

# Utilisation de gouttelettes d'émulsion pour l'étude de l'adhésion spécifique entre deux surfaces fluides

Jean-Daniel Emerard

▶ **To cite this version:**

Jean-Daniel Emerard. Utilisation de gouttelettes d'émulsion pour l'étude de l'adhésion spécifique entre deux surfaces fluides. Chimie analytique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2010. Français. NNT : . pastel-00554288

**HAL Id: pastel-00554288**

**https://pastel.hal.science/pastel-00554288**

Submitted on 10 Jan 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE**
**L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Ecole doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris Centre

Spécialité
Matière condensée : Chimie et organisation.

Présentée par

M. Jean-Daniel Emerard

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse :

# Utilisation de gouttelettes d'émulsion pour l'étude de l'adhésion spécifique entre deux surfaces fluides.

soutenue le 5 Novembre 2010

devant le jury composé de :

| | |
|---|---|
| Mme. Françoise Brochard-Wyart | Présidente du Jury |
| M. Jérôme Bibette | Directeur de thèse |
| M. Jean Baudry | Co-directeur de thèse |
| M. Carlos Marques | Rapporteur |
| M. Philippe Poulin | Rapporteur |
| Mme Annie Viallat | Examinateur |

*A grand-maman, à Yannick.*

# Remerciements :

Alors que les flocons tombent tranquillement en cette fin d'année 2010, quelques pensées rétroactives sur ces quatre années passées au laboratoire LCMD de l'ESPCI.
En janvier ou février 2007, je prenais place au sein du laboratoire pour mon stage de Master qui allait s'enchaîner sur trois années de thèse.
Le Lcmd est vraiment un laboratoire unique et très agréable, un savant mélange de passion, d'audace, de travail, de volonté, … de bien belles choses qui mises ensemble donnent ce Lcmd, petite structure dans laquelle les savoirs se côtoient, se confrontent, s'assemblent et avancent en bonne intelligence depuis l'observation déroutante et inconnue à la compréhension théorique claire, depuis l'expérience fondamentale à la possibilité industrielle. Le Lcmd est un laboratoire du futur où s'associent sans crainte la chimie, la physique et pourquoi pas la biologie. Qu'il est bon de travailler dans ce contexte curieux, Je ne sais pas encore si une telle dynamique peut s'appliquer à de plus gros ensembles mais c'est une façon de fonctionner vraiment très agréable et stimulante. Pourvu que ça dure.

Merci donc à Jérôme Bibette pour m'avoir accueilli au sein de ce beau laboratoire qu'est le Lcmd. Par ailleurs, je me souviendrai longtemps de cette veille de soutenance durant laquelle j'ai pu prendre conscience de ta sensibilité scientifique… et de ton sens du timing! Tracer l'équation d'état dans le film tombait vraiment à point! Merci.

Mes premières pensées vont ensuite à Jean Baudry. Si je suis venu au Lcmd, ce fut suite à un premier stage de trois mois sur la mesure du coefficient de diffusion en rotation de colloïdes sphériques sous ta direction. Ce stage fut bref mais m'a convaincu que ta sensibilité et ta pertinence aussi bien scientifique qu'humaine, ta disponibilité, ta confiance et ta patience étaient ce que je cherchais chez un directeur de thèse. Je suis venu au Lcmd pour cela et j'ai passé quatre années heureuses. Merci.

Merci bien sûr à tous les collègues de laboratoire, pour m'avoir supporté et aidé, en particulier mes compagnons de thèse, Julie, Laurent, Rachid et Fabien. Nous sommes entrés ensemble et sortons maintenant ensemble de ces trois ans, après avoir suivi des scenari tous bien différents. C'était complémentaire ! Une pensée, bien sûr, pour mes collègues de bureau, Coraline et Isabelle, puis Florence et Laryssa, merci d'avoir supporté ma présence pendant tout ce temps ! Enfin en espérant ne pas en oublier, merci aux autres, Audrey, Leslie, Qiao, Geneviève, Nicolas, Fernando, Damien, Denis, Donatien, Quentin, Jean-Yves, et les nombreux stagiaires!

Bien entendu, je remercie chaleureusement les membres du jury de ma thèse qui ont fait du 5 novembre 2010 une journée magnifique en particulier pour leur attention lors de la présentation et pour leur ouverture lors des questions. Cette soutenance fut un vrai plaisir grâce à vous. Merci à Françoise Brochard-Wyart, présidente du jury, Annie Viallat, examinatrice, Philippe Poulin et Carlos Marques, rapporteurs que je remercie par la même occasion pour leur rapport bien utiles, Jérôme et Jean déjà cités. Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'avoir évalué mon travail.

Sans ma famille et mes amis, j'aurais été bien seul pendant toutes ces années. Merci donc à mes parents et à mon frère, mon cercle proche pour leur soutien indéfectible et si fort. Merci à mes cousins, tantes et oncles bien sûr, toujours disponibles en cas de besoin.

Enfin, merci à mes amis, ce cercle si précieux avec qui j’ai passé un nombre incalculables de bons moments et qui a rendu les passages un peu houleux de cette thèse plus faciles à traverser. Là encore, pourvu que ça dure!

# Table des matières :

Introduction……1

Première partie : Bibliographie.

I- Interactions entre biomolécules : les protéines d'adhésion…… 4

I-1- Contexte biologique :…… ……..4
I-1-1 : Reconnaissance spécifique : cas particulier des protéines d'adhésion…4
I-1-2 : Adhésion de neutrophiles à la paroi interne des vaisseaux……..5

I-2 : Description et mesures des constantes cinétiques des réactions ligand/récepteur:……..7
I-2-1 : Description des interactions ligand/récepteur en termes de réaction chimique:……7
I-2-2 : Mesure expérimentale des constantes de réaction :…… ……8
I-2-3 : Résultats sur les mesures des constantes de dissociation Kd et des taux cinétiques de réaction (k_on et k_off):……..…… 10
I-2-4 : Description du $k_{on}$ : importance de la diffusion…….……11
I-2-5 : koff des réactions Ligand/récepteur :……13

Conclusion…… 17
Bibliographie……18

I-3 : Expériences en molécule unique sur les couples ligands récepteur :……14

II : Adhésion spécifique entre surfaces fluides : ……..20

II-1 : Un matériau incontournable pour la biophysique : les vésicules ou liposomes unilamellaires :……..20
II-1-1 : Description des vésicules :……20
II-1-2 : Energie de surface des vésicules :……22

II-2 : Expériences et description des phénomènes d'adhésion spécifique : aspect statique :……24
II-2-1 : Les premières expériences d'adhésion spécifique ……..…..24
II-2-2 : Le modèle de Bell……26

II-3 : Expériences d'adhésion spécifique sur des systèmes biomimétiques :…….. 32
II-3-1 : Expériences en micropipette et mesure d'énergie d'adhésion…….. ...32
II-3-2 : Adhésion spécifique de liposomes fluctuants sur substrats plans : ….35
II-3-3 : Mesure de constantes cinétiques dans les zones d'adhésion spécifique en fluorescence et en FRAP :…….. 39

Conclusion……40

Bibliographie……40

III- Adhésion spécifique de gouttelettes d'émulsion :…… . …42

III-1 : Généralités sur les émulsions : ……..…….42
III-2 : Interactions entre gouttes d'émulsion :…….……..43
III-3 : Détermination thermodynamique de l'équation d'Young-Dupré :……44
III-4 : Adhésion spécifique de gouttelettes d'émulsion sur substrats solides : le travail de Jacques Fattaccioli……45

Bibliographie…….47

Conclusion……48

Annexe : Détails de la dérivation du Lagrangien de l'énergie libre par rapport aux variables d'espace……49

Deuxième partie : Matériaux et caractérisation……51

I- Les gouttelettes d'émulsion :……..54
I-1 : Fabrication d'émulsions monodisperses fonctionnalisées…….54
I-1-1 : Formulation de l'émulsion :……...54
I-1-2 : Fonctionnalisation de l'émulsion :…….58
I-1-3 : Caractérisation en microscopie de fluorescence :……..63
I-2 : Etude qualitative de la densité de straptavidine sur les gouttelettes :……64
I-3 : Dosage en retour de la quantité de streptavidine greffée : …… 68
I-3-1 : Première tentative : dosage en retour de la streptavidine……..69
I–3-2 : Deuxième tentative : dosage en retour d'une solution de biotine FITC:…….70
I-4 : Description thermodynamique de la réaction d'adsorption :……72

Bibliographie……75

II- Bicouches lipidiques supportées : Fabrication et caractérisation…….76

II-1 : Dépôt de bicouches supportées par fusion de vésicules :……76
II-1-1 : Matériel et protocole expérimental :……76
II-1-2 : Observation des SLB en épi-fluorescence :……..82
II-2 : Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) et quantification…….. 83
II-2-1 : Bases théoriques de la FCS :……83
II-2-2 : Montage de FCS……87
II-3 : Caractérisation des bicouches en FCS :…… 90
II-3-1 : Courbes expérimentales de FCS en volume et en surface :…..……90
II-3-2 : Z-scan et caractérisation de w0 :…….…..92
II-3-3 : Caractérisation des bicouches supportées et quantification de la fluorescence :……..…94

II-3-4 : Mesures de temps de vie et validité de l'extrapolation aux hautes densités en fluorophores:……..:……...……...97
II-3-5 : Diffusion de la streptavidine sur les bicouches:…… ……102
II-3-6 : Mesures de FCS sur les gouttes fonctionalisées ……103

Conclusion……..……103

Bibliographie…….…….…….104

Annexe : Détail du calcul de la fonction de corrélation our des particules diffusant librement en volume……105

Troisième partie : Adhésion spécifique de gouttelettes d'émulsion fonctionnalisées sur des bicouches supportées planes :……...……..106

I- Mise en place de l'expérience :…….……..106

I-1 :Protocole expérimental :……..….106
I-2 : Tension de surface des gouttelettes d'émulsion ……107

II- Observation de l'adhésion spécifique des gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées en microscopie de fluorescence :…….……...……..110

III- Mesures expérimentales de l'adhésion en statique :…..……..……117
III-1 :Mesures de déformation : comparaison entre déformation et recrutement de streptavidines……..117
III-2 :Mesures de déformation : comparaison entre déformation et recrutement de streptavidines: ……...……119
III-3 : Mesure des effets non spécifiques : ……122
III-4 : Variations des conditions expérimentales :……...…… ……..125
III-5 : Effet de la quantité initiale de streptavidine :…… ……..126
III-6 : Discussion autour des résultats expérimentaux :…… ……130
III-7 : Cinétique d'étalement des gouttelettes :…… ……..……..134

Bibliographie……138

Conclusion générale :……139

Introduction :

Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé un matériau original, des gouttelettes d'émulsion fonctionnalisées, pour aborder un sujet bien vaste : l'adhésion cellulaire.
L'adhésion cellulaire est un sujet biologique passionnant. Outre le fait qu'elle assure un maintien des organismes multicellulaires, elle intervient de façon très dynamique et dirigée dans de nombreuses situations cruciales. A titre d'exemple, durant l'embryogénèse, les cellules sont capables de se distinguer les unes des autres pour former les différentes parties d'un corps. Les différences d'adhésivité entre les cellules pourraient diriger la croissance de l'embryon vers un être aux multiples tissus et organes ([1])..
Un autre exemple largement étudié ces dernières décennies est la synapse immune. La synapse immune ainsi nommée par Dustin décrit la situation d'adhésion entre macrophage et lymphocyte T qui permet le transfert d'information, depuis le macrophage vers le lymphocyte, de la présence du non-soi dans un organisme ([2, 3]). Pour parvenir à une synapse immune mature permettant le transfert d'information, la zone d'adhésion entre le macrophage et le lymphocyte connaît un scénario remarquable, les différentes molécules se structurant en anneaux concentriques.
Les situations biologiques sont stupéfiantes mais une étude physico-chimique directe est compliquée tant les phénomènes sont nombreux et entremélés. Une approche consiste à simplifier les contextes biologiques pour essayer de les imiter. Il est alors possible de repérer dans quelle mesure on peut reproduire avec des ingrédients purement physico-chimiques des situations biologiques.
Dans mon travail de thèse, j'ai opté pour cette voie réductionniste. Un de nos objectifs n'était pas tant de se rapprocher de la biologie de l'adhésion cellulaire que de fabriquer un système bien quantifié et original utilisant certaines propriétés de l'adhésion cellulaire.
Notre travail part d'un constat bien établi : lorsque deux surfaces portant des molécules adhésives sont mises en proche contact, elles vont adhérer. Notre but était de comprendre cette adhésion sur un système modèle.
Nous avons donc utilisé deux ingrédients omniprésents en biologie pour aborder ce sujet et pour commencer, les protéines adhésives. Le vivant utilise un vaste panel de molécules capables de se reconnaître spécifiquement. La reconnaissance spécifique entre molécules du vivant peut jouer un rôle adhésif. C'est notamment le cas de certaines classes de protéines membranaires qui engendrent l'adhésion cellulaire. Ces protéines fonctionnent par couple se reconnaissant spécifiquement. Deux protéines adhésives peuvent s'imbriquer l'une dans l'autre pour former un lien stable. Le lien peut durer de quelques microsecondes à plusieurs jours selon la nature des protéines. Ces protéines adhésives sont le moteur de l'adhésion cellulaire.
A ces molécules particulières s'ajoute une contrainte spatiale forte. Dans le cas de l'adhésion inter-cellulaire, les protéines adhésives se trouvent à la surface des cellules, surfaces déformables, sur lesquelles elles diffusent. Lorsque deux cellules adhèrent, l'interaction entre protéines est fortement soumise à la nature des surfaces sur lesquelles elles se trouvent.
Ainsi, de façon très réductrice, on peut résumer l'adhésion cellulaire à l'interaction spécifique et collective entre protéines d'adhésion dont la diffusion et la réactivité sont reliées à leur attachement à la surface qui les porte.
L'étude de ces réactions entre surfaces molles a commencé les années 80 et l'intérêt perdure aujourd'hui. Les papiers relatifs à cette thématique présentent la particularité de toucher à de nombreuses branches des sciences. Il peut bien sûr s'agir de biologie. Il s'agit aussi de chimie et de physique. En effet, si l'adhésion cellulaire est omniprésente biologiquement, elle impose aussi des cadres d'étude originaux pour envisager la réaction chimique et se prête à des

descriptions faisant appel à la physique statistique, à la physicochimie des polymères ou à l'hydrodynamique.
Dans ce travail de thèse, nous avons opté pour une approche expérimentale contrôlée et une description la plus physique possible.
Nous avons utilisé comme protéines adhésives, le couple modèle biotine/streptavidine, bien connu pour son énergie d'interaction exceptionnellement forte pour des molécules biologiques. Jacques Fattaccioli a initié ce travail en mettant au point un protocole de fonctionnalisation de gouttelettes d'émulsion avec la streptavidine. Un des avantages des émulsions est de pouvoir être produites en grandes quantités. Ceci permet notamment d'obtenir un bon contrôle sur le greffage des protéines. Par ailleurs, les gouttelettes d'émulsion ont une physique de surface assez simple et on peut aisément mesurer leur déformation pour accéder à une énergie d'adhésion.
Pour observer l'adhésion des gouttelettes, nous avons déposé des bicouches lipidiques fluides sur des surfaces de verre. Les bicouches lipidiques fluides supportées sont une surface fluide pratique pour l'observation. On peut caractériser ces bicouches ou observer les situations d'adhésion qu'elles engendrent avec différents types de microscopie.
Dans ce travail de thèse, je ferai dans un premier lieu une étude bibliographique des principales mesures et résultats obtenus sur l'adhésion cellulaire avec une perspective de physico-chimiste. Puis je décrirai les matériaux que nous avons utilisés dans ce travail en détaillant leur caractérisation. Enfin, j'essaierai d'apporter des explications aux situations d'adhésion spécifique que nous avons pu observer.

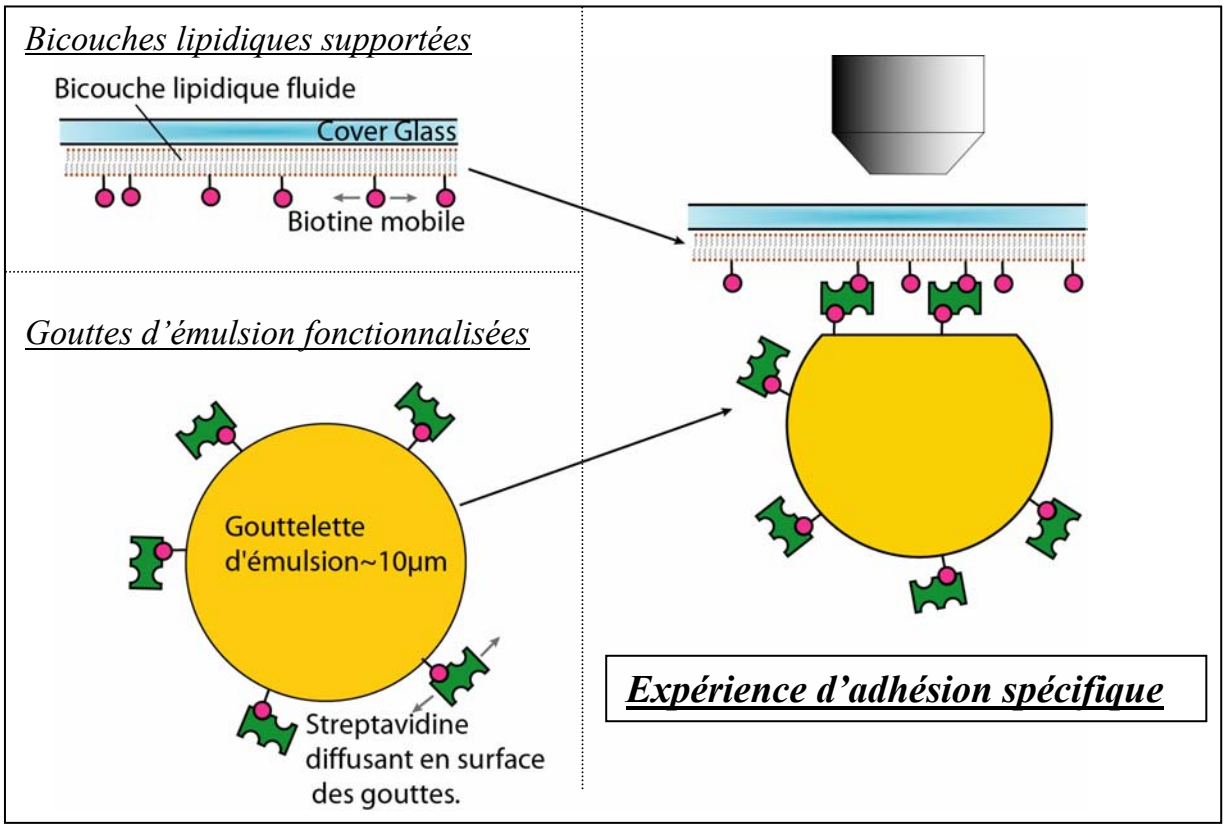



Figure 1 : Schéma de principe de l'expérience d'adhésion spécifique.
A gauche, les matériaux décrits dans ce chapitre.
A droite, l'expérience à comprendre.

Bibliographie :


1. Huang, S. and D. Ingber, *The structural and mechanical complexity of cell-growth control.* Nature Cell Biology, 1999. **1**: p. 131-131.
2. Monks, C., et al., *Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells*. Nature, 1998. **395**(6697): p. 82-86.
3. Grakoui, A., et al., *The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation.* Science, 1999. **285**(5425): p. 221.

# Première partie : Bibliographie

L'étude l'adhésion spécifique entre surfaces fluides est une réaction chimique doublement spéciale. Tout d'abord, les molécules réagissant sont des molécules du vivant qui peuvent se reconnaître spécifiquement pour adhérer. Les interactions entre ces molécules ne sont pas des interactions de chimie classique (covalente). Il s'agit plutôt de liaisons faibles de type hydrogène ou Van der Waals dont les effets s'ajoutent. Les molécules du vivant se reconnaissent donc déjà de façon bien particulière. Par ailleurs, dans bon nombre de situations, ces molécules sont attachées à des surfaces ce qui modifie leur adhésivité. Dans cette partie bibliographique, nous allons tout d'abord décrire les caractéristiques des interactions en volume entre molécules biologiques en nous focalisant sur les 'protéines adhésives'. Nous mettrons en place les ordres de grandeur de ces interactions ainsi que des éléments d'explications des valeurs mesurées. Une fois que nous aurons décrit la réactivité à trois dimensions de ces molécules, nous spécifierons le problème au cas où les molécules sont contraintes de diffuser sur des surfaces fluides. Nous décrirons les expériences d'adhésion spécifique biomimétiques entre surfaces fluides et les modèles thermodynamiques permettant de comprendre les situations observées. Nous montrerons aussi comment, dans un certain nombre de cas, l'approche biomimétique a permis de mettre en évidence des observations biologiques avec de simples paramètres physico-chimiques. Enfin, dans la troisième partie de cette bibliographie, nous nous focaliserons un peu plus sur notre matériau d'étude, les gouttelettes d'émulsion et les premier résultats que J.Fattaccioli a pu obtenir sur l'adhésion spécifique de ces objets sur des substrats biomimétiques.

## I- Interactions entre biomolécules : les protéines d'adhésion.

### I-1- Contexte biologique :

#### I-1-1 : Reconnaissance spécifique : cas particulier des protéines d'adhésion.

Un organisme vivant fait appel à un nombre gigantesque de molécules. Une caractéristique de ces molécules est de se reconnaître spécifiquement pour interagir entre elles. Brins d'adn, arn messager ou de transfert, enzymes/substrats, anticorps/antigènes,.. toutes ces molécules peuvent reconnaître spécifiquement les vis-à-vis avec lesquels elles vont interagir. Le caractère spécifique de cette reconnaissance est primordial. Une molécule biologique ne trouvera dans le gigantesque ensemble des molécules du vivant qu'un petit nombre de molécules complémentaires avec lesquelles elle pourra interagir
Une caractéristique remarquable de l'adhésion entre biomolécules est leur réversibilité. Un couple de biomolécules adhésives peut perdurer de quelques microsecondes à plusieurs jours. Ce spectre temporel permet les organismes vivants d'être dynamiques à des échelles de temps très variables. Par ailleurs, la fonction des différentes molécules biologiques va être intimement liée à la nature de leur interaction spécifique.
Contrairement aux situations de chimie 'classique', l'adhésion entre molécules biologiques n'est souvent pas covalente mais liée à la création de quelques liaisons faibles ( Van der Waals, hydrogène, électrostatique, solvatation..) qui lorsqu'elles s'ajoutent permettent de former un lien stable. L'adhésion des biomolécules est liée à la possibilité de trouver des conformations spatiales dans lesquelles deux molécules vont pouvoir s'associer et résister un certain temps à l'agitation thermique

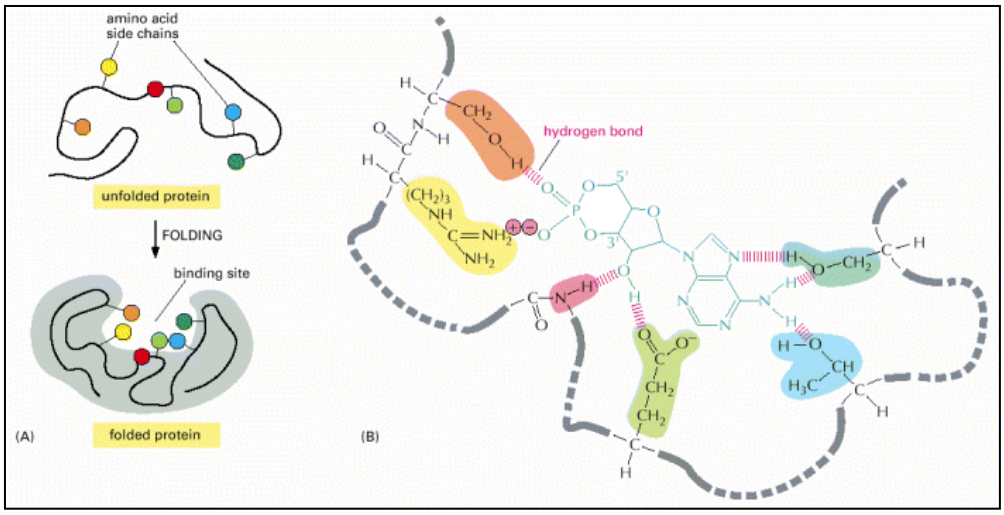



Figure 1 : Illustration de principe de l'adhésion spécifique entre biomolécules. Pour que deux molécules biologiques puissent réagir, elles doivent adopter une conformation spatiale très précise afin que les liaisons faibles de très courte portée puissent se mettre en place se mettre en place. Source [6]

Dans cette thèse, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux biomolécules dont la reconnaissance spécifique est utilisée pour permettre à des cellules d'adhérer. Il s'agira en général de protéines et je parlerai de protéines d'adhésion.

NB : Par la suite, nous parlerons de réactions entre ligand et récepteur pour parler d'interactions entre protéines adhésives. Ligand et récepteur seront les réactifs des réactions biochimiques considérées. Ligand et récepteur sont des dénominations assez vagues et imprécises qui peuvent parfois être interchangées.
Notons que dans certains cas, ligand et récepteur seront indiscernables. C'est le cas des interactions homophiliques ayant lieu entre protéines identiques (interactions entre cahérines par exemple).
Dans les cas où l'adhésion fera intervenir des molécules de tailles différentes, la grosse molécule sera le récepteur tandis que la petite sera le ligand.

Un corps humain dispose de quatre grandes familles de protéines d'adhésion : les cadhérines, les sélectines, les immunoglobulines et les intégrines. Chacune de ses familles est composée de plusieurs dizaines de variantes. Selon les fonctions à accomplir, un corps humain utilisera préférentiellement un type de protéines.
Pour illustrer ces différences, nous allons prendre un exemple particulier: l'adhésion de neutrophiles à la paroi interne des vaisseaux en réponse à une inflammation.

### I-1-2 : Adhésion de neutrophiles à la paroi interne des vaisseaux :

Lorsqu'une partie du corps est infectée par des bactéries, une des premières étapes de la réponse immunitaire va être le recrutement de neutrophiles, des globules blancs non spécifiques dans la zone infectée. Les neutrophiles présents dans les vaisseaux sanguins vont être recrutés au niveau de la zone infectée. Pour cela, ils vont adhérer à la paroi des vaisseaux

(sur les cellules endothéliales) puis traverser la paroi cellulaire de ces vaisseaux pour se rendre sur le lieu de l'infection.
Pour rendre possible ce recrutement dans la zone intéressante, deux types de protéines d'adhésion vont entrer en jeu, pour accomplir deux fonctions différentes.
Avant d'être recrutés, les neutrophiles circulent dans les vaisseaux sanguins. Lorsqu'une infection est déclarée, les cellules endothéliales sont activées et présentent temporairement à leur surface des sélectines de type P et E.
Les sélectines sont des protéines membranaires capables de se lier à des polysaccharides (sucres). On recense différents types de selectines dont la différence principale est la longueur de la chaîne les liant à la membrane cellulaire.
Outre les sélectines, les cellules endothéliales présentent d'autres types de protéines d'adhésion appelées ICAM présentant une partie adhésive de la famille des immunoglobulines. Les immunoglobulines sont capables de se fixer entre elles mais aussi à la famille des intégrines.
Les neutrophiles circulant dans le sang présentent à leur surface les polysaccharides complémentaires des sélectines présentent sur la paroi des vaisseaux ainsi que des intégrines.
De nombreux travaux [7-9] ont démontré l'ordre d'intervention particulier des deux types de protéines d'adhésion.
Dans un premier temps, les neutrophiles s'écoulant dans les vaisseaux sanguins vont être freinés grâce à des interactions entre sucres recouvrant la surface des neutrophiles et sélectines sur les cellules endothéliales.
Une fois freinés, les interactions entre intégrines sur les neutrophiles et immunoglobulines sur les cellules endothéliales peuvent avoir lieu. Grâce à ces nouvelles interactions, le neutrophile se bloque sur les cellules endothéliales et peut traverser la paroi endothéliale.

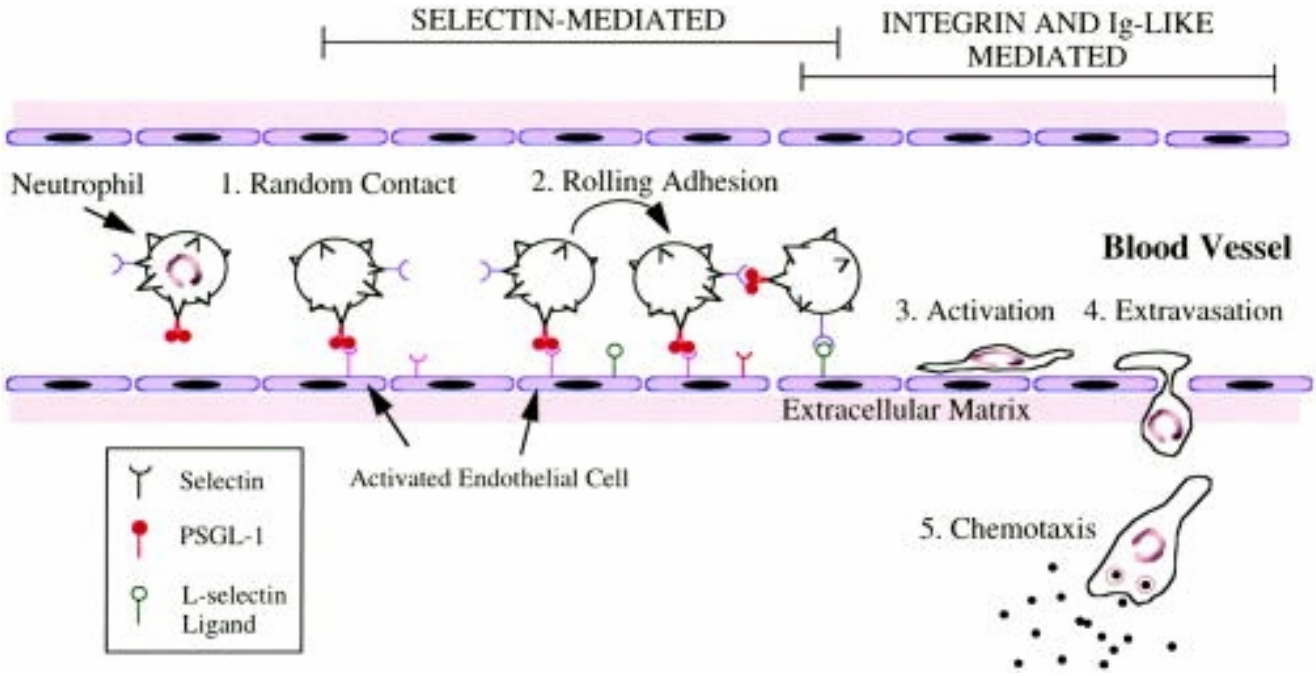



Figure 2 : schéma de l'adhésion des neutrophiles sur les parois endothéliales. Un premier ralentissement a lieu grâce aux interactions entre les polysaccharides (PSGL-1 sur les neutrophiles et les sélectines sur les cellules endothéliales. Une fois ralentis et 'roulant' sur les parois, les neutrophiles peuvent adhérer fortement grâce à des interactions plus fortes entre intégrines et immunoglobulines. Source [3].

Cet exemple illustre la variété des fonctions des protéines d'adhésion utilisées dans l'organisme. Deux types de protéines adhésives sont ici requis. Les sélectines permettent tout d'abord de freiner les cellules lorsqu'elles sont portées par le flux sanguins. Les interactions engendrées par les sélectines doivent donc être rapides pour pouvoir attraper les neutrophiles dans leur élan En revanche elles ne sont visiblement pas assez fortes pour stopper complètement les neutrophiles. C'est alors qu'entrent en jeu les intégrines, qui permettent quant à elles une adhésion plus forte et le blocage des neutrophiles sur les parois des vaisseaux.
Le rôle des protéines adhésives varie donc d'une famille à l'autre et leur réactivité influe visiblement sur leur fonction. Dans le paragraphe suivant nous allons nous intéresser à la description et à la mesure expérimentale des constantes cinétiques des interactions ligand/récepteur. Avant de considérer des ligands et récepteurs sur des surfaces, nous allons commencer par étudier le cas mieux connu et plus développé des interactions en volume.

## I-2 : Description et mesures des réactions ligand/récepteur en volume :

### 1-2-1 : Description des interactions ligand/récepteur en termes de réaction chimique :

Nous nous éloignons à ce stade de la biologie pour commencer à décrire les interactions biologiques avec des notions de physico-chimie.
On considère donc des réactions entre ligands et récepteurs ayant lieu en volume. De la même façon que dans une réaction chimique classique, on peut écrire l'équation bilan de la réaction ligand L/récepteur R en volume. En notant C le couple ainsi formé, on a :

$$Ligand + récepteur \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftharpoons}} couple$$

Cette réaction est caractérisée par un taux d'association kon et un taux de dissociation koff.
Le ratio koff/kon est égal à la constante de dissociation Kd de la réaction. On a ainsi :

$$K_D = \frac{[Ligand]\ \ [Récepteur]}{[Couple]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} \propto mol/l$$ (pour une réaction en volume.)

Notons que l'inverse de la constante de dissociation 1/Kd est aussi souvent utilisé. C'est la constante d'association de la réaction : Ka=1/Kd.
L'expression de Kd découle de raisonnements thermodynamiques qui nous seront bien pratiques par la suite.
Tout d'abord, ligands et récepteurs peuvent réagir pour former un nombre $N_{couples}$ de couples dont l'énergie d'interaction est $E_{couple}$. De manière générale, on peut écrire $E_{couple}$ comme une différence de potentiel chimique standard en l'occurrence :

$$E_{couple} = \mu^0_{couple} - \mu^0_{ligand} - \mu^0_{récepteur}$$

L'énergie libre du système constitué des ligands, des récepteurs et des couples formés dans le volume V peut alors s'écrire comme un terme enthalpique lié à la création de couples et un terme d'entropie de configuration des espèces chimiques en solution, c'est-à-dire le nombre de configurations permettant de distribuer les espèces chimiques dans leur volume V. Les termes

entropiques de vibration ou de rotation des molécules sont soit inclus dans l'énergie d'interaction des couples, soit invariants.
Ainsi, on peut écrire :
$F = -N_{couples} E_{couple} - TS_{config}$ .

Dans un modèle sur réseau, on doit donc définir un volume de maille $V_{molecule}$ qui caractérise la place occupée par une molécule (on se place dans l'hypothèse simplificatrice où ligands, récepteurs et couples occupent des volumes identiques ($V_{molecule}$)). Le volume $V_{molecule}$ est a priori très petit devant le volume V où a lieu la réaction.
Pour déterminer l'état d'équilibre du système, il faut dériver l'énergie libre du système par rapport à la variable thermodynamique qui nous intéresse, le nombre de liens $N_{couples}$ . Le calcul se simplifie bien et mène à la loi d'action des masses bien connue qui s'écrit :

$$\frac{[Ligand][récepteur]}{[couple]} = \frac{1}{V_{molecule}} e^{-\frac{E_{couple}}{kT}} = K_d$$

où $K_d \propto \#.l^{-1}$

Pour passer en mol/l, il suffit de multiplier par le nombre d'Avogadro.
Ce calcul est intéressant. Il précise notamment le coefficient de proportionnalité entre le rapport des concentrations et les énergies mises en jeu ($\frac{1}{V_{molecule}}$).

Comme, à l'équilibre, on a aussi :
$$\frac{d[Couple]}{dt} = 0 = k_{on}[Ligand] \quad [Récepteur] - k_{off}[Couple].$$

On peut finalement écrire :
$$Kd = \frac{1}{N_A V_0} e^{-\frac{E_{couple}}{kT}} = \frac{k_{off}}{k_{on}}.$$

Expérimentalement, de nombreux travaux ont consisté à déterminer les taux de réaction $k_{off}$ et $k_{on}$ des réactions ligand/récepteur ainsi que les grandeurs thermodynamiques standards de réaction pour des réactions ayant lieu en volume (il faut remarquer que $\frac{E_{couple}}{kT} = \frac{\Delta_r \mu^0}{kT} = \frac{\Delta_r G^0}{RT}$). C'est ce que nous allons décrire dans le paragraphe suivant.

### I-2-2 : Mesure expérimentale des constantes de réaction :

Les méthodes expérimentales employées pour des réactions chimiques classiques (calorimétrie par exemple) s'adaptent très bien à des réactions entre protéines. Elles sont d'ailleurs largement employées. L'ITC (pour Isothermal Titration Calorimetry) par exemple,

mesure le dégagement de chaleur associé à une réaction chimique et donne accès à l'enthalpie de réaction. En jouant sur la température, on peut aussi accéder à l'entropie de réaction et donc à l'enthalpie libre de réaction. C'est une des rares mesures qui renseigne directement sur des données directement énergétiques (et non à des taux d'association, de dissociation ou à des Kd).

Par ailleurs, des méthodes ont été développées utilisant la grande taille et l'architecture complexe des molécules biologiques. Ces nouvelles méthodes sont principalement le BIAcore ainsi que des méthodes de fluorescence (FRET par exemple) [10]
Ces expériences permettent d'accéder aux taux d'association et de dissociation des réactions chimiques entre protéines.

Le Biacore est une technique intéressante bien que difficile à mettre en œuvre. Un substrat est recouvert d'une fine couche métallique (en général de l'or). Lorsque une onde lumineuse monochromatique éclaire cette surface à une bonne incidence, une onde évanescente peut se propager dans le métal. Les électrons libres du métal résonnent à la fréquence de l'onde évanescente : il s'agit de plasmons de surface.
Le Biacore utilise la sensibilité de ces plasmons à la nature des surfaces où la résonance a lieu. Ainsi, l'absorption d'une couches ligands ou de récepteurs à la surface d'une couche métallique où oscille un plasmon va changer la réflectivité du milieu et va pouvoir être détectée et interprétée en termes de densité de molécules sur la surface.

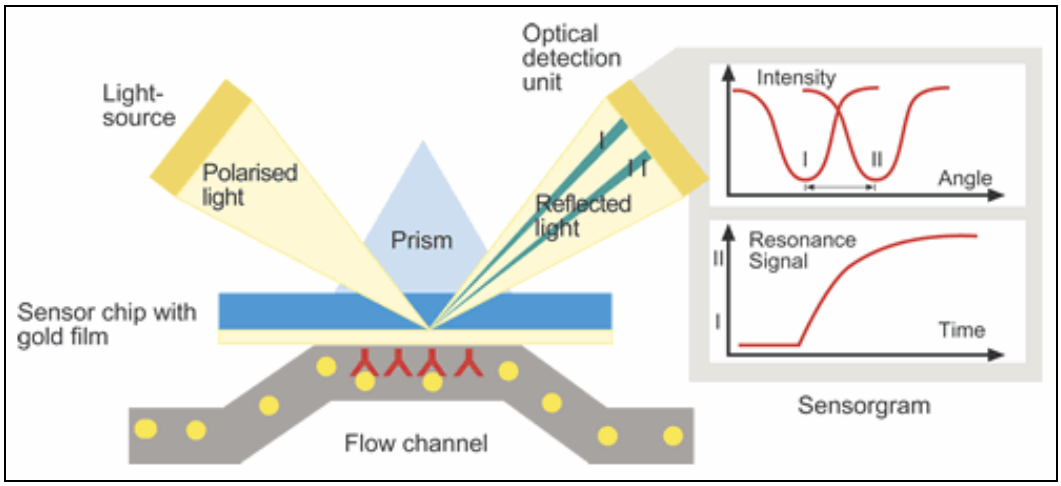



Figure 3 : Schéma de principe du BIAcore : selon la masse de molécules adsorbées sur la surface du métal, l'angle d'émission de la lumière réfléchie change. On peut ainsi mesurer la cinétique d'association et de dissociation des récepteurs se liant à des ligands déposés en surface. Source [1]

Le BIAcore a été largement étudié ces dernières années. C'est une technologie de premier intérêt puisqu'elle permet de suivre en temps réel les cinétiques d'association et de dissociation des couples ligand/récepteur et d'extraire à la fois le k_on et le k_off des réactions.

De nombreuses précautions s'imposent pour faire des mesures comparables à des situations en volume puisque les récepteurs sont fixés à des surfaces[11]. En particulier , il faut réussir à conserver les degrés de liberté de rotation des récepteurs liés en surface. Par ailleurs, des étapes non-désirées de transport (à bas flux ou à trop hautes concentrations) peuvent donner des constantes de réaction sous estimées de plusieurs ordres de grandeur.

Grâce au Biacore, à des méthodes de calorimétrie ou de fluorescence et à leur comparaison ([12, 13]), on est maintenant capable de déterminer les taux d'association et de dissociation de nombreux couples ligand/récepteur .

I-2-3 : Résultats sur les mesures des constantes de dissociation Kd et des taux cinétiques de réaction (k_on et k_off):

De nombreuses mesures de constantes de dissociation ont été menées au cours des 20 dernières années. Ces données ont été recensées dans des bases de données[14, 15]. Wang et al. ont recensé les différents Kd sur près de 1000 complexes c'est-à-dire des interactions entre protéines et groupes moléculaires d'assez petite taille (100 à 1000 g/mol). Ce sont des interaction de type biotine/streptavidine. Dans ce travail, Wang et al. n'ont retenu que les constantes de dissociation( Kd) (et non les taux d'association ou de dissociation (k_on et k_off)).
N. Moore a repris ces valeurs pour les reporter dans un diagramme des énergies d'interaction Ligand/récepteur dans [2]. Il reporte la proportion de couples selon leur énergie (le $\Delta rG^0$ vu plus haut). Remarquons que Moore assimile énergies de liens et un temps de vie en reportant ces deux grandeurs sur le même axe. Ceci suppose que le Kd se compare directement au taux de dissociation k_off des molécules. Nous verrons plus loin que cette hypothèse est justifiée.

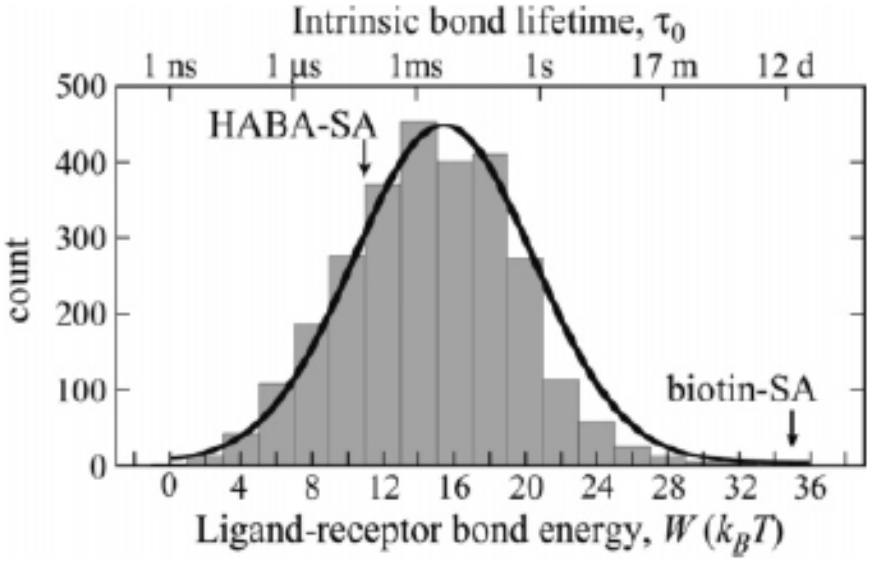



Figure 4 : distribution en kT de l'énergie libre des réactions ligand/récepteur des molécules adhésives du vivant (Moore Langmuir 2008 [2])
Le couple Biotine/streptavidine a une énergie d'adhésion de 35kT environ. Il s'agit d'une adhésion exceptionnellement forte dans le vivant.

La moyenne de la distribution se situe aux alentours de Kd=$10^{-7}$mol/l soit une énergie moyenne des énergies des couples autour de 15kT. La variance de la distribution s'étale sur

16kT soit sur 6 ordres de grandeur en terme de Kd. Le couple Biotine/streptavidine (que nous utiliserons expérimentalement) est exceptionnel avec son énergie de 35kT (Kd=10^-14).

Ce diagramme est un bon panorama sur l'énergie typique des couples ligand/récepteur. On peut remarquer que sur l'axe des abcisses, l'énergie des liens est assimilée à un temps de vie des liens. Or le temps de vie d'un lien c'est autre que l'inverse du k_off. Ceci suppose que c'est le k_off qui fait le Kd et que le k_on n'a pas d'influence. Ce constat est un peu abrupt mais les expériences menées en Biacore notamment et qui renseignent sur les taux d'association k_on et de dissociation k_off.

Les mesures montrent que mis à part certains cas particuliers (forces à longue portée pouvant aider la réaction notamment), le $k_{on}$ est sensiblement constant quels que soient les couples ligand/récepteur étudiés. En l'occurrence, le $k_{on}$ des réactions ligand/récepteur varie sur la très grande majorité des couples entre 10^5mol-1.L.s-1 et 10^7mol-1.L.s-1.
Cette observation est assez frappante : les couples ligand/récepteur peuvent être très différents mais leur taux d'association est proche. Ce constat, comme nous allons le décrire peut être attribué à la nature principalement diffusive de l'association des molécules.
Le $k_{off}$ des molécules est quant à lui beaucoup plus variable selon les couples mis en jeu et il faut entrer dans les détails moléculaires de l'affinité entre ligand et récepteur.
Ainsi, on peut dire que c'est le koff qui fait le Kd.
Nous allons essayer d'expliquer successivement les résultats relatifs au $k_{on}$ et au k_off avec des arguments de modélisation.

### I-2-4 : Description du $k_{on}$ : importance de la diffusion.

On va pour commencer considérer une réaction où ligand et récepteur diffusent librement en volume et reprendre la description de J.Janin ([4]).
Pour que la réaction puisse avoir lieu, ligand et récepteur doivent être proches l'un de l'autre. La première étape de la réaction est une étape de diffusion translationnelle : le ligand et le récepteur diffusent en volume selon un mouvement brownien et peuvent se rencontrer aléatoirement selon une constante $k_{coll}$. Une rencontre est définie lorsque ligand et récepteur se trouvent en deça d'une distance (de l'ordre de quelques Angstroms) à laquelle la réaction est susceptible d'avoir lieu.

Dès 1917, Smoluchowski a décrit l'étape de diffusion translationnelle.
On considère deux particules sphériques A et B isotropiquement réactives dans un milieu.
On imagine une particule A fixe au point r=0. Les particules B ont un coefficient de diffusion D égal à la somme des coefficients de diffusion de A et B et leur concentration c est soumise à l'équation de diffusion :

$$\frac{\partial c}{\partial t} + D\Delta c = 0$$

Les conditions limites sont :

$c(R,t) = 0$ et $c(\infty,t) = c_0$

R est la somme des rayons de A et B. $c_0$ est la concentration initiale de B.

La première condition limite décrit une condition d'absorption totale : une fois arrivées en r=R, les sphères disparaissent : l'étape de réaction est immédiate et irréversible.

Le flux à la distance r=R donne la constante de vitesse de Smoluchowski

$$k_{coll} = \frac{4\pi DR^2}{c_0}\frac{\partial c}{\partial r}\Big)_{r=R} = 4\pi DR$$

Le coefficient de diffusion d'une sphère au sein d'un liquide s'écrit (Einstein):

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}.$$

On en déduit donc une expression de $k_{coll}$ dans le cas de deux sphères de même rayon :

$$k_{coll} = \frac{2kT}{3\eta}$$

Pour deux sphères de même taille, cette valeur est indépendante de la taille des sphères. Cette constante $k_{coll}$ est la constante d'association diffusionelle. Elle décrit l'adhésion d'objets isotropiquement réactifs diffusant librement dans un milieu et constitue une limite haute du taux d'association d'objets soumis à de la pure diffusion.
A température ambiante, en milieu aqueux ($\eta = 10^{-3} Pa.s$), $k_{coll}$ vaut environ $10^9 mol^{-1}.l.s^{-1}$.

Toutefois, lorsque ligand et récepteur se sont rencontrés, rien n'assure qu'ils ont la bonne orientation pour que la réaction puisse avoir lieu. Janin définit une probabilité pr pour que lors de la rencontre, ligand et récepteur aient la bonne orientation et puissent ainsi adhérer.
Ainsi, le kon de la réaction ligand/récepteur peut s'écrire :

$$k_{on} = p_r k_{coll}$$

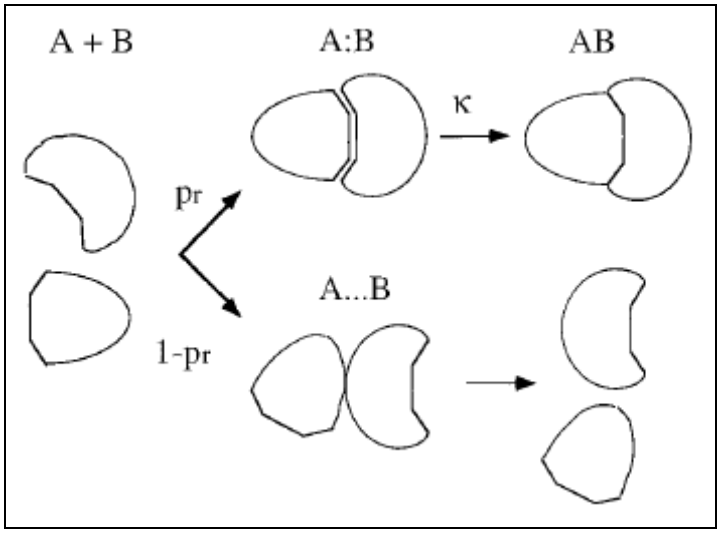



Figure 5 : Schéma descriptif de la cinétique d'association d'un ligand (ici A) et d'un récepteur (B).
Les probabilités utilisées ici doivent être multipliées par la constante de diffusion translationnelle kcoll.
(adapté de [4])

La probabilité pr contient de nombreuses informations caractéristiques des biomolécules, notamment les contraintes liées la taille des molécules.
Une description intéressante peut être lue dans un papier de Northrup et Erickson ([16]). Il s'agit d'un travail de simulation numérique. Les auteurs décrivent les molécules adhésives comme des sphères présentant plusieurs (en l'occurrence 4) sites d'adhésion bien localisés (chacun correspondant à une liaison hydrogène ou Van der Waals). Les 4 sites peuvent se retrouver en vis-à-vis et ainsi assurer une adhésion résistante dans la configuration

géométrique adaptée. Les auteurs calculent, en n'incluant que des ingrédients de dynamique brownienne, les probabilités pour que 1, 2, 3 ou les 4 sites d'adhésion se retrouvent correctement positionnés pour adhérer.
Une première remarque intéressant est que, sur la base de cette simulation brownienne, lorsqu'une rencontre a lieu (ligand et récepteur à une distance de quelques angstroms l'un de l'autre), le temps passé dans la zone de possible adhésion est assez grand. Les auteurs distinguent un temps de rencontre et un temps de collision. Le temps de collision est très court, de l'ordre de quelques 1/10émes de nanosecondes. Mais, une fois une collision passée, il existe une grande probabilité pour que les molécules se collisionnent à nouveau. Northrup montre, en n'utilisant que des arguments de dynamique brownienne, que lors d'une rencontre, il y a en moyenne 9 collisions.
Le temps de rencontre, défini comme temps entre la première collision et la dernière collision dure plusieurs nanosecondes. Ce temps devient alors de l'ordre de grandeur du temps caractéristique de diffusion en rotation de la protéine. Lors d'une rencontre, les molécules ont donc le temps de tourner sur elles-mêmes et donc de tester de nouvelles positions lors des collisions.
Les simulations de Northrup donnent des valeurs de k_on de $4.10^8$mol-1.s-1 pour N=1, $4.10^6$mol-1.s-1 pour N=2, $10^5$ pour N=3. Pour ces valeurs, les auteurs ne prennent pas en compte la stabilisation due aux liens formés. En ajoutant une énergie potentielle attractive à l'étape N=2 de -4.2 kcal/mol (10kT, estimation peut être un peu grande), la valeur de k_on devient 2*10^6mol-1 .s-1 pour N=3.
Ces valeurs théoriques sont intéressantes car elles sont très comparables aux données expérimentales sur l'adhésion entre biomolécules. Les réactions d'association entre ligand et récepteur sont essentiellement des processus diffusifs. L'étape limitante est le positionnement des molécules dans la bonne position l'une en face de l'autre. Alors, les liens peuvent se former. L'autre idée intéressante est qu'une fois qu'un petit nombre de liaisons faibles se sont formés (2 dans le modèle de Northrup), la réaction a beaucoup de chances d'aboutir à la formation du couple adhéré.
Des descriptions à partir du mouvement brownien expliquent bien les valeurs trouvées pour le k_on. Le k_on, essentiellement diffusif dépend donc peu de la structures protéines mais plutôt de leur rayon de giration et de leur masse molaire.
Notons que dans quelques cas rares, des forces à longues portées de type électrostatique ou dipôle-dipôle peuvent aider les molécules à s'orienter dans la position favorable au collage et augmenter le k_on quelques ordres de grandeur. Il s'agit d'exceptions.
Le résultat principal concernant le k_on des interactions ligand/récepteur est leur caractère diffusif. Ainsi, le k_on est très proche entre le couple et ne varie typiquement qu'entre $10^5$ et $10^7$ $mol^{-1}.l.s^{-1}$.
En revanche, la situation est bien différente pour le k_off.

### I-2-5 : k_off des réactions Ligand/récepteur :

Si, en l'absence de forces à longue portée, les constantes d'association sont très proches entre les différents couples ligand/récepteur, les valeurs de koff quant à elles, peuvent varier de plusieurs ordres de grandeur. Les constantes de dissociation des couples ligand/récepteur peuvent ainsi varier entre $10^{-7}$ *et* $6.10^3$ $s^{-1}$ ([17]). Ainsi, c'est principalement le k_off qui engendre les différences sur le Kd. Les valeurs de k_off dépendent essentiellement de la

nature de la stabilisation du couple ligand/récepteur une fois adhéré. La nature de cette stabilisation ainsi que l'énergie associée varient beaucoup selon les couples.
La stabilisation d'un couple peut être (c'est assez souvent le cas) de nature enthalpique et être liée à la création de plusieurs liaisons faibles au sein du complexe. La somme de ces liaisons s'apparente à une enthalpie de liaison qui stabilise le couple ligand/récepteur. Cette enthalpie de liaison compense largement la perte entropique liée au passage de 2 molécules à une seule.

Toutefois, il existe une grande variété dans la stabilisation des complexes. Des articles ([13, 18]) montrent notamment en couplant des expériences de Biacore, de calorimétrie entre autres que des réactions dont l'enthalpie libre de réaction est sensiblement comparable suivent des chemins très différents. Day et al. par exemple ([13])étudient l'interaction de deux petites molécules comparables (4-carboxybenzenesulfonamide (CBS) et 5-dimethyl-amino-1-naphtalène-sulfonamide (DNSA)) avec une enzyme (carbonic hydrase II). Les deux petites molécules ont une enthalpie libre de réaction proche ($\Delta G^0(CBS) = -8.4 kcal/mol$, $\Delta G^0(DNSA) = -8.8 kcal/mol$). Toutefois leur enthalpie de réaction et leur entropie de réaction sont sensiblement différentes $\Delta H^0(CBS) = -11.8 kcal/mol$, $\Delta H^0(DNSA) = -5 kcal/mol$
et $\Delta S^0(CBS) = -11 cal/(mol.K)$, $\Delta S^0(DNSA) = 12 cal/(mol.K)$.

Les entropies de réaction ont donc des signes opposés !
En particulier, l'entropie de réaction du DNSA est positive et sa contribution à l'enthalpie libre de réaction est donc favorable : l'entropie du complexe est plus grande que celle des deux objets séparés. Les auteurs ne proposent pas d'explication à cette tendance. On peut penser à des effets de désolvatation : les ligands excluent des molécules de solvant auparavant liées à l'enzyme. Le solvant regagne donc de l'entropie ce qui est favorable. Des effets de désolvatation importants ont été mis en évidence expérimentalement par Baerga-ortiz ([18]) et ces effets peuvent tout à fait compenser la perte entropique du ligand et du récepteur lors de la formation du complexe. On peut aussi imaginer des effets de vibration ou de fluctuation au sein de l'enzyme modifiés lors de la réaction.

Ainsi, il existe de multiples possibilités pour stabiliser des couples ligands/récepteur. Les énergies mises en jeu varient elles aussi sur près de dix décades. Ceci se traduit dans le k_off des molécules.

De nouvelles manipulations ont vu le jour au milieu des années 1990 qui se sont cette fois ci consacrées non plus à étudier des effets en volume mais à étudier les couples ligand/récepteur individuellement. Il s'agit d'expériences en molécule unique menées en AFM, grâce à des expériences de micropipette ou avec des machines de force.

## I-3 : Expériences en molécule unique sur les couples ligands récepteur :

Les expériences en molécules uniques renseignent sur le taux de dissociation k_off. En effet, la mise en contact des molécules se fait de façon mécanique, que ce soit en AFM, en machine de force ou en micropipettes.
Au début des années 90, le groupe de Gaub a mené des expériences dans lesquelles ils fonctionnalisaient des pointes d'AFM avec des ligands (de la biotine) et approchaient ces pointes de billes d'agarose collées à des substrats et fonctionnalisées avec de la streptavidine.

En contrôlant la force exercée sur la lien grâce à la déflection de la pointe d'AFM, ils ont pu extraire des valeurs de la force du lien entre streptavidine et biotine ([19, 20]).
Ces expériences ont été complétées avec des expériences de micropipettes. Pour contrôler la force, on utilise une vésicule tendue de tension de surface connue comme un ressort. Sur une bille collée à cette vésicule, on applique une force (ici, c'est la force du lien que l'on veut mesurer) en changeant la pression dans la micropipette. La vésicule se déforme sous l'effet de la surpression. Connaissant la tension de la vesicule et en mesurant sa déformation géométrique, on peut en déduire la force qui s'applique sur le lien ([21]).
A le fin des années 90, Evans a mené des expériences de mesure de force de rupture des liens ligand /récepteur [5, 22, 23]. Dans les expériences d'Evans, on applique en fait une rampe de force. La force exercée F sur le lien augmente donc linéairement au cours du temps . On a $F = r * t$ où r est le taux de charge variant typiquement entre 1pN/s et 10 000 pN/s.
Le couple étudié dans les expériences d'evans est le couple biotine/streptavidine dont la constante de dissociation vaut Kd=10^-14mol^-1 en volume.
La biotine est greffée sur une bille de verre maintenue fixe. En vis-à-vis on approche une microbille de verre couverte de streptavidine. La microbille est fortement attachée à un globule rouge qui joue le rôle de ressort. On approche la microbille couverte de streptavidine de la bille de verre biotinilée maintenue fixe. Les concentrations en biotine et streptavidine sont suffisamment basses pour qu'un seul lien biotine/streptavidine puisse se former.

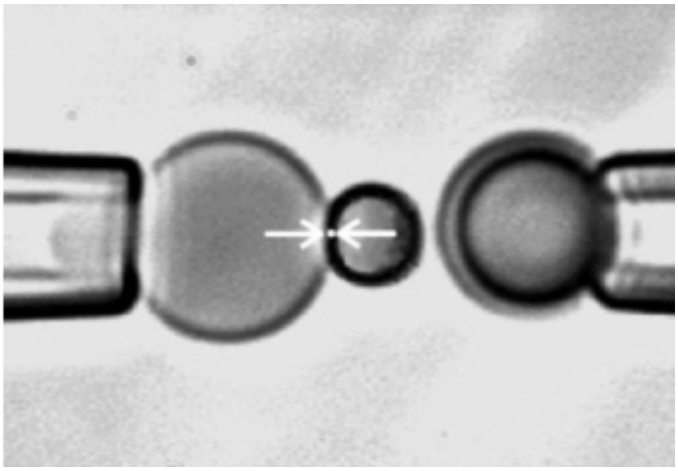


Figure 6 : L'expérience d'Evans : mesure en micropipette de la force de rupture du lien biotine/streptavidine.
La petite bille centrale porte les streptavidines et est fixement attachée au globule rouge à gauche. Le globule rouge joue le rôle de ressort et de capteur de force. A droite, une bille de verre couverte de biotine est fixée à une pointe. Le lien biotine/streptavidine étudié se fait entre petite bille centrale et la bille de droite. Source [5]

Ces expériences ont permis de tracer l'influence du taux de charge sur la rupture du lien. Plus on tire vite sur le lien, plus le lien va casser à une force élevée. Toutefois, on remarque sur la figure ci-dessous que le taux de charge varie sur plusieurs décades tandis que la force de rupture ne change que d'un facteur 10. Le paramètre la plus spectaculairement affecté par l'application d'une force est en fait le temps de vie du lien. Ainsi, le temps de vie diminue exponentiellement avec la force appliquée sur le lien.

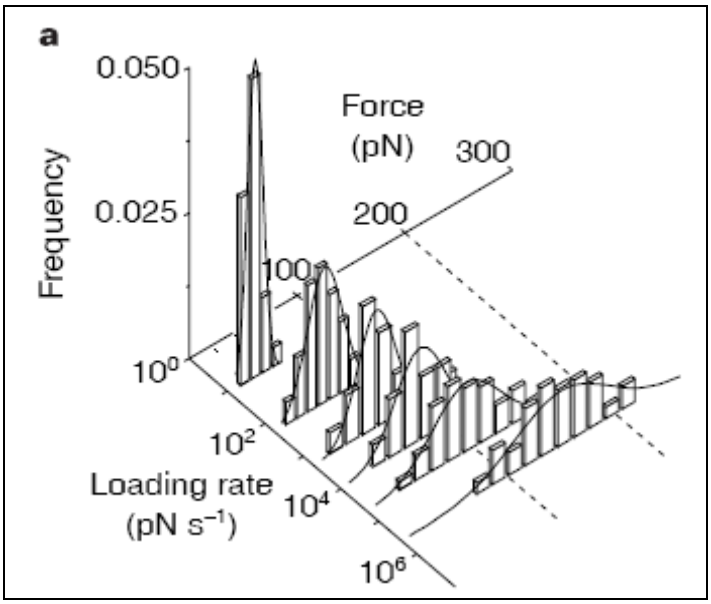



Figure 7 : Force de rupture la plus probable en fonction du taux de charge. Plus le taux de charge est élevé, plus la force de rupture est grande. Toutefois, c'est plutôt le temps de vie du lien qui est diminué sous l'effet d'une force.
Source [5]

Ce résultat important est assez contre-intuitif. On pourrait penser que pour être efficace, le travail F*x (x est la distance pour séparer un ligand d'un récepteur. x est de l'ordre du nanomètre) appliqué sur un lien devrait être de l'ordre de l'énergie d'interaction ligand/récepteur pour avoir un effet. Ces expériences ont montré que dès que le travail Fx devient de l'ordre de kT, le temps de vie du lien varie significativement.

Bell [24], dans son papier de 1978, avait prévu que l'application d'une force sur un lien aurait un effet spectaculaire sur son temps de vie.
La durée de vie d'un couple ligand/récepteur d'énergie Eo peut être écrite en multipliant la péride caractéristique des vibrations moléculaires par un facteur $\exp(\frac{E_0}{kT})$.
Bell a prévu que l'application d'une force F sur un lien corrigerait son temps de vie en :

$$\tau = \tau_0 \exp(\frac{E_0 - Fx_0}{kT})$$

,où x0 est la distance sur laquelle se déplace le ligand et le récepteur pour se séparer. Typiquement, x0 est de l'ordre du nanomètre.
Le temps de vie d'une liaison sous l'application d'une force décroît donc exponentiellement avec la force imposée sur le lien.
Or le temps de vie écrit plus haut n'est rien d'autre que l'inverse du taux de dissociation k_off. Le k_off des couples est donc très sensible aux forces appliquées sur les liens.
Dans l'expression au dessus, on voit apparaître une force caractéristique $F_0 = \frac{kT}{x_0}$.
On peut estimer cette force. En prenant $x_0$=1nm, et avec kT=4,1 pN.nm, on obtient :
$F_0$=4.1pN.
L'application de forces de quelques picoNewtons peut donc faire varier significativement le k_off des couples ligand-récepteur.
Remarquons pour finir que l'échelle de temps à laquelle sont appliquées les forces a une grande importane. En effet, pour briser un lien dans un temps caractéristique de l'ordre de vibrations moléculaires (de l'ordre de la ns), le travail à fournir devra être de l'ordre de E0. A

l'inverse, aux temps très longs, l'agitation thermique sera toujours capable de défaire les liens entre molécules biologiques adhésives.

Conclusion :

Nous conclurons cette partie avec les deux résultats principaux sur l'association des biomolécules. Le k_on des couples ligand/récepteur est principalement sensible à la diffusion. Accrocher les récepteurs sur des surfaces confinées va avoir un effet sur la diffusion des ligands et récepteurs, puisqu'on passe d'une situation 3D à 2D. Le k_on des réactions ligand-récepteur risque donc de s'en voir modifier.
Le k_off quant à lui dépend de la 'profondeur du puits ' dans lequel le couple adhésif se trouve. Le temps de vie moyen des couples est de l'ordre de la milliseconde mais dure près de 10 jours pour certains couples, dont le couple Biotine/streptavidine qui nous a intéressés. Il faut aussi retenir que le k_off est aussi très sensible à l'application de force et voit son temps de vie diminuer exponentiellement lorsqu'on lui applique une force.

Nous allons maintenant nous rapprocher de notre situation expérimentale et étudier les travaux menés sur l'adhésion des couples ligand/récepteurs lorsque ceux-ci sont placés sur des surfaces fluides. Il s'agit d'une situation chimique intéressante et finalement assez nouvelle. Comme nous allons le voir, la description de cette situation est encore très ouverte.

Bibliographie :


1. University_of_Maryland. Available from: http://medschool.umaryland.edu/physiology/biacore.asp.
2. Moore, N., D. Mulder, and T. Kuhl, *Adhesion from Tethered Ligand- Receptor Bonds with Microsecond Lifetimes†*. Langmuir, 2008. **24**(4): p. 1212-1218.
3. Varki, A., *Essentials of glycobiology*. 1999: Cold Spring Harbor Laboratory Pr.
4. Janin, J., *The kinetics of protein-protein recognition.* Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 1997. **28**(2): p. 153-161.
5. Evans, E., *Looking inside molecular bonds at biological interfaces with dynamic force spectroscopy.* Biophysical Chemistry, 1999. **82**(2-3): p. 83-97.
6. Alberts, B., et al., *Molecular biology of the cell. 2002.* New York: Garland Science.
7. von Andrian, U., et al., *Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(17): p. 7538.
8. Tözeren, A. and K. Ley, *How do selectins mediate leukocyte rolling in venules?* Biophysical journal, 1992. **63**(3): p. 700-709.
9. Lawrence, M. and T. Springer, *Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins.* Cell, 1991. **65**(5): p. 859-873.
10. Lakey, J. and E. Raggett, *Measuring protein--protein interactions.* Current opinion in structural biology, 1998. **8**(1): p. 119-123.
11. Myszka, D., *Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors.* Current opinion in biotechnology, 1997. **8**(1): p. 50-57.
12. Drake, A., D. Myszka, and S. Klakamp, *Characterizing high-affinity antigen/antibody complexes by kinetic-and equilibrium-based methods.* Analytical biochemistry, 2004. **328**(1): p. 35-43.
13. Day, Y., et al., *Direct comparison of binding equilibrium, thermodynamic, and rate constants determined by surface-and solution-based biophysical methods.* Protein Science, 2002. **11**(5): p. 1017-1025.
14. Wang, R., et al., *The PDBbind database: methodologies and updates.* J. Med. Chem, 2005. **48**(12): p. 4111-4119.
15. Wang, R., et al., *The PDBbind database: collection of binding affinities for protein-ligand complexes with known three-dimensional structures.* J. Med. Chem, 2004. **47**(12): p. 2977-2980.
16. Northrup, S. and H. Erickson, *Kinetics of protein-protein association explained by Brownian dynamics computer simulation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**(8): p. 3338.
17. Bongrand, P., *Ligand-receptor interactions.* Reports on Progress in Physics, 1999. **62**: p. 921.
18. Baerga-Ortiz, A., et al., *Two different proteins that compete for binding to thrombin have opposite kinetic and thermodynamic profiles.* Protein Science, 2004. **13**(1): p. 166-176.
19. Moy, V., E. Florin, and H. Gaub, *Intermolecular forces and energies between ligands and receptors.* Science, 1994. **266**(5183): p. 257.
20. Florin, E., V. Moy, and H. Gaub, *Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs.* Science, 1994. **264**(5157): p. 415.
21. Simson, D., et al., *Micropipet-based pico force transducer: in depth analysis and experimental verification.* Biophysical journal, 1998. **74**(4): p. 2080-2088.

22. Evans, E. and K. Ritchie, *Dynamic strength of molecular adhesion bonds.* Biophysical journal, 1997. **72**(4): p. 1541-1555.
23. Merkel, R., et al., *Energy landscapes of receptor–ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy.* Nature, 1999. **397**(6714): p. 50-53.
24. Bell, G., *Models for the specific adhesion of cells to cells.* Science, 1978. **200**(4342): p. 618.

II : Adhésion spécifique entre surfaces fluides :

Dans un grand nombre de cas biologiques, les protéines adhésives diffusent en surface des cellules et confèrent à la cellule des propriétés collantes. La réaction chimique est donc placée dans un cadre très différent de la réaction chimique 'classique' en volume. En volume, nous avons vu que la réaction ligand/récepteur est principalement décrite par la diffusion des molécules. Lorsque les molécules sont accrochées à des surfaces, leur diffusion est déjà bien différente puisque l'es molécules ont perdu un degré de liberté en translation. De plus, la rencontre entre molécules dépend de la mécanique des surfaces qui les porte. Des protéines adhésives portées par une surface fluctuant sous l'effet de l'agitation thermique ou par une surface tendue n'auront a priori pas les mêmes probabilités de se rencontrer. Il existe donc un couplage entre réactivité chimique et physique de surface qui va modifier la réaction chimique.
Nous nous sommes placés dans une perspective de physico-chimiste et notre intérêt va se porter sur les expériences et les modèles simplifiés de l'adhésion entre surfaces fluides. Il s'agit donc de comprendre dans des situations contrôlées et réductionnistes vis à vis de la biologie comment des molécules adhésives vont réagir selon la nature des surfaces qui les portent.
Dans cette partie, nous allons décrire les travaux fondateurs et les pistes d'étude de ce domaine de la réactivité entre surfaces fluides.

II-1 : Un matériau incontournable pour la biophysique : les vésicules ou liposomes unilamellaires :

II-1-1 : Description des vésicules :

Un des objets les plus utilisés pour comprendre l'adhésion spécifique entre surfaces sont les vésicules et plus précisément les liposomes unilamellaires. Ils constituent en quelque sorte le niveau zéro de la structure cellulaire, en permettant d'isoler un milieu intérieur aqueux d'un milieu extérieur lui aussi aqueux.
Les liposomes sont des bicouches lipidiques s'organisant à trois dimensions. On classe les liposomes selon leur taille qui peut varier entre quelques dizaines de nanomètres et quelques dizaines de microns. Les petits liposomes appelés SUV (Small Unilmellar Vesicle) de quelques dizaines à centaines de nanomètres sont utilisés en pharmacie pour délivrer des principes actifs ([16]). Dans les expériences de biophysique, on préfèrera utiliser les GUV (Giant Unilamellar Vesicle) dont la taille varie de quelques microns à quelques dizaines de microns. A cette taille, une observation directe en microscopie est possible.

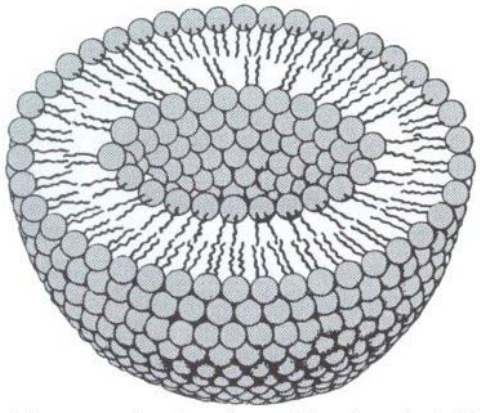



Figure 1 : Structure d'un liposome unilamellaire.[1]

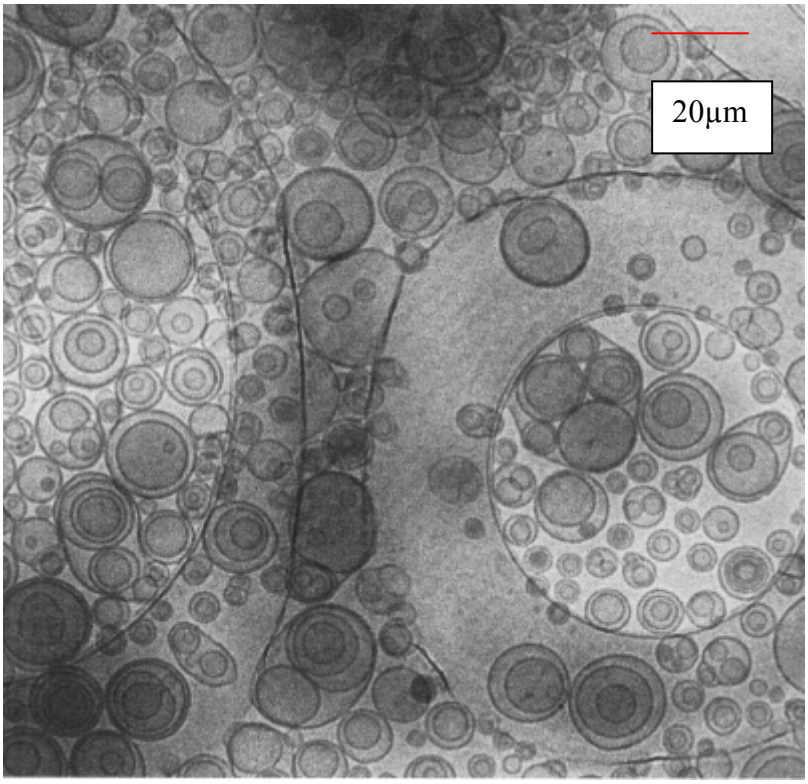



Figure 2 : Observation de liposomes. Dans ce cliché, les liposomes unilamellaires sont assez rares. On se rend compte de la variété de structures que peuvent adopter les bicouches lipidiques lorsqu'elles prennent des structures à trois dimensions. [3]

Par la suite je parlerai systématiquement de vésicules pour désigner les liposomes unilamellaires.

Les composants de base des vésicules sont les lipides à tête hydrophile. Les plus communs sont des phospholipides. De manière générale, il s'agit de molécules amphiphiles. La queue hydrophobe est généralement constituée d'une double chaîne carbonée dont la longueur peut varier (entre 10 et 20 carbones). Ces queues lipophiles peuvent être insaturées (présence de double liaison).
La tête d'un phospholipide est liée aux queues hydrophiles par une fonction glycérol elle-même liée à un groupe phosphate. Ce dernier porte la terminaison hydrophile du phospholipide.
On peut se procurer dans le commerce de multiples types de phospholipides qui permettent selon les proportions, de former des vésicules aux propriétés très différentes.

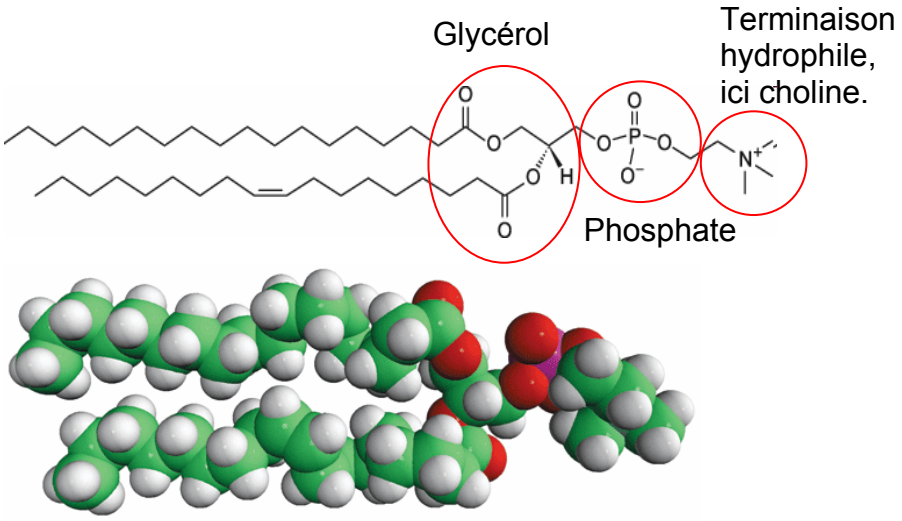



Figure 3 : exemple de phospholipide : **1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine.**
1 insaturation.
Chaîne 18 carbones.
Température transition gel/fluide :6°C
Source [2]

Les bicouches lipidiques présentent une transition de phase liquide/gel à une température critique Tc. En dessous de Tc, les bicouches sont gélifiées, les phospholipides composant la bicouche ne diffusent plus ou très peu sur la membrane. En dessus de Tc, l'agitation thermique redevient suffisante pour que les phospholipides adoptent un mouvement brownien à 2d au sein de la bicouche. Nous n'entrerons pas dans les détails des phases fluides possibles des bicouches. Quand nous caractériserons la fluidité des membranes, on mesurera son coefficient de diffusion.

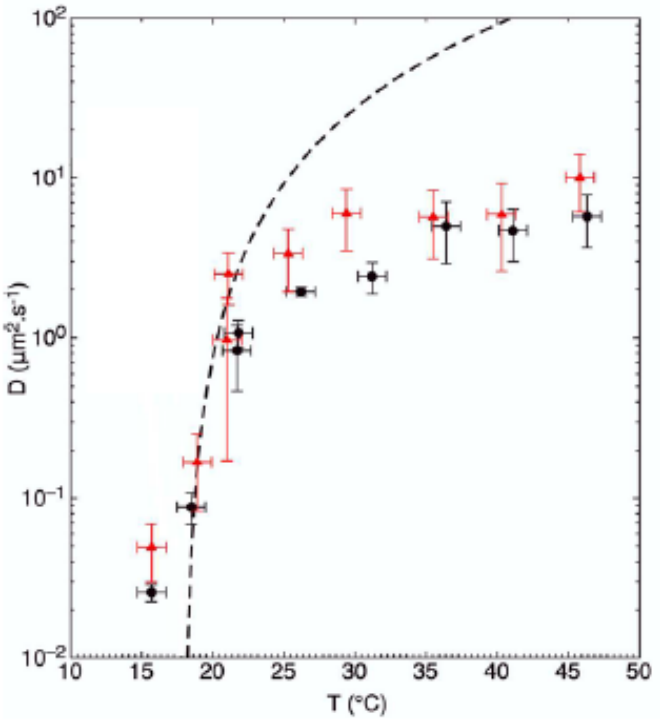



Figure 4: transition de phase du DMPC (C14 ;insaturé) mesurée sur une bicouche supportée (plane). La température de transition de phase est 23°. ([12])

En jouant par exemple sur les longueurs de chaînes et les insaturations, on peut faire varier la transition liquide-gel de plusieurs dizaines de degrés. Un phospholipide à courte queue carbonée (16C) et insaturé a une température de transition de -40°. Un phospholipide à longue chaîne insaturé aura une température de transition de +80°.
Notons d'ores et déjà que le coefficient de diffusion des phospholipides au sein dune membrane fluide varie typiquement entre 1 et 10 μm²/s selon les phospholipides composant la membrane.

Par la suite, on considèrera uniquement des membranes fluides.

### II-1-2 : Energie de surface des vésicules :

Les membranes fluides ont une physique de surface assez complexe notamment à cause de leur capacité à fluctuer. Ce problème a été étudié formellement dans les années 1970 par Helfrich[17] , E.Evans [18], F.Brochard et PG de Gennes [19] entre autres.
Une rapide description de l'énergie de surface des membranes est intéressante car comme nous le verrons, lorsque deux cellules adhèrent, elles se déforment, leur surface augmente et ceci coûte de l'énergie à la vésicule.
L'énergie de surface d'une membrane fluide peut être décomposée en 4 termes (voir figure 5).

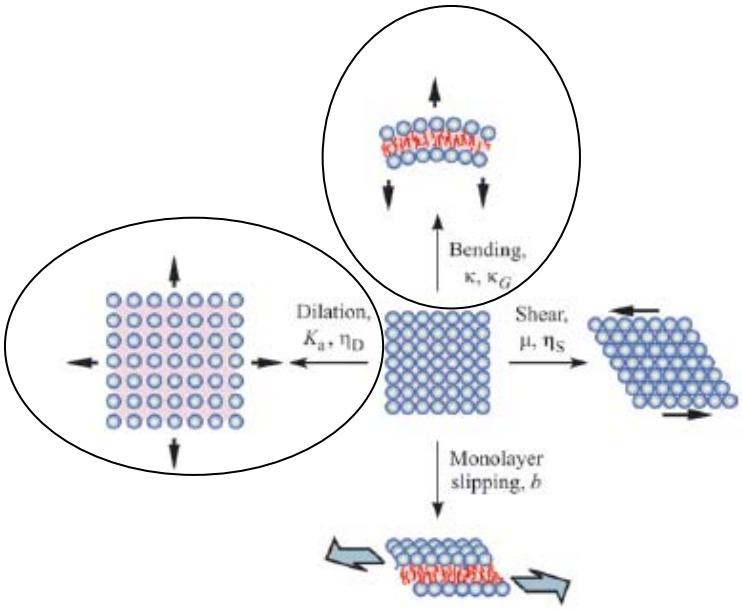



Figure 5 : L'énergie de surface des membranes peut être décomposée en 4 termes :
-une énergie de cisaillement.
-une énergie de friction des deux feuillets l'un sur l'autre.
-une énergie de courbure reliée aux fluctuations de la membrane.
-une énergie de dilatation.
Seules ces deux dernières contributions varient lors de la déformation d'une vésicule.
Source [13]

La surface d'une vésicule est capable de fluctuer lorsqu'elle est détendue. Dans les années 1970, Helfrich [17] fut le premier à décrire formellement ces fluctuations. Celles-ci adviennent lorsque la surface d'une vésicule n'est pas tendue. Alors, sous l'effet de l'agitation thermique et afin de maximiser son entropie, la surface des vésicules est capable d'ondule. Ces fluctuations existent à de multiples longueurs d'onde, entre le nanomètre et le micromètre et une grande partie de ces fluctuations n'est pas observable optiquement. Ainsi, l'aire apparente d'une vésicule non-tendue est en général sous-estimée par rapport à sa surface réelle.
Lorsque l'on fait croître l'aire apparente d'une vésicule, un premier régime consiste à tendre la vésicule en annihilant les fluctuations de membrane. En premier lieu, ce sont les fluctuations de grande longueur d'onde qui sont supprimées, puis les longueurs d'onde de plus en plus petites. Finalement, lorsque toutes les fluctuations sont éteintes, la vésicule est tendue et l'aire apparente de la vésicule correspond à sa surface réelle.
Tendre un liposome a un coût entropique. L'énergie à apporter correspond à la perte d'entropie liée à la supression des fluctuations. On peut définir une tension de surface apparente correspondant à l'énergie à fournir pour supprimer les fluctuations thermiques en surface d'une vésicule. Les expériences ([6]) coïncident bien avec les descriptions théoriques ([20]) et mettent en évidence une relation exponentielle entre la tension de surface σ des vésicules et la variation d'aire apparente $\frac{\Delta A}{A}$ : l'aire de la vésicule varie exponentiellement avec sa tension de surface. Cependant, il suffit d'une tension très faible de l'ordre de 0.1mN/m pour tendre complètement une vésicule.

Dans le domaine entropique, il faut donc retenir deux résultats importants :
-la tension de surface d'origine entropique est inférieure à 0.1mN/m. Cette valeur est assez basse (la tension de surface d'une émulsion est au moins 1mN/m) et il coûte donc assez peu en énergie de déplier une vésicule.
-la tension de surface augmente avec l'aire apparente de la vésicule. Autrement dit, lorsqu'on déplie une vésicule, sa tension de surface augmente.

Une fois la vésicule tendue et les fluctuations de surface supprimées, on passe dans un régime où va intervenir la tension liée à la dilatation. L'origine de cette tension est cette fois ci liée à l'éloignement des phospholipides les uns des autres et donc à une énergie d'interaction entre phospholipides. L'énergie liée à la dilatation est bien plus grande que l'énergie liée au dépliement entropique. La tension de surface dans le régime de dilatation est de l'ordre du mN/m soit de l'ordre de grandeur des tensions de surface des émulsions. Comme dans le cas du régime 'déplié', il faut noter que la tension de surface des vésicules associée à la dilatation dépend de l'aire de la vésicule. Cette fois ci la dépendance est linéaire (voir figure et [6]) mais une fois encore, travailler à tension de vésicule contrôlée est contraignant expérimentalement.

L'augmentation de la surface apparente d'une vésicule se déroule donc en deux étapes bien distinctes et très différentes. Dans un premier temps, on supprime les fluctuations de membrane. L'extension de la surface apparente des vésicules a un coût entropique et la tension de surface associée est basse (inférieure à 0.1mN/m). Lorsque la vésicule est dépliée, on passe dans un régime enthalpique, plus coûteux en énergie, où, pour augmenter l'aire de la vésicule, il faut éloigner les phospholipides les uns des autres.

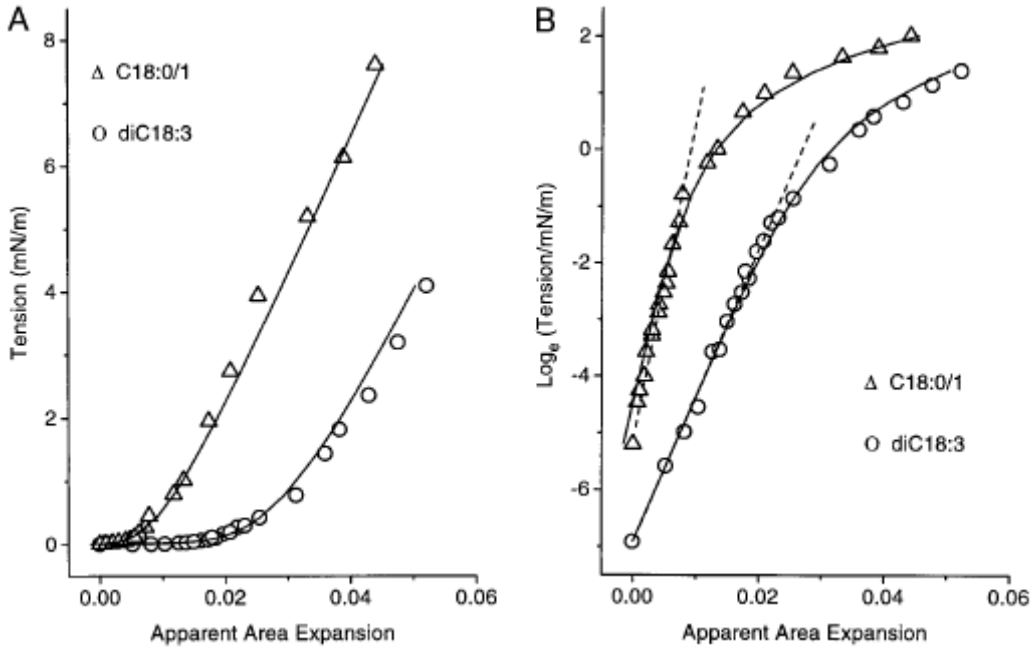



Figure 6 : Mesure en micropipette de la tension de surface apparente d'un liposome en fonction de la variation de l'aire apparente.( [6])
Les mesures vérifient très bien l'existence de ces deux régimes. dans lesquelles sont tracées la tension appliquée sur les liposomes en fonction de la variation d'aire dans deux systèmes d'axe (linéaire et semi-log). On retrouve les deux évolutions prévues:

- à faible variation d'aire, on est dans le régime fluctuant où la variation d'aire a un coût entropique et varie comme le logarithme de la tension appliquée.
- Au-delà d'une variation limite (où le liposome est tendu), on se retrouve dans un cas de tension de surface d'orgine enthalpique où il faut éloigner les phospholipides les uns des autres pour augmenter la taille du liposome. La tension varie linéairement avec la variation d'aire.

En dépit de leur mécanique de surface difficile à contrôler, les vésicules sont un objet de choix pour l'étude biomimétique de l'adhésion cellulaire et naturellement, les premières expériences d'adhésion spécifique biomimétiques ont utilisé ces objets.
Les premières expériences que nous avons pu trouver dans nos recherches bibliographiques remontent à 1986 et furent poursuivies dans le courant des années 90. Nous allons décrire ces expériences fondatrices et décrire l'équilibre statique auquel obéissent les phénomènes d'adhésion spécifique.

## II-2 : Expériences et description des phénomènes d'adhésion spécifique : aspect statique.

### II-2-1 : Les premières expériences d'adhésion spécifique :

Avant de parler de surfaces modèles, on peut signaler les travaux de Chow et Poo datant de 1982 ([5]) qui pour la première fois à ma connaissance, ont pu observer en microscopie de fluorescence un phénomène d'adhésion spécifique. Il s'agissait de l'adhésion entre cellules musculaires de souris dont certaines protéines de surface avaient été marquées. Les auteurs ont pu constater le recrutement de certaines de ces protéines de surface dans la zone de contact pendant l'adhésion cellulaire (figure 7)

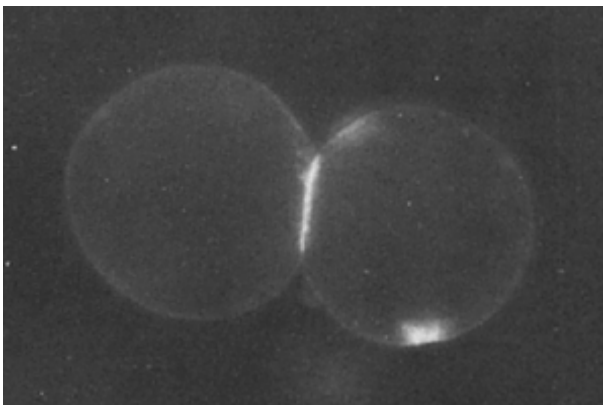


Figure 7 : Observation en microscopie de fluorescence de deux cellules adhésives. On constate un recrutement de certaines molécules de surface dans la zone de contact. Source [5]

Peu après cette observation d'adhésion cellulaire, le même Poo en compagnie de McCloskey se sont tournés vers des expériences biomimétiques et ont opté pour l'utilisation d'une vésicule maintenue par une micropipette.
Ces premières expériences en micropipette remontent à 1986. McCloskey et Poo manipulent un phospholipide avec une micropipette. En surface des phospholipides se trouvent des groupes dinitrophényl (DNP). Les auteurs approchent ces vésicules de cellules portant à leur surface des immunoglobulines (IgE) anti-DNP capables de réagir avec les groupes DNP et portant un marqueur fluorescent.
Au cours du temps, les auteurs ont pu observer le même phénomène que dans le cas précédent des cellules adhérentes : un recrutement des IgE anti-DNP dans la zone de contact.

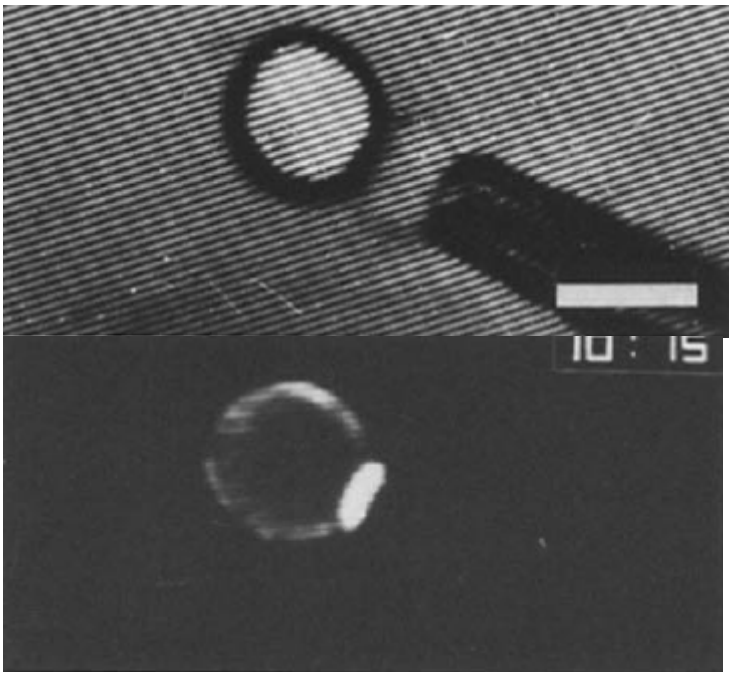



Figure 8 : l'expérience de McCloskey et Poo : une vésicule portant à se surface des goupes DNP et maintenue par une micropipette est approchée d'une cellule portant des IgE anti-DNP fluorescentes. Au cours du temps, les auteurs constatent le recrutement des IgE dans la zone de contact.
Source [10]

Cette première expérience utilisant des vésicules est intéressante puisqu'elle démontre que le recrutement de couples ligand/récepteur dans la zone de contact a bien une origine physico-chimique et n'est pas uniquement dirigée par des effets biologiques.
Ces expériences du début des années 80 apportent donc la preuve que l'adhésion entre deux surfaces fluides va de pair avec un recrutement de molécules adhésives dans la zone de contact. Intuitivement, la réaction ligand récepteur étant favorable énergétiquement, on peut prévoir qu'un certain nombre de protéines va être recruté dans la zone de contact pour que la réaction ait lieu. Il est plus difficile de prévoir en détail combien de ligands vont être recrutés, quel sera le rapport entre la taille du patch et le nombre de couple ligand/récepteur ou bien quels sont les effets qui vont limiter le recrutement des protéines.

Bell dans deux papiers fondateurs [7, 21]fut un des premiers à essayer de décrire les phénomènes d'adhésion avec des équations de physico-chimie.
Nous allons dans le paragraphe suivant décrire en particulier l'article de 1984 [7] qui propose les arguments essentiels et une approche assez générique pour caractériser le recrutement des protéines d'adhésion dans la zone de contact entre deux cellule adhésives. Nous allons confronter à ce modèle une situation formelle assez simple mais dans l'approximation opposée. Ce modèle fut brièvement décrit par de Gennes et al. (Langmuir 2003 [22])

### II-2-2 : Les modèles thermodynamiques.

En 1984,, Bell et al. décrivent leur premier modèle thermodynamique de l'adhésion cellulaire. Nous allons décrire en détail ce modèle : c'est d'une part un exemple significatif des travaux théoriques de biophysique. Par ailleurs, il pose les fondements de la description statique de l'adhésion spécifique entre surfaces fluides.

Dans ce modèle, Bell considère deux objets (cellules) adhésifs. Sur ces deux cellules, on trouve un certain nombre fixé de ligands ou de récepteurs. Ligands et récepteurs sont

susceptibles de réagir entre eux. Une des cellules porte tous les ligands. L'autre cellule porte les récepteurs. Par ailleurs une couche de polymère (glycocalyx) entraîne une répulsion entre les surfaces des cellules lorsqu'elles adhèrent.
Bell va décrire l'évolution des deux cellules adhésives en termes thermodynamiques. Le système considéré est l'ensemble des deux cellules. Au départ les deux cellules sont séparées et n'interagissent pas l'une avec l'autre. Le système va évoluer vers la situation où les deux cellules ont adhéré grâce à la formation de couples ligand/récepteur.

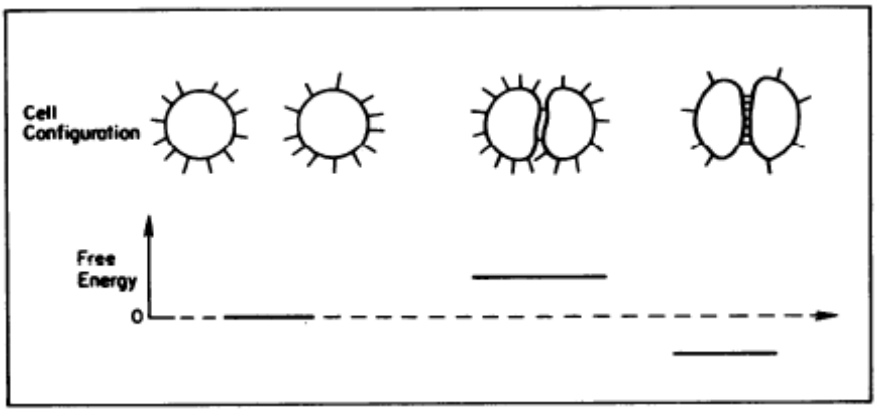



Figure 9 : le système thermodynamique des cellules adhésives. Bell a cherché à déterminer la variation d'enthalpie libre $\Delta G$ entre l'état initial (cellules séparées) et l'état final (cellules collées). Bell et al., Biophys.journal 1984 [7])

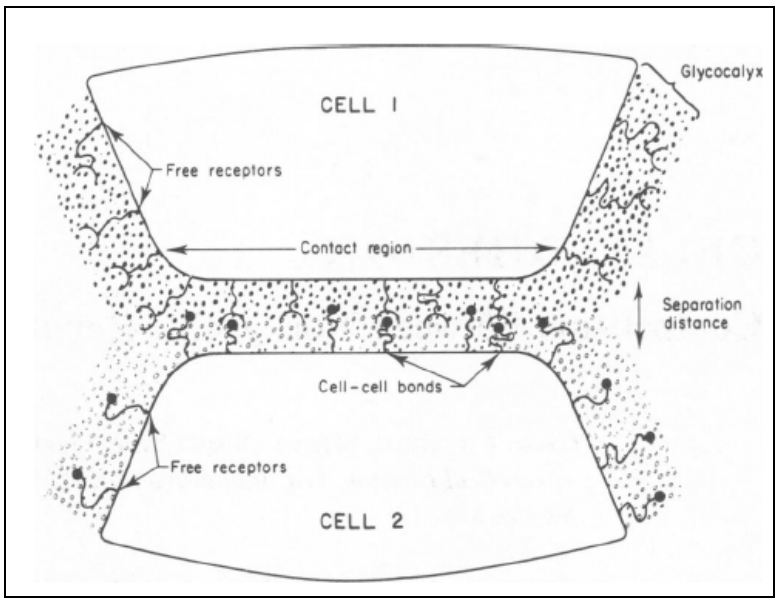



Figure 10 : la représentation de l'adhésion cellulaire selon Bell 1984. Les variables permettant de minimiser l'énergie libre sont la densité de liens (bonds) dans le patch et l'aire du patch (contact region). [7]

Pour mettre en équation ce problème de thermodynamique, Bell écrit en premier lieu l'enthalpie libre du système des cellules adhésives.
Deux contributions sont prises en compte :

- les potentiels chimiques des ligands, des récepteurs et des couples ligand/récepteur.
- Une énergie répulsive liée à la compressibilité d'une couche de polymères sur les surfaces adhésives (cette énergie répulsive représente le 'glycocalyx' cellulaire).

NB : en fait dans son modèle, Bell tenait aussi compte de la distance entre cellules. Je ne tiendrai pas compte de cet aspect ici. Tenir compte simplement du nombre de récepteurs et d'une énergie répulsive apporte déjà de précieuses informations.

L'enthalpie libre du système 'cellules adhésives ' s'écrit comme la somme des différents termes, soit :

$$G = \mu_{ligand_libre} N_{ligand_libre} + \mu_{récepteur_libre} N_{récepteur_libre} + \mu_{lien} N_{liens} + A_{contact} W_{polymère}$$

Les données de départ du problème sont la surface (fixe) A1 et A2 des deux cellules, le nombre total de ligands sur la cellule 1 $N_{LigandsTotal}$, le nombre total de récepteurs sur la cellule 2 $N_{récepteursTotal}$.

Les variables thermodynamiques par rapport auxquelles il va falloir minimiser la variation d'énergie sont : l'aire du contact entre les deux cellules $A_{contact}$ et la densité de liens dans la zone de contact $N_{liens}$.

Pour une résolution complète, il faut exprimer les potentiels chimiques des différentes molécules. Le potentiel chimique d'un composant chimique C dans un système S est défini comme la variation d'énergie libre du système S lorsqu'un ajoute une molécule de C. Le potentiel chimique d'un corps a plusieurs origines :
-une origine enthalpique qui est l'énergie d'interaction du composé avec son environnement.
-une origine entropique qui est la contribution d'une molécule de C à l'entropie du système.

Bell se place dans le cadre des solutions idéales. Ligands, récepteurs et liens diffusent librement, sans interaction entre eux, que ce soit sur la surface libre ou dans la surface de contact. Le potentiel chimique des liens s'écrit par exemple :

$\mu_{liens}([liens]) = \mu_{liens}{}^{0} + kT \ln([liens])$, où $[liens]$ est la densité de surface (ou concentration) des liens.

On peut faire quelques remarques à ce stade :
- dans le cadre des solutions idéales, il n'y a pas de différence entre l'intérieur et l'extérieur du patch pour les ligands libres et les récepteurs libres. Les ligands libres ont la même concentration et le même potentiel chimique standard dans et hors de la zone de contact.
- Bell ne tient pas compte d'éventuels termes d'énergie de surface. Dans son modèle, les surfaces des cellules se déforment sans coût énergétique et la surface totale des cellules reste constante.

En menant les deux dérivations par rapport aux variables du modèle, Acontact et Nliens, Bell peut décrire l'équilibre final du système des cellules collées.
Ces dérivations apportent les résultats suivants.

**<u>Dérivation de l'énergie libre par rapport au nombre de liens :</u>**

La minimisation de l'énergie par rapport au nombre de liens permet d'écrire une loi d'action des masses à deux dimensions. En l'occurrence :

$$\frac{\left(\frac{N_{LigandsTotal} - N_{liens}}{A_1}\right)\left(\frac{N_{récepteurs_total} - N_{liens}}{A_2}\right)}{\frac{N_{liens}}{A_{contact}}} = K_D \sim e^{\left(\frac{\mu_b^0 - (\mu_1^0 + \mu_2^0)}{kT}\right)}$$

$K_D$ est la constante de dissociation à deux dimensions de la réaction ligand/récepteur. Elle est très similaire à une constante de dissociation à 3d si ce n'est que toutes les grandeurs qui interviennent sont définies sur les surfaces (concentrations surfaciques et potentiel chimique des espèces sur les surfaces.). En particulier, Kd est ici en $m^{-2}$ . A trois dimensions, Kd est en mol/L ou ce qui est équivalent à un facteur numérique près, en $m^{-3}$. Dans ce modèle nous n'irons pas plus loin dans la recherche des différences entre Kd à trois dimensions et Kd à deux dimensions. Il faut simplement retenir qu'il est possible de définir dans des situations d'adhésion spécifique entre deux surfaces fluide un Kd qui s'exprime de la même façon qu'à trois dimensions comme un ratio de concentrations (surfaciques).
On voit aussi que la constante de dissociation Kd est reliée à l'énergie d'adhésion des molécules. En effet, on peut écrire :

$K_D \sim e^{\left(\frac{\mu_b^0 - (\mu_1^0 + \mu_2^0)}{kT}\right)}$.

Le terme $\mu_b^0 - (\mu_1^0 + \mu_2^0)$ décrit la différence d'énergie entre un lien et les molécules séparées. Dans l'approximation des solutions idéales, où on ne considère pas d'interactions 'latérales' entre les molécules, cette différence de potentiels chimiques standards est l'énergie d'interaction du couple ligand/récepteur $E_{lien}$.
Des arguments d'homogénéité imposent l'existence d'un préfacteur pour relier $K_D$ et $e^{\left(\frac{\mu_b^0 - (\mu_1^0 + \mu_2^0)}{kT}\right)}$. Comme nous l'avons vu à trois dimensions, le facteur de proportionnalité entre ces expressions est en gros (l'inverse) de la taille occupée par une molécule. Dans un modèle entropique sur réseau, c'est l'inverse de la taille des cases du réseau.
Un premier aspect du modèle de Bell est donc de retrouver dans le cas de réactions entre surfaces fluides une loi d'action des masses quasi-similaire à celle bien connue en volume.

**<u>Dérivation de l'énergie libre par rapport au à l'aire de contact :</u>**

La dérivation de l'énergie par rapport à la surface de contact permet d'écrire un autre résultat important. Dans le modèle de Bell, cette dérivation permet d'écrire :

$W_{polymère} = kT \frac{N_{lien}}{A_{contact}}$.

De manière générale, la dérivation de l'énergie par rapport à la surface peut être scindée en deux : d'une part, les termes liés à la réaction chimiques (les potentiels chimiques), d'autre part, des termes ne dépendant en général pas de la réaction.
Un point important est que la dérivée par rapport à la surface des termes associés au potentiel chimiques (les '$\mu N$') définit la pression osmotique. La pression osmotique apparaît naturellement dans la situation de l'adhésion cellulaire car la zone où a lieu la réaction (la surface de contact) est variable. On peut ainsi écrire :

$\frac{\partial\left(\sum \mu_i N_i\right)}{\partial A_{contact}} = \Delta\Pi$, où $\Delta\Pi$ est la différence de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la zone de contact aussi appelée pression de film ou 'spreading pressure'.
Cette différence de pression osmotique est le moteur de la déformation des cellules ou des vésicules lorsqu'elles adhèrent spécifiquement.
Bell et al., en se plaçant dans le cadre des solutions infiniment diluées retrouvent naturellement le terme en $kT \frac{N_{liens}}{A_{contact}}$ qui est l'analogue surfacique de la pression osmotique

des solutions diluées kT*'Concentration'. (NB : En solution, une approche claire via l'expérience du tube en U peut être trouvée dans le livre de B.Cabanne [23] ).
Dans la situation envisagée par Bell, le seul terme 'chimique' dépendant de la surface de contact est le potentiel chimique des liens. En effet, ce potentiel s'écrit :
$\mu_{liens}([liens]) = \mu_{liens}{}^{0} + kT\ln([liens])$ .
Or,
$[liens] = \frac{N_{liens}}{A_{contact}}$ .
Nb et A sont des variables indépendantes et finalement :
$$\frac{\partial\left(N_{liens}\left(\mu_{liens}{}^{0} + kT\ln(\frac{N_{liens}}{A_{contact}})\right)\right)}{\partial A_{contact}} = -kT\frac{N_{liens}}{A_{contact}}$$

Dans la dérivation de l'énergie par rapport à la surface de contact, ce terme s'équilibre avec les autres termes énergétiques faisant intervenir la surface de contact. Dans le cas de Bell, il s'agit de l'énergie de répulsion entre couches de polymères qui est proportionnelle à la surface de contact. Dans le cas d'objets ayant une tension de surface, la dérivation de l'énergie de surface par rapport à la surface de contact fait apparaître le terme en $\gamma(1-\cos\theta)$ que l'on trouve dans l'équation d'Young. Ainsi, dans le cas de deux gouttelettes dont la tension de surface est constante, on pourra écrire en toute généralité :
$\gamma(1-\cos\theta) = \Delta\Pi$ .
Notons que le cas des vésicules est un peu plus compliqué car leur tension de surface change lorsque la vésicule s'étale.
Ainsi, l'approche de Bell, fortement réductionniste mène à deux résultats importants. Il est d'une part possible de définir une constante de dissociation à deux dimensions ayant la même forme qu'à trois dimensions mais dont les unités diffèrent. Toutefois, ce terme de réaction est cette fois couplé avec un terme nouveau par rapport à une situation à trois dimensions : la réaction chimique et l'apparition de liens dans la zone de contact va créer une différence pression osmotique entre la zone de contact et l'extérieur et va être le moteur de la déformation. Les expressions trouvées par Bell sont valables dans un cadre théorique bien particulier : l'approximation des solutions diluées. Compte tenu du recrutement déjà observé dans les zones de contact, cette approximation est susceptible d'être mise en défaut car le recrutement occasionne une densification des espèces chimiques dans la zone de contact.

La situation opposée est donc elle aussi intéressante et elle peut être décrite assez simplement. La situation opposée est une situation où l'énergie d'interaction entre ligand et récepteur est grande et va rendre négligeable les effets entropiques. Ligands et récepteurs vont alors réagir jusqu'à densifier complètement la zone de contact où a lieu la réaction. Cette situation nous intéresse particulièrement car nous utiliserons le couple biotine/streptavidine dont l'énergie d'interaction est de l'ordre de 35kT. de Gennes, Brochard et Puech (Langmuir 2003 [22]) démontrent l'expression de la pression osmotique dans le cas où l'interaction ligand/récepteur est grande. Les auteurs appellent cette situation le régime dense. La situation envisagée par les auteurs est en fait une situation où, sur les deux surfaces en vis-à-vis, ligands et récepteurs forment déjà une monocouche. La différence de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur due la zone de contact s'écrit alors :
$\Delta\Pi = d_{liens}U_{lien}$ , où $d_{liens}$ est la densité de liens dans le patch et $U_{lien}$ est l'énergie d'un lien.
En effet, jusqu'à maintenant, nous avons écrit :

$\mu_{liens}([liens]) = \mu_{liens}{}^{0} + kT\ln([liens])$ .

Le terme dans le logarithme n'est pas adimensionné. Pour écrire le potentiel chimique plus proprement, il faut convient de définir une surface caractéristique α qui est la surface occupée par une molécule. Cette surface α est exactement le facteur de proportionnalité que l'on a évoqué à la page précédente et qui permet de relier la constante de dissociation et l'exponentielle de l'énergie d'un lien (on a : $K_D = \frac{1}{\alpha} e^{\left(\frac{\mu_b^0 - (\mu_1^0 + \mu_2^0)}{kT}\right)}$) On peut ainsi subdiviser la zone de contact en un nombre de cases :

$N_{cases} = \frac{A_{contact}}{\alpha}$ .

La concentration en liens peut alors s'écrire sans dimension : $[liens] = \frac{N_{liens}}{N_{cases}}$

On imagine une situation où l'interaction entre ligand et récepteur est suffisamment grande pour que ligands et récepteurs soient recrutés dans le patch jusqu'à ce qu'ils forment une monocouche.

Lorsque les liens commencent à remplir le patch, Nliens devient proches de Ncases et le terme dans le logarithme tend vers 1, ce qui l'annule.

La concentration en liens est alors constante et égale au nombre de cases de surface α par unité d'aire. On peut noter $[liens]_{monocouche}$ cette concentration de saturation. Le nombre liens est alors égal à : $N_{liens} = [liens]_{monocouche} * A_{contact}$ .

Alors :

$$\Delta\Pi \sim \frac{\partial N_{liens}\mu_{liens}}{\partial A_{contact}} = \frac{\partial\left([liens]_{monocouche} * A_{contact} * \mu_{lien}^0\right)}{\partial A_{contact}} = [liens]_{monocouche}\,\mu_{lien}^0 .$$

Cette situation est possible si l'énergie des liens est grande donc si $E_{lien} = \mu_{lien}^0 - \left(\mu_{ligand}^0 + \mu_{récepteur}^0\right) \sim \mu_{lien}^0$.

On a donc : $\Delta\Pi \sim E_{lien}[liens]_{monocouche}$

Les deux régimes évoqués ont donc des similitudes mais de profondes différences.

Dans les deux situations, diluée et dense, c'est toujours la constante de la réaction qui va déterminer la quantité de liens spécifiques formés. Cependant, dans le régime dilué, la différence de pression osmotique qui s'apparente à une pression d'étalement des cellules ne va être proportionnelle à la densité de liens que par l'intermédiaire de l'énergie thermique. Pour que ce régime ait lieu, il faut donc que les énergies de surface restent faibles pour ne pas contrecarer la pression d'étalement.

Si des contraintes viennent s'opposer à la déformation, les systèmes adhésifs vont basculer dans une autre situation, la situation dense proposée par de Gennes. La quan tité de liens formée sera encore prédite par la loi d'action des masses mais la pression d'étalement deviendra alors proportionnelle à l'énergie des liens individuels et pourra donc devenir sensiblement plus grande que l'énergie thermique.

Toutefois, le modèle de de Gennes part de situations initiales denses où le régime dilué ne peut advenir.

La situation qui va nous intéresser et la question que l'on va se poser seront un mélange des situations formelles envisagées. Nous considérerons un couple ligand/récepteur à forte énergie, susceptible de former des liens jusqu'à la densification de la zone de contact. Toutefois, dans la situation initiale, ligands et récepteurs seront dilués sur leur surface. Lorsque les surfaces adhèrent, on peut se demander si ligands et récepteurs vont former une

zone de contact dense nous plaçant directement dans le cadre du modèle de de Gennes ou si le sytème adhésif va trouver des états d'équilibres intermédiaires.

Le modèle de Bell a ouvert la voie à de nombreuses possibilités de description thermodynamiques de l'adhésion spécifique. On peut notamment noter les travaux de Seifert et Smith ([24]) qui proposent une approche un peu différente dans leur calcul de l'énergie libre du système adhésif en calculant directement l'entropie de leur système. Dans ce cas, les auteurs imposent une taille de patch et comparent l'effet stabilisant de la création de liens à la perte entropique engendrée (les liens ne peuvent se répartir que dans la zone de contact). La loi d'action des masses de la réaction ligand/récepteur est alors modifiée et doit alors prendre en compte les 'trous', zone où ne sont présent ni récepteur, ni lien, ni ligand.

La modélisation thermodynamique de l'adhésion spécifique est donc un moyen formel puissant pour prévoir les états d'équilibre de bien des systèmes adhésifs. Expérimentalement, il est plus compliqué d'accéder à une description complète des systèmes adhésifs car cela nécessite la quantification de nombreux paramètres.
Cependant, divers travaux expérimentaux ont affiné la caractérisation de l'adhésion spécifique. Nous allons en parler dans le prochain paragraphe.
.

## II-3 : Expériences d'adhésion spécifique sur des systèmes biomimétiques :

### II-3-1 : Expériences en micropipette et mesure d'énergie d'adhésion.

Dans la lignée des travaux de Poo et al. décrits plus tôt, les expériences en micropipette ont été largement été utilisées pour étudier des phénomènes d'adhésion spécifique dans des conditions de plus en plus contrôlées. Les micropipettes permettent d'une part de manipuler les vésicules et de les faire adhérer à l'endroit et au moment voulus.
Par ailleurs, un avantage fort de l'utilisation des micropipettes pour l'étude de l'adhésion spécifique est de pouvoir contrôler et de maintenir constante la tension des vésicules [25, 26]. Couplée à une mesure géométrique de la déformation, contrôler la tension des vésicules permet d'accéder à l'énergie d'adhésion entre deux vésicules grâce à l'équation d'Young : $2\gamma(1-\cos\theta) = E_{adhésion}$.
(nous démonterons cette équation dans le prochain chapitre).

En micropipette, on contrôle la tension des vésicules en contrôlant la dépression entre l'intérieur de la micropipette et l'extérieur ([26]) . Par ailleurs, l'angle de contact entre des vésicules adhésives peut facilement être mesuré optiquement.
On peut donc mesurer une énergie d'adhésion entre deux vésicules et, en l'absence d'énergie non-spécifique adhésive, la relier à la différence de pression osmotique entre la zone de contact et l'extérieur du patch.
Plusieurs séries d'expériences ont apporté des résultats intéressants.

En 1996 Noppl-Simson et Needham ([11]) décrivent une des premières expériences d'adhésion spécifique utilisant des micropipettes. Ils mettent en contact deux vésicules fluides maintenues dans des micropipettes. L'une des vésicules porte des biotines, l'autre des streptavidines. Les auteurs observent l'adhésion spécifique de ces objets avec des méthodes optiques (transmission, fluorescence).

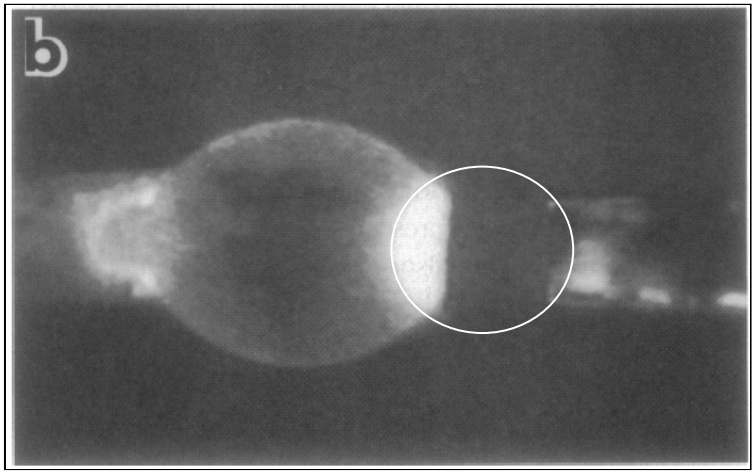



Figure 11 : Expérience de Noppl-Simson et Needham. Deux vesicules, une portant des straptividines fluorescentes l'autre des biotines (entourée en blanc sur la photo) sont mises en contact grâce à des micropipettes. Dans la zone, de contact, très fluorescente, la majeure partie des streptavidine sont recrutées [11]

La déformation des vésicules donne donc accès à la différence de pressions osmotiques entre l'intérieur et l'extérieur de la zone d'adhésion. En utilisant une streptavidine fluorescente, les auteurs ont aussi pu observer le recrutement important des streptavidines dans la zone d'adhésion. Toutefois, avec cette observation transverse à la zone d'adhésion, il est difficile de déterminer les concentrations de ligands dans le patch et donc d'aller plus loin dans la description des pressions osmotiques.

Noppl-Simson et Needham doivent ainsi faire l'hypothèse de solution idéale proposée par Bell pour accéder aux concentrations de liens dans le patch. Cette hypothèse est douteuse particulièrement dans le cas du couple biotine/streptavidine. En effet, il est difficile de savoir dans des expériences comme celles-ci si le patch est dense en couple biotine/streptavidine ou si il reste dilué.

Nam et al. ([4]) ont étudié avec des expériences semblables mais dans les quelles biotine et streptavidine formaient des couches denses. La proportion de streptavidines et de biotines étant proche de la monocouche, $d_{liens} \sim 10000/\mu m^2$. En supposant que l'énergie du lien biotine/streptavidine n'est pas trop modifié dans cette situation, $U_{lien} \sim 30kT$. On a alors $d_{liens}U_{lien} \sim 1mN/m$. Ainsi, si une vésicule a une tension de l'ordre de 0.5mN/m, les vésicules doivent adhérer jusqu'à des angles égaux à 180°.

Nam et Santore ont pu effectivement mesurer des déformations très marquées allant souvent jusqu'à des angles de contact de 180°.

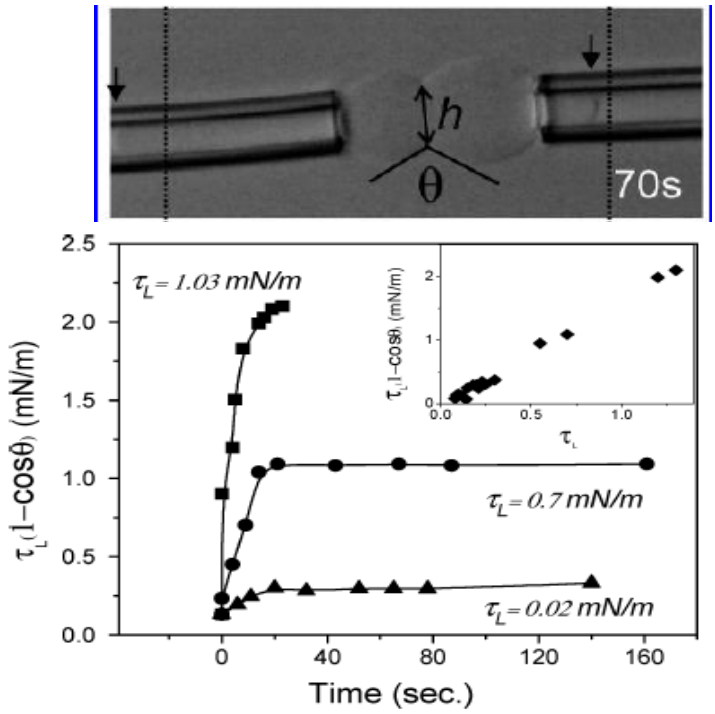



Figure 12 : Expérience de Nam et al [4]. Une des vésicules est fluctuante et peut se déformer tandis que l'autre vésicule est tendue. Les vésicules sont saturées en streptavidine et en biotine.
Dans l'insert, on voit que jusqu'à des tensions de membrane de l'ordre de 2mN/m (de l'ordre de grandeur d'une émulsion), on a : $\tau_l(1-\cos\theta) \sim 2\tau_l$
Les vésicules adhèrent jusqu'à des angles de 180°

Un autre avantage des micropipettes est de pouvoir maintenir les vésicules à une tension assez basse (0.1mN/m et en deça) pour pouvoir observer des situation où l'énergie ligand/récepteur est faible.
Pincet et al. ([27]) ont étudié l'adhésion spécifique d'une vésicule fluctuante sur une bille solide par l'intermédiaire de deux nucléosides (les bases de l'ADN), l'adénosine et la thymidine. Ces deux nucléosides interagissent par deux ou trois interactions hydrogènes et sont peu réactifs (constantes de dissociation de l'ordre de quelques kT soit un temps de vie de l'ordre de la nanoseconde).

Pincet et al. mènent une expérience de micropipettes classique et imposent une faible tension à la vésicule pour pouvoir observer distinctement sa déformation sous l'effet de l'adhésion spécifique. Il peut donc extraire l'énergie spécifique d'adhésion liée à la réaction entre couples de faible énergie dans ses mesures.
Toutefois, les densités de ligands ne sont pas accessibles avec cette mesure et pour remonter à la constante de dissociation de la réaction, il est nécessaire d'ajuster un paramètre, la densité de liens dans la zone de contact. Par ailleurs, en travaillant sur des vésicules fluctuantes, on autorise des fluctuations de membrane qui peuvent avoir un effet peu quantifiable sur les rencontres entre molécules adhésives.

Les expériences en micropipette permettent donc une mesure de l'énergie d'adhésion entre vésicules. Toutefois, l'accès aux densités de ligands dans le patch est malaisé et il est difficile d'estimer la loi d'action des masses avec ces expériences. Par ailleurs, dès que l'on se place dans le régime fluctuant des vésicules, on autorise un effet supplémentaire : les fluctuations de membranes.
L'étude de l'adhésion spécifique en présence de fluctuations de membranes a donné lieu à de nombreux travaux depuis les premières expériences. Ces études utilisent une autre stratégie expérimentale consiste à mener des expériences d'adhésion spécifiques sur substrats plans. Dans ces expériences, la méthodes de mesure de choix est la microscopie interférentielle. En microscopie interférentielle, il est possible de mesurer avec une précision de l'ordre de quelques nanomètres les distances entre vésicules et substrats plans. Par ailleurs, il est

possible de mesurer des effets dynamiques liés aux fluctuations de membrane lors de l'adhésion spécifique (croissance de patch, influence de la diffusion des ligands). Le contrôle de la tension de surface est perdu en utilisant ces techniques. Mais il s'agit aussi d'un axe d'étude un peu différent où il s'agit de retrouver des effets biologiques avec des ingrédients purement physico-chimiques.

### II-3-2 : Adhésion spécifique de liposomes fluctuants sur substrats plans :

Le principe de ces expériences est de mettre en contact des vésicules fonctionnalisées avec des ligands adhésifs sur des substrats plans portants les récepteurs appropriés. Les substrats plans peuvent être de deux types, solides dans le cas de protéines greffées sur des couches de polymère ou liquide si l'on a déposé une bicouche lipidique sur les substrats. La fluidité des bicouches supportées (en tout cas la fluidité du feuillet en solution) est comparable à la fluidité sur des liposomes (quelques $\mu m^2/s$).

Les méthodes expérimentales les plus répandues pour étudier l'adhésion spécifique de vésicules sur substrats plans sont la microcopie interférentielle (Reflection Interference Contrast Microscopy) et la fluorescence.
Pour mener des observations en RICM, on focalise le plan à imager sur la lamelle de verre. Les rayons réfléchis sur la lamelle et les rayons réfléchis sur les objets à imager proches de la lamelle peuvent interférer et selon la distance de l'objet à la lamelle, ces interférences peuvent être constructives ou destructives ce qui apparaît sur une image en RICM comme des zones claires ou sombres. La RICM permet par ailleurs de remonter à la distance relative entre les objets à imager et la surface de verre.

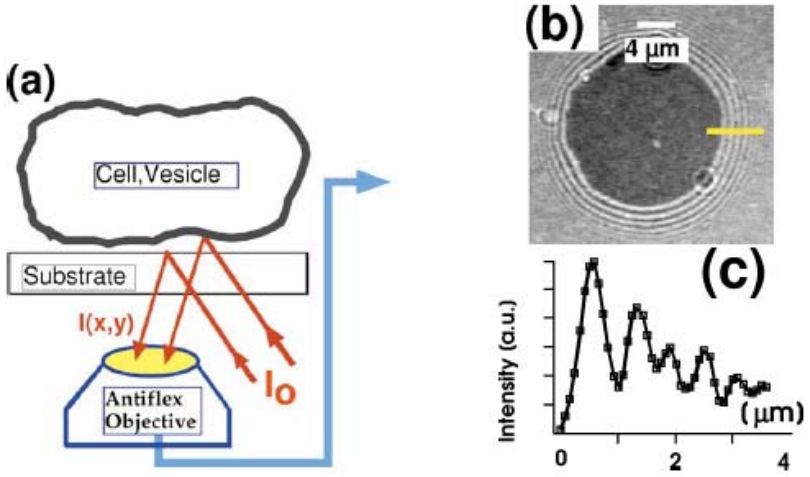



Figure 13: Schéma de principe de la RICM : Image de gauche, observation des anneaux d'interférence créés par le liposome à proximité de la surface. Une analyse des franges d'interférence permet d'accéder à la distance du liposome par rapport à la surface. (source[9])

Dès la fin des années 90, Sackmann et al ont commencé l'étude l'adhésion de liposomes fonctionnalisés avec des membranes lipidiques supportées en RICM ([14, 28]).
Leur étude portait principalement sur des vésicules fluctuantes. Amenant les vésicules par gravité à proximité des substrats, les auteurs ont pu observer que l'adhésion spécifique de ces vésicules fluctuantes avait lieu à partir de différents endroits : les points focaux d'adhésion. Ces points focaux sont des zones denses en couples ligands/récepteurs. En fonction de la densité initiale en ligands et récepteurs, les zones adhésives peuvent alors s'étendre ou rester localisées. Les auteurs ont pu observer l'augmentation de la taille de la zone adhésive avec la densité de ligands et récepteurs.

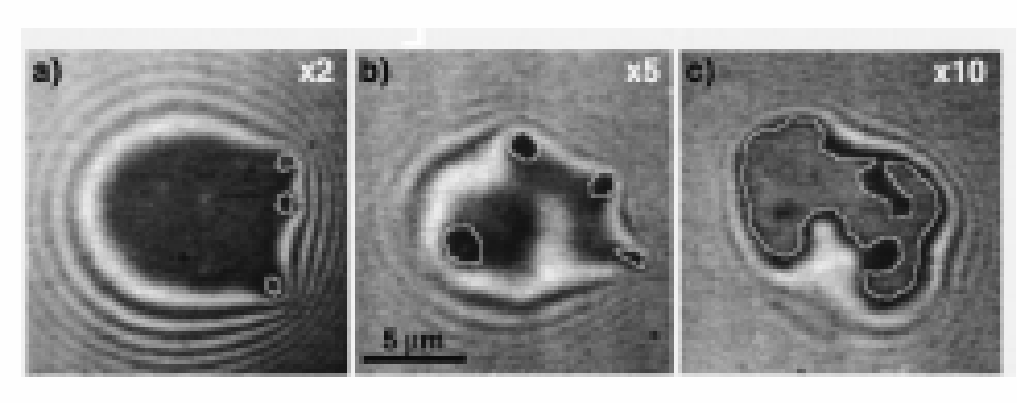



Figure 14 : effet de la densité en protéines adhésives sur la taille des zones de contact d'une vésicule fluctuante sur une bicouche supportée.
On observe la coexistence de 2 types de zones, des zones d'adhésion faible (gris)et des zones d'adhésion forte (entourées en blanc. Plus la concentration en protéines adhésives est grande, plus grandes sont les zones de contact fort. En haut à droite de chacune des images est indiqué la densité de protéines d'adhésion sur les liposomes (en nombre de fois une concentration de référence)
Source [14]

Les expériences de RICM permettent ensuite de sonder localement les équilibres. Ainsi grâce à leurs images en RICM, Bruinsma et al. ([29],[28]) ont établi les relations liant les déformations élastique au niveau des lignes de contact avec l'énergie d'adhésion locale. Ils ont montré qu'il est possible de mesurer localement l'angle de contact et une longueur 'capillaire' comparant module de courbure et tension de surface pour finalement accéder à l'énergie d'adhésion locale des vésicules. Ils ainsi pu montrer que sur un même patch adhésif, l'énergie d'adhésion pouvait varier de plusieurs ordres de grandeur selon les zones d'adhésion. Malheureusement, ces approches expérimentales n'ont pu être couplées avec des méthodes permettant de déterminer localement les densités de protéines mises en jeu.

Les travaux sur vésicules fluctuantes ont pu montrer que la présence d'une couche de polymère répulsive mimant le glycocalyx a une influence considérable sur les situations d'adhésion. Quand la teneur en polymère devient trop grande, l'adhésion spécifique n'est plus possible. Les polymères, mobiles dans les expériences d'adhésion, se répartissent dans la zone entre la vésicule et le substrat avant le collage spécifique. Pour que l'adhésion spécifique ait lieu, il faut que ligands et récepteurs excluent en partie les polymères de la zone d'adhésion pour créer des points focaux d'adhésion. Cela a un coût correspondant à la pression osmotique des polymères dans la zone d'adhésion faible. Si la concentration en polymère devient grande, les ligands et les récepteurs ne peuvent plus être recrutés et engendrer de l'adhésion spécifique.

Par ailleurs, les fluctuations thermiques des vésicules peuvent, dans le cas d'adhésion spécifique médiée par des couples ligands/récepteurs de faible énergie (Ulien<10kT) défaire les zones de contact spécifique ([14]).

Ainsi, les expériences de physico-chimie sur les vésicules fluctuantes permettent de retrouver des effets biologiqus (les points focaux d'adhésion) et de déterminer les conditions dans lesquelles la simple physico-chimie permet d'observer ces effets. Le contrôle des paramètres

mis en jeu permet alors une bonne compréhension et une juste interprétation des effets observés

Plus récemment, Smith et al ([15]) ont utilisé la RICM pour étudier l'effet de la mobilité du substrat lors de l'application d'une force sur une vésicule adhérée.
Les auteurs étudient l'adhésion spécifique de liposomes fluctuants sur des substrats solides (récepteurs fixes) ou fluides (récepteurs mobiles). La zone de contact de vésicules avec le substrat fluctue et fait apparaître une coexistence de zones claires et sombres. Les zones sombres sont des point focaux d'adhésion.
Des études biologiques ont montré que les cellules réagissent sous l'effet d'une force par une consolidation de leur cytosquelette[30]. Cependant, cette consolidation met plusieurs minutes pour avoir lieu. Avec une approche purement physico-chimique, les auteurs ont pu montrer que l'influence d'une force sur une vésicule adhérée permettait de consolider la jonction entre vésicule et substrat.
Lors de l'application d'une force, les zones d'adhésion spécifique de petite taille voient leur surface diminuer. Les liens se condensent alors dans ces plus petites zones d'adhésion. Cette densification des liens s'apparente à une forte hausse de la pression osmotique dans les zones denses. Lors de la relaxation, ces zones grandissent, faisant ainsi augmenter la zone totale de contact et permettant l'apparition de nouvelles zones d'adhésion spécifiques.

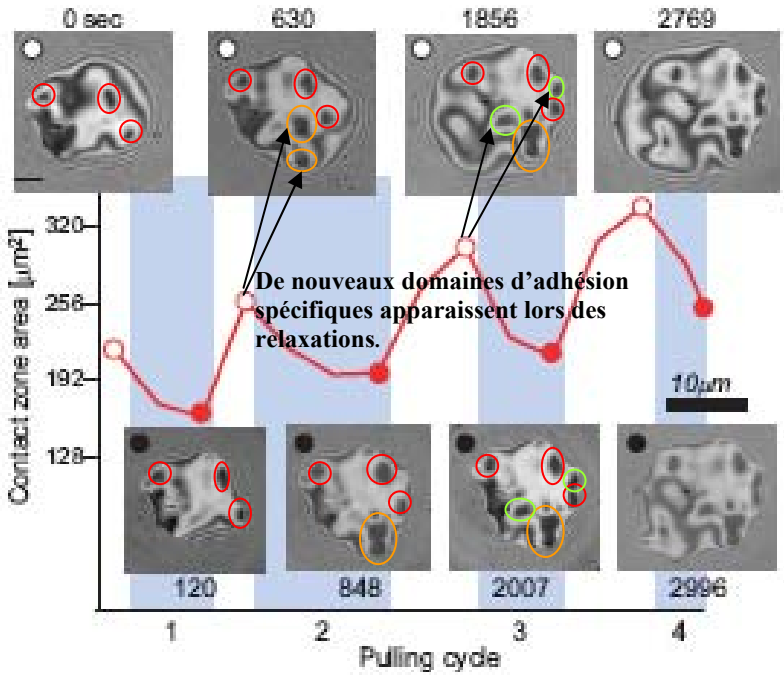



Figure 15 : Observation en RICM de la zone de contact d'une vésicule sur substrat mobile.
L'effet des forces est de permettre l'apparition de nouvelles zones de contact spécifique (entourées en couleur).
La courbe rouge représente l'évolution de la zone de contact totale.
Les zones de contact spécifique sont une fraction de la zone d'adhésion.
Leur taille totale augmente aussi sous l'effet de la force (données non représentées). Source [15]

### II-3-3 : Cinétique d'étalement des liposomes :

Les techniques RICM permet par ailleurs d'observer la dynamique de croissance et de disparition des zones de contact. Un bon exemple de cette utilisation a été publié par Cuvelier et Nassoy [8].
Les auteurs ont suivi l'adhésion d'une vésicule couverte de streptavidine sur un substrat solide présentant des biotines. Le substrat solide est soit couvert de PEG-3400-Biotine (le PEG-3400 a une longueur étirée d'environ 25nm), soit de Caséine biotinilée. En RICM, les auteurs ont

pu suivre la cinétique de cette adhésion spécifique et tracer les profils de leur vésicule adhésive au cours du temps.

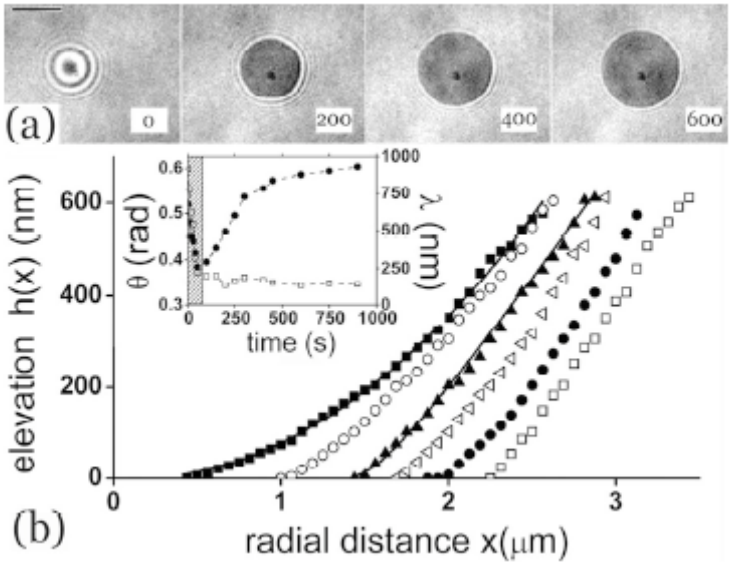



Figure 16 : Cinétique de croissance d'un patch adhésif lors de l'adhésion d'une vésicule greffée streptavidine sur un substrat solide biotinilé. La RICM permet de recalculer la forme de la vésicule pendant l'étalement (graphe principal).et d'accéder à la loi θ(t) (insert).[8]

Dans le cas d'une couverture avec des PEG3400-Biotine et pour des vésicules suffisamment diluées en streptavidine, ils rapportent une loi de croissance du type :

$\theta(t) \sim t^{\frac{1}{2}}$ caractéristique d'une cinétique limitée par la diffusion des ligands vers la zone de contact.

En revanche, dans le cas d'un substrat fonctionnalisé caséine-biotine, la cinétique de croissance est différente : après une loi de croissance θ(t)~t^1/2 aux temps courts, la cinétique devient plus lente et suit une loi en t^2/7.

Cette loi en t^2/7 est expliquée par une réduction du taux d'association k_on entre biotines et streptavidines en l'absence de spacer. Cette hypothèse est confirmée par une expérience supplémentaire dans laquelle les biotines sont adsorbées sur le tapis de caséine via un PEG-3400. Les auteurs retrouvent alors des loi en t^1/2.

Les expériences en RICM sur les vésicules fluctuantes sont une approche moins réductionniste que celle que nous avons pu employer. Ces techniques ont mis en évidence avec des ingrédients purement physico-chimiques des phénomènes biologiques importants. Les points focaux d'adhésion retrouvés dans des situations biologiques [31] apparaissent dans les expériences d'adhésion spécifique avec les vésicules fluctuantes. Des effets de compétition entre la pression osmotique des couches de polymère et la densification des ligands dans les points focaux d'adhésion ont pu être mis à jour. Par ailleurs, ces techniquess permettent de sonder très localement les zones de contact aux formes peu régulières et d'en tirer des énergies d'adhésion locales. Nombre de couples adhésifs ont pu être sondés avec le système modèle (vésicules géantes+bicouches supportées) et le contrôle des paramètres lors des expériences (concentrations initiales de ligands et de récepteurs ou de polymères répulsifs ) permet de mieux comprendre ces phénomènes. ([14, 32, 33]).

Notre approche sera un peu différente. Nous avons voulu mettre en place une expérience d'adhésion spécifique sur un système volontairement simple afin de pouvoir comparer en détails les prévisions des modèles thermodynamiques énoncés auparavant. Il s'agira donc d'aller vérifier s'il est possible de caractériser l'énergie d'adhésion avec les densités de protéines mises en jeu. Nous essaierons aussi d'accéder à une constante de réaction de notre système.

Accéder à des constantes de réaction à deux dimensions entre surfaces fluides a déjà fait l'objet d'étude notamment dans le groupe de Dustin et al.. en utilisant des méthodes de fluorescence. Les méthodes de fluorescence sont intéressantes car moyennant quelques précautions, elles permettent de quantifier assez sensiblement des densités de ligands ou de récepteurs fluorescents. Nous allons ici reporter les expériences du groupe de Dustin et Zhu qui ont effectué des expériences de Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP).

II-3-3 : Mesure de constantes cinétiques dans les zones d'adhésion spécifique en fluorescence et en FRAP :

Dustin et Zhu ont publié de nombreux articles sur des techniques de FRAP dans les zones adhésives ([34, 35]). Contrairement aux travaux évoqués jusqu'alors, Dustin et al. ont une approche la plus biologique possible et en l'occurrence étudient l'adhésion de cellules sur des bicouches lipidiques planes.
Pour décrire leurs expériences, les auteurs se servent sans préambule de la loi d'action des masses proposée par Bell et écrivent :

$$\frac{[ligands_libres][récepteurs_libres]}{[liens]} = K_D .$$

Connaissant les quantités initiales de ligands et de récepteurs sur les cellules, les auteurs accèdent ainsi à des valeurs de constante de dissociation entre deux immunoglobulines (CD2 et CD58) lors de l'adhésion de lymphocytes ou de globules rouges greffés sur des bicouches planes.
Leur valeur reportées sont de l'ordre de Kd=5+/-1/µm². Les auteurs montrent que les différents types de cellules n'ont pas le même Kd. D'ailleurs, les auteurs comparent les valeurs à un article précédent dans lequel la valeur du Kd pour le même couple ligand/récepteur et pour les mêmes cellules était sensiblement plus basses (les auteurs avaient obtenu Kd=1/µm²).
Ces mesures sont intéressantes, toutefois, cette approche biologique semble dépendante des types de cellules voire des souches de cellule utilisées. Il est donc difficile de déterminer quelles sont les causes des différences observées. Par ailleurs, la mesure de constantes de dissociation à deux dimensions entre surfaces fluides étant assez récente et les valeurs reportées assez rares, il est encore difficile d'interpréter les valeurs obtenues. On peut présupposer que le fait de diffuser à deux dimension va modifier le k_on des réaction. On peut aussi penser que des effets locaux de tension peuvent modifier le k_off. En approchant ce problème avec des cellules dont on ne contrôle pas grand-chose, il est toutefois difficile de vérifier ces hypothèses. D'ailleurs, si les constantes mesurées varient d'un système à l'autre, on peut se demander dans quelle mesure les résultats obtenus sont généralisables. Il est intéressant d'obtenir des ordres de grandeur sur les systèmes à deux dimensions. Cependant, il semble qu'une approche plus réductionniste permettra de mieux comprendre les paramètres importants de l'adhésion entre surfaces fluides.

Conclusion :

Dans ce travail de thèse, nous avons ainsi opté pour une approche très franchement physico-chimique et assez éloignée de la biologie. L'adhésion cellulaire est même assez loin. Il s'agit plutôt d'essayer de comprendre comment fonctionne l'adhésion entre surfaces fluides sur un système modèle bien contrôlé. Notre outil de travail sera donc des gouttelettes d'émulsion que nous fonctionnalisons avec des protéines. Ces gouttelettes ont une physique de surface assez simple bien décrite par leur tension de surface. Nous allons dans le prochain paragraphe apporter quelques éléments sur la physico-chimie des émulsions en particulier sur la possibilité de mesurer aisément des énergies d'adhésion. Nous décrirons aussi les premiers résultats obtenus sur l'adhésion spécifique de ce système modèle.

Bibliographie :


1. www.dadairs.com/Images/Liposome_structure.jpg.
2. http://www.avantilipids.com/.
3. www.cryomicroscopygroup.org.uk/liposome.jpg.
4. Nam, J. and M. Santore, *The adhesion kinetics of sticky vesicles in tension: The distinction between spreading and receptor binding.* Langmuir, 2007. **23**(21): p. 10650-10660.
5. Chow, I. and M. Poo, *Redistribution of cell surface receptors induced by cell-cell contact.* Journal of Cell Biology, 1982. **95**(2): p. 510.
6. Rawicz, W., et al., *Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers.* Biophysical journal, 2000. **79**(1): p. 328-339.
7. Bell, G., M. Dembo, and P. Bongrand, *Cell adhesion. Competition between nonspecific repulsion and specific bonding.* Biophysical journal, 1984. **45**(6): p. 1051-1064.
8. Cuvelier, D. and P. Nassoy, *Hidden dynamics of vesicle adhesion induced by specific stickers.* Physical Review Letters, 2004. **93**(22): p. 228101.
9. Bruinsma, R. and E. Sackmann, *Bioadhesion and the dewetting transition.* Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series IV-Physics, 2001. **2**(6): p. 803-815.
10. McCloskey, M. and M. Poo, *Contact-induced redistribution of specific membrane components: local accumulation and development of adhesion.* Journal of Cell Biology, 1986. **102**(6): p. 2185.
11. Noppl-Simson, D. and D. Needham, *Avidin-biotin interactions at vesicle surfaces: adsorption and binding, cross-bridge formation, and lateral interactions.* Biophysical journal, 1996. **70**(3): p. 1391-1401.
12. Scomparin, C., et al., *Diffusion in supported lipid bilayers: Influence of substrate and preparation technique on the internal dynamics.* The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological Physics, 2009. **28**(2): p. 211-220.
13. Dimova, R., et al., *A practical guide to giant vesicles. Probing the membrane nanoregime via optical microscopy.* Journal of Physics: Condensed Matter, 2006. **18**: p. S1151.
14. Bruinsma, R., A. Behrisch, and E. Sackmann, *Adhesive switching of membranes: experiment and theory.* Physical Review E, 2000. **61**(4): p. 4253-4267.
15. Smith, A., et al., *Force-induced growth of adhesion domains is controlled by receptor mobility.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(19): p. 6906.

16. Gabizon, A. and D. Papahadjopoulos, *Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988. **85**(18): p. 6949.
17. Helfrich, W., *Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments.* Zeitschrift für Naturforschung. Teil C: Biochemie, Biophysik, Biologie, Virologie. **28**(11): p. 693.
18. Evans, E. and W. Rawicz, *Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes.* Physical Review Letters, 1990. **64**(17): p. 2094-2097.
19. Brochard, F., P. De Gennes, and P. Pfeuty, *Surface tension and deformations of membrane structures: relation to two-dimensional phase transitions.* Journal de Physique, 1976. **37**(10): p. 1099-1104.
20. Fournier, J., A. Ajdari, and L. Peliti, *Effective-area elasticity and tension of micromanipulated membranes.* Physical Review Letters, 2001. **86**(21): p. 4970-4973.
21. Bell, G., *Models for the specific adhesion of cells to cells.* Science, 1978. **200**(4342): p. 618.
22. De Gennes, P., P. Puech, and F. Brochard-Wyart, *Adhesion induced by mobile stickers: A list of scenarios.* Langmuir, 2003. **19**(17): p. 7112-7119.
23. Cabane, B. and S. Henon, *Liquides: solutions, dispersions, émulsions, gels.* Belin, Paris, 2003.
24. Smith, A. and U. Seifert, *Vesicles as a model for controlled (de-) adhesion of cells: a thermodynamic approach.* Soft Matter, 2007. **3**(3): p. 275-289.
25. Evans, E., *Analysis of adhesion of large vesicles to surfaces.* Biophysical journal, 1980. **31**(3): p. 425-431.
26. Simson, D., et al., *Micropipet-based pico force transducer: in depth analysis and experimental verification.* Biophysical journal, 1998. **74**(4): p. 2080-2088.
27. Pincet, F., et al., *From macroscopic adhesion energy to molecular bonds: a test of the theory.* Physical Review Letters, 2001. **87**(17): p. 178101.
28. Albersdörfer, A., T. Feder, and E. Sackmann, *Adhesion-induced domain formation by interplay of long-range repulsion and short-range attraction force: a model membrane study.* Biophysical journal, 1997. **73**(1): p. 245-257.
29. Zuckerman, D. and R. Bruinsma, *Statistical mechanics of membrane adhesion by reversible molecular bonds.* Physical Review Letters, 1995. **74**(19): p. 3900-3903.
30. Balaban, N., et al., *Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates.* Nature cell biology, 2001. **3**(5): p. 466-472.
31. Alberts, B., et al., *Molecular biology of the cell. 2002.* New York: Garland Science.
32. Lorz, B., et al., *Adhesion of giant vesicles mediated by weak binding of sialyl-LewisX to E-selectin in the presence of repelling poly (ethylene glycol) molecules.* Langmuir, 2007. **23**(24): p. 12293-12300.
33. Reister-Gottfried, E., et al., *Dynamics of specific vesicle-substrate adhesion: from local events to global dynamics.* Physical Review Letters, 2008. **101**(20): p. 208103.
34. Zhu, D., et al., *Analysis of two-dimensional dissociation constant of laterally mobile cell adhesion molecules.* Biophysical journal, 2007. **92**(3): p. 1022-1034.
35. Tolentino, T., et al., *Measuring diffusion and binding kinetics by contact area FRAP.* Biophysical journal, 2008. **95**(2): p. 920-930.

III- Adhésion spécifique de gouttelettes d'émulsion :

Nous avons durant cette thèse et à l'aide du travail de J.Fattaccioli, fabriqué un système d'adhésion spécifique original n'utilisant pas de vésicules. Pour 'mimer' les cellules, nous avons fonctionnalisé des gouttelettes d'émulsion micrométriques avec des protéines d'adhésion. La physique des gouttelettes d'émulsion est différente et plus simple que celle des vésicules ou des cellules. En particulier, l'énergie de surface des gouttelettes d'émulsion est uniquement contrôlée par leur tension de surface qui reste constante dans un tampon donné. Nous allons ici revenir sur les équations classiques du mouillage qui décrivent la physique des gouttelettes d'émulsion.

III-1 : Généralités sur les émulsions :

Nous avons utilisé dans ce travail des émulsions simples directes. Une émulsion simple directe est une dispersion de gouttelettes d'huile micrométriques dans une phase aqueuse. Les gouttelettes d'huile sont stabilisées par la présence de surfactants à leur surface. Les surfactants sont des molécules amphiphiles c'est-à-dire constitués d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe. Les surfactants permettent d'éviter la coalescence des gouttes. La coalescence de gouttelettes advient lorsque des pores suffisamment s'ouvrent entre les gouttes et entraîne leur fusion. Les surfactants vont avoir tendance à s'opposer à la croissance des pores pouvant apparaître entre les gouttes et ainsi empêcher la coalescence des gouttes. Pour stabiliser une émulsion directe par exemple, les surfactants doivent avoir une partie hydrophile plus 'grosse' que leur partie hydrophobe. Ainsi, leur courbure naturelle est orientée vers l'huile et lors de l'ouverture d'un pore entre deux gouttes, leur courbure va s'opposer à la courbure vers l'eau apparraissant avec le pore.

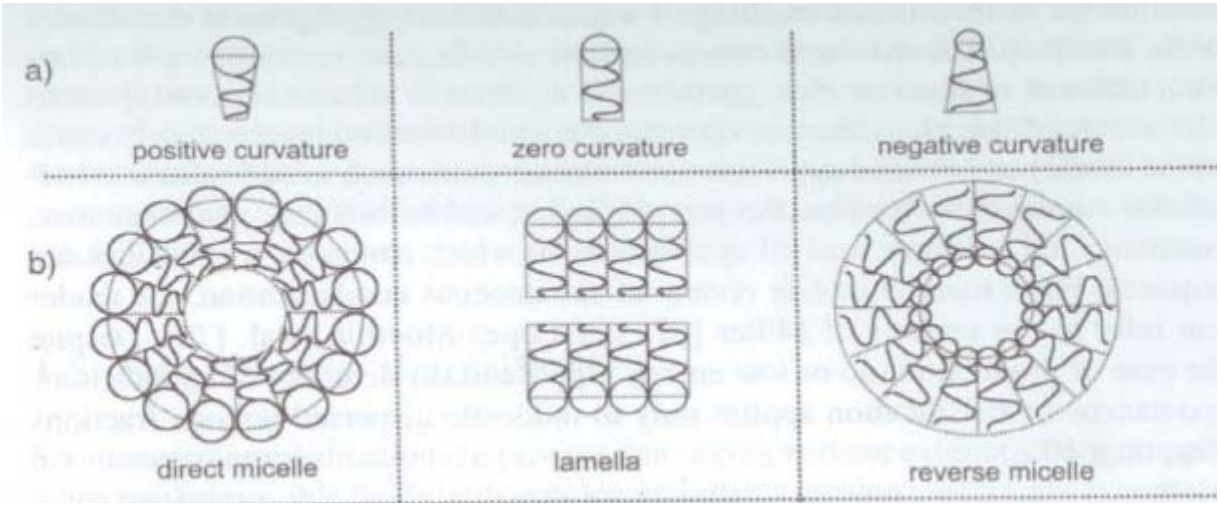



Figure 5 : effet de la géométrie des surfactants sur leur organisation sous forme de micelles. Les micelles sont des structures à trois dimensions que forment naturellement les surfactants en solution en dessus d'une concentration critique. Source [1]

De par leur géométrie (grosse tête hydrophile), les surfactants stabilisant une émulsion directe sont solubles dans l'eau. Lorsqu'on les dilue dans l'eau, il existe une concentration critique au-delà de laquelle les surfactants s'organisent en micelles (voir figure). Au-delà de cette concentration critique, la concentration en surfactants libres en solution va rester constante et

la quantité de micelles va augmenter. En dessus de la concentration micellaire critique (cmc), les micelles constituent donc un réservoir de surfactant en cas d'un excès de surface entre émulsion et phase aqueuse.
Un des effets parallèles de la couverture de surfactants à la surface des gouttelettes d'huile va être la diminution de la tension de surface des émulsions. L'énergie d'interaction des surfactants en surface des gouttes est plus grande que l'énergie d'interaction de molécules d'huile avec une phase aqueuse. Ainsi, la tension de surface des émulsions est abaissée.

Des valeurs typiques de tension de surface de gouttelettes d'émulsion couvertes par un film de surfactant va être de l'ordre de quelques mN/m, ordre de grandeur comparable à la tension de surface des vésicules dans leur régime enthalpique.
Toutefois, à la différence des vésicules, la tension de surface des émulsions est constante.

III-2 : Interactions entre gouttes d'émulsion :

Le modèle le plus simple pour décrire les interactions entre gouttelettes prend en compte les interactions de Van der Waals et des interactions électrostatiques. C'est le modèle DLVO. Ce modèle prédit, selon l'ampleur des interactions de Van der Waals, la charge des surfaces et la force ionique de la solution, l'agrégation ou la séparation des gouttelettes, et dans le cas de l'agrégation la distance d'équilibre des gouttelettes entre elles.
D'autres interactions peuvent exister, parmi les interactions bien connues dans les émulsions, notons les interactions de déplétion provenant de la coexistence d'objets de tailles différentes et induisant des interactions de volume exclu d'origine entropique.
Un autre type d'interactions (Poulin, Bibette PRL 97 [2]) peut être dû à la formulation des émulsions dans une phase continue mixte. Cette phase continue mixte est un mélange d'un bon et d'un mauvais solvant pour les surfactants. Lorsque la teneur en mauvais solvant devient grande, il devient énergétiquement très défavorable pour les surfactants de rester en solution. La pression en surfactants va alors augmenter sur les gouttes. Lorsque deux gouttes se trouvent en contact, elles vont adhérer entre elles. En effet, la zone de contact entre les gouttes est très favorable pour les surfactant car le contact avec le solvant est très atténué. Dans ces situations, on observe l'apparition d'angles de contact très grands pour que les surfactants abaissent leur énergie.
Quel que soit le moteur de l'adhésion entre gouttelettes, il est toujours possible d'utiliser l'équation d'Young-Dupré pour déterminer l'énergie d'adhésion entre gouttelettes.
On peut établir l'équation d'Young de nombreuses façons. Ici, nous allons opter pour une approche thermodynamique dans l'esprit du modèle de Bell. Nous allons écrire l'énergie du système des deux gouttes et minimiser cette énergie par rapport aux variables du modèles. Le minimum correspondra à l'état d'équilibre.

III-3 : Détermination thermodynamique de l'équation d'Young-Dupré :

On considère donc le système thermodynamique constitué de deux gouttes d'émulsion dans leur solvant. Les gouttes liquides ont un volume constant (ce n'est plus vrai pour des vésicules).
Ces deux gouttes peuvent adhérer l'une à l'autre avec une énergie d'interaction E(>0) par unité de surface de zone adhésive. Nous ne faisons ici aucune hypothèse sur la nature de cette interaction. On considère juste que les gouttes lorsqu'elles se rapprochent se trouvent à une distance d'équilibre et qu'une énergie de surface attractive peut alors se développer.
Les gouttes sont initialement sphériques et prennent une forme de sphère tronquée lorsqu'elles adhèrent (voir figure 1).

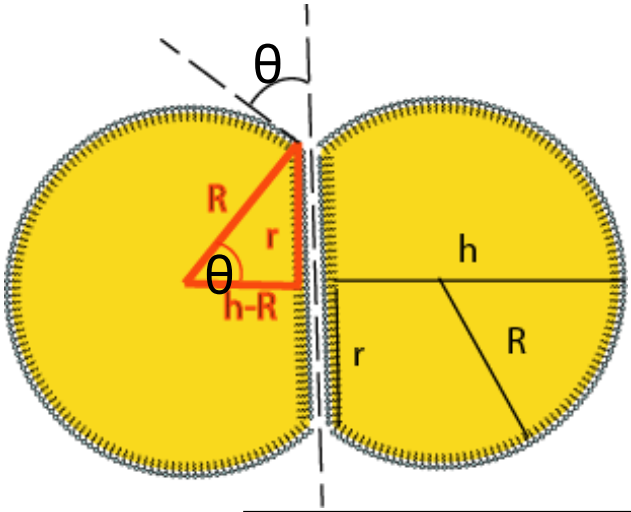



Figure 6 :
Paramétrage des gouttelettes adhésives. Il faut faire attention à la définition de théta qui peut être défini différemment notamment dans la physique du mouillage.

L'énergie libre du système des deux gouttes adhérées peut s'écrire de la façon suivante :

$$F = 2\gamma * A + (2\gamma - E)\pi r^2$$

où :
γ est la tension de surface des gouttes libres dans le solvant.
A est l'aire des sphères tronquées, patches exclus. On a, avec les notations de la figure. : $A = 2\pi Rh$
r est le rayon du patch adhésif.

Donc :

$$F = 2\gamma * 2\pi Rh + (2\gamma - E)\pi r^2$$

En exprimant les paramètres géométriques entre eux et une feinte de calcul (transformation de Lagrange), on peut finalement exprimer l'énergie libre en fonction de deux paramètres d'espace (détails en annexe en fin de chapitre). L'annulation des dérivées permet d'obtenir l'équation d'Young :

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

Cette approche thermodynamique conduit de la même façon qu'un bilan de forces sur la ligne de contact à l'équation d'Young-Dupré.

Pour étudier l'adhésion spécifique des émulsions, l'équation d'Young-Dupré est intéressante puisque, en mesurant la déformation de la goutte et connaissant sa tension de surface, je pourrai accéder à l'énergie d'adhésion de la goutte. Comme la tension de surface des gouttes d'émulsion est quasi-constante, je ne serai pas contraint, comme dans le cas des vésicules, à utiliser des micropipettes et pourrait directement faire coller les gouttes sur des substrats plans tout en connaissant leur tension.

III-4 : Adhésion spécifique de gouttelettes d'émulsion sur substrats solides : le travail de Jacques Fattaccioli.

Jacques a mis au point le protocole de greffage que nous reprendrons dans la prochaine partie. Il est donc possible de greffer de la streptavidine sur les gouttelettes d'émulsion à des densités de quelques centaines de streptavidines par μm². Les streptavidines sont libres de diffuser en surface des émulsions.
Jacques, dans sa thèse a mis au point des lamelles fonctionnalisées avec un tapis de polymères hydrophiles, des PolyEthylène Glycol dont une certaine proportion portait des biotines. Il a ainsi pu étudier l'adhésion spécifique de ces gouttelettes sur ces substrats.
Un des premiers constats fut l'existence d'une interaction non-spécifique entre gouttelettes fonctionnalisées et substrat PEG. Sans même autoriser la création de liens spécifiques, Jacques a pu observer le recrutement des streptavidines dans la zone de contact jusqu'à une concentration de saturation. L'énergie d'adhésion des gouttes calculée en mesurant la déformation de la goutte était en revanche très faible. Sur substrats solides, l'existence d'une interaction non-spécifique même faible entre streptavidine et substrat solide, suffit pour recruter une densité de streptavidine constante dans la bicouche. En ajoutant une proportion de biotines sur le substrat, Jacques a pu observer une nette augmentation de l'énergie d'adhésion (angle de contact bien plus grand), signe que des liens spécifiques se formaient.
En revanche, la densité de streptavidine dans la bicouche restait toujours identique, le recrutement de streptavidine jusqu'à une concentration de saturation étant toujours assuré par l'interaction non-spécifique entre streptavidine et PEG. La concentration en streptavidine estimée par jacques était de l'ordre de 3000/μm². A cette concentration, les streptavidines recrutées semblent se trouver dans une phase gel.

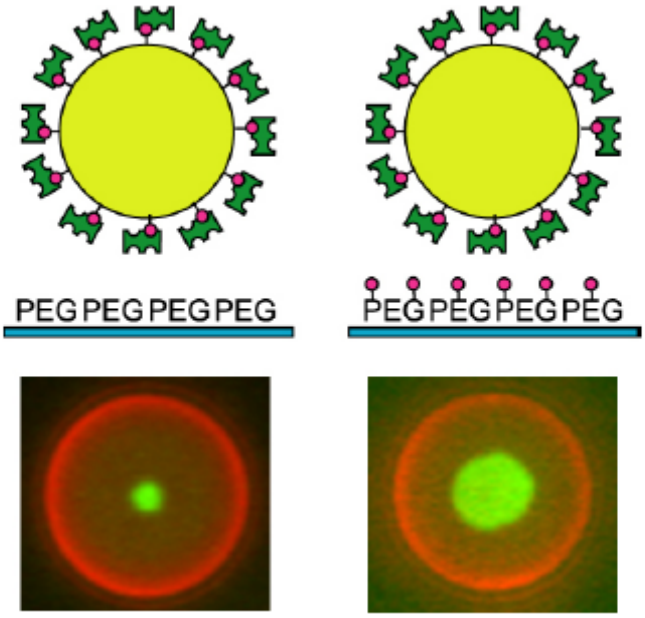



Figure 7 : Recrutement non-spécifique et recrutement spécfique des streptavidine portées par des gouttelettes sur des substrats plans solides.
Superposition de deux images :
En vert, une image prise dans le plan d'adhésion substrat-gouttelette.
En rouge, une image prise dans le plan équatorial des gouttelettes.
Grâce à la création de liens biotine-streptavidine, le patch grandit. L'intensité de fluorescence donc la densité en streptavidine reste en revanche constante (adapté de la thèse de J.Fattaccioli)

Jacques a pu observer que l'angle de contact des gouttes augmente avec la proportion de biotine sur le substrat. Toutefois, il existe donc une incertitude sur le nombre de streptavidines liées. En faisant l'hypothèse que l'énergie d'interaction Biotine/streptavidine n'était pas modifiée dans cette réaction de surface, Jacques a pu montrer que même si la concentration en biotine est dix fois plus importante que le nombre de streptavidine dans le film, au mieux 60% des streptavidines sont liées. Jacques a ainsi pu mettre en évidence les effets couplés des interactions non-spécifiques et spécifiques dans cette situation de collage.
Je vais me servir de ce matériau original que sont les gouttes d'émulsion pour étudier une nouvelle situation d'adhésion spécifique. Cette fois ci, le substrat sera une bicouche lipidique fluide. Nous pourrons alors comparer les résultats et expliquer mes observations.

Bibliographie :

1. Bibette, J., et al., *Emulsion Science: Basic Principles*. 2002, Springer, Berlin Heidelberg New York.
2. Poulin, P. and J. Bibette, *Wetting of Emulsions Droplets: From Macroscopic to Colloidal Scale.* Physical Review Letters, 1997. **79**(17): p. 3290-3293.

Conclusion :

Nous avons dans ce chapitre bibliographique décrit les caractéristiques des ingrédients de l'adhésion cellulaire auxquels nous nous sommes intéressés dans notre expérience biomimétique. En l'occurrence, il s'agit du moteur de l'adhésion, les protéines adhésives, qui grâce à leur interaction permettent de faire coller les cellules entre elles. Il s'agit aussi des surfaces sur lesquelles diffusent ces protéines qui impliquent des contraintes spatiales fortes et largement différentes des situations en volume.
Concernant les protéines d'adhésion, leur réactivité, que ce soit à deux dimensions ou à trois dimensions peut être décrite avec le formalisme de la cinétique chimique en terme de constante de dissociation Kd, de taux d'association k_on et de dissociation k_off. La plupart des résultats sur la cinétique des réactions ligands/récepteur a toutefois été déterminée en volume. Il apparaît que k_on et k_off sont profondément différents. Le k_on est une étape principalement diffusive ou ligand et récepteur, via la diffusion doivent se rencontrer. Une étape de diffusion en rotation ou ligand et récepteur sont proches permet aux molécules de trouver leur conformation spatiale qui va permettre l'adhésion. Le k_on en solution varie très peu (à peine deux décades autour de 10^6 mol-1.L .s-1) sur l'ensemble vaste des couples ligand/récepteur.
Le k_off est quant à lui très différent et dépend beaucoup de la nature et du nombre d'interactions qui stabilise les couples ligand/récepteur. C'est le k_off qui fait la différence entre les constantes de dissociation des couples ligand/récepteur. Le k_off des couples,égal à l'inverse du temps de vie des couples, peut varier de 10^-5 à 10^6s-1. Ces valeurs caractérisent un k_off dans lequel seule l'agitation thermique permet de sortir du puits de potentiel. Si une force est appliquée sur un lien, cette force va en revanche avoir un effet dramatique sur le temps de vie du lien en le faisant décroître de façon exponentielle (mis à part quelques cas spéciaux (catch bonds voir Science review Evans 2007)).
De manière plus générale, la constante de dissociation des couples ligands/récepteurs rencontrés en biologie est de l'ordre de 15 kT avec un écart type de 6kT ce qui correspond à un k_off de 10^3 s-1 (temps de vie une milliseconde) variant typiquement entre 10^6 et 1 s-1. Le couple Biotine/streptavidine que nous avons utilisés est un cas exceptionnel dans le vivant. Son Kd est de l'ordre de 35 kT et son k_off d'environ 10^-5 s-1. C'est donc un couple assez peu 'biologique' mais un bon système modèle pour les observations expérimentales.

Outre les protéines biologiques, un autre intérêt de l'adhésion cellulaire provient aussi des contraintes spatiales auxquelles sont soumises les molécules réagissant. Celles-ci sont contraintes de diffuser sur des surfaces molles dont la mécanique va influer sur l'adhésion spécifique. Ainsi, entre une vésicule 'molle' et une vésicule tendue, l'apparence des zones de contact va déjà être très différente. En effet, l'adhésion spécifique modifie l'énergie totale du système des deux cellules. Selon les cas, ces modifications énergétiques vont se répartir différemment. Le modèle de Bell a posé les fondements d'une approche énergétique du phénomène d'adhésion spécifique en opposant à la création de liens une énergie de répulsion d'origine polymérique. Des vésicules molles doivent plutôt s'opposer aux fluctuations de membranes et à l'entropie perdue qu'engendre le dépliement d'une membrane.
Une autre façon de s'opposer à la création de liens est de déformer des objets tendus. C'est cette voie qui est employée dans les expériences de micropipette et c'est pour cette voie que nous avons opté en utilisant des gouttelettes d'émulsion. L'intérêt des émulsions par rapport aux vésicules est principalement de pouvoir concilier observation dans le plan de la zone de contact et contrôle de la tension de surface. Ainsi, il va être possible de relier la cinétique de la réaction ligand/récepteur à des effets énergétiques liés à la déformation des gouttelettes.
Nous allons décrire cette approche expérimentale et les résultats obtenus dans les prochains chapitres.

Annexe : Détails de la dérivation du Lagrangien de l'énergie libre par rapport aux variables d'espace.
On part de l'expression de l'énergie de les gouttes adhérées, somme de l'énergie de surface de la goutte et de l'énergie d'adhésion E par unité de surface entre les gouttes.

$$F = 2\gamma * 2\pi Rh + (2\gamma - E)\pi r^2$$

Nous devons minimiser cette expression par rapport aux variables d'espace R, r et h.

Une première relation simple relie R,r et h. Si l'on applique Pythagore sur le triangle rouge, on obtient aisément :

$$r^2 = R^2 - (h-R)^2 .$$

On a donc :

$$F(R,h) = 4\pi Rh\gamma + (2\gamma - E)\pi(R^2 - (h-R)^2) .$$

La minimisation de F se fait à volume des gouttes constant. Nous allons utiliser cette contrainte sur le volume V des gouttes pour alléger les calculs. Il s'agit de la méthode des multiplicateurs de Lagrange.
Au lieu de minimiser F, nous allons minimiser la fonction L(R, h,λ) :

$$L(R,h,\lambda) = F(R,h) + \lambda V(R,h)$$

λ est un multiplicateur de Lagrange et est homogène à une pression. λ est imposé par la minimisation de L (dL=0).

Le volume V(R,r,h) d'une sphère tronquée, qui est notre hypothèse quant à la forme finale des gouttes, est :

$$V(R,h) = \frac{\pi h^2}{3}(3R - h) = Cste .$$

Nous allons donc minimiser le Lagrangien L :

$$L(R,h,\lambda) = 4\pi Rh\gamma + (2\gamma - E)\pi(R^2 - (h-R)^2) + \lambda\frac{\pi h^2}{3}(3R - h)$$

NB : Pour faire les choses proprement, il faudrait, pour assurer $\frac{\partial L}{\partial \lambda} = 0$, choisir une fonction V(R,r,h) identiquement nulle, c'est-à-dire soustraire au volume de la sphère tronquée le volume de la goutte sphérique par exemple. Mais, ceci ne change rien aux dérivations par rapport aux autres variables d'espace.

A l'équilibre dL=0, nous allons donc dériver L par rapport à R et h. Ces dérivations donnent.

- $\frac{\partial L}{\partial R} = 0$

$\Leftrightarrow 4\pi h\gamma + \pi(2\gamma - E) * 2h + \pi\lambda h^2 = 0$

$\Leftrightarrow 8h\gamma - 2hE + \lambda h^2 = 0$

$\Leftrightarrow \lambda = \frac{2(E - 4\gamma)}{h}$

Pour E=0, on se retrouve dans le cas de gouttelettes non déformées entourées de solvant. Alors h=2R et on retrouve la relation de Laplace. λ est alors la différence de pression entre l'extérieur et l'intérieur des gouttes comptée deux fois car on a deux gouttes et on obtient l'équation de Laplace :

$\Delta P = \frac{-2\gamma}{R}$

- $\frac{\partial L}{\partial h} = 0$

$\Leftrightarrow 4\pi R\gamma + \pi\left(2\gamma - E\right) * (2R - 2h) + \frac{\pi\lambda}{3}\left(2h(3R - h) - h^2\right) = 0$

Avec $\lambda = \frac{2(E - 4\gamma)}{h}$

$\frac{\partial L}{\partial h} = 4\pi R\gamma + \pi\left(2\gamma - E\right) * (2R - 2h) + \frac{2\pi(E - 4\gamma)}{3}\left(2(3R - h) - h\right) = 0$

$\Leftrightarrow \gamma(4R + 4R - 4h - 8(2R - h)) + E(2h - 2R + 2(2R - h)) = 0$

$\Leftrightarrow \gamma(-8R + 4h) = E(-2R)$

$\Leftrightarrow E = 2\gamma(2 - \frac{h}{R})$

Or, $h = (1 + \cos\theta)R$

donc,

$E = 2\gamma(1 - \cos\theta).$

# Deuxième partie : Matériaux et caractérisation.

Nous avons vu dans la partie précédente les principaux résultats concernant l'adhésion spécifique entre surfaces fluides. Les expériences sur les vésicules, objets de choix pour imiter la membrane cellulaire permettent de se retrouver expérimentalement dans des situations intéressantes vis-à-vis de l'adhésion cellulaire. Toutefois, un des inconvénients des vésicules est encore la difficulté de les produire en grand nombre, à des compositions identiques et à des tailles contrôlées. Ceci sera sûrement un ancien problème à la vue des développements technologiques de fabrication en microfluidique ou des techniques de caractérisation localisées (Fluorescence Correlation Spectroscopy que nous décrirons par la suite) mais pour l'heure, il est difficile de quantifier les expériences d'adhésion utilisant des vésicules (c'est-à-dire connaître les quantités de protéines adhésives mises en jeu) et de tirer des tendances générales à partir de nombreux évènements d'adhésion.
Par ailleurs, les expériences d'adhésion sur les membranes présentent certaines limites. En particulier, il est difficile d'observer le plan des zones d'adhésion tout en contrôlant la tension des vésicules et donc d'accéder à des quantifications énergétiques.

Durant ma thèse, j'ai voulu mesurer les énergies mises en jeu lors de l'adhésion spécifique et j'ai décidé de travailler sur un autre matériau, sûrement moins biomimétique que les vésicules mais présentant des avantages pour leur fabrication et la quantification de nos phénomènes d'adhésion.

Nos matériaux de prédilection au laboratoire Colloides et Matériaux Divisés, sont les émulsions. J'ai donc repris le travail de formulation de Jacques Fattaccioli et j'ai étudié l'adhésion spécifique de gouttelettes d'émulsion fonctionnalisées sur substrat fluide.
Les gouttelettes d'émulsion présentent l'avantage d'être productibles en grande quantité (plusieurs millilitres) et de façon contrôlée (on peut choisir la taille des gouttes entre 3µm et 30µm avec une assez petite polydispersité). Ainsi, un des objectifs était d'être capable de fournir des séries de mesures sur de grands nombres de gouttes pour en déduire des tendances moyennes. Dans le même ordre d'idée, pouvoir produire des émulsions en grande quantité fut bien utile pour quantifier les quantités de protéines mises en jeu dans nos expériences d'adhésion spécifique.
Par ailleurs, la physique de surface des gouttelettes est plus simple que celle des vésicules. L'énergie de surface des gouttelettes d'émulsion est bien décrite par la tension de surface des gouttes. Pour une émulsion directe (gouttes d'huile dans de l'eau) celle-ci dépend uniquement de l'huile et des surfactants utilisés pour stabiliser l'émulsion. Connaissant la tension de surface des gouttelettes, il est ensuite pratique d'utiliser la loi d'Young pour mesurer l'énergie d'adhésion des gouttes. On a donc potentiellement un accès mécanique assez simple à l'énergie d'adhésion de nos gouttelettes adhésives.
Le couple adhésif que nous avons utilisé est le couple biotine/streptavidine. Tout au long de ce travail, nous avons utilisé de la streptavidine fluorescente. Nous nous sommes perpétuellement servis de ce ces propriétés de fluorescence non seulement pour l'observation des phénomènes d'adhésion mais aussi pour quantifier au mieux les densités de streptavidine mises en jeu.
En fournissant ce gros travail de quantification en fluorescence sur nos gouttes ou dans nos zones de contact, un de nos espoirs était d'extraire le plus proprement possible les quantités de protéines adhésives mises en jeu et ainsi de pouvoir expliciter avec des ingrédients microscopiques le détail de l'énergie d'adhésion par unité de surface intervenant dans la loi d'Young.

En parallèle de l'utilisation de gouttelettes d'émulsion, il fallait un substrat pratique et adapté pour l'observation de l'adhésion de nos gouttelettes. Nous avons choisi de coller nos gouttes sur des bicouches lipidiques supportées. En ceci réside l'intérêt de mon travail par rapport à celui de Jacques. Jacques avait étudié le mouillage spécifique de ces gouttelettes sur des substrats solides : des PEG-Biotine greffés sur une couche de polylysine adsorbée sur une lamelle de verre. Un des inconvénients de cette méthode était l' adhésion non-spécifique entre les streptavidines et la couche de polymère. Jaques observait un recrutement des streptavidines à une densité uniforme et pouvait difficilement relier la densité de streptavdine dans le patch à la densité de straptavidine liée aux biotines et contribuant à l'adhésion spécifique.

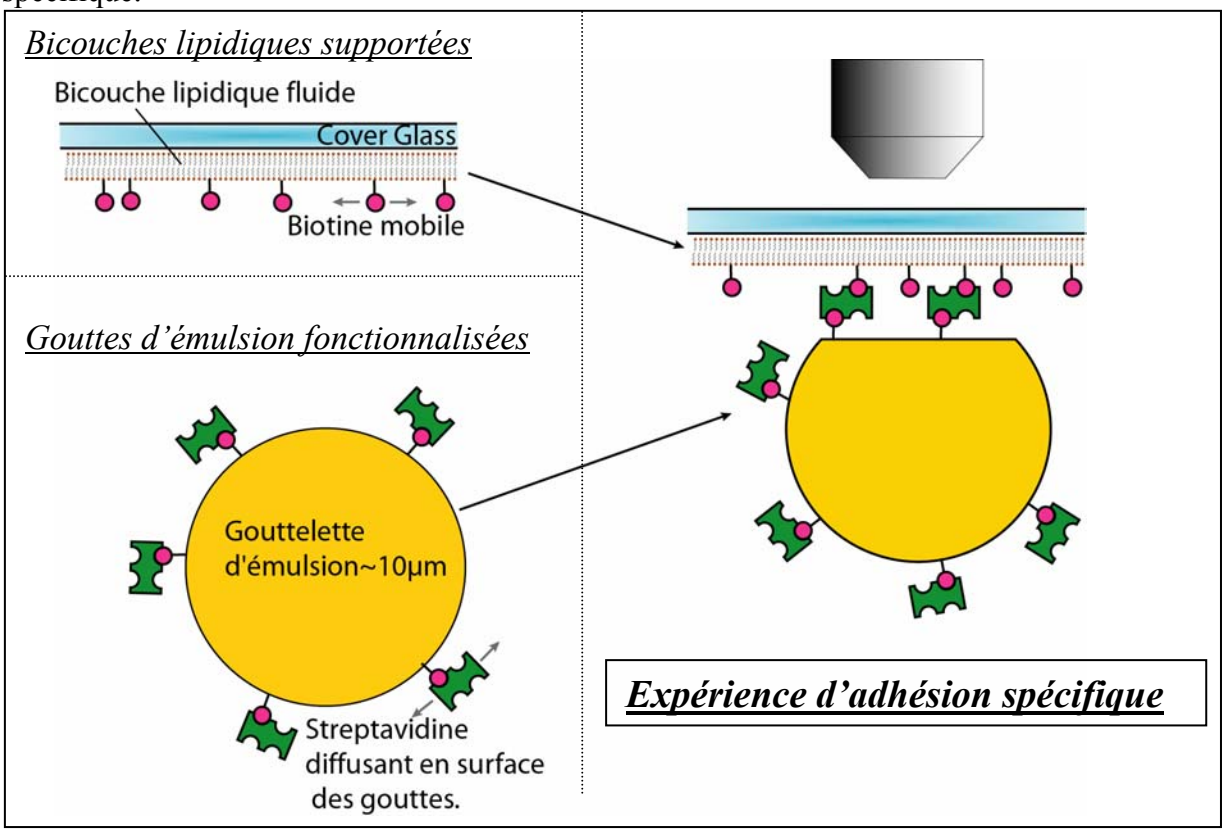



Figure 1 : Schéma de principe de l'expérience d'adhésion spécifique.
A gauche, les matériaux décrits dans ce chapitre.
A droite, l'expérience à comprendre.

Dans ma thèse, j'ai repris et développé au laboratoire un protocole permettant d'adsorber des bicouches lipidiques sur des lamelles de verre. Ces bicouches présentent un double intérêt. D'une part, elles sont fluides. Les phospholipides qui la composent ont un mouvement brownien plan au sein de la bicouche. En particulier, les phospholipides portant les molécules adhésives peuvent diffuser dans les zones d'adhésion. Cette situation devient assez proche d'un point de vue physico-chimique des cas d'adhésion cellule-cellule ou ligands et récepteurs sont fluides et peuvent ainsi être recrutés si le système adhésif le veut.
Par ailleurs et contrairement à la situation de Jacques, nous avons pu constater que l'adhésion non-spécifique dans notre système était faible. Lorsque l'on passive les streptavidines ou en absence de récepteur approprié, les gouttes ne s'adhèrent pas sur les bicouches. Les situations

de collage que nous avons observées sont comme nous le montrerons principalement dues à la création de liens spécifiques.

Les gouttelettes fonctionnalisées et les bicouches supportées sont donc les briques élémentaires de nos expériences. Avant d'assembler ces deux briques, nous allons décrire la conception et la caractérisation de ces matériaux. Dans un premier temps, nous commencerons par décrire les protocoles de formulation et de fonctionnalisation des gouttelettes d'émulsion et le contrôle que nous pouvons avoir sur cette chimie. Je détaillerai aussi le travail que nous avons fourni en microscopie de fluorescence afin de tirer la meilleure quantification possible des densités de protéines sur les gouttes.

Dans un second temps, je décrirai le travail effectué sur les bicouches lipidiques supportées. Outre le protocole de fabrication et les mises en évidence en microscopie de fluorescence, je détaillerai le montage de Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy (FLCS) que j'ai monté pendant ma thèse et qui nous a permis une excellente caractérisation de nos bicouches.

I- Les gouttelettes d'émulsion :

Durant sa thèse, J.Fattaccioli a mis au point un protocole permettant de greffer de façon covalente de la biotine sur des gouttelettes d'émulsion. A partir de cette émulsion biotinilée, il est possible d'adsorber de la streptavidine en surface des gouttelettes. Avec cette émulsion fonctionnalisée, nous disposons ainsi d'un matériau original pour mener à bien des expériences d'adhésion spécifique. Dans un premier temps, je vais décrire la fabrication et la caractérisation de ces émulsions.

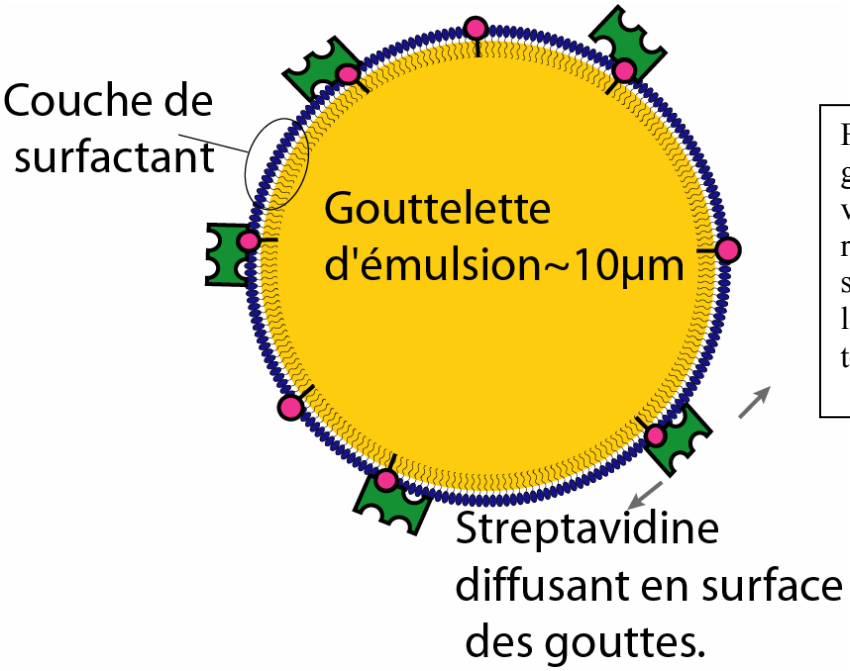



Figure 2 : Schéma des gouttelettes fonctionalisées. En violet, à la surface des gouttes est représentée la couche de surfactant permettant de stabiliser les gouttes et qui abaisse leur tension de surface.

I-1 : Fabrication d'émulsions monodisperses fonctionnalisées.
La préparation de ces matériaux se fait en deux étapes : formulation de l'émulsion, greffage de l'émulsion.

I-1-1 : Formulation de l'émulsion :

Dans un premier temps, il faut formuler une émulsion directe huile dans eau, assez monodisperse, et stable dans le temps. Formuler une émulsion directe huile dans eau consiste à disperser la phase huile sous forme de gouttelettes micrométriques dans la phase continue aqueuse. Pour pouvoir disperser la phase huile initialement continue en gouttelettes, il faut pouvoir déformer l'huile jusqu'à ce qu'elle deviennent instable et se scinde en petites gouttes. Il faut donc imposer un cisaillement assez fort, ce qui est fait en utilisant une phase aqueuse très visqueuse ($\eta(\Phi aq)$~1 000cP). Pour cela, on travaille à haute teneur en surfactant et on ajoute un viscosifiant hydrophile.
Nous avons opté pour une première étape de cisaillement à la main permettant d'obtenir une première dispersion assez grossière puis nous avons rendu notre émulsion monodisperse par une étape de cisaillement au Couette suivie d'une étape de décantation.

L'huile que nous avons utilisée est de l'huile de soja (soybean oil Sigma Aldrich Ref : S7381). Cette huile végétale 'naturelle' est composée de nombreux corps gras notamment des acides oléiques. C'est grâce à ces acides oléiques que nous pourrons fonctionnaliser nos gouttes. Les acides oléiques sont des molécules amphiphiles dont la tête hydrophile, la fonction acide, migre en surface des gouttelettes.
Notons que l'huile de soja s'altère sous l'effet de l'oxygène de l'air et de la lumière. Il faut le plus possible la contenir dans un récipient clos à l'abri de la lumière.
Nous avons utilisé comme tensioactif le synperonic PE/F68 (Uniqema). Le Synperonic est un copolymère tribloc formé de deux branches polyéthylèneglycol hydrophiles et d'une branche polypropylène glycol hydrophobe.

Pour viscosifier la phase aqueuse, on ajoute de l'alginate de sodium (Sigma-Aldrich Ref : 180947). Ceci va permettre une bonne fragmentation.

Recette de la formulation :

- Dans un bécher, verser 30 ml d'huile de soja.
- Dans un deuxième bécher, mélanger 5ml d'une solution à 4%m/m d'alginate de sodium (viscosifiant) et 5 ml d'une solution à 30%m/m de tensioactif Synperonic PE/F68 ;
    - prendre soin de mélanger les deux composants de la phase aqueuse sans trop faire de bulles.
    - Il faudra prendre soin de laisser gonfler et de diluer le synperonic la veille de la formulation.
- Ajouter quelques gouttes d'huile de soja dans la phase aqueuse et incorporer l'huile au sein de la phase aqueuse. Le mélange se trouble légèrement.
- Renouveler l'ajout d'huile et incorporer. Au fur et à mesure, on peut ajouter de plus en plus d'huile.
    - Pour une meilleure réussite de l'émulsion, utiliser l'huile et la phase aqueuse à la même température
- Incorporer finalement les 30ml d'huile. L'émulsion ainsi formée doit avoir une consistance onctueuse et une couleur blanche. L'émulsion est ratée si on aperçoit des gouttes d'émulsion blanches de l'ordre du millimètre.

Nous disposons à ce stade d'un premix grossier très monodisperse. La taille des gouttes va de 1µm à quelques centaines de µm.
A partir de ce premix, nous allons affiner la distribution en taille de notre émulsion en contrôlant le cisaillement des gouttes.
A priori, on peut estimer la taille des gouttes obtenues lors de l'émulsification à partir du nombre capillaire qui compare la contrainte de cisaillement ayant tendance à déformer la goutte et tension de surface qui s'oppose à la déformation:

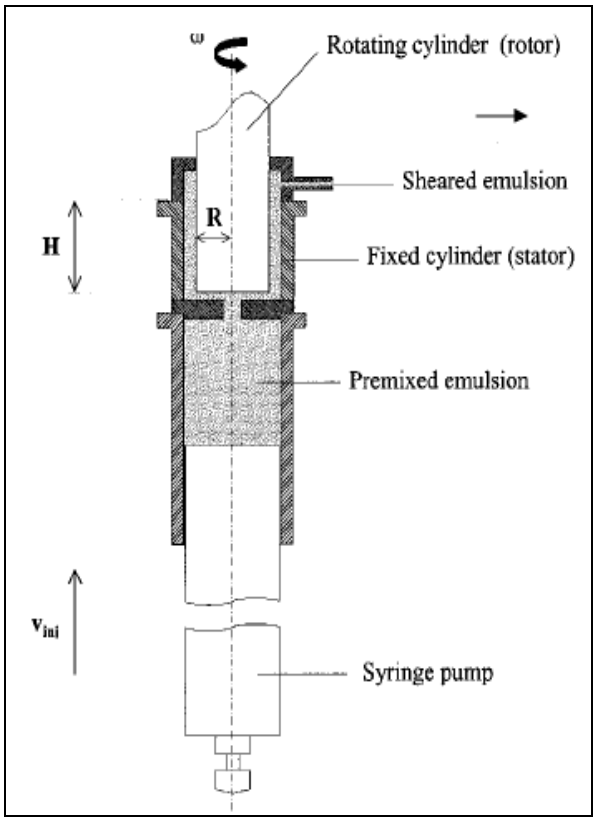
$$C_a = \frac{2\sigma}{P_{laplace}} = \frac{\eta\dot{\xi}}{\frac{\gamma}{R}}$$

Ici, η est la viscosité dynamique de la phase continue, $\dot{\xi}$ est le taux de cisaillement appliqué sur la goutte, γ la tension de surface des gouttes et R le rayon de la goutte.

Il a été établi expérimentalement que les gouttes se fragmentent à un nombre capillaire critique dépendant du rapport $p = \frac{\eta_d}{\eta_c}$, ratio entre viscosité des gouttes et de la phase continue.
Dans notre cas, la viscosité de la phase aqueuse est de l'ordre de 1000 Cp(=1Pa.s) tandis que celle des gouttes est de l'ordre de 50Cp. p vaut donc environ 0.05. A cette valeur de p , le nombre capillaire critique est de l'ordre de 1 (Bibette et al., Emulsion science, Springer ed.[4]).

Avec un taux de cisaillement de l'ordre de 10^3/s (différence de vitesse de 30cm/s sur une distance de 100µm), on peut prévoir un rayon de rupture de l'ordre de 5µm.

Pour obtenir des gouttes de cet ordre de taille, nous avons utilisé la méthode développée par Mason et al.([2]) et utilisant une cellule de Couette.
Une cellule de Couette est constituée de deux cylindres concentriques pouvant tourner sur leur axe. Dans notre cas, le cylindre intérieur est fixe et le cylindre extérieur tourne à une vitesse de 50 à 300 rotations par minute. Un tel montage permet de contrôler le cisaillement autour de 10^3/s et d'obtenir des gouttes allant de quelques microns à quelques dizaines de microns.
Expérimentalement, j'ai utilisé l'entrefer de 100µm à une vitesse de rotation de l'ordre de 200rpm pour obtenir des gouttes de diamètre moyen égal à 5µm.
Pour obtenir des gouttes de près de 20µm de moyenne, j'ai utilisé l'entrefer de 200µm à une vitesse de 40 rpm.
Notons que vouloir des grosses gouttes augmente un peu la polydispersité de l'émulsion finale, un assez grand nombre gouttelettes dans le premix faisant déjà moins de 20µm.



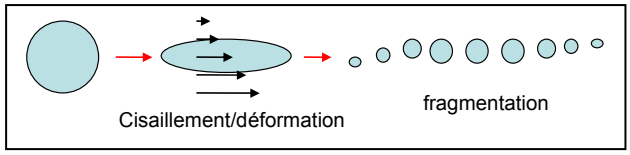




Figure 3 : Durant l'étape de cisaillement au Couette, on fait passer l'émulsion prémixée entre deux cylindres concentriques séparés d'un entrefer d'une centaine de µm (ça peut être 200µM). Les cylindres tournent, cisaillent les gouttelettes d'émulsion qui se fragmentent en plus petites gouttes. Les gouttes formées sont assez monodisperse. Leur taille moyenne fait entre 4 et 20µm de diamètre. Il reste aussi au sein de l'émulsion un grand ombre de satellites issus de la fragmentation dont le diamètre n'excède pas 2µm. Cette méthode a été développée par Mason et al.[2]. Schéma tiré de Mabille et al. [3]

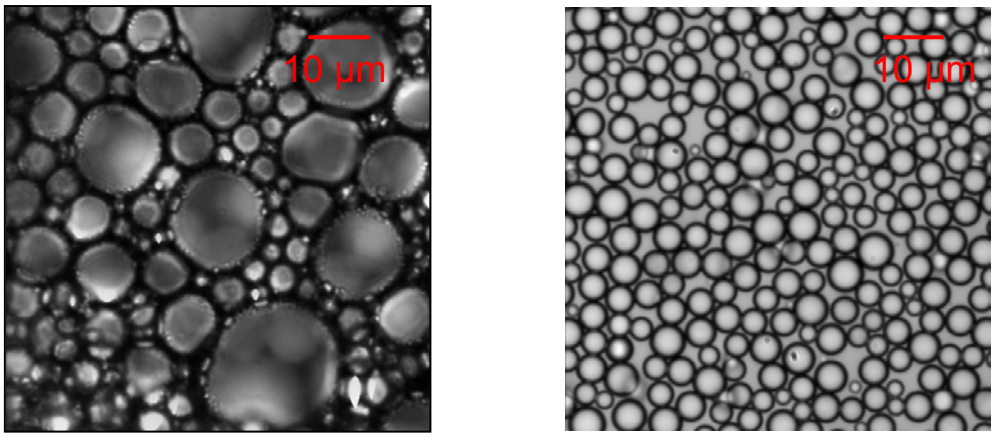



Figure 4 : Observation d'émulsion en lumière blanche.
A gauche : premix à la main.
A droite : après passage au Couette, l'émulsion est plus petite, plus monodisperse.

Il est nécessaire d'utiliser dans la machine de Couette des volumes assez grands (et des produits pas trop coûteux), le volume mort dans la machine étant de 20ml..
En sortie de Couette, on récupère une émulsion plus monodisperse mais dans laquelle se trouve encore une grande quantité de petits satellites, gouttelettes de 1-2 microns apparaissant entre les grosses gouttes fragmentées. Ces petits satellites sont nuisibles à la stabilité de l'émulsion et vont avoir tendance à accélérer le mûrissement d'Ostwald. Il est nécessaire de s'en débarrasser. Ces petites gouttes n'étant plus très sensibles à la gravité, il est possible de les séparer par décantation.

L'émulsion obtenue en sortie de Couette est très dense (75%m/m de gouttes d'huile). Il convient, avant décantation, de diluer cette émulsion, à une teneur en huile de l'ordre de 5%m/m.
Pour s'assurer une bonne stabilité de l'émulsion, la phase aqueuse servant à la dilution contient 1%m/m de tensioactif synperonic F68.

Une fois diluée, l'émulsion qui s'apparente maintenant à un lait est déversée dans une ampoule à décanter à l'abri de la lumière. Les gouttes mettent plusieurs heures pour sédimenter. Finalement, on obtient une phase surnageante faite des gouttes d'émulsion et une phase sous nageante composée d'eau, de tensioactifs et des satellites que nous voulons éliminer. Cette étape de décantation doit être renouvelée jusqu'à ce que la phase sous-nageante soit limpide, signe que la plupart des satellites ont été lavés.

Une fois le sous-nageant limpide, on peut aliquoter la crème obtenue dans des ependorfs et la stocker au frigidaire, à l'abri de la lumière. La fraction volumique en huile est alors de l'ordre de 65%. L'émulsion ainsi préparée peut être conservée trois mois sans modifications de ses propriétés.

I-1-2 : Fonctionnalisation de l'émulsion :

L'huile de soja est en partie composée d'acides oléiques. Les acides oléiques présentent une acidité libre hydrophile en bout de chaîne. Lorsque l'huile de soja est dispersée en gouttelettes dans un solvant aqueux, la fonction acide va se placer dans l'eau tandis que la queue carbonée va rester dans l'huile.
Il est donc en principe possible de faire de la chimie sur ces fonctions carboxylique. Dans notre cas, nous avons utilisé les fonctions acide pour synthétiser des liaisons peptidiques.
Les liaisons peptidiques sont des liaisons covalentes liant notamment les acides aminés les uns aux autres. La liaison est le résultat de la réaction entre une fonction acide carboxylique COOH et une fonction amine $NH_2$.
Dans notre cas, nous avons utilisé une biotine liée à une amine et fait réagir l'amine sur la fonction acide en surface des gouttes. On peut donc ainsi obtenir des gouttelettes fonctionnalisées avec de la biotine.
Nous avons utilisé un protocole classique en deux étapes pour réaliser cette réaction. En premier lieu, on active la fonction acide avec du s-NHS (sulfo,N-hydroxysuccinimide) en présence d'EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride).
Une fois la fonction activée, on fait réagir la fonction amine liée à la biotine pour créer la liaison peptidique covalente (voir figures 3-a et 3-b).

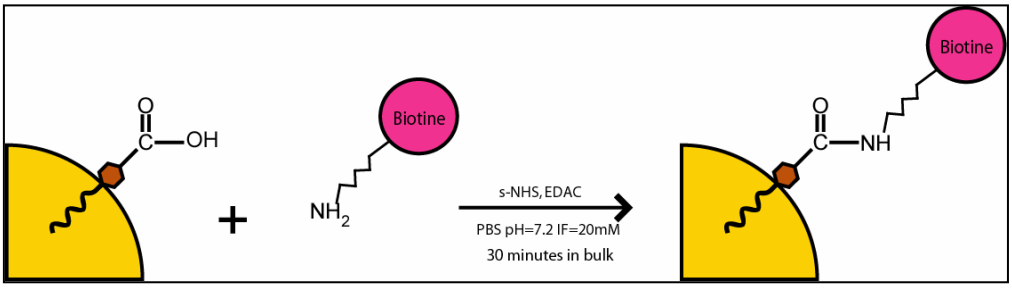



Figure 5 : Schéma de la réaction permettant de greffer une biotine sur nos gouttelettes via une liaison peptidique (d'après J.Fattaccioli ; thèse de doctorat[1]).

Une des difficultés de cette chimie est que nous n'avons a priori aucune idée de la quantité d'acides oléiques en surface des gouttes. Jacques a développé cette chimie pour déterminer les conditions expérimentales permettant d'obtenir les bonnes quantités à utiliser. Les concentrations sont précisées dans le protocole de greffage plus bas.
J'ai toujours utilisé la même quantité de biotine lors de mes greffages afin de me retrouver dans des situations sensiblement identiques pour le greffage de la streptavidine.
Une fois la biotine greffée, il est possible de venir adsorber de la streptavidine en surface des gouttes. Il s'agit de faire incuber de la streptavidine en présences des gouttelettes d'émulsion. La streptavidine est alors susceptible de faire un couple ligand /récepteur avec la biotine. La liaison Biotine/streptavidine formée n'est pas covalente. Toutefois, le temps de vie du couple biotine/streptavidine est exceptionnellement long (plusieurs jours) et on verra qu'il n'y a effectivement pas de désorption pendant la durée de nos expériences et que la quantité de streptavidine est constante sur nos gouttes.

Pour assurer la stabilité de l'émulsion, nous utiliserons toujours des tampons dans lesquels est dilué du surfactant. Lors des étapes de greffage, j'ai gardé les méthodes de Jacques concernant les surfactants. En l'occurrence pendant toutes les étapes de chimie, j'ai utilisé du Tween20, un surfactant non-ionique dont la concentration micellaire critique vaut $8.04\times10^{-5}$ M à 21°C et la HLB vaut 16.7 (le Tween 20 se dilue très préférentiellement dans l'eau).

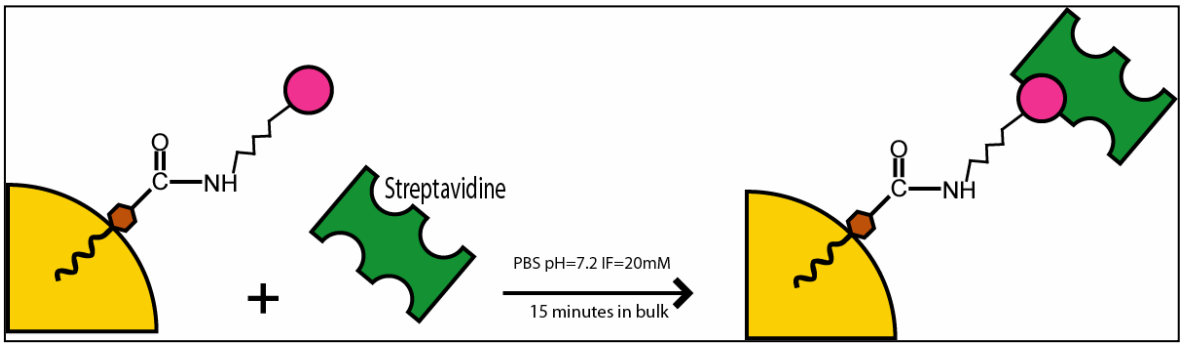



Figure 6 : Schéma de principe de l'étape d'adsorption de la streptavidine sur les gouttes (d'après thèse de J.Fattaccioli[1])

Je vais détailler le protocole de greffage dans le paragraphe suivant.

## Protocole détaillé du greffage de la biotine et de la streptavidine sur les goutelettes d'émulsion :

Pour réaliser cette chimie, le matériau essentiel est l'émulsion telle qu'elle a été aliquotée (voir paragraphe formulation de l'émulsion). On utilise tout au long des expériences de l'eau milliQ.
Les produits suivants sont nécessaires :

| | Produit chimique | Marque référence | remarque |
|---|---|---|---|
| Tampon PB/Tween20 | NaH2PO4 | Sigma Aldrich 71505 | Le tampon phosphate semble vieillir vite et il est bon de le renouveler toutes les deux semaines. |
| | Tween 20 | Sigma Aldrich 93773 | |
| Mélange d'activation | s-NHS (sulfo,N-hydroxysuccinimide) | Fluka 56485 | Facilement oxydable. A conserver sous athmosphère inerte. |
| | EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride) | Sigma-Aldrich E6383 | Se dégrade vite en présence d'eau. |
| Solution Biotin-NH2 | Biotin-PEO3-amine | interchim 77872A | la chaine de polyethylene oxide mesure environ 20 Angstroms |
| Solution Streptavidine | Streptavidine Alexa 488 2mg/ml | Invitrogen S32354 | Faire 2 ou 3 aliquots de la solution mère sans forcément diluer. Fluoresce dans le bleu |
| | Streptavidine Alexa 555 2mg/ml | Invitrogen S32355 | Aliquotage idem. Fluoresce dans le vert |
| | Streptavidine non modifiée | Sigma Aldrich 85878 | |

- dans un ependorf de 600µl, diluer 20 µL d'émulsion aliquotée à 180 µL de PB/Tween 20(0.2%m/m).

NB : le PB/Tween20(0.2%m/m) est un tampon phosphate dans lequel on a ajouté du Tween20 (surfactant). Son pH est de 7.2, sa force ionique de 20mM et **la fraction massique** en surfactant (Tween 20) de 0,2% m/m. Ceci correspond à environ 20 fois la concentration micellaire critique. Les gouttes sont donc saturées en surfactant. Pour faire ce tampon, on ne rajoute pas de sels. La force ionique est uniquement due aux charges des acides phosphoriques et de leur contre ion. Le pH et la force ionique des tampons PB/Tween20 utilisés par la suite resteront constants. La fraction massique en surfactant est en général de 0.2% (elle est précisée entre parenthèses).

- Préparer une solution d'activation aux proportions 0.06g de EDC, 0.01 g de s-NHS et 100 µL de PBS/Tween20(0.2%). Ajouter 65 µL de ce mélange d'activation dans l'ependorf contenant l'émulsion. L'ajout doit être fait assez vite après la préparation car l'EDC est vite

hydrolysé. En pratique, avec les quantités précisées, le mélange d'activation peut servir pour deux ependorfs d'émulsion (soit 40 µl d'émulsion dans360µl de tampon).

- mélanger sur un soleil (disque de 30 cm de diamètre tournant à 25 tours/minute ; les ependorfs sont disposés à la périphérie du soleil) pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.

- laver l'émulsion. Pour ce, on centrifuge l'ependorf dans lequel la réaction a eu lieu. L'émulsion crème en surface (fraction volumique d'émulsion ~70%) tandis que la phase aqueuse contenant les réactifs n'ayant pas réagi reste en dessous. On utilise ensuite un tip de propipette à bout effilé pour aspirer délicatement la phase aqueuse sous-nageante. Le retrait de la phase aqueuse se fait en deux fois avec centrifugation entre les deux fois. On évite ainsi de perdre trop d'émulsion. Après retrait du sous-nageant, il ne doit rester que l'émulsion centrifugée au fond de l'ependorf à une fraction massique d'environ 65%. On ajoute alors 220µl de PB/tween 20(0,2%) et on renouvelle l'opération 3 fois.
- Après le troisième lavage, ajouter 230µl de PB/Tween20(0.2%)
- Ajouter 20 µL d'une solution de biot-PEO3-NH2 à la concentration 20mg/ml.

- Mélanger une demi-heure sur le soleil à l'abri de la lumière.

- laver 4 fois l'émulsion pour faire disparaître au mieux la biotine en solution. Après le dernier lavage, on récupère une phase dense (centrifugée) d'émulsion dont la teneur est environ de 70%v/v en huile. Durant ces nombreux lavages, les pertes sont inévitables et le coup de main est assez délicat. Je récupère au mieux une dizaine de µL d'émulsion.

- Prélever 5 microlitres de l'émulsion dense (70%v/v) biotinilée et la diluer dans 230µl de PB/Tween20(0.05%).
- Ajouter quelques microlitres de solution de streptavidin à 2 mg/ml. Selon ce que l'on veut faire, on prendra uniquement de la streptavidine fluorescente ou un mélange de streptavidine fluorescente et de non fluorescente. Les proportions 'intéressantes' du rapport Vstrep(µl)/Vemulsion(µl) varient typiquement entre un rapport 1/10 et 2. On ajoutera donc entre 0.5µl et 10µl de solution concentrée (2mg/ml) de streptavidine.
- Mélanger pendant 20 minutes sur le soleil à l'abri de la lumière.
- Laver 5 fois l'émulsion obtenue.

Ainsi s'achève le protocole de greffage de la biotine et de la streptavidine.

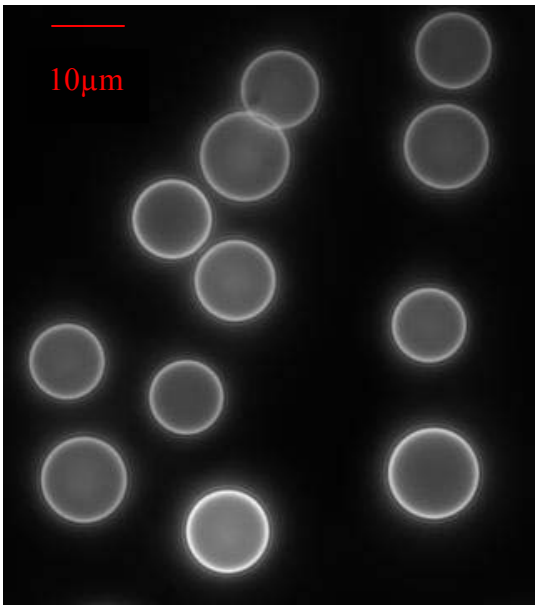



Figure 7: observation en microscopie de fluorescence des gouttelettes d'émulsion fonctionnalisées. La streptavidine est fluorescente.

Remarques :

-Lors de l'étape de greffage de la streptavidine, j'utilise une variable expérimentale pratique, le ratio Vstrep/Vemulsion. C'est en jouant sur ce ratio que je peux faire changer la densité de streptavidine greffée sur mes gouttes. La gamme utile de ce ratio est comprise entre 0.1 et 1.
La solution de streptavidine considérée est la solution mère de concentration 2mg/ml.
L'émulsion considérée est l'émulsion centrifugée que je récupère après lavage. La fraction volumique en huile est environ 70%.
-Une difficulté de cette chimie est d'assurer la stabilité des gouttes. En particulier, il arrive que les billes s'agrègent lors de l'étape de streptavidination et des lavages qui suivent. En effet, il reste des biotines libres sur les gouttes. Lors de l'étape de lavage des sous-nageants, il est nécessaire de centrifuger les gouttes pour séparer les gouttes du sous-nageant. Pendant cette étape, les gouttes sont mises en contact et il devient facile de créer des liens streptavidine-biotine entre gouttes. Les gouttes peuvent alors s'agréger grâce à des zones de contact biotine/streptavidine.

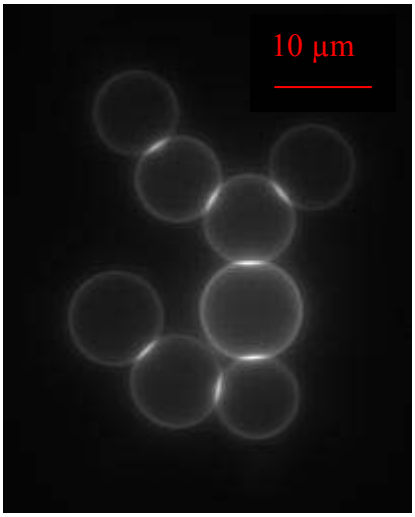



Figure 4 : observation en microscopie de fluorescence d'un agrégat de gouttelettes fonctionnalisées avec de la streptavidine (la streptavidine est fluorescence). Les gouttes s'agrègent par l'intermédiaire de zones de contact spécifiques où des liens biotine /streptavidine se forment (zone très fluorescentes entre les gouttes).

En l'absence de surfactant, les effets d'agrégation sont énormes et les gouttes isolées deviennent rares. Par ailleurs, lorsqu'on mélange un lot de gouttes agrégé, on détruit les zones

de contact et on voit apparaître sur les gouttes des patches de streptavidine fluorescente. Ces gouttes sont difficilement utilisables.
Toutefois les effets d'agrégation sont atténués lorsque les tampons et l'émulsion sont bien propres. Il est alors possible de faire des lots de gouttes fonctionnalisées bien séparées.

### I-1-3 : Caractérisation en microscopie de fluorescence :

Comme le montrent les clichés déjà utilisés, une méthode pratique et rapide pour apprécier la qualité du greffage des streptavidines sur les gouttes peut être faite en microscopie de fluorescence. C'est la streptavidine qui porte des fluorophores et permet cette observation.
Nous avons confirmé que la fluorescence observée était bien due à des streptavidines adsorbées sur les biotines recouvrant la surface des gouttes en menant diverses expériences témoin.
D'une part, lorsque l'on observe les gouttelettes d'émulsion non-fonctionnalisées en microscopie de fluorescence, on peut observer une légère autofluorescence. Cette autofluorescence est faible et uniforme en volume.
Pour valider le greffage, nous avons essayé de greffer des streptavidines sur des gouttes non biotinilées. On observe uniquement l'autofluorescence des gouttes. Les streptavidines ne s'adsorbent donc pas non-spécifiquement à la surface des gouttes et sont donc bien accrochées à des biotines.

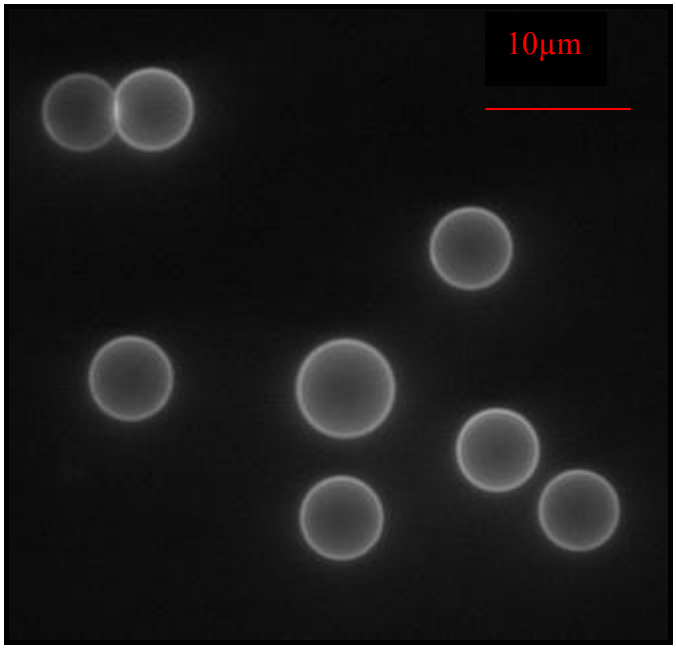



Figure 8 : Observation en microscopie de fluorescence de gouttelettes fonctionnalisées. La fluorescence est localisée en surface et due à des streptavidines adsorbées sur les biotines.

J'ai travaillé sur un statif Nikon Eclipse E600 droit avec un objectif Nikon APO*100 d'ouverture numérique 1.3. La profondeur de champ de cet objectif est de l'ordre de 0.5 microns. L'observation se faisait en transmission en lumière blanche et en réflexion sous lampe à mercure.

L'acquisition se faisait grâce à une caméra Ropper Cascade 512 B de très bon rendement quantique (~0.9).
L'image est ensuite aquise avec le logiciel Metavue. Les photos sont codées en niveaux de gris sur 16 bits (65000 niveaux de gris).
Les gouttes étant assez monodisperses, je ma place dans le plan équatorial des gouttes pour l'observation. Le profil en intensité caractéristique d'une goutte est donné en figure 9.

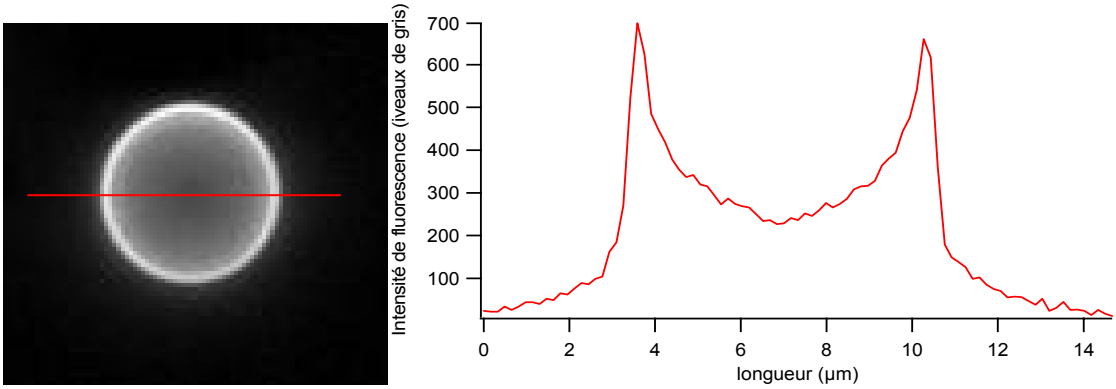



Figure 9 : Image d'une goutte en épifluorescence et son profil en intensité (le long du trait rouge).

L'intensité est forte sur les bords de gouttes, signe que les streptavidines sont bien greffées en surface et n'entrent pas dans la goutte. Au centre de la goutte, il reste néanmoins une fluorescence non négligeable. Cette fluorescence au centre est due en partie à l'autofluorescence de la goutte et aux streptavidines situées en dessus et en dessous du plan équatorial dont l'émission de fluorescence est un peu collectée.
Une observation importante déjà faite par Jacques est que le temps caractéristique de désorption de la streptavidine est de l'ordre de quelques jours. On peut observer les gouttes fluorescentes sans constater de changement significatif de fluorescence. Le $k_{off}$ du couple biotine/streptavidine ne semble donc pas modifié par le fait d'être sur les gouttes. Lorsqu'on fonctionnalise les gouttes, on peut donc s'en servir pendant la durée des expériences sans que les gouttes soient modifiées.

### I-2 : Etude qualitative de la densité de straptavidine sur les gouttelettes :

Dans un premier temps, j'ai voulu caractériser la fluorescence de mes gouttes en fonction des conditions d'incubation. Deux observations m'ont incité à utiliser la fluorescence des gouttes comme critère de caractérisation.
D'une part, pour des conditions d'incubation données (c'est-à-dire pour un certain ratio Vstreptavidine/Vemulsion à l'incubation), je récupère un lot de gouttes à la fluorescence visiblement assez homogène. J'ai donc voulu me servir de cette fluorescence homogène et estimer une 'densité' de fluorescence sur mes gouttes selon mes conditions d'incubation.
Par ailleurs, lorsque je fais varier les conditions d'incubation, je peux observer une variation nette de la fluorescence des gouttes.

Pour caractériser le greffage des gouttes, Jacques avait lui aussi utilisé la fluorescence des gouttes mais avait préféré une technique de cytométrie en flux. La cytométrie permet une analyse de la distribution en taille de la population de gouttelettes. La polydispersité des gouttes n'est donc pas un problème. Par ailleurs la cytométrie permet une détermination de la densité de streptavidine adsorbée grâce à des mesures de fluorescence (Fattaccioli Softmatter 2003 [5]). Nous ne disposions pas, au début de ma thèse de cytomètre et la caractérisation devait se faire à l'extérieur, ce qui n'était ni pratique, ni rapide.
J'ai ainsi préféré opter pour une mesure en microscopie de fluorescence. La microscopie de fluorescence a l'avantage d'être très pratique. Il suffit d'un échantillon et de quelques photos pour avoir une bonne idée de la qualité d'un greffage. Par ailleurs, les émulsions étant assez monodisperses, la distribution en taille des gouttelettes ne pose pas trop de problèmes de focalisation lors de l'observation. Enfin, comme nous allons le voir, des mesures de fluorescence permettent d'obtenir de bonnes informations qualitatives sur les densités de streptavidine greffées. En calibrant mes mesures de fluorescence avec un dosage en retour, j'ai finalement pu accéder aux densités de steptavidines sur mes gouttes.

**Mesure de la densité de fluorescence sur les gouttelettes** :

A chaque greffage de streptavidine, j'utilise 5µl d'émulsion qui correspondent à environ $5.10^7$ *gouttes*. Je récupère donc lors de chaque expérience quelques dizaines de millions de gouttes fonctionnalisées ! Un échantillon entre lame et lamelle séparées par un spacer (du scotch double-face par exemple) me permet d'observer la fluorescence de plusieurs milliers de gouttes.
Pour réaliser ma quantification en fluorescence, je vais faire l'image en fluorescence d'une centaine de gouttes et vais évaluer la taille et la fluorescence de chacune de ces gouttes.

Pour mesurer la fluorescence des gouttes, je prends des clichés sous lampe à mercure en focalisant dans le plan médian des gouttes.
Un seuillage en niveau de gris me permet de distinguer les gouttes. J'effectue un seuillage à valeur fixe dont le seuil me permet de distinguer uniquement la couronne fluorescente à la périphérie des gouttes. Je peux alors extraire une valeur de la fluorescence en surface de mes gouttes en unités arbitraires par unité de surface. J'ai aussi accès à la taille des gouttes.

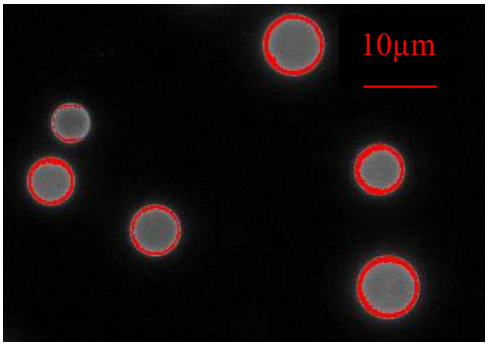



Figure 10 : En choisissant un bon seuil, on peut sélectionner uniquement la couronne fluorescente en surface des gouttes. Cette couronne est un bon indicateur de la densité de streptavidine en surface des gouttes.

Expérimentalement, c'est le ratio Vstrep/Vémulsion qui change. Pour chaque condition d'incubation, le volume d'émulsion est constant (15µl). Le volume total dans l'ependorf où a lieu la réaction est lui aussi sensiblement constant (250µl). La fraction volumique en gouttes est constante et égale à 5%. C'est donc la concentration en streptavidine qui est variable dans ces expériences, en l'occurrence le volume ajouté dans l'ependorf de la solution mère à 2mg/ml. Le temps d'incubation de la streptavidine est toujours fixé à environ 15minutes.
Pour des conditions d'incubation données, je peux tracer la fluorescence moyenne des pixels en surface des gouttes (en u.a/pix²).

Sur la figure suivante, j'ai tracé la valeur moyenne de fluorescence en surface des gouttes pour un lot de gouttes fonctionnalisées à Vstrep/Vémul=1/1.

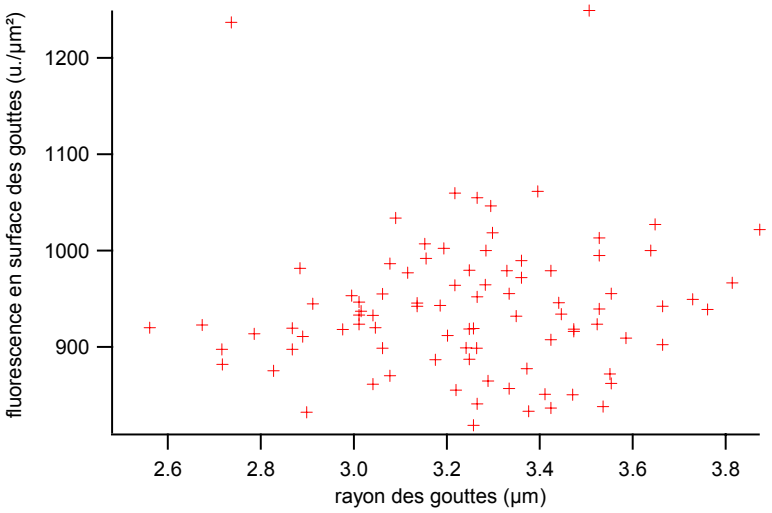



Figure 10 : Valeur moyenne de la fluorescence en surface des gouttes. On constate que cette valeur est indépendante du rayon des gouttes et à peu près homogène (920ua/pix²+/-70)

Sur ce graphe, chaque point représente une goutte pour laquelle je mesure la fluorescence moyenne à sa périphérie. J'ai aussi accès à la taille de la goutte.
Notons qu'il y a un bruit assez grand sur la mesure de taille des gouttes. Par exemple, le diamètre d'une goutte de 8µm équivaut à 25pixels. Une erreur de 1 pixel sur la mesure du rayon engendre une erreur de près de 5% sur la mesure de taille.

Avec cette caractérisation qualitative, si l'on change les conditions d'incubation (en faisant varier le ratio Vstrep/Vemul), on peut ainsi observer qualitativement la variation de fluorescence en surface des gouttes. Sur la figure suivante, j'ai représenté l'évolution de la

valeur moyenne de fluorescence selon les conditions d'incubation.

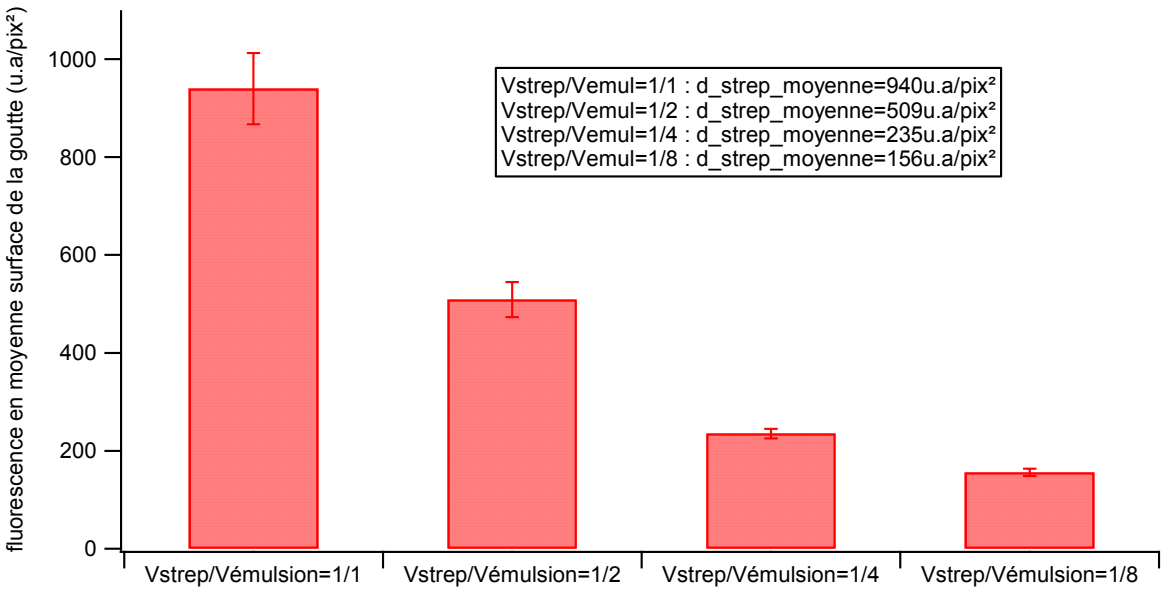



Figure 10 : Evolution de la densité de fluorescence en surface des gouttes selon les conditions d'incubation. Dans ce cas, l'évolution de la densité moyenne en surface des gouttes est quasi propotionnelle à la quantité de streptavidine introduite. Avec cette méthode de mesure, on obtient une bonne caractérisation de la variation de la densité de streptavidine en surface avec les conditions d'incubation.

Il existe une certain bruit sur la mesure de fluorescence. On peut évoquer des erreurs introduites par le seuillage à valeur fixe. Par ailleurs, il existe une variabilité de fluorescence inhérente au greffage.
Par ailleurs, dans la durée (quelques mois), on peut être gêné par le vieillissement des lampes à mercure. Autant que possible, lors des mesures en fluorescence, j'ai essayé faire des expériences à comparer en quelques jours pour m'assurer un faible bruit d'illumination.

Avec ma méthode de mesure, on se rend compte que la 'densité' de streptavidine en surface des gouttes augmente avec la concentration en streptavidine initialement introduite. J'appelle 'densité' de streptavidine la valeur moyenne de fluorescence mesurée. Elle n'a pas de valeur quantitative mais représente assez bien l'intensité de fluorescence que j'observe à la surface de mes gouttes et semble reliée directement à la densité de streptavidine sur mes gouttes.
Notons que pendant ma thèse, j'ai joué sur les tampons notamment pour tenter de réduire les effets d'agrégation des gouttes. J'ai ainsi pu tracer des graphes similaires à celui de la figure 10 en changeant les tampons.
En particulier, j'ai réalisé des greffages de la streptavidine dans un tampon sans surfactant et dans un tampon à pH=5.5 (au lieu de 7.2).
Il apparaît que le greffage est plus efficace dans ces tampons (mais au détriment de la stabilité des gouttes) en particulier en pH acide.
Dans le cas du tampon sans surfactant, on peut évoquer une accessibilité des biotines facilitée. En effet, les biotines sont séparées des fonctions acide en surface des gouttes par une courte chaîne de ~2nm. Le Tween 20 est une molécule dont la fonction hydrophile est composée d'une cinquantaine de carbones et dont la taille caractéristique semble aussi être du nanomètre. Lorsque les gouttes sont plongées dans un tampon sans surfactant, des surfactants

initialement sur les gouttes vont se solubiliser en solution. Les biotines sont alors plus accessibles.
L'effet du pH est difficile à prédire. On peut penser à des effets électrostatiques. La charge de surface des gouttes est peut être diminuée et l'approche des streptavidines alors facilitée.

Le k_on de la réaction Biot(2D)+strep(3D) est donc assez dépendant de la nature des surfaces. Mais pour l'heure, il est impossible d'estimer le k_on de la réaction, n'ayant aucune idée quantitative de la densité de streptavidine se greffant en surface des gouttes. Rappelons qu'en revanche, on peut estimer le k_off du lien formé entre biotine et streptavidine en surface des gouttes en suivant la désorption de la streptavidine au cours du temps. Ce k_off est de l'ordre de quelques jours ce qui est assez proche (moins d'un ordre de grandeur) du k_off du couple biotine_streptavidine en volume (~12 jours).

Je vais décrire dans le prochain paragraphe la méthode m'ayant permis d'accéder à des estimations quantitatives des densités de streptavidine sur mes gouttes.

### I-3 : Dosage en retour de la quantité de streptavidine greffée :

Au premier abord, vue la grande énergie d'interaction entre biotine et streptavidine, on pourrait penser que, dans chaque cas, toute la streptavidine introduite réagit avec les biotines des gouttes. Nous allons estimer quelques ordres de grandeur relatifs à cette situation.

On peut faire quelques estimations a priori. Dans des conditions d'incubation diluées (Vstrep/Vemulsion=1/10), si toute la streptavidine réagissait, j'aurais sur mes gouttes environ $1/10^{ème}$ de monocouche.
Dans les conditions les plus riches en step (Vstrep/Vemul=1), en cas de réaction totale, je couvrirais les gouttes avec une monocouche de streptavidine et pourrai alors saturer la surface de mes gouttes avec de la streptavidine.

Toutefois, la réaction entre les streptavidines en solution et les biotines sur les gouttes ne semble pas être totale. Par exemple, lors des lavages, après réaction de la streptavidine, le sous-nageant aqueux a toujours une couleur rose, couleur de la solution de streptavidine.
Par ailleurs, Jacques avait estimé en cytométrie que la densité de streptavidine était de l'ordre de quelques centaines par µm². Or la densité de la monocouche est plus de l'ordre de 40 000strep/µm²..

Nous avons décidé de mettre en place une autre méthode de quantification pour accéder à la densité de streptavidine sur les gouttes. Il s'agit de faire un dosage en retour de la streptavidine : nous allons comparer en spectrofluorimétrie la fluorescence de la phase aqueuse après réaction de la streptavidine avec un étalon dont la concentration en strep est égale à la solution initialement introduite pour la réaction. En mesurant la différence de fluorescence entre les deux solutions, nous devons pouvoir accéder à la quantité de streptavidine sur les gouttes.

I-3-1 : Première tentative : dosage en retour de la streptavidine.

L'idée est de comparer la quantité de streptavidine n'ayant pas réagi lors du greffage à celle mise en solution initialement pour le greffage. L'instrument de mesure est un spectrofluorimètre (SAFAS) , les streptavidines utilisées sont toujours des streptavidine Alexa 555.

Le principe du dosage en retour est décrit dans la figure ci dessous.

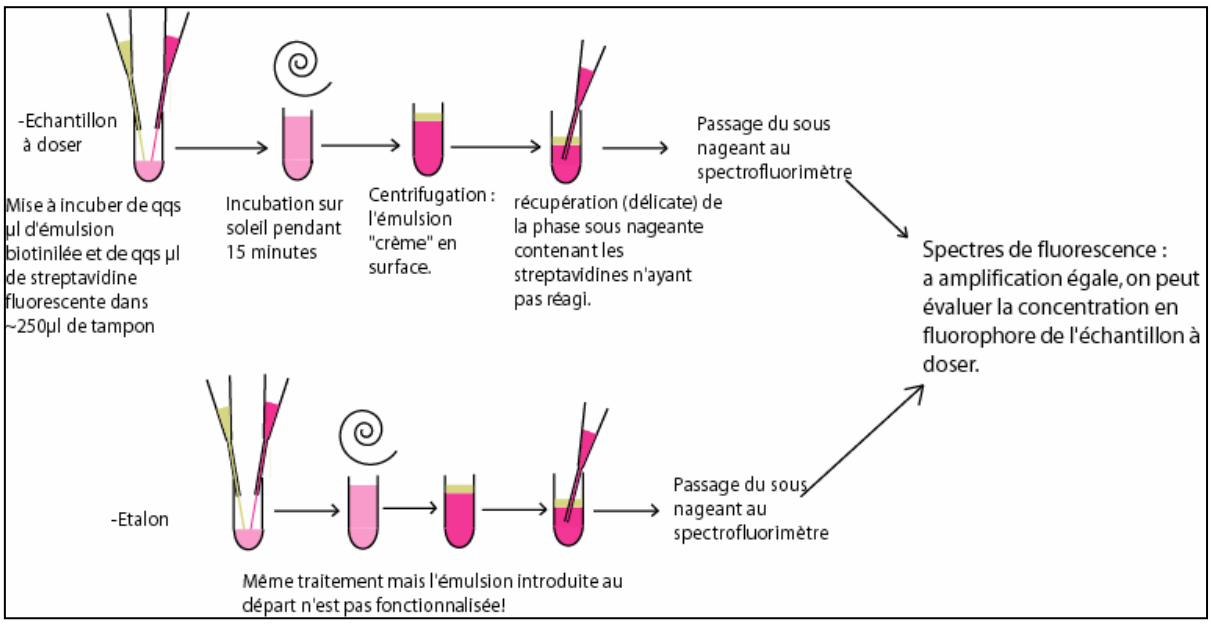



Figure 11 : principe du dosage en retour.
La quantité de streptavidine fluorescente dans l'étalon est identique à la quantité de streptavidine fluorescente mise initialement à incuber avec l'émulsion à fonctionnaliser.

Cette mesure, simple en principe, se révèle assez ardue en pratique et les sources d'erreur sont nombreuses.

On utilise des petits volumes d'émulsion (~10µl). Il faut déjà faire attention aux volumes prélevés d'autant que l'aspiration de l'émulsion avec des micropipettes n'est pas identique à l'aspiration de l'eau par exemple. Lorsqu'une pipette aspire 10µl d'eau, elle n'aspirera que 8 ou 9µl d'émulsion. J'ai dû marquer au feutre les niveaux d'émulsion prélevés pour les comparer à des volumes en eau plus juste. On peut estimer l'erreur sur la mesure des volumes à 10%.

Le bruit de mesure spectrofluorimètre n'est pas négligeable. Sur 5 mesures successives, on peut avoir une variabilité de 10% sur les mesures (après de trop nombreuses mesures, il semble y avoir des effets de photobleaching mais sur 5 mesures, cet effet n'est pas visible).

La propreté des échantillons est aussi primordiale. Un échantillon sale ou rempli de micelles ou de microgouttelettes va engendrer une diffusion de lumière parasite faussant le signal.

Moyennant de nombreuses précautions et de nombreux essais, j'ai donc essayé de tracer la fluorescence du sous-nageant après réaction et de la comparer avec un étalon connu.

Les résultats avec la streptavidine furent décevants. Le graphe d'émission de fluorescence du sous-nageant et de l'étalon à la concentration initiale en streptavidine se superposent. On ne peut extraire une quantité de streptavidine ayant réagi.
Nous avons essayé de jouer sur les quantités de streptavidine à l'incubation. En effet, si par exemple nous avions été en net excès de streptavidine par rapport aux biotines disponibles sur la goutte, même dans le cas d'une réaction totale, nous n'aurions pu observer de différence entre la fluorescence du sous-nageant après réaction et la fluorescence de la solution initiale. Mais les recherches de la bonne gamme de streptavidine furent vaines.
Systématiquement, le bruit de la mesure nous empêche d'obtenir des estimations sur la densité de streptavidines adsorbées.
Ceci semble montrer que le rendement de la réaction d'adsorption de la streptavidine sur les gouttes biotinilées est en fait très faible. Ceci est un peu étrange compte tenu de la très forte affinité de la streptavidine pour la biotine en volume. Nous en rediscuterons dans le paragraphe 4.

Nous avons mis au point un autre protocole de dosage en retour en faisant cette fois-ci incuber de la biotine-FITC en présence de l'émulsion fonctionnalisée avec la streptavidine.

### I–3-2 : Deuxième tentative : dosage en retour d'une solution de biotine FITC:

Nous avons donc tenté une nouvelle méthode de quantification en venant greffer des biotines fluorescentes sur les streptavidines en surface des gouttelettes puis de quantifier en spectrométrie de fluorescence la biotine n'ayant pas réagie.
Le principe est donc strictement le même que celui décrit dans la figure 1. Mais cette fois-ci, on fait incuber de la biotine fluorescente avec l'émulsion « streptavidinée » et on mesure au spectrofluorimètre la fluorescence des biotines non fixées restant dans les sous nageant.
Les résultats furent bien plus convaincants.
La figure 4 est un exemple de spectre de fluorescence obtenu lors de ces manips de dosage en retour.

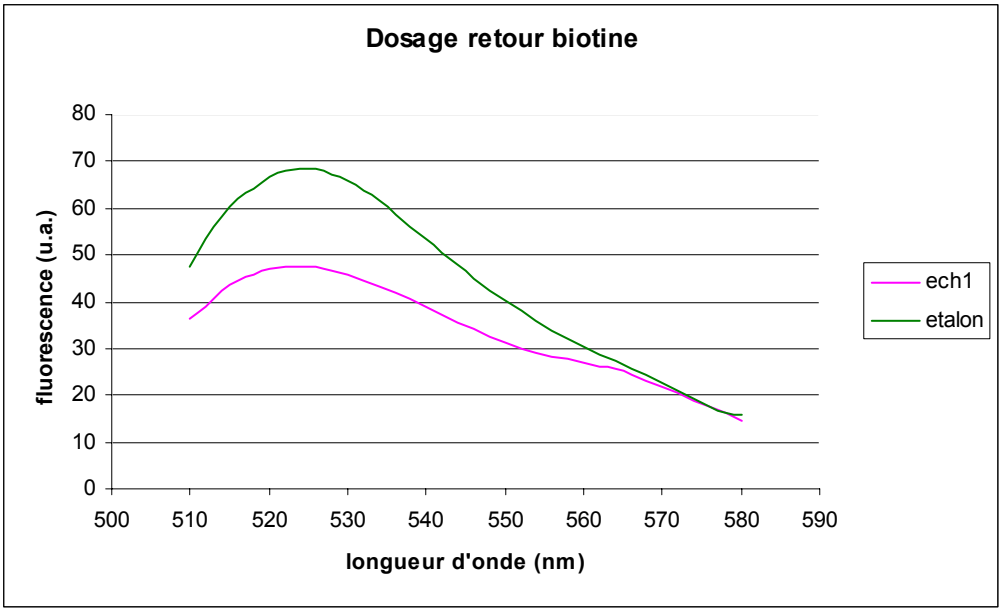



Figure 12 : spectres d'émission de fluorescence lors d'une expérience de dosage en retour de la biotine. Les deux mesures sont faites à amplification égale.

Dans cette situation, un écart significatif apparaît entre la fluorescence de l'étalon et celle du sous-nageant.
Dans le spectre ci-dessus, on éclaire à 475nm et on récupère la lumière sur la gamme de longueur d'onde en abscisse. Le pic intéressant est le pic à 530 nm (émission du FITC). Pour déterminer la concentration en Biotine-FITC, on fait le rapport entre l'intensité des pics à 530 que l'on multiplie par la concentration connue de l'étalon.
Notons que le bruit de fond mesuré avec le même tampon sans fluorophore est proche de 0. Sur le graphe, on observe une petite proéminence à 565nm. Cette bosse est une émission de fluorescence parasite des streptavidine 555 excitées par la lumière d'excitation (475nm). Je considère que l'effet de cette bosse est négligeable dans la fluorescence du sous-nageant à 530nm,
Ayant déterminé la concentration en biotine-FITC du sous nageant et connaissant les volumes de tampon et d'émulsion introduits, on peut remonter à la quantité de biotine greffée sur les gouttelettes d'émulsion.
Si l'on suppose que la réaction d'adsorption de la biotine sur les streptavidines est totale et que deux biotines sont adsorbées par streptavidine, on peut alors remonter à une estimation de la densité de streptavidine sur les gouttes.

La figure 5 offre une synthèse des dosages effectués dans différentes conditions de fonctionnalisation (le ratio Vstrep/Vémulsion varie).

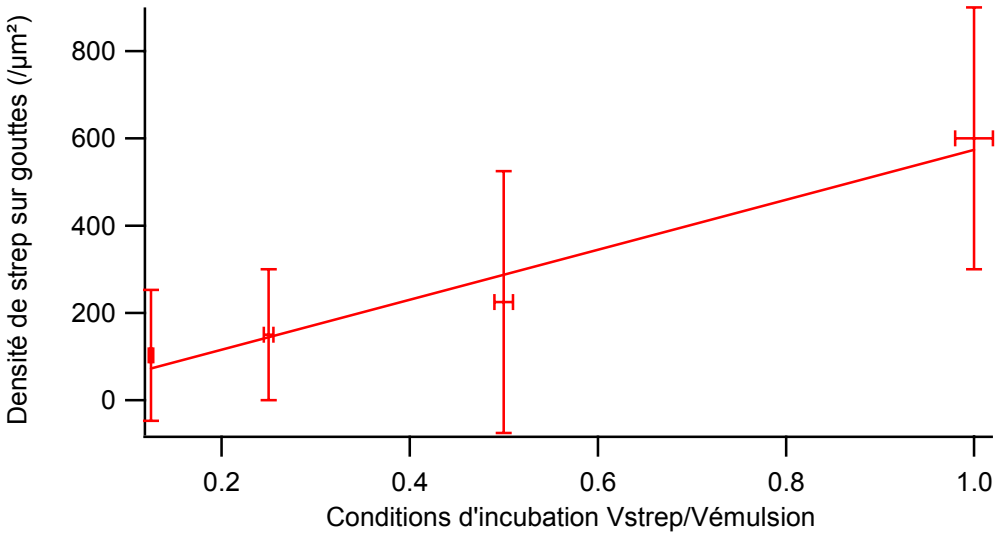



Figure 19 : Mesure quantitative de la densité de streptavidine sur les gouttes selon les conditions d'incubation.

Ce dosage en retour aura permis de se convaincre de l'ordre de grandeur de la densité de streptavidine. D'ailleurs les valeurs estimées concordent bien avec les estimations de Jacques

qui trouvait une densité maximale de 400/µm² et descendait aussi à des valeurs faibles de l'ordre de quelques dizaines/µm². Pour rappel, Jacques avait effectué ces mesures en cytométrie en flux. En utilisant des billes de calibration, il avait pu remonter à des valeurs de densité de streptavidine comprises entre 100 et 400 streptavidine/µm², ce qui est particulièrement proche de que j'ai pu établir.

Un point particulièrement frappant est la faible affinité de la streptavidine pour les biotines situées sur les gouttes. La réaction est loin d'être totale et a en fait un rendement assez faible. Connaissant la plupart des ordres de grandeur intervenant dans cette réaction, on est en mesure d'estimer le k_on de notre réaction d'adsorption des streptavidines sur la biotine. C'est ce que nous allons faire dans le paragraphe suivant.

### I-4 : Description thermodynamique de la réaction d'adsorption :

Nous allons ici refaire un peu de thermodynamique et décrire l'équilibre de la réaction d'adsorption des streptavidines sur les gouttelettes.

On considère le système suivant. Une goutte d'émulsion sur laquelle diffusent des récepteurs (les biotines) est immergée dans une solution où diffusent en volume des ligands (les steptavidines).
Les ligands sont susceptibles de venir réagir avec les récepteurs pour créer des couples adhésifs.
Nous allons ici raisonner en termes de potentiels chimiques. En particulier, à l'équilibre, le potentiel chimique des ligands est le même en solution que sur les gouttes, une fois adsorbés sur les récepteurs.

$\mu_{strep_bulk} = \mu_{strep_bond}$

Nous allons expliciter les deux potentiels chimiques.
En volume, le potentiel chimique des streptavidines s'écrit de façon classique comme le potentiel chimique d'un soluté infiniment dilué en solution. On a :

$\mu_{strep_bulk} = \mu^0_{strep_bulk} + kT \ln c_{strep_bulk}$

Le potentiel chimique standard de la streptavidine $\mu^0_{strep_bulk}$ dépend de l'énergie d'interaction de la streptavidine avec le solvant environnant.

Nous allons détailler un peu une façon d'accéder au potentiel chimique des streptavidines adsorbées sur les gouttes. Pour cela, nous allons écrire l'énergie libre de la gouttelette lorsque des streptavidines sont adsorbées à sa surface. En particulier, nous allons écrire les termes dépendant du nombre de streptavidines adsorbées $N_{strep_goutte}$, puisque le potentiel chimique des streptavidines adsorbées sur la goutte s'écrit :

$\mu_{strep_goutte} = \frac{\partial G}{\partial N_{strep_goutte}}$ où G est l'énergie libre de la gouttelette.

Les termes dépendant de $N_{strep_goutte}$ dans l'énergie libre de la gouttelettes sont :
- la stabilisation énergétique due à la création de liens égale à : $-N_{strep_goutte} E_{strep-biot}$. $N_{strep_goutte}$ est le nombre nombre de streptavidines adsorbées sur les biotines en surface de la goutte. $E_{strep-biot}$ est l'énergie d'un lien biotine/streptavidine. On pourrait écrire $E_{strep-biot}$

comme la différence entre le potentiel chimique de la biotine seule en surface de la goutte et le potentiel chimique du couple biotine/streptavidine en surface de la goutte.
-l'énergie associée à l'entropie de répartition des $N_{strep_goutte}$ liens sur les $N_{biotine}$ biotine à la surface de la goutte. Il s'agit ici uniquement d'une entropie de configuration qu s'écrit comme une combinatoire :

$$S_{répartition_N_{strep_goutte}-Nbiotine} = k \ln\left( \frac{N_{biotine}!}{N_{strep_goutte}!(N_{biotine} - N_{strep_goutte})!} \right).$$

Finalement :

$$\mu_{strep_goutte} = \frac{\partial G}{\partial N_{strep_goutte}} = -E_{strep_biotine} + kT \ln\left( \frac{N_{strep_goutte}}{N_{biotine} - N_{strep_goutte}} \right).$$

L'égalité des potentiels chimiques entre la strep en solution et la strep liée s'écrit donc :

$$\mu_{strep_bulk} = \mu_{strep_bond}$$

$$\Leftrightarrow \mu^0_{strep_bulk} + kT \ln c_{strep_bulk} = -E_{strep/biotine} + kT \ln\left( \frac{N_{strep_goutte}}{N_{biotine} - N_{strep_goutte}} \right)$$

$$\Leftrightarrow \frac{N_{strep_goutte}}{c_{strep_bulk}\left(N_{biotine} - N_{strep_goutte}\right)} = e^{\frac{\mu^0_{strep_bulk} + E_{strep/biotine}}{kT}}$$

En écrivant $E_{strep/biotine} = \mu^0_{strep_goute} - \mu^0_{biotine}$, le terme $\mu^0_{strep_bulk} + E_{streptavidine/biotine}$ dans l'exponentielle est égal à l'enthalpie libre standard de la réaction entre ligand en volume et récepteur en surface.
Par ce raisonnement on arrive donc à une loi d'action des masses entre des objets diffusant en volume et des sites réactifs de surface. Ce résultat avait été établi par Langmuir dans les années 30 pour décrire l'adsorption d'un gaz sur un substrat solide.
Quoique classique, ce résultat est tout de même remarquable.
En écrivant naïvement le bilan de la réaction d'adsorption entre ligand et récepteur :
$Strep_bulk + Biotine_libre_surface \underset{k_off}{\overset{k_on}{\rightleftharpoons}} Strep/Biot_surface$,
on peut donc écrire sans erreur :

$$K_a = \frac{k_{on}}{k_{off}} = e^{\frac{\Delta rG^o}{kT}} = \frac{\left[Strep/Biot_surface\right]}{\left[Strep_bulk\right]\left[Biotine_surface\right]}$$

où $\left[Strep/Biot_surface\right] = \frac{N_{strep_goutte}}{S_{gouttelette}}$ et $\left[Biotine_libre_surface\right] = \frac{N_{biotine} - N_{strep_goutte}}{S_{gouttelette}}$

A partir de nos expériences, on peut estimer les différentes concetrations mises en jeu.
J'ai pu observer le plateau de saturation des biotines en surface des gouttes lorsque les expériences se passent dans un tampon acide. Le plateau est plus haut que le dosage en retour fait lorsque la réaction se passe en tampon neutre.

Je peux estimer ma concentration totale de biotine sur mes surfaces à ~1000/µm².
Lorsque j'introduit un volume de 1µl de strep dans de 250µl de tampon la concentration initiale est $10^{-7} mol/l$.
Comme en témoignent les tentatives de dosage en retour, la concentration de streptavidine en solution ne change pratiquement pas durant la réaction et reste environ égale à $10^{-7} mol/l$.

Dans ces conditions, la concentration en strep sur les gouttes est de 100/µm².
La constante de ma réaction vaut donc :

$$K_a = \frac{[Strep/Biot_surface]}{[Strep_bulk][Biotine_surface]} = \frac{100}{900*10^{-7}} = 10^6 mol^{-1}.l$$

En volume, ce même Ka vaut $10^{15} mol^{-1}.l$ …
Or le koff du couple $[Strepavidine/Biotine(2D)]$ reste sensiblement le même qu'en volume, soit : $k_{off} = 10^{-8} s^{-1}$.

On a donc : $k_{on} \sim 10^{-2} mol^{-1}.l.s^{-1}$.

La réaction d'adsorption des streptavidines sur les gouttelettes est donc très inefficace. La biotine est semble-t-il très peu accessible.

Des expériences menées en parallèle m'ont convaincu de la gêne stérique limitant l'accès aux biotines.
J'ai notamment essayé de changer la formulation de mes gouttelettes en introduisant un spacer long (~15nm) entre mes gouttelettes et les biotines.
Pour cela, j'ai incorporé dans ma phase aqueuse lors de la préparation de l'émulsion, une fraction de phospholipides biotinilés dont la tête hydrophile est séparée de la biotine par un PEG-2000 (longueur 15nm).
Les observations furent frappantes. La réaction est bien plus efficace avec ces PEG. Avec une concentration 10 fois moindre, j'obtenais une couverture en streptavidine 10 fois plus grande et semble t il limitée par la proportion de phospholipides biotinilés.
Je n'ai malheureusement pas pu utiliser ces gouttelettes car des ponts biotine-strep-biotine s'établissent entre les phospholipides au sein même des gouttelettes ne laissant quasiment plus de streptavidine libre pour l'adhésion.
Ces résultats confirment que dans le cas décrit où j'utilise les acides oléiques de l'huile de soja, la réaction de surface a un rendement très pauvre et ne permettent de greffer que quelques centaines de streptavidines par µm² de goutte.
Ces concentrations sont toutefois largement suffisantes pour les expériences d'adhésion qui vont suivre.

Nous sommes donc capables de fonctionnaliser nos gouttelettes d'émulsion avec de la streptavidine. Nous disposons d'un moyen simple pour comparer les densités de streptavdine en surface à partir de la fluorescence sur la couronne. Enfin, nous avons quantifié la densité de streptavidine à leur surface. Ces gouttelettes sont maintenant bien caractérisées.
Les deuxièmes matériaux à caractériser sont les bicouches lipidiques. C'est ce que nous allons faire dans le prochain chapitre.

Bibliographie :


1. Fattaccioli, J., *Mouillage Specifique d'Emulsions sur Substrats Biomimetiques*. 2006.
2. Mason, T. and J. Bibette, *Emulsification in viscoelastic media.* Physical review letters, 1996. **77**(16): p. 3481-3484.
3. Mabille, C., et al., *Rheological and shearing conditions for the preparation of monodisperse emulsions.* Langmuir, 2000. **16**(2): p. 422-429.
4. Leal-Calderon, F., V. Schmitt, and J. Bibette, *Emulsion science: basic principles*. 2007: Springer Verlag.
5. Fattaccioli, J., et al., *Size and fluorescence measurements of individual droplets by flow cytometry.* Soft Matter, 2009. **5**(11): p. 2232-2238.

II : Bicouches lipidiques supportées : fabrication et caractérisation.

Pour notre expérience d'adhésion spécifique, nous avons développé une technique déjà connue de dépôt de bicouches lipidiques sur des lamelles de verre. Plusieurs techniques sont évoquées dans la littérature pour la fonctionnalisation des lamelles avec des bicouches lipidiques supportées (SLB pour Supported Lipid Bilayer). Entre autres, un procédé commun de fabrication est la fusion de nanovésicules sur les lamelles. Dans un premier temps, nous allons décrire cette technique et le protocole que nous avons employé pour la conception de ces bicouches.
Dans une deuxième sous-partie, nous allons décrire la méthode expérimentale nous ayant permis de caractériser nos lamelles et notamment d'accéder au coefficient de diffusion sur les bicouches ainsi qu'à une détermination précise de concentrations en fluorophore : cette puissante technique est la FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy.

II-1 : Dépôt de bicouches supportées par fusion de vésicules :

II-1-1 : Matériel et protocole expérimental :

La technique de dépôt de bicouches lipidiques par fusion de vésicules a vu le jour dans les années 80 notamment dans le groupe de McDonnell à Stanford. Le principe de la fabrication est de fabriquer des nanoliposomes de phospholipides (taille typique : quelques dizaines de nanomètres). En présence d'une surface bien propre et dans une solution contenant des ions calcium, ces vésicules vont fusionner sur la surface et former une bicouche lipidique. L'effet des ions calcium sur les vésicules a été mis en évidence dans les années 70. Les ions calcium induisent par exemple une forte agrégation entre liposomes ([2]). Ils permettent aussi aux liposomes de relarguer leur contenu.([3]). Ces mêmes ions calcium sont la cause de la fusion des nanoliposomes sur des lamelles propres. Une des explications proposées est la possibilité de ponter, grâce à la double charge des ions calcium, les phospholipides (portant une charge négative au niveau du phosphate) composant les liposomes.
Dans le cas de la fusion des nanovésicules sur du verre ou de la silice, on se retrouve un peu dans le même cas de figure. La surface d'un verre propre est composée de fonction Si-OH qui peuvent s'ioniser en Si-O-. On peut imaginer un pontage entre les Si-O- du verre et les charges négatives portées par les groupements phosphates des phospholipides, pontages qui seront d'autant plus 'nombreux' si les vésicules fusionnent et recouvrent le verre.
Notons que cette explication a ses limites. Mes phospholipides par exemple portent une charge positive au bout de la tête hydrophile qui pourrait rendre difficile l'approche de l'ion Calcium.

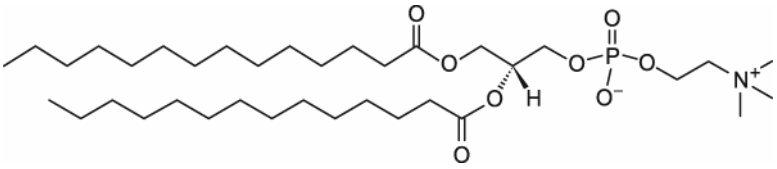
On peut trouver de nombreux protocoles de fusion de vésicules dans la littérature. Je me suis servi d'un protocole sur le net (Yegor Domanov ; [4]) et de quelques bons conseils d'amis pour établir mon propre protocole. Ce protocole m'a permis de faire des dépôts homogènes de bicouches sur de grandes surfaces de l'ordre du centimètre².

Je vais maintenant décrire les produits utilisés et mon protocole de formation de bicouches supportées.

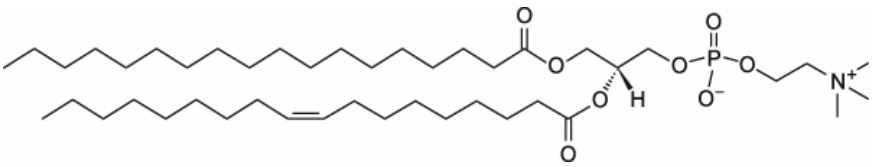
Matériel et méthode :
Les matériaux élémentaires des bicouches lipidiques supportées sont les phospholipides.

Mes bicouches sont tout d'abord constituées d'un phospholipide 'de base' représentant près de 99% des lipides composant mes bicouches. Je n'ai pas essayé de faire des mélanges de phospholipides pour essayer d'exhiber des séparations de phase ou autres phénomènes liés à des compositions à plusieurs lipides. Selon les bicouches désirées j'ajouterai en petites proportions certains phospholipides fluorescents ou fonctionnalisés avec de la biotine.

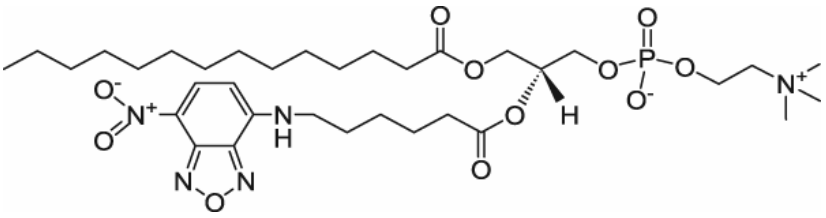
J'ai utilisé deux types de phospholipide de base :
-1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (**DMPC**) : 2 chaînes de 14 carbones, pas d'insaturations ; Température transition Gel/liquide : 23°C (utilisable seulement l'été ou dans une pièce chauffée pour s'assurer la fluidité de la bicouche)



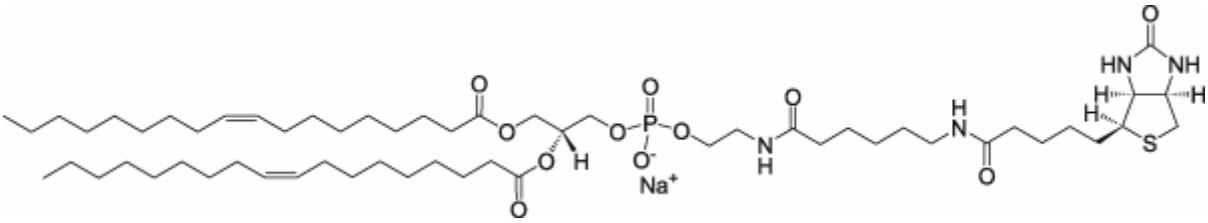
-1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (**SOPC**): 2 chaînes de 18 carbones ; une insaturation ; Température transition Gel/liquide -6°C (grâce à l'insaturation).



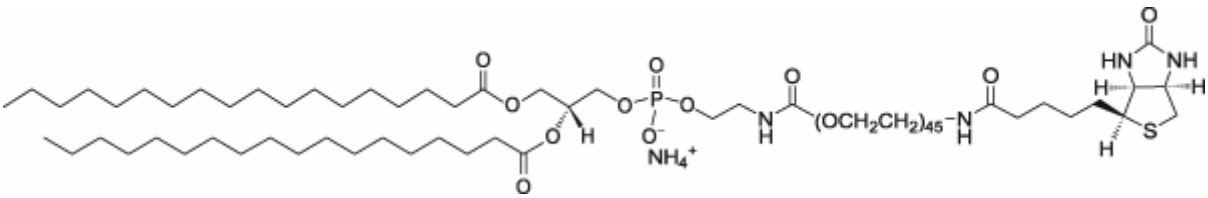
A ces lipides 'de base', j'ai pu ajouté dans certaines expériences un lipide portant un marqueur fluorescent porté sur une des chaînes lipidiques. Ces lipides sont bien pratiques pour s'assurer de la qualité d'une bicouche. Ils sont utilisés dans des proportions massiques typiques comprises entre 0.1% et 1% .
J'ai utilisé comme phospholipide fluorescent :
- 1-myristoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-*sn*-glycero-3-phosphocholine ; une chaîne C14, une chaîne C6 portant le groupe fluorescent 'NBD' ; j'appellerai par abus de langage ce phospholipide **NBD.**



Pour mes expériences d'adhésion spécifique, j'ai incorporé une fraction de phospholipides biotinilés comprise entre 0.00001% et 1% du nombre total de lipides.
Mes lipides biotinilés sont :
-1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(cap biotinyl) (sodium salt) (**DOPC-Biotin)**; chaînes 18C; deux insaturations; terminaison biotine séparée d'une courte chaîne d'une douzaine de carbones (~2nm hors de la bicouche)



-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[biotinyl(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt) (**DOPC-PEG-Biotin)** ; chaînes 18C; pas d'insaturation; terminaison biotine séparée par une pEG de masse molaire 200 (longueur ~15nm hors de la bicouche)



J'ai fabriqué des bicouches avec le DMPC ou le SOPC. Dans les deux cas, les proportions de lipides sont les mêmes. Je vais décrire mon protocole avec le SOPC.

Mes phospholipides sont stockés dans le chloroforme, aliquotés dans des vials et conservés au congélateur. Ils sont stables pendant plusieurs mois.

Ma solution mère de SOPC a une concentration de 10mg/ml.
M& solution mère de NBD a une concentration de 0.1mg/ml.
Ma solution mère de DOPC-Biotine ou de DOPC-PEG-Biotine a une concentration de 0.1mg/ml. Je dispose aussi d'aliquots à des concentrations de 0.01mg/ml, 0.001mg/ml,, etc..
Dans le protocole, je vais décrire la préparation d'une bicouche SOPC contenant 1% de NBD et 1% de DOPC-Biotine.

Protocole :

**Solution aqueuse de nanovésicules :**

-dans un vial en verre de 2ml, introduire 50µl de la solution mère de SOPC ; 50µl de la solution mère NBD ; 50µl de la solution mère de DOPC-Biotin (à 0.1mg/ml).
- évaporer le chloroforme sous un flux d'azote. Les phospholipides vont alors tapisser la paroi du vial. Il faut en essayant de déposer un film mince et uniforme de phospholipides sur les bords de la paroi du vial.
-pour ôter toute trace de chloroforme, placer les vials dans un déssicateur sous vide pendant une heure.

Il faut maintenant faire passer les phospholipides, pour l'instant déposés sur la paroi du vial, en solution aqueuse. Le tampon utilisé est un tampon phosphate à 10mM en phosphate, 120mM en NaCl. Le pH est de 7.2.
-ajouter 1ml de tampon. Le dépôt de phospholipide est blanchâtre, la phase aqueuse translucide.
-Agiter au vortex. Le dépôt de phospholipides va passer en solution en adoptant des structures à trois dimensions compliquées et mal définies dont la taille est micrométrique. La phase aqueuse devient turbide. Si les phospholipides sont bien séchés dans le dessicateur, le transfert en solution va assez vit (quelques secondes d'agitation).
-transférer la solution turbide dans un récipient adapté (pour moi un ependorf en plastique de 1.5 ml) et passer la solution aux ultrasons. Il faut utiliser une pointe effilée et un sonificateur. Sonifier pendant 1à minutes, par pulses de quelques secondes (pour moi 5) entrecoupés de pauses de 10 secondes. L'ependorf doit plonger dans un bain de glace pour éviter une surchauffe de la solution. La puissance de notre sonificateur est exprimée en % de la puissance maximale. Je l'utilisais à 21% de la puissance maximale.
Le sonificateur permet de délivrer une grande énergie à la solution et a pour effet de briser les structures micrométriques compliquées de phospholipides en vésicules de quelques dizaines de nanomètres.
Lors de cette étape, la solution de vient translucide. Les nanovésicules ne diffusent plus la lumière.
Pour un dépôt de qualité, il est important qu'à la fin de la sonification, la taille des vésicules soit comprise entre 30 et 60nm. Il est donc bon de vérifier en DLS la taille des nano-vésicules en fin de sonification. Si la taille des vésicules est trop grande, il ne faut pas hésiter à re-sonifier l'échantillon et à augmenter la puissance de sonification.

La solution de nanovésicules obtenue est prête à l'emploi. Elle peut se conserver quelques jours mais je préfère m'en servir le jour de la préparation.

**Solution de CaCl2 :**

Pour que la fusion des nanovésicules ait lieu, il doit y avoir des ions calcium en solution.
La solution contenant les ions calcium qui sera utilisée a une concentration en CaCl2 de 10 millimoles/litre. Préférer une poudre de calcium pour biochimie (propre). La solution de CaCl2 semble moins efficace au bout de deux ou trois semaines.

**Nettoyage des lamelles :**

Une des clés de la réussite du protocole est la propreté et l'activation des lamelles de verre. Déposer sur du verre est plus difficile que déposer sur du mica clivé ou de la silice. Le verre n'est pas cristallin et sa surface présente des aspérités et est facilement salie.
J'ai lavé mes lamelles en deux étapes.

1- nettoyage grossier : je nettoie les lamelles avec du surfactant (Paic citron) du bout des doigts. Je rince à grande eau (il ne doit surtout pas rester de surfactant sur la lamelle), d'abord avec l'eau du robinet, puis avec de l'eau milliQ. Je sèche la lamelle au pistolet à air comprimé et la réserve sur un porte-lamelle.
2- Nettoyage au plasma : je mets le porte-lamelle dans un plasma à oxygène durant 15 minutes.

A la sortie du plasma, la lamelle est propre et activée. Sa surface est faite de Si-OH ou Si-O- bien hydrophiles qui vont permettre la fusion des nano-vésicules. Mais en quelques minutes, la surface de verre se désactive et se faire oxyder par l'air ambiant pour donner des Si-O-Si. Le dépôt marche alors moins bien.
Il s'agit donc d'aller vite à la sortie du plasma.

**Incubation des nanovésicules et du calcium :**

J'ai employé deux méthodes pour faire incuber mes lamelles en présence des nano-vésicules et du calcium.
Notons ici qu'il est important de ne JAMAIS exposer la bicouche à l'air. Elle est alors immédiatement détruite.

1ère méthode : incubation sur parafilm.
Je découpe des bandes de parafilm de 5cm*10cm que je dépose sur une paillasse.
Une fois les lamelles sorties du plasma, je les dépose sur les bandes de parafilm.
J'ajoute alors 500µl de la solution de nanovésicules et 500 µl de la solution de CaCl2.
Le parafilm est très hydrophobe. Ceci va permettre au ml de liquide de ne pas s'étaler et de faire une crêpe épaisse en dessus de la lamelle.
Avec une micropipette, j'agite le mélange.
Je laisse incuber 30 minutes à l'abri de la lumière.
Je rince ensuite avec une pissette du tampon utilisé pour faire les nanovésicules (Phosphate 10mM ; NaCl 120mM ; pH 7.2). Il faut bien maintenir la lamelle (avec une pince en teflon par exemple) pour ne pas qu'elle glisse hors du parafilm.
La bicouche est prête.

Reste tout de même un passage délicat lors duquel j'ai souvent gâché des bicouches. Il faut parvenir à coller la lamelle sur une lame pour l'observer au microscope.
Pour cela, j'ai utilisé du scotch double-face. Je colle un carré de la taille d'une lamelle sur une lame de microscope et j'enlève un carré intérieur de scotch. L'étape critique consiste, en un mouvement rapide et précis à faire coller la lamelle sur la lame. On ne peut exposer la bicouche à l'air, il faut donc 'traverser' un volume de liquide pour accéder à la lamelle. Il arrive fréquemment que la lamelle glisse lors de l'approche de la lame et n'assure plus un contact hermétique. La bicouche est alors perdue.

2ème méthode : préparation d'une chambre à flux.

Afin d'observer la cinétique de l'adhésion des gouttes, j'ai mis au point une petite chambre à flux bien pratique et bien moins risquée que la méthode précédente.
Cette chambre est représentée sur la figure 2.
Pour préparer une chambre, il faut découper trois fines lames de verre de 0.5cm*2cm et une plus petit 0.5cm*0.5cm à l'aide d'un diamant.
Avec de la colle UV, je colle ces petites lames sur une lame de verre (voir figure).
Dans les deux petits canaux, je colle, toujours avec la colle UV, deux pointes de micropipettes à bout effilé.
Lorsque les lamelles sortent du plasma, je colle les lamelles sur la petite construction de verre.
Il est primordial de bien s'assurer de l'étanchéité de la chambre en ajoutant un surplus de colle aux endroits critiques (jonctions, canaux).
Alors, je peux introduire via les cônes de micropipettes les solutions de nano-vésicules et de calcium.
Les volumes utilisés avec cette méthode sont moindres puisqu'il suffit de 180µl de solution de nanovésicules et 180µl de solution de chlorure de calcium.
Je mélange les deux solutions en faisant affluer et refluer les liquides dans la chambre.
Je laisse incuber pendant 30 minutes.
Enfin, je rince le calcium et les nanovésicules en excès avec 15ml de tampon à l'aide d'une seringue dont l'embout aura préalablement élimé.
La bicouche est prête et on peut introduire dans la chambre tous les liquides que l'on veut.

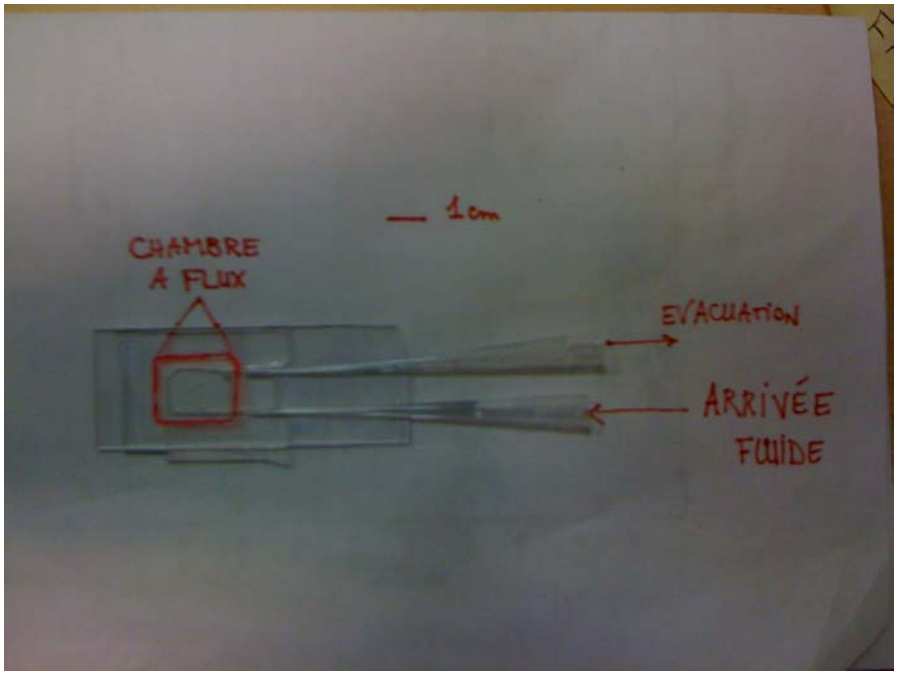



Figure 1 : Photo d'une de mas chambre à flux. La lamelle qui recouvre la chambre à flux porte une bicouche supportée.

Avec cette méthode, il faut faire attention à ne pas introduire de bulles d'air qui pourraient détruire la bicouche.

II-1-2 : Observation des SLB en épi-fluorescence :

Une première vérification de la formation d'une SLB peut se faire en épi-fluorescence. En utilisant une fraction de phopholipides fluorescents (NBD ; de 0.1% à 1% des phospholipides), on peut observer au microscope la présence de SLB diffusantes.
Une SLB réussie est caractérisée par une fluorescence homogène sur sa surface et une diffusion des phospholipides. Pour vérifier la diffusion de surface des bicouches, je me suis servi d'une méthode de continuous photobleaching pour s'assurer de la qualité des bicouches (Wachsmuth et al. Biophys.Journal 2003 [5], Fenz et al., Langmuir 2009 [6]). Bien contrôlée, cette méthode permet d'accéder aux coefficients de diffusion des espèces sur les bicouches. Je ne m'aen suis servi que pour caractériser la qualité de mes lamelles.
En fermant le diaphragme de champ de notre microscope, on peut délimiter une zone illuminée, image du diaphragme de champ du microscope. Juste après les premiers instants d'illumination , si une bicouche fluide est présente, on observe une zone uniformément fluorescente (image de gauche de la figure 2). Si l'illumination se prolonge, les molécules du centre de zone, qui n'auront pas eu le temps de diffuser hors de la zone illuminée vont bleacher. Sur les bords, des molécules diffusent incessamment entre la zone non illuminée et la zone illuminée et on va voir apparaître un gradient d'intensité de fluorescence. Le profil de fluorescence observé est caractéristique du coefficient de diffusion des phospholipides et de leur caractéristique de fluorescence (temps caractéristique de bleaching). Ces informations qualitatives sont des signes de la présence d'une bicouche diffusante. En l'absence de diffusion (mais en présence de fluorophores), le gradient d'intensité de fluorescence aux bords n'apparaît plus. Après illumination prolongée, si l'on se déplace un peu sur l'échantillon, on observe alors le contour nettement délimité de la zone précédemment illuminée (figure 3).

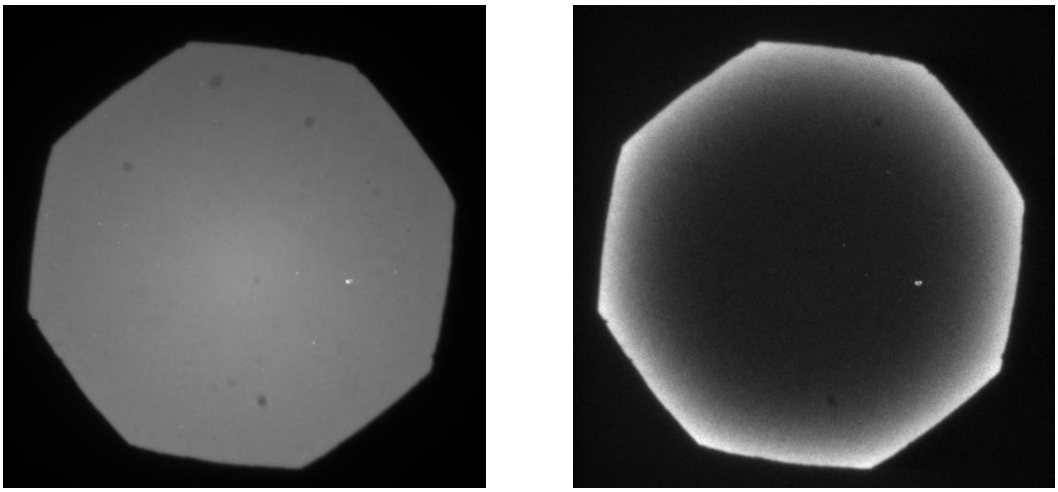


Figure 2 : observation en épifluorescence de slb marquées avec du NBD.
A gauche, image juste après illumination sous lampe à mercure.
A droite, état stationnaire atteint après une minute d'illumination sous lampe à mercure.
Les fluorophores de la partie centrale sur la photo de droite ont bleaché. Sur les bords, des phopholipides provenant de la zone non-illuminée continuent d'entrer dans la zone illuminée et sont encore visibles en épi-fluorescence. Ce gradient de luminosité caractérise une diffusion des lipides dans la SLB. Ces observations en épi-fluorescence permettent aussi de caractériser à vue d'œil la qualité des bicouches.

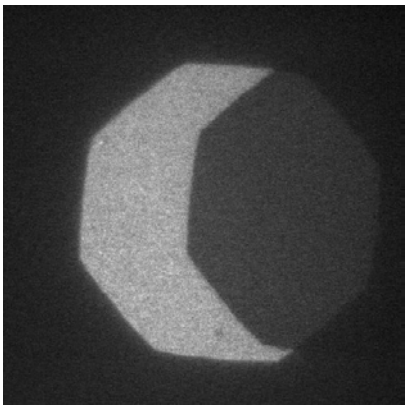


Figure 3 : surface d'une lamelle de verre couverte de fluorophores mais absence de bicouche fluide. La zone de droite a été illuminée pendant un certain temps, faisant bleacher les fluorophores dans cette zone. En se déplaçant légèrement, on remarque que la zone bleachée a un contour très net. Il n'y a pas de diffusion sur cette lamelle de verre, seulement un dépôt de phopholipides fixe.

Ces observations en fluorescence offrent de rapides et de précieuses informations sur l'état des bicouches et la diffusion des phopholipides à leur surface mais elles renseignent assez peu sur la quantité de phospholipides fluorescents diffusant.
Nous avons besoin d'une méthode parallèle pour accéder aux concentrations en molécules fluorescentes sur nos bicouches. D'ailleurs, calibrer la fluorescence sur nos bicouches est primordial pour l'analyse quantitative de nos expériences d'adhésion dans lesquelles les zones de contact se trouveront sur la bicouche.

Pour parvenir à nos exigences de quantification, nous avons mis au point un montage de Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) nous permettant d'aller caractériser plus finement nos SLB et de calibrer la fluorescence sur nos bicouches.

## II-2 : Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) et quantification :

Les débuts expérimentaux de la FCS datent de 1972 et d'un article de Magde, Elson et Webb (PRL 1972 [7]). La FCS est utilisée pour mesurer des concentrations et des coefficients de diffusion de fluorophores diffusant dans l'espace. L'idée est d'illuminer à la longueur d'onde d'excitation des fluorophores étudiés, une zone de l'espace de taille micrométrique. Lorsque des fluorophores sont présents dans cette zone, ils réémettent un signal de fluorescence mesurable. Au cours du temps, grâce à leur diffusion, les fluorophores entrent et sortent du volume d'illumination. La FCS mesure et corrèle les fluctuations de fluorescence provenant du volume illuminé au cours du temps. Elle donne ainsi accès à la fois à une concentration moyenne de fluorophores dans le volume illuminé et au temps caractéristique de diffusion des fluorophores dans le volume illuminé.

### II-2-1 : Bases théoriques de la FCS :

Suivre l'évolution temporelle des fluctuations de fluorescence signifie que l'on va tenter d'accéder à la fonction de corrélation temporelle des fluctuations de l'intensité de fluorescence provenant de la zone illuminée. L'intensité de fluorescence est proportionnelle au nombre de fluorophores dans le volume illuminé. Pour pouvoir mesurer des fluctuations de fluorescence liées aux fluctuations du nombre de fluorophores, une condition nécessaire est de travailler à des concentrations assez basses en fluorophores (typiquement comprises entre 10^-7 et 10^-10 mol/l soit moins de 100 fluorophores dans le volume d'illumination).

En effet, le nombre de fluorophores dans le volume d'illumination suit une loi de Poisson centrée sur le nombre moyen de fluorophores dans le volume ([8]). L'écart-type du nombre de fluorophores est donc égal au nombre moyen de fluorophores dans le volume d'illumination.
Autrement écrit :

$$\langle \delta N \rangle^2 = \langle N(t) - \langle N \rangle \rangle^2 = \langle N \rangle$$

.
Les fluctuations du nombre de fluorophores dans le volume d'illumination par rapport au nombre de fluorophores varient donc comme :

$$\frac{\langle \delta N \rangle^2}{\langle N \rangle^2} = \frac{\langle N \rangle}{\langle N \rangle^2} = \frac{1}{\langle N \rangle}$$

Il est donc primordial pour pouvoir mesurer des fluctuations de signal de travailler avec des concentrations en fluorophores assez petites (typiquement comprises entre 10^-7 et 10^-10 mol/l).
La fonction de corrélation de l'intensité de fluorescence G(τ) peut être écrite sans précaution :

$$G(\tau) = \frac{1}{T}\int_0^T F(t)F(t+\tau)dt$$

F(t) est la fluorescence collectée depuis le volume illuminé. Elle contient les caractéristiques du montage expérimental et celles des fluorophores utilisés. Nous développerons l'expression de F(t) plus tard.
T représente typiquement la durée sur laquelle on suit l'expérience.

Dans les expériences de FCS et de mesure de corrélation en général, on préfèrera calculer la fonction de corrélation normée des fluctuations du signal détecté. Les fluctuations de fluorescence $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$ sont en effet la grandeur intéressante.
( $\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T}\int_0^T F(t)dt$ est la valeur moyenne de fluorescence détectée.)
Les fluctuations de fluorescence peuvent typiquement être dues à la diffusion des fluorophores dans et hors du volume illuminé ou à une réaction chimique modifiant la fluorescence des espèces diffusantes.

Nous allons maintenant détailler l'expression de la fluorescence collectée.
La fluorescence détectée dépend en premier lieu de la zone d'espace illuminée et de l'intensité locale d'illumination. On définit donc une fonction spatiale de répartition en énergie lumineuse $I_{exc}(r)$.
Dans un montage bien aligné, le faisceau d'illumination est symétrique autour de l'axe otique et en général gaussien.
$I_{exc}(r)$ est donc une répartition d'intensité gaussienne centrée sur l'axe optique. On peut écrire :
$I_{exc}(r) = I_0 f(r)$, où f(r) est une gaussienne selon les trois directions de l'espace.

La probabilité pour les fluorophores d'absorber un photon est proportionnelle à l'intensité lumineuse locale $I_{exc}(r)$, à la concentration en fluorophores C(r,t) et à la section efficace d'absorption des fluorophores σ(t) (dépendance en temps traduit l'éventuelle dégradation des fluorophores).

Lorsqu'ils absorbent un photon, les fluorophores passent dans un état excité et ont alors une certaine probabilité de réémettre un photon de fluorescence. Cette probabilité est le rendement quantique des fluorophores Φ(t).

A ce point, nous avons déterminé une intensité d'émission de fluorescence.
$I_{émission}(r,t) = I_0 f(r) * C(r,t) * \sigma(t) * \phi(t)$.
Cette intensité correspond au nombre de photons réémis localement par unité de temps par les fluorophores.

Dans la fonction de collection de fluorescence F(t), on ne va compter que les photons détectés par le système optique. Un point crucial de la FCS est son caractère confocal. Il faut en effet faire coïncider dans l'espace le volume illuminé et l'image par le système optique du détecteur. Les détecteurs sont en général en général des diodes à avalanches.
On appelle S(r) l'image par le montage optique du détecteur. Si le détecteur est une ouverture de quelques dizaines de microns placée dans le plan focal d'une lentille de collection en sortie de l'objectif, S(r) sera l'image de cette ouverture par le système lentille de collection-objectif. Les dimensions de cette image seront en général limitées par la diffraction.

La qualité de la détection va en outre dépendre de l'ouverture numérique de l'objectif utilisé, de la qualité du matériel optique utilisé (transmission des lentilles..), du rendement quantique du détecteur. Ces différentes dépendances vont intervenir via un coefficient d'atténuation α constant.

Encore une fois, il est important sur un montage de FCS de bien faire coïncider S(r) avec la fonction de distribution spatiale d'intensité lumineuse f(r) pour s'assurer que le maximum de photons de fluorescence émis soit collecté via le montage optique.
Finalement, la fonction F(t) s'écrit :
$F(t) = \int I_0 f(r) * C(r,t) * \sigma(t) * \phi(t) * \alpha S(r) dr$, où l'intégrale porte sur le volume sur lequel est défini $f(r)S(r)$.
$f(r)S(r)$ caractérise le recouvrement entre l'image du faisceau d'illumination et l'image du détecteur par leur trajet optique respectif (trajet qui peut être différent). Il traduit le caractère confocal du montage.
Souvent, on assimile la fonction $f(r)S(r)$ à une gaussienne à trois dimensions qui décrit la répartition spatiale de la lumière émise :
$f(r)S(r) = e^{-2\frac{r^2}{r_0^2}} e^{-2\frac{z^2}{z_0^2}}$.
On peut regrouper les paramètres $I_0, \sigma(t), \phi(t)$ et $\alpha$ en un paramètre unique η(t) qui est un nombre caractéristique de l'intensité de fluorescence collectée par molécule.
On a :
$\eta(t) = I_0 * \sigma(t) * \phi(t) * \alpha$.
Lorsque l'on s'intéresse aux fluctuations temporelles de la fluorescence, la dépendance temporelle intervient dans la concentration en fluorophores et éventuellement dans le coefficient η par l'intermédiaire de la section efficace d'absorption $\sigma(t)$ et du rendement quantique $\phi(t)$ des fluorophores (en particulier, si les fluorophores se dégradent (bleachent), il faudra faire attention à cette dépendance temporelle).
Ainsi, les fluctuations de fluorescence peuvent s'écrire :

$\delta F(t) = \int e^{-2\frac{r^2}{r_0^2}} e^{-2\frac{z^2}{z_0^2}} * \delta(\eta.C(r,t))dV$ , où $\delta(\eta.C(r,t)) = \eta(r,t).C(r,t) - \langle \eta(r,t).\delta C(r,t) \rangle_t$

La fonction de corrélation normée des fluctuations de fluorescence s'écrit alors :

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t)\delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\left\langle \iint f(r)S(r)\delta\left(\eta.C(r,t)\right) * f(r')S(r')\delta(\eta.C(r',t+\tau))dVdV' \right\rangle}{\left\langle \int f(r)S(r)(\eta.C)(r,t)dV \right\rangle^2}$$

*soit*

$$G(\tau) = \frac{\iint f(r)S(r)f(r')S(r')\left\langle \delta\left(\eta.C(r,t)\right)\delta(\eta.C(r',t+\tau)) \right\rangle dVdV'}{\left( \int f(r)S(r)\langle (\eta.C)(r,t) \rangle dV \right)^2}$$

Si l'on fait l'hypothèse (souvent valable expérimentalement) que les fluorophores conservent leur caractéristique de fluorescence au cours du temps (pas de bleaching au cours de l'expérience), alors η devient indépendant du temps et l'expression de G(τ) se simplifie en :

$$G(\tau) = \frac{\iint f(r)S(r) * f(r')S(r')\left\langle \delta\left(C(r,t)\right)\delta(C(r',t+\tau)) \right\rangle dVdV'}{\left( \int f(r)S(r)\langle C \rangle dV \right)^2}$$

Dans le cas de fluorophores diffusant librement au sein d'un liquide, on peut écrire une expression intégrée de G(τ). Le calcul mène à (voir annexe en fin de chapitre pour plus de détail):

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{eff}\langle C \rangle} \cdot \frac{1}{(1+\frac{\tau}{\tau_d})} \cdot \frac{1}{\sqrt{1+\left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_d}}}$$

Il est intéressant de remarquer que : $G(0) = \frac{1}{V_{eff}\langle C \rangle} = \frac{1}{\langle N \rangle} \Leftrightarrow \langle C \rangle = \frac{1}{V_{eff} G(0)}$ .

L'ordonnée à l'origine des courbes de corrélation de fluorescence, connaissant les dimensions du volume confocal ($r_0$ et $z_0$ ), donne accès à la concentration en fluorophores dans l'échantillon. Nous nous servirons beaucoup de ce résultat dans la calibration de la fluorescence de nos bicouches.

A deux dimensions (le cas de nos bicouches), il n'y a plus de diffusion selon l'axe otique (axe z) et les formules se simplifient en :

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{eff}\langle C \rangle} \cdot \frac{1}{(1+\frac{\tau}{\tau_d})}$$

avec $V_{eff} = \pi r_0^2$.

La concentration $\langle C \rangle$ est la concentration surfacique de fluorophores diffusant sur la bicouche.

La FCS permet d'accéder à des caractéristiques plus fines que la diffusion dans le volume d'illumination. Les fluorophores peuvent par exemple une fois dans leur état excité transiter vers un état triplet. Un état triplet est lié au passage d'un électron excité sur une orbitale d'énergie voisine avec inversion de spin. Une fois dans cet état triplet, les électrons mettent un temps de l'ordre de 10^-6s pour retourner vers leur état excité et pouvoir émettre un photon de fluorescence. Les fluorophores apparaissent sombres pendant la transition dans l'état triplet. La FCS permet d'observer ce passage dans l'état triplet en faisant apparaître une corrélation de fluorescence autour de 10^-6 s. Nous ne prêterons pas attention à ces détails dans les mesures de FCS que nous mènerons et ne resterons attentifs qu'à la fonction de corrélation liée à la diffusion des fluorophores dans le volume d'illumination.

### II-2-2 : Montage de FCS

On peut acheter dans le commerce les éléments de base des montages de FCS. Il faut en particulier un détecteur de bonne qualité qui puisse être relié à un corrélateur. Il est pratique d'avoir un microscope à entrées/sorties multiples pour pouvoir utiliser son montage sur des échantillons microscope. Les autres éléments du montage sont des appareils d'optique 'classique', en l'occurrence, un laser, une fibre optique et quelques lentilles
Pour monter notre expérience de FCS, nous avons utilisé du matériel PicoQuant. Nous avons acheté une diode laser pulsée PDL 800-B (Picoquant). Cette diode délivre des pulses laser de quelques picosecondes de longueur d'onde 488nm et à une fréquence pouvant aller jusqu'à 40MHz.. L'intensité moyenne est de l'ordre de 20µW. Notre détecteur est une diode à avalanche MPD dont la surface active est une ouverture circulaire de 50µm de rayon.
Nous corrélons l'intensité de fluorescence provenant de l'échantillon à analyser (en général lamelle de microscope) grâce à la Picoharp (Picoquant).
Enfin nous utilisons le logiciel symphotime pour calculer nos courbes de corrélation.
Il n'est pas nécessaire d'utiliser un laser pulsé pour réaliser des expériences de FCS. Toutefois, utiliser un laser pulsé à la dizaine de mégaHertz permet d'accéder au temps de vie des fluorophores étudiés. Nous reviendrons plus tard sur l'intérêt de pouvoir mesurer le temps de vie des fluorophores.
A proprement parler, nous faisons donc de la FLCS pour fluorescence lifetime correlation spectroscopy. Pour le moment, je vais décrire le montage comme un montage de FCS (c'est techniquement la même chose) et me servirai plus tard des mesures de temps de vie.

Nous avons adapté les éléments de notre montage de FCS sur un microscope Nikon TE2000 inversé afin de pouvoir à la fois observer nos échantillons en microscopie et faire nos mesures de FCS.
La difficulté dans un tel montage est d'assurer une bonne confocalisation de l'image du faisceau laser et de l'image du détecteur via l'optique du microscope.
En sortie de la diode laser, le faisceau laser n'est pas gaussien. Il porte encore plusieurs modes transverses électromagnétiques qui rendent le faisceau elliptique. Nous avons tout d'abord fibré notre faisceau laser dans un fibre optique monomode nous assurant de conserver uniquement le premier mode transverse (TEM 0 0) de notre onde lumineuse. Ce premier mode est gaussien et va rester gaussien en passant dans l'objectif du microscope.
En sortie de fibre, le faisceau est certes gaussien mais divergent (angle de divergence ~30°). Il faut donc choisir une lentille afin de rendre le faisceau parallèle. Cette lentille doit par ailleurs être choisie de sorte que le diamètre du faisceau après passage dans la lentille ait un diamètre

de l'ordre du diamètre d'entrée dans l'objectif. Dans notre cas, une lentille de focale 2cm était appropriée pour obtenir un faisceau légèrement plus étroit que l'entrée de l'objectif. Nous avons monté cette lentille sur un pas de vis micrométrique afin d'assurer un positionnement précis par rapport à la sortie de fibre.

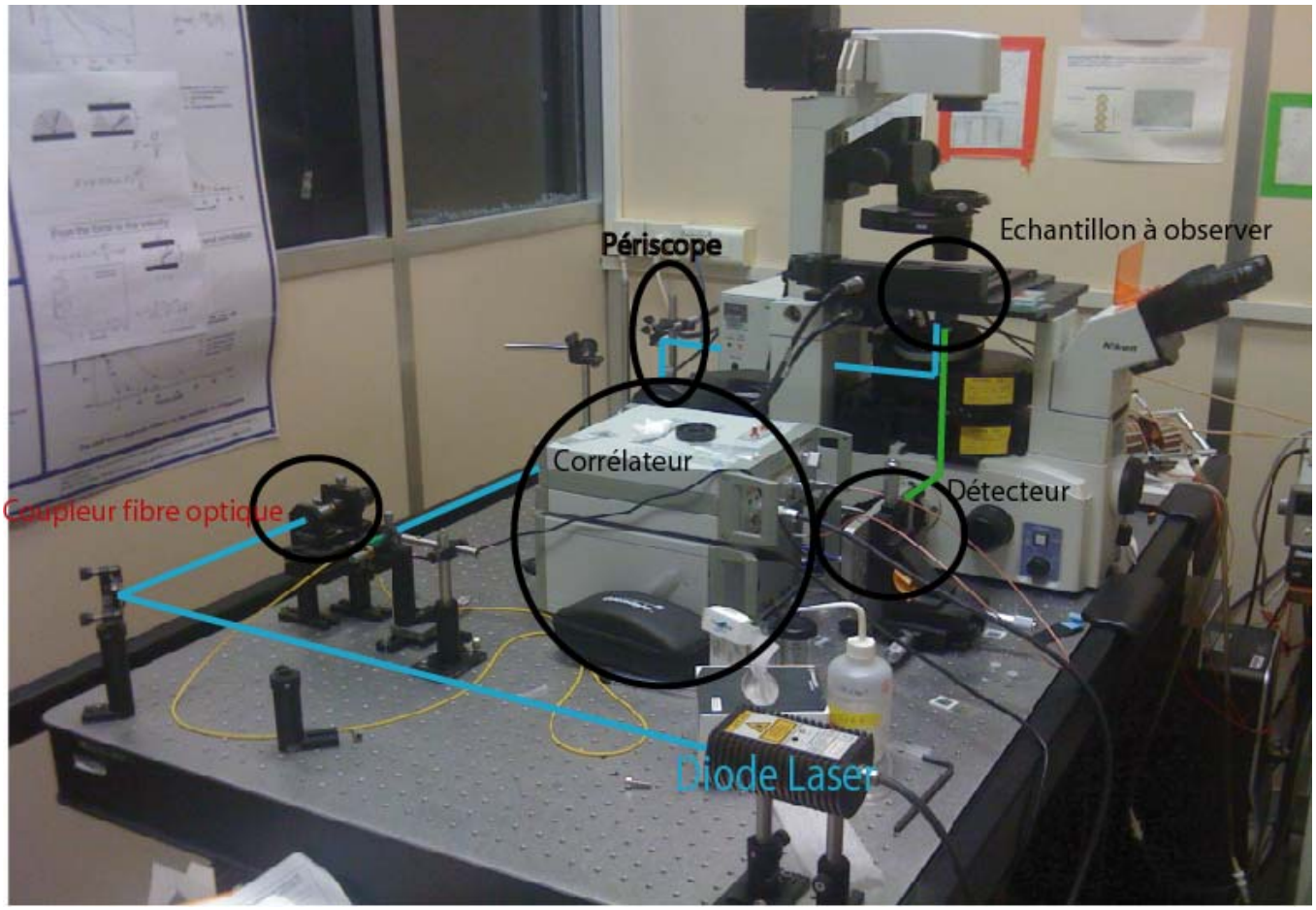



Figure 4 : le montage de FCS que j'ai réalisé au laboratoire.

Pour faire entrer le faisceau laser dans le microscope avec le bon alignement, nous avons dû monter un 'périscope' fait de deux miroirs à l'arrière du microscope. Le faisceau entre donc par l'arrière du microscope, est réfléchi sur le miroir dichroïque d'un cube approprié (longueur d'onde incidente 488nm) et entre dans l'objectif. L'alignement du faisceau était fait selon trois critères : centrage du faisceau sur l'entrée du cube dichroïque, centrage du faisceau sur un diffuseur placé sur la tourelle des objectifs, centrage sur une mire placée 'à l'infini' (au plafond). Une fois réglé, on peut placer l'objectif sur le chemin optique. Souvent des petits réajustements sont nécessaires pour obtenir un faisceau symétrique autour de l'axe optique en sortie d'objectif.
Nous avons utilisé un objectif *100 à huile d'ouverture numérique 1.4. L'image du faisceau au travers d'un tel objectif est dans le plan de focalisation, un spot dont la largeur est limitée par la diffraction (0.5µm) et dont le profil énergétique est gaussien. En profondeur, les limites

de la diffraction imposent une taille z d'illumination de l'ordre de 2µm. Le volume caractéristique d'illumination est ainsi de l'ordre du femtolitre.
A cette étape, nous avons donc uniquement focalisé le faisceau laser dans l'objectif en assurant un bon alignement du faisceau.
Reste à conjuguer l'image du spot laser avec l'image du détecteur.
Le trajet optique entre le détecteur et l'échantillon est différent de celui du faisceau laser incident. Nous avons placé notre détecteur sur une sortie prévue pour caméra. En sortie d'objectif, la lumière issue dans l'échantillon est plane. Elle est alors focalisée grâce à une lentille (focale typique 16cm). Nous faisons l'image de notre détecteur au travers de cette lentille puis de l'objectif. Dans le principe, il s'agit de positionner le détecteur à la focale de la lentille de sortie du microscope afin d'obtenir un trajet optique plan entre cette lentille et l'arrière de l'objectif. Enfin, l'image du détecteur est focalisée dans l'échantillon via l'objectif. Les dimensions de l'image du détecteur sont limitées par la diffraction. La taille de notre détecteur est 50µm. En passant dans un objectif *100, son image devrait mesurer 500nm, ce qui constitue les limites de résolution imposée par la diffraction. Notre détecteur de 50µm joue donc aussi le rôle 'pinhole' souvent utilisé dans les montages optiques de FCS pour se débarrasser des lumières parasites ne provenant pas du volume d'illumination.
Le détecteur est placé sur une platine xyz, ce qui permet de régler finement la confocalisation entre l'image du détecteur et l'image du faisceau laser.

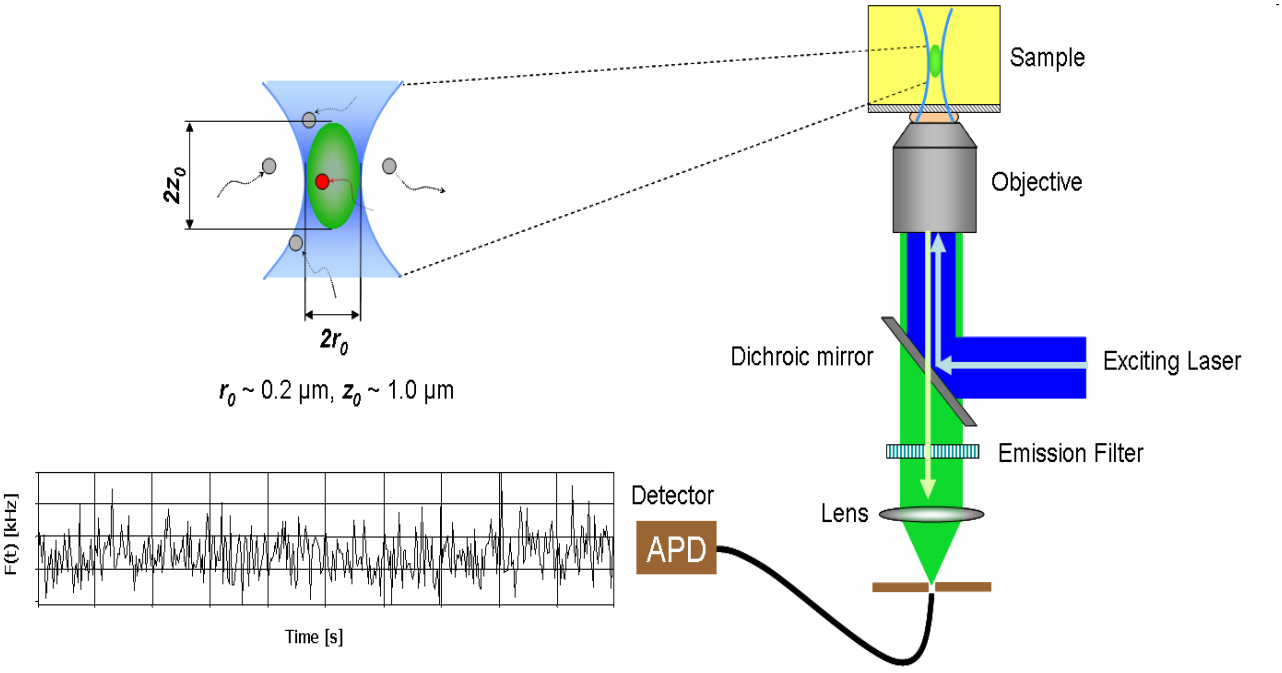



Figure 5 : Schéma d'un montage de FCS. Un faisceau laser plan entre par l'arrière d'un objectif. Il est alors focalisé dans l'échantillon d'étude et excite les fluorophores contenus dans le volume d'illumination ainsi créé. L'émission de fluorescence est collectée grâce à une diode à avalanche. On compte au cours du temps le nombre de photons arrivant sur le détecteur (Photon Counting Histogram en bas à gauche) et on corrèle ce signal pour obtenir les courbes de corrélation. (tiré de [1])

Dans le prochain chapitre je vais décrire les résultats obtenus en FCS et les renseignements qu'ils nous ont apporté sur nos bicouches.

## II-3 : Caractérisation des bicouches en FCS :

### II-3-1 : Courbes expérimentales de FCS en volume et en surface :

En premier lieu, nous avons testé notre montage de FCS dans la situation la plus simple, des fluorophores diffusant en volume.
Expérimentalement, un des paramètres importants à maximiser est le nombre de coups (nombre de photons reçus sur l'APD) par molécule. Le nombre de coups par molécule caractérise le nombre de photons que détecte le détecteur par molécule présente dans le volume confocal. Lorsqu'un montage est bien réalisé, c'est-à-dire lorsque le laser est bien aligné, lorsque le volume d'illumination et l'image du détecteur se recouvrent bien, le nombre de coups par molécule peut atteindre plusieurs milliers de coups par seconde et par molécules. Cette grandeur est caractéristique d'un bon montage et va permettre de bonnes mesures de corrélation. Elle dépend aussi et indépendamment de la qualité du montage de la puissance du laser. Ainsi, plus la puissance du laser est élevée, plus le nombre de coups par molécule sera grand et meilleure sera la mesure. Il faut toutefois être vigilant et ne pas trop augmenter la puissance laser pour éviter les effets gênants de bleaching (si une molécule bleache avant d'avoir traversé le volume d'illumination, les grandeurs mesurées seront liées au bleaching et non à la diffusion dans le volume d'illumination). Typiquement ; les 'bonnes puissances laser sont, en sortie d'objectif entre 10µW et 50µW. J'ai plutôt travaillé autour de 10µW et ai obtenu des nombres de coups par molécule par seconde compris entre 2000 et 6000cps/molécule.

Sur la figure suivante, j'ai représenté une mesure de FCS effectuée sur de la streptavidine Alexa 488 diffusant en volume.

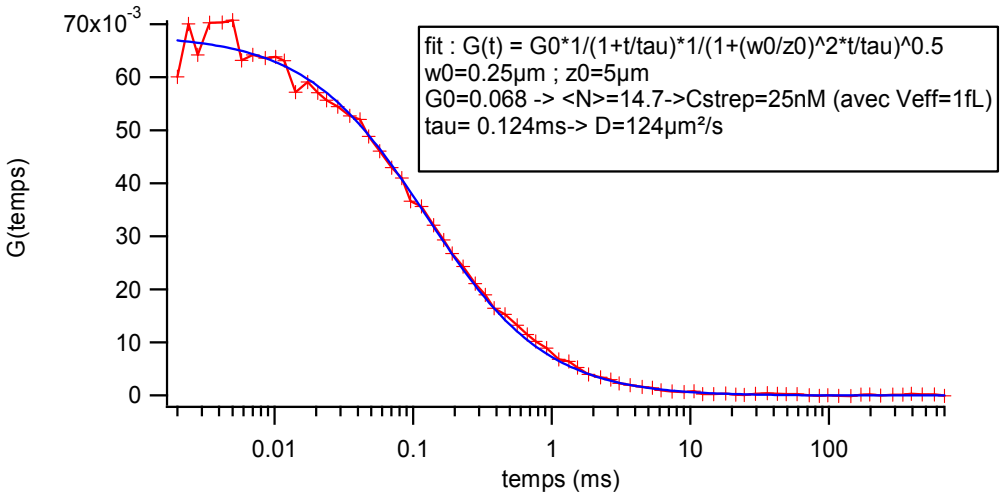



Figure 6 : fonction de corrélation caractéristique pour des fluorophores diffusant en volume.
La concentration est a priori de 30nM. La concentration mesurée est de 25 nM (avec volume d'illumination arbitraire mais caractéristique).
Le temps caractéristique de diffusion est de l'ordre de 0.1ms donnant un coefficient de diffusion de ~100µm²/s, temps typique pour des protéines libres en volume.

Sur une telle courbe de corrélation, nous allons nous intéresser tout particulièrement à deux points importants : l'ordonnée à l'origine et l'abscisse du point d'inflexion. Comme nous l'avons vu, l'ordonnée à l'origine est égale à l'inverse du nombre moyen de fluorophores dans le volume d'illumination. Connaissant w0 et z0, les dimensions du volume d'illumination, on a alors un accès absolu à la concentration en fluorophores dans la solution. L'abscisse du point d'inflexion va donner le temps caractéristique de diffusion dans le volume d'illumination. Une fois encore, connaissant w0 et z0, on a alors accès au coefficient de diffusion des molécules dans leur milieu. Les méthodes de FCS donnent donc, une fois le montage bien caractérisé, un accès rapide aux concentrations et à la diffusion des fluorophores intéressants.
Toutefois, la détermination des paramètres w0 et z0 du volume d'illumination est difficile et si l'approximation d'un volume d'illumination gaussien est pratique pour les calculs, expérimentalement, les valeurs de w0 et z0 sont très sensibles aux conditions d'illumination (voir Hess et Webb Biophys.Journal 2002 [9]). Ainsi, w0, dimension transversale du volume d'illumination peut aisément varier, selon la planéité du faisceau incident ou la largeur du faisceau lorsqu'il entre dans l'objectif, entre 0.22µm et 0.3µm. Une telle variation de w0 entraîne des erreurs de près de plusieurs dizaines de pourcents sur la détermination des coefficients de diffusion et des concentrations.

Dans mes expériences, il semble que je sois dans un situation où le diamètre de mon faisceau est un peu petit par rapport au diamètre d'entrée de mon objectif et le fit de mes courbes de corrélation en volume me donnent des valeurs du ratio z0/w0 souvent trop grandes.
Je ne me suis toutefois pas attardé outre mesure sur ces problèmes de forme du volume d'illumination. En effet, je voulais principalement utiliser mon montage de FCS sur des problèmes à deux dimensions et principalement pour des mesures sur des bicouches fluides. Dans ce cas, seule la dimension transversale w0 et une bonne focalisation sont importantes et comme nous allons le voir, des méthodes permettent de bien les déterminer. Dans la figure 3, j'ai représenté l'allure typique d'une courbe de corrélation à deux dimensions. L'allure est la même qu'à trois dimensions, toutefois la fonction permettant de fiiter cette courbe est légèrement modifiée. Il n'y a plus de dépendance avec la profondeur z0 d'illumination. Par ailleurs, on peut remarquer que les temps de diffusion caractéristiques sont environ 50 fois plus grands qu'à trois dimensions. La diffusion sur les bicouches est bien plus lente qu'en volume.

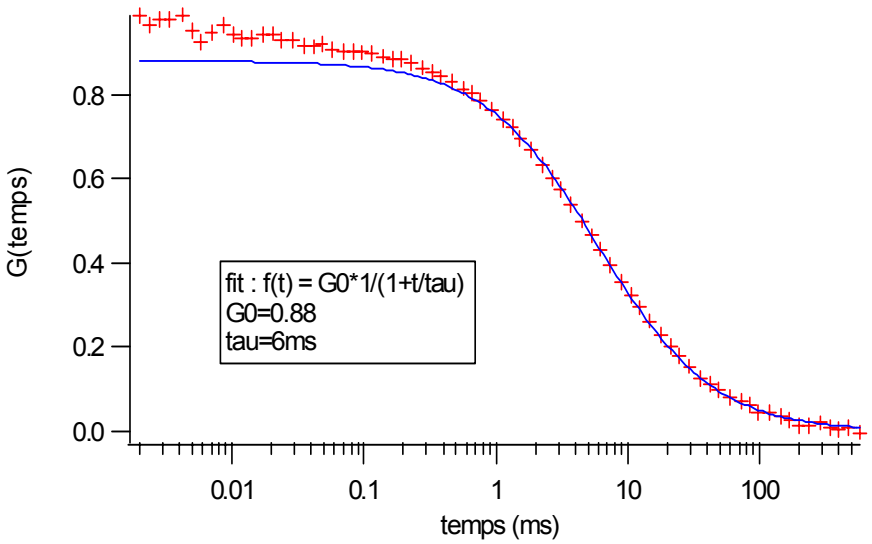



Figure 7 : fonction de corrélation caractéristique pour des fluorophores diffusant sur une bicouche supportée..
Le temps caractéristique de diffusion est plus grand qu'en volume (6ms) donnant un cofficient de diffusion de quelques µm²/s.
On constate un décalage au temps court qui peut être dû à des fluorophores diffusant en volume.

Effectuer ces mesures sur des bicouches m'a permis de m'affranchir des incertitudes sur la forme de mon faisceau. En effet, les bicouches supportées sont dans un plan orthogonal à l'axe optique. La difficulté est de bien focaliser le beam-waist de mon laser sur la bicouche. Dès lors, si je parviens à déterminer la largeur du beam-waist, la profondeur z0 du faisceau n'est plus une préoccupation (les fluorophores sur une bicouche mesurent quelques nanomètres négligeables devant la taille caractéristique z0). Or, il existe une méthode permettant d'accéder directement à la dimension transversale du faisceau d'illumination w0 sans paramètre ajustable. Je vais décrire cette méthode dans le paragraphe suivant.

II-3-2 : Z-scan et caractérisation de w0 :

La méthode permettant d'accéder au rayon du faisceau d'illumination a été décrite par Benda et al (langmuir 2003 [10]). Il s'agit d'effectuer un scan par pas de 0.2µm le long de l'axe optique et de mesurer l'évolution de la fonction de corrélation selon la position de la zone d'illumination par rapport à la bicouche.

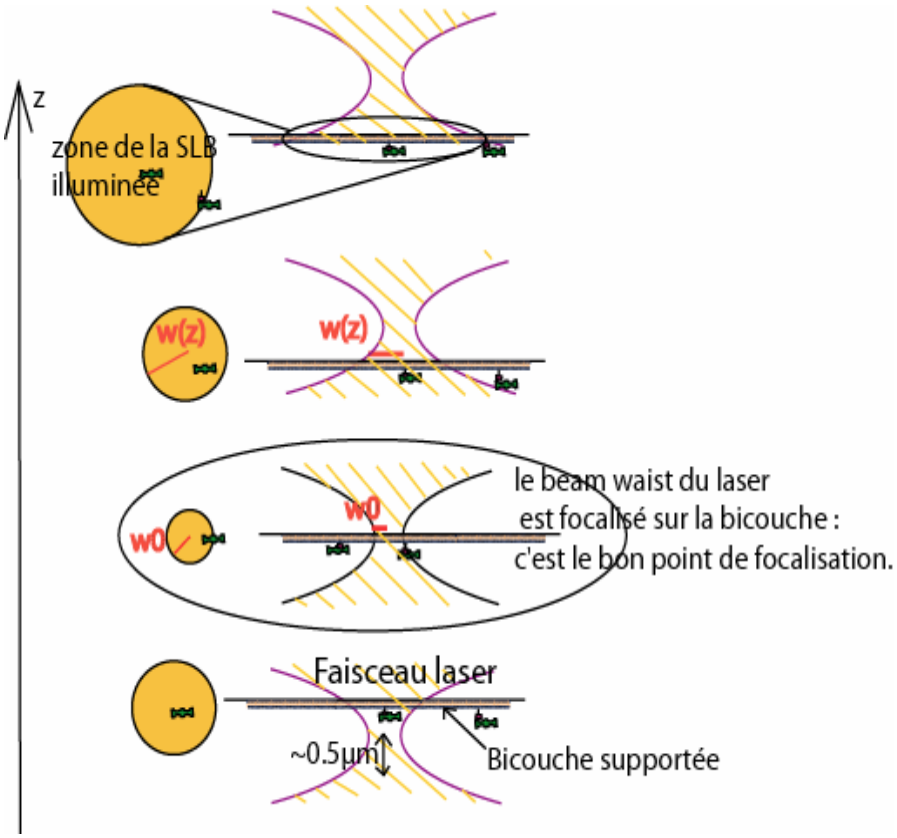



Figure 8 : principe du z-scan : au début du z-scan, l'objectif donc le faisceau laser est focalisé en dessous de la bicouche. La zone de la bicouche éclairée est plus grande que le beam-waist du laser. On remonte par pas de 0.2µm la position de focalisation du laser. On passe ainsi par le point de bonne focalisation où le beam-waist du laser est focalisé sur la bicouche : alors, le temps de diffusion τ et le nombre de fluorophores <N> mesurés sont minimaux. En dépassant ce point, la zone de la bicouche illuminée grandit de nouveau ainsi que τ et <N>.
On peut tracer l'évolution de τ et <N> en fonction de z pour accéder à la dimension transversale du beam waist w0.

Benda et al. ont pu déterminer que l'évolution de τ_diff et de <N> avec Δz (mesuré par rapport à la position où le laser est focalisé sur la lamelle) est parabolique et dépend de quelques grandeurs bien connues.

Plus précisément, τ_diff et de <N> vérifient les relations :

$$\tau_{diff} = \frac{w_0}{4D}(1+\frac{\lambda^2\Delta z^2}{\pi^2 n^2 w_0^4})$$

$$< N >= \pi w_0^2 C(1+\frac{\lambda^2\Delta z^2}{\pi^2 n^2 w_0^4})$$

J'ai effectué plusieurs fois ces mesures de z-scan. Dans la figure 5, je présente une de ces mesures.

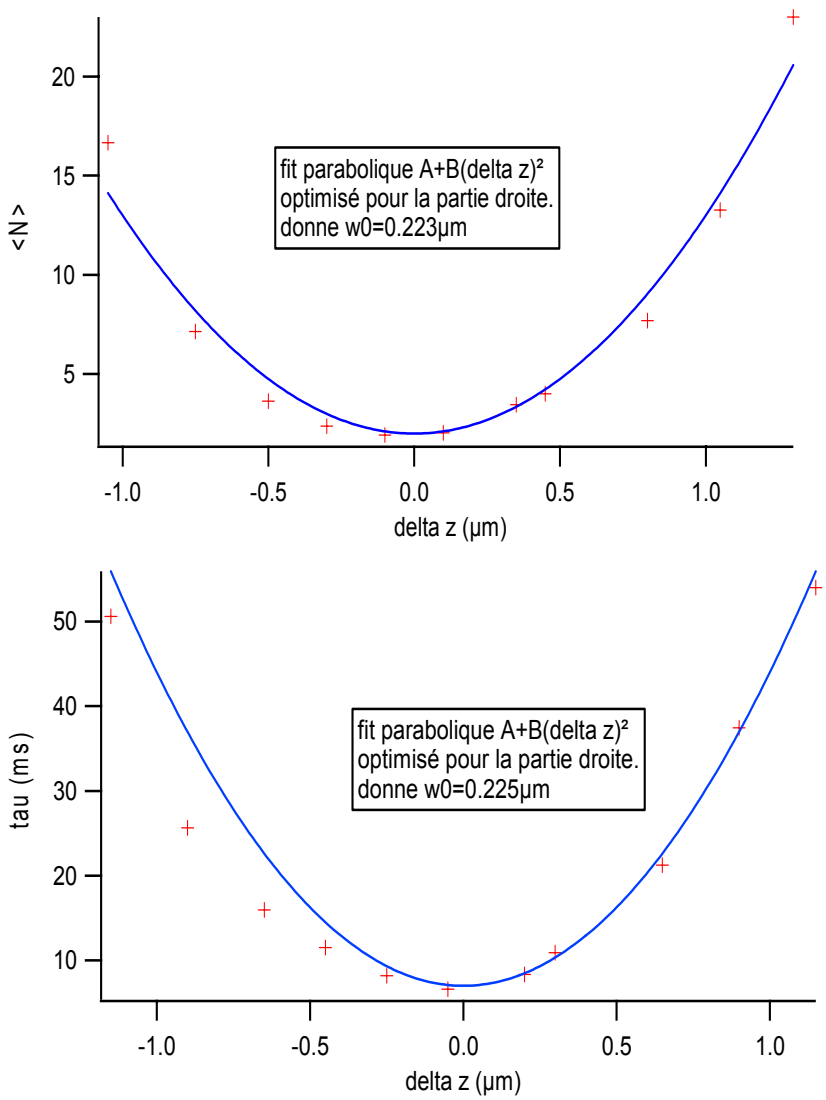



Figure 9 : Mesure de z-scan. Par pas de 0.2 µm environ, je change la focalisation du laser par rapport à la bicouche et je mesure les courbes de corrélation associée. Les courbes passent par un minimum qui est atteint lorsque le beam-waist du laser est focalisé sur la bicouche.
L'allure de cette courbe est parabolique et le fit permet d'accéder à la dimension transversale w0 du volume d'illumination.
On remarque que la courbe est dissymétrique. Ceci est dû à la différence d'indice entre les deux parties de la courbe. A gauche le laser est focalisé dans le verre (indice 1.515), à droite, on entre dans l'échantillon et le laser est focalisé dans l'eau (indice 1.33).
Le fit est optimisé sur la partie droite de la courbe.

Sur les profondeurs sondées et en dépit de la forme un peu trop allongée de ma zone d'illumination, l'approche de Benda permet une bonne estimation de la largeur de mon faisceau d'illumination.
J'ai effectué plusieurs fois cette mesure à plusieurs mois d'écart entre ma thèse. Entre les différentes mesures, j'ai modifié mon montage (en particulier l'entrée de mon faisceau incident) et j'ai effectivement constaté des différences assez notables dans mon w0 ainsi déterminé avec des mesures allant de w0=0.23µm à w0=0.29µm.

Les z-scans sont donc un bon moyen pour caractériser le faisceau d'illumination (du moins la dimension transversale) et mener des mesures correctes en FCS à deux dimensions.
Toutefois, dans les mesures de routine sur des bicouches supportées (notamment pour mes calibrations), je n'ai pas effectué de z-scan à chaque point. J'ai donc dû estimer à vue la focalisation de mon laser sur ma bicouche. Le z-scan montre que les erreurs sont vite arrivées. Une erreur de 0.5µm sur la focalisation du laser entraîne une erreur de près de 100%. Une méthode pratique est de suivre en temps réel le nombre de coups total reçu. Dans mes expériences, ce nombre de coups passe par un maximum très net lorsque le laser est focalisé sur la bicouche (figure 7). ( Benda observe un décalage entre la position de la bonne focalisation et celle du nombre de coups maximum mesuré. Cet écart est très dépendant de la surface utilisée. Je n'observe pas ce décalage). Notons que lorsque le laser est bien focalisé, le nombre de coups par seconde par molécule est lui aussi maximal.

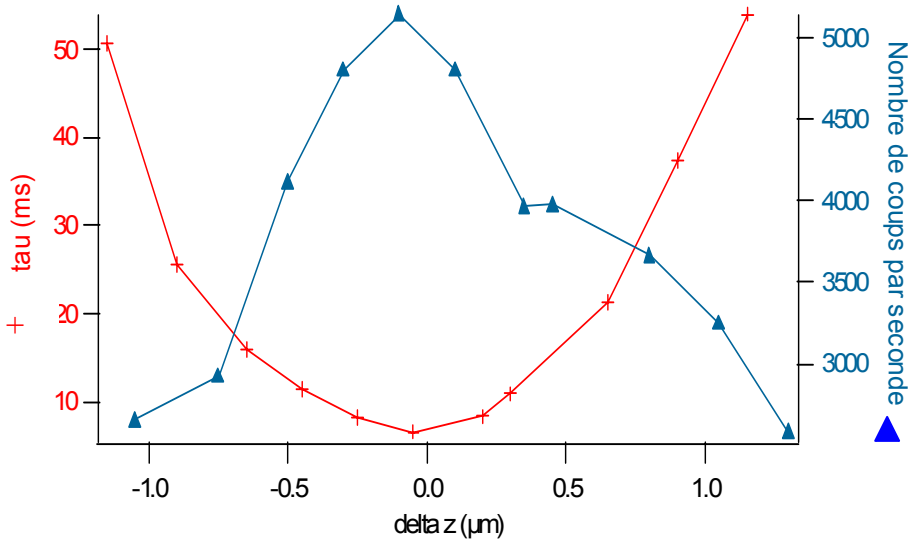



Figure 10 : Comparaison entre le temps de diffusion et le nombre de coups mesuré avec l'APD. On constate que le maximum du nombre de coups est atteint lorsque le laser est correctement focalisé sur la bicouche. Expérimentalement, ceci est bien pratique car on peut suivre en temps réel le nombre de coups reçus sur l'APD. On peut donc déterminer en temps réel la bonne position de focalisation du laser.

Le z-scan apporte donc des informations précieuses. Il permet de déterminer w0, largeur de mon faisceau d'illumination et donc de remonter sans paramètre ajustable à des valeurs de concentrations et de coefficient de diffusion. Par ailleurs, il valide une méthode expérimentale pour les mesures sur bicouche : il s'agit de trouver le maximum du nombre de coups lors de ma mise au point pour déterminer la bonne focalisation de mon laser et effectuer une bonne mesure de corrélation.
Lorsque j'ai transformé mon montage de FCS, j'ai refait à chaque fois des mesures de z-scan pour déterminer les paramètres de mon faisceau et pouvoir faire de bonnes mesures.
Grâce à ce travail sur la FCS, j'ai pu caractériser finement mes bicouches supportées. En particulier, j'ai pu relier des concentrations en fluorophores à une intensité de fluorescence.

### II-3-3 : Caractérisation des bicouches supportées et quantification de la fluorescence :

Pour quantifier la fluorescence sur mes bicouches, je me suis servi de mon montage de FCS : l'idée est de préparer des bicouches supportées sur lesquelles diffusent des streptavidines fluorescentes. Alors, je mesure parallèlement l'intensité de fluorescence sur mes lamelles et compare cette intensité de fluorescence à la concentration de streptavidine mesurée en FCS.

J'ai fabriqué des bicouches supportées selon les protocoles décrits plus tôt à des teneurs en phospholipides biotinilés variables. Sur ces bicouches, j'ai fait incuber de la streptavidine Alexa 488. J'obtiens alors des bicouches greffées avec de la streptavidine à des concentrations variables. Ici, il faut un peu jouer sur les concentrations de straptavidine greffées pour que les

concentrations soient assez grandes pour être observées en fluorescence et assez petites pour pouvoir mener des expériences de FCS.

Avec mes protocoles, je suis capable d'obtenir des bicouches homogènes sur de grandes surface (~1cm²).
En fluorescence, mes mesures ont constitué à prendre plusieurs clichés à différents endroits sur la lamelle pour en déduire une intensité de fluorescence moyenne. Par ailleurs, compte tenu de la possible variabilité de la fluorescence de la lampe à mercure utilisée, les expériences sont faites vite (pour 5 concentrations différentes, en moins de une semaine). Les paramètres de la caméra restent strictement identiques d'expérience en expérience.
En FCS, j'ai mené une dizaine de mesures à différents endroits sur la lamelle et en ai déduit une concentration moyenne (et une certaine erreur).
A partir d'une lamelle, je peux donc associer une intensité de fluorescence à une concentration en streptavidine. J'ai répété ce protocole sur différentes lamelles à différentes concentrations pour obtenir une courbe maîtresse de calibration.

Sur l'images ci-dessous est présentée un cliché de fluorescence pris sur une lamelle. Les niveaux de gris le long de la ligne rouge sont représentés sur les profils d'intensité à l'intérieur des photos. J'ai pris plusieurs de ces photos à différents endroits de la lamelle. Le niveau de gris moyen est sensiblement identique et on peut extraire une valeur moyenne de ces mesures. On remarquera une petit tache sombre au centre de l'image. Pour faire le focus, je ferme le diaphragme au maximum, en fait une image nette puis ouvre brutalement le diaphragme pour prendre la photo. Le bleaching est ainsi diminué au maximum.

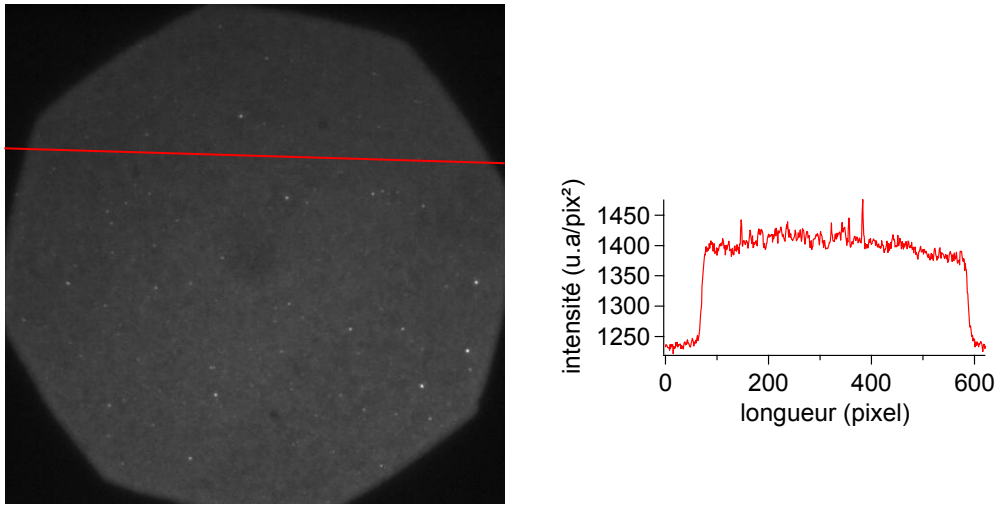



Figure 11 : Observation d'une lamelle en microscopie de fluorescence. Des clichés sont pris à des endroits au hasard sur la lamelle. Je compare la fluorescence de ces différents clichés pour en tirer une intensité moyenne de fluorescence sur la lamelle. Sur la droite, j'ai reporté le profil de fluorescence selon la ligne rouge.

Sur ce cliché, en soustrayant le bruit lumineux (niveau de gris à 1220 +/-10) je peux déterminer le niveau moyen de gris par pixel². En l'occurrence ici, l'intensité de fluorescence par pixel² est de l'ordre de 180+/-30 u.a/pix².

En parallèle, sur la même lamelle, je vais faire des mesures de FCS en une dizaine d'endroits différents sur la lamelle.
Ces différentes mesures me donnent une valeur moyenne de la concentration en streptavidine sur cette lamelle (je peux aussi en déduire une valeur moyenne du coefficient de diffusion sur mes bicouches. Je donnerai les valeurs plus tard).

Pour 5 lamelles différentes j'ai mené les caractérisations croisées et ai pu en déduire la relation entre mes niveaux de gris en fluorescence et ma concentration en streptavidine.

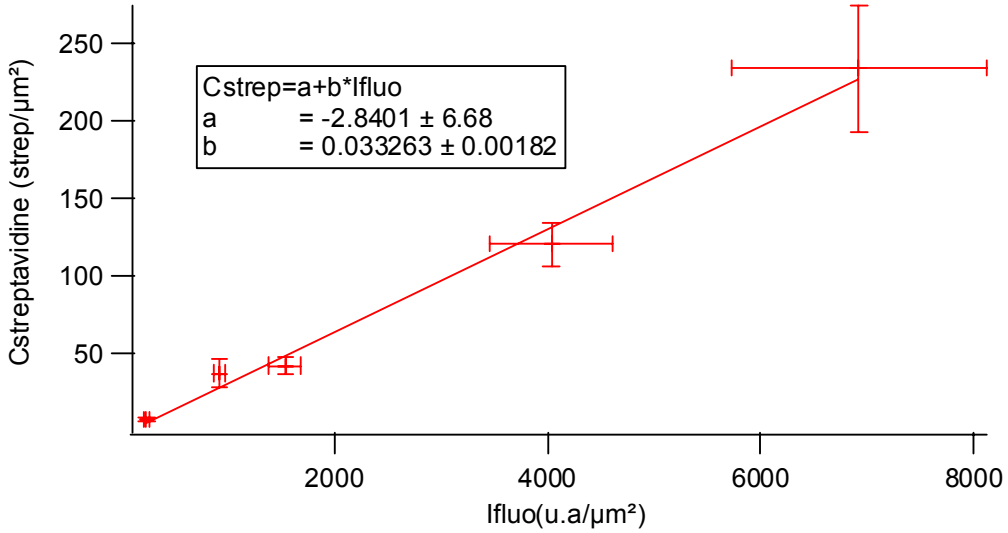



Figure 12 : Courbe maîtresse de calibration de la fluorescence. La pente de la droite me donne l'équivalent d'un niveau de gris (avec les paramètres d'illumination et de caméra bien utilisés) en streptavidine. En l'occurrence, 1 niveau de gris compte pour 0.033 streptavidine.

La figure 10 est la courbe maîtresse que j'utiliserai pour la calibration.
Cette courbe est primordiale pour la description de mes expériences. En extrapolant la droite de calibration aux intensités de fluorescence mesurées dans les patches adhésifs, je pourrai en effet déduire une densité de streptavidine à partir de la valeur de l'intensité de fluorescence dans le patch.
Toutefois, pour pouvoir extrapoler cette courbe aux valeurs de densités atteintes dans mes expériences d'adhésion (quelques milliers de fluorophores par µm²), il faut d'abord s'assurer que la fluorescence reste bien proportionnelle au nombre de streptavidines même quand les densités deviennent élevées. En particulier, il faut s'assurer qu'aucun effet de quenching ne vient fausser l'estimation.

II-3-4 : Mesures de temps de vie et validité de l'extrapolation aux hautes densités en fluorophores:

Nous avons vu plus tôt que notre matériel nous permettait de faire de la FLCS c'est-à-dire nous permettait d'accéder à la loi temporelle de fluorescence de nos fluorophores autrement dit, au temps de vie de nos fluorophores. Le temps de vie d'un fluorophore est lié à la constante de désexcitation du fluorophore depuis son état excité vers son état stable.

Typiquement, la désexcitation d'un fluorophore suit une loi exponentielle en $\exp(-\frac{t}{\tau})$. Le temps caractéristique ou temps de vie du fluorophore $\tau$ est de l'ordre de quelques nanosecondes et peut varier significativement entre différents fluorophores. En outre, un fluorophore voit selon son environnement, son temps de vie varier de manière significative. En mesurant et en comparant le temps de vie de nos fluorophores dans les différents environnements où on sera amener à le trouver, je pourrai caractériser le quenching de nos fluorophores dans nos différentes situations expérimentales..

Notre montage est donc un peu différent des montages de FCS classiques. En particulier, nous n'utilisons pas un laser continu mais un laser pulsé. Ce laser pulsé est connecté au même corrélateur que la sortie de notre détecteur. Ainsi, avec notre montage, le temps d'arrivée des photons issus de la fluorescence peut être comparé à la cadence du laser. Autrement dit, on peut associer temporellement un photon de fluorescence au pulse laser qui l'a engendré. La fréquence du laser joue le rôle d'horloge grâce à laquelle on peut mesurer la probabilité temporelle d'émission des fluorophores c'est à dire leur temps de vie.

Nous allons faire quelques rappels théoriques autour des temps de vie des fluorophores. Un fluorophore peut passer sous l'effet d'une illumination de son état fondamental F à un état excité F* . Une fois dans cet état excité, le fluorophore peut revenir à son état fondamental selon un processus radiatif en émettant un photon de fluorescence ou transiter vers un état transitoire selon un processus non-radiatif. Les temps caractéristiques sont de l'ordre de quelques nanosecondes. Un exemple de processus non-radiatif est le passage vers l'état triplet. La transition vers l'état triplet est rapide, en revanche le retour vers l'état excité F* est lent et peut être négligé dans les équations de cinétique.

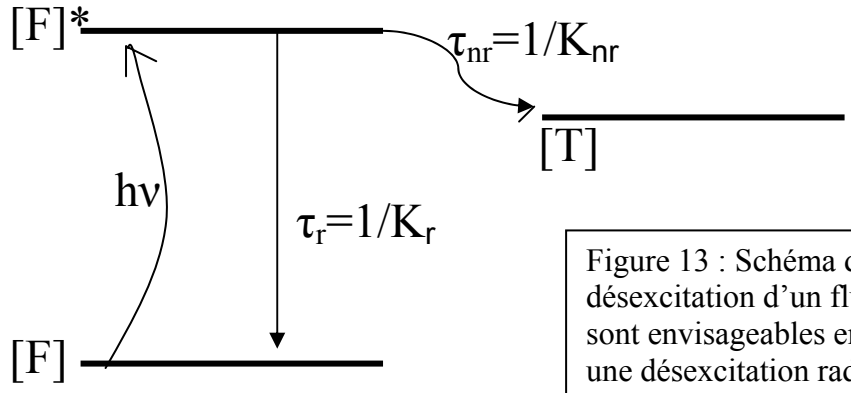



Figure 13 : Schéma de principe de la désexcitation d'un fluorophore. Deux voies sont envisageables en première approche : une désexcitation radiative donnant lieu à un photon de fluorescence (taux de désexcitation Kr) ; une voie non radiative menant vers des états triplet par exemple. Une fois dans l'état triplet, le fluorophore met alors des temps longs (~µs) pour se désexciter.

A l'échelle de la nanoseconde, on peut décrire l'évolution temporelle de la population de fluorophores excités avec l'équation : $\frac{d[F^*]}{dt} = -K_r[F^*] - K_{nr}[F^*]$

$K_r$ est la constante de désexcitation radiative.
$K_{nr}$ est la constante de désexcitation non radiative.
On suppose que ces constantes sont du premier ordre par rapport à la concentration en fluorophores excités $[F^*]$.

Dans l'équation ci-dessus, si l'on suppose que l'on part d'une population de fluorophores excités $[F^*]_0$ par un court pulse lumineux (c'est le cas avec un laser pulsé), on obtient alors une loi de désexcitation du type :
$[F^*(t)] = [F^*]_0 e^{-(K_r + K_{nr})t}$.
On peut écrire $K_r + K_{nr} = \frac{1}{\tau}$ où $\tau$ est le temps de vie du fluorophore. Typiquement, les temps de vie de fluorescence sont de l'ordre de quelques nanosecondes. Il est important de noter que τ dépend beaucoup de l'environnement des fluorophores. Des tables de temps de vie de fluorophores dans des solvants différents (B.Valeur, Molecular Fluorescence [11]) montrent que les temps de vie d'un même fluorophore peut varier jusqu'à un facteur 2 ou 3 selon le solvant dans lequel il est introduit.

Notons en passant que le rendement quantique Φ d'un fluorophore peut être défini à partir des constantes $K_r$ et $K_{nr}$.
On a :
$\Phi = \frac{K_r}{K_r + K_{nr}} = K_r \tau$.

L'intensité de fluorescence $i_f(t)$ est définie comme le nombre de photons (en mol) reçus par unité de temps et par unité de volume. Elle est à chaque instant proportionnelle à la concentration de fluorophores excités.

On peut écrire :
$i_f(t) = \lambda K_r [F^*(t)] = \lambda K_r [F^*]_0 e^{-(K_r + K_{nr})t}$.

$\lambda$ inclue tous les effets liés au montage.
Une fois encore, l'intensité de fluorescence mesurée par un détecteur est à chaque instant proportionnelle au nombre de fluorophores excités par l'intermédiaire de la constante radiative Kr. Cependant, la loi temporelle de l'intenstité de fluorescence mesurée a un temps caractéristique qui dépend des effets non-radiatifs. La loi temporelle de fluorescence est donc caractéristique de phénomènes non-radiatifs tels le passage par un état triplet ou les effets de quenching.

En FLCS, on utilise un laser pulsé. La fréquence des pulses est typiquement de l'ordre de la dizaine de MHz (périodes de l'ordre de 100ns). Pour accéder au temps de vie, on utilise les

pulses laser comme référence temporelle et on mesure le temps entre la détection d'un photon et le pulse laser l'ayant engendré. Pour pouvoir associer avec certitude chaque photon reçu par le détecteur à un pulse laser, la fréquence des pulse laser est au moins dix fois plus grande que la fréquence de détection des photons (on évite ainsi de détecter deux photons de fluorescence durant la période entre deux pulses). L'équation différentielle écrite plus haut est donc un peu impropre puisque en FLCS, une impulsion lumineuse génère l'excitation d'un photon. On mesure un grand nombre d'évènements individuels qui lorsqu'on les met ensemble, vont nous donner la loi temporelle de fluorescence des fluorophores utilisés.
Un graphe typique de temps de vie est représenté sur la figure suivante.

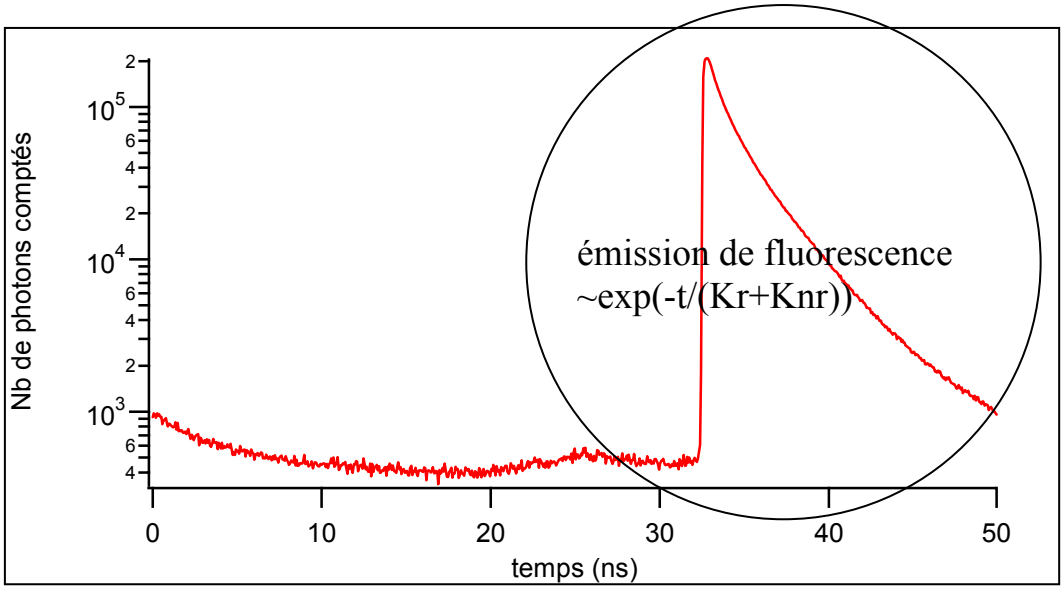
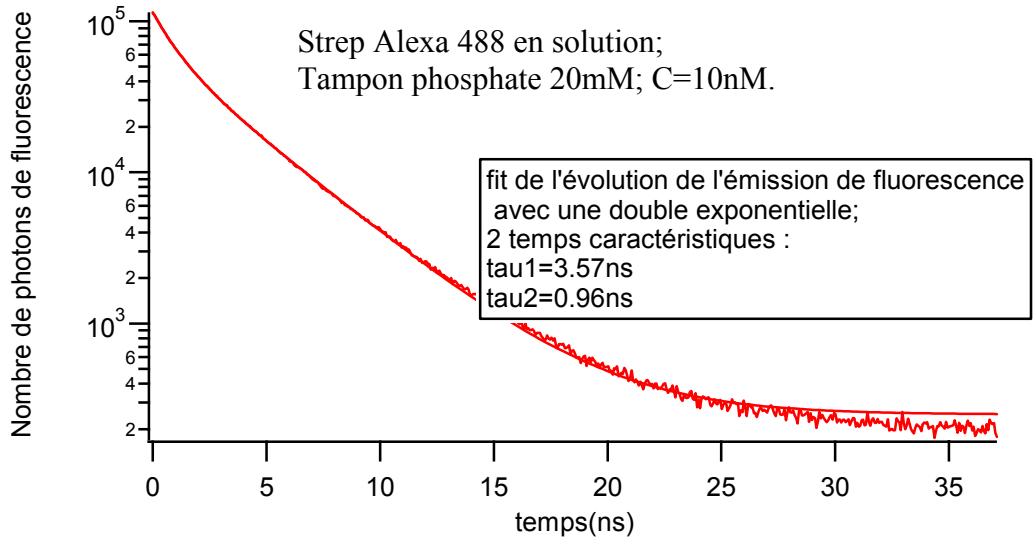



Figure 14 : Mesure de la loi temporelle d'émission de fluorescence permettant d'accéder au temps de vie de la streptavidine Alexa 488 diffusant en volume.
Le graphe s'étend sur 50ns, période d'un pulse (f=20MHz).
Le graphe est décalé vers la droite à cause d'une différence de trajet mal compensée entre le pulse du laser et les photons de fluorescence provenant de l'échantillon.
Le petit rebond autour de 25ns n'est pas déterminé (électronique..)

La partie caractéristique de l'émission de fluorescence est un peu décalée sur la droite. Le bruit de fond (~500photons) est dû à de la lumière parasite extérieure au montage, à des défauts électroniques (afterpulse) et à des photons issus de l'état triplet (le temps de passage dans l'état triplet (1µs) est grand devant la période laser (50ns) et les photons issus de l'état triplet apparaissent comme un bruit blanc).
Sur la figure suivante, j'ai tracé une mesure de temps de vie de la streptavidine Alexa 488 en volume avec une origine des temps convenable.




.

Figure 15 : mesure de la loi temporelle d'émission de la streptavidine alexa 488 en volume. Ce graphe est identique au graphe de la figure 13. J'ai décallé le graphe pour avoir une origine des temps à 0. Le fit est une double exponentielle.

Les tentatives de fit avec une loi exponentielle simple ne marchent pas. Il est nécessaire de fitter avec une double exponentielle (au moins), signe qu'il existe plusieurs temps caractéristiques de fluorescence.
Notons aussi que le fait qu'il y ait plusieurs fluorophores par protéine n'a pas d'influence sur la fonction de corrélation spatiale et sur la détermination de la concentration en protéines. Les fluctuations de fluorescence à l'echelle temporelle de la diffusion sont dues à l'entrée et à la sortie des fluorophores dans le volume illuminé. Les 6 fluorophores sur une streptavidine sont tous corrélés entre eux et n'induisent pas de fluctuations dans la fonction de corrélation liée à la diffusion.

Nous avons mesuré les temps de la streptavidine Alexa 488 dans les autres situations rencontrées c'est-à-dire, lorsqu'elle est adsorbée sur les gouttes, lorsqu'elle est greffée sur les bicouches (calibration) et lorsqu'elle est dans les patches adhésifs.
Les graphes correspondants sont représentés ci-après.

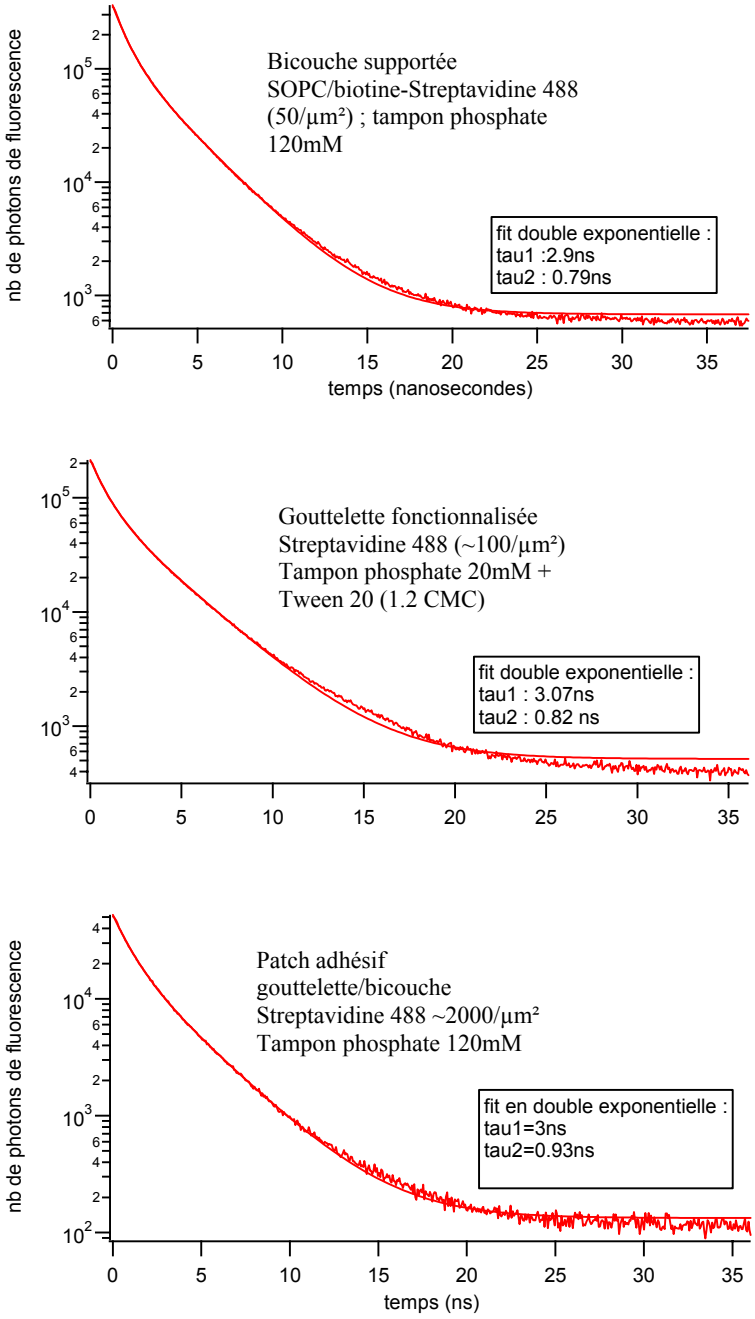



Figure 16 : Allure de la loi temporelle d'émission de fluorescence lorsque les streptavidines sont greffées sur des surfaces (bicouche supportée, gouttelette et patch adhésif). Les temps de vie sont sensiblement identiques entre eux mais assez différents de la streptavidine diffusant librement en volume.

On constate que la différence avec la streptavidine libre qui diffuse en volume est significative puisque le 'grand ' temps caractéristique passe de 3.5ns à 3ns.
Mais, entre nos différentes situations où la streptavidine est adsorbée en surface, les fits donnent des temps de vie sensiblement ressemblants.
Nous avons fait des mesures sur les différents échantillons ayant servi à la calibration. La variabilité entre les fits est faible (0.1ns d'erreur sur les temps caractéristiques) et ne change pas avec la concentration. Ainsi, on constate dans les cas ci-dessus, qu'entre une mesure dans un patch adhésif où les concentrations en streptavidine sont grandes (~2000/µm²) et une mesure sur une lamelle de calibration à une concentration plus basse (~50/µm²), l'allure des courbes de désexcitation change peu.
Le temps de vie des fluorophores est donc sensiblement différent entre des mesures en volume et des mesures en surface. Mais une fois accroché à une surface par l'intermédiaire d'une biotine, quelles que soient les concentrations, on ne mesure que de faibles écarts sur les

temps de vie mesurés. Les hautes concentrations en fluorophore ne modifie pas l'émission de fluorescence et l'intensité de fluorescence à haute concentration reste donc proportionnelle au nombre de fluorophores dans le volume d'illumination. Ceci nous permet d'extrapoler la droite de calibration effectuée sur des concentrations assez basses à des concentrations plus élevées et ainsi de mesurer de façon absolue la concentration en streptavidine dans les patches adhésifs.

### II-3-5 : Diffusion de la streptavidine sur les bicouches :

A partir des expériences de calibration, on a aussi accès à l'évolution du coefficient de diffusion de la streptavidine en fonction de la concentration en streptavidine.
Cette mesure est donnée dans le graphe de la figure 11.

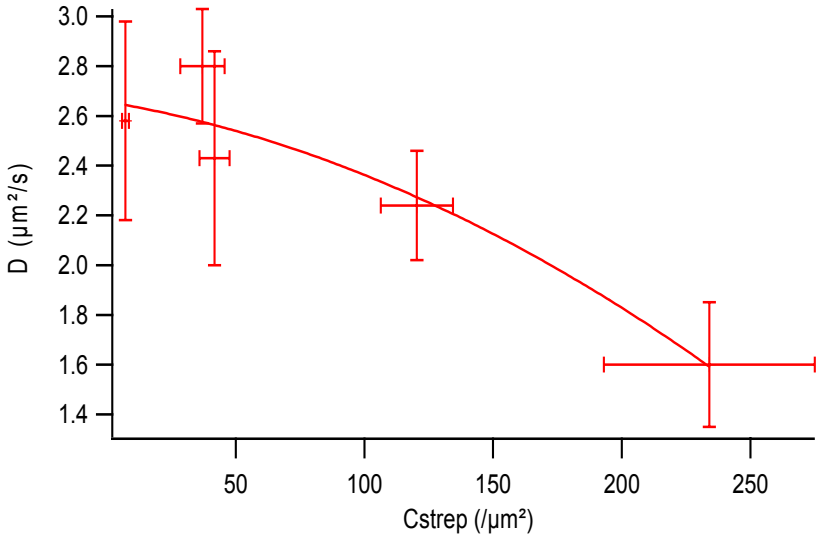



Figure 17 : Mesure du coefficient de diffusion en fonction de la concentration en streptavidine sur la bicouche.
A basse concentration en streptavidine, le coefficient de diffusion de la streptavidine est de l'ordre de 2.5µm²/s (on trouve des valeurs de 2.3µm²/s dans la littérature).

A basse concentration en streptavidine, je mesure des coefficients de 2.5µm²/s, valeur qui sont proches des valeurs reportées dans la littérature ([6]). Cette valeur a tendance à chuter lorsque la concentration en streptavidine augmente. Toutefois, il ne semble pas correct d'attribuer le ralentissement de la diffusion sur les bicouches à des effets stériques. D'une part les concentrations en sreptavidine restent faibles par rapport au close-packing (~40 000#/µm²). Par ailleurs, je me suis rendu compte tardivement que la composition des bicouches en phospholipides influence le coefficient de diffusion des bicouches. En particulier, des bicouches ayant une teneur de l'ordre de 1% de lipides biotinilés présentent une diffusion nettement plus lente que des bicouches portant 0.1% de lipides biotinilés. Je pense que le ralentissement observé sur la figure ci-dessus est dû à une variation de la teneur en lipides biotinilés.

### II-3-6 : Mesures de FCS sur les gouttes fonctionalisées :

J'ai mené quelques expériences de FCS sur mes gouttelettes fonctionnalisées. J'ai ainsi pu aller vérifier mes résultats de dosage en retour et quantifier la diffusion de mes streptavidines sur les gouttes. Selon les conditions de greffage les mesures nous permettent d'accéder à des concentrations en streptavidine sur les gouttes comprises entre 50 et 400/µm². Les mesures confirment ainsi les résultats du dosage en retour qui donnaient des densités de streptavidine dans les mêmes gammes. Par ailleurs, le coefficient de diffusion sur les gouttes est de l'ordre de 3+/-0.5µm²/s ce qui est un peu plus grand que le coefficient de diffusion sur nos bicouches.

## Conclusion :

A ce stade, nous avons en main deux types d'objets bien caractérisés : d'une part, les gouttelettes d'émulsion dont les densités en streptavidine peuvent aller de quelques dizaines à quelques centaines de streptavidine par micron². A la surface des gouttes, la streptavidine diffuse avec un coefficient de diffusion de l'ordre de 3µm²/s.
D'autre part, nous pouvons déposer des bicouches supportées sur des lamelles de verre. Ces bicouches supportées sont sensiblement homogènes sur de grandes surfaces de l'ordre du cm². Le coefficient de diffusion de phospholipides portant des streptavidines est de l'ordre de 2.5µm²/s lorsque la streptavidine est assez diluée pour que la diffusion ne soit pas anormale.

Nous sommes maintenant en mesure d'assembler ces deux parties et de voir comment va évoluer notre système modèle adhésif.

Bibliographie :


1. http://www.mpip-mainz.mpg.de/groups/butt/research/fcs. *max planck institute for polymers*.
2. Lansman, J. and D. Haynes, *Kinetics of a Ca2+-triggered membrane aggregation reaction of phospholipid membranes.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1975. **394**(3): p. 335-347.
3. Papahadjopoulos, D. and G. Poste, *Calcium-induced phase separation and fusion in phospholipid membranes.* Biophysical Journal, 1975. **15**(9): p. 945-948.
4. http://www.biophysics.helsinki.fi/SLB/SLB_protocol.pdf.
5. Wachsmuth, M., et al., *Analyzing intracellular binding and diffusion with continuous fluorescence photobleaching.* Biophysical Journal, 2003. **84**(5): p. 3353-3363.
6. Fenz, S., R. Merkel, and K. Sengupta, *Diffusion and intermembrane distance: case study of avidin and E-cadherin mediated adhesion.* Langmuir, 2008. **25**(2): p. 1074-1085.
7. Magde, D., E. Elson, and W. Webb, *Thermodynamic fluctuations in a reacting system—measurement by fluorescence correlation spectroscopy.* Physical Review Letters, 1972. **29**(11): p. 705-708.
8. Schwille, P. and E. Haustein, *Fluorescence correlation spectroscopy. An introduction to its concepts and applications.* Biophysics Textbook Online, 2001. **1**(3).
9. Hess, S. and W. Webb, *Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy.* Biophysical Journal, 2002. **83**(4): p. 2300-2317.
10. Benda, A., et al., *How to determine diffusion coefficients in planar phospholipid systems by confocal fluorescence correlation spectroscopy.* Langmuir, 2003. **19**(10): p. 4120-4126.
11. Valeur, B., *Molecular fluorescence.*

Annexe : Détail du calcul de la fonction de corrélation our des particules diffusant librement en volume.

On part de l'expression de la fonction de correlation temporelle d fluorescence :

$$G(\tau)=\frac{\iint f(r)S(r)*f(r')S(r')\left\langle \delta\left(C(r,t)\right)\delta(C(r',t+\tau))\right\rangle dVdV'}{\left(\int f(r)S(r)\left\langle C\right\rangle dV\right)^2}$$

Dans le cas de particules diffusant librement au sein d'un liquide, on peut réécrire le terme de corrélation de fluctuation dans le numérateur comme une solution de l'équation de diffusion :

$$\left\langle \delta\left(C(r,t)\right)\delta(C(r',t+\tau))\right\rangle=\left\langle C\right\rangle\frac{1}{\left(4\pi D\tau\right)^{-\frac{3}{2}}}e^{-\frac{(r-r')^2}{4D\tau}}$$

Alors,

$$G(\tau)=\frac{\iint f(r)S(r)*f(r')S(r')\left\langle C\right\rangle\frac{1}{\left(4\pi D\tau\right)^{-\frac{3}{2}}}e^{-\frac{(r-r')^2}{4D\tau}}dVdV'}{\left(\int f(r)S(r)\left\langle C\right\rangle dV\right)^2}$$

soit

$$G(\tau)=\frac{1}{\left\langle C\right\rangle\left(4\pi D\tau\right)^{-\frac{3}{2}}}\frac{\iint f(r)S(r)*f(r')S(r')e^{-\frac{(r-r')^2}{4D\tau}}dVdV'}{\left(\int f(r)S(r)dV\right)^2}$$

On va faire intervenir le temps de diffusion des fluorophores dans le volume illuminé :

$\tau_d=\frac{{r_0}^2}{4D}$ (comme $r_0<z_0$, la diffusion selon la dimension transversale est celle qui limite le temps de parcours des fluorophores dans le volume illuminé)

et le volume effectif :

.

$$V_{eff}=\frac{\left(\int f(r)S(r)dV\right)^2}{\int(f(r)S(r))^2dV}=\frac{\left(\int e^{-2\frac{r^2}{{r_0}^2}}e^{-2\frac{z^2}{{z_0}^2}}dV\right)^2}{\int e^{-4\frac{r^2}{{r_0}^2}}e^{-4\frac{z^2}{{z_0}^2}}dV}$$ (avec $f(r)S(r)=e^{-2\frac{r^2}{{r_0}^2}}e^{-2\frac{z^2}{{z_0}^2}}$)

soit après calcul,

$$V_{eff}=\pi^{\frac{3}{2}}{r_0}^2z_0$$.

On peut alors trouver une expression intégrée de G(τ) pour des fluorophores diffusant librement en volume.

$$G(\tau)=\frac{1}{V_{eff}\left\langle C\right\rangle}\cdot\frac{1}{(1+\frac{\tau}{\tau_d})}\cdot\frac{1}{\sqrt{1+\left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2\cdot\frac{\tau}{\tau_d}}}$$

# Troisième partie : Adhésion spécifique de gouttelettes d'émulsion fonctionnalisées sur des bicouches supportées planes :

Dans cette partie, nous allons décrire les résultats obtenus concernant l'adhésion spécifique de nos gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées.
Dans un premier temps, nous décrirons les résultats obtenus en statique, puis nous parlerons de la cinétique d'adhésion.

## I- Mise en place de l'expérience :

### I-1 : Protocole expérimental :

Dans la 2nde partie de cette thèse, nous avons décrit la fonctionnalisation des gouttelettes et la fabrication des bicouches.
Nous disposons donc de gouttelettes greffées avec de la streptavidine à des densités variant de 50 à 500/µm². La streptavidine une fois greffée sur les biotines en surface des gouttelettes a un koff comparable à celui en volume ($k_{off} = 10^{-9} s^{-1}$).
Les bicouches supportées sont uniformes sur de grandes surfaces (~1cm²) et sont stables quelques jours si on les conserve dans un tampon PBS (H2PO4 :10mM ; NaCl : 100mM ; ph=7.2).
Pour réaliser nos expériences d'adhésion, il faut mettre en contact nos gouttes avec les bicouches supportées.
Ici se pose un problème. Comme on vient de le décrire, les deux tampons permettant de conserver nos objets de façon stable sont sensiblement différents. Le tampon de nos gouttelettes contient du surfactant et a une force ionique relativement faible. Le tampon de nos bicouches ne contient pas de surfactant et a une force ionique élevée.
Quel tampon choisir ?
Nous avons essayé en premier lieu de réaliser nos expériences d'adhésion dans le tempon de nos gouttelettes d'émulsion (H2PO4 : 10mM ; Tween 20 : 20 cmc).

Les bicouches supportées sont donc alors soumises à un changement de tampon. Elles sont soumises à une moindre concentration en NaCl et à la présence de surfactants. Réduire la concentration en sel du tampon dans lequel sont immergées les bicouches a pour effet de fluidifier la membrane mais n'altère pas la stabilité des bicouches supportées (Bockmann Biophysical Journal 2003 [2]).
En revanche, l'ajout de surfactant a un effet dévastateur sur la bicouche. Les surfactants sont des molécules amphiphiles tout comme les phospholipides. En présence de surfactants, les phospholipides de la bicouche vont se mélanger avec les surfactants et la bicouche va être fortement déstabilisée. J'ai pu observer l'effet de l'ajout de surfactants sur une bicouche plane supportée. Visuellement, on voit apparaître de nombreux filaments ondulants sur la bicouche. Si on laisse le système évoluer pendant quelques minutes et à concentration suffisamment haute en surfactant (~CMC), les filaments étant apparus à la surface de la bicouche vont former des structures à trois dimensions et la bicouche va entièrement se dissoudre dans le tamon. Utiliser un tampon comprenant des surfactants est donc impossible sauf à des concentrations très faibles (10^-6 mol/l soit 0.05CMC)

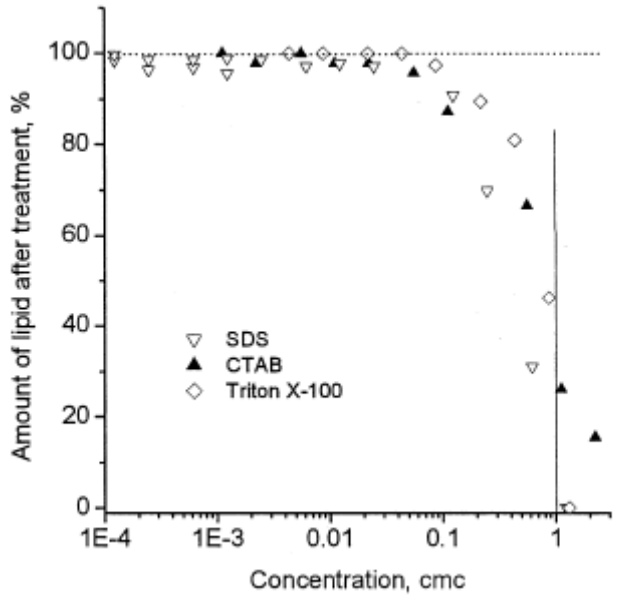



Figure 1 : effet de l'ajout de surfactants sur des bicouches lipidiques en surface de nanoparticules d'or. Les auteurs mesurent la proportion de phospholipides restant sur les nanoparticules lors de l'ajout de tensioactifs en solution. Dès que [surfactant]>0.1cmc, les bicouches se diluent en solution. Ce phénomène semble généralisable à tous les types de surfactants.
(Artyhukin et al. Industrial Engineering Chem. Res. 2003 [1])

Ainsi, pour mettre en contact les gouttes d'émulsion et les bicouches supportées, il est nécessaire de réduire drastiquement la concentration en surfactants jusqu'à une valeur de l'ordre de 0.05 cmc.

Concernant la force ionique, nous avons tenté de faire les expériences d'adhésion à 20mM et à cette force ionique, aucune adhésion n'a lieu. Nous avons pensé à des effets électrostatiques et avons donc augmenté la force ionique pour écranter d'éventuelles répulsion électrostatiques. Nous avons donc utilisé un tampon (H2PO4 :10mM ; NaCl : 100mM ; ph=7.2). Dans ces conditions, les gouttes deviennent adhérentes et on observe la formation de patches adhésifs. Il faut donc utiliser un tampon à force ionique assez élevée pour pouvoir observer l'adhésion spécifique entre nos matériaux. Cette augmentation de force ionique favorise l'adhésion non-spécifique entre les gouttelettes. En effet, si les interactions électrostatiques entre gouttelettes et bicouches sont écrantées, il en va de même pour les interactions entre gouttes. Ainsi, à haute force ionique, l'émulsion flocule et on observe la formation de grappes de toutes tailles. Heureusement, nous utilisons plusieurs dizaines de milliers de gouttes par expérience à des fractions volumiques petites. Les bicouches étant homogènes sur de grandes surfaces, nous sommes ainsi toujours en mesure d'observer plusieurs dizaines de gouttes isolées collant sur les bicouches.
Dans les expériences suivantes, nous utiliserons donc un tampon phosphate dont la composition est la suivante :
H2PO4 : 10mM ; NaCl : 100mM ; pH : 7.2 ; Tween20~: 0.05 CMC (5.10^-6mol/l).

### I-2 : Tension de surface des gouttelettes d'émulsion :

La tension de surface des gouttelettes d'émulsion dans un tampon saturé en surfactant est de l'ordre de 3 mN/m. Lors de mes expériences d'adhésion spécifique, je dois diluer environ 1µl de mon émulsion fonctionnalisée dans son tampon à 0.2%m/m de Tween20 dans environ 400 µl du tampon décrit ci-dessus. Ceci abaisse la concentration en surfactant à ~0.05 cmc.

Un problème engendré par l'utilisation d'un tampon dont on a diminué la teneur en surfactant est le changement de la tension de surface des gouttes. Lorsqu'on dilue par 100 la teneur en

surfactant dans le tampon des gouttelettes, un nouvel équilibre va s'instaurer : les surfactants initialement à la surface des gouttes vont se dissoudre dans le tampon aqueux et la couverture des gouttes en surfactant va être abaissée : la tension de surface des gouttes va donc augmenter pour atteindre une valeur inconnue. Nous avons tenté de mesurer la tension de surface des gouttes une fois plongée dans un tampon pauvre en surfactant.

Nous avons mené des expériences en goutte pendante pour mesurer la tension de gouttes d'huile en l'absence de surfactant dans notre tampon d'adhésion. Le montage a été mis en place au laboratoire par N.Brémond. Les expériences de goutte pendante sont réalisées sur des gouttes d'huile assez grosses de l'ordre du millimètre. Nous avons fait une expérience d'une goutte pendante d'huile de soja dans le tampon de travail en absence complète de Tween20. Le résultat est présenté sur la figure2.

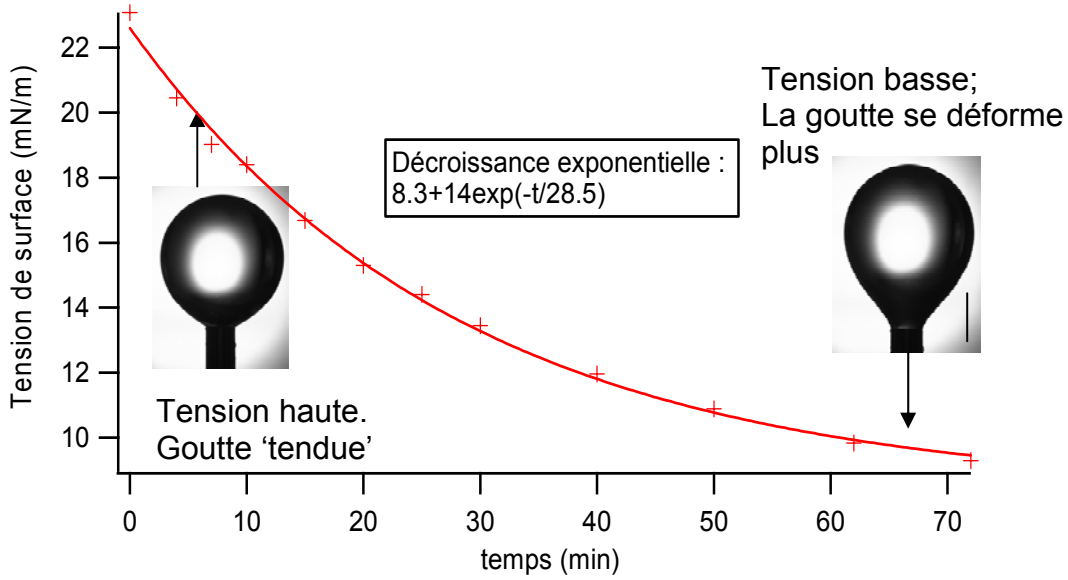



Figure 2 : Mesure de la tension de surface d'une goutte d'huile dans un tampon sans surfactant. La présence de molécules amphiphiles dans l'huile fait baisser la tension de surface de la goutte au cours du temps. A partir du temps caractéristique d'évolution et d'une estimation du coefficient de diffusion des amphiphiles dans l'huile, on peut déduire une concenration des molécules ampihiphiles dans l'huile de soja. Barre d'échelle : 1mm

Dans cette mesure, il n'y a aucun surfactant en solution dans l'eau. Pourtant la tension de surface mesurée chute d'un facteur trois au cours du temps. Ceci est dû aux tensioactifs présents dans l'huile de soja (acides oléiques, triglycérides..). Une goutte d'huile plongée dans l'eau voit donc sa surface se couvrir de molécules amphiphiles présentes au sein de l'huile de soja. Le temps caractéristique de stabilisation est de l'ordre 30minutes~2000secondes.
Si ce phénomène est uniquement dû à la diffusion, on peut déterminer une distance de diffusion caractéristique. Une chose surprenante ici est la loi de décroissance temporelle. On pourrait s'attendre à des effets diffusif or un fit en $\sqrt{t}$ ne marche pas bien, en tout cas

beaucoup moins bien que le fit exponentiel proposé. Dans notre expérience, on rate les premiers instants. Il y a en effet un certain temps entre la mise en place de la goutte et la première photo, instants où les premiers surfactants viennent couvrir la goutte. Par ailleurs, la taille finie de la goutte peut engendrer des écarts par rapport à une loi en $\sqrt{t}$ . Pour plus de détails sur les méthodes de goutte pendante, on pourra se référer au travail de Yang et al. (Langmuir 2004) [3].
Dans notre cas, nous cherchons à faire des estimations assez grossières et nous servirons du temps caractéristique apparaissant dans l'exponentielle du fit.
Le coefficient de diffusion d'une molécule au sein de l'huile de soja est de l'ordre de 10^-11m².s (l'huile de soja est environ 70 fois plus visqueuse que l'eau).
La distance caractéristique parcourue en 30 minutes dans l'huile de soja est donc de l'ordre de 150µm. Le réservoir d'amphiphiles étant infini dans l'expérience de la goutte pendante et la tension de surface des gouttes se stabilisant (autour de 8mN/m), on peut penser que la surface est saturée avec les amphiphiles de l'huile.
A partir de l'estimation de la distance sur laquelle diffuse les amphiphiles de l'huile et connaissant la surface de la goutte pendante, je peux faire une estimation de la concentration en amphiphiles dans mon huile.
En goutte pendante, mes gouttes mesurent environ 3mm de diamètre.
En prenant une aire par tête amphiphile de 20 angstroms², on peut estimer la concentration en amphiphiles dans l'huile à :
[amphiphiles]=5.10^-5mol/L.
A la concentration en amphiphiles déterminée ci-dessus, pour couvrir une gouttelette de 20µm de diamètre, il faudrait un volume de 10^5µm^3. Or une goutte de diamètre 20µm de diamètre a un volume de 5.10^3µm^ 3. La couverture possible d'une goutte de diamètre 20µm par les amphiphiles qu'elle contient correspond environ à 1/50$^{ème}$ de la couverture totale et les amphiphiles dans l'huile ne permettent pas de prédire complètement la tension de surface de la goutte.
Dans notre tampon de travail, la concentration en surfactant est de l'ordre de 0.05cmc. On peut donc estimer que la tension de surface sera fixée par la quantité de surfactant dans l'eau. A cette concentration, la tension de surface mesurée en goutte pendante juste après immersion de la goutte d'huile dans le tampon est de l'ordre de 18mN/m. Il n'est ensuite pas aisé d'estimer proprement la tension de surface des gouttes en goutte pendante puisque au cours du temps, deux effets se mélangent. Dans la suite, et pour fixer les idées, on prendra une valeur intermédiaire de 12mN/m. Des mesures sont en cours pour préciser cette valeur de 12mN/m.

II- Observation de l'adhésion spécifique des gouttelettes d'émulsion sur les bicouches supportées en microscopie de fluorescence :

Nos gouttelettes, une fois introduites dans le bon tampon sont capables d'adhérer aux bicouches supportées. Nous allons maintenant nous intéresser aux observations et aux mesures que nous avons menées pour caractériser et comprendre notre situation d'adhésion spécifique.
Pour commencer, je vais décrire les séries de mesure en statique que nous avons mené. Notre outil de travail de préférence fut la microscopie de fluorescence.

D'après mes observations, au bout d'une vingtaine de minutes, les patches adhésifs ne grandissent quasiment plus. Nous pouvons alors observer l'état d'équilibre de nos situations d'adhésion. Une première stratégie consiste à observer en microscopie de fluorescence la répartition des streptavidines sur la goutte et dans le patch.
La faible profondeur de champ du microscope nous a permis d'observer distinctement deux zones d'intérêt : les patches adhésifs, le plan équatorial des gouttes.
Lorsqu'on focalise sur la zone de contact, on peut observer très clairement la fluorescence de ces zones. La fluorescence dans le patch est due à un recrutement des streptavidines dans la zone de contact. Cette observation est encourageante. Il existe bel et bien un effet qui, comme dans le cas de l'adhésion cellulaire ou des expériences en micropipette, permet de recruter les streptavidines dans la zone de contact. Grâce à la calibration de fluorescence effectuée en FCS, nous pouvons faire une estimation de la densité de streptavidine dans les zones d'adhésion de nos gouttes. Remarquons qu'à ce stade, il est encore impossible de dire si ce recrutement est bien dû à la création de liens ou à un effet non spécifique comme avait pu l'observer Jacques. Nous décrirons notre mise en évidence des effets non spécifiques dans le prochain paragraphe. L'observation de la fluorescence dans le patch nous permet d'accéder au diamètre de la zone de contact.
Une autre prise de vue intéressante en microscopie de fluorescence est l'observation des gouttes dans leur plan équatorial. En observant les gouttes dans leur plan équatorial, on peut encore détecter une fluorescence assez nette à la surface des gouttes, signe que les streptavidines ne sont pas toutes recrutées dans la zone de contact. Cette fluorescence nous donne une indication sur la densité de streptavidine restant en surface des gouttes. On peut aussi se servir de cette fluorescence pour mesurer le rayon des gouttes.

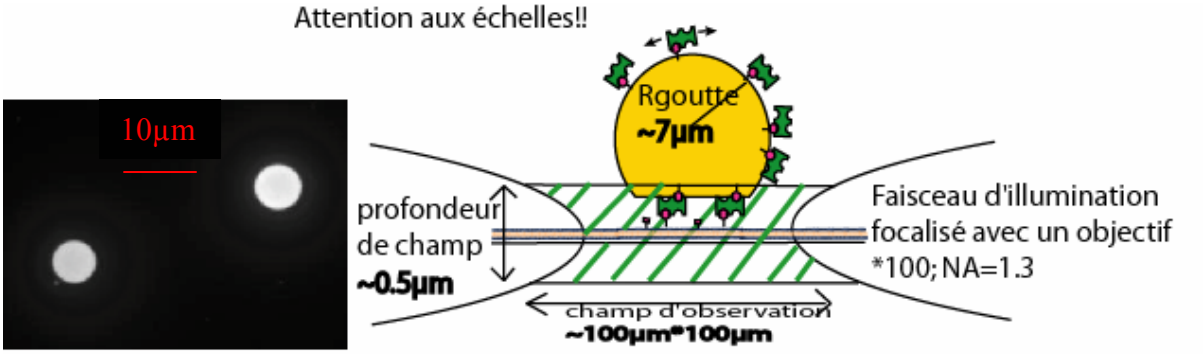



Figure 1 : Observation des patches adhésifs sur la bicouche. La mise au point est faite sur la bicouche (schéma de droite). La fluorescence du reste de la goutte est alors minime. Ce type d'image donne accès :

- à la fluorescence dans le patch et donc au nombre de strep grâce à notre quantifiction.
- au rayon du patch adhésif.

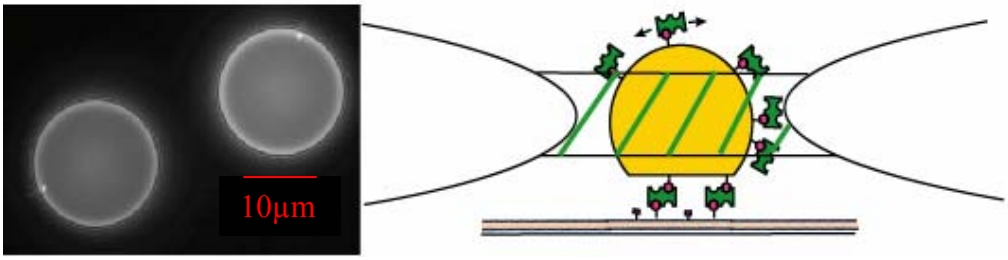



Figure 2 : Observation du plan équatorial des gouttes. Sur les bords de gouttes, on observe encore une fluorescence assez nette, signe que les streptavidines ne sont pas toutes recrutées dans la zone de contact. Au centre des gouttes, on devine un halo lumineux qui est la fluorescence issue du patch. Ce halo rend l'estimation de la fluorescence sur les gouttes un peu délicate.

Nous avons ainsi mené pour un bon nombre d'échantillons des mesures en microscopie de fluorescence. Dans les mesures que nous allons présenter, la biotine est libre de diffuser sur la bicouche lipidique tandis que les streptavidines peuvent diffuser sur les gouttes. Chaque échantillon est caractérisé par la proportion de biotine dans la bicouche et la densité initiale de streptavidine sur les gouttes.
Pour déterminer la proportion de biotine dans la bicouche, je prélève des volumes donnés à des concentrations connues de phospholipides. J'ai donc une assez bonne idée de la proportion initiale de biotine dans ma population de lipides. Je fais ensuite l'hypothèse que

cette proportion est maintenue lorsque je fabrique les bicouches. Typiquement, les proportions de biotine que j'ai utilisées sont comprises entre 0.01% et 1% de l'ensemble des lipides. Si on prend une aire par tête lipidique de l'ordre de 80Angstroms², cela correspond à des concentrations comprises entre 100 et 10 000 biotines/µm². La concentration en biotine dans la bicouche varie donc entre une fois et une centaine de fois la concentration en streptavidine sur les gouttes. Remarquons aussi que l'aire totale de mes zones d'adhésion ne dépasse pas 1/100$^{ème}$ de l'aire de mes bicouches. Dans la 'pire' des situations, je dois recruter des biotines sur une surface de l'ordre de 10 fois celle du patch. Mon réservoir de biotines qu'est la bicouche fluide n'est donc jamais dépleté. Mieux, même dans le pire des cas, seuls 10% de mes biotines sont requises dans les patches et la concentration en biotine sur mes bicouches reste sensiblement constante.
Pour estimer la concentration en streptavidine sur les gouttes, je me sers de la quantification décrite dans la partie matériaux. Dans mon tampon de greffage, je sais que selon mes conditions d'incubation, la densité de streptavidine varie entre quelques dizaines et quelques centaines de streptavidine/µm². Une fois greffée, je peux faire une mesure de la fluorescence moyenne en surface des gouttelettes, comme cela a été décrit dans la partie matériaux ce qui me permet d'avoir une estimation a priori de la densité de streptavidine initialement présente sur les gouttes. Comme nous allons le voir, après la série de mesure en fluorescence, je peux accéder indirectement à ma concentration en streptavidine de façon plus précise.

Chaque échantillon est donc caractérisé par une concentration initiale en streptavidine sur les gouttes et une concentration en biotine quasi-constante sur les bicouches.
Sur un échantillon réussi, j'observe des situations d'adhésion sur une grande surface de l'ordre du cm². Un grand nombre de situations de collage peuvent donc être observés.
En microscopie de fluorescence, nous prenons une série d'images doubles à différents endroits sur la lamelle. A un endroit donné, on prend une première photo en focalisant sur la bicouche où se trouvent les patches fluorescents (figure 1) puis, sans changer de position transverse, une autre photo dans le plan équatorial des gouttes (figure 2).

La première image va nous permettre d'accéder au rayon du patch et à la densité de streptavidines dans le patch (grâce à la calibration faite auparavant).
La seconde image prise dans le plan équatorial des gouttes va nous permettre d'accéder au rayon des gouttes et à la densité de streptavidine restant sur les gouttes après adhésion.

Pour un endroit donné, on peut observer entre 2 et 6 gouttelettes adhésives.
Une fois un endroit photographié, on peut ensuite se déplacer dans l'échantillon et renouveler la prise de photos à une dizaine voire plus d'endroits différents.
Ainsi, un échantillon de prendre des mesures sur quelques dizaines de gouttes adhésives.

Remarques :

- Dans ces séries de mesures, il faut faire attention à limiter les effets de photobleaching. Les photos en fluorescence sont prises le plus rapidement possible pour limiter le temps d'illumination et de la façon la plus équivalente possible. En moyenne, le temps nécessaire pour prendre une photo est de l'ordre d'une demi-seconde. Le temps caractéristique de bleaching des streptavidines utilisées est de l'ordre de 30 secondes. L'erreur liée au bleaching est de l'ordre de 5% par rapport à une image prise 'instantanément'.

- La polydispersité en taille des gouttes entraîne des erreurs sur la mesure du diamètre des gouttes dans le plan équatorial. Autant que possible, nous avons tenté de prendre des photos sur des ensembles de gouttes les plus monodisperses possibles.
- Par la suite, les clichés de fluorescence seront une superposition des 2 images prises au même endroit, l'une dans le plan de la bicouche et des patches (en vert), l'autre dans le plan équatorial des gouttes (en rouge).

Ces mesures de fluorescence donnent donc accès à 3 grandeurs importantes :
**-la déformation de la goutte** : elle est accessible grâce aux mesures du rayon du patch et du rayon de la goutte. Le rapport rayon du patch /rayon de la goutte est égal au sinus de l'angle de contact tel qu'il est défini sur la figure 3. On peut donc déterminer assez facilement le cosinus de l'angle de contact théta. On a donc un accès à l'énergie d'adhésion de nos gouttelettes en utilisant l'équation d'Young $E_{adhésion} = \gamma(1-\cos\theta)$.

En rapportant uniquement l'angle de contact de nos mesures géométriques, on normalise par rapport à la taille de la goutte. On a pu vérifier que la taille de la goutte n'a pas d'influence sur l'équilibre d'adhésion.
Notons que la mesure du rayon du patch est assez bruitée. Une erreur d'un pixel sur la mesure du patch entraîne une erreur de près de 7% sur la mesure du rayon d'un patch de 2 microns.

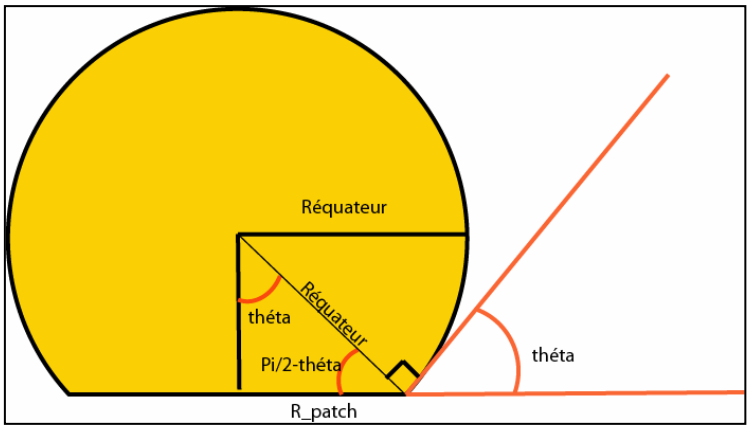



Figure 3 : pour une goutte adhésive, sans approximation, on a toujours, sin(théta)=Rpatch/Réquateur.

**-la densité de streptavidine dans le patch :** cette mesure est absolue grâce à la calibration de fluorescence faite dans la partie bicouche. Nous extrapolons la courbe maîtresse de calibration aux intensités de fluorescence mesurées dans les expériences d'adhésion.
.

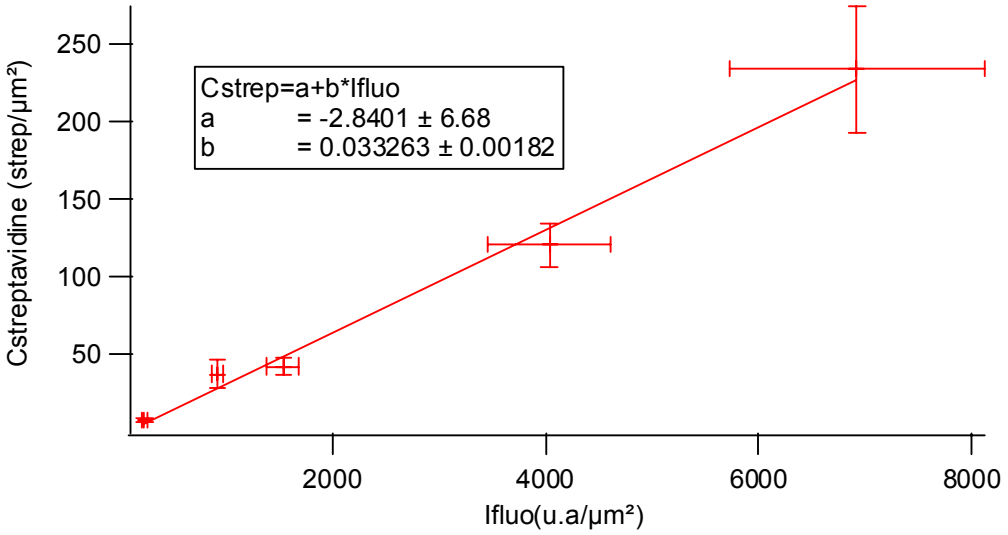



Figure 4 : Courbe maîtresse de calibration C_strep/I_fluo.
En extrapolant cette droite aux valeurs de fluorescence trouvées dans les patches, j'en déduit la concentration en streptavidine dans les patches.

En mesurant l'intensité de fluorescence, on peut ainsi déterminer la densité de streptavidine dans le patch. Notons que cette mesure ne nous permet pas de savoir la proportion de streptavidine effectivement adhérées à des biotines. Nous utiliserons des arguments de libre diffusion dans et hors du patch (égalité de la concentration en streptavidine libre dans et hors du patch) et l'estimation des effets non-spécifiques pour estimer la proportion de streptavidines liées à des biotines dans le patch.

**-la densité de streptavidine sur la goutte avant et après adhésion :** l'accès aux densités en streptavidine se fait de façon indirect. Nous utilisons les valeurs moyennes auxquelles le grand nombre de gouttes sur lesquelles nous faisons les mesures nous donne accès.
Déjà au niveau de la taille, nos gouttes ont un rayon moyen qui nous permet d'estimer une surface moyenne.
Concernant les densités de streptavidine en surface, nous avons vu dans la partie matériau que lors d'un greffage, la fluorescence des gouttes est sensiblement la même sur l'ensemble des gouttes. La déviation standard n'excède pas 10%. Nous avons donc accès à une moyenne de la densité de fluorescence en surface des gouttes, valeur sensiblement proportionnelle la densité de streptavidine.
Une fois les gouttes ayant adhéré, une partie de la streptavidine est recrutée dans la zone de contact. Cependant, nous avons constaté qu'il reste une quantité non-négligeable de streptavidine en surface. Nous pouvons donc mesurer la fluorescence de surface des gouttes adhérées. Lorsqu'on effectue cette mesure sur quelques dizaines de gouttes, on trouve une valeur moyenne de la fluorescence des gouttes après adhésion. Cette valeur est proportionnelle à la concentration en streptavidine restant en surface de la goutte.
En comparant les valeurs initiales et finales de streptavidine sur les gouttes, on a donc accès à la proportion de streptavidine ayant été recrutées dans le patch adhésif.

Or, on a accès, grâce à la calibration effectuée en FCS, aux densités absolues de streptavidines dans le patch. Sur plusieurs dizaine d'évènements, ces densités se moyennent autour d'une densité connue cette fois ci en nombre de streptavidine/µm².
Le fait que les gouttes aient un rayon moyen entraîne que les rayons des zones d'adhésion s'échelonnent autour d'une valeur moyenne.
Nous avons alors tous les ingrédients pour accéder aux densités de streptavidine initiale et finale sur les gouttes. Le nombre de streptavidine dans les patches correspond à la proportion de streptavidine ayant quitté la surface pendant l'adhésion. On a donc accès au nombre total de streptavidines sur les gouttes puis aux densités de streptavidine avant et après adhésion.

Dans ce raisonnement, on perçoit tout l'intérêt de travailler sur les gouttes d'émulsion ayant une petite polydispersité. Cette polydispersité nous permettra de mesurer des tendances sur des échantillons uniques mais nous permettra de nous servir des moyennes pour accéder par exemple aux densités de streptavidine sur les gouttes.

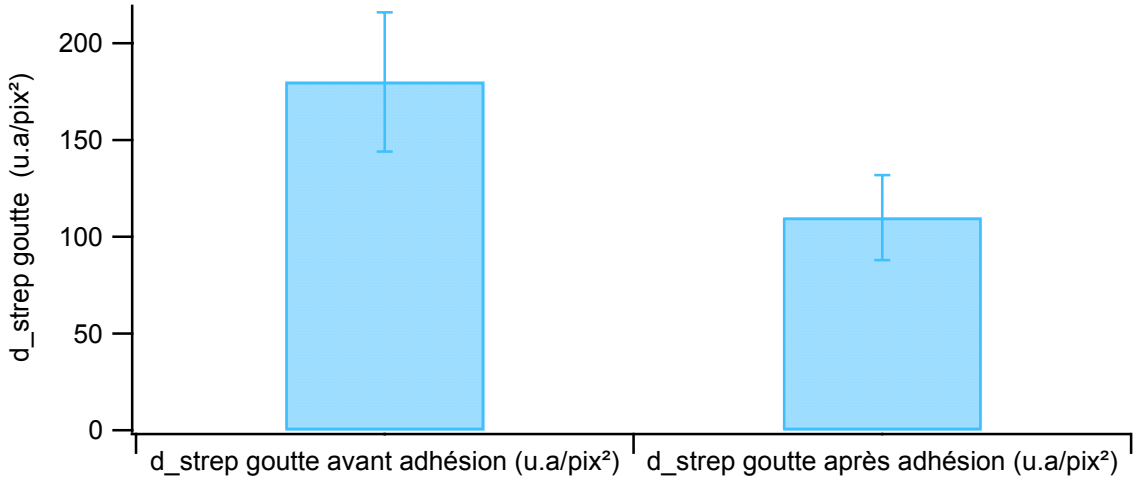



Figure 10 : Evolution de la densité de streptavidine en surface de la goutte avant et après l'adhésion. On a fait la moyenne de la fluorescence sur une quarantaine de gouttes. La différence de densité mesurée (environ 35% ici) est due au recrutement des streptavidines dans le patch pendant l'adhésion. La fluorescence est mesurée en bord de goutte et donnée en niveaux de gris par pixel². Cette valeur est proportionnelle à la densité de streptavidine. A partir de la mesure absolue de densité dans le patch, on peut accéder aux densités moyennes absolues en surface des gouttes.

Remarquons que après adhésion, il arrive que lors de la focalisation dans le plan équatorial de la goutte, la fluorescence du patch apparaisse de façon très nette (voir figure suivante). Ce lumineux halo m'oblige pour limiter les erreurs à observer uniquement le bord de goutte. Malgré cela, il est possible que mes estimations de fluorescence soient un peu surévaluée par la fluorescence parasite du halo issu du patch.

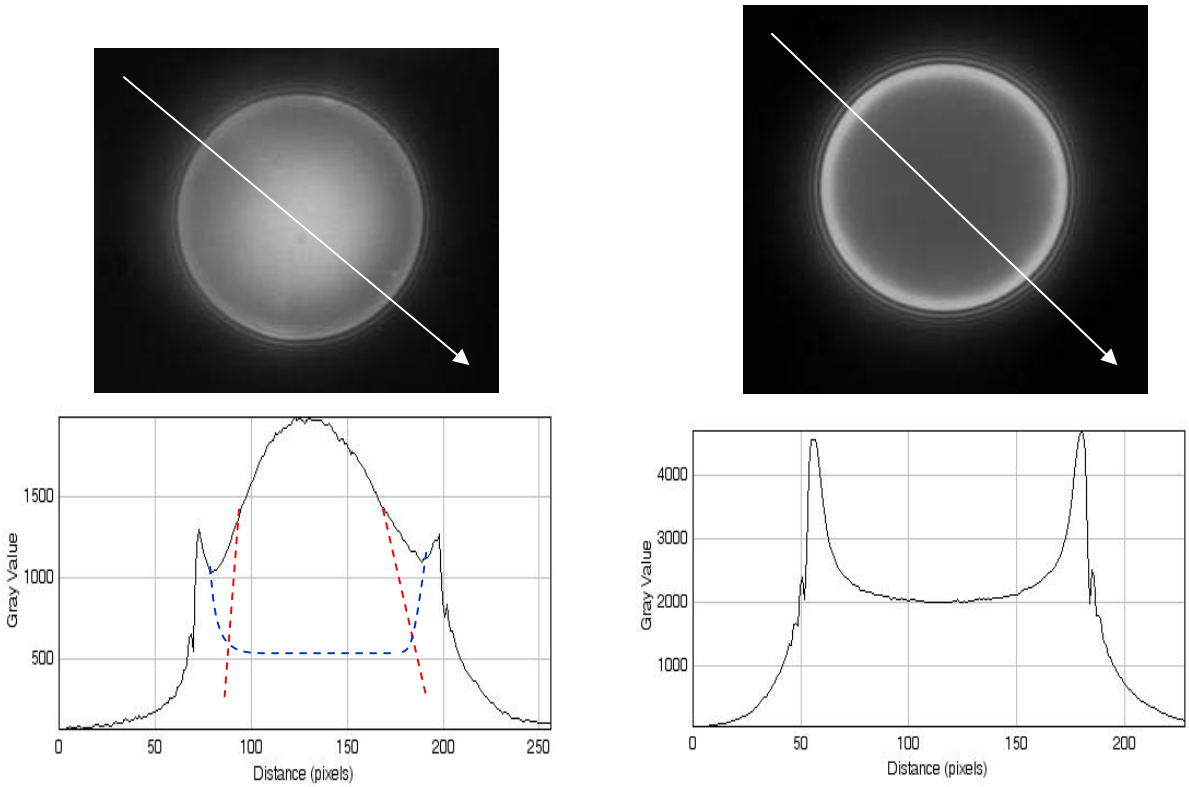



Figure 4 : A gauche observation de l'émision de fluorescence d'une goutte ayant adhéré spécifiquement. On constate l'appartition d'un halo lumineux au cetre de la goutte qui est dû au patch adhésif concentré en steptavidine. Ce halo nous oblige à quantifier la densité de streptavidine uniquement avec la fluorescence sur le périmètre de la goutte.

Avec ces possibilités de mesure, nous avons mené quasi-systématiquement des mesures de fluorescence sur nos différents échantillons. L'objectif de ces mesures est double. D'une part, nous pouvons quantifier assez précisément (les densités de streptavidine hors et dans le patch). Pouvant estimer la quantité de biotine dans la bicouche à partir des proportions initialement introduites, on a donc un accès aux différentes concentrations intervenant dans la loi d'action des masses de la réaction Biotine/streptavidine en surface.
Par ailleurs, les mesures géométriques du rayon du patch et de la goutte après contact nous permettent d'accéder à la déformation de la goutte et donc de mesurer l'énergie d'adhésion de notre système.
Nous allons donc être capable avec ces mesures de fluorescence d'essayer de relier énergie d'adhésion et loi d'action des masses de notre réaction à deux dimensions.

III-Mesures expérimentales de l'adhésion en statique :

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que nos méthodes de mesure nous permettait d'accéder à la déformation des gouttelettes ainsi qu'aux densités de streptavidine sur la goutte et dans la zone de contact. Nous allons maintenant développé les résultats sur l'adhésion spécifique que nous avons pu obtenir.

III-1 : Premières observations sur les zones de contact :

Les premières observations agréables furent l'apparition des zones de contact très fluorescentes entre les gouttelettes et les bicouches. Comme prévu, de la streptavidine semble être recrutée dans la zone où la réaction streptavidine/biotine peut avoir lieu.
Ci-dessous, nous avons représenté un cliché en fluorescence où sont superposés l'image dans le plan adhésif et l'image dans le plan équatorial de la goutte.

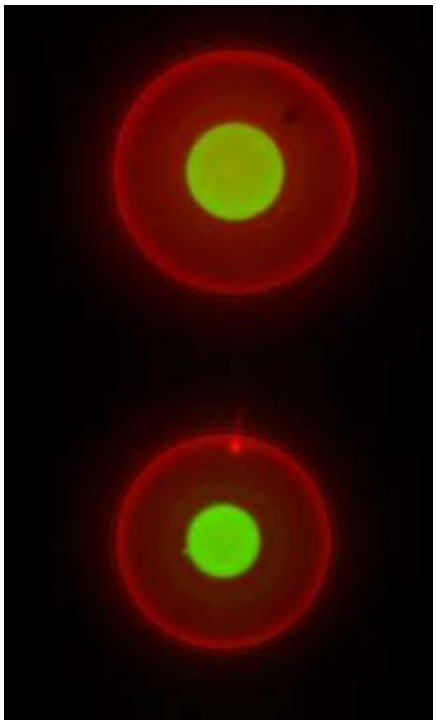


Figure 5 : Observation en microscopie de fluorescence de l'adhésion des gouttelettes. On a ici superposé 2 images prises au même endroit, l'une dans le plan de la bicouche et des patches (en vert), l'autre dans le plan équatorial des gouttes (en rouge). On constate que le patch est à peu près homogène.
Dans ces cas, l'angle de contact est environ de 20°.

Sur les clichés de fluorescence, la zone de contact se distingue par sa fluorescence plus intense que sur les bords de gouttes.
Un autre constat intéressant est l'homogénéité de la zone de contact. Les streptavidines recrutés sont réparties uniformément dans le patch adhésif.
Par ailleurs, lorsque nous observons les patches des gouttelettes adhésives, ceux-ci ne semblent pas grandir. Il semble que l'état d'équilibre soit atteint assez vite.
A la vue de cette apparente homogénéité et de l'aspect stationnaire de nos patches, nous nous sommes assez vite posés la question de savoir si les streptavidines dans la zone de contact, formant des liens avec les biotines conservaient un mouvement diffusif ou étaient bloquées par le recrutement.
Pour aller vérifier la mobilité dans la zone de contact, nous avons tout d'abord mené des expériences de FRAP. Avec un laser d'assez haute énergie (1mW continu), nous avons illuminé une partie de la zone d'adhésion. Les fluorophores portés par la streptavidine sont bleachés par l'impulsion lumineuse et on voit apparaître une zone sombre dans la zone de contact. Nous avons pu constater qu'en quelques secondes, la zone sombre disparait et la zone

de contact redevient homogène : le patch adhésif est donc fluide. Sur la figure suivante, j'ai reporté une de ces expériences de FRAP sur la zone de contact entre des gouttes assez concentrées (~150strep/µm²) et une bicouche riche en biotine (~10 000/µm²).

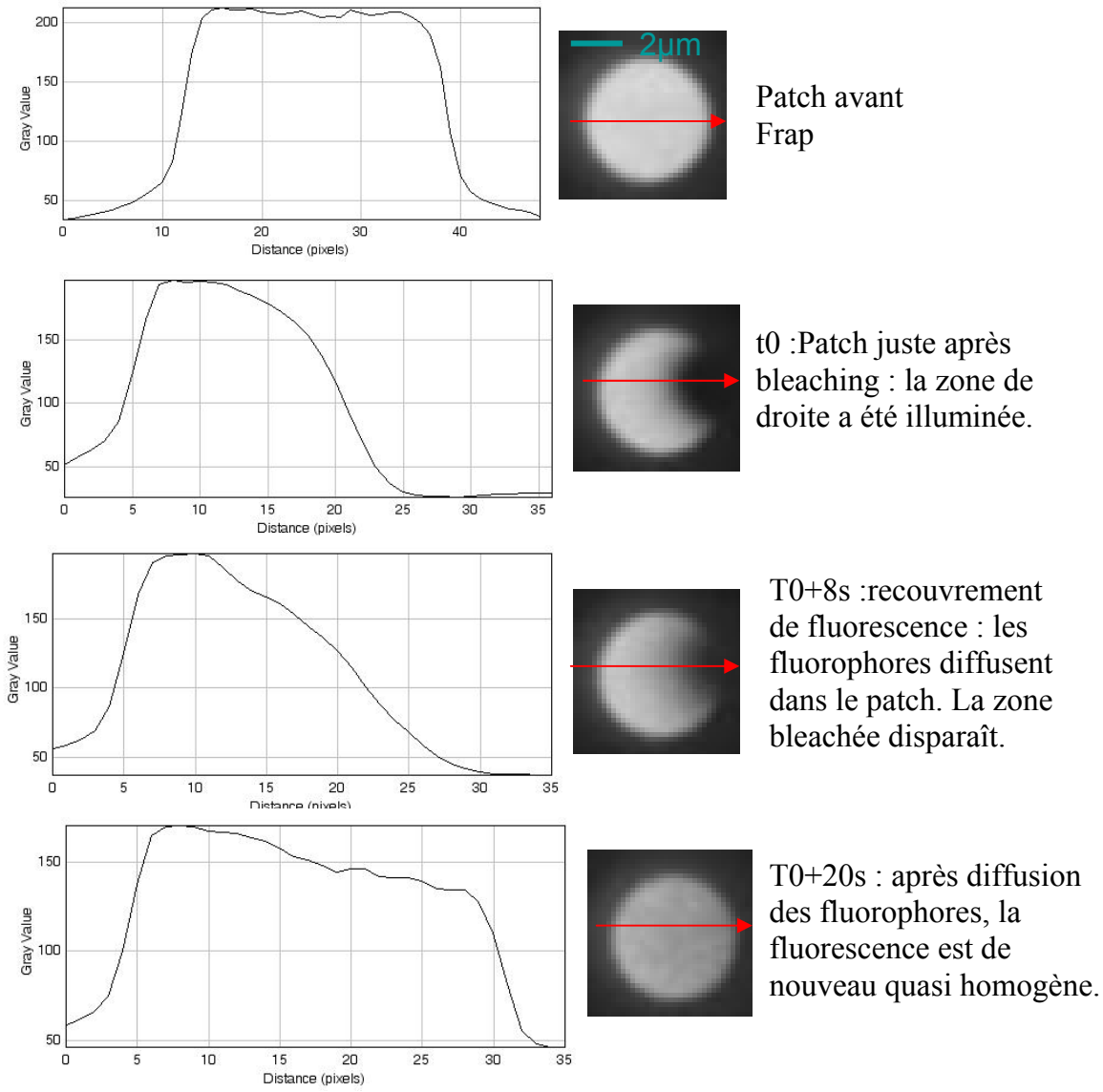



Figure 6 : Mise en évidence de la fluidité dans la zone de contact grâce à une expérience de FRAP. On observe le recouvrement de fluorescence au cours du temps.

La zone bleachée a une taille caractéristique de 2µm. Après bleaching, la zone de contact redevient uniforme en une quinzaine de secondes. On remarque que son niveau de fluorescence est plus bas qu'au départ. Ceci est dû en partie au fait que des fluorophores bleachés se sont répartis uniformément sur la surface et se sont mélangés à des fluorophores encore brillant abaissant en moyenne la fluorescence totale de la zone de contact.
Grâce à cette observation, on peut estimer un coefficient de diffusion à environ : $D = \frac{r^2}{t} \sim \frac{4}{20} = 0.2 \mu m^2 / s$. Ce coefficient est sensiblement plus long que le coefficient de

diffusion que nous avons rapporté dans la partie Matériaux où nous mesurions des coefficients de diffusion de l'ordre de 2µm²/s.

Nous avons mené une expérience de FRAP comparable sur une bicouche dont la teneur en biotine est seulement de ~500/µm². Nous avons une nouvelle fois pu constater la fluidité des streptavidines dans la zone de contact. Toutefois, le coefficient de diffusion estimé était cette fois nettement plus grand puisque le recouvrement de fluorescence d'une zone de 1.5µm se passait en 2 secondes environ. Dans ce cas, une estimation du coefficient de diffusion donne D~1.1µm²/s.
La zone de contact reste donc fluide mais diffuse plus vite. On peut attribuer ces différences à la proportion de biotine. En effet, les biotines sont portées par des phospholipides dont la température de transition gel/fluide est en dessus de la température ambiante. Ces phospholipides ont donc tendance à abaisser la fluidité des membranes.
Il est aussi possible que la densité en streptavidine soit plus basse dans la seconde expérience permettant aux streptavidines de mieux diffuser.
Le résultat intéressant reste la fluidité des zones de contact. Les espèces chimiques, streptavidine, biotine et liens peuvent donc diffuser dans tout le système. Ceci est positif car cette libre diffusion est une condition nécessaire pour qu'un équilibre chimique et mécanique soit possible.

III-2 :Mesures de déformation : comparaison entre déformation et recrutement de streptavidines.

Une fois la fluidité des zones de contact mise en évidence, nous nous sommes penchés sur un autre effet aisément observable. Selon les différentes situations d'adhésion, on peut observer une variation significative de la taille des zones de contact et de la densité de streptavidine dans le patch. Il semble, a priori, que plus la densité de streptavidine dans le patch est grande, plus la déformation de la goutte est importante. J'ai reporté différentes situations d'adhésion sur la figure suivante.

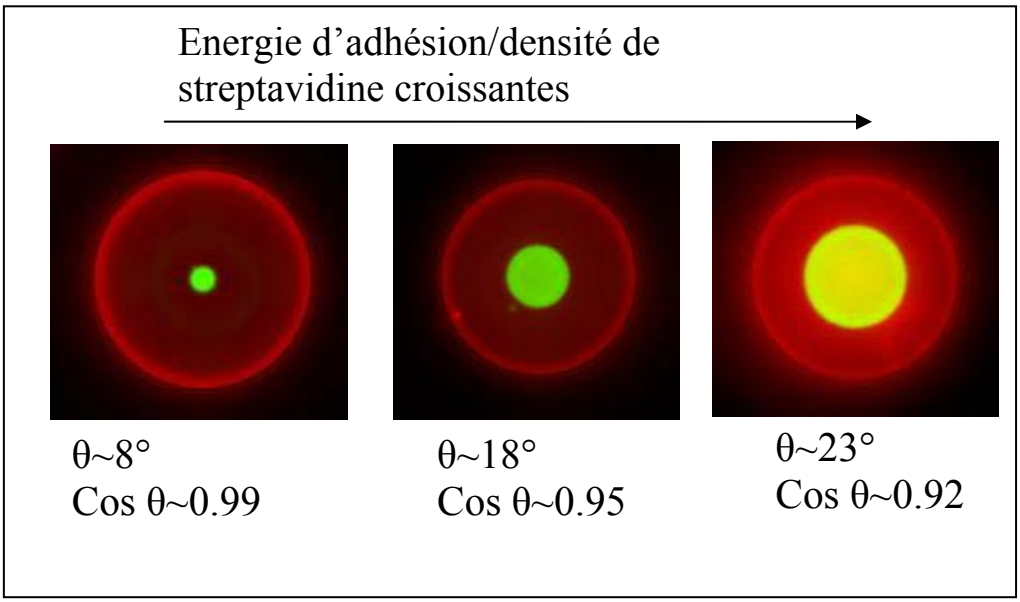



Figure 7 : Différentes situations d'adhésion. On peut constater une nette variation de l'énergie d'adhésion (reliée à l'angle de contact) selon les expériences.

Ainsi, dans notre système expérimental, l'énergie d'adhésion semble reliée à la densité de streptavidines dans la zone de contact. Ces observations rappellent les prédictions théoriques des modèles de Bell et al. par exemple. L'énergie d'adhésion est dans les cas extrêmes (dilués ou denses) proportionnelle à la concentration en liens. Nous avons donc voulu aller plus loin et mieux caractériser l'évolution de la déformation de la goutte en fonction la densité de streptavidine dans la zone de contact

A partir de nos expériences, nous pouvons faire de bonnes mesures de cosθ (qui intervient dans l'équation d'Young) et de la densité de streptavidine dans le patch. Nous avons donc essayé de tracer l'évolution de cosθ avec la densité de liens. La figure 5 est un graphe caractéristique de cette mesure.

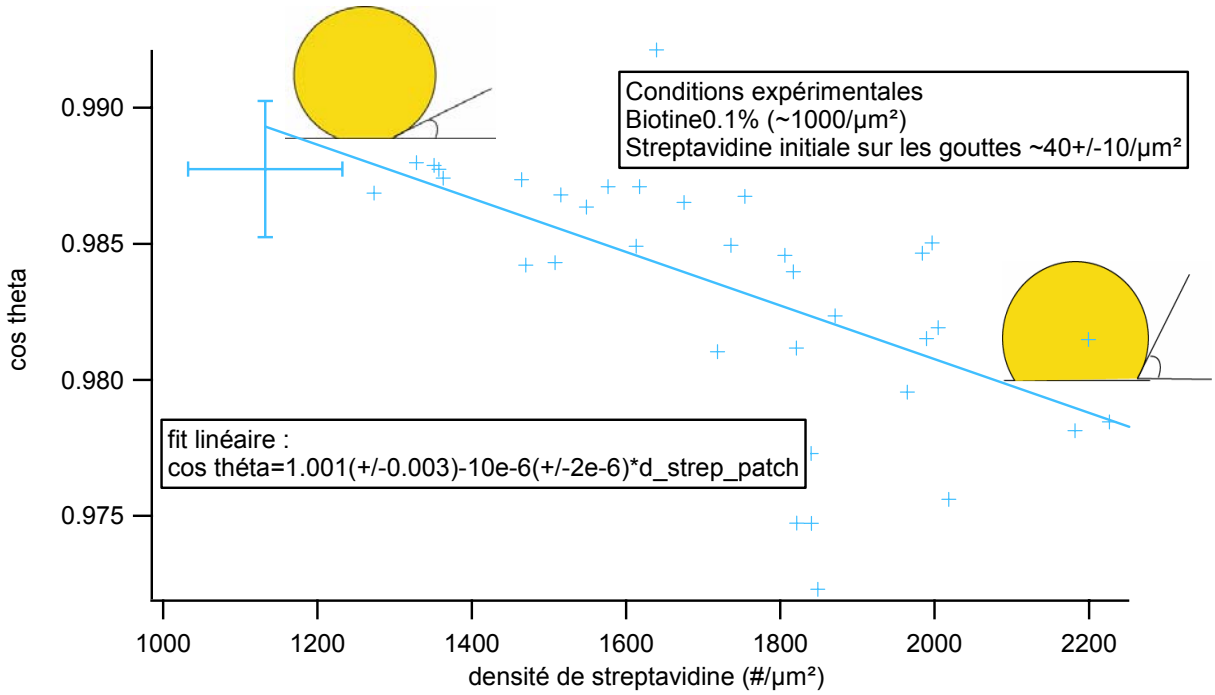



Figure 8 : Graphe cos(θ) vs d_strep. Quand la densité de streptavidine augmente dans le patch, la deformation de la goutte (l'angle de contact) augmente aussi.

Sur ce graphe, chaque point du graphe représente donc un évènement adhésif (une gouttelette) pour laquelle je mesure l'angle de contact et la densité de streptavidine dans le patch. J'ai représenté les barres d'erreur sur un seul point pour ne pas encombrer la figure.
Cette série de mesure correspond à un échantillon, c'est-à-dire une bicouche supportée (~1000biotines/µm²) et un lot de gouttelettes fonctionnalisées (~40+/-10streptavidine/µm²).

La dispersité sur les densités de streptavidine en surface des gouttes est ici un avantage puisqu'elle permet de au sein d'un échantillon d'observer des tendances. Il semble ici,, comme le prédisent les modèles formels que le cosinus de l'angle de contant diminue (avec la densité de streptavidine. On peut fitter ces données par une droite dont la pente vaut numériquement 10^-6µm².

Comme nous l'avons vu, dans les deux cas limites formels, l'équation d'Young peut s'écrire : $\gamma(1-\cos\theta) = E*[liens]$.
Dans le régime entropique, E est l'énergie thermique kT, dans un régime dense et énergétique, E est l'énergie d'un lien.
Grâce à nos mesures, on peut estimer une énergie E à partir de la pente de la droite. En supposant que toutes les streptavidines sont liées et en prenant une valeur de tension de surface de 12mN/m, l'énergie E dans notre fit linéaire vaudrait E=28kT(+/-6kT).
Cette valeur est bien plus grande que l'énergie thermique et s'approche de l'anergie des liens biotine/streptavidine en volume. On est donc visiblement dans un régime où c'est l'énergie des liens qui permet de déformer la goutte.

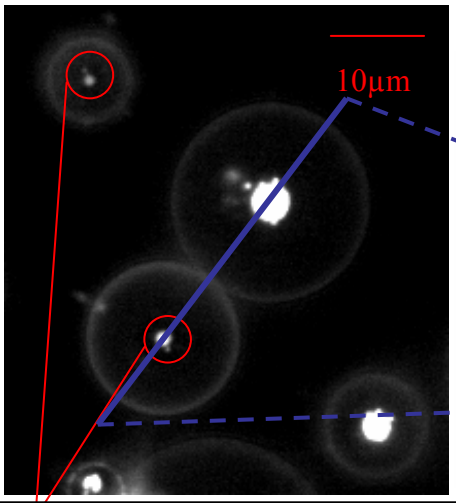
Nous allons commenter l'écart type assez grand de notre série de mesures.
Ces expériences présentent une certaine variabilité liée à la sensibilité des effets de surface. Nous déposons par exemple nos bicouches sur près d'un cm² et je ne néglige aucune zone où l'adhésion peut avoir lieu. Sur les grandes surfaces explorées, il est possible que mes bicouches aient des défauts ou présentent de légères différences modifiant localement les phénomènes d'adhésion spécifique.
Par ailleurs, j'ai pu observer assez fréquemment sur mes gouttes l'apparition de patches lumineux qui semblent être des agglomérats de streptavidine. Ces agglomérats diffusent en surface des gouttes et ont notamment tendance à venir se placer au niveau de la ligne de contact entre goutte et bicouche supportée, gênant ainsi le transport de la streptavidine et de la biotine entre la zone de contact et l'extérieur. Ceci cause une variabilité au sein d'une même expérience.
Il y a aussi un bruit lié à notre méthode de mesure et de traitement des images. D'une part une mauvaise focalisation au niveau de la zone de contact entraîne facilement des erreurs sur la mesure du rayon des patches adhésifs. Par ailleurs, lors de mon traîtement d'image, je repère mes objets en imposant un seuil de valeur fixe. Ceci peut fausser la mesure des tailles de aptches selon qu'ils sont plus ou moins denses en streptavidine. Or, une erreur de 1 pixel sur la mesure de la taille d'un patch peut entraîner une erreur, dans nos gammes de déformation de l'ordre de $\Delta\cos(\theta)$=+/-0.005. Ceci peut expliquer les erreurs sur l'axe des ordonnées. Cette erreur apparaît dans la barre d'erreur du graphique de la figure 8.
Par ailleurs, nous faisons des mesures en microscopie de fluorescence et les effets de bleaching sont inévitables. Notre fluorophore est ici de l'alexa488. Le temps de photobleaching de l'Alexa 488 dans nos conditions d'illumination est de l'ordre de 30s. La décroissance de fluorescence due au photoblanchiment étant exponentielle et le temps de mise au point pouvant différer de près d'une seconde, il y a une erreur de l'ordre de 5-10% sur l'intensité de fluorescence mesurée dans le patch. Ceci peut expliquer le bruit de la mesure des densités dans le patch et sur la goutte.

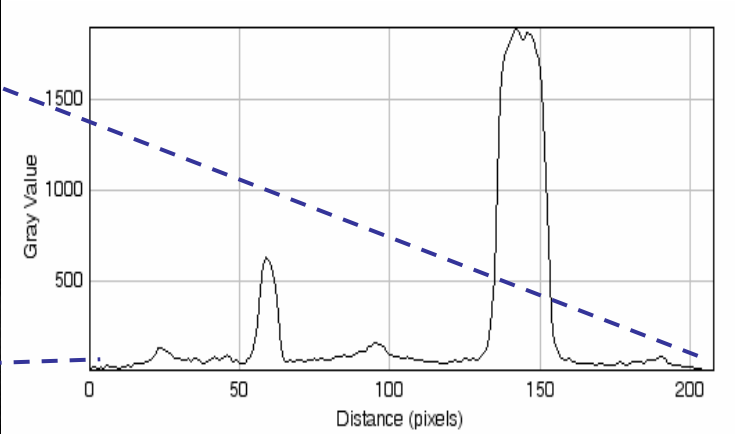
Jusqu'à maintenant, nous avons observé et mené des mesures sur les patches adhésifs sans vraiment savoir si l'adhésion observée était bien due à la création de liens biotine/streptavidine. Avant d'aller plus loin, nous allons mesurer la part de non-spécifique dans nos situations d'adhésion.

III-3 : Mesure des effets non spécifiques :

Pour évaluer l'interaction non-spécifique dans notre système, nous avons fait l'expérience suivante :
-nous faisons incuber des gouttelettes fonctionnalisées avec de la streptavidine dans une solution concentrée en biotine.
-nous amenons ces gouttelettes en présence de bicouches lipidiques fonctionnalisées avec de la biotine.
-nous observons l'adhésion de ces gouttelettes passivées en microscopie de fluorescence.

Le premier constat qui sort de ces expériences est que le non spécifique est faible. Sur la figure 6, nous avons mis la photo de l'adhésion de 2 types de gouttelettes sur une même bicouche supportée. La taille du patch et l'intensité de fluorescence dans le patch des gouttes passivées sont petites devant celles d'une goutte normale non passivée.




Zones de contact des gouttelettes passivées par la biotine : le rayon des patches est faible devant celui des gouttes non-passivée alors que les densités de streptavidine initiales sont comparables. La fluorescence et donc la densité de streptavidine est aussi est aussi plus basse.

Profil d'intensité de fluorescence (u.a/pix²) le long de la ligne bleue. L'intensité de fluorescence dans le patch des gouttes passivées est nettement plus basse (environ 3 fois) que dans le patch des gouttes normales.

Figure 9 : Adhésion de gouttelettes passivées par de la biotine.
L'adhésion est fortement réduite pour les gouttes passivées signe qu'une bonne partie de l'adhésion des gouttes est spécifique.

Sur la figure 6, on constate que les goutes passivées collent beaucoup moins bien que les gouttes normales. Il reste tout de même un patch adhésif et une fluorescence non négligeable, signe que des streptavidines sont recrutées. La fluorescence dans les patches 'non-spécifiques' est environ trois à quatre fois plus faible que dans le patch des gouttes normales. On peut évaluer la densité de streptavidine à environ 500#/µm² ce qui est tout de même environ 12 fois plus que la densité sur les gouttes. De la même façon que pour le traitement des gouttes

non passivées, nous avons reporté le cosinus de l'angle de contact de ces gouttes passivées en fonction de la densité mesurée de streptavidine dans le patch.
Nous avons ajouté ces points de non-spécifique sur le graphe de la figure 7

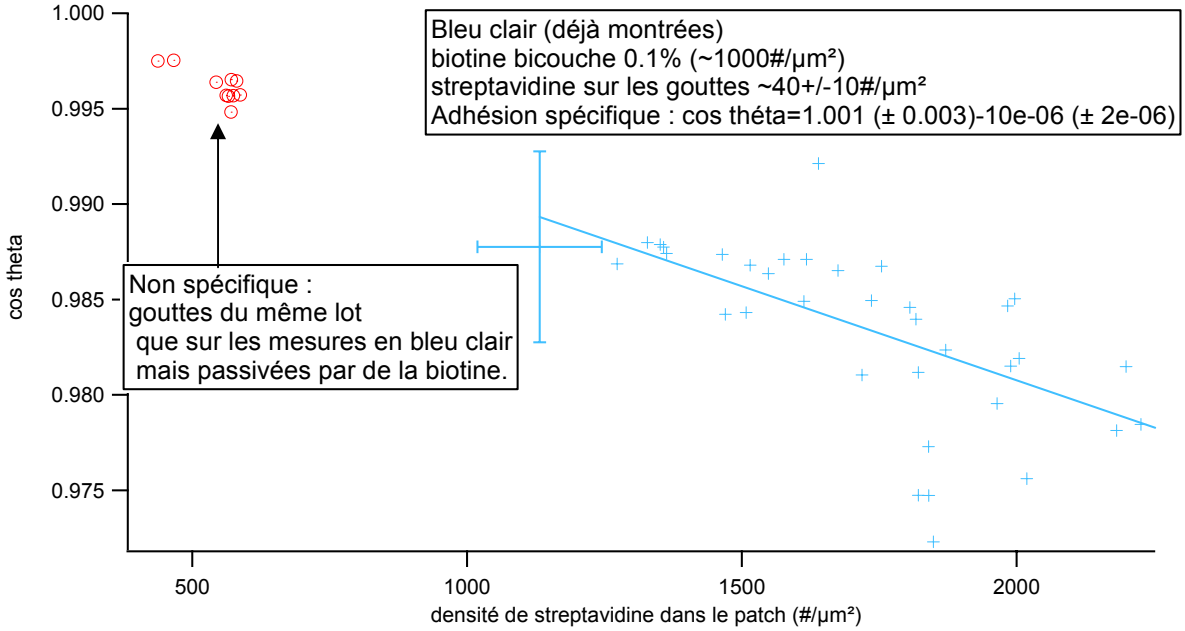



Figure 10 : Adhésion non-spécifique (en rouge) de gouttes passivées par de la biotine. La densité de streptavidine et la déformation des gouttes est plus faible que pour les gouttes 'normales'. Le recrutement n'est toutefois pas négligeable. Il y cinq fois plus de streptavidine dans le patch des gouttes 'non-spé' que sur les surfaces libres avant collage

Il semble exister des interactions favorables au recrutement de la streptavidine dans la zone de contact. Ces interactions ne permettent toutefois pas de déformer la goutte autant que les interactions spécifiques et n'engendrent pas un recrutement comparable à celui engendré par les interactions spécifiques. Les interactions non-spécifiques permettent de recruter environ 500streptavidines/µm² en l'absence de liens spécifiques et sur des bicouches comprenant environ 100strep/µm². L'effet non-spécifique est donc relativement fort. Toutefois, la densité de streptavidine recrutée par les effets non-spécifiques reste significativement plus faible que la densité de streptavidine dans les cas d'adhésion spécifique.
Faisons un petit retour vers le travail de J.Fattaccioli. Jacques avait étudié l'adhésion de gouttelettes sensiblement similaires sur des substrats solides : les biotines sur les substrats étaient fixes et liées à des PEG. Dans le cas de Jacques, le non-spécifique engendrait une faible déformation comme dans mon cas mais les streptavidines étaient recrutées dans le contact jusqu'à une concentration de saturation. Jacques avait estimé cette concentration de saturation à 3300+/-300#/µm². En faisant varier la concentration en biotine sur ces lamelles, Jacques pouvait observer un accroissement de la zone de contact mais la densité de streptavidine restait identique dans tous les cas. Ainsi, l'interaction non-spécifique entre streptavidine et substrat suffisait pour recruter les streptavidines à une concentration

constante. La formation de liens biotine/streptavidine permettait quant à elle la croissance de la zone de contact.
La nature du substrat, fluide ou solide engendre donc des différences notables sur l'adhésion non-spécifique. Contrairement au substrat solide, le recrutement non-spécifique entre les surfaces fluides n'a pas lieu jusqu'à une concentration de saturation mais s'arrête à des concentrations en streptavidine de l'ordre de 500/µm². Ce recrutement non-spécifique va cependant contrarier un argument souvent utilisé. En absence de non-spécifique, la libre diffusion des streptavidines libres dans et hors du patch conduit à l'égalité des concentrations en steptavidine libre dans et hors du patch.
Dans notre cas, c'est plutôt l'interaction non-spécifique qui va imposer la concentration en streptavidines libres dans le patch. On peut penser que le recrutement non-spécifique va aussi dépendre de la concentration initiale en streptavidine sur les gouttes.

Ces expériences témoins permettent toutefois d'affirmer qu'une majeure partie des streptavidines recrutées dans le patch le sont à cause d'effets spécifiques, en l'occurrence la création de liens biotine/streptavidine  Un partie non-négligeable des streptavidines est toutefois recrutée par des effets non-spécifiques. On se retrouve un peu dans la même interrogation que Jacques, à savoir : quelle proportion des streptavidines recrutée dans la zone de contact va effectivement être liée. Par la suite, nous reporterons toujours le nombre total de streptavidine dans le patch et lors des estimations numériques on utilisera ce nombre.
Jusqu'à maintenant, nous n'avons présenté des résultats que sur une seule expérience.
J'ai pu au cours de ma thèse réaliser des expériences sur de multiples lamelles avec de multiples gouttes. Essentiellement, j'ai changé les concentrations initiales en réactif pour observer l'effet sur l'équilibre final du système. J'ai reporté un certain nombre de ces expériences dans le paragraphe suivant.

III-4 : Variations des conditions expérimentales :

J'ai fait des expériences d'adhésion spécifique dans de multiples situations. En l'occurence, j'ai fait varier la densité de streptavidine sur mes gouttes et les proportions de biotine dans mes bicouches. J'ai reproduit les mesures liant déformation de la goutte à la densité de liens dans le contact. Le résumé de ces mesures cos théta vs d_strep_patch est présenté sur la figure suivante.

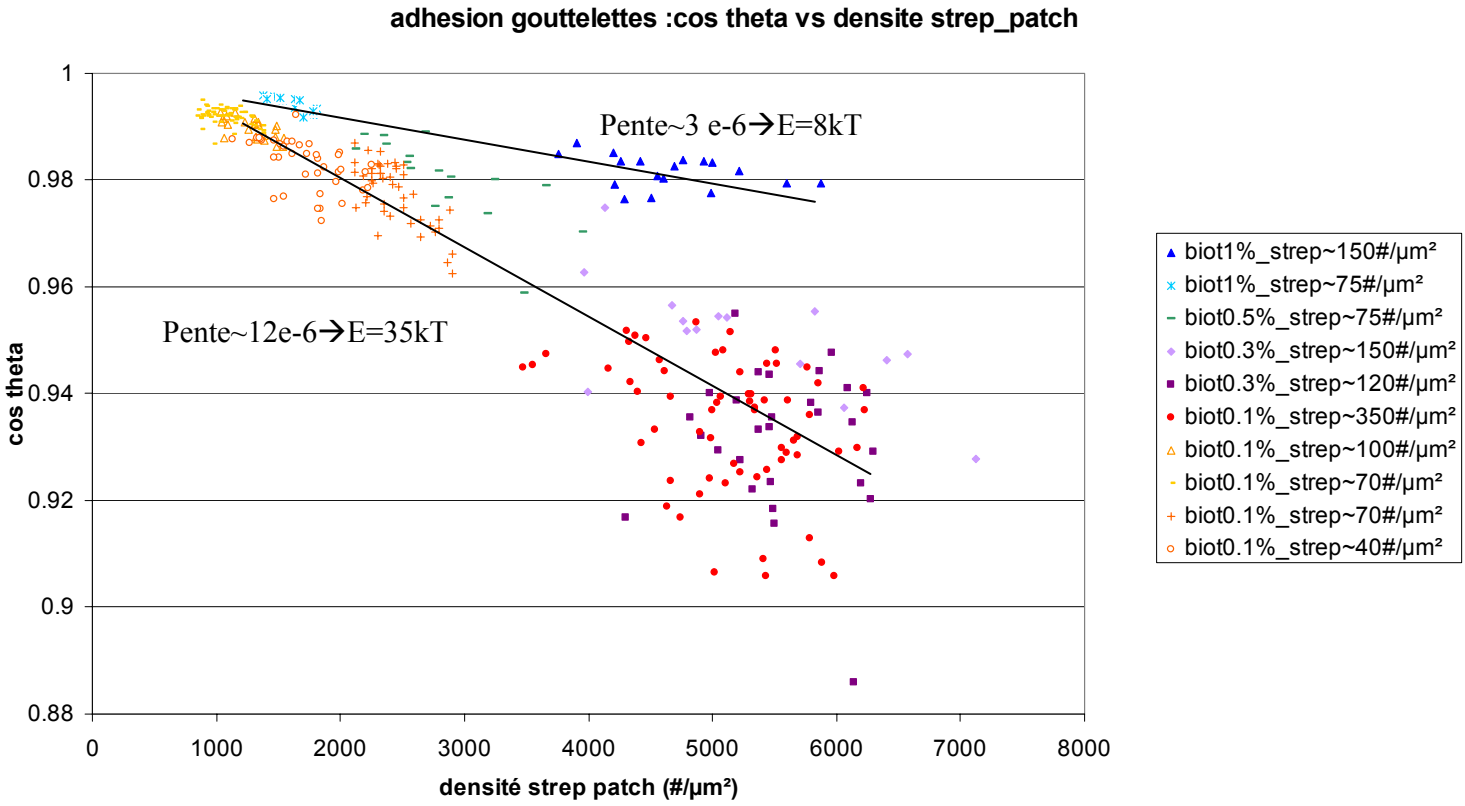



Figure 11 : Mesure de la déformation en fonction de la densité de streptavidine liées dans la zone de contact dans différentes situations expérimentales.

Dans le graphe ci-dessus, j'ai reporté 8 expériences dont les quantités de biotine et de streptavidine sur les gouttes et dans les bicouches varient.
Concernant la proportion de biotine dans les bicouches, il y a un code couleur :
-bleu : 1% biotine~10 000biotines/µm²
-vert : 0.5%~5000 biotines/µm²
-violet : 0.3%~3 000 biotines/µm²
-rouge/orange : 0.1%~1 000biotines/µm².
A chaque série de points correspond une bicouche supportée différente.
Les densités de streptavidine données sont estimées indirectement à partir de la mesure des densités moyennes de streptavidine dans les patches.

Ce graphique montre la tendance générale qui lie l'augmentation de la déformation à la densité de streptavidine dans le patch. Toutefois, selon les expériences, la pente reliant le cosinus de l'angle de contact à la densité de streptavidine dans le patch peut varier d'un facteur 4. Rappelons que cette pente peut s'écrire comme le ratio d'une énergie par lien sur la tension de surface.
A y regarder de plus près, il semble que la valeur de cette pente soit corrélée avec la quantité de biotine dans la bicouche. En l'occurrence, plus la concentration en biotine dans la bicouche est élevée, moins la pente est grande. Ainsi, les données 'bleues' pour lesquelles la teneur en biotine dans la bicouche est de l'ordre de 1% ont une pente de l'ordre de 3.10^-6 µm², tandis que les données orangées/rouge correspondant à une teneur en biotine de l'ordre de 1000biot/µm² ont une pente environ 3 fois plus grande de l'ordre de 12.10-6µm²/#.
On peut rappeler que nos expériences de FRAP ont montré qu'un bicouche portant ~10000biot/µm² a une diffusion plus lente qu'une bicouche portant~1000biot/µm².
On peut se demander si cette différence de diffusivité engendre la différence observée sur la relation entre déformation et densité de streptavidine. On peut en particulier penser qu'une moindre diffusivité dans la bicouche engendre des effets non-spécifiques plus forts. Cette observation irait dans le sens des expériences de Jacques dans lesquelles, sur des substrats fixes, la densité de streptavidine recrutée non-spécifiquement atteignait une concentration de saturation.

Un autre constat sur ces séries d'expériences est la dépendance de la densité de streptavidine recrutée à la densité initiale sur les gouttes.il semble que plus on met de streptavidines sur les gouttes au départ, mieux les gouttes vont coller.
Toutefois, cette dépendance est moins robuste que la dépendance de l'angle de contact avec la densité de streptavidine dans le patch et dans un certain nombre d'expériences, une assez grande concentration initiale en streptavidine n'a mèné qu'à de faibles adhésions.
Ainsi, on trouve des situations dans lesquelles la concentration initiale en streptavidine sur les gouttes est de l'ordre de 200#/µm² et pour lesquelles, l'adhésion reste faible. C'est par exemple le cas de la série de données 'biot0.1%_strp200/µm²' (triangles vides oranges) dont les gouttes, bien que portant une concentration initiale assez grande en streptavidine n'ont que très peu adhéré à la bicocuhe. Toutefois, même si les angles de contact et le recrutement de streptavidines restent faibles, la déformation reste liée à la densité de streptavidine dans les patches et les points s'alignent sur les droites de fit. Encore une fois, les expériences entre surfaces sont très sensibles. Il est possible que certains paramètres que je n'ai pas détecté aient des influences importantes sur les expériences d'adhésion et puisse favoriser ou au contraire anéantir l'adhésion spécifique.

En dépit de la sensibilité des expériences de surface, il apparaît au sein des expériences réussies que la densité initiale de streptavidine entraîne des différences sensibles sur l'équilibre final. Nous avons voulu mesurer cette dépendance et pour cela, nous sommes entrés dans les détails de deux expériences en allant mesurer l'effet des concentrations initiales sur la situation finale d'adhésion.

### III-5 : Effet de la quantité initiale de streptavidine :

Pour étudier l'effet des concentrations initiales, nous allons comparer les résultats obtenus avec les gouttes biot0.1%_strep~40/µm² et biot 0.1%_strep340/µm² présentées dans le graphe récapitulatif précédent (triangles oranges et ronds rouges).

Nous avons donc utilisé deux lots de gouttes différents que nous avons caractérisés avant la réaction en mesurant la concentration moyenne de streptavidine en surface.
La différence initiale de concentration en streptavidine entre les deux lots de goutte est donnée dans la figure suivante.

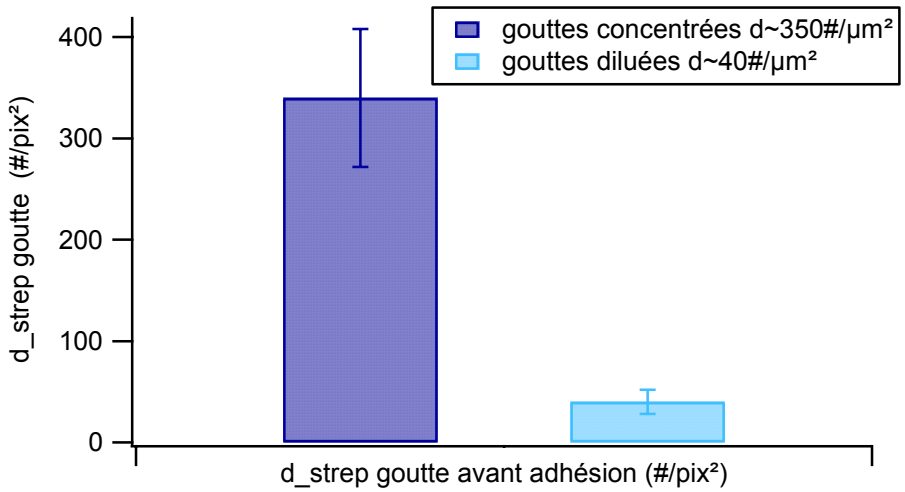



Figure 12 : Concentrations initiales moyennes en streptavidine à la surface des gouttes avant l'adhésion. En bleu foncé, les gouttes 'concentrées'. En bleu clair, les gouttes 'diluées'.

Il y a donc un facteur ~0.12 entre la densité de surface des gouttes peu concentrées et celle des gouttes plus concentrées.
Nous avons fait adhérer ces deux lots de goutte sur deux bicouches (différentes) de composition identique (~1000biotines/µm²). Nous avons ainsi pu mesurer la densité moyenne de streptavidines dans le patch pour les deux lots de gouttes et la densité de streptavidine restant sur les gouttes après l'adhésion. J'ai reporté ces valeurs sur les histogrammes suivants

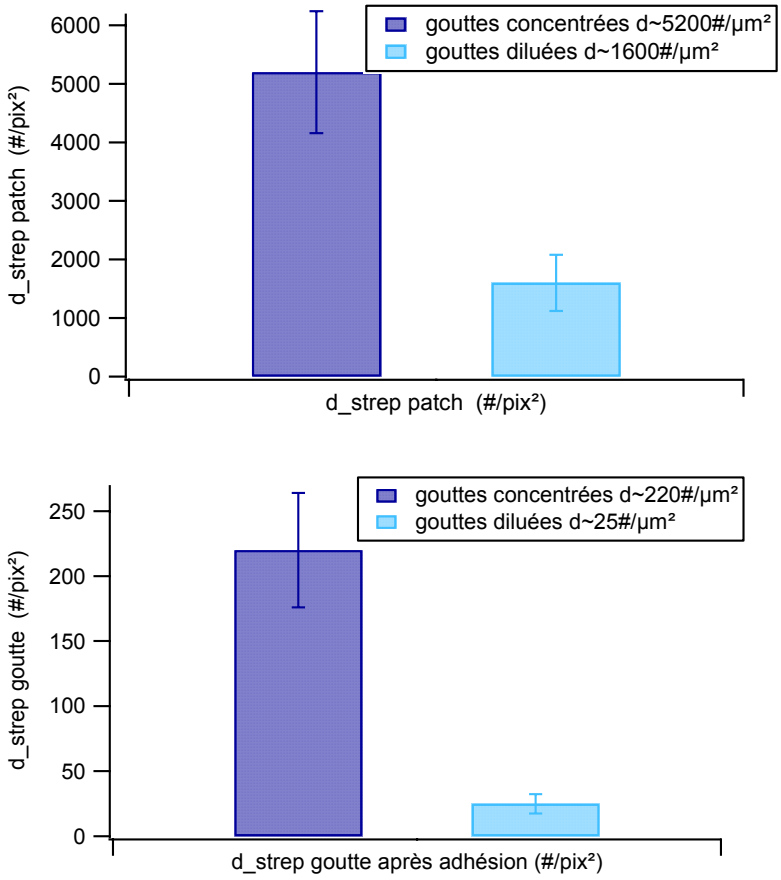



Figure 13 : Dans la situation d'équilibre après l'adhésion, en haut, concentration de streptavidine dans le patch. En bas, concentration en streptavidine restant sur la goutte.

En renormalisant, les valeurs par rapport à la valeur des gouttes concentrées, on peut tracer les proportions de streptavidine avant l'adhésion, puis après l'adhésion, sur la goutte et dans le patch.

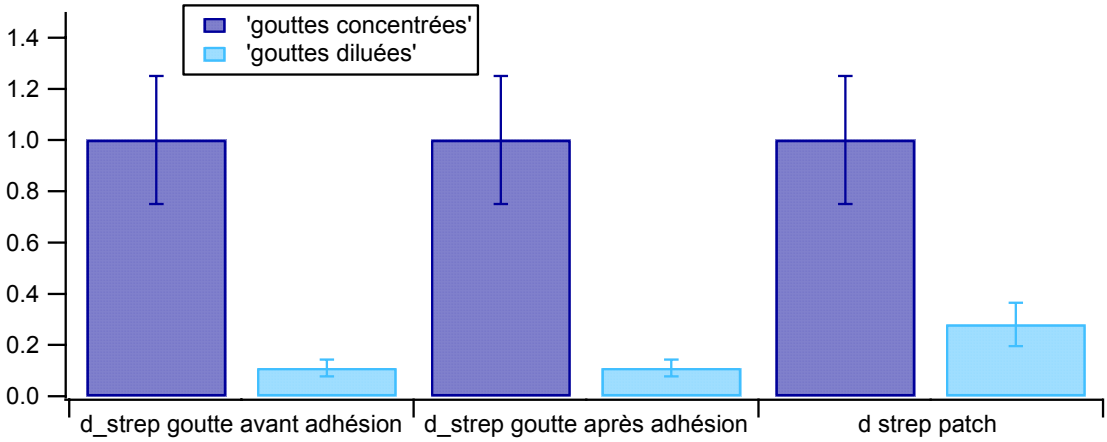



Figure 14 : Données renormalisées par rapport aux concentrations des gouttes concentrées. On constate que la proportion de streptavidine initiale entre gouttes concentrées et diluées se conserve dans le patch et sur la goutte dans la réaction.

Ces mesures montrent que la concentration finale en streptavidine dans le patch semble dépendre de la concentration initiale sur les gouttes. Il apparaît que plus la concentration initiale en steptavidine sur les gouttes est grande, plus la densité de streptavidine dans le patch est grande.
Mieux, il semble que la déplétion des gouttes entre l'état initial et l'état final soit comparable entre les expériences (concentrée et diluée). La même proportion de streptavidine va être recrutée dans les deux séries d'expérience.
En revanche, la densité de liens dans la zone de contact est proportionnellement plus grande dans le cas des gouttes diluées. Cet effet est dû à la différence de taille significative entre les zones de contact. Dans le cas concentré, le patch a une surface près de 3 fois plus grande que dans le cas dilué. Le nombre de streptavidines recrutées dans le patch suit donc la proportion des streptavidines initiales (ratio 1/10 entre gouttes diluées et concentrées) mais la surface sur laquelle sont réparties ces streptavidines recrutées, soumise à la pression osmotique des nomnresus streptavidines devient plus grande. La densité apparente dans le cas concentrée est donc plus faible.

Si l'on suppose que toutes les streptavidines dans le patch sont liées et que la densité de streptavidine libre et de l'ordre de la densité de streptavidine sur la goutte, on peut calculer les 'constantes' de dissociation dans les deux cas envisagés (on conserve l'hypothèse que la concentration en biotine reste constatne au cours de l'expérience et environ égale à 1000#/µm².
Dans le cas dilué, on trouve,
$Kd \sim 15\#/\mu m^2$.
Dans le cas concentré :
$Kd \sim 40\#/\mu m^2$.

Compte tenu de la surface variable de la zone de contact, le Kd défini habituellement n'est plus une constante et varie avec la surface de contact. Plus précisément, plus la densité de streptavidine initiale est grande, plus la 'constante' de dissociation augmente, signe qu'on forme moins de liens par rapport aux conditions initiales.

Sur le graphe suivant, j'ai reporté cette tendance. On voit que lorsque la densité initiale de streptavidine augmente, vient un moment la densité de streptavidine sature. On entre dans un domaine dense en streptavidine où il coûte cher en énergie de venir ajouter des streptavidines. Les interactions latérales deviennent grandes.

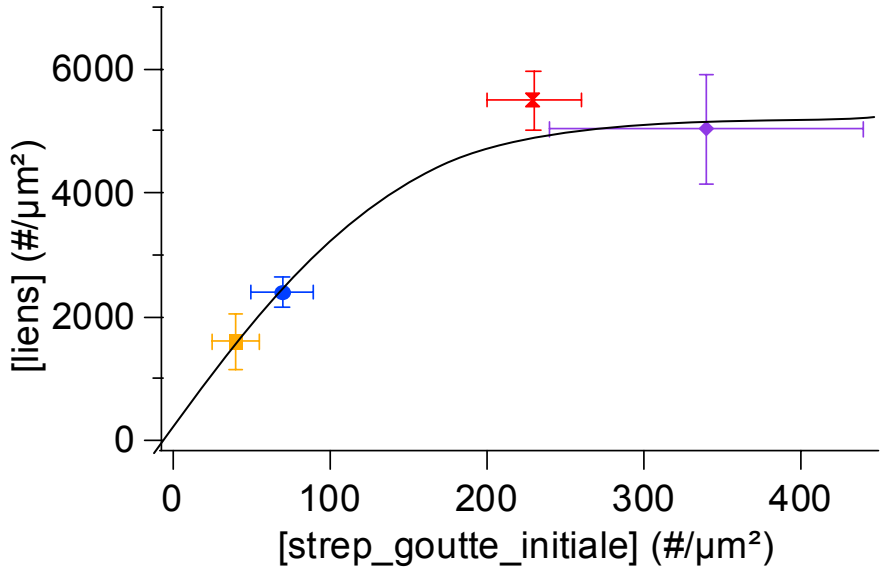



Figure 15 : Evolution de la densité de streptavidine dans le patch en fonction de la densité de streptavidine initiale sur les gouttes. Lorsque les densités de streptavidine initiales de streptavidine augmentent sur les gouttes, la densité de streptavidine dans le patch sature. Même si la quantité de streptavidine initialement présente sur les gouttes augmente, il devient trop cher en énergie de faire entrer des liens dans la zone de contact. La courbe de fit n'est pas analytique.

.

III-6 : Discussion autour des résultats expérimentaux :

Nous avons jusqu'à maintenant décrit sans rentrer dans les détails les observations et les mesures expérimentales que nous avons pu mener sur l'adhésion spécifique de nos gouttelettes.
Nous allons maintenant confronter ces mesures aux théories notamment les modèles thermodynamiques.
Nous avons utilisé au cours de ce travail le couple biotine/streptavidine en particulier pour sa très forte affinité qui nous approche de cas formels assez pratique.
En volume, l'énergie d'interaction du couple biotine/streptavidine est de l'ordre de 35 kT. La constante de dissociation du couple est de l'ordre de Kd~10^-14.
Les modèles thermodynamiques de l'adhésion spécifique prévoient deux cas extrêmes. Dans l'approximation des régimes dilués, on peut écrire l'énergie d'adhésion des gouttelettes :

$$E_{adhésion} = \gamma(1-\cos\theta) = kT * [liens].$$

Dans le régime dense. où les effets entropiques ne peuvent se manifester et où la fluidité des surfaces ne joue plus de rôle prépondérant, l'énergie d'adhésion s'écrit alors :

$$E_{adhésion} = \gamma(1-\cos\theta) = U_{lien} * [liens].$$

Nous utilisons expérimentalement des gouttelettes et des bicouches sur lesquelles, initialement nos ligands conservent une fluidité et ne sont pas denses. Dans cette situation, lorsque les gouttelettes adhèrent sur les bicouches, nous avons été capables de relier expérimentalement la déformation des gouttelettes à la densité de liens. Notre mesure nous a

permis de tracer une loi : $\cos\theta = 1 - \frac{E}{\gamma}[Liens]$ et d'estimer E à 40+/10kT. Cette valeur est proche de l'énergie du couple biotine/streptavidine en volume. Notre situation expérimentale semble donc s'approcher du cas dense décrit pas de Gennes et al. Dans ce cas, on pourrait alors s'attendre à ce que les streptavidines soient recrutées dans la zone de contact jusqu'à ce qu'elles forment une monocouche quasi-compacte de streptavidine.
Visiblement ce n'est pas le cas dans nos expériences. D'une part, les concentrations de streptavidine mesurées dans la zone de contact varient de presque un ordre de grandeur entre les situations les plus diluées et les situations les plus concentrées. Toutefois, il est toujours possibles de tracer la loi $\cos\theta = 1 - \frac{E}{\gamma}[Liens]$ avec E~40kT. Nous ne sommes donc pas dans une situation dense au moins dans les régimes les plus dilués. Par ailleurs, avec une énergie d'interaction de l'ordre de 40kT, des couples biotine/streptavidine devraient pouvoir se former jusqu'à ce que la surface de la goutte soit presque déplétée en streptavidine.
Or ceci n'est visiblement pas le cas. Dans toutes nos expériences, le recrutement de streptavidine dans la zone de contact s'arrête bien avant que les gouttes soient déplétées.

Nous n'avons expérimentalement, ni une monocouche dense dans la zone de contact, ni une déplétion des ligands en surface des gouttes.
Les modèles présentés jusque là ne suffisent pas pour expliquer notre situation expérimentale.

Nous avons pensé que ce faible recrutement était dû à une mise sous tension des liens. Comme nous l'avons vu, mettre un lien spécifique sous tension a pour effet de diminuer exponentiellement son temps de vie. Si les couples biotine/streptavidine étaient vraiment étirés, les énergies d'interaction pourrait être fortement diminuée et la réaction biotine/streptavidine moins efficace que prévue.
Nous avons donc utilisé des biotines reliées aux bicouches lipidiques par l'intermédiaire d'un spacer PEG de 15nm. Ceci devait avoir pour effet de réduire la tension imposée sur les liens.
En menant à bien cette expérience, nous n'avons observé que de faibles différences entre les deux situation (avec au sans spacer)

Sur le graphe de la figure suivante, j'ai représenté l'adhésion sur des bicouches normales comparée à l'adhésion sur des biotines séparées des bicouches par des PEG. Sur les icouches 'normales', la biotine est séparée de la bicouche par un petit linker de l'ordre de 2nm tandis que le PEG étiré mesure 15 nm.

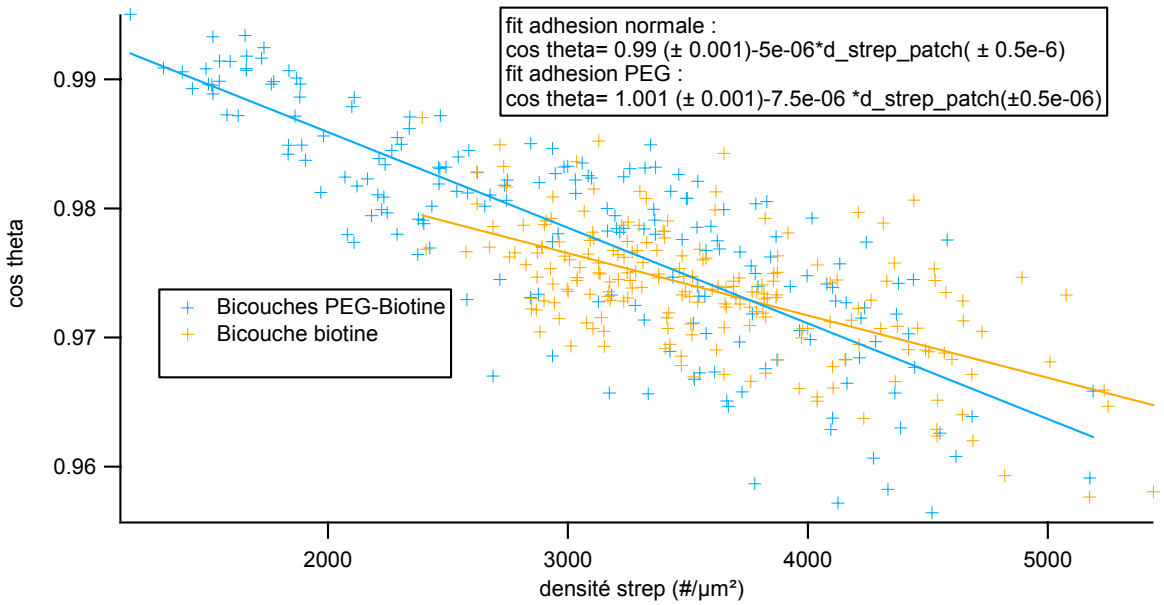



Figure 16 : effet de l'introduction d'un spacer entre bicouche et les biotines sur l'adhésion des gouttelettes.

Une légère différence apparaît dans les pentes des deux graphes. Les gouttes collant sur des bicouches PEG collent un peu mieux que les gouttes collant sur des bicouches normales. Toutefois, ces différences restent minimes et il reste toujours une grande quantité de streptavidines libres sur les gouttes.
Le faible recrutement des streptavidines ne semble pas lié à la longueur des liens entre les protéines et les surfaces qui les portent.

En toute fin de thèse, nous avons pensé à une représentation des résultats expérimentaux qui permet une meilleure compréhension. Plutôt que de tracer le cosinus de l'angle de contact en fonction de la densité de liens, nous avons tracé l'énergie d'adhésion spécifique $E_{adhésion_spé} = \gamma(1-\cos\theta_{spé+non_spé}) - \gamma(1-\cos\theta_{non_spé}) = \gamma(\cos\theta_{non_spé} - \cos\theta_{spé+non_spé})$ en fonction de la densité de liens dans le patch. Cette énergie d'adhésion ne tient pas compte des effets d'adhésion et de recrutement non-spécifique. Elle représente la pression d'étalement de la zone de contact ou pression de film liée à la création de liens dans la zone de contact.
Ce graphe est représenté sur la figure suivante.

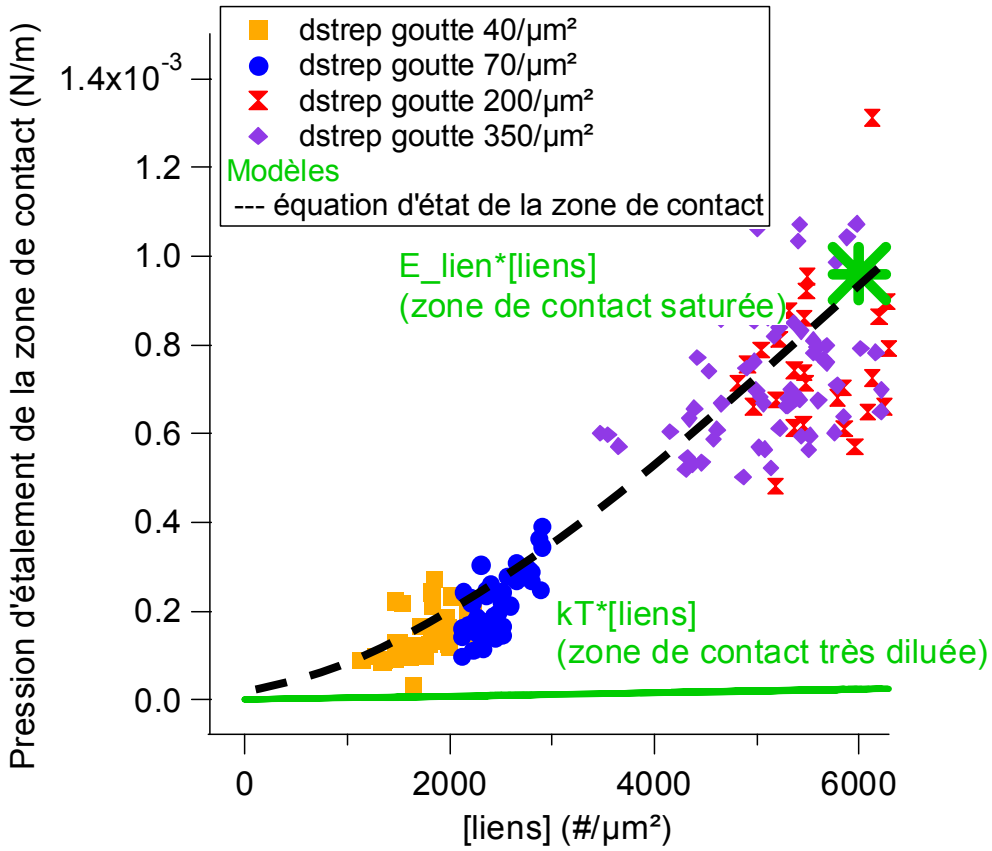



Figure 17 : Mesure de la pression d'étalement liée à la création de liens de la zone de contact en fonction de la concentration en liens. Les effets non-spécifiques ont été retranchés. En vert sont représentés les modèles théoriques déjà établis : la situation de Bell (zone de contact diluée) où la pression d'étalement et proportionnelle à l'énergie thermique et le cas d'une zone de contact 'saturée' : à ce point, réduire la taille de la zone de contact à nombre de liens constants est impossible. Pour réduire la raille de la zone de contact, il faut casser des liens.
Ce graphe expérimental fait le lien entre les deux modèles. Il apparaît dans la situation de 'saturation' que la pression d'étalement est proportionnelle à l'énergie du lien biotine/streptavidine. Cette saturation où les effets de compressibilité deviennent énergétiquement de l'ordre de l'énergie d'un lien advient à des densités en steptavidine de l'ordre de 6000#/µm² (on peut noter que les densités d'une monocouche cristalline de streptavidine sont de l'ordre de ~40 000#/µm²). Lorsque la concentration en liens diminue, la pression d'étalement n'est plus proportionnelle à l'énergie d'un lien mais est dans une situation intermédiaire entre les deux modèles. Ce graphe est une mesure expérimentale de l'équation d'état d'un film adhésif. Il mesure les effets de compressibilité des protéines dans le film adhésif.

Ce graphe est une mesure de l'équation d'état de la zone de contact. Il fait le lien entre les deux modèles connus de la situation diluée décrite par Bell et d'une situation dense (décrite par de Gennes). Nous pensons que cette équation d'état reflète les énergies liées à la compressibilité des protéines dans la zone de contact. Cette compressibilité peut avoir une origine entropique (perte de degrés de liberté du sandwich biotine-streptavidine-biotine) mais aussi une origine enthalpique. Ces détails n'ont pas été explorés au cours de cette thèse.
Des travaux sont en cours pour développer un modèle thermodynamique qui modéliserait cet effet.

Pour parachever notre étude, nous avons étudié la cinétique de croissance de la zone de contact. Les résultats sont présentés dans le paragraphe suivant.

III-7 : Cinétique d'étalement des gouttelettes :

Pour observer la cinétique d'étalement des gouttelettes, nous avons monté une expérience de RICM. Grâce à nos chambres à flux, on peut injecter les gouttelettes une fois la lamelle correctement placée sous l'objectif et ainsi observer la cinétique de croissance de la zone de contact entre gouttelette et bicouche supportée.
Nous mesurons donc le diamètre de la zone de contact au cours du temps.
Une telle mesure est donnée dans la figure suivante.

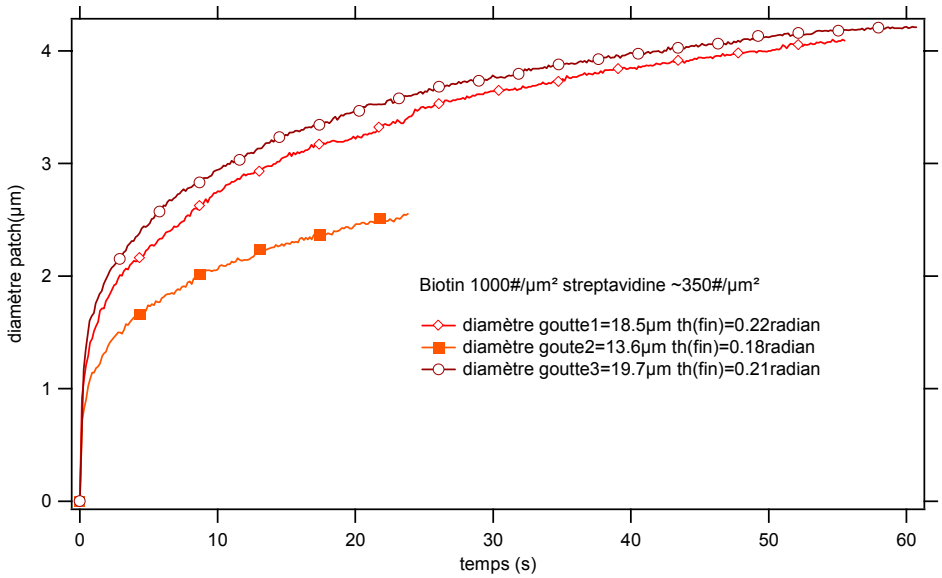



Figure 18 : Cinétique de croissance des patches adhésifs lors de l'adhésion des gouttelettes. La cinétique de croissance du patch dépend visiblement de la taille des gouttes.

Une première observation est que la phénomène d'adhésion est rapide. Nos observations que nous qualifions de statique étaient prises au bout de 20 minutes d'attente. Sur le graphe ci-dessus, on voit que au bout de 30 secondes la croissance des patches ralentit. Il est légitime de penser que l'équilibre est atteint au bout de 20 minutes.
A la vue de ces courbes, nous avons voulu comparer les temps observés au temps caractéristique de diffusion sur les gouttes. Si l'on considère une goutte de rayon 10µm et un

coefficient de diffusion de 3µm²/s, un temps caractéristique de diffusion est τ=R²/D=30s. Nos phénomènes se passent typiquement dans cette gamme de temps et on a donc de bonnes raisons de penser que notre cinétique est principalement de nature diffusive.

Nous avons donc tenté de renormaliser nos courbes par des grandeurs caratéristiques de la diffusion. Naturellement, nous avons renormalisé le diamètre des patches par le diamètre des gouttes et nous avons renormalisé le temps par le temps caractéristique de diffusion d'une streptavidine sur la goutte en l'occurrence : $\tau = \frac{R^2}{D}$.

Ici, R est le rayon de la goutte qu'on suppose quasi –constant pendant la déformation. D est le coefficient de diffusion des streptavidines sur les gouttes..

En renormalisant de la sorte les courbes, on obtient le graphe suivant :

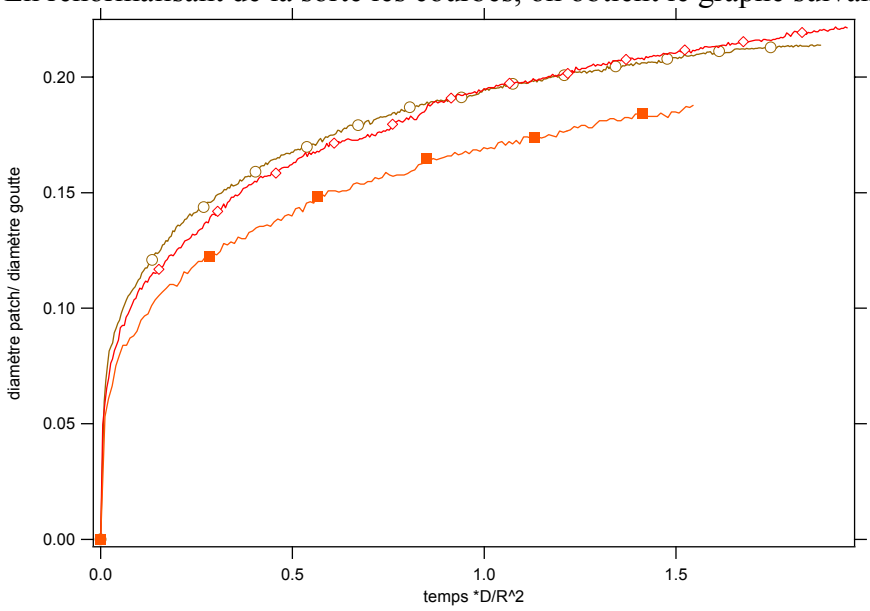



Figure 19 : Tracé renormalisé de la cinétique de croissance des patches adhésifs lors de l'adhésion des gouttelettes. Les courbes se sont rapprochées toutefois elles ne se superposent pas complètement.

Cette renormalisation ne suffit visiblement pas à superposer complètement les deux courbes mais permet déjà de les rapprocher..

Nous avons essayé de fitter ces courbes en particulier avec des lois de puissance. En pensant à un phénomène diffusif, on pourrait s'attendre à une loi en t^0.5. Le tracé log-log de nos lois de croissance nous force de constater que la loi de puissance obéit à une puissance de l'ordre de 0.24 et ce de façon assez généralisée.

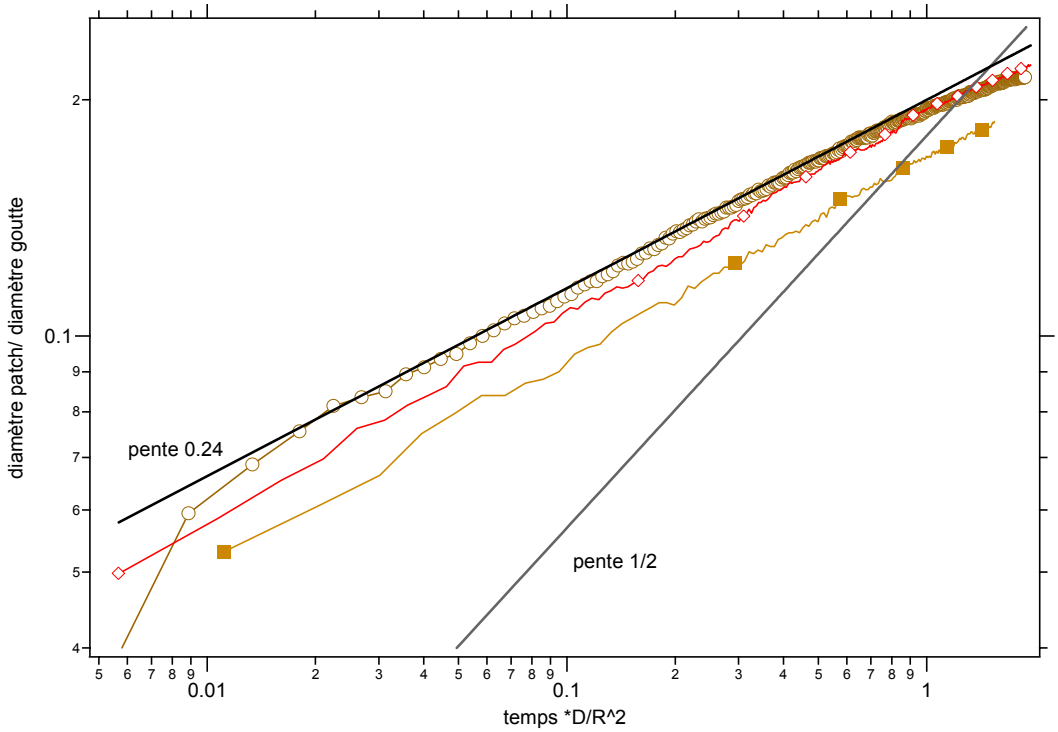



Figure 20 : Tracé renormalisé de la cinétique de croissance des patches sur des axes logarithmiques. La loi de puissance marche bien pour fitter les courbes. La puissance de la loi est cependant plus petite que 0.5. On trouve plutôt R(t)~t^0.24

Cette puissance ¼ a déjà été proposée dans un modèle théorique de F.Brochard-Wyart et al. (PNAS 2002 [4]).
On fait l'hypothèse d'un régime purement diffusif. A chaque instant la réaction dans le patch est à l'équilibre. On va donc employer l'expression à l'équilibre qui relie la déformation de la goutte et la concentration en liens
Nous avons vu qu'on peut approcher nos données par une loi :
$\gamma(1-\cos\theta) = E[Liens]$.

Aux petits angles, on a donc : $\frac{\theta^2}{2} = \frac{E}{\gamma}[Liens]$.

En régime purement diffusif, la surface sur laquelle sont recrutés les ligands au cours du temps peut s'écrire : $S = Dt$.
Le nombre de ligands recrutés sur cette surface S est :
$S*[ligands_libres] = Dt[ligands_libres]$

Ces ligands sont recrutés dans le patch à une concentration $[Liens]$.

La conservation du nombre de ligands impose une taille de patch à chaque instant telle que (est le rayon du patch):
$Dt*[ligands_libres] = \pi r^2[Liens]$.

Soit :
$$t = \frac{\pi r^2}{D}\frac{1}{[ligands_libres]}\frac{\gamma}{E}\frac{\theta^2}{2}$$

Aux petits angles, le rayon du patch est environ égal à θR. On obtient finalement une loi temporelle du type :

$$t \sim \frac{1}{DR^2} * \frac{E}{\gamma} \frac{1}{\left[ligands_libres\right]} r^4 .$$

Dans le cas d'un processus diffusif où la zone de contact grandit au cours du temps, on prévoit donc une loi de croissance du rayon en t^1/4. Cette puissance est très proche des 0.24 que nous trouvons dans nos expériences, signe que notre processus est fondamentalement diffusif.

Il est intéressant de remarquer que nos courbes commencent à s'écarter de la loi en t^1/4 lorsque le temps renormalisé dépasse 1. On rentre alors dans un nouveau régime où il faut prendre en compte des effets de surface finie. Ce calcul a été mené à bien par Lee et al. (Langmuir 2008 [5]) dans le cas d'un patch de taille constante. Pour expliquer nos observations, il faudrait inclure l'effet important de taille de patch variable au cours du temps.

Des comparaisons entre cinétiques d'adhésion sur des gouttes portant des concentrations différentes en streptavidine montrent qu'une densité initiale élevée en streptavidine entraîne des croissances plus rapides que pour des gouttelettes plus pauvres en streptavidine. Il semble donc que les densités de ligands aient un rôle sur la cinétique. On peut en fait penser que la croissance du patch est quasistatique. Cette hypothèse est en fait contenue dans le modèle en t^1/4 qui fitte si bien nos données. Dans ce modèle, à chaque instant, on suppose l'équation thermodynamique $\gamma(1-\cos\theta) = \Delta\Pi$ est satisfaite. Dans les travaux de Brochard-Wyart et al les auteurs se placent dans le cas dilué ($\Delta\Pi = kT\left[liens\right]$). Dans notre situation expérimentale, on prendra plutôt la loi $\gamma(1-\cos\theta) = \Delta\Pi$ que nous avons déterminée dans nos mesures en statique.

Ainsi, expériences et modélisation semblent montrer que dans notre situation, la cinétique de croissance du patch est quasistatique où l'équilibre $\gamma(1-\cos\theta) = \Delta\Pi$ est atteint à chaque instant.

Bibliogaphie :


1. Artyukhin, A. and P. Stroeve, *Effects of corrosive chemicals on solid-supported lipid bilayers as measured by surface plasmon resonance.* Ind. Eng. Chem. Res, 2003. **42**(10): p. 2156-2162.
2. Böckmann, R., et al., *Effect of sodium chloride on a lipid bilayer.* Biophysical journal, 2003. **85**(3): p. 1647-1655.
3. Yang, C. and Y. Gu, *Modeling of the Adsorption Kinetics of Surfactants at the Liquid-Fluid Interface of a Pendant Drop.* Langmuir, 2004. **20**(6): p. 2503-2511.
4. Brochard-Wyart, F. and P. De Gennes, *Adhesion induced by mobile binders: dynamics.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(12): p. 7854.
5. Lee, N., et al., *Ligand- Receptor Interactions in Chains of Colloids: When Reactions Are Limited by Rotational Diffusion†.* Langmuir, 2008. **24**(4): p. 1296-1307.

# Conclusion Générale :

Nous avons dans ce travail de thèse étudié l'adhésion spécifique de gouttelettes d'émulsion sur des bicouches lipidiques supportées. Si l'inspiration initiale était l'apparente proximité de la biologie et plus précisément, de l'adhésion cellulaire, ce travail est devenu une approche assez fondamentale de l'interaction entre protéines d'adhésion portées sur des surfaces fluides.
Nous avons donc conçu un système modèle en utilisant des ligands et des récepteur diffusant sur des surfaces en vis à vis. En approchant ces surfaces l'une de l'autre, nous avons pu observer et mener un certain nombre de mesures sur l'adhésion spécifique de ce système modèle.
Nous avons utilisé le couple biotine/streptavidine, couple ligand/récepteur qui a été vastement étudié pour son interaction exceptionnellement forte dans l'ensemble des molécules du vivant. Utiliser ce couple bien connu s'est avéré pratique pour étudier notre système adhésif. D'une part sa robustesse permet de l'utiliser sur des échelles de temps de l'ordre de la durée de nos expériences sans effets indésirables (relargage de la streptavdine depuis les gouttes). De plus bien connaître les caractéristiques de ce couple nous a permis de comparer nos mesures à des valeurs connues (notamment l'énergie du lien biotine/streptavidine).
Outre un couple modèle bien connu, notre approche minimaliste et le savoir-faire du laboratoire nous a conduit a utiliser des gouttelettes d'émulsion. Les gouttelettes sont elles assez facile à décrire et conviennent à cette approche. Leur volume est constant. Leur énergie de surface est simplement calculable à partir de leur tension de surface. Il est ainsi possible d'accéder aisément aux énergies d'adhésion de ces gouttelettes lorsqu'elles adhèrent grâce à l'équation d'Young. Par ailleurs, le fait de pouvoir les produire en grandes quantités nous a permis de mesurer en moyenne leur caractéristiques ainsi que de se servir de leurs légères différences pour observer des tendances locales.
En vis-à-vis des gouttelettes, nous avons déposé des bicouches lipidiques fluides sur des lamelles de verre. Ces bicouches sont le substrat fluide sur lequel adhérent les gouttes. Le fait d'être déposées sur des lamelles de verre nous a permis de mener de multiples observations avec diverses méthodes optiques.
Avec ces matériaux bien décrits, nous avons pu aller explorer expérimentalement l'adhésion spécifique des gouttelettes sur les bicouches.
Lorsque les surfaces des gouttelettes portant les ligands et surface des bicouches portant les récepteurs s'approchent à une distance de quelques nanomètres l'une de l'autre, la réaction entre ligands et récepteurs peut avoir lieu : ligands et récepteurs s'assemblent pour former des couples adhésifs.
La création de liens engendre l'apparition d'une 'zone de contact' où sont confinés les liens.

Nous avons étudié pendant cette thèse l'évolution de cette zone de contact en fonction des quantités initiales de ligands et de récepteurs.
La réaction chimique au sein de la zone de contact a tendance à étendre la zone de contact. Cette pression d'étalement est liée la différence de pression osmotique entre la zone de contact où sont créés les liens et l'extérieur de cette zone où ne diffusent que les ligands libres ou les récepteurs libres.
L'extension de la zone de contact sous l'effet de la réaction chimique est en compétition avec la déformation de la goutte. Pour la goutte, l'extension de la zone de contact s'apparente à une surface libre supplémentaire et a donc un coût associé à sa tension de surface. Ceci est extrêmement pratique expérimentalement. En effet, il est assez simple de mesurer la déformation des gouttes et ainsi d'accéder à l'énergie d'adhésion des gouttelettes grâce à

l'équation d'Young. Dans notre situation les effets non-spécifiques sont faibles et l'énergie d'adhésion est essentiellement due à la pression d'étalement du film adhésif engendrée par la création de liens spécifiques.

Grâce à nos efforts de caractérisation, nous avons pu relier la quantité de streptavidine dans la zone de contact à la pression d'étalement des films adhésifs. Nous avons aussi pu comparer la quantité de streptavidine recrutée dans la zone de contact à la quantité de streptavidine initialement présente sur les gouttelettes. Nous avons donc pu étudier les effets liés au couplage entre réaction biotine/streptavidine et pression d'étalement.
Le principal intérêt de ce travail de thèse est l'observation des effets de compressibilité dans les films adhésifs. La compressibilité des films adhésifs s'apparente au coût énergétique pour faire varier la surface des zones de contact à nombre de liens constant. Cette compressibilité s'apparente aux interactions latérales entre couples 'ligand-récepteur' au sein de la zone de contact.
Ces effets de compressibilité se caractérisent par deux observations. D'une part la compressibilité des films adhésifs est la cause principale de la pression d'étalement des films et donc de la déformation des gouttelettes. Autrement dit, les mesures de déformation des gouttelettes établies à partir de l'équation d'Young-Dupré sont directement reliées à la compressibilité du film adhésif : plus une zone de contact va être étendue, plus la pression au sein du film est grande, plus la compressibilité est grande. Nous avons pu mesurer la dépendance de l'extension des zones de contact et donc la dépendance de la compressibilité des films adhésifs en fonction de la densité de liens dans le film. A faible concentration en liens, il coûte assez peu en énergie pour compacter les liens. Ceci s'apparente à une faible valeur de la compressibilité et donc à une faible pression d'étalement. Lorsque les densités en liens augmente, la compressibilité au sein de la bicouche augmente aussi : il coûte de plus en plus cher en énergie de faire entrer de nouveaux liens. La pression au sein du film adhésif est donc grande et les zones de contact sont grandes. Nous avons ainsi pu tracer expérimentalement l'équation d'état de la zone de contact adhésif entre gouttelettes et bicouches supportées qui reporte la pression dans le film à la densité de liens.

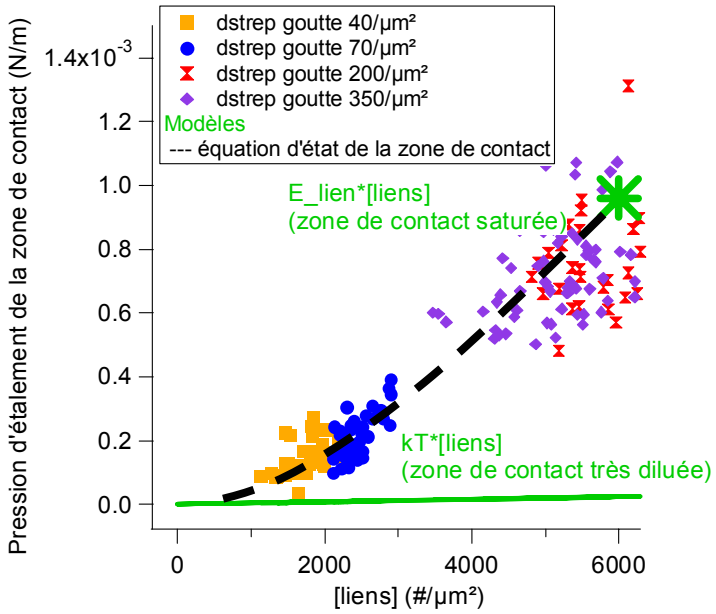



Figure 1 : Mesure de l'équation d'état de la zone de contact entre gouttelette et bicouche : grâce à notre système modèle, on peut relier la pression d'étalement à la densité de liens dans la zone de contact.

Ce graphe expérimental s'approche notamment des deux limites prédites théoriquement : dans le cas d'un film dilué en liens, la pression d'étalement est proportionnelle à l'agitation thermique (prévision de Bell). Ce cas se dessine sur le graphe avec l'aplanissement de la courbe aux faibles concentrations en liens. Lorsque la densité en liens augmente, la pression dans le film augmente jusqu'à ce que la pression d'étalement soit proportionnelle à l'énergie d'un lien. A cette limite, le coût en énergie pour créer un nouveau lien à surface de contact constante (donc pour compresser les liens) est égal à l'énergie d'un lien. C'est une limite de compaction des liens dans la zone de contact. Dans notre cas expérimental, cette densité limite est de l'ordre de 6000#/µm². A cette limite dense, il est impossible de faire diminuer la surface de la zone de contact par simple compaction (c'est-à-dire à nombre de liens constants) : il faut casser des liens.

L'autre effet important que nous avons pu étudier est la répartition des liens, des ligands et des récepteurs à l'équilibre. En effet se pose la question : quelle proportion de ligands libres va être recrutée dans la zone de contact ? Y a-t-il déplétion des streptavidines sur les gouttes ? Nous avons pu observer l'effet des conditions initiales sur le recrutement des liens dans la zone de contact. A faible densité en streptavidine initiale sur les gouttes, la densité de liens recrutés augmente quasi-linéairement puis, lorsque la densité initiale en streptavidine augmente, la densité de liens tend vers un plateau de saturation. L'existence du plateau est bien comprise. En effet, lorsque la pression d'étalement dans le film devient de l'ordre de l'énergie d'un lien, il n'est plus possible de faire entrer de nouvelles streptavidines dans la zone de contact. La densité en liens sature. En revanche, nous n'avons pas encore de bon modèle pour expliquer le recrutement assez lent des streptavidines au début de la courbe. En effet, une observation étonnante est qu'il reste toujours une quantité importante de streptavidines libres sur les gouttes. Le recrutement n'est jamais très fort au point de dépléter les gouttes (et d'engendrer alors des effets entropiques forts). Même à faible concentration initiale en streptavidine sur les gouttes, le nombre de streptavidines recruté dans la zone de contact est de l'ordre de 70% du nombre total de streptavidine. Il reste à comprendre ce faible recrutement et le comparer notamment vis-à-vis des effets de compressibilité du film adhésif.

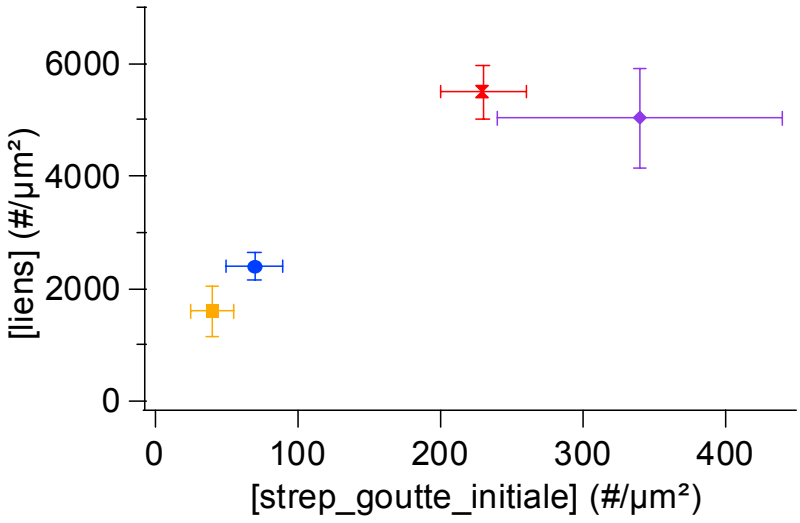



Figure 2 : Effet des quantités initiales sur le recrutement des liens. Après une phase quasi-linéaire, la concentration sature à une densité pour laquelle la pression d'étalement est proportionnelle à l'énergie d'un lien.

Pour conclure, l'utilisation de gouttelettes d'huile dans l'étude de l'adhésion spécifique nous a permis de créer un système modèle bien contrôlé qui nous a permis d'entrer dans des détails nouveaux de l'adhésion spécifique. En particulier, nous avons pu mettre en évidence le rôle de la compressibilité des films adhésifs autrement dit les interactions latérales qui influent grandement sur l'adhésion spécifique.
A la lumière de ces résultats, il sera peut être possible d'apporter de nouveaux éléments de compréhension à des systèmes plus compliqués comme l'adhésion de vésicules sur des bicouches voire l'adhésion de cellules entre elles.