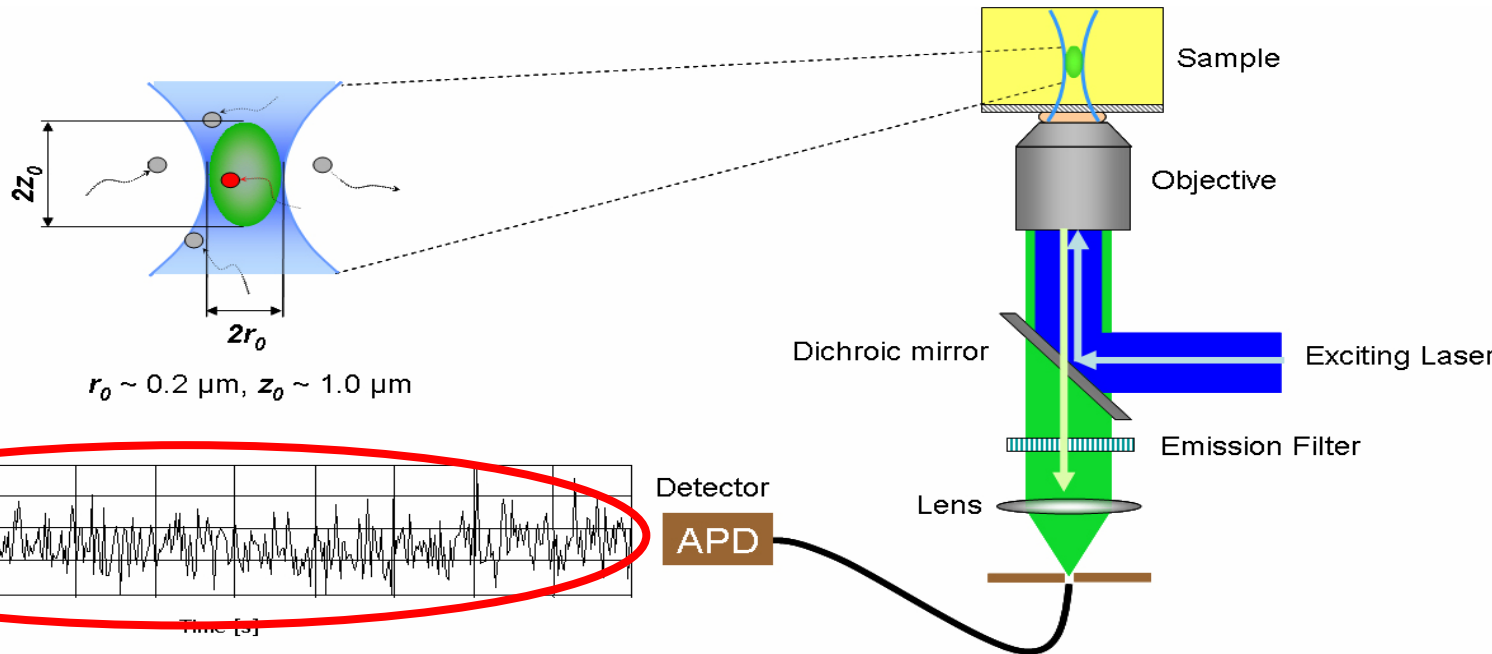
Caractérisation quantitative en Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)

-méthode optique sur des échantillons où diffusent des fluorophores.



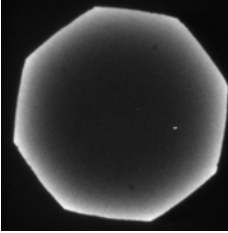


Caractérisation en Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)

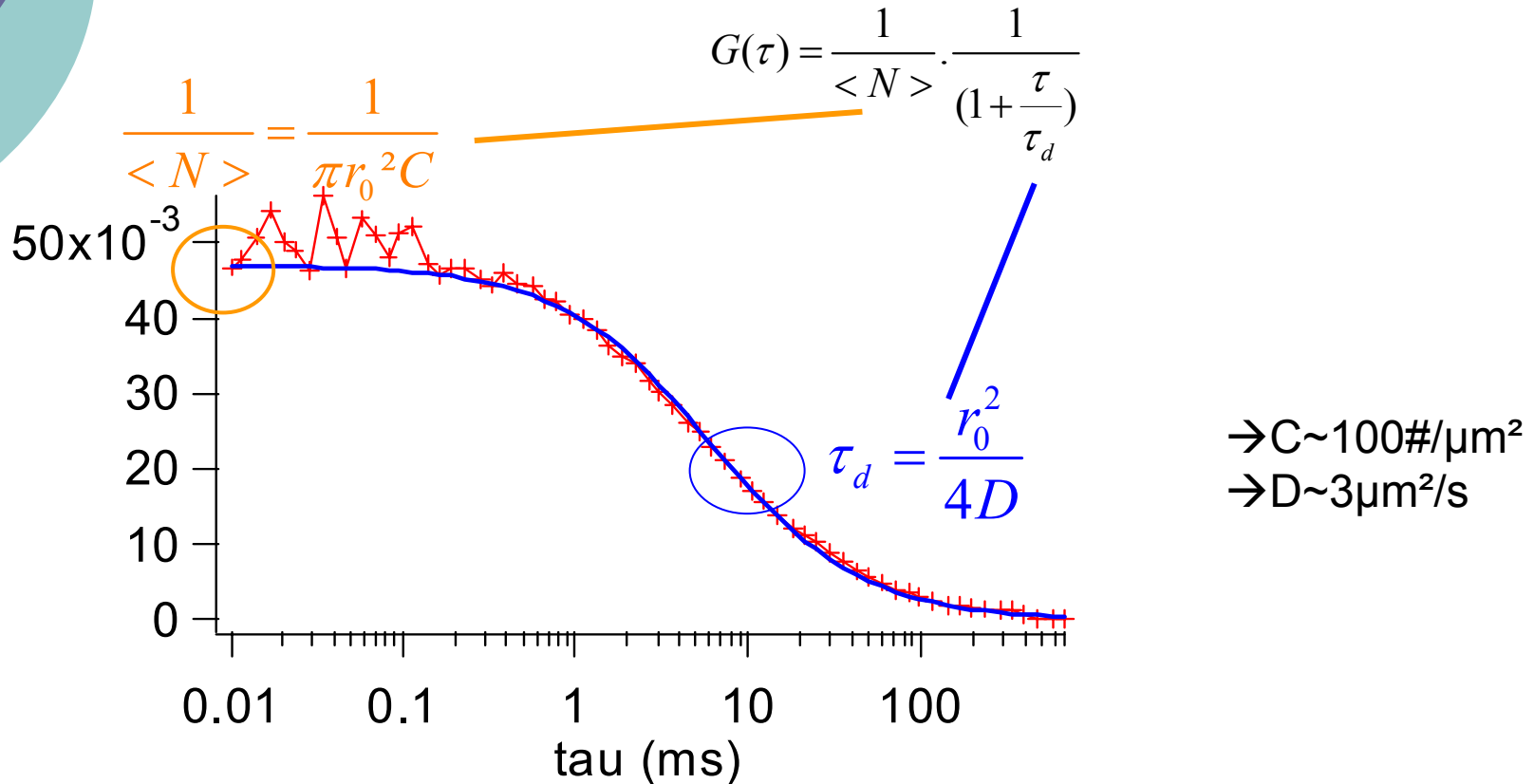


- Fluctuations autour d'une valeur moyenne → concentration en fluorophores.
- Temps caractéristique des fluctuations → coefficient de diffusion des fluorophores.
- On calcule la fonction de corrélation des fluctuations de fluorescence

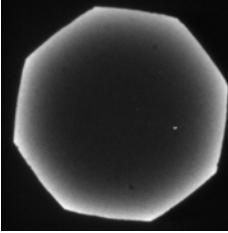
Bicouches lipidiques supportées :



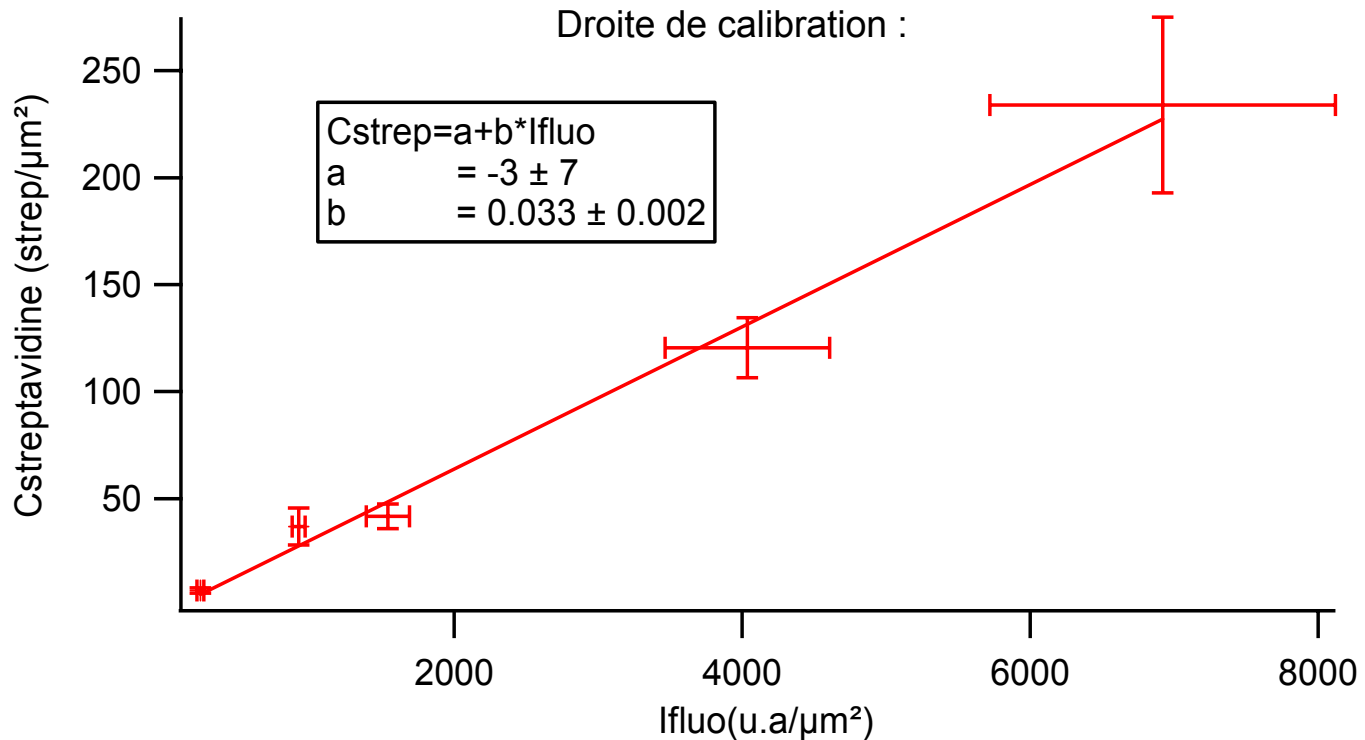
Fonction de corrélation pour des bicouches lipidiques supportées.



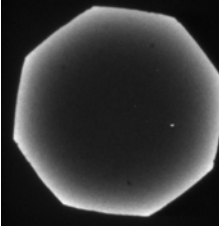
Bicouches lipidiques supportées :



Calibration de la fluorescence des streptavidines sur les bicouches supportées



On peut comparer l'intensité de fluorescence sur les bicouches à la concentration surfacique en fluorophores.

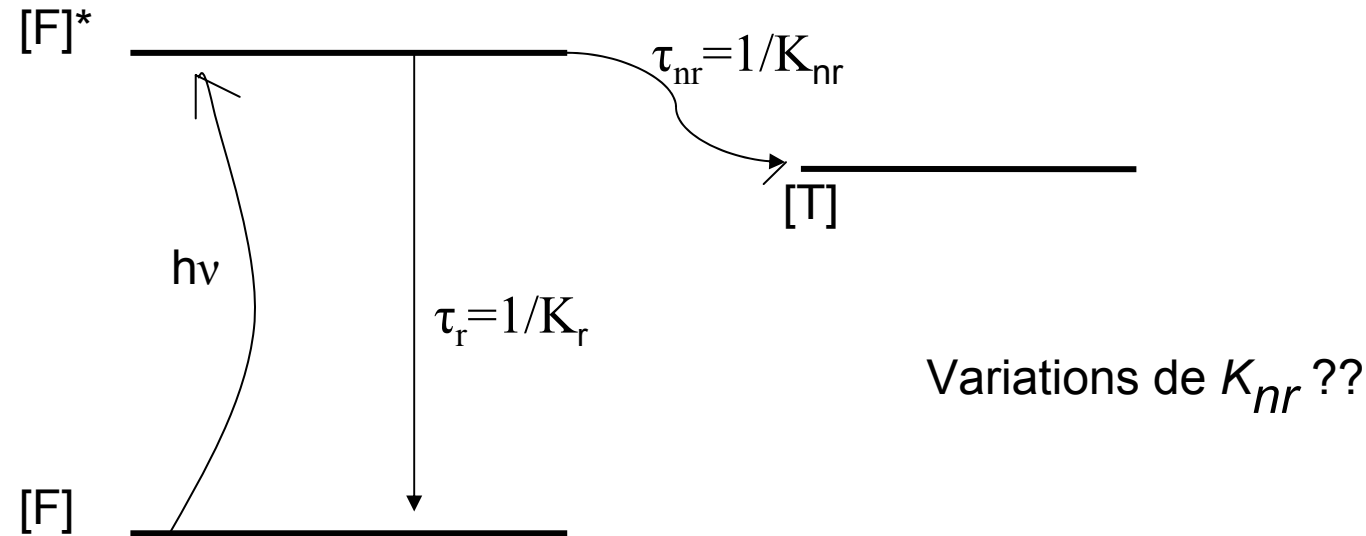


Bicouches lipidiques supportées :

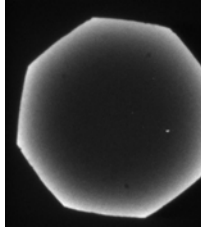
Extrapolation aux hautes concentrations est elle valide?

- Calibration en FCS à de faibles concentrations.
- Densité dans les patches adhésifs plus élevée
- Variation du rendement quantique

$$\Phi = \frac{K_r}{K_r + K_{nr}} \quad ?$$



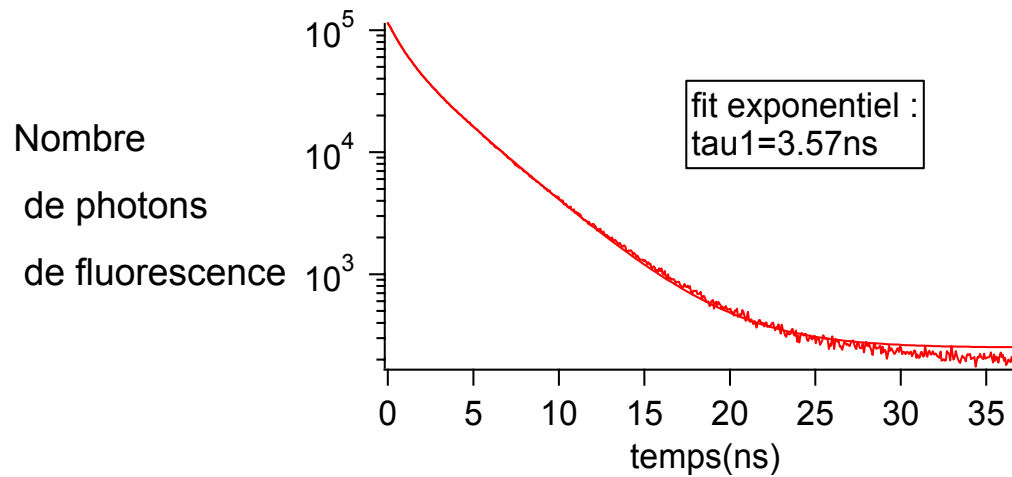
Bicouches lipidiques supportées :



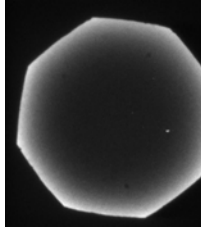
Quantification de la fluorescence : extrapolation aux hautes concentrations :

• Mesures de temps de vie :

○ Loi temporelle de fluorescence : $e^{-\frac{t}{\tau}} \longrightarrow \tau = \frac{1}{K_r + K_{nr}}$



Streptavidine 488 en volume.



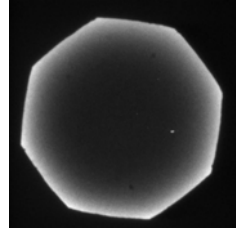
Bicouches lipidiques supportées :

Quantification de la fluorescence : extrapolation aux hautes concentrations:

- Mesures de temps de vie de la strep Alexa 488: $\tau = \frac{1}{K_r + K_{nr}}$

milieu	Concentration	Temps de vie
En volume	50 strep/ μm^3	3.6 ns +/- 0.2 ns
Sur une bicouche supportée	50 strep/ μm^2	2.9 ns +/- 0.2 ns
Dans un patch adhésif	2000 strep/ μm^2	3ns +/-0.2ns

→ Intensité de fluorescence n'est pas modifiée aux hautes concentrations dans les patches adhésifs.



Conclusion sur les bicouches:

- o homogènes et fluides sur de vastes surface ($\sim 1\text{cm}^2$).
- o on peut choisir la teneur en lipides biotinilés.
- o Calibration absolue de la concentration en streptavidine et de la diffusion

Plan de l'exposé

Adhésion spécifique entre surface fluides et déformables:

Adhésion spécifique entre surfaces fluides et déformables

Equilibre : Modèles thermodynamiques

Adhésion spécifique de vésicules : cinétique et équilibre

Matériaux et caractérisation :

Gouttelettes d'émulsion fonctionnalisées

Bicouches lipidiques supportées

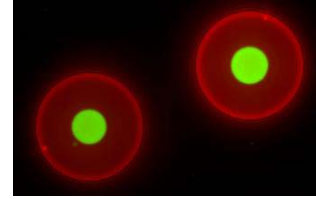
Résultats sur notre système d'adhésion spécifique

Cinétique

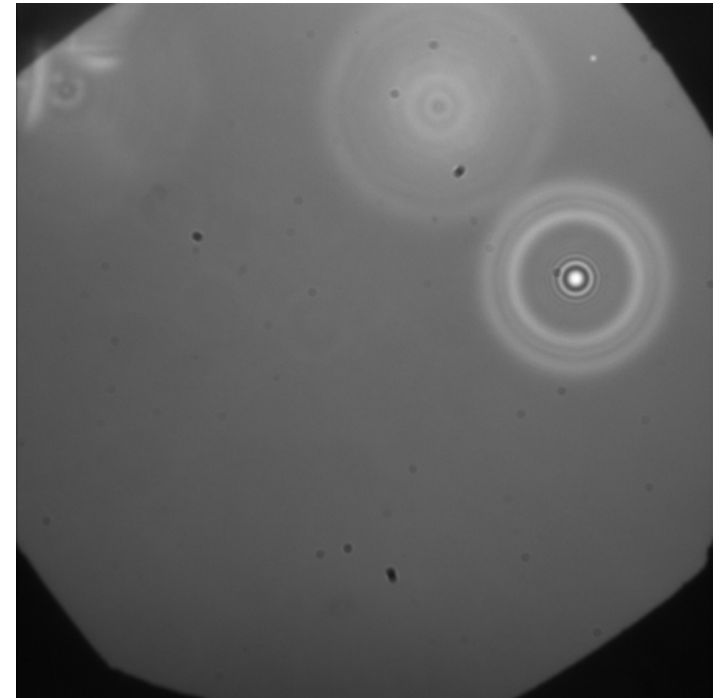
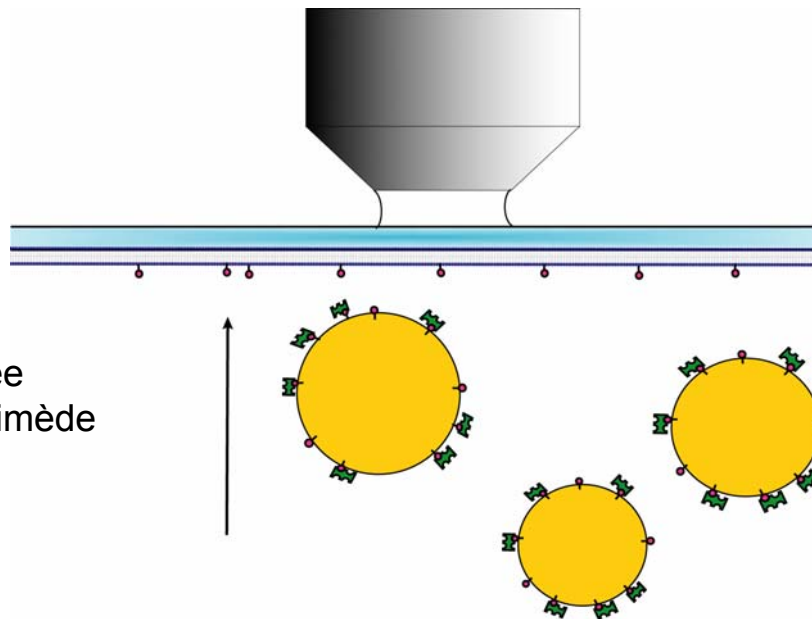
Equilibre

Expériences d'adhésion spécifique des gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées :

Cinétique d'adhésion des gouttelettes :

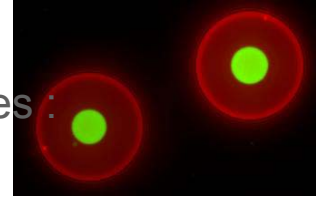


Observation de l'adhésion des gouttes (microscopie interférentielle)



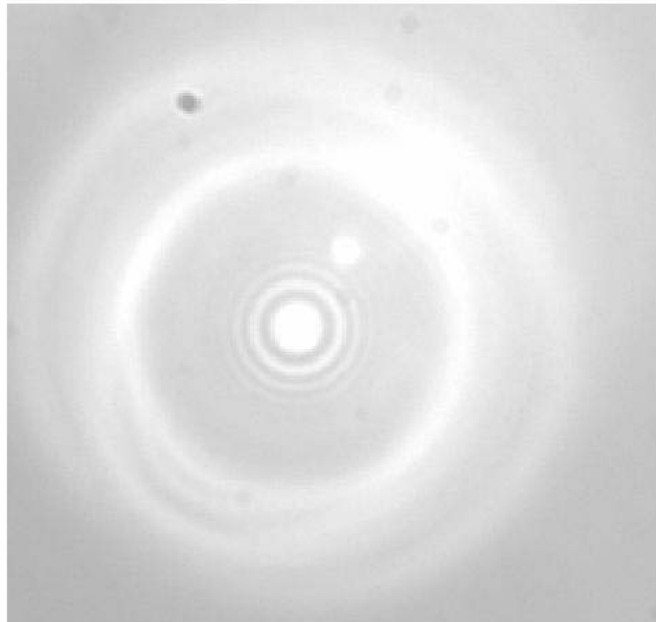
Poussée
d'Archimède

Expériences d'adhésion spécifique
des gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées :

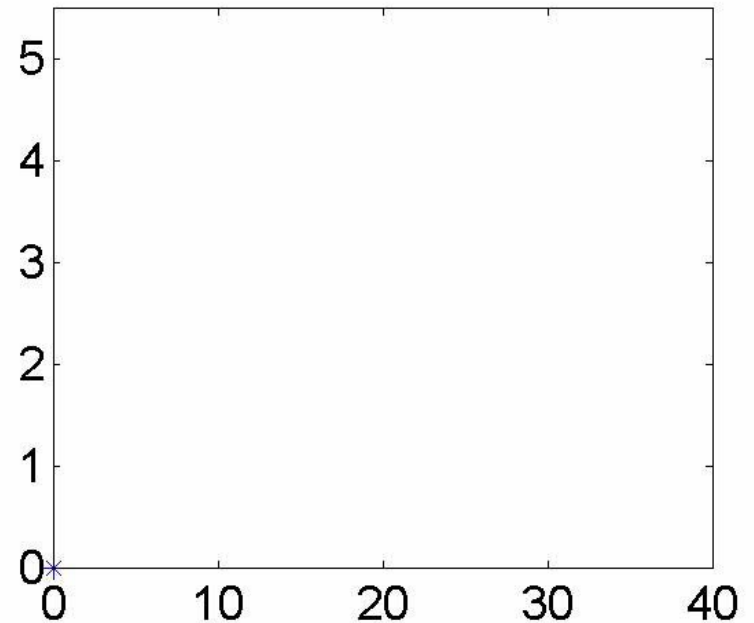


Cinétique d'adhésion des gouttelettes :

Evolution du diamètre du patch adhésif au cours du temps :

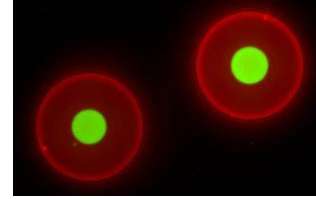


d_{patch} (μm)



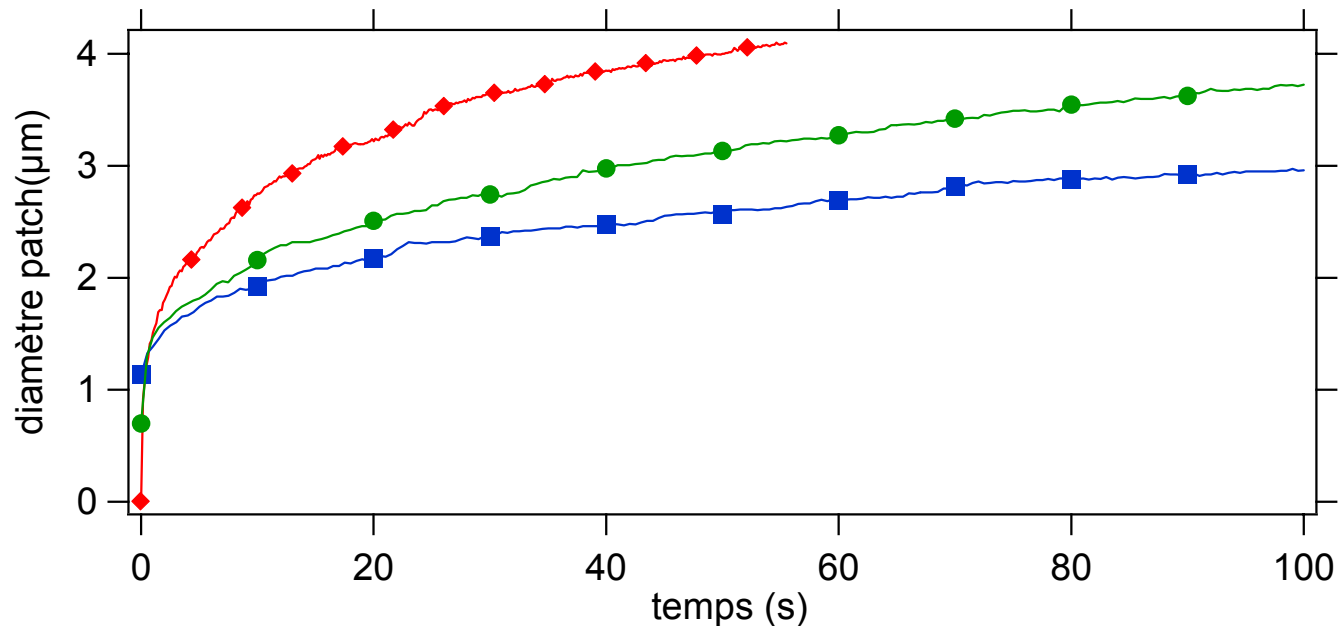
Temps (s)

Expériences d'adhésion spécifique
des gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées :



Cinétique d'adhésion des gouttelettes :

Effet des concentrations initiales en ligands

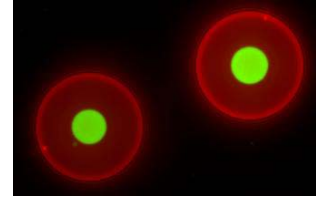


- ◆ strep 350#/μm²
- strep 200#/μm²
- strep 70#/μm²

Rayon des gouttes 18μm

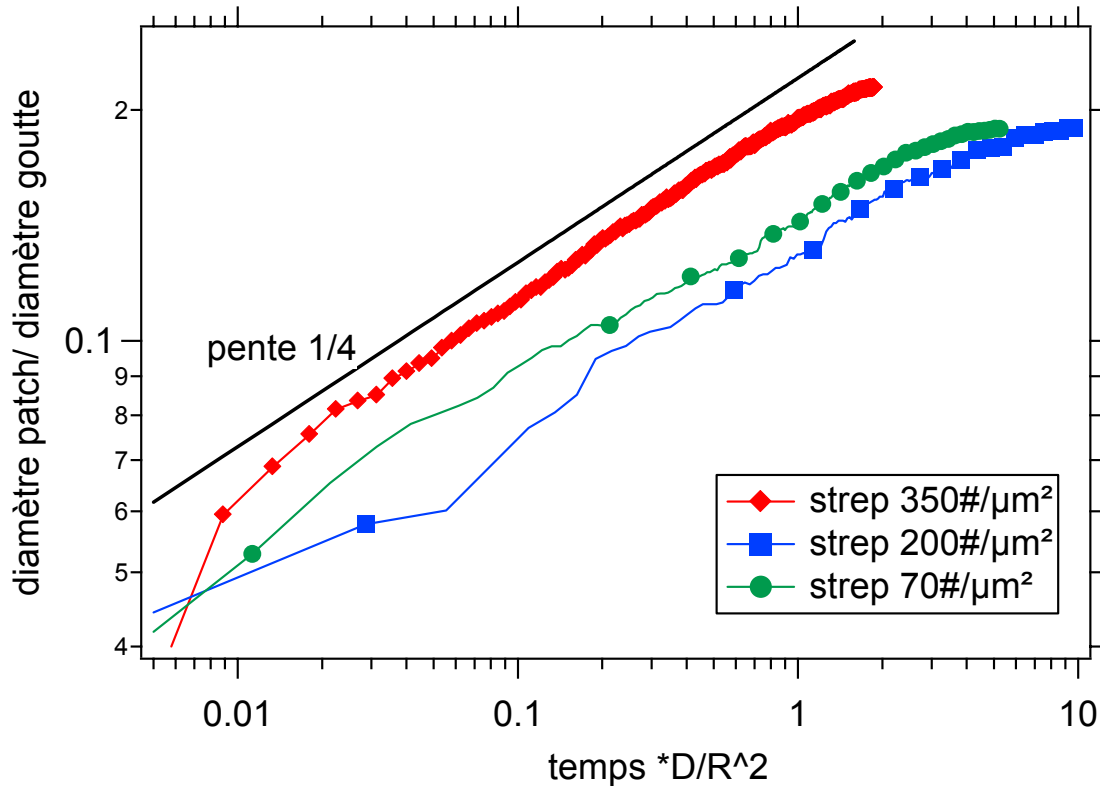
[biotine]=1000/μm²

Expériences d'adhésion spécifique
des gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées :



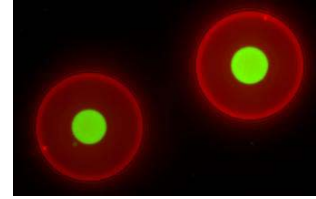
Cinétique d'adhésion des gouttelettes :

Tracé log-log



Quand $t < D/R^2$, loi de puissance 1/4

Expériences d'adhésion spécifique
des gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées :



Cinétique d'adhésion des gouttelettes :

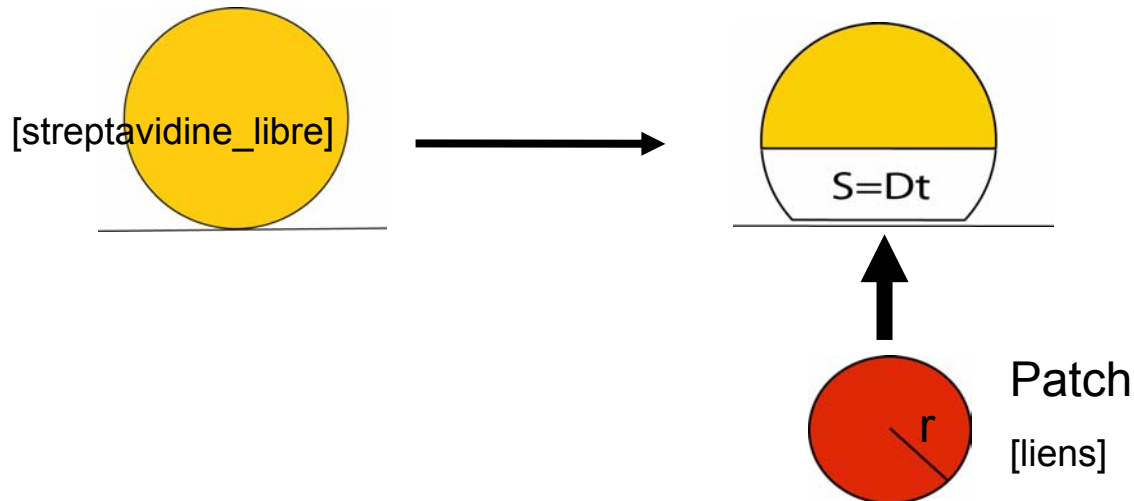
Cinétique d'adhésion des gouttelettes

Croissance limitée par la diffusion des ligands

(Modèle Brochart-Wyart et al. PNAS 2002)

→ conservation de la matière

$$[\textit{liens}] * \pi r^2 = [\textit{streptavidine_libre}] * Dt$$



Expériences d'adhésion spécifique
des gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées :



Cinétique d'adhésion des gouttelettes :

Croissance limitée par la diffusion + croissance quasi-statique

(Modèle Brochart-Wyart et al. PNAS 2002)

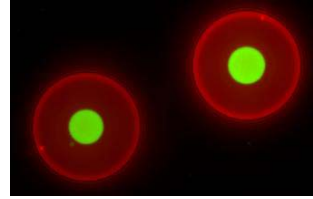
-conservation de la matière $[liens] * \pi r^2 = [streptavidine_libre] * Dt$

-[liens] varie au cours du temps.

-équilibre quasistatique → concentration en liens dans le patch en équilibre avec la déformation de la goutte.

$$kT [liens] = \gamma(1 - \cos \theta) \sim \gamma \frac{\theta^2}{2}$$

Expériences d'adhésion spécifique
des gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées :



Cinétique d'adhésion des gouttelettes :

Croissance limitée par la diffusion + croissance quasi-statique

(Modèle Brochart-Wyart et al. PNAS 2002)

Conservation de la matière + Equilibre quasistatique

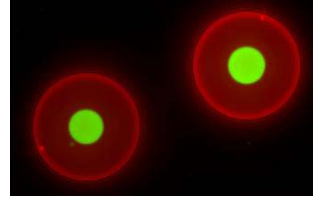
$$[\textit{liens}] * \pi r^2 = [\textit{streptavidine_libre}] * Dt$$

$$kT[\textit{liens}] = \gamma(1 - \cos \theta) \sim \gamma \frac{\theta^2}{2}$$

Avec $r^2 \sim (R_{\textit{goutte}} \theta)^2$, on obtient finalement :

$$\text{Soit, } r \propto t^{\frac{1}{4}}$$

Expériences d'adhésion spécifique
des gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées :



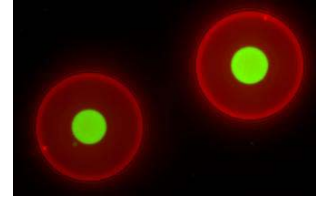
Cinétique d'adhésion des gouttelettes :

-la cinétique d'étalement est donnée par le temps de diffusion des protéines vers la contact.

-en 20 minutes, l'équilibre est atteint.

→ Mesures à l'équilibre

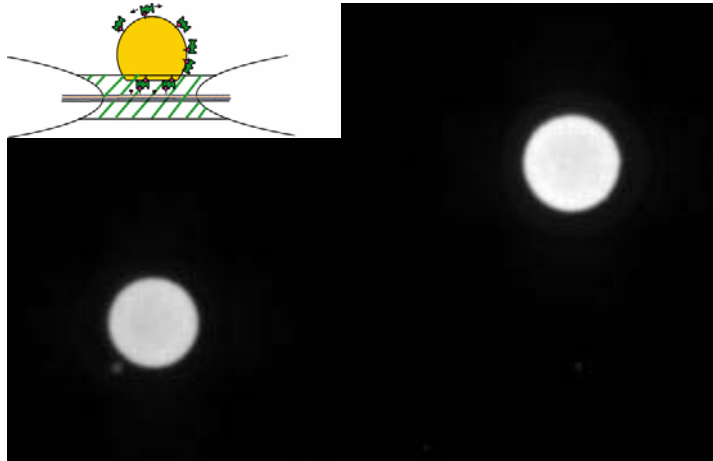
Expériences d'adhésion spécifique
des gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées :



Mesures à l'équilibre

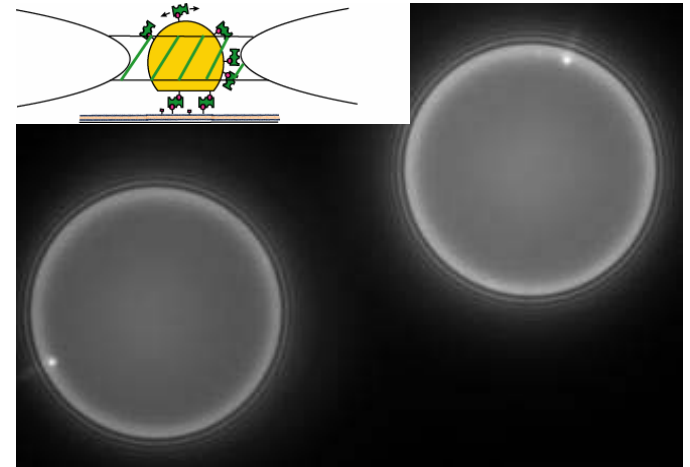
Mesures quantitatives

Focalisation dans le plan
de la zone de contact



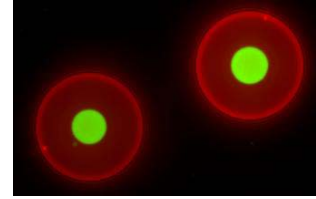
- rayon du patch.
- densité de streptavidine dans le patch

Focalisation dans le plan
équatorial des gouttes.

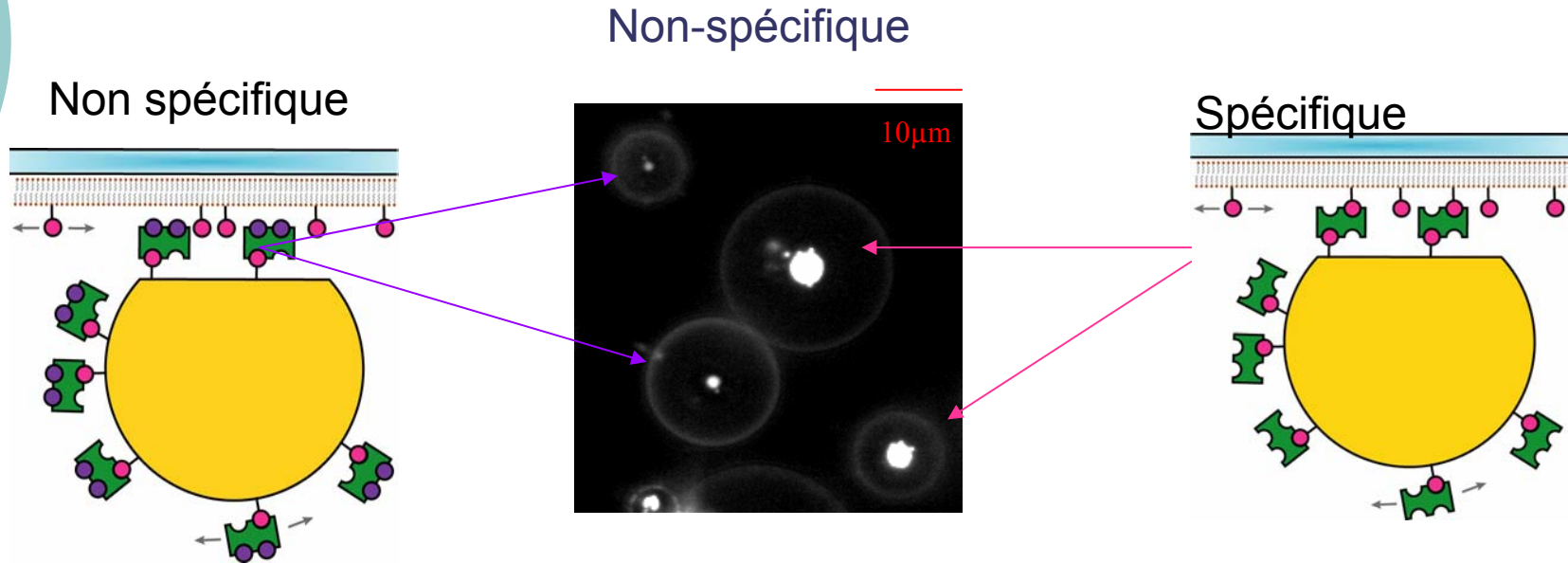


- rayon des gouttes.
- densité de streptavidine sur les gouttes
avant et après adhésion

Expériences d'adhésion spécifique
des gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées :



Mesures à l'équilibre

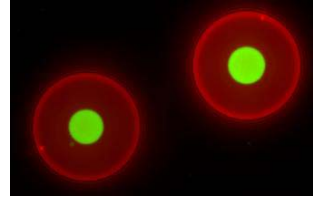


-faible déformation.

-faible densité de streptavidine dans le patch (~3 fois plus faible que pour le recrutement spécifique)

→ Effets observés majoritairement spécifiques.

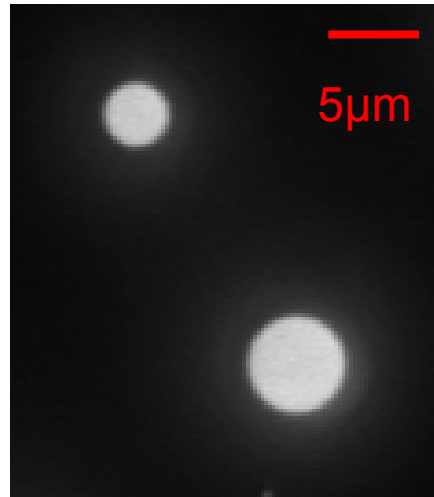
Expériences d'adhésion spécifique
des gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées :



Mesures à l'équilibre

Patches d'adhésion spécifique : mobilité dans le patch :

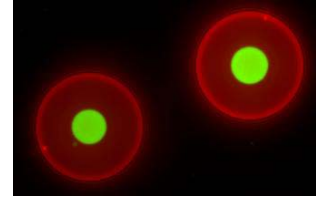
•expérience de FRAP



- Temps réel (Recouvrement en ~ 20 s)
- D_{patch} varie entre $0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $1.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

-Les liens diffusent dans le patch.

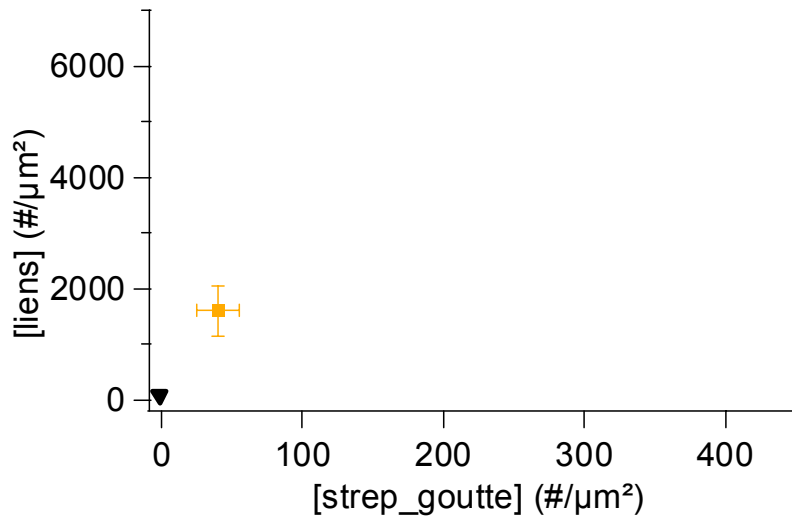
Expériences d'adhésion spécifique
des gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées :



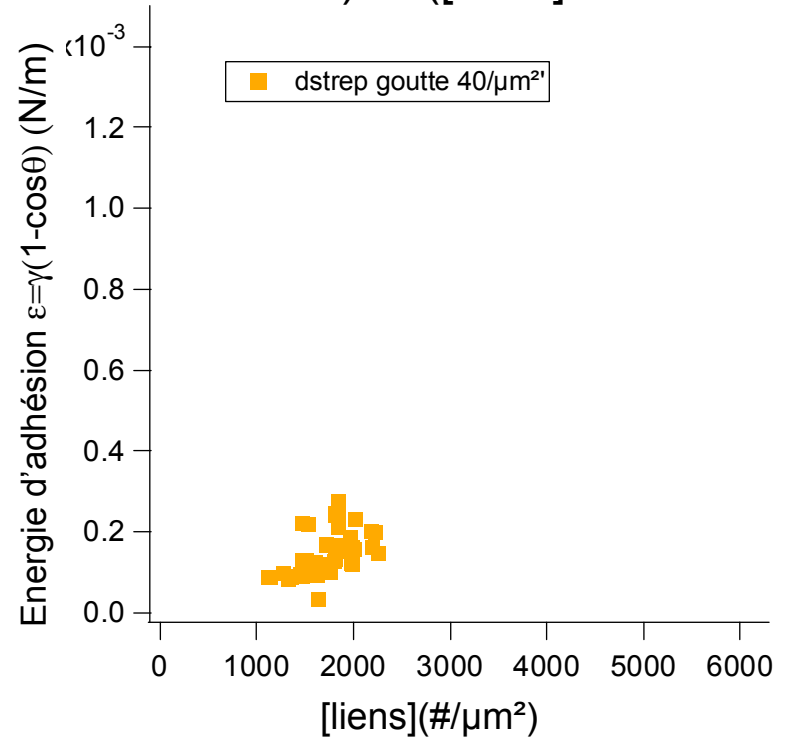
Mesures à l'équilibre

Réaction ligand/récepteur :

$$[\text{liens}] = f[\text{strep initiale_gouttes}]$$

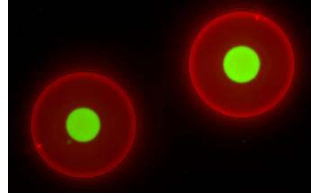


Pression d'étalement (=Energie
d'adhésion) = $f([\text{liens}]$



$$[\text{biotine_bicouche}] = \text{Constante} \sim 1000/\mu\text{m}^2$$

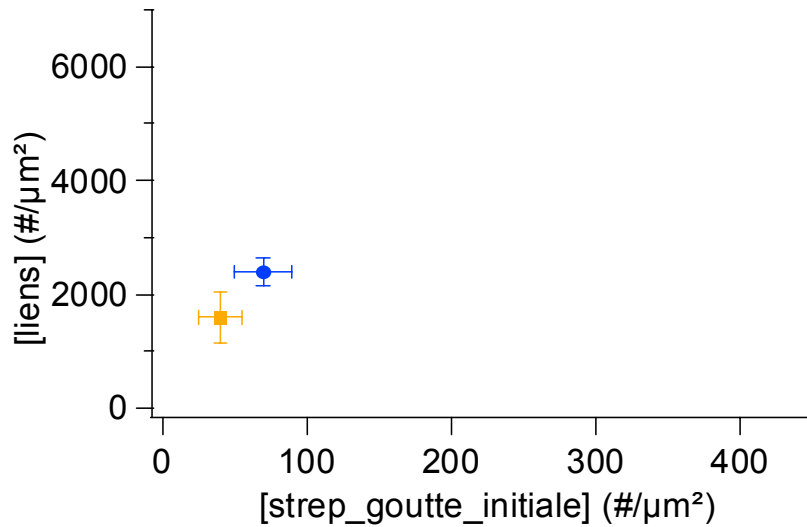
Expériences d'adhésion spécifique
des gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées :



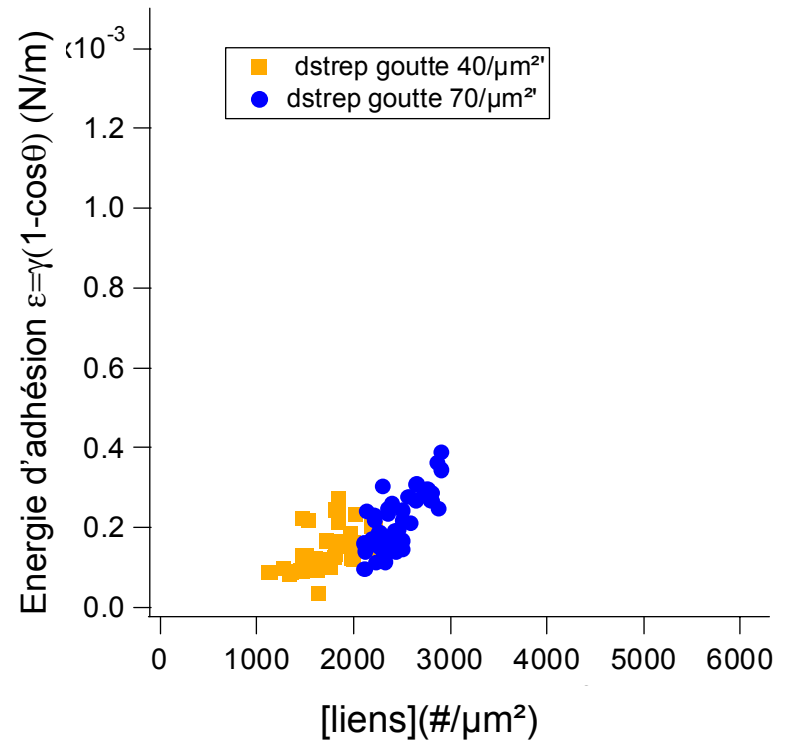
Mesures à l'équilibre

Réaction ligand/récepteur :

$$[\text{liens}] = f[\text{strep initiale_gouttes}]$$

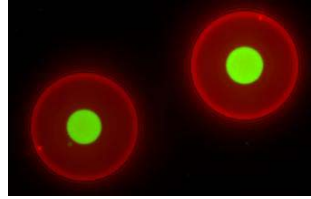


Pression d'étalement (=Energie d'adhésion) = $f([\text{liens}]$



$$[\text{biotine_bicouche}] = \text{Constante} \sim 1000/\mu\text{m}^2$$

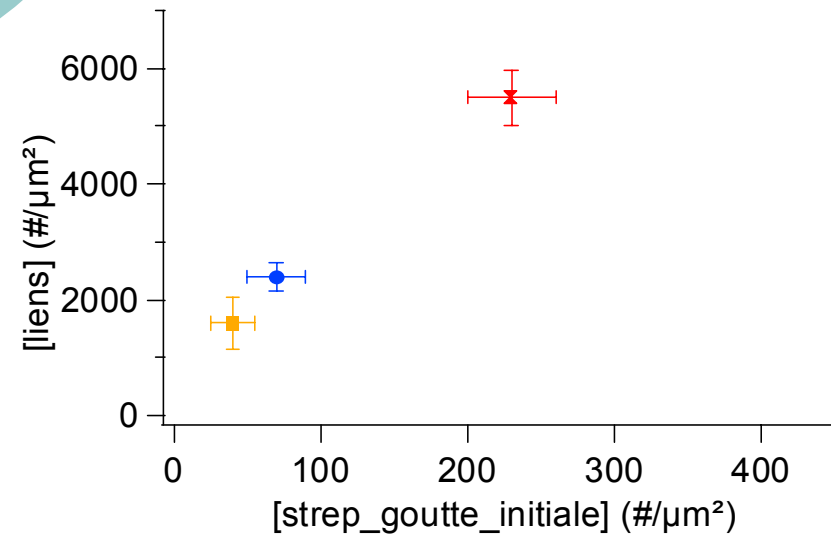
Expériences d'adhésion spécifique
des gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées :



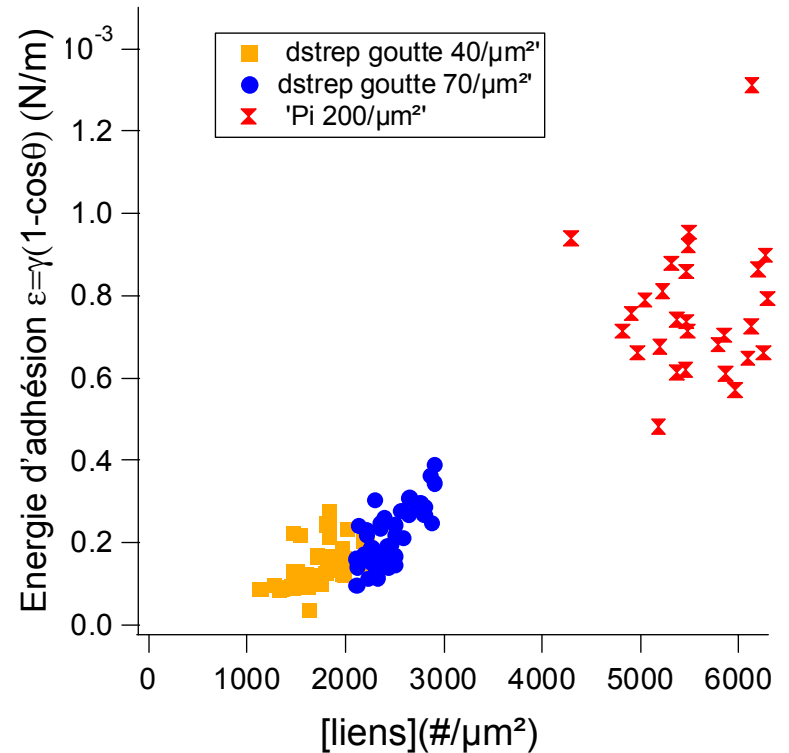
Mesures à l'équilibre

Réaction ligand/récepteur :

$$[\text{liens}] = f[\text{strep initiale_gouttes}]$$

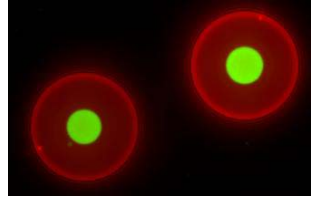


Pression d'étalement (=Energie d'adhésion) = $f([\text{liens}]$



$$[\text{biotine_bicouche}] = \text{Constante} \sim 1000/\mu\text{m}^2$$

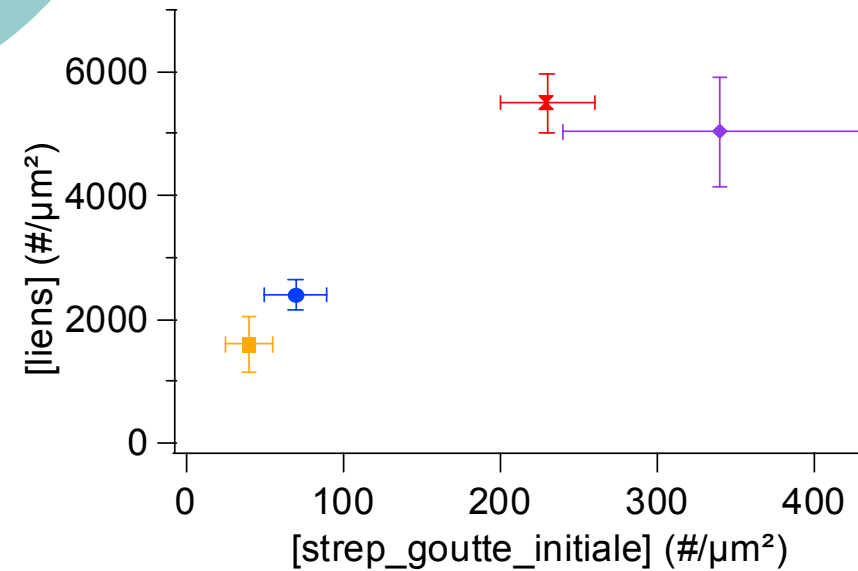
Expériences d'adhésion spécifique
des gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées :



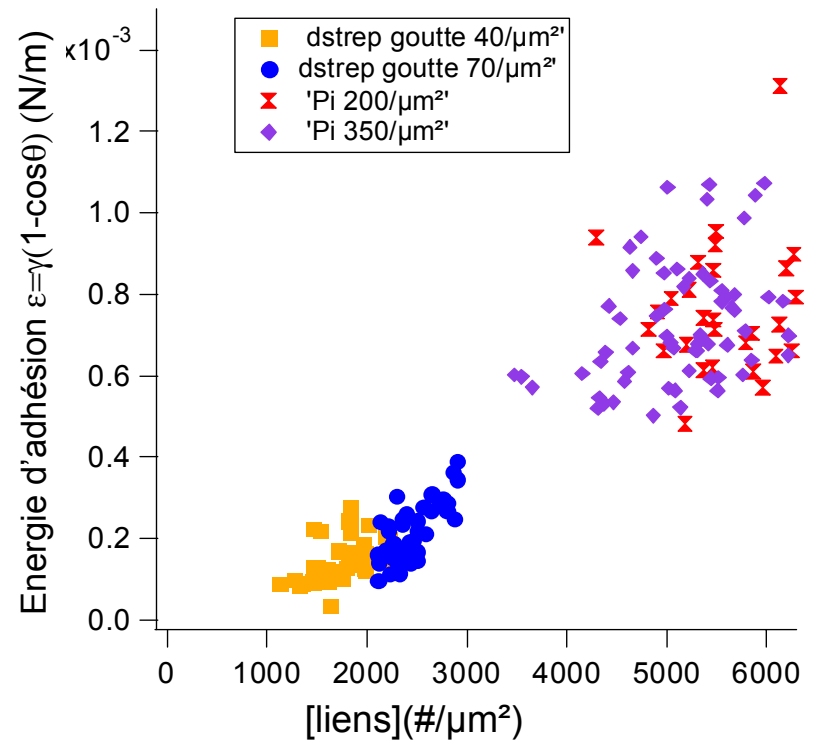
Mesures à l'équilibre

Réaction ligand/récepteur :

$$[\text{liens}] = f[\text{strep initiale_gouttes}]$$

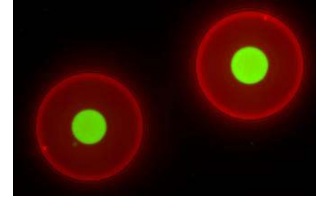


Pression d'étalement (=Energie d'adhésion) = $f([\text{liens}]$



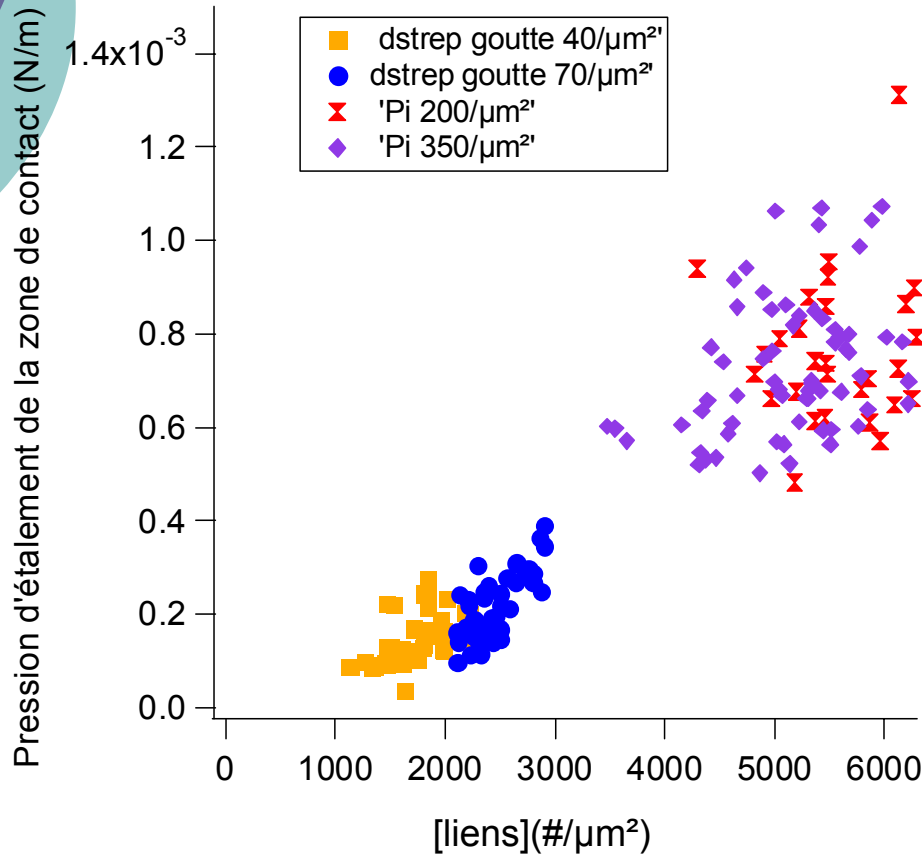
$$[\text{biotine_bicouche}] = \text{Constante} \sim 1000/\mu\text{m}^2$$

Expériences d'adhésion spécifique des gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées :



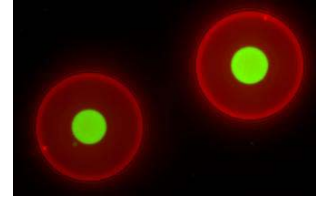
Mesures à l'équilibre

Mesure expérimentale de la pression dans la zone de contact



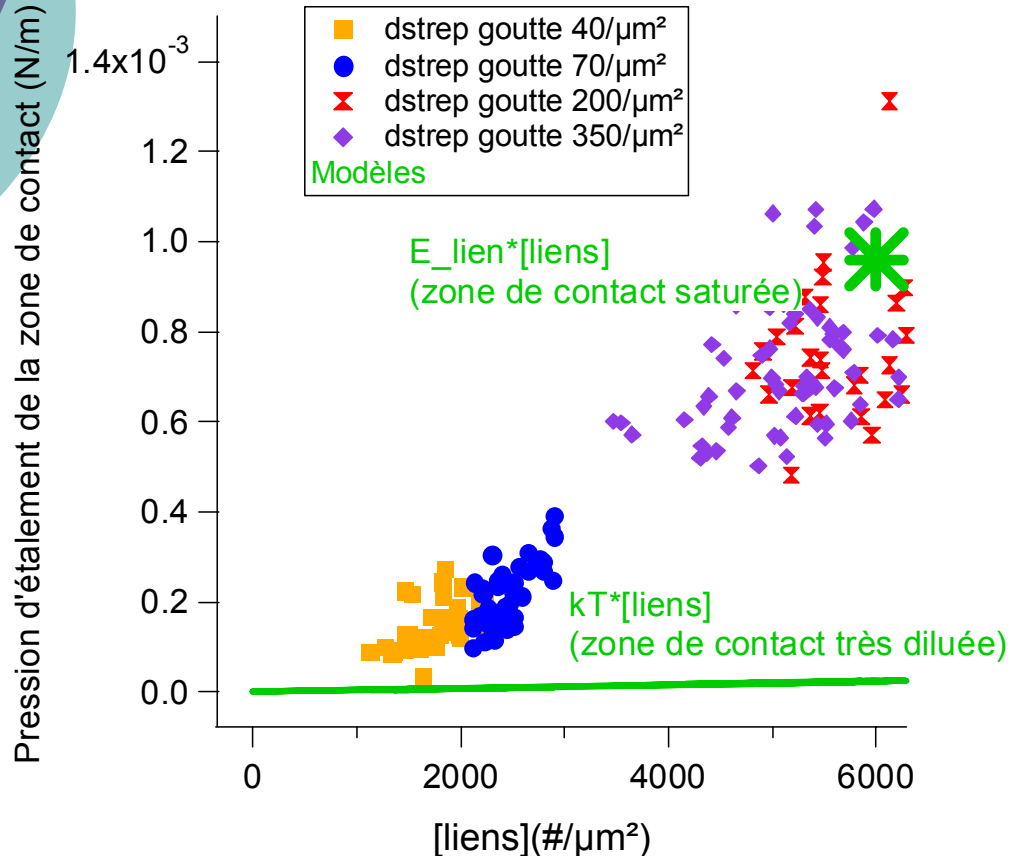
o Energie d'adhésion $\varepsilon = \gamma(1 - \cos\theta) = \Delta\Pi$
→ Pression d'étalement(N/m)

o [liens] augmente → pression
augmente



Mesures à l'équilibre

Mesure expérimentale de la pression dans la zone de contact



o Energie d'adhésion $\varepsilon = \gamma(1 - \cos\theta) = \Pi$

→ Pression d'étalement (N/m)
o [liens] augmente → pression augmente

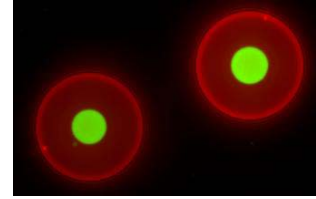
o on retrouve les limites connues :

→ Saturation en liens :

$$\Pi = E_{lien} * [liens_saturation]$$

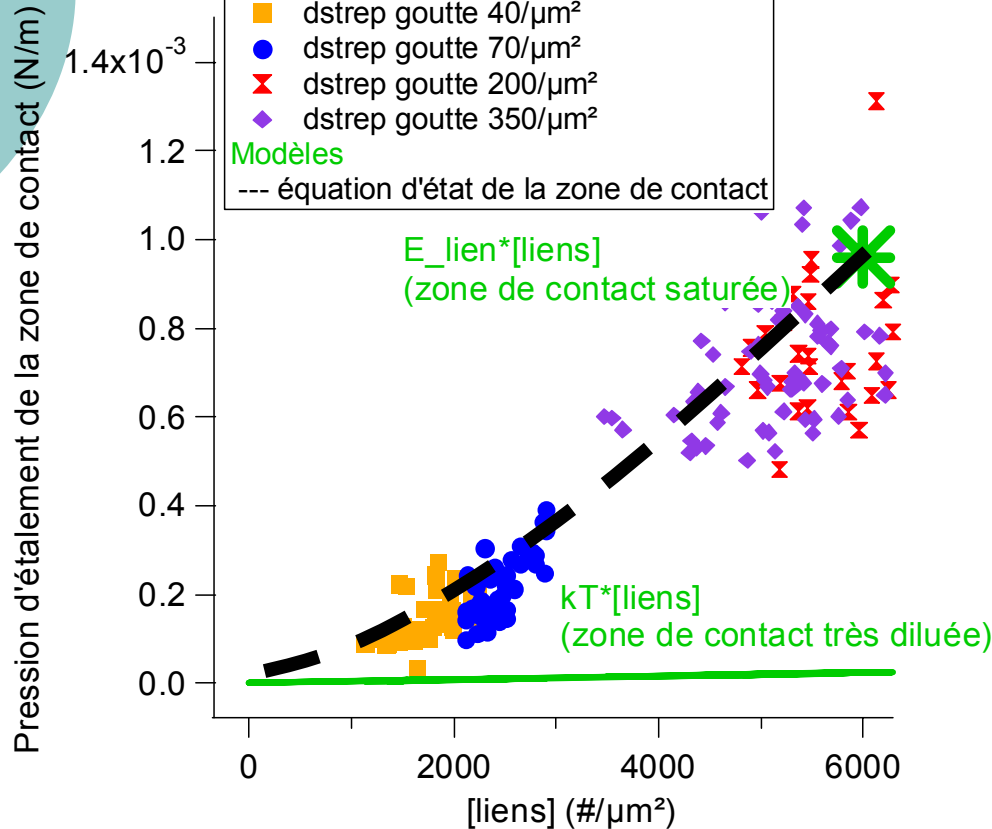
→ Zone de contact diluée :

$$\Pi = kT * [liens]$$



Mesures à l'équilibre

Mesure expérimentale de la pression dans la zone de contact



o Energie d'adhésion $\varepsilon = \gamma(1 - \cos\theta) = \Delta\Pi$
→ Pression d'étalement (N/m)

o [liens] augmente → pression augmente

o on retrouve les limites connues :

→ Saturation en liens :

$$\Pi = E_{lien} * [liens_saturation]$$

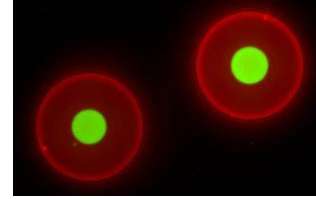
→ Zone de contact diluée :

$$\Pi = kT * [liens]$$

→ On a accès à l'équation
d'état de la zone de contact :

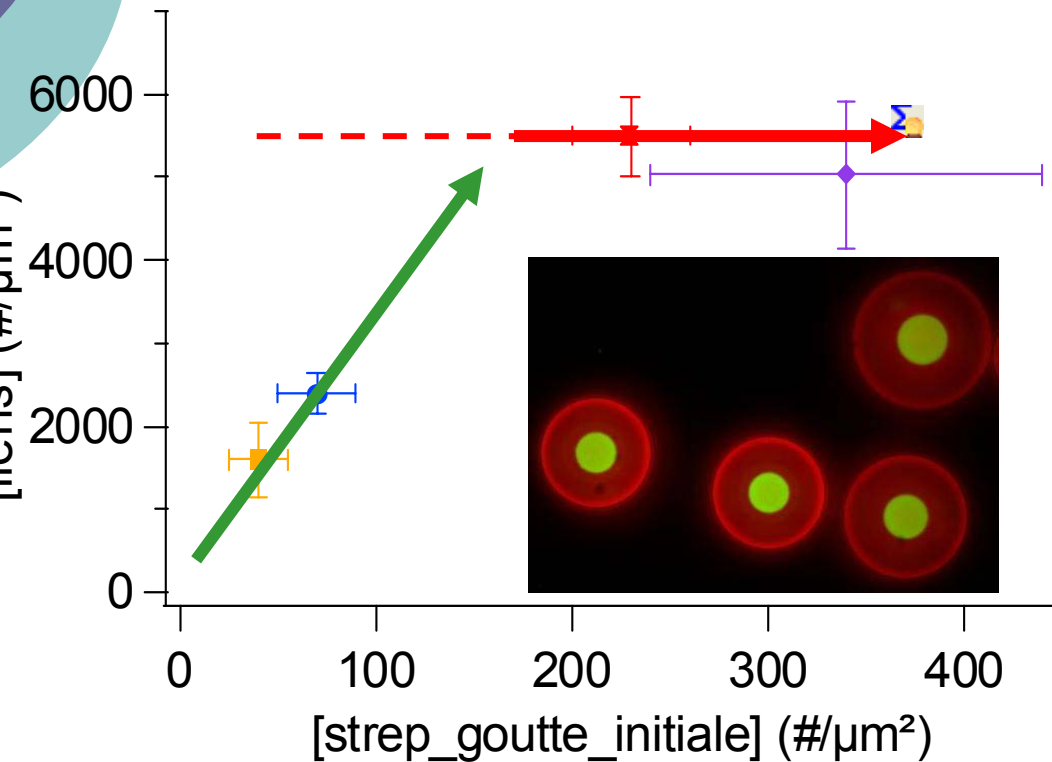
$$\Pi = f([liens]).$$

Expériences d'adhésion spécifique
des gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées :



Mesures à l'équilibre

Réaction ligand/récepteur : $[\text{liens}] = f[\text{strep initiale_gouttes}]$



o 2 zones :

o augmentation $[\text{liens}] / \text{saturation} [\text{liens}]$

o $[\text{lien}]_{\text{saturation}} \sim 5500 \#/\mu\text{m}^2$

→ Aire/liens $\sim 200 \text{ nm}^2$

(Close packing : Aire/strep $\sim 25 \text{ nm}^2$).

o Constante de réaction :

$K \sim \exp(-E/kT) \rightarrow E \sim 5kT$

→ Réaction peu avancée,

il reste des strep sur les gouttes.

Conclusion :

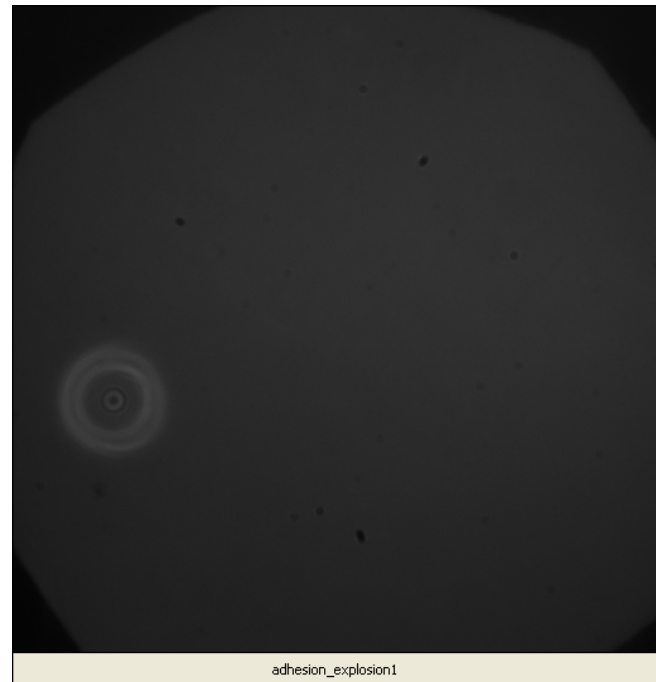
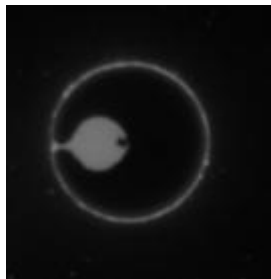
- Système modèle d'adhésion spécifique bien quantifié.
- Cinétique d'adhésion liée au temps nécessaire pour diffuser dans le patch.
- Il faut comprimer les protéines pour les faire entrer dans le patch.
- Mise en place d'une expérience permettant de mesurer la pression dans la zone de contact.
- La réaction entre ligand et récepteur dans le patch est fortement affectée par la pression dans la zone de contact.

Perspectives :

- Modèle plus précis.
- nouvelle formulation pour explorer différents couples ligands/récepteurs.
- Etude de la fusion de gouttelettes.

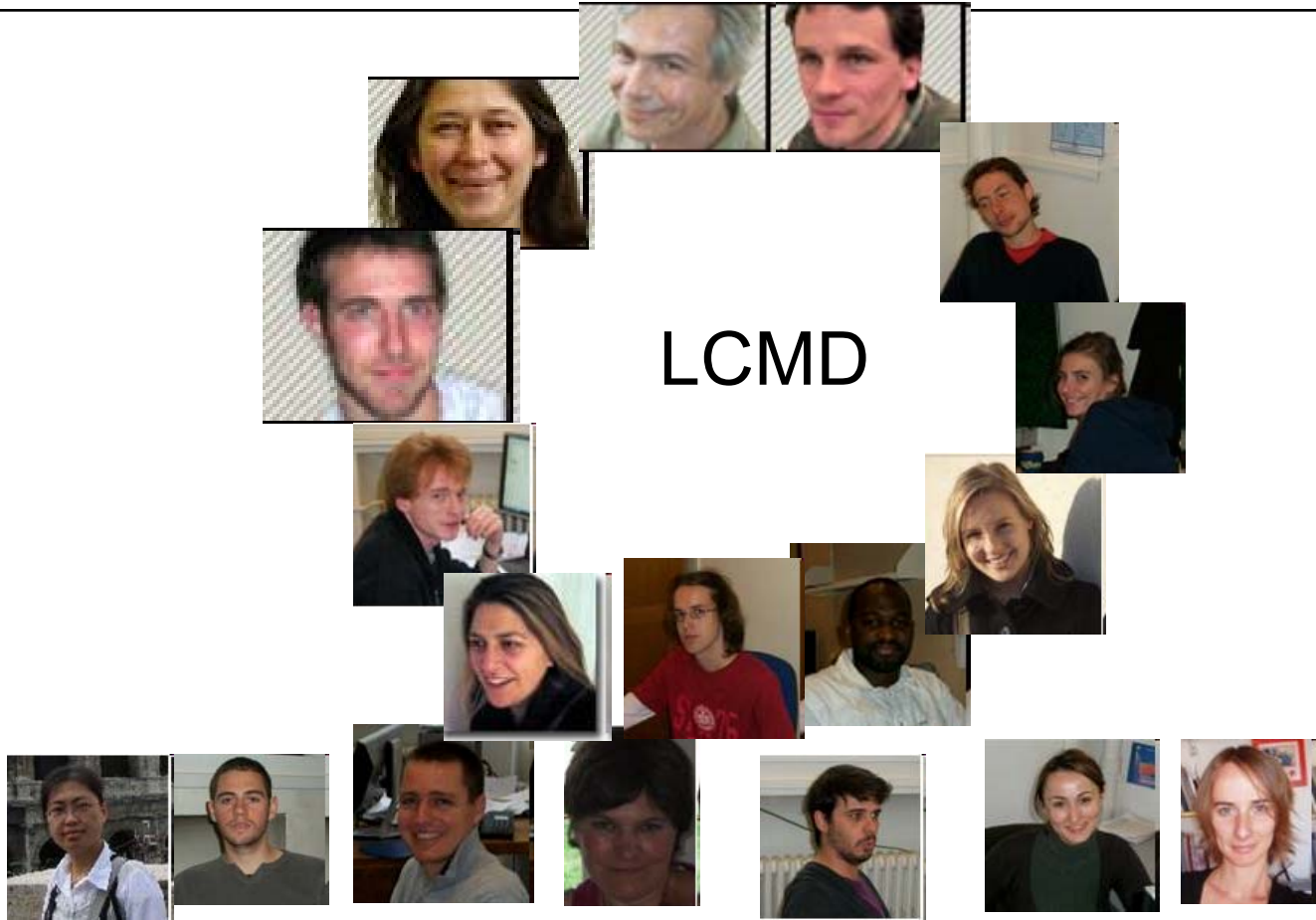


Patches après la fusion des gouttes lors de l'adhésion



Film en microscopie interférentielle de gouttes fusionnant lors de l'adhésion

Remerciements

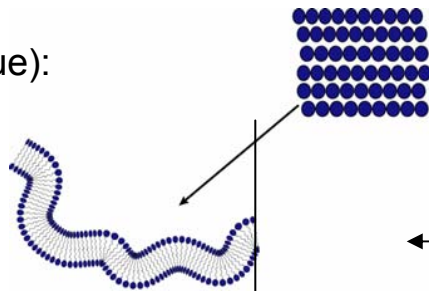


+Famille, amis!

Adhésion entre surfaces fluides

- Système expérimental de référence : vésicules unilamellaires.

Régime 'fluctuant' (entropique):



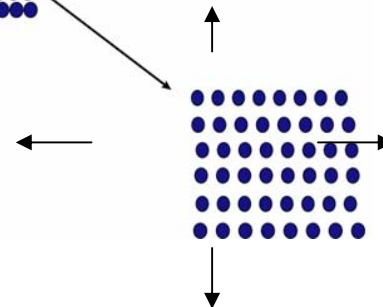
- Module de courbure κ

$$\kappa \sim 20kT$$

- Tension de surface : $\gamma \propto e^{-\frac{\kappa^* \Delta A}{A_0}}$

$$\gamma < 0.1 \text{ mN/m}$$

Régime 'tendu' :



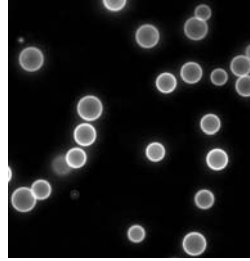
- Module de dilatation élastique K_a

$$K_a \sim 100 \text{ mN/m}$$

- Tension de surface : $\gamma = K_a \frac{\Delta A}{A_0}$

$$0.1 \text{ mN/m} < \gamma < \gamma_{rupture} \sim 20 \text{ mN/m}$$

Réactivité à deux dimensions :
protéines contraintes de diffuser sur des
surfaces.



Tension de surface constante.

Mesure de la tension de surface des gouttelettes :

Technique de la goutte
pendante (N.Bremond)



Tampon de travail pour l'adhésion spécifique :

$$\gamma \sim 12 \text{ mN} / \text{m} + / - 4 \text{ mN} / \text{m}$$