



HAL
open science

Les interactions multivalentes : leurs rôles dans les processus de reconnaissance biomoléculaire et leur application dans la construction d'assemblage supramoléculaire

Marie Françoise Wilczewski

► To cite this version:

Marie Françoise Wilczewski. Les interactions multivalentes : leurs rôles dans les processus de reconnaissance biomoléculaire et leur application dans la construction d'assemblage supramoléculaire. Autre. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00196867

HAL Id: tel-00196867

<https://theses.hal.science/tel-00196867>

Submitted on 13 Dec 2007

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

Présentée par

Marie WILCZEWSKI

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Spécialité : Chimie

Option : Chimie-physique moléculaire et structurale

(arrêtés ministériels du 5 juillet et du 30 mars 1992)

**Les interactions multivalentes :
leurs rôles dans les processus de reconnaissance
biomoléculaire et leur application dans la construction
d'assemblage supramoléculaire**

Thèse soutenue le 9 novembre 2007 devant la commission d'examen :

Pr. A. Brisson	Rapporteur
Pr. P. Schaaf	Rapporteur
Dr. H. Lortat-Jacob	Examineur
Pr. L. Blum	Examineur
Pr. P. Labbé	Directeur de thèse
Dr A. Van Der Heyden	Co-encadrante
Pr. P. Dumy	Membre invité

Thèse préparée au Département de Chimie Moléculaire (UMR CNRS 5250) au sein de
l'équipe Ingénierie et Interaction BioMoléculaire (I2BM),
Université Joseph Fourier de Grenoble

THESE

Présentée par

Marie WILCZEWSKI

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Spécialité : Chimie

Option : Chimie-physique moléculaire et structurale

(arrêtés ministériels du 5 juillet et du 30 mars 1992)

**Les interactions multivalentes :
leurs rôles dans les processus de reconnaissance
biomoléculaire et leur application dans la construction
d'assemblage supramoléculaire**

Thèse soutenue le 9 novembre 2007 devant la commission d'examen :

Pr. A. Brisson	Rapporteur
Pr. P. Schaaf	Rapporteur
Dr. H. Lortat-Jacob	Examineur
Pr. L. Blum	Examineur
Pr. P. Labbé	Directeur de thèse
Dr A. Van Der Heyden	Co-encadrante
Pr. P. Dumy	Membre invité

Thèse préparée au Département de Chimie Moléculaire (UMR CNRS 5250) au sein de
l'équipe Ingénierie et Interaction BioMoléculaire (I2BM),
Université Joseph Fourier de Grenoble

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe Ingénierie et Interaction BioMoléculaire (I₂BM) du Département de Chimie Moléculaire (DCM) UMR CNRS 5250 dirigé par le professeur Pascal Dumy. Je tiens d'ailleurs à remercier Mr Dumy pour m'avoir permis de travailler au sein de son laboratoire dans de très bonnes conditions.

Je remercie Messieurs Alain Brisson, Professeur à l'Université de Bordeaux 1 et Pierre Schaaf, Professeur à l'Institut Charles Sadron de Strasbourg, pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je tiens également à remercier Monsieur Hugues Lortat-Jacob, directeur de recherche à l'Institut de Biologie Structurale pour avoir accepté de présider ce jury, ainsi que pour son aide précieuse concernant mon initiation à la technique SPR. Je remercie également Monsieur Loïc Blum, Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1, pour avoir accepté d'y participer au pied levé.

Mes sincères remerciements vont à « ma » chef, Madame Angéline Van der Heyden, Maître de Conférence à l'Université Joseph Fourier, pour avoir co-encadrée cette thèse. Je la remercie pour toutes les discussions scientifiques et non, sa gentillesse, son énorme disponibilité, son soutien, ses tic-tacs et pour tous ses précieux conseils qui m'ont permis d'acquérir une assurance et une rigueur scientifique.

Mes sincères remerciements vont également à Monsieur Pierre Labbé, Professeur à l'Université Joseph Fourier, pour m'avoir accueillie au sein de son ancienne équipe il y a quatre ans et pour avoir dirigé mes travaux de recherche. Je le remercie pour sa très grande disponibilité, sa rigueur scientifique, pour m'avoir toujours soutenue et aidée à la bonne avancée des études et enfin pour m'avoir permis de découvrir le monde scientifique sur plusieurs continents.

Ces trois années de thèse m'ont donné l'opportunité de travailler avec des personnes très compétentes que je tiens à remercier particulièrement : tout d'abord Mrs Olivier Renaudet et Didier Boturyn (I₂BM), ainsi que Mme Rachel Auzély (CEBMAV) pour la synthèse des composés avec une rapidité et une efficacité sans faille, Mr Jean-Luc Coll (IAB) pour m'avoir fourni les cellules ; et enfin Mmes Anne Imberty et Catherine

Gautier pour leur aide précieuse, leur efficacité, leur gentillesse et leur chaleureux accueil au sein du CERMAV.

Finalement, un grand grand merci à Mr Christophe Quétard de la société GE Healthcare qui m'a offert une opportunité en or pour mon avenir professionnel.

Je remercie également Mme Liliane Guérente, Mr Christophe Bucher, Mr Sébastien Morin et MONSIEUR Bruno Galland pour leur invariable disponibilité et aide toujours avec le sourire, Mr Jean-Claude Moutet pour ses conseils avisés, et Mr Jean-Paul Riboud pour son franc-parler et ses anecdotes cocasses.

Je tiens à remercier également l'ensemble des membres du laboratoire pour leur accueil convivial qui m'a permis de travailler dans des conditions très agréables et particulièrement les secrétaires Sylvie, Marie-Thérèse et Régine pour leur très grande efficacité et leur invariante bonne humeur quelque soit nos demandes.

Et puis qu'auraient été ces trois années sans la petite troupe des joyeux thésards passés et présents, qui sont toujours à l'écoute dans les bons et les mauvais moments... Un très grand merci à Jeannot l'imperturbable toujours prêt pour aller prendre un petit thé... Aurélien (le petit カリ×□ mais quel stripteaseur !!) et Xavier (apporter, amener j'y arriverai un jour !) les messieurs langue française, et Ludivine la fofolle aux habits plus colorés les uns que les autres... Un grand merci ensuite aux plus anciens qui ont fait depuis leur petit bout de chemin : Naoufel avec sa bonne humeur contagieuse, Sophie la rouquine, Marie et Aymeric les futurs parents, Charlitot et ses blagues toujours à point, et Juju à qui j'ai « chipé » le grand Lulu... ; ainsi qu'aux nouveaux arrivés Sophie M. à qui j'espère avoir transmis une partie de mes connaissances, Adriana la danseuse et Jessica la compatriote du sud à qui je souhaite bonne chance pour la suite.

Enfin un énorme merci à mon petit Ludo qui a fait un travail formidable pour la mise en place et le développement des nouveaux appareils, me permettant ainsi une avancée importante pour mes études, et qui, également, a toujours été présent et aux petits soins aux moments où j'en avais le plus besoin et surtout qui a réussi à me supporter durant les derniers mois de cette thèse... Merci mon cœur. Et évidemment je remercie ma grande famille : Lalou, Phéphé, Sissi, Laet et Pierrot mon frère, mes sœurs et ma belle-sœur, mes parents, mon papy Jo et la petite dernière ma nièce Léna.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	- 3 -
CHAPITRE I. ETUDE DES INTERACTIONS BIOMOLECULAIRES	-11-
I. INTRODUCTION	- 11 -
II. L'INTERACTION MONOVALENTE 1:1.....	- 11 -
<i>II.1. Définitions</i>	<i>- 12 -</i>
II.1.1. Les acteurs de l'interaction.....	- 12 -
II.1.2. L'affinité et les constantes cinétiques de l'interaction.....	- 12 -
<i>II.2. L'étude des interactions monovalentes.....</i>	<i>- 13 -</i>
II.2.1. Les isothermes de Langmuir.....	- 13 -
II.2.2. Le modèle cinétique de Langmuir	- 14 -
II.2.2. La linéarisation du modèle de Langmuir (représentation de Scatchard)	- 17 -
III. LES INTERACTIONS MULTIVALENTES : DEFINITION ET CONCEPT	-19-
<i>III.1. Définitions</i>	<i>- 19 -</i>
<i>III.2. Les modèles d'étude de la multivalence.....</i>	<i>- 21 -</i>
III.2.1. La représentation de Scatchard.....	- 21 -
III.2.2. Le modèle multivalente de Scatchard.....	- 22 -
III.2.2.1. Relation linéaire	- 22 -
III.2.2.1. L'équation hyperbolique rectangulaire	- 23 -
III.2.3. Le modèle cinétique de l'analyte bivalent.....	- 24 -
<i>III.2. Les interactions multivalentes dans les processus de reconnaissance cellulaire. -25-</i>	
III.3.1. Les ligands synthétiques multivalents.....	- 26 -
III.3.2. L'étude des interactions multivalentes aux interfaces.....	- 28 -
IV. LA BIO-FONCTIONNALISATION DES SURFACES	- 29 -
<i>IV.1. Nature des surfaces</i>	<i>- 29 -</i>
<i>IV.2. Monocouche auto-assemblée (SAM).....</i>	<i>- 30 -</i>
<i>IV.3. Les bicouches lipidiques supportées (BLS).....</i>	<i>- 30 -</i>
V. LES METHODES D'ETUDE AUX INTERFACES	- 32 -
<i>V.1. Microbalance à quartz avec mesure de la dissipation d'énergie (QCM-D)</i>	<i>- 33 -</i>
III.3.1. Le principe de fonctionnement	- 34 -
III.3.2. La détermination de la masse adsorbée.....	- 35 -
III.3.1. L'eau en QCM-D.....	- 36 -
III.3.2. L'appareillage d'étude.....	- 36 -
V.1.4.1. Les surfaces utilisable	- 36 -
V.1.4.2. Les modes de fonctionnement.....	- 36 -
<i>V.2. Résonance plasmonique de surface</i>	<i>- 38 -</i>

V.2.1. Le principe de fonctionnement	38 -
V.2.2. L'eau en SPR.....	40 -
V.2.3. Les études cinétiques par BIAcore®	40 -
V.2.3.1. Principe	40 -
V.2.3.2. Les différentes surfaces d'étude	42 -
V.2.4. Le transport de matière	43 -
V.3. L'ellipsométrie	43 -
V.3.1. Le principe de fonctionnement	43 -
V.3.2. L'ellipsométrie à annulation.....	45 -
V.3.3. Les modes de fonctionnement de l'appareillage utilisé.....	46 -
VI. CONCLUSION DU CHAPITRE	46 -
CHAPITRE II. INFLUENCE DE LA PRESENTATION MULTIPLE DE SUCRE OFFERTE PAR LES RAFT SUR L'INTERACTION SUCRE- LECTINE	55 -
I. INTRODUCTION	55 -
I.1. Généralités.....	56 -
I.1.1. Les sucres	56 -
I.1.2. Les lectines.....	56 -
I.2. Les interactions sucre-lectine	58 -
I.2.1. L'intérêt biologique.....	58 -
I.2.2. La molécule RAFT.....	60 -
I.2.2.1. Son architecture et ses aptitudes	60 -
I.2.2.2. Sa synthèse.....	61 -
II. L'INTERACTION LECTINE CON A – RAFT-MAN	64 -
II.1. Etude avec la molécule RAFT immobilisée	64 -
II.1.1. Etude par QCM-D.....	64 -
II.1.1.1. Immobilisation de RAFT biotinylés à la surface d'un cristal 2D de streptavidine	65 -
II.1.1.1.1. Formation des vésicules de petite taille (SUV).....	65 -
II.1.1.1.2. Formation de la surface de la BLS.....	67 -
II.1.1.1.3. Formation de la surface 2D de streptavidine	70 -
II.1.1.1.4. Immobilisation des molécules RAFT biotinylés	72 -
II.1.1.1.5. Etude cinétique de l'interaction de la Con A	74 -
II.1.1.2. Immobilisation de RAFT thiol sur une surface d'or.....	78 -
II.1.1.2.1. L'interaction de la lectine Con A avec les surfaces RAFT-Man : résultats expérimentaux	80 -
II.1.1.2.2. Discussion	83 -
II.1.2. Etude de l'interaction Con A/ RAFT-Man par SPR	85 -
II.1.2.1. Greffage des RAFT-Man sur des sensor chip d'or	85 -
II.1.2.2. Couplage affine des RAFT via des ponts biotine-streptavidine sur une sensor chip C1 ..	86 -
II.1.2.2.1. Fonctionnalisation de la surface d'étude.....	86 -
II.1.2.2.2. L'adhésion non spécifique.....	89 -
II.1.2.2.3. Etude cinétique de l'adhésion de la Con A : résultats expérimentaux	89 -
II.1.2.2.4. Discussion	92 -

II.2. Conclusion.....	- 98 -
II.3. Etude par SPR avec la lectine immobilisée.....	- 99 -
II.3.1. Haute densité en lectine Con A	- 101 -
II.3.1.1. Résultats expérimentaux.....	- 102 -
II.3.1.2. Discussion	- 104 -
II.3.2. Faible densité en lectine Con A.....	- 110 -
II.3.2.1. Résultats expérimentaux.....	- 111 -
II.3.2.2. Discussion	- 113 -
II.4. Conclusion.....	- 116 -
III. CONCLUSION DU CHAPITRE.....	- 116 -
CHAPITRE III. LES INTERACTIONS LIGAND PEPTIDIQUE –	
RECEPTEUR CELLULAIRE.....	- 125 -
I. INTRODUCTION	- 125 -
I.1. L'angiogenèse tumorale.....	- 125 -
I.2. Les intégrines.....	- 126 -
I.2.1. Structure.....	- 126 -
I.2.2. Le rôle des cations dans les relations propriété / fonction des intégrines	- 127 -
I.2.3. L'intégrine $\alpha\beta3$ – Fonction.....	- 128 -
I.3. Le motif -RGD- comme marqueur de l'intégrine $\alpha\beta3$	- 128 -
I.4. L'interaction -RGD- / intégrine $\alpha\beta3$ à l'interface solide – liquide	- 129 -
II. ETUDE EN QCM-D : IMMOBILISATION DE LA MOLECULE RAFT...-	130 -
II.1. Etat de l'art : adhésion cellulaire suivie par QCM-D.....	- 131 -
II.2. Préparation des surfaces d'étude	- 132 -
II.2.1. Nettoyage et activation du cristal de quartz recouvert d'or	- 133 -
II.2.2. Optimisation des conditions d'immobilisation	- 133 -
II.2.3. Immobilisation RAFT-(RGD) ₄ et RAFT-(RAD) ₄	- 135 -
II.3. L'adhésion des cellules.....	- 136 -
II.3.1. Résultats expérimentaux	- 136 -
II.3.1.1. Surface RAFT-(RGD) ₄	- 136 -
II.3.1.2. Surface RAFT-(RAD) ₄	- 139 -
II.3.2. Discussion.....	- 140 -
II.4. Conclusion et perspectives	- 143 -
III. INTERACTION RAFT-(RGD) ₄ / INTEGRINE $\alpha\beta3$ – ETUDE PAR SPR	-143-
III.1. Fonctionnalisation de la surface.....	- 144 -
III.1.1. Les intégrines utilisées	- 144 -
III.1.2. Les pistes de référence	- 144 -

III.1.3. Les pistes d'étude	- 145 -
<i>III.2. Tests de viabilité</i>	- 146 -
III.2.1. Test de conformation de l'intégrine : adhésion de l'anticorps LM609	- 146 -
III.2.2. Test de l'activité : adhésion de la vitronectine	- 147 -
<i>III.3. Etude cinétique de l'interaction intégrine $\alpha\beta3$ / ligand -RGD-</i>	- 149 -
III.3.1. Présence d'effet tampon	- 149 -
III.3.2. La piste de référence.....	- 151 -
III.3.3. Tentative d'alourdissement de la molécule RAFT-(RGD) ₄	- 152 -
IV. CONCLUSION DU CHAPITRE	- 152 -
CHAPITRE IV. FILMS MULTICOUCHES BASES SUR DES INTERACTIONS HÔTE-INVITÉ	- 159 -
I. INTRODUCTION : MULTIVALENCE EN MILIEU SUPRAMOLECULAIRE ...	-159-
.....	
<i>I.1. Interaction hôte-invité : études en solution</i>	- 159 -
<i>I.2. Interaction hôte-invité : études aux interfaces</i>	- 161 -
II. LES FILMS MULTICOUCHES AUTO-ASSEMBLES DE BIOPOLYMERES ...	-162-
.....	
<i>II.1. Introduction</i>	- 162 -
<i>II.2. Etat de l'art</i>	- 163 -
II.2.1. Les interactions hôte-invité de la β -cyclodextrine aux interfaces.....	- 163 -
II.2.2. Les films multicouches « hôte-invité » de polymères	- 163 -
<i>II.3. Les molécules d'étude</i>	- 164 -
II.3.1. Les polymères de chitosane	- 164 -
II.3.1.1. Origine.....	- 164 -
II.3.1.2. Les polymères de chitosane modifié utilisés : chit-CD et chit-AD.....	- 165 -
II.3.1.3. Leurs propriétés en milieu aqueux.....	- 165 -
II.3.2. Synthèse de l'adamantane acetamidoethanethiol (AD-SH).....	- 166 -
III. L'AUTO-ASSEMBLAGE COUCHE PAR COUCHE : ETUDE EN QCM-D	- 167 -
.....	
<i>III.1. La fonctionnalisation de la surface, base de l'assemblage</i>	- 167 -
<i>III.2. Résultats expérimentaux</i>	- 168 -
III.2.1. La formation de l'assemblage	- 168 -
III.2.2. Validation de l'interaction hôte-invité comme base de l'assemblage	- 170 -
<i>III.3. Discussion</i>	- 172 -
III.3.1. Assemblage basé sur des interactions hôte-invité	- 172 -

III.3.2. Formation de l'assemblage.....	- 172 -
<i>III.4. La variation de la force ionique</i>	<i>- 174 -</i>
IV. CONCLUSION DU CHAPITRE	- 177 -
CONCLUSION GENERALE	- 183 -
ANNEXES	- 187 -
Annexe 1 : Partie expérimentale	- 189 -
Annexe 2 : Publications.....	- 195 -

Liste des abréviations

AD :	adamantane
BLS :	bicouche lipidique supportée
BSA :	bovin albumin serum
CD :	β -cyclodextrine
Chi², R :	résidus, erreur entre les données expérimentales et les données analysées
Chit :	chitosane
Con A :	concanavaline A
DPPE :	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-Phosphoethanolamine-N-(cap Biotinyl)
DOPS :	Dioléylphosphatidylsérine
EDC :	N-ethyl-N'-(3-diethylaminopropyl) carbodiimide
HEPES :	N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonique acide)
K_A :	constante d'association
k_a :	constante de vitesse d'association
K_D :	constante de dissociation
k_d :	constante de vitesse de dissociation
Lac :	lactose
Man :	mannose
MAP :	Multiple Antigenic Peptide
MAP-(Man)₄ :	plateforme MAP présentant 4 sucres mannoses
NHS :	N-hydroxysuccinimide
PNA :	peanut agglutinin
POPC :	1- palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
QCM-D:	microbalance à cristal de quartz avec suivie de la dissipation
RAFT :	Regioselectively Adressable Functionnalized Template
RAFT-(Lac)_x:	plateforme RAFT présentant x motifs lactose (x = 1 ou 4)
RAFT-(Man)_x:	plateforme RAFT présentant x motifs mannose (x = 1 ou 4)
R_{max} :	quantité maximale d'analyte pouvant être adsorbée sur la surface de ligand
RU :	Réponse Unitaire (unité de résonance en SPR BIAcore [®])
SA :	streptavidine

SAM :	monocouche auto-assemblée
SPR :	résonance plasmonique de surface
SUV :	vésicule de petite taille
TRIS :	alpha, alpha, alpha-Tris-(hydroxyméthyl)-méthylamine
WB :	“working buffer” : tampon d’étude

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

La communication cellulaire est un phénomène essentiel et indispensable à tous les organismes vivants. Les processus de reconnaissance, mis en jeu lors de la communication cellulaire, se font par l'intermédiaire de deux acteurs principaux : le récepteur présent sur la surface des cellules et le ligand qui peut être isolé ou immobilisé sur une autre molécule ou cellule. Les récepteurs présents sur la surface des cellules cibles sont de nature diverse : protéines, oligosaccharides, acides aminés. Ils ont pour rôle de recevoir les informations de l'environnement extracellulaire, puis de les transformer en réponses intracellulaires.

Une bonne communication exige une réponse aux stimuli sensible et précise. Les organismes vivants ont ainsi développé différentes particularités (couplage des récepteurs d'une même fonction à la surface des cellules, présentation de plusieurs sites aux ligands sur un même récepteur) permettant alors une signalisation efficace et sensible ¹⁻⁹. Le concept actuel émergent serait que les récepteurs qui composent ces complexes communiquent les uns avec les autres ⁷, et facilitent ainsi la reconnaissance. Ces modes de fonctionnement des récepteurs tirent ainsi profit des interactions multivalentes, en les utilisant comme un moyen simple et hautement spécifique de communication cellulaire.

Les interactions multivalentes sont alors apparues, aux cours de ces dernières décennies, comme les ingrédients essentiels présents dans la médiation de procédés biologiques. Une compréhension fondamentale de la multivalence et des processus la faisant intervenir est depuis lors devenue primordiale. Afin de mieux comprendre le fonctionnement des procédés biologiques, l'idée actuelle est d'exploiter la multivalence pour reproduire des assemblages ¹⁰ ou des dispositifs ¹¹, analogues à ceux trouvés dans la nature. Les ligands multivalents synthétiques, sont alors apparus comme des outils précis pour la compréhension et la caractérisation des fonctions des récepteurs. En plus de l'utilité de ces agents pour examiner la fonction des récepteurs, les ligands multivalents synthétiques présentent des applications potentielles dans le traitement de maladie. Les applications médicales sont nombreuses et vont du diagnostic via l'utilisation de biocapteurs, à l'imagerie par l'utilisation de sondes biologiques, en passant par la thérapie grâce au ciblage de cellules malignes ou à leur possibilité de pénétration cellulaire. Ainsi, l'étude de la multivalence dans des systèmes modèles artificiels simples, mais riches en information, est bénéfique non seulement pour comprendre le concept de multivalence mais également pour transférer les avancées obtenues dans la science des matériaux ¹². Dans le désir de construire des nanosystèmes de plus en plus

élaborés, la multivalence apparaît alors jouer un rôle significatif en chimie supramoléculaire^{13, 14}, médicinale et des matériaux.

L'objectif de ma thèse est ainsi de développer des outils et des méthodes permettant d'étudier et de quantifier des interactions biomoléculaires mettant en jeu des systèmes de reconnaissance multivalent. L'émergence de nombreuses techniques de caractérisation surfacique, a rendu accessible l'étude de ces interactions aux interfaces via l'immobilisation d'un des deux partenaires. Les études effectuées dans ce manuscrit ont été effectuées grâce à l'utilisation de deux techniques principales de caractérisation complémentaires : la microgravimétrie (QCM-D) et la résonance plasmonique de surface (BIAcore®).

A la vue des diverses applications développées dans ce manuscrit, le premier chapitre ne se présentera pas sous la forme d'une étude bibliographique au sens propre du terme. En effet, dans le cadre de cette thèse, la notion de multivalence a été étudiée via l'utilisation de ligands multivalents synthétiques à la fois dans des processus de reconnaissance biomoléculaire et dans la construction d'assemblage supramoléculaire stimuable. Ainsi, au début de chacun des chapitres sera présenté en introduction le contexte et l'état de l'art de l'étude abordée.

Le chapitre I introduira l'étude des interactions aux interfaces, en donnant les notions et les modèles d'analyse des interactions multivalentes qui vont être le maître mot de l'ensemble de ce manuscrit. Après une présentation des différents moyens de fonctionnalisation de surface par des biomolécules, les différentes techniques de caractérisation de surface utilisées dans nos études seront exposées.

Les chapitres II et III mettront ensuite en pratique, l'utilisation des ligands multivalents synthétiques dans les interactions respectivement sucre-lectine et ligands peptidiques-récepteurs cellulaires. En effet, pour notre étude, nous avons exploité la présentation multiple de ligands grâce à une molécule particulière appelée RAFT (Regioselective Adressable Functionalized Template). Cette molécule se présente comme une plateforme cyclodécapeptidique, qui a la particularité de pouvoir être fonctionnalisée sur ses deux faces de façon indépendante et chimiquement distincte^{15, 16}. Grâce à une méthode d'assemblage séquentiel et régiosélectif, il est possible de fixer sur une face du RAFT un domaine de reconnaissance via l'immobilisation d'une ou quatre biomolécules (sucre ou ligand peptidique) et sur l'autre face un domaine de détection qui va permettre de greffer le RAFT sur une surface (thiol, biotine, amine). Des études préalables effectuées sur cette

molécule RAFT présentant quatre ligands biomoléculaires, ligands -RGD- (-Arg-Gly-Asp-) ou sucres ont permis de mettre en avant le potentiel de cette molécule multivalente comme agent thérapeutique (vecteurs dans le ciblage de la néo-vascularisation, imagerie de tumeurs)^{17, 18} et/ou de signalisation cellulaire (mimes de surface cellulaire, vaccins synthétiques anti-tumoraux)^{19, 20}. Il est notamment clairement établi que la présentation multiple des ligands à la surface des plateformes RAFT permet d'améliorer efficacement leur capacité de reconnaissance du récepteur cible, par rapport au RAFT homologue monovalent. Une meilleure compréhension et une quantification des mécanismes d'interaction mis en jeu s'avère cependant primordiale pour rationaliser le design moléculaire de ces ligands et optimiser leurs propriétés.

Le chapitre II est ainsi dédié à l'étude des interactions sucre-lectine. Une étude préliminaire en anisotropie de fluorescence effectuée en solution¹⁹ a montré la meilleure reconnaissance de la lectine Con A par la molécule RAFT présentant quatre sucres mannoses par rapport à la molécule RAFT n'en présentant qu'un. La preuve de la meilleure association physique des deux partenaires de l'interaction grâce au ligand multiple RAFT étant faite, nous avons exploré, de façon plus quantitative, la force des interactions grâce à la détermination des paramètres cinétiques et thermodynamiques des interactions.

Dans le chapitre III, le ligand synthétique RAFT a été mis à profit dans l'étude des interactions entre des récepteurs cellulaires et des ligands peptidiques. Les études en fluorescence effectuées en 2006^{18, 21} grâce à l'immobilisation d'une sonde fluorescente sur la seconde face de chaque molécule RAFT, ont permis de mettre en évidence l'avantage de cette présentation multiple des ligands -RGD- dans le ciblage de cellules cancéreuses. Dans le but de quantifier ce phénomène, une étude d'adhésion cellulaire a été réalisée sur des surfaces présentant des ligands -RGD-. Ensuite afin d'obtenir une meilleure compréhension du processus de reconnaissance, une analyse cinétique entre le récepteur cellulaire seul, l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, et les ligands -RGD- a également été menée par SPR.

Finalement, le chapitre IV présentera une tout autre application de la multivalence dans le domaine des biomatériaux. Les interactions multivalentes ont été appliquées à la formation d'un assemblage multicouche supramoléculaire de biopolymères. Pour cette étude, des biopolymères de chitosane fonctionnalisés par des cavités cyclodextrine et des entités adamantane ont été utilisés. L'emploi de la technique d'auto-assemblage couche par couche, appliquée aux interactions hôte-invité, nous a ainsi permis d'élaborer un assemblage multicouche de biopolymères sensible à des stimuli extérieurs comme des variations de pH ou des variations de force ionique.

Les différents aspects développés dans cette thèse : la chimie-physique des techniques de fonctionnalisation et de caractérisation des interactions aux interfaces, la biologie des systèmes étudiés et des applications visées, ainsi que l'élaboration de matériaux stimulables, insèrent cette étude dans un réel travail interdisciplinaire.

Références :

- (1) Changeux, J. P.; Thiery, J. P.; Tung, Y.; Kittel, C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1967**, *57*, 335-341.
- (2) Heldin, C.-H. *Cell* **1995**, *80*, 213-223.
- (3) Schlessinger, J. *Trends in Biochemical Sciences* **1988**, *13*, 443-447.
- (4) Klemm, J. D.; Schreiber, S. L.; Crabtree, G. R. *Annual Review of Immunology* **1998**, *16*, 569-592.
- (5) Metzger, H. *Journal of Immunology* **1992**, *149*, 1477-1487.
- (6) Sacchettini, J. C.; Baum, L. G.; Brewer, C. F. *Biochemistry* **2001**, *40*, 3009-3015.
- (7) Smith, F. D.; Scott, J. D. *Current Biology* **2002**, *12*, R32-R40.
- (8) Weiss, A.; Schlessinger, J. *Cell* **1998**, *94*, 277-280.
- (9) Groves, J. T. *Angewandte Chemie, International Edition* **2005**, *44*, 3524-3538.
- (10) Balzani, V.; Credi, A.; Raymo, F. M.; Stoddart, J. F. *Angewandte Chemie, International Edition* **2000**, *39*, 3348-3391.
- (11) Flood, A. H.; Ramirez, R. J. A.; Deng, W.-Q.; Muller, R. P.; Goddard, W. A., III; Stoddart, J. F. *Australian Journal of Chemistry* **2004**, *57*, 301-322.
- (12) Dueren, T.; Sarkisov, L.; Yaghi, O. M.; Snurr, R. Q. *Langmuir* **2004**, *20*, 2683-2689.
- (13) Mammen, M.; Chio, S.-K.; Whitesides, G. M. *Angewandte Chemie, International Edition* **1998**, *37*, 2755-2794.
- (14) Mulder, A.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2004**, *2*, 3409-3424.
- (15) Renaudet, O.; Dumy, P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15*, 3619-3622.
- (16) Garanger, E.; Boturyn, D.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. *Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71*, 2402-2410.
- (17) Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Garanger, E.; Favrot, M.-C.; Dumy, P. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 5730-5739.
- (18) Razkin, J.; Jossierand, V.; Boturyn, D.; Jin, Z.-h.; Dumy, P.; Favrot, M.; Coll, J.-L.; Texier, I. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1069-1072.
- (19) Renaudet, O.; Dumy, P. *Organic Letters* **2003**, *5*, 243-246.
- (20) Grigalevicius, S.; Chierici, S.; Renaudet, O.; Lo-Man, R.; Deriaud, E.; Leclerc, C.; Dumy, P. *Bioconjugate Chemistry* **2005**, *16*, 1149-1159.
- (21) Garanger, E.; Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Favrot, M.-C.; Dumy, P. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, *4*, 1958-1965.

CHAPITRE I

Chapitre I. Etude des interactions biomoléculaires

I. Introduction

Les interactions biomoléculaires sont à l'origine de la plupart des processus de reconnaissance cellulaire. Ce mode de reconnaissance implique deux partenaires : le récepteur et le ligand, qui présentent entre eux une spécificité de liaison remarquable. L'activation du récepteur par le ligand se traduit, la majeure partie du temps, par une ou plusieurs réponses physiologiques variables selon le type cellulaire et le récepteur mis en jeu.

Ces interactions biomoléculaires se font la plupart du temps par l'intermédiaire non pas d'une interaction monovalente, c'est-à-dire ne faisant intervenir la liaison d'un seul récepteur et d'un seul ligand, mais par l'utilisation d'interactions multivalentes qui permet d'améliorer la spécificité et la force de la liaison entre les deux partenaires. Les protéines, qui font partie des récepteurs de surface des cellules les plus étudiées, sont ainsi connues et analysées pour leur possibilité de liaison multivalente avec leurs ligands. En effet, ces dernières se présentent la majorité du temps sous la forme de multimère, c'est-à-dire qu'elles exhibent plusieurs sites de reconnaissance identiques au même ligand, leur permettant de s'impliquer dans des interactions multivalentes plus fortes et de haute spécificité.

Dans le but de mieux comprendre la notion d'interactions multivalentes, pilier central de ce manuscrit, nous allons au préalable introduire les notions et les définitions ayant trait à une interaction simple monovalente. Une fois le modèle simple monovalent établi, nous allons nous intéresser plus précisément à l'étude des interactions multivalentes et des modèles existants pour les identifier et les étudier. Nos études s'effectuant via l'immobilisation d'un des deux partenaires biomoléculaires, nous développerons, ensuite, les différentes méthodes de bio – fonctionnalisation de surface. Nous terminerons par la présentation des différentes techniques de caractérisation de surface dont nous nous sommes servis dans le cadre de ce manuscrit.

II. L'interaction monovalente 1:1

L'interaction la plus simple qu'il puisse y avoir entre deux partenaires présentant un site de reconnaissance spécifique l'un avec l'autre est une interaction monovalente de type 1:1.

II.1. Définitions

II.1.1 Les acteurs de l'interaction

Il est commun de penser la reconnaissance moléculaire en terme de deux composantes. Il apparaît donc essentiel, pour une bonne compréhension de notre étude, de les définir. Dans la littérature, on retrouve en effet différents termes associés en fonction du domaine d'étude concerné. Ainsi, en biochimie, on parlera d'un récepteur protéinique et d'une espèce reconnaissant le récepteur pouvant être un ligand, un inhibiteur, un substrat, un épitope, ou d'autres molécules ou portion de molécule dépendante du récepteur. Dans le langage chimique, pour simplifier, le récepteur est la serrure, et le ligand la clef. Lors des études aux interfaces, on parlera de ligand pour l'entité immobilisée et d'analyte pour l'entité en solution. Le chapitre IV traitera plus particulièrement d'interactions hydrophobes supramoléculaires mettant en jeu des complexes d'inclusion. Les acteurs de l'interaction seront alors définis comme une espèce présentant une cavité hôte dans laquelle va pouvoir s'insérer l'entité invité correspondante.

II.1.2 L'affinité et les constantes cinétiques de l'interaction

Une interaction monovalente décrit la liaison de deux entités A et B de fonctionnalité complémentaire. Les deux entités, une fois liées, forment ce que l'on appelle un complexe monovalent noté AB (Figure 1).

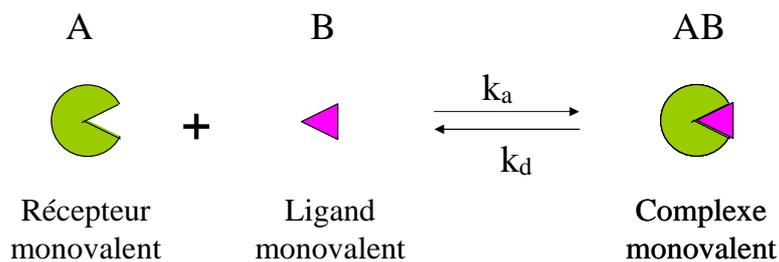


Figure 1: Terminologie des acteurs et vitesses de formation k_a et de dissociation k_d d'une interaction monovalente

La formation d'un complexe monovalent entre deux entités est réversible et se traduit par deux constantes cinétiques : la constante de vitesse de formation du complexe notée k_a et la constante de vitesse de dissociation du complexe notée k_d . Le rapport de ces deux constantes

de vitesse (k_a/k_d) ou (k_d/k_a) fournit respectivement la constante d'association notée K_A et la constante de dissociation K_D du complexe (équation I-1).

$$K_A = \frac{[AB]}{[A].[B]} = \frac{k_a}{k_d} \quad (\text{I-1})$$

Ces deux grandeurs traduisent la force de liaison entre les deux entités. Plus K_A sera grand et inversement plus K_D sera petit et meilleure sera la force de l'interaction. K_A ou K_D est donc une des grandeurs thermodynamiques les plus attendues et importantes pour la quantification des interactions entre partenaires biologiques.

L'affinité est une notion qui intervient systématiquement dès que l'on parle d'interaction. Il faut néanmoins faire attention à la terminologie. Le mot affinité représente le terme qualitatif, la constante d'affinité le terme quantitatif qui, correctement nommé, s'appelle la constante d'association K_A définie ci-dessus. L'affinité se définit comme la force de liaison entre un seul site de liaison de l'analyte et du ligand dans leur forme monovalente.

II.2. L'étude des interactions monovalentes

La caractérisation des interactions monovalentes s'effectue par la détermination de certains paramètres qui permettent de rendre compte des constantes de vitesse de formation de l'interaction (étude cinétique), de la force de l'interaction (K_A) et des mécanismes mis en jeu (étude thermodynamique). Pour ce faire, différents types de modèle existent pour analyser les interactions monovalentes. Avant d'utiliser un quelconque modèle, il est nécessaire de vérifier que le modèle d'analyse est adapté au système d'étude. En effet, quel que soit le modèle utilisé, l'analyse des données expérimentales donnera un résultat. C'est ensuite au scientifique de juger du résultat et de choisir un modèle en adéquation avec l'étude de l'interaction effectuée.

II.2.1 Les isothermes de Langmuir

L'isotherme de Langmuir, développée en 1916 par Irving Langmuir, est une méthode empirique dérivée d'un mécanisme cinétique. Cette méthode ne peut être appliquée que pour des études aux interfaces. L'utilisation d'une isotherme de Langmuir est basée sur quatre hypothèses :

- 1) La surface de l'adsorbant est uniforme, c'est-à-dire que tous les sites d'adsorption sont égaux.
- 2) Les molécules adsorbées n'interagissent pas les unes avec les autres.
- 3) Toute l'adsorption a lieu par le même mécanisme.
- 4) À adsorption maximum, seule une monocouche est formée : il n'y a pas de formation de multicouche.

Comme à l'accoutumée, il est rare que ces quatre points soient vérifiés expérimentalement. En effet, il y a toujours des imperfections sur la surface, le mécanisme n'est clairement pas le même pour les toutes premières molécules que pour les autres. De plus, l'isotherme d'adsorption est le fruit de mesures expérimentales et, en tant que telle, elle n'est pas parfaite : les différents points mesurés sont fonction de l'estimation que l'on aura pu faire de l'équilibre thermodynamique.

Cette méthode consiste à modéliser les points expérimentaux : $\Delta\Gamma$ (masse surfacique de l'analyte à l'équilibre) en fonction de la concentration de l'analyte en solution C , selon une isotherme d'adsorption de Langmuir définie par l'équation (I-2) :

$$\Delta\Gamma = \Delta\Gamma_{\max} \times \frac{K_A \cdot C}{1 + K_A \cdot C} \quad (\text{I-2})$$

Le tracé de ces isothermes d'adsorption de Langmuir va permettre une détermination de la constante d'association de l'interaction : K_A , ainsi que de la quantité maximale d'analyte, $\Delta\Gamma_{\max}$, qui va pouvoir être adsorbée sur les ligands immobilisés.

II.2.2 Le modèle cinétique de Langmuir

Le modèle cinétique de Langmuir consiste en l'analyse des paramètres cinétiques d'une interaction monovalente entre un ligand B immobilisé sur une surface et un analyte A en solution selon un modèle mathématique prédéfini.

Une étude cinétique est effectuée au préalable. Un analyte A est injecté sur une surface fonctionnalisée par des ligands B. Les courbes d'association et de dissociation expérimentales, réalisées pour différentes concentrations en analyte A, sont alors modélisées par un modèle mathématique selon le mécanisme réactionnel de la Figure 1.

Lorsqu'une interaction obéit à un modèle simple de type 1:1, la vitesse de l'interaction en solution est décrite par l'équation (I-3) :

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a[A][B] - k_d[AB] \quad (\text{I-3})$$

Les études cinétiques menées au cours de ce manuscrit ont été réalisées par SPR (BIAcore®). Ainsi l'équation cinétique (I-3) devient en terme de réponse SPR, R (cf ci-après V.2 Résonance plasmonique de surface), l'équation suivante (I-4).

$$\frac{dR}{dt} = k_a C(R_{\max} - R) - k_d R, \text{ soit } \frac{dR}{dt} = k_a C R_{\max} - (k_a C + k_d)R \quad (\text{I-4})$$

où C est la concentration molaire en analyte et R_{\max} la réponse maximale de la surface en RU (cf ci-après V.2 Résonance plasmonique de surface). En effet, le signal de résonance en SPR BIAcore® est exprimé en unités de résonance ou RU.

Différents processus d'analyse des études cinétiques ont ensuite été développés.

- Linéarisation

dR/dt peut être tracé en fonction de R, et la pente de la droite obtenue, k_s (s^{-1}), est égale à $k_a C + k_d$. Un nouveau graphique peut donc être réalisé, en reportant k_s en fonction de C : la pente de la droite est égale à k_a , et l'ordonnée à l'origine à k_d (Figure 2A)). Cette linéarisation des données n'est valable que dans le cas d'interactions simples. Pour les interactions plus complexes, les données transformées ne seront plus linéaires.

- Analytique

Une méthode plus générale, basée sur l'intégration analytique (Figure 2B)) des équations décrivant la variation de la réponse en fonction du temps ¹, a été mise à la disposition des utilisateurs du BIAcore® dès 1993. La constante de vitesse de dissociation, exprimée en s^{-1} , est tout d'abord déterminée grâce à l'équation suivante (I-5) :

$$R_t = R_{t_0} e^{-k_d(t-t_0)} \quad (\text{I-5})$$

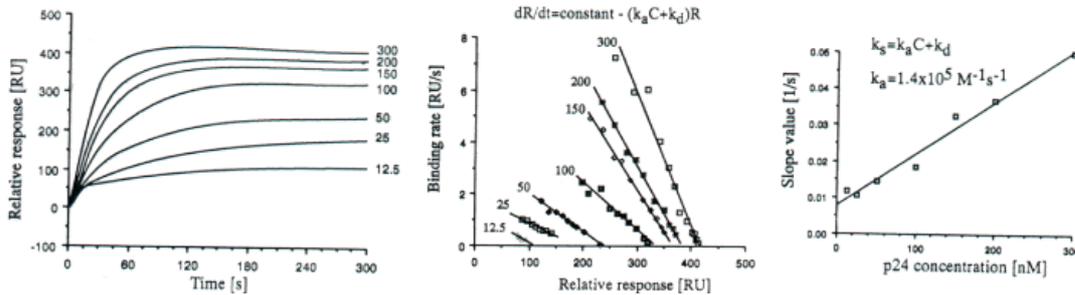
où R_t est la quantité d'analyte A adsorbé sur la surface de ligand B au temps t et R_{t_0} est la quantité à l'équilibre d'analyte A adsorbé.

La constante de vitesse d'association peut ensuite être calculée par le modèle selon l'équation (I-6) :

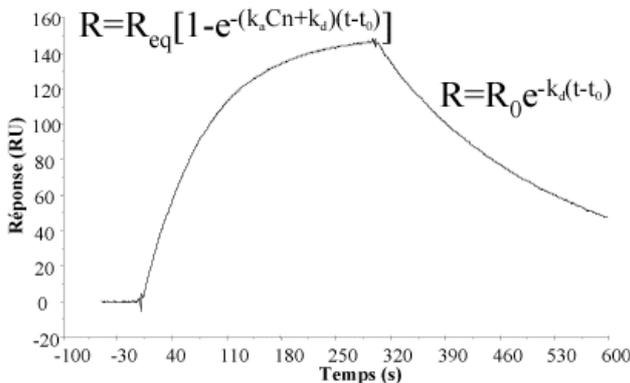
$$R_t = \frac{k_a C R_{\max} (1 - e^{-(k_a C + k_d)t})}{k_a C + k_d} \quad (\text{I-6})$$

où R_{\max} est la quantité maximale à l'équilibre d'analyte A adsorbé et C est la concentration d'analyte en solution. L'association des deux composants est traitée comme la somme de deux événements indépendants, chacun décrit par une équation de la forme précédente.

A) Linéarisation



B) Intégration analytique



C) Intégration numérique

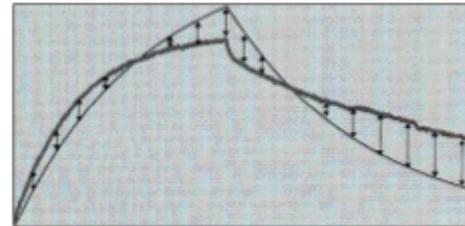


Figure 2: Exemples des différents traitements des données cinétiques par le modèle de Langmuir en SPR A) par linéarisation, B) par intégration analytique et C) par intégration numérique. Les figures sont issues de ² et de la société BIAcore®.

- Intégration numérique

La méthode utilisée dans le logiciel d'évaluation du BIAcore® T100 utilisée au cours de cette thèse est plus récente. Elle s'appuie sur une méthode d'analyse numérique couplée à l'ajustement global des données ³. Ce moyen d'analyse a bénéficié de l'accroissement des puissances de calcul disponibles sur les micro-ordinateurs. Elle est basée sur l'algorithme de Marquardt-Levenberg ⁴ qui ajuste les données calculées et expérimentales en minimisant la somme des résidus au carrés (notée χ^2 , Figure 2C)). Le calcul est réalisé sur l'intégralité du

sensorgramme (c'est-à-dire la courbe d'association et de dissociation de l'analyte) et, si souhaité, sur plusieurs sensorgrammes à la fois. Une seule valeur par paramètre est déterminée pour tout un jeu de sensorgrammes. Cette nouvelle méthode de traitement est plus sensible que les deux précédentes à la qualité des données.

Une fois les deux constantes de vitesse déterminées, le rapport de ces deux dernières, comme cité précédemment, donne la constante d'association et de dissociation du complexe à l'équilibre : $K_A = [AB]/[A] \cdot [B]$ exprimé en M^{-1} et $K_D = 1/K_A = [A] \cdot [B]/[AB]$ exprimé en M .

II.2.3 La linéarisation du modèle de Langmuir (représentation de Scatchard)

Le modèle de Scatchard a été développé en 1949⁵. Ce modèle consiste en une analyse graphique simple des données de liaison d'une interaction entre un ligand immobilisé et un analyte en solution. L'utilisation de la représentation de Scatchard rend alors possible la linéarisation du modèle de Langmuir. En effet, l'équation de Scatchard (I-7) est une fonction linéaire extraite de la relation hyperbolique (I-2) qui permet la simplification de l'analyse des résultats et la détermination rapide des paramètres du système étudié comme K_A et Γ_{\max} . L'avantage de cette procédure est alors de valider l'utilisation du modèle de Langmuir en vérifiant l'accord entre les courbes expérimentales et le modèle mathématique.

L'équation de Scatchard (I-7) est donnée par :

$$\frac{\Gamma}{C} = K_A n - K_A \Gamma \quad \text{(I-7)}$$

où Γ est la quantité d'analyte adsorbé à l'équilibre (en notation SPR, Γ correspond à $R_{\text{éq}}$), C est la concentration en analyte libre à l'équilibre et n est le nombre de sites de liaison par analyte.

La méthode consiste alors à tracer les points correspondant à la variation de (Γ/C) en fonction de Γ (Figure 3). Si ces points forment une droite cela confirme que les données expérimentales correspondent à une interaction monovalente entre l'analyte et le ligand immobilisé.

Si l'interaction est monovalente, les graphes de Scatchard permettent l'obtention de la constante d'affinité (K_A) donnée par l'opposé de la pente et de nK_A qui est donné par l'ordonnée à l'origine.

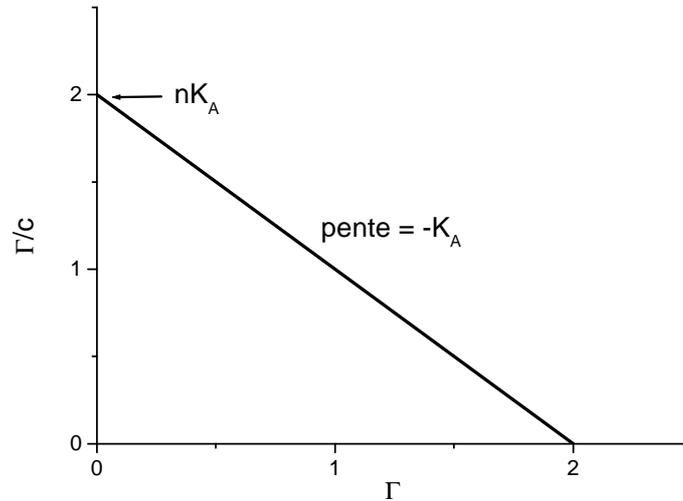


Figure 3 : Graphe de Scatchard obtenu par la linéarisation de l'équation de Langmuir correspondant à l'interaction monovalente d'un ligand avec un analyte.

Le tracé des graphes de Scatchard peut être adapté à l'analyse des données obtenues par SPR⁶, en assimilant Γ à la réponse unitaire obtenue en BIAcore[®] à l'équilibre (notée $R_{\text{éq}}$). L'équation de Scatchard s'écrit alors :

$$\frac{R_{\text{éq}}}{C} = K_A R_{\text{max}} - K_A R_{\text{éq}} \quad (\text{I-8})$$

Dans le cadre de ce manuscrit, l'analyse des données SPR, a systématiquement été faite par le tracé des graphes de Scatchard en utilisant l'équation (I-8).

L'ensemble des méthodes que nous venons de présenter, n'est valable que pour les cas simples d'interactions monovalentes. Cependant, dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à mettre en évidence l'avantage des interactions dites multivalentes dans l'amélioration des processus de reconnaissance cellulaire entre partenaires biologiques. Dans les paragraphes suivants, nous allons définir plus spécifiquement les interactions multivalentes, leurs utilités ainsi que les différents modèles dont nous nous sommes servis pour distinguer et quantifier les phénomènes de multivalence dans des interactions entre partenaires biologiques.

III. Les interactions multivalentes : définition et concept

La multivalence décrit la formation de liaisons multiples de deux (ou plus) entités présentant à leur surface des fonctionnalités complémentaires et multiples (Figure 4). L'effet « glycoside cluster »⁷ se définit comme une amélioration de l'affinité par l'utilisation de ligands multivalents comparé à l'interaction similaire avec leur homologue monovalent. Cette amélioration est supérieure à un simple effet d'augmentation de la concentration. C'est l'exemple de multivalence le plus connu dans les processus biologiques.

III.1. Définitions

La valence des acteurs de l'interaction correspond au nombre de connections séparées d'un même type qui peuvent être formées avec d'autres particules par des interactions ligands – récepteurs. Une lectine qui présente quatre sites de liaison à un sucre sera alors appelée une lectine tétravalente.

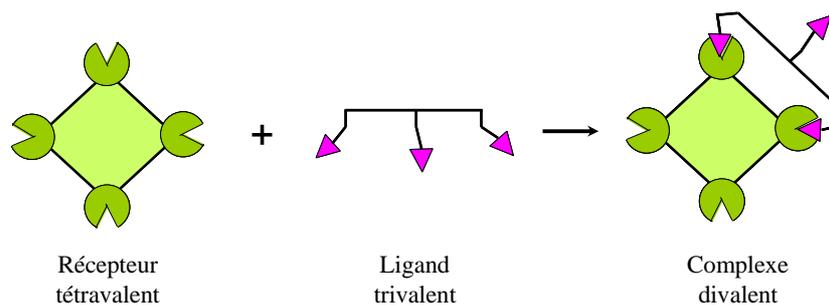


Figure 4 : Terminologie des valences et des acteurs de l'interaction multivalente. Cette figure a été adaptée de⁸.

Le terme d'avidité est fréquemment employé, dès lors que l'on s'intéresse à des interactions multivalentes. Il faut cependant ne pas le confondre avec l'affinité. Par définition, l'avidité, aussi appelée "affinité fonctionnelle", est une mesure de la force de liaison entre l'ensemble des sites de reconnaissance de l'analyte et du ligand dans leurs formes naturelles (*i.e.* qu'ils soient mono ou multivalent). Elle décrit donc plutôt une situation physiologique que théorique ou expérimentale et peut se distinguer clairement de l'affinité.

La concentration effective (C_{eff}) est une notion importante dans la compréhension moléculaire de l'étude des interactions multivalentes⁹. Par définition, elle représente la probabilité d'interaction entre deux entités réactives ou complémentaires et symbolise une concentration « physiquement réelle » d'une des fonctionnalités réactives par rapport à sa contrepartie complémentaire (Figure 5). Cette probabilité d'interaction a été montrée comme

étant dépendante de la longueur du bras espaceur entre les sites de reconnaissance de l'entité réactive et des possibilités conformationnelles qui existent entre elles ¹⁰⁻¹².

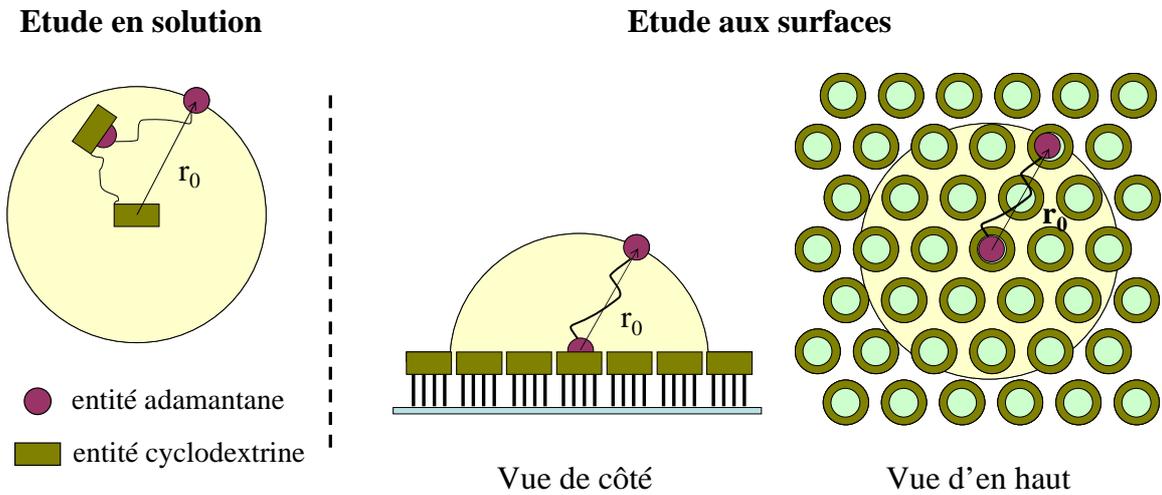


Figure 5 : Représentation schématique du concept de la concentration effective d'une interaction bivalente entre une molécule invitée (bis(adamantyle)) et un dimère de cyclodextrine en solution (gauche) et à une SAM de cyclodextrine (droite). Cette figure a été adaptée de ¹³.

Enfin, une dernière définition importante, que l'on doit introduire pour la suite, est la différence entre des interactions intra et intermoléculaires, mise en évidence par Jencks ¹⁴ en 1981.

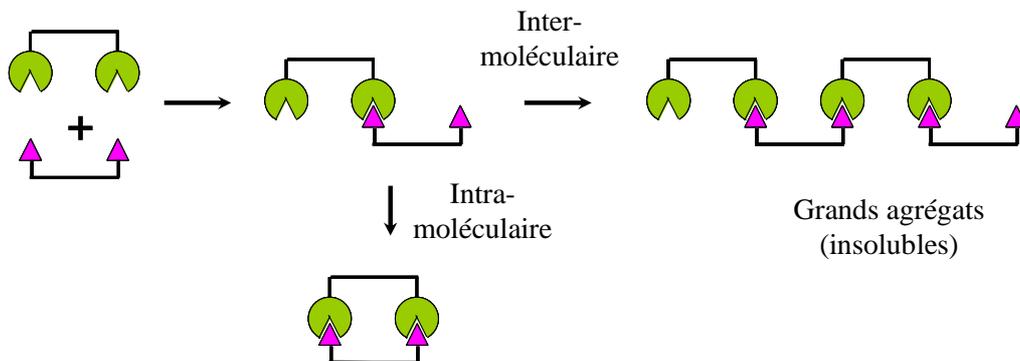


Figure 6 : Comparaison des interactions multivalentes intra et intermoléculaires. Cette figure a été adaptée de ⁸.

Il existe, il est vrai, de nombreuses possibilités d'interactions entre des entités analytes et ligands. En effet, des liaisons multivalentes peuvent avoir lieu intramoléculairement, cas classique qui découle de la définition de la multivalence, mais une interaction intermoléculaire entre deux entités multivalentes est également possible (Figure 6). Alors qu'une interaction multivalente intramoléculaire peut conduire à des structures avec des

géométries et des motifs de liaison définis, les liaisons intermoléculaires conduisent à la formation de grands agrégats (insolubles) et de structures polymériques. Les liaisons ne suivent pas nécessairement un réseau simple : des combinaisons de liaisons intra- et intermoléculaires sont également possibles. Pour atteindre spécifiquement la formation de liaison multivalente, un certain degré de design du système est alors requis. Les aspects les plus importants qui doivent être pris en compte sont l'architecture, taille et forme, des entités multivalentes et la thermodynamique des interactions.

Même si, dans la plupart des études de phénomène de liaison entre partenaires biologiques, les récepteurs présentent plusieurs sites de liaison, les résultats sont classiquement analysés avec un modèle simple d'interaction 1:1^{5, 15}, alors que rien ne le justifie. Une des causes en est peut être l'existence de très peu de modèles d'étude qui permettent de mettre en évidence ou d'analyser des interactions multivalentes. Toutefois, quelques uns sont décrits et ceux qui nous ont servis dans ce manuscrit sont détaillés ci-après.

III.2. Les modèles d'étude de la multivalence

III.2.1 La représentation de Scatchard

Comme on l'a vu pour les interactions 1:1, la représentation de Scatchard est une méthode linéaire simple qui permet d'obtenir les caractéristiques principales (K_D et R_{max}) d'une interaction monovalente. Elle peut également être mise à profit pour mettre en évidence la présence ou non d'interaction monovalente. En effet, l'obtention d'une réponse linéaire traduit la capacité du système étudié à répondre à une interaction de type 1:1. Par contre, l'obtention d'un tracé non linéaire va rendre compte d'une interaction plus complexe (Figure 7). Trois situations différentes peuvent alors être envisagées.

- la présence d'une coopérativité négative, qui correspond à la décroissance de l'affinité avec l'augmentation du nombre de sites occupés
- la présence de ligands hétérogènes
- la présence d'interaction multivalente (graphes concaves de Scatchard) qui se traduit par une augmentation de l'affinité de l'analyte en solution vis-à-vis de la présentation multivalente de ligands immobilisés (effet chélatant de l'analyte).

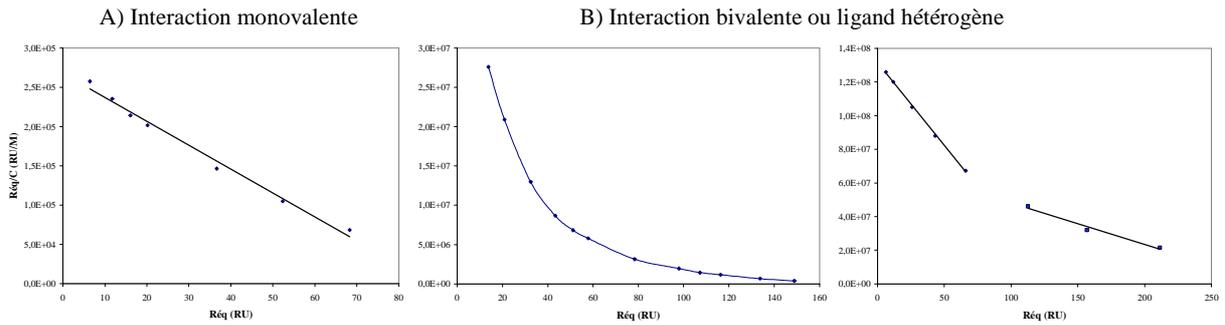


Figure 7 : Présentation des trois différents cas possibles obtenus lors du tracé de la représentation de Scatchard traduisant A) la présence d’une interaction monovalente et B) la présence d’une interaction plus complexe : bivalente, ligand hétérogène.

L’utilisation des graphes de Scatchard va permettre alors facilement de mettre en évidence ou non la présence d’interaction multivalente entre les partenaires de l’étude (Figure 7).

III.2.2 Le modèle multivalent de Scatchard

III.2.2.1. Relation linéaire

Dans les années 1980, D. J. Winzor et al. ont résolu l’analyse des données d’interactions multivalente en proposant l’expression d’une constante intrinsèque de liaison ¹⁶ via le développement ^{17, 18} d’une relation analogue à l’équation de Scatchard ⁵ (équation I-6). Mais cette dernière a été soumise à polémique. En 1995, D. J. Winzor a alors adaptée l’équation traditionnelle de Scatchard à l’étude des interactions multivalentes ¹⁹.

Si on considère la situation où un analyte A, avec f sites de liaison se lie à un ligand B immobilisé et que toutes les réactions entre les sites individuels de A et de B sont gouvernées par une seule constante de liaison intrinsèque ¹⁵, K_{AB} , la quantité d’analyte A immobilisée sur la surface pour un tel système, R_f , s’écrit sous la forme ¹⁸.

$$R_f = (C_A^{*1/f} - C_A^{1/f}) / C_B^* \quad \text{(I-11)}$$

où C_A correspond à la concentration molaire d’analyte libre, c’est-à-dire la concentration en analyte injectée sur la surface, et C_A^* et C_B^* respectivement les concentrations molaires totales (libres et liées) d’analytes et de ligands immobilisés. En tenant compte de la relation (I-11), l’équation de Scatchard correspondant à l’analyse de liaisons multiples indépendantes et équivalentes se transforme en l’expression (I-12)

$$\frac{R_f}{C_A^{1/f}} = K_{AB} - fK_{AB}R_f C_A^{*(f-1)/f} \quad (\text{I-12})$$

où $\frac{R_f}{C_A^{1/f}}$ est l'équivalent de la notation [ligand lié/ ligand libre] de l'équation de Scatchard monovalente ($f = 1$). La représentation linéaire est obtenue en traçant $\frac{R_f}{C_A^{1/f}}$ en fonction de $R_f C_A^{*(f-1)/f}$. La valence de l'interaction peut alors être déduite en traçant des graphes successifs à différentes valeurs de f jusqu'à l'obtention d'un tracé linéaire.

III.2.2.2. L'équation hyperbolique rectangulaire

Une seconde forme alternative du modèle multivalent de Scatchard peut également être utilisée afin de faciliter l'analyse en régression non-linéaire des données expérimentales par des programmes informatiques standard de modélisation des données. L'équation (I-12) peut alors être convertie en une relation hyperbolique rectangulaire^{19, 20} qui décrit la fonction de liaison conventionnelle^{5, 15} pour une concentration libre en ligand.

$$R_f = \frac{K_{AB} C_A^{*(1/f)}}{(1 + fK_{AB} C_A^{*(f-1)/f} C_A^{1/f})} \quad (\text{I-13})$$

En multipliant cette expression par $fC_A^{*(f-1)/f}$ l'expression (I-13) et en remplaçant R_f par sa valeur selon la relation (I-11), on obtient alors l'équation (I-14) suivante :

$$fC_A^{*(f-1)/f} (C_A^{*1/f} - C_A^{1/f}) = \frac{fC_A^{*(f-1)/f} C_B^* K_{AB} C_A^{*(1/f)}}{(1 + fK_{AB} C_A^{*(f-1)/f} C_A^{1/f})} \quad (\text{I-14})$$

Pour des études en SPR utilisant des appareils BIAcore[®], des études de calibration ont permis d'établir une relation linéaire^{20, 21} entre la réponse SPR, R_p , la quantité de protéine liée, w_A , et l'aire de la surface du biocapteur, Δ , selon l'équation (I-15).

$$R_p = \frac{k_p w_A}{\Delta} \quad (\text{I-15})$$

où k_p est une constante de proportion.

La connaissance supplémentaire du volume V en contact avec la surface du biocapteur permet ainsi de déterminer $(C_A^* - C_A)^{20}$ (équation I-16).

$$M_A (C_A^* - C_A) = w_A / V = R_p / k'_p \quad \text{(I-16)}$$

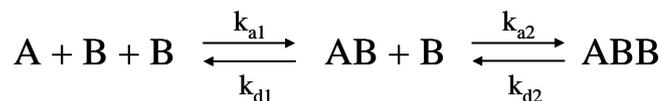
où M_A est la masse molaire de l'analyte A et k'_p est égale à $k_p V / \Delta$.

Pour l'appareil BIAcore® sur lequel nous avons travaillé, $k_p = 0,11 \text{ degré.ng}^{-1}.\text{mm}^{-2}$, $\Delta = 1,1 \text{ mm}^2$ et $V = 40 \text{ nL}$, donc $k'_p = 40\,000 \text{ RU}$ (RU = Réponse Unitaire et un déplacement de 1° de l'angle d'incidence équivaut à une variation de $10\,000 \text{ RU}$, cf section V.2.3 Résonance plasmonique de surface). C_A^* peut alors facilement être extraite des données expérimentales.

L'analyse par régression linéaire de la dépendance de $C_A^{*(f-1)/f} (C_A^{*1/f} - C_A^{1/f})$ en fonction de $f C_A^{*(f-1)/f} C_A^{*1/f}$ selon l'équation (I-13) permet alors la détermination de C_B^* et de la constante d'association intrinsèque de l'interaction multivalente K_{AB} .

III.2.3 Le modèle cinétique de l'analyte bivalent

Concernant, finalement les études possibles au niveau cinétique, nous nous sommes servis d'un modèle d'analyte bivalent mis au point par R. Karlson²². Ce modèle comme son nom l'indique considère une interaction bivalente entre le ligand immobilisé B et un analyte bivalent A en solution (exemple de l'adhésion des anticorps) selon le schéma réactionnel suivant :



où k_{a1} , k_{a2} et k_{d1} , k_{d2} sont respectivement les constantes de vitesse cinétiques d'association et de dissociation des complexes AB et ABB.

L'analyte A va donc pouvoir se lier à deux ligands B selon deux mécanismes de réaction distincts mettant en jeu deux interactions successives. On appellera $K_{A1} = k_{a1}/k_{d1}$ la première constante de d'association correspondant à la formation du complexe AB et $K_{A2} = k_{a2}/k_{d2}$ la constante d'association associée à la formation du second complexe ABB. Les deux sites de liaison de l'analyte sont supposés indépendants et réagiront de manière équivalente avec un ligand B.

Les équations de vitesse exprimées en termes de réponse SPR (R) et utilisées dans l'algorithme du logiciel sont les suivantes :

$$\frac{dR_1}{dt} = k_{a1} C_A \times (R_{\max} - R_1 - 2R_2) - k_{d1} R_1 - k_{a2}^* R_1 \times (R_{\max} - R_1 - 2R_2) + k_{d2} R_2 \quad (\text{I-17})$$

$$\frac{dR_2}{dt} = k_{a2}^* R_1 \times (R_{\max} - R_1 - 2R_2) - k_{d2} R_2 \quad (\text{I-18})$$

$$\frac{dR_3}{dt} = -\frac{dR_1}{dt} \quad (\text{I-19})$$

avec k_{a2}^* la constante de vitesse de la seconde association exprimée en $\text{RU}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, C_A est la concentration en analyte et R_1 , R_2 et R_3 correspondent aux concentrations des espèces AB, ABB et B respectivement.

La seconde constante de vitesse d'association, k_{a2}^* est donnée en $\text{RU}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ car la seconde liaison de l'analyte n'induit pas de changement dans la quantité d'analyte qui adhère sur la surface. Cette valeur ne pourra être transformée en $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ que si un facteur de conversion, c est disponible entre la réponse observée (en RU) et la concentration en analyte (M). Ce facteur c varie avec l'épaisseur et le type de surface utilisée ainsi qu'avec l'indice de réfraction de l'analyte en solution (cf section V.2.3 Les études cinétiques par BIAcore® page - 40 -). Par exemple, c sera égal à $\text{MW} \cdot 100$ pour une chips CM5 dans le cas de l'adhésion de protéines^{21,22}.

III.3. Les interactions multivalentes dans les processus de reconnaissance cellulaire

La capacité des cellules à transmettre des signaux entre elles est un aspect essentiel de toute vie multicellulaire. Des milliers de récepteurs associés aux membranes cellulaires et des molécules de signalisation ont été identifiés par la communauté des biologistes comme des entités permettant la communication entre les cellules. Actuellement, beaucoup d'attention est portée sur la compréhension des interactions chimiques entre les récepteurs et les ligands. En effet, dans de nombreux cas, il a été mis en évidence que les propriétés des événements de liaison monovalente ne permettaient pas d'atteindre le comportement remarquable exhibé par les protéines responsables de la signalisation dans les cellules vivantes.

De nombreuses interrogations subsistent sur le mode de fonctionnement des récepteurs afin de faciliter la transmission des données. Les scientifiques n'ont pas encore établis si les cellules utilisent des microdomaines ou d'autres mécanismes pour organiser et assembler les composants de la signalisation. Cependant, des données en microscopie et en cristallographie aux rayons X ont révélé que les récepteurs à la surface des cellules, pour de nombreuses

classes structurales, s'assemblent en des complexes multirécepteurs²³⁻³². La taille de ces assemblages varie : certains sont composés de deux récepteurs tandis que d'autres en contiennent des milliers. Néanmoins, on sait peu de chose sur la structure de ces assemblages, leur localisation à l'intérieur des cellules et si leur localisation influence la signalisation. Comprendre ces interrogations, pourtant, pourrait conduire à des nouvelles stratégies de traitement thérapeutique par exemple. Une des manières de procéder actuellement est l'utilisation de ligands synthétiques présentant de nombreux motifs identiques de reconnaissance afin de cibler au mieux ces complexes multirécepteurs pour des applications thérapeutiques (Chapitres II et III).

III.3.1 Les ligands synthétiques multivalents

L'utilisation de ligands multivalents synthétiques ou naturels est devenue depuis le début de ce siècle, un précieux atout, car leurs caractéristiques en font à la fois de bons inhibiteurs et de bons effecteurs des processus biologiques³³. La présence de multiples copies de fonction se liant au récepteur, permet aux ligands multivalents de se lier avec une grande affinité et spécificité au récepteur, ce qui en fait de puissants inhibiteurs^{7, 34-40}. De la même manière, les ligands multivalents peuvent être des effecteurs potentiels qui favorisent une réponse biologique spécifique via un signal de transduction^{41, 42}. Ainsi, le potentiel d'un ligand multivalent dépend du mécanisme d'action selon lequel il opère.

Contrairement aux ligands monovalents qui ont accès à un nombre limité de mécanismes de liaison, les ligands multivalents, réciproquement, peuvent interagir avec les récepteurs via de nombreux mécanismes (Figure 8)^{34, 35, 43} qui incluent:

- les effets chélatant (les contacts entre le ligand multivalent et les récepteurs multiples diminuent la vitesse de dissociation et augmente l'affinité, Figure 8 A)
- la stabilisation stérique (la taille des ligands multivalents empêche stériquement d'autres interactions avec les ligands)
- la re-liaison statistique (la re-liaison des ligands multivalents est favorisée par la haute concentration locale des fonctions de liaison, Figure 8 D)
- ou encore le « clustering » de récepteurs^{33, 34} (Figure 8 C)

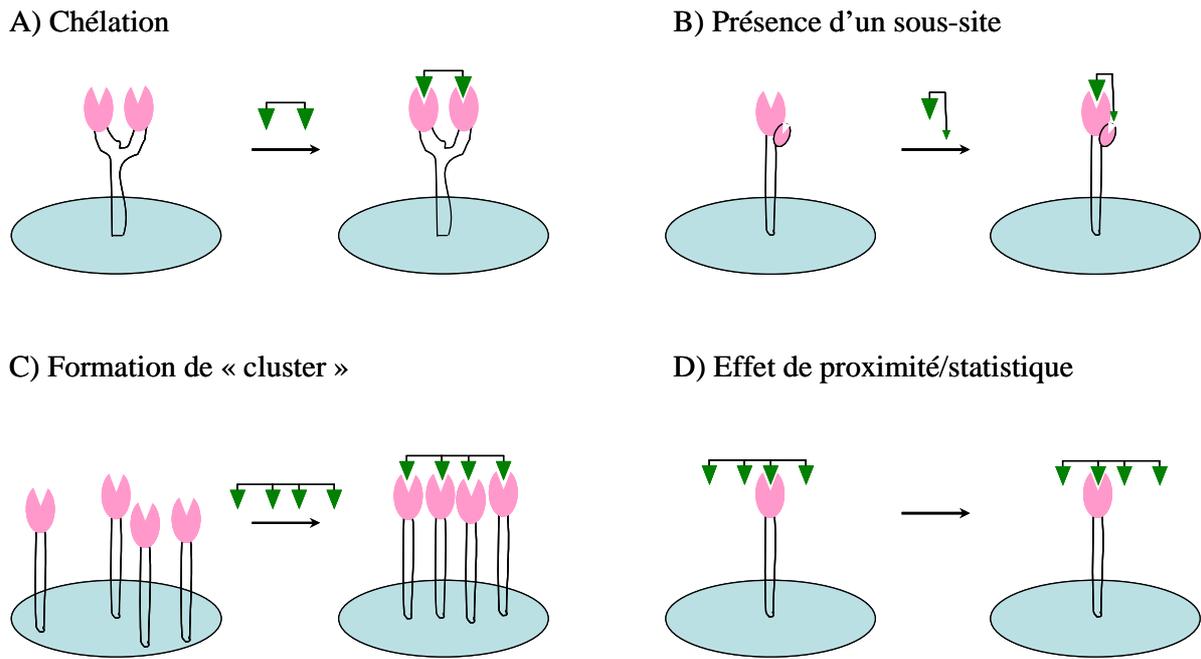


Figure 8: Les différents mécanismes de liaison de ligands multivalents aux récepteurs immobilisés sur une surface.

Ces trois derniers effets s'avèrent particulièrement intéressants notamment pour l'utilisation de ces molécules multivalentes en tant qu'inhibiteur d'interactions non désirées ou néfastes (cellules cancéreuses, virus). Germain *et al.*⁴⁴ ont, par exemple, montré que l'efficacité d'un vaccin multivalent est influencée par sa capacité de rassemblement des récepteurs de surface cellulaire ; et que l'activité d'un inhibiteur des toxines Shiga pentamériques dépend de sa capacité à occuper les sites de liaison multiple^{45, 46}.

Kiessling *et al.*^{43, 47} ont ainsi émis l'hypothèse que comme la complexité structurale des macromolécules multivalentes est plus grande que celle des ligands monovalents, les modes de liaison disponibles du ligand multivalent résultent de son architecture. On trouve alors, dans la littérature, de nombreux exemples de ligands synthétiques multivalents présentant des architectures diverses et variées en fonction de l'application pour laquelle ils sont destinés. On peut citer ainsi parmi ces ligands multivalents, des polymères linéaires et polydisperses^{47, 48}, des dendrimères^{49, 50}, des liposomes polymérisés⁵¹, des échafaudages oligomériques⁵² ou encore plus récemment des glyconanoparticules d'or^{53, 54}.

Pour notre étude, nous avons choisi d'exploiter la présentation multivalente grâce à une molécule particulière appelée RAFT pour Regioselective Adressable Functionalized Template. Cette molécule se présente comme une plateforme cyclodécapeptidique, qui a la particularité de pouvoir être fonctionnalisée sur ses deux faces de façon indépendante et

chimiquement distincte (Figure 9). Ce dispositif structural permet un assemblage séquentiel et régiosélectif d'un côté d'un domaine de reconnaissance grâce à l'immobilisation d'une ou quatre biomolécules sucre (Chapitre II) ou ligand peptidique RGD (Chapitre III) et de l'autre d'un domaine de détection qui va nous permettre de greffer le RAFT sur une surface (thiol, biotine, amine).

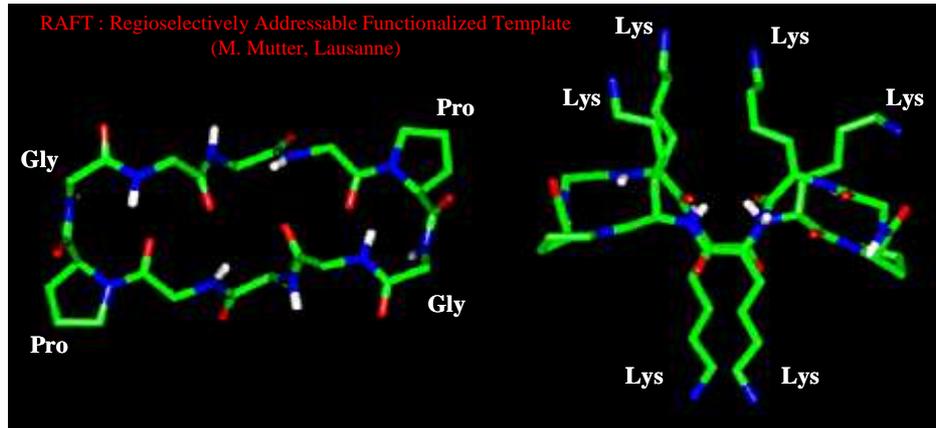


Figure 9 : Représentation modélisée de la molécule RAFT effectuée par M. Mutter (Lausanne).

Ainsi, la multitude d'architectures polyvalentes fait de la multivalence un phénomène très étudié dans de nombreux domaines.

III.3.2 L'étude des interactions multivalentes aux interfaces

Du fait de leur complexité, les interactions multivalentes entre partenaires biologiques ont tout d'abord été étudiées en solution, et ce n'est que récemment que des études aux interfaces ont été développées.

De grandes avancées ont été effectuées concernant les études en solution. Dans ce cas, leur compréhension, essentiellement qualitative, a conduit au design de nouveaux inhibiteurs basés sur la multivalence, par exemple, pour la toxine du choléra et des systèmes analogues^{45, 46, 55-58}. Toutefois, une compréhension quantitative consciencieuse n'a été faite que pour quelques systèmes. C'est le cas notamment pour la liaison multivalente de la toxine du choléra pentavalente grâce à l'utilisation d'un modèle thermodynamique^{59, 60} et pour la caractérisation d'une interaction trivalente entre un peptide trivalent et un dérivé de tris-vancomycine^{61, 62} par des mesures en calorimétrie.

Depuis ces dernières décennies, l'émergence de nombreuses techniques de caractérisation surfacique, a permis de rendre accessible un grand nombre de nouveaux axes de recherche. L'étude aux interfaces est ainsi devenue une nouvelle façon d'analyser la multivalence. Les interfaces d'étude se sont rapidement développées et on retrouve maintenant une gamme multiple et variée allant des membranes cellulaires⁴⁷, à la membrane lipidique⁶³⁻⁶⁵, aux systèmes modèles de monocouches auto – assemblées⁶⁶⁻⁷¹, aux nanoparticules^{53, 54, 72} ou encore aux vésicules⁷³⁻⁷⁵.

Cependant et malgré leur grand intérêt, les études de multivalence réalisées à une interface sont parfois plus difficiles à interpréter qu'en solution. En effet, de telles interfaces, quand elles sont fonctionnalisées avec des récepteurs monovalents, complexifient l'interaction en rendant les surfaces multivalentes. Des études ont alors été effectuées en faisant varier la concentration de ligands à l'interface⁶⁴⁻⁶⁷, provoquant la possibilité de distribution inégale ou altérée des ligands^{47, 64}. Bien que souvent spéculés, de tels sujets ont rarement été étudiés d'un point de vue quantitatif, en grande partie parce qu'il manque des modèles incorporant la multivalence aux interfaces.

Afin de pouvoir étudier les interactions multivalentes aux interfaces, l'un des deux partenaires doit alors être immobilisé. La partie qui suit présente les différentes techniques existantes de bio-fonctionnalisation des surfaces.

IV. La bio-fonctionnalisation des surfaces

IV.1. Nature des surfaces

Plusieurs types de recouvrement de surface permettent une bio-fonctionnalisation du support. Parmi eux, les plus utilisés sont l'or, la silice et le mica. Une grande majorité des études menées aux interfaces ont lieu sur des surfaces d'or. Tout d'abord, l'or est un métal relativement inerte et ensuite il peut facilement former des films minces qui peuvent être utilisés comme support d'étude pour différentes techniques de caractérisation telles que la microgravimétrie, la SPR ou encore l'ellipsométrie. Les surfaces d'or sont principalement modifiées par la formation d'une monocouche auto-assemblée, notée SAM pour self - assembled monolayer.

La silice et le mica sont des substrats utilisés principalement parce qu'ils permettent l'obtention d'une surface hydrophile rendant possible la fonctionnalisation de la surface par des bicouches lipidiques supportées, notées BLS (voir ci –après) que l'or ne permet pas.

IV.2. Monocouche auto-assemblée (SAM)

L'or est le substrat le plus utilisé pour l'obtention de monocouches auto-assemblées. Une grande partie des SAM formées sur surface d'or le sont avec des thiols car l'or forme aisément des liaisons covalentes avec les atomes de soufre. La fonctionnalisation de la surface par des motifs présentant une activité biologique devient alors simple dès lors que la molécule présente à l'une de ses extrémités un motif thiol (Figure 10 A)). Cette bio-fonctionnalisation peut se faire également en deux étapes : initialement par l'immobilisation de molécules thiol présentant un groupement d'ancrage à l'une de ses extrémités puis par l'utilisation de « click chemistry » pour coupler de façon indirecte le motif biologique ⁷⁶ ou autre...(Figure 10 B)).

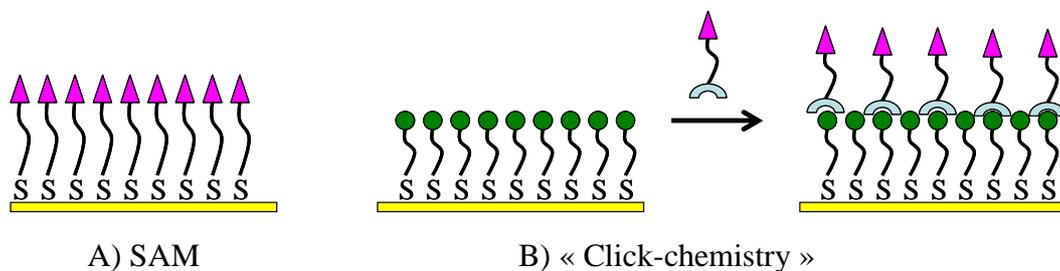


Figure 10 : Représentations schématiques de deux manières de bio-fonctionnalisation d'une surface d'or soit A) de manière directe par la formation d'une SAM ou soit B) de façon indirecte par « click chemistry ».

La formation de SAM comme méthode de bio-fonctionnalisation de surface présentent de nombreux avantages tels que la facilité de mise en oeuvre - par simple trempage de la solution sur la surface -, la reproductibilité des surfaces modifiées ⁷⁷, et enfin leur stabilité, que nous avons nous même observée, pour des périodes allant de quelques jours à plusieurs semaines ⁷⁷. De plus, les SAM peuvent être facilement caractérisées en électrochimie, notamment par désorption réductrice.

IV.3. Les bicouches lipidiques supportées (BLS)

Depuis presque 20 ans, l'émergence de nombreuses techniques de caractérisation aux interfaces (voir section suivante) ainsi que le développement de méthodes de nanostructuration « patterning » ⁷⁸⁻⁸³ ont permis une recrudescence de l'utilisation des bicouches phospholipidiques déposées sur des substrats solides comme modèles de surface cellulaire ⁸⁴⁻⁹⁰. Cette recrudescence provient, également, de la grande facilité et rapidité de

formation des bicouches lipidiques par dépôt direct d'une mono- ou bicouche lipidique sur de nombreux types de surfaces solides⁸⁴. Les bicouches lipidiques « surfaciques » sont, depuis, couramment utilisées comme modèles de membrane biologique et ont permis en outre d'avoir un aperçu des réactions immunes et de l'adhésion cellulaire. Il existe plusieurs types de modèles de bicouches lipidiques « surfaciques » provenant des différentes méthodes de dépôts (méthode Langmuir-Blodgett, dépôts de Langmuir-Schäfer, étalement de vésicules). On retrouve, ainsi, les bicouches lipidiques déposées sur un « coussin » de polymère⁹¹⁻⁹³, des bicouches hybrides^{94, 95}, des bicouches lipidiques suspendues⁹⁶⁻⁹⁸, des couches vésiculaires supportées^{81, 99} et finalement notre modèle d'étude les bicouches lipidiques supportées^{84, 100-103}.

Des études récentes¹⁰⁴⁻¹¹¹ ont prouvé le rôle déterminant de la nature du support solide¹⁰⁷ (charge surfacique, structure, rugosité), des vésicules lipidiques¹¹² (composition, charge, taille et état physique), et de l'environnement aqueux^{113, 114} (pH, force ionique et température) dans le procédé de dépôt lipidique.

Il en résulte une multitude de chemins possibles pour la formation de BLS ou même pour éviter leur formation afin de conserver des SUV à la surface. Ainsi on formera une bicouche lipidique sur une surface hydrophile de SiO₂ et de mica, une monocouche sur une surface d'or rendue hydrophobe par une monocouche de thiol par exemple, tandis que les vésicules pourraient s'adsorber sur une surface d'or tout en gardant leur intégrité¹⁰⁹ (Figure 11).

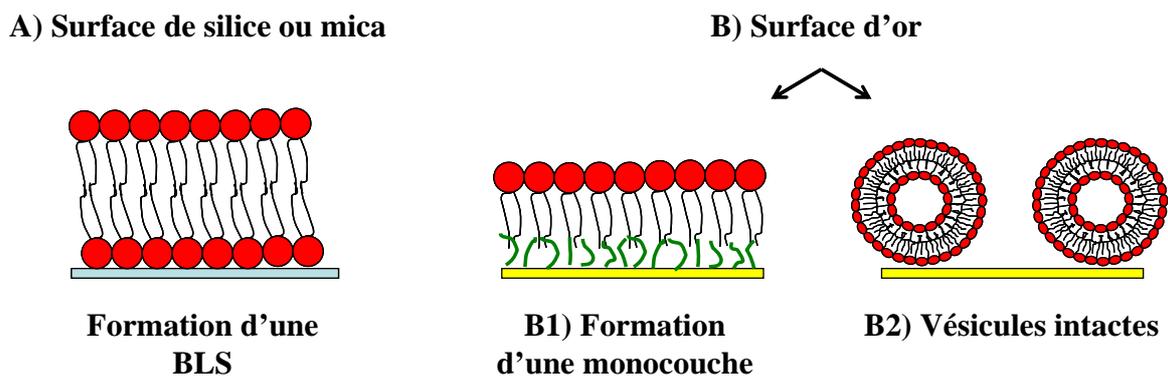


Figure 11 : Schémas représentant les différentes possibilités de dépôt de vésicules de petite taille sur des surfaces A) hydrophile de silice ou de mica et B) d'or B1) rendue hydrophobe par dépôt d'une monocouche de thiol et B2) or nu.

Une fonctionnalisation spécifique de la BLS est également possible, ce qui constitue une bonne stratégie de modification de surface. Ainsi, de plus en plus d'études sont effectuées en incorporant dans de simples bicouches de phospholipides des molécules bioactives qui

peuvent être soit des ligands (glycolipides) pour l'inhibition ou l'adsorption de protéine, soit des lipides modifiés chimiquement dans le but de construire des édifices nanocomposites. Dans ce dernier cas, la littérature présente plusieurs types de fonctionnalisation de la BLS, notamment par des lipides maleimides qui vont permettre le couplage covalent de ligand présentant une fonction cystéine ¹¹⁵. Brisson *et al.* ont montré la cristallisation 2D de la streptavidine sur une BLS biotinylée ^{100, 116} et Reviakine *et al.* ¹¹⁷ celle de l'Annexine A5 sur une BLS contenant de la dioléoylphosphatidylsérine (DOPS). La possibilité d'effectuer des assemblages 2D structurés de protéines sur un support solide fournit alors un degré de contrôle supplémentaire dans la construction d'édifices complexes. Dans le cadre de cette thèse, nous avons notamment utilisé l'assemblage 2D de streptavidine réalisée sur une BLS (chapitre II). Le grand avantage des BLS est l'obtention sur une surface bio-inerte, rigide, fonctionnalisable et parfaitement caractérisée (Figure 12).

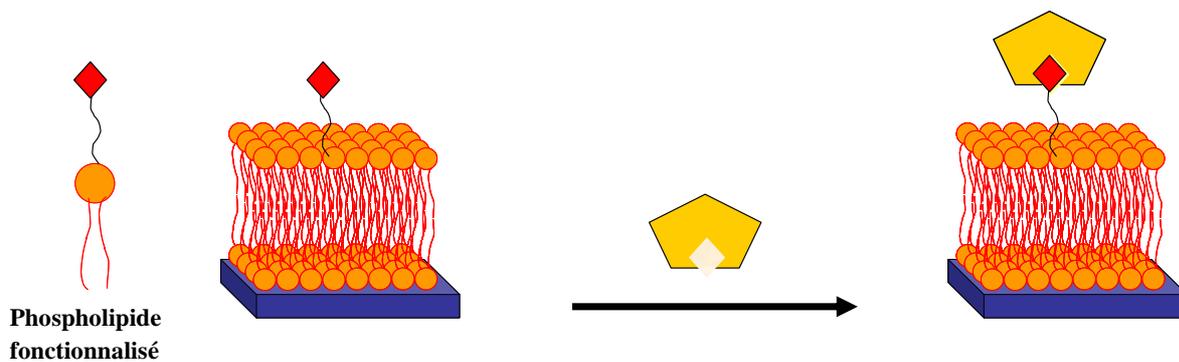


Figure 12 : Schéma d'une BLS fonctionnalisée par des motifs de reconnaissance et de son interaction avec le récepteur complémentaire.

La formation de BLS constitue, ainsi, une méthode simple pour la transformation d'une surface solide en une surface biocompatible. Actuellement, les BLS sont sujettes à des recherches allant des études mécaniques, aux tentatives de compréhension des procédés fondamentaux se déroulant dans les organismes vivants, en passant par les applications émergentes en Science du vivant, telles que les biocapteurs ^{118, 119}, l'écrantage de drogues et de nombreuses applications médicales.

V. Les méthodes d'étude aux interfaces

Pour des études mécanistiques des interactions multivalentes, l'immobilisation d'un des deux partenaires sur une surface a été réalisée. Un des principaux avantages à travailler aux

interfaces est la facilité relative de préparation de la « surface multivalente » de liaison. En effet, des ligands monovalents lorsqu'ils sont immobilisés à des densités surfaciques élevées, vont créer des surfaces d'étude multivalente (effet de la concentration effective, cf Figure 5 page - 20 -). Ils permettent ainsi d'accroître la force de liaison du ligand avec l'analyte en solution. Un second avantage est que la fonctionnalisation de la surface est facilement contrôlable et quantifiable. On peut ainsi faire varier la distance entre les ligands et leur quantité à la surface, ainsi que réaliser des mélanges de ligands. Actuellement, il existe une richesse technologique de méthodes de caractérisation surfacique basées sur une variété de principes de détection optique et mécanique : la microscopie de fluorescence, la microscopie d'angle de Brewster, la microscopie à force atomique (AFM), la résonance plasmonique de surface (SPR), l'ellipsométrie, la microgravimétrie (QCM-D). Pour les travaux présentés dans ce manuscrit, nous avons employé principalement la combinaison de deux techniques : la QCM-D et la SPR (BIAcore[®]) (chapitre II et III). Les résultats ont été également complétés par l'ellipsométrie. La QCM-D et la SPR sont deux techniques qui permettent une détection en temps réel sans une nécessité de marquage des molécules à détecter. Ces trois techniques, ainsi que leur complémentarité sont introduites ci-dessous.

V.1. Microbalance à quartz avec mesure de la dissipation d'énergie (QCM-D)

La microbalance à quartz (QCM) est une technique utilisée depuis de nombreuses années pour suivre le dépôt de films minces en milieu gazeux ou sous vide. Ce n'est que dans les années 1990 que la technique QCM couplée à la mesure de la dissipation d'énergie, appelée QCM-D, mise au point par Rodalh *et al.*¹²⁰, fut utilisée pour des études en milieu liquide.

Depuis lors, la QCM-D est devenue un outil de caractérisation de surface de couches minces permettant à la fois la mesure de la masse adsorbée ainsi que la détermination des propriétés viscoélastiques. Cette technique a été brillamment appliquée à de nombreuses études allant de l'adhésion de protéines sur support solide¹²¹⁻¹²³ à l'adhésion cellulaire¹²⁴, en passant par le suivi de la formation d'assemblage de polyélectrolytes¹²⁵⁻¹²⁹ et de polymères¹³⁰⁻¹³², par la formation de BLS^{104-106, 109, 111, 133-135}, etc.

V.1.1 Le principe de fonctionnement

Une QCM-D se compose d'un cristal de quartz, recouvert sur ses deux faces par des électrodes d'or (Figure 13), d'une chambre de mesure thermostatée présentant deux modes de fonctionnement (voir ci après) et d'une unité électronique reliée à un PC.

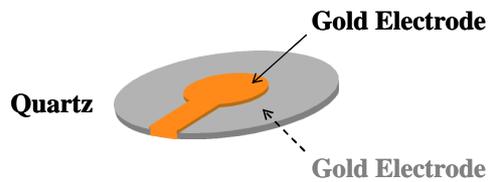


Figure 13 : Schéma d'un cristal de quartz utilisé en QCM-D.

Grâce aux propriétés piézoélectriques du quartz, ce dernier peut être excité par une tension alternative appliquée entre les deux électrodes. L'établissement d'un champ électrique alternatif à travers le cristal de quartz provoque un mouvement vibrationnel à la fréquence de résonance du quartz (5 MHz dans notre cas). Les mesures des fréquences de vibration sont réalisées sur la première, la troisième, la cinquième et la septième harmoniques, correspondant à $n = 1, 3, 5, 7$ et à 5, 15, 25 et 35 MHz, respectivement.

La dissipation d'un cristal est mesurée en enregistrant la réponse de la décroissance de ses oscillations après l'avoir excité à la fréquence de résonance.

La dissipation de l'oscillation d'un cristal renseigne sur les propriétés visco-élastiques du film adsorbé. Elle se définit selon l'équation (I-20)

$$D = \frac{E_{perdue}}{2\pi E_{stockée}} \quad \text{(I-20)}$$

où E_{perdue} est l'énergie dissipée durant un cycle d'oscillation et $E_{stockée}$ est l'énergie totale stockée dans le système. Ainsi, en collectant la dissipation d'énergie (ΔD_n) et les variations de fréquence (Δf_n) enregistrées pour la fréquence de résonance d'un cristal de quartz et ses trois harmoniques ($n = 3, 5, \text{ et } 7$), la technique de caractérisation microgravimétrique peut être utilisée pour caractériser la formation de films minces à l'échelle du nanomètre, constitués par exemple de protéines, de polymères ou de cellules sur des surfaces, en milieu liquide.

V.1.2 La détermination de la masse adsorbée

La fréquence de résonance du cristal (Δf_n) est sensible à la variation totale de masse du cristal, incluant l'eau couplée à l'oscillation. Une diminution de $\Delta f_n/n$ est usuellement associée à une augmentation de la masse adsorbée sur le quartz.

L'adsorption d'un matériau sur la surface, Δm , induit une diminution de la fréquence de résonance du quartz, Δf . Si la masse adsorbée est faible par rapport à celle du cristal et si cette masse est suffisamment rigide, alors Δf est proportionnelle à Δm selon la relation de Sauerbrey (I-21).

Cette relation se définit par :

$$\Delta m = - C \Delta f_n/n \quad (\text{I-21})$$

où C est la constante de sensibilité massique pour un cristal de quartz de 5 MHz et $n = 1, 3, 5, 7$ est le numéro de l'harmonique.

La constante de sensibilité se définit comme $C = \frac{A \times (\rho_q \mu_q)^{1/2}}{2 f_0^2} = 17,7 \text{ ng.Hz}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, avec A

la surface piézoélectriquement active, ρ_q la densité du quartz ($2,648 \text{ g.cm}^{-3}$), μ_q le module de cisaillement ($2,947 \cdot 10^{11} \text{ dynes.cm}^{-2}$) et f_0 la fréquence de résonance du cristal de quartz.

En considérant ρ_{eff} , la densité effective de la couche déposée, il devient alors possible de donner une estimation de l'épaisseur (d) du film déposé (équation (I-22))

$$d_{\text{eff}} = \frac{\Delta m}{\rho_{\text{eff}}} \quad (\text{I-22})$$

Cependant, dans de nombreuses situations, le film adsorbé n'a pas un comportement rigide, et l'équation de Sauerbrey n'est pas valide. En effet, un film viscoélastique ne va pas complètement suivre l'oscillation du cristal (mesure de la dissipation). Dans ce cas, l'équation de Sauerbrey va sous-estimer la masse adsorbée à la surface. Le film viscoélastique pourra être caractérisé en détail grâce à la mesure des fréquences multiples ($n = 3, 5$ et 7) et à l'utilisation du modèle de Voïnona et al.^{136, 137}. Ce modèle établit ainsi une relation entre les paramètres viscoélastiques du film (la viscosité et le module de cisaillement) et les variations de fréquence et de dissipation des différentes harmoniques. Une routine numérique

implémentée dans le logiciel QTools (Q-Sense, Suède), permet, à partir de la réponse QCM-D, de remonter aux propriétés de la couche formée.

V.1.3 L'eau en QCM-D

En milieu liquide, la masse de film adsorbée consiste en une quantité importante d'eau. La mesure de plusieurs fréquences et de la dissipation du film pour la fréquence de résonance et ses trois harmoniques permet de déterminer si le film adsorbé est rigide ou viscoélastique. La quantité d'eau dans un film adsorbé peut aller jusqu'à 95% et elle dépend du type de molécule et du type de surface que l'on étudie.

Cependant, l'étude seule en QCM-D ne permet pas la mesure directe de la quantité d'eau présente. Pour sa détermination, une seconde technique de caractérisation sera donc nécessaire telle que l'électrochimie, la résonance plasmonique de surface ou l'ellipsométrie.

V.1.4 L'appareillage d'étude

Dans le cadre de ces études, nous avons utilisé une QCM-D D300 de chez Q-sense. Nous allons donc présenter rapidement les modes de fonctionnement ainsi que les différentes surfaces existantes.

V.1.4.1. Les surfaces utilisables

La technique QCM-D, contrairement à des techniques de caractérisation optique, n'est pas limitée par le type de surface mais dépend seulement du cristal de quartz. On pourra alors travailler sur plusieurs surfaces différentes : l'or, les oxydes de silice (SiO_2) et de titane (TiO_2) ou encore le mica¹³⁸. Dans nos études, les surfaces d'or et de SiO_2 ont été employées telles quelles ou fonctionnalisées. Leur utilisation nécessite au préalable un nettoyage et/ou une activation qui sera présenté dans les chapitres II et III et résumé dans la partie expérimentale.

V.1.4.2. Les modes de fonctionnement

Sur l'appareil utilisé, deux modes de fonctionnement sont à disposition :

- le mode statique (Figure 14). Il s'agit de l'utilisation classique de la QCM-D, la chambre de mesure se compose alors d'une boucle (T-loop) qui permet de thermostatier les solutions injectées afin de garantir une stabilité du signal et d'une cellule de mesure où se

situé le cristal de quartz. Dans ce mode de mesure, le liquide est d'abord injecté dans la T-loop (1,5 mL) puis après 2 minutes de mise en température, il est envoyé (0,5 mL) dans la cellule de mesure grâce à un système de vanne. Chaque injection dans la chambre de mesure nécessite 2 mL de produit et 0,5 mL pour chaque injection supplémentaire. Ce mode d'utilisation nécessite une grande quantité de produits, ce qui peut devenir un facteur limitant lorsque l'on travaille avec des molécules onéreuses disponibles en faible quantité.

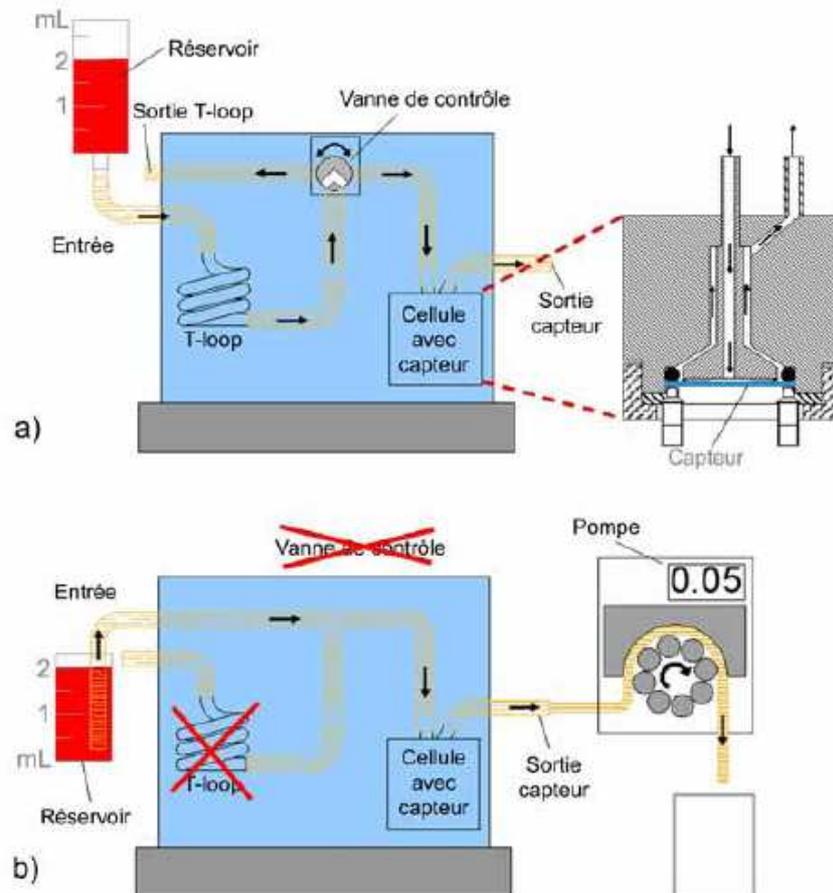


Figure 14 : Description schématique des deux modes de fonctionnement en milieu liquide de la QCM-D. La direction du transport de liquide est donnée par des flèches. Le mode a) correspond au mode statique. Il consiste à l'injection (1,5 mL), grâce à une vanne, du liquide dans un réservoir : la T-loop où il reste deux minutes pour être thermostaté. Il est ensuite envoyé (0,5 mL) dans la cellule de mesure. Le mode b) correspond au mode flux continu. La T-loop est alors déconnectée et le liquide accède directement à la chambre de mesure à l'aide d'une pompe péristaltique.

- le mode flux continu qui consiste à court-circuiter la T-loop et à injecter directement le liquide dans la cellule de mesure via l'utilisation d'une pompe péristaltique à l'aval ou à l'amont de la cellule de mesure. L'utilisation d'une pompe péristaltique permet de travailler à des débits faibles et constants. Ce mode d'utilisation ne permettant pas de thermostatier les

solutions, nous avons placé nos solutions dans un bain thermostaté à la température de mesure (la cellule de mesure est équipée d'un système qui assure un contrôle très précis de la température à $\pm 0,02$ °C). Ce second mode est privilégié lorsque l'on veut limiter les problèmes de transport de matière.

V.2. Résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface est un outil de diagnostic hautement sélectif pour la détection d'événements interfaciaux. Elle a pour fonction de visualiser en temps réel des interactions entre biomolécules non marquées. L'analyse d'interaction biomoléculaire n'est pas limitée aux protéines. Des interactions ADN-ADN, protéine – ADN, protéine – lipide, antigène-anticorps et des systèmes hybrides de biomolécules et de surfaces non biologiques peuvent être étudiés. L'analyse d'interactions biomoléculaires peut être utilisée de plusieurs façons. Tout d'abord, elle permet de mettre en évidence l'interaction entre deux partenaires, puis de quantifier cette force d'interaction (affinité, constantes de vitesse, quantité de ligand et d'analyte immobilisés). De plus, la dernière génération d'appareil permet également la réalisation d'études thermodynamiques de l'interaction (BIAcore T100).

La résonance plasmonique de surface est donc une technique couramment employée dès que l'on désire obtenir des informations d'ordre cinétique relatives à une interaction entre deux partenaires biomoléculaires : vitesse d'association et de dissociation du complexe formé, constante d'affinité, taux molaires et concentrations de protéines actives. Cette technique se révèle donc particulièrement adaptée à nos études, c'est-à-dire aussi bien pour l'étude de l'interaction protéine-sucre^{67, 139-141} et notamment pour mettre en avant la présence d'interaction multivalente^{20, 66, 142, 143} que pour l'interaction entre ligands peptidiques et cellules¹⁴⁴⁻¹⁴⁶.

V.2.1 Le principe de fonctionnement

Le principe physique de la SPR développée par H. Raether et K. Welford^{147, 148}, est basé sur les propriétés particulières de l'interaction entre une lumière polarisée et une surface d'étude qui consiste en une couche de verre recouverte d'un film mince métallique (Figure 15).

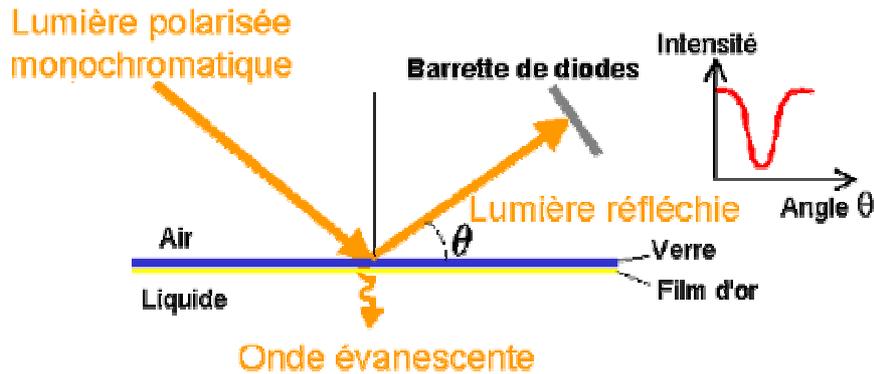


Figure 15 : Schéma illustrant le principe de fonctionnement de la technique SPR. Cette figure est issue du site www.ifr122.cnrs.fr.

La SPR est une technique optique qui utilise le phénomène d'onde évanescente pour mesurer les changements d'indice de réfraction à proximité de la surface métallique d'étude. Des films d'aluminium, d'argent et d'or d'épaisseur variant de 2,5 à quelques dizaines de nm peuvent être utilisés.

Le phénomène de résonance plasmonique de surface se déroule quand la lumière polarisée, sous des conditions de réflexion interne totale, frappe une couche de métal électriquement conductrice à l'interface entre des milieux d'indice de réfraction différents : le verre de la surface du capteur (indice de réfraction élevé) et le milieu liquide (indice de réfraction bas).

Lorsque ce faisceau de lumière polarisée monochromatique arrive à cette interface, une partie de la lumière incidente est réfléchi sur l'interface et l'autre partie de la lumière est réfractée à travers la surface. Selon l'angle d'incidence du faisceau, toute la lumière peut être réfléchi. Lorsqu'il n'y a pas de réfraction, une des composantes électromagnétiques de la lumière, l'onde évanescente, se propage perpendiculairement à l'interface sur une distance équivalente à sa longueur d'onde. La zone balayée par l'onde est appelée champ évanescent.

L'onde évanescente entre en résonance avec les électrons délocalisés de la couche électronique périphérique de l'or (plasmon). Une conséquence énergétique de cette résonance est visible dans le faisceau réfléchi qui, analysé avec une barrette de diodes, présente une chute d'intensité à un angle défini. Cet angle d'intensité minimum est l'angle de résonance. Il varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu présent dans le champ évanescent. La lumière ne pénètre pas jusqu'à l'échantillon, c'est pourquoi les analyses peuvent donc être réalisées sur des échantillons opaques, colorés et turbides.

Pour les études d'interaction, un des réactifs, le ligand, est immobilisé sur la surface. L'analyte, dilué dans le tampon d'étude, est ensuite injecté sur la surface fonctionnalisée. Les changements de masse induits par l'association ou la dissociation des complexes ligand-

analyte modifie la réfringence du milieu et décalent la position de l'angle de résonance. L'enregistrement de la variation de l'angle de résonance permet ainsi de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées sur la surface (Figure 16).

V.2.2 L'eau en SPR

Contrairement à la technique QCM-D, où la variation de masse calculée correspond à la masse totale couplée au mouvement du cristal de quartz, c'est-à-dire la masse des biomolécules et de l'eau d'hydratation, la technique SPR ne mesure que la masse adsorbée de biomolécules. Ainsi, lorsque l'on travaille en solution aqueuse, la différence entre les masses obtenues à partir des mesures QCM-D et SPR, m_{QCM} et m_{SPR} , permet d'obtenir la quantité d'eau couplée dynamiquement au film adsorbé^{101, 121, 149, 150}. La combinaison de ces deux techniques s'avère être d'une grande utilité et permet de fournir de nombreuses informations : cinétique d'interaction, masse de biomolécules adsorbées, masse d'eau couplée, propriétés viscoélastiques des films formés.

V.2.3 Les études cinétiques par BIAcore®

V.2.3.1. Principe

Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé un appareil BIAcore® T100. La technologie BIAcore® utilise le phénomène de résonance plasmonique de surface pour détecter des interactions biomoléculaires lorsqu'elles ont lieu. Le système de détection optique des appareils BIAcore® est calibré pour que le faisceau rencontre l'interface biospécifique dans ces conditions, dites de réflexion interne totale. La longueur d'onde de la lumière est de 760 nm.

Avec la technique BIAcore®, les études sont effectuées en flux continu. Le signal de résonance est exprimé en unités de résonance (RU). Pour la plupart des biomolécules, le changement de la réponse est proportionnel à la masse de matériel lié. L'enregistrement du signal s'appelle un sensorgramme. Un exemple d'une étude cinétique effectuée avec un appareil BIAcore® est présentée par la Figure 16. L'ensemble de l'étude s'effectue dans un seul tampon de travail, noté WB, afin d'éviter la présence de fort saut de signal (effet tampon) dû exclusivement à des changements de tampon de travail. L'étude cinétique comporte trois étapes : les étapes d'association et de dissociation de l'analyte suivies de la régénération de la

surface à son état initial. Afin de pouvoir effectuer des cycles d'association/dissociation successifs à des concentrations croissantes nécessaire à l'analyse des résultats (cf section III.2 Les modèles d'étude de la multivalence, page - 21 -), l'étape de régénération de la surface en ligand, sans dégradation, est primordiale.

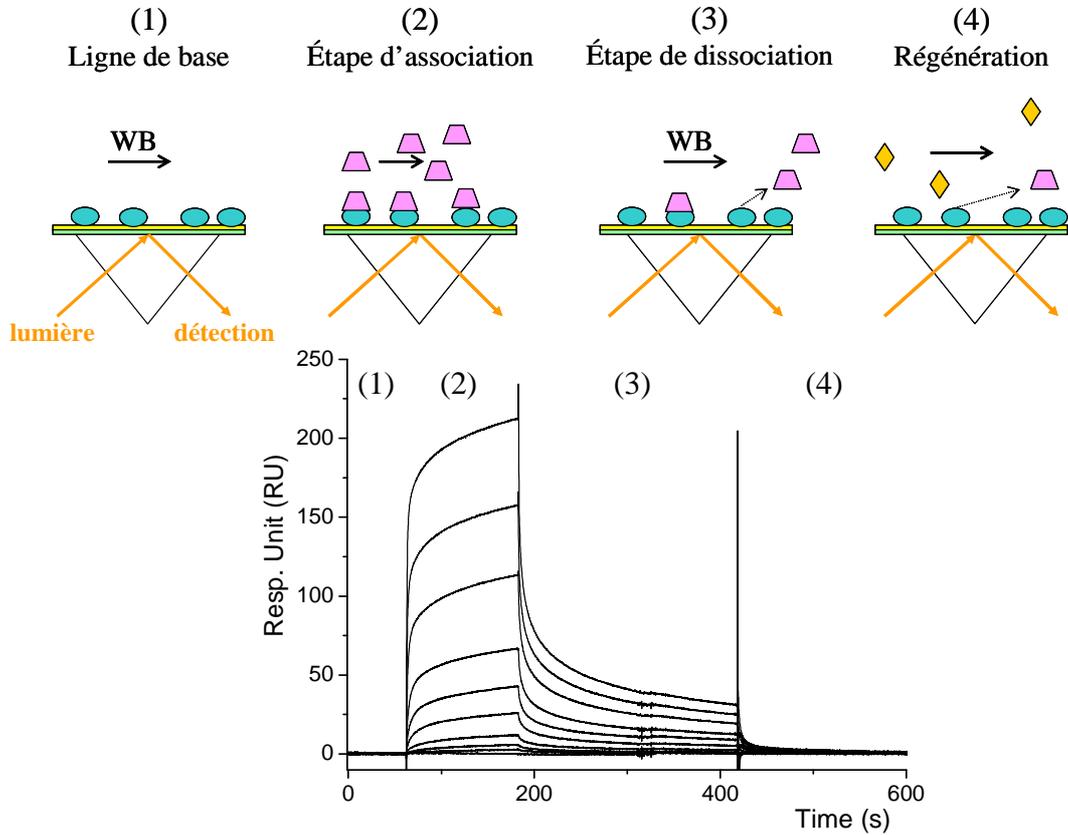


Figure 16 : Schémas et sensorgrammes - obtenu en SPR (BIAcore®) – représentant les différentes étapes d'une étude cinétique entre un analyte en solution et son ligand complémentaire immobilisé sur la surface d'étude.

Pour les conditions suivantes : adhésion de protéine sur une sensor chip CM5 (voir ci-après), une variation de 1000 RU correspond à une déviation de l'angle de 0,1 degré, ainsi qu'à une fixation de 1 ng de protéine par mm² de surface. Pour toutes les autres conditions, la variation en RU (ΔRU) peut être convertie en masse (Δm_{SPR}) selon la relation suivante^{101, 151} :

$$\Delta m_{SPR} = d \frac{n_{biomolécule}^{eff} - n_{buffer}}{dn/dc} = C_{SPR} \Delta RU \quad (\text{I-23})$$

avec $C_{SPR} \sim 0,066 \text{ ng.cm}^{-2}$ pour l'adsorption de protéine sur une surface plane d'or, avec dn/dc (rapport indice de réfraction sur la concentration) $\sim 0,18 \text{ mL/g}$ pour une protéine²¹. $n_{biomolécule}^{eff}$ et n_{buffer} correspondent respectivement à l'indice de réfraction de la biomolécule et du tampon d'étude.

Lorsque dn/dc est équivalent entre plusieurs analytes de masse molaire différente, la variation en RU sera proportionnelle à la masse molaire de l'analyte selon l'équation (I-24).

$$R_{ana} = R_{lig} \times \frac{MW_{lig}}{MW_{ana}} \times \left[\left(\frac{dn}{dc} \right)_{lig} / \left(\frac{dn}{dc} \right)_{ana} \right] \quad (\text{I-24})$$

avec R_{ana} et R_{lig} les quantités en RU d'analyte et de ligand, MW_{lig} et MW_{ana} les masses molaires en ligand et en analyte et $(dn/dc)_{lig}/(dn/dc)_{ana}$ rapport des variations des indices de réfraction en fonction de la concentration.

Les mesures en SPR permettent de suivre en temps réel des profils de reconnaissance, des associations et dissociations d'analyte. De ces profils, les données telles que la spécificité, l'affinité, le comportement cinétique et la concentration de l'échantillon peuvent être déterminées.

V.2.3.2. Les différentes surfaces d'étude

Les surfaces d'étude en SPR BIAcore[®] sont appelées sensor chips. Elles se composent d'une couche de verre recouvert d'un mince film d'or. La plus couramment utilisée est la sensor chip CM5 (Figure 17). Elle est formée d'une couche hydrogel réticulé de dextran carboxyméthylé recouvrant le film d'or qui permet à la fois :

- d'agir comme un substrat sur lequel les molécules peuvent être attachées
- de fournir un environnement hydrophile pour l'interaction.

Il existe une grande variété de sensor chips d'or fonctionnalisées par d'autres matrices selon le mode d'utilisation escompté. Pour notre étude, nous avons utilisé des sensor chips CM5, d'or seul et C1 (Figure 17).

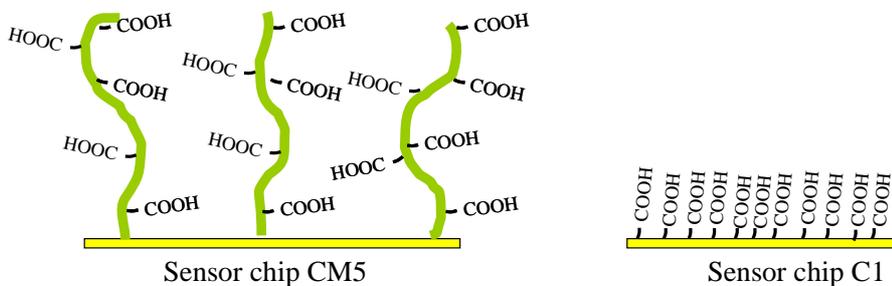


Figure 17 : Schémas représentant les deux principales sensor chips utilisées lors de nos études avec le BIAcore[®].

La sensor chip C1 se compose d'une SAM présentant des groupes carboxyméthyle. Sur ces surfaces sont immobilisés de façon covalente des ligands hydrosolubles dans un milieu hydrophile (lectines, glycoconjugués, protéines membranaires). Elle est préférée à la sensor chip CM5 dans le cas des études d'interaction mettant en jeu des lectines. En effet, le dextran est un oligosaccharide qui pourrait fausser la quantité de lectine adsorbée spécifiquement.

V.2.4 Le transport de matière

Par la technique BIAcore[®], le système de flux est un système microfluidique ; il permet de délivrer un flux constant de produits ou de tampon sur la sensor chip et ce durant toute l'analyse. Cette technique permet d'injecter dans le système des volumes précis au microlitre avec des troubles minimaux de flux et une dispersion minimale de l'échantillon. La possibilité de travailler alors sur des canaux micrométriques et des cellules de mesure de 40 nL de contenance permet un renouvellement de l'échantillon sur la surface de mesure de l'ordre de plus de 600 fois par minute quand on travaille à des flux lents de 25 $\mu\text{L}/\text{min}$. Cette propriété permet, dans la plupart des cas, de réduire les problèmes de transport de matière et permet alors une analyse précise des constantes de vitesse cinétique.

V.3. L'ellipsométrie

L'ellipsométrie est une technique optique d'analyse de surface fondée sur la mesure du changement de l'état de polarisation de la lumière après réflexion sur une surface plane. Les points forts de l'ellipsométrie sont : son caractère non destructif, sa large gamme de mesure (mesure d'épaisseur depuis une fraction de couche mono-atomique jusqu'à quelques micromètres), sa possibilité de contrôle *in situ* permettant la mesure d'épaisseur de couche pendant leur croissance. Il faut distinguer l'ellipsométrie à une seule longueur d'onde, qui est l'outil le plus simple, de l'ellipsométrie spectroscopique (celle que l'on utilise), qui effectue des mesures sur tout un spectre et permet d'interpréter des structures complexes : multicouche, rugosité d'interface, homogénéité, etc.

V.3.1 Le principe de fonctionnement

Le principe de l'ellipsométrie a été découvert il y a plus d'un siècle. Une onde plane envoyée sur la surface polie d'un matériau donne lieu à une onde plane réfléchie. En général, si l'onde

incidente est polarisée suivant le plan d'incidence elle reste polarisée suivant ce même plan. Cependant, si l'onde d'incidence, est polarisée suivant une direction quelconque l'onde réfléchie est en général de polarisation elliptique : cela est dû au fait que l'onde subit un déphasage à la réflexion, et ce déphasage dépend de la direction de la polarisation (Figure 18).

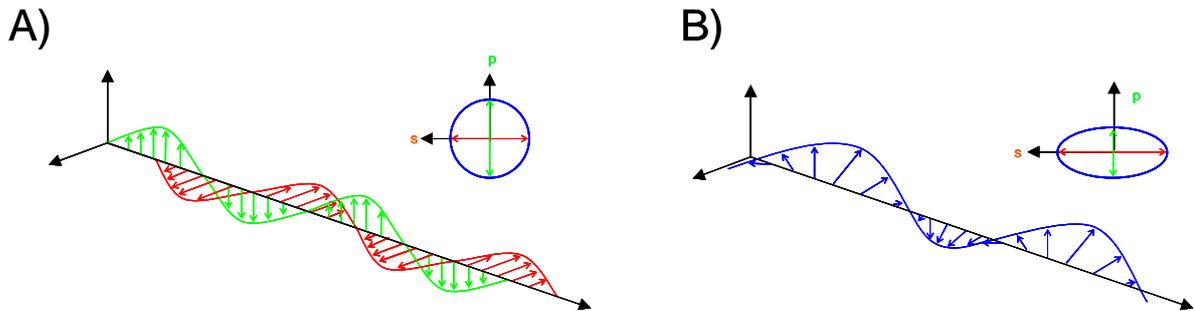


Figure 18 : Schéma représentant la polarisation de la lumière pour A) une lumière polarisée circulaire et B) une lumière polarisée elliptique.

Ce phénomène est traduit mathématiquement au moyen de coefficients de réflexion complexes, r_p et r_s pour les polarisations parallèles (« p ») et perpendiculaire (« s ») au plan d'incidence. L'état de polarisation de la lumière réfléchie est déterminé par le rapport r_p/r_s , qu'on décrit habituellement sous la forme :

$$r_p/r_s = \tan(\psi) \cdot \text{Exp}\Delta \quad (\text{I-25})$$

Cette relation définit les « angles ellipsométriques » ψ et Δ où $\tan(\psi) = |r_p| / |r_s|$, le rapport des modules et θ est la différence des déphasages des ondes réfléchies p et s par rapport à l'onde incidente.

On désigne sous le nom d'ellipsométrie les méthodes permettant de mesurer expérimentalement ces quantités, ψ et Δ , qui sont dépendantes de la constitution du matériau, que l'on veut ainsi caractériser. Si l'on a affaire à un seul constituant, la mesure de ψ et Δ permet de déterminer les parties réelle et imaginaire de l'indice de réfraction du matériau. Cependant, en général l'ellipsométrie est appliquée à la caractérisation de matériaux stratifiés en couches minces. Ainsi, si l'on connaît l'indice du substrat et celui de la couche déposée, on peut alors déduire de ψ et Δ la valeur de l'épaisseur de la couche.

Un des intérêts de l'ellipsométrie est sa sensibilité à de faibles variations de l'épaisseur de cette couche : en effet, l'ordre de grandeur de Δ est le déphasage correspondant à un aller retour de la lumière dans l'épaisseur de la couche. La mesure de l'épaisseur se ramène ainsi à

la mesure d'un angle. La mesure de Δ avec une précision de $0,1^\circ$ permet ainsi de mettre en évidence des variations d'épaisseur effectives de l'ordre de la monocouche atomique (0,05 – 0,1 nm).

V.3.2 L'ellipsométrie à annulation

Plusieurs techniques de mesure de polarisation par réflexion existent et elles utilisent toute le même montage optique (source, polariseur, analyseur et détecteur) ; ce qui varie entre elles, c'est l'ajout de différents éléments comme des modulateurs, un compensateur, etc. Il existe principalement trois types de méthode d'ellipsométrie : la méthode de modulation par élément tournant, la méthode à modulation de phase et la méthode de zéro ou ellipsomètre à annulation que nous avons utilisée dans le cadre de nos travaux (Figure 19). Cette méthode utilise l'extinction du signal pour effectuer une mesure angulaire.

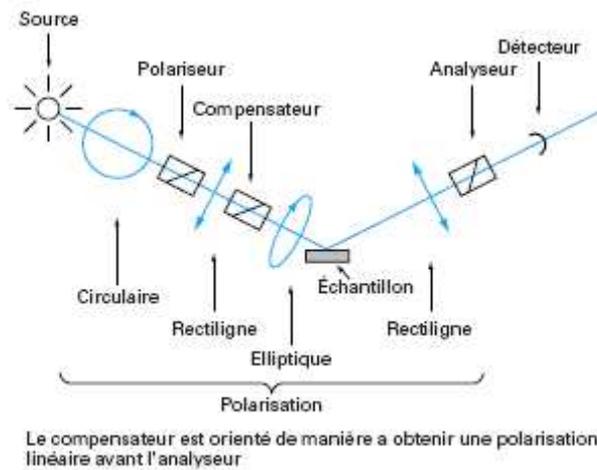


Figure 19 : Montage schématique optique de la composition d'un ellipsomètre à annulation

La polarisation, linéaire après le polariseur, est transformée en polarisation elliptique par le compensateur. Ce dernier est orienté de manière à obtenir une polarisation linéaire après la réflexion sur l'échantillon ; le compensateur joue alors un rôle symétrique à l'échantillon. L'analyseur est ensuite orienté de manière à être croisé avec la polarisation linéaire ainsi obtenue, ce qui conduit à l'extinction du faisceau. Les orientations du polariseur et de l'analyseur permettent de connaître les paramètres ellipsométriques de l'échantillon selon l'équation (I-26):

$$\tan(\Psi).e^{i\Delta} = \frac{-\tan A \times (\tan C - \tan(P - C))}{1 + i \tan C \tan(P - C)} \quad (\text{I-26})$$

avec A, C et P les angles respectifs de l'analyseur, du compensateur et du polariseur repérés par rapport au plan d'incidence. Ainsi, pour une position donnée du compensateur, chaque couple de valeurs (ψ , Δ) correspond à deux paires d'angle P et A. Cette méthode permet le calcul direct des angles ψ et Δ . Tous ces paramètres ellipsométriques sont ensuite exploités (modèles optiques simples mis au point en fonction de l'étude) et fournissent un grand nombre d'informations citées plus haut.

V.3.3 Les modes de fonctionnement de l'appareillage utilisé

Nous avons utilisés deux modes de fonctionnement. Soit à l'interface surface – air par mesure ellipsométrique soit à l'interface surface – liquide en utilisant une cellule SPR. Le premier cas correspond à la méthode de travail citée ci-dessus. Dans le second cas, on travaille avec un prisme en utilisant exactement le principe de résonance plasmonique de surface expliqué précédemment (cf section V.2 Résonance plasmonique de surface). On travaillera soit en flux continu grâce à l'utilisation d'une pompe péristaltique soit en mode statique selon la même façon de procéder que la QCM-D. Ce mode de fonctionnement donne alors accès à la possibilité de faire des études cinétiques.

VI. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence la difficulté de l'étude des interactions multivalentes aux interfaces. D'une part, parce que les mécanismes de liaison entre partenaires biologiques ne sont pas encore clairement définis. D'autre part, parce que l'immobilisation d'un des partenaires rend l'étude encore plus complexe en rajoutant un effet de multivalence de la surface en plus de celle de l'analyte en solution. De même, la limitation des modèles cinétique et thermodynamique existant rend les études quantitatives difficiles à réaliser.

C'est pourquoi, afin de mener au mieux nos investigations, différents types de surface ont été testés et les résultats ont été renforcés et confirmés par l'utilisation de deux techniques de caractérisation complémentaires que sont la QCM-D et la SPR.

Références chapitre I :

- (1) O'Shannessy, D. J.; Brigham-Burke, M.; Soneson, K. K.; Hensley, P.; Brooks, I. *Analytical Biochemistry* **1993**, 212, 457-468.
- (2) Karlsson, R.; Michaelsson, A.; Mattsson, L. *Journal of Immunological Methods* **1991**, 145, 229-240.
- (3) Fisher, R. J.; Fivash, M.; Casas-Finet, J.; Erickson, J. W.; Kondoh, A.; Bladen, S. V.; Fisher, C.; Watson, D. K.; Papas, T. *Protein Science* **1994**, 3, 257-266.
- (4) Beechem, J. M. *Methods in Enzymology* **1992**, 210, 37-54.
- (5) Scatchard, G. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1949**, 51, 660-672.
- (6) MacKenzie, C. R.; Hiramata, T.; Deng, S.-j.; Bundle, D. R.; Narang, S. A.; Young, N. M. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271, 1527-1533.
- (7) Lundquist, J. J.; Toone, E. J. *Chemical Reviews* **2002**, 102, 555-578.
- (8) Mulder, A.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2004**, 2, 3409-3424.
- (9) Huskens, J.; Mulder, A.; Auletta, T.; Nijhuis, C. A.; Ludden, M. J. W.; Reinhoudt, D. N. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 6784-6797.
- (10) Jacobson, H.; Stockmayer, W. H. *Journal of Chemical Physics* **1950**, 18, 1600-1606.
- (11) Kramer, R. H.; Karpen, J. W. *Nature* **1998**, 395, 710-713.
- (12) Kuhn, W. *Kolloid-Zeitschrift* **1934**, 68, 2-15.
- (13) Huskens, J. *Current Opinion in Chemical Biology* **2006**, 10, 537-543.
- (14) Jencks, W. P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1981**, 78, 4046-4050.
- (15) Klotz, I. M. *Archives of Biochemistry* **1946**, 9, 109-117.
- (16) Nichol, L. W.; Ward, L. D.; Winzor, D. J. *Biochemistry* **1981**, 20, 4856-4860.
- (17) Hogg, P. J.; Winzor, D. J. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1984**, 234, 55-60.
- (18) Hogg, P. J.; Winzor, D. J. *Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects* **1985**, 843, 159-163.
- (19) Harris, S. J.; Jackson, C. M.; Winzor, D. J. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1995**, 316, 20-23.
- (20) Kalinin, N. L.; Ward, L. D.; Winzor, D. J. *Analytical Biochemistry* **1995**, 228, 238-244.
- (21) Stenberg, E.; Persson, B.; Roos, H.; Urbaniczky, C. *Journal of Colloid and Interface Science* **1991**, 143, 513-526.
- (22) Karlsson, R.; Mo, J. A.; Holmdahl, R. *Journal of Immunological Methods* **1995**, 188, 63-71.
- (23) Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. *Angewandte Chemie, International Edition* **2006**, 45, 2348-2368.
- (24) Changeux, J. P.; Thiery, J. P.; Tung, Y.; Kittel, C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1967**, 57, 335-341.
- (25) Groves, J. T. *Angewandte Chemie, International Edition* **2005**, 44, 3524-3538.
- (26) Klemm, J. D.; Schreiber, S. L.; Crabtree, G. R. *Annual Review of Immunology* **1998**, 16, 569-592.
- (27) Heldin, C. H. *Cell FIELD Full Journal Title:Cell* **1995**, 80, 213-223.
- (28) Metzger, H. *Journal of Immunology* **1992**, 149, 1477-1487.
- (29) Sacchettini, J. C.; Baum, L. G.; Brewer, C. F. *Biochemistry* **2001**, 40, 3009-3015.
- (30) Schlessinger, J. *Trends in Biochemical Sciences* **1988**, 13, 443-447.
- (31) Smith, F. D.; Scott, J. D. *Current Biology* **2002**, 12, R32-R40.
- (32) Weiss, A.; Schlessinger, J. *Cell* **1998**, 94, 277-280.

- (33) Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, *4*, 696-703.
- (34) Mammen, M.; Chio, S.-K.; Whitesides, G. M. *Angewandte Chemie, International Edition* **1998**, *37*, 2755-2794.
- (35) Kiessling, L. L.; Pohl, N. L. *Chemistry & Biology* **1996**, *3*, 71-77.
- (36) Roy, R. *Curr Opin Struct Biol FIELD Full Journal Title: Current opinion in structural biology* **1996**, *6*, 692-702.
- (37) Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Accounts of Chemical Research* **1995**, *28*, 321-327.
- (38) Bovin, N. V. *Glycoconjugate Journal* **1998**, *15*, 431-446.
- (39) Houseman, B. T.; Mrksich, M. *Topics in Current Chemistry* **2002**, *218*, 1-44.
- (40) Lindhorst, T. K. *Topics in Current Chemistry* **2002**, *218*, 201-235.
- (41) Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. *Science* **2001**, *291*, 2357-2364.
- (42) Clemons, P. A. *Current Opinion in Chemical Biology* **1999**, *3*, 112-115.
- (43) Kiessling, L. L.; Strong, L. E.; Gestwicki, J. E. *Annual Reports in Medicinal Chemistry* **2000**, *35*, 321-330.
- (44) Germain, R. N. *Int J Technol Assess Health Care FIELD Full Journal Title: International journal of technology assessment in health care* **1994**, *10*, 81-92.
- (45) Fan, E.; Zhang, Z.; Minke, W. E.; Hou, Z.; Verlinde, C. L. M. J.; Hol, W. G. J. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 2663-2664.
- (46) Kitov, P. I.; Sadowska, J. M.; Mulvey, G.; Armstrong, G. D.; Ling, H.; Pannu, N. S.; Read, R. J.; Bundle, D. R. *Nature (London)* **2000**, *403*, 669-672.
- (47) Gestwicki, J. E.; Kiessling, L. L. *Nature* **2002**, *415*, 81-84.
- (48) Kanai, M.; Mortell, K. H.; Kiessling, L. L. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 9931-9932.
- (49) Wolfenden, M. L.; Cloninger, M. J. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12168-12169.
- (50) Woller, E. K.; Cloninger, M. J. *Organic Letters* **2002**, *4*, 7-10.
- (51) Bruehl, R. E.; Dasgupta, F.; Katsumoto, T. R.; Tan, J. H.; Bertozzi, C. R.; Spevak, W.; Ahn, D. J.; Rosen, S. D.; Nagy, J. O. *Biochemistry* **2001**, *40*, 5964-5974.
- (52) Kalovidouris, S. A.; Blixt, O.; Nelson, A.; Vidal, S.; Turnbull, W. B.; Paulson, J. C.; Stoddart, J. F. *Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 8485-8493.
- (53) Barrientos, A. G.; de la Fuente, J. M.; Rojas, T. C.; Fernandez, A.; Penades, S. *Chemistry--A European Journal* **2003**, *9*, 1909-1921.
- (54) Lin, C.-C.; Yeh, Y.-C.; Yang, C.-Y.; Chen, G.-F.; Chen, Y.-C.; Wu, Y.-C.; Chen, C.-C. *Chemical Communications* **2003**, 2920-2921.
- (55) Merritt, E. A.; Zhang, Z.; Pickens, J. C.; Ahn, M.; Hol, W. G. J.; Fan, E. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 8818-8824.
- (56) Zhang, Z.; Merritt, E. A.; Ahn, M.; Roach, C.; Hou, Z.; Verlinde, C. L. M. J.; Hol, W. G. J.; Fan, E. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 12991-12998.
- (57) Kitov, P. I.; Shimizu, H.; Homans, S. W.; Bundle, D. R. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 3284-3294.
- (58) Schon, A.; Freire, E. *Biochemistry* **1989**, *28*, 5019-5024.
- (59) Kitov, P. I.; Bundle, D. R. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 16271-16284.
- (60) Gargano, J. M.; Ngo, T.; Kim, J. Y.; Acheson, D. W. K.; Lees, W. J. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 12909-12910.
- (61) Rao, J.; Lahiri, J.; Isaacs, L.; Weis, R. M.; Whitesides, G. M. *Science* **1998**, *280*, 708-711.
- (62) Rao, J.; Lahiri, J.; Weis, R. M.; Whitesides, G. M. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 2698-2710.

- (63) Pisarchick, M. L.; Thompson, N. L. *Biophysical Journal* **1990**, *58*, 1235-1249.
- (64) Doyle, E. L.; Hunter, C. A.; Phillips, H. C.; Webb, S. J.; Williams, N. H. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 4593-4599.
- (65) Yang, T.; Baryshnikova, O. K.; Mao, H.; Holden, M. A.; Cremer, P. S. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 4779-4784.
- (66) Mann, D. A.; Kanai, M.; Maly, D. J.; Kiessling, L. L. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 10575-10582.
- (67) Smith, E. A.; Thomas, W. D.; Kiessling, L. L.; Corn, R. M. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 6140-6148.
- (68) Rao, J.; Yan, L.; Xu, B.; Whitesides, G. M. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 2629-2630.
- (69) Rao, J.; Yan, L.; Lahiri, J.; Whitesides, G. M.; Weis, R. M.; Warren, H. S. *Chemistry & Biology* **1999**, *6*, 353-359.
- (70) Horan, N.; Yan, L.; Isobe, H.; Whitesides, G. M.; Kahne, D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 11782-11786.
- (71) Metallo, S. J.; Kane, R. S.; Holmlin, R. E.; Whitesides, G. M. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 4534-4540.
- (72) Liang, R.; Yan, L.; Loebach, J.; Ge, M.; Uozumi, Y.; Sekanina, K.; Horan, N.; Gildersleeve, J.; Thompson, C.; Smith, A.; Biswas, K.; Still, W. C.; Kahne, D. *Science* **1996**, *274*, 1520-1522.
- (73) Thibault, R. J.; Hotchkiss, P. J.; Gray, M.; Rotello, V. M. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 11249-11252.
- (74) Thibault, R. J., Jr.; Galow, T. H.; Turnberg, E. J.; Gray, M.; Hotchkiss, P. J.; Rotello, V. M. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 15249-15254.
- (75) Ravoo, B. J.; Jacquier, J.-C.; Wenz, G. *Angewandte Chemie, International Edition* **2003**, *42*, 2066-2070.
- (76) Zhang, Y.; Luo, S.; Tang, Y.; Yu, L.; Hou, K.-Y.; Cheng, J.-P.; Zeng, X.; Wang, P. G. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 2001-2008.
- (77) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chemical Reviews* **2005**, *105*, 1103-1169.
- (78) Kung, L. A.; Kam, L.; Hovis, J. S.; Boxer, S. G. *Langmuir* **2000**, *16*, 6773-6776.
- (79) Srinivasan, M. P.; Ratto, T. V.; Stroeve, P.; Longo, M. L. *Langmuir* **2001**, *17*, 7951-7954.
- (80) Michel, R.; Reviakine, I.; Sutherland, D.; Fokas, C.; Csucs, G.; Danuser, G.; Spencer, N. D.; Textor, M. *Langmuir* **2002**, *18*, 8580-8586.
- (81) Svedhem, S.; Pfeiffer, I.; Larsson, C.; Wingren, C.; Borrebaeck, C.; Hook, F. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 339-343.
- (82) Morigaki, K.; Kiyosue, K.; Taguchi, T. *Langmuir* **2004**, *20*, 7729-7735.
- (83) Jackson Bryan, L.; Groves Jay, T. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 13878-13879.
- (84) Brian, A. A.; McConnell, H. M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1984**, *81*, 6159-6163.
- (85) Chan, P. Y.; Lawrence, M. B.; Dustin, M. L.; Ferguson, L. M.; Golan, D. E.; Springer, T. A. *Journal of Cell Biology* **1991**, *115*, 245-255.
- (86) Erb, E.-M.; Tangemann, K.; Bohrmann, B.; Mueller, B.; Engel, J. *Biochemistry* **1997**, *36*, 7395-7402.
- (87) Kloboucek, A.; Behrisch, A.; Faix, J.; Sackmann, E. *Biophysical Journal* **1999**, *77*, 2311-2328.
- (88) Qi, S. Y.; Groves, J. T.; Chakraborty, A. K. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 6548-6553.

- (89) Grakoui, A.; Bromley, S. K.; Sumen, C.; Davis, M. M.; Shaw, A. S.; Allen, P. M.; Dustin, M. L. *Science* **1999**, 285, 221-227.
- (90) Tamm, L. K.; McConnell, H. M. *Biophysical Journal* **1985**, 47, 105-113.
- (91) Goennenwein, S.; Tanaka, M.; Hu, B.; Moroder, L.; Sackmann, E. *Biophysical Journal* **2003**, 85, 646-655.
- (92) Wagner, M. L.; Tamm, L. K. *Biophysical journal* **2001**, 81, 266-275.
- (93) Munro, J. C.; Frank, C. W. *Langmuir* **2004**, 20, 10567-10575.
- (94) Silin, V. I.; Wieder, H.; Woodward, J. T.; Valincius, G.; Offenhausser, A.; Plant, A. L. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, 14676-14683.
- (95) Terrettaz, S.; Mayer, M.; Vogel, H. *Langmuir* **2003**, 19, 5567-5569.
- (96) Loessner, D.; Kessler, H.; Thumshirn, G.; Dahmen, C.; Wiltschi, B.; Tanaka, M.; Knoll, W.; Sinner, E.-K.; Reuning, U. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 4524-4533.
- (97) Romer, W.; Steinem, C. *Biophysical journal* **2004**, 86, 955-965.
- (98) Romer, W.; Lam Yuen, H.; Fischer, D.; Watts, A.; Fischer Wolfgang, B.; Goring, P.; Wehrspohn Ralf, B.; Gosele, U.; Steinem, C. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 16267-16274.
- (99) Yoshina-Ishii, C.; Boxer, S. G. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 3696-3697.
- (100) Reviakine, I.; Brisson, A. *Langmuir* **2001**, 17, 8293-8299.
- (101) Larsson, C.; Rodahl, M.; Hook, F. *Analytical chemistry* **2003**, 75, 5080-5087.
- (102) Lenz, P.; Ajo-Franklin, C. M.; Boxer, S. G. *Langmuir* **2004**, 20, 11092-11099.
- (103) Reviakine, I.; Bergsma-Schutter, W.; Brisson, A. *Journal of Structural Biology* **1998**, 121, 356-361.
- (104) Richter, R. P.; Him, J. L. K.; Brisson, A. *Materials Today* **2003**, 6, 32-37.
- (105) Richter, R.; Mukhopadhyay, A.; Brisson, A. *Biophysical Journal* **2003**, 85, 3035-3047.
- (106) Richter, R. P.; Brisson, A. *Langmuir* **2004**, 20, 4609-4613.
- (107) Richter, R. P.; Maury, N.; Brisson, A. R. *Langmuir* **2005**, 21, 299-304.
- (108) Raedler, J.; Strey, H.; Sackmann, E. *Langmuir* **1995**, 11, 4539-4548.
- (109) Keller, C. A.; Kasemo, B. *Biophysical Journal* **1998**, 75, 1397-1402.
- (110) Starr, T. E.; Thompson, N. L. *Langmuir* **2000**, 16, 10301-10308.
- (111) Reimhult, E.; Hoeoek, F.; Kasemo, B. *Langmuir* **2003**, 19, 1681-1691.
- (112) Reimhult, E.; Hook, F.; Kasemo, B. *Journal of Chemical Physics* **2002**, 117, 7401-7404.
- (113) Seantier, B.; Breffa, C.; Felix, O.; Decher, G. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, 109, 21755-21765.
- (114) Reimhult, E.; Hook, F.; Kasemo, B. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys FIELD Full Journal Title:Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* **2002**, 66, 051905.
- (115) Svedhem, S.; Dahlborg, D.; Ekeroth, J.; Kelly, J.; Hoeoek, F.; Gold, J. *Langmuir* **2003**, 19, 6730-6736.
- (116) Richter, R. P.; Brisson, A. *Langmuir* **2003**, 19, 1632-1640.
- (117) Reviakine, I.; Bergsma-Schutter, W.; Mazeret-Dubut, C.; Govorukhina, N.; Brisson, A. *Journal of Structural Biology* **2000**, 131, 234-239.
- (118) Sackmann, E. *Science* **1996**, 271, 43-48.
- (119) Boxer, S. G. *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, 4, 704-709.
- (120) Rodahl, M.; Hook, F.; Krozer, A.; Brzezinski, P.; Kasemo, B. *Review of Scientific Instruments* **1995**, 66, 3924-3930.

- (121) Hook, F.; Voros, J.; Rodahl, M.; Kurrat, R.; Boni, P.; Ramsden, J. J.; Textor, M.; Spencer, N. D.; Tengvall, P.; Gold, J.; Kasemo, B. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces* **2002**, *24*, 155-170.
- (122) Hoeoek, F.; Rodahl, M.; Brzezinski, P.; Kasemo, B. *Langmuir* **1998**, *14*, 729-734.
- (123) Muratsugu, M.; Ohta, F.; Miya, Y.; Hosokawa, T.; Kurosawa, S.; Kamo, N.; Ikeda, H. *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 2933-2937.
- (124) Li, J.; Thielemann, C.; Reuning, U.; Johannsmann, D. *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, *20*, 1333-1340.
- (125) Picart, C.; Lavalle, P.; Hubert, P.; Cuisinier, F. J. G.; Decher, G.; Schaaf, P.; Voegel, J. C. *Langmuir* **2001**, *17*, 7414-7424.
- (126) Plunkett, M. A.; Claesson, P. M.; Ernstsson, M.; Rutland, M. W. *Langmuir* **2003**, *19*, 4673-4681.
- (127) Halthur, T. J.; Elofsson, U. M. *Langmuir* **2004**, *20*, 1739-1745.
- (128) Huebsch, E.; Ball, V.; Senger, B.; Decher, G.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P. *Langmuir* **2004**, *20*, 1980-1985.
- (129) Ferreyra, N.; Coche-Guerente, L.; Fatisson, J.; Lopez Teijelo, M.; Labbe, P. *Chemical Communications* **2003**, 2056-2057.
- (130) Irwin, E. F.; Ho, J. E.; Kane, S. R.; Healy, K. E. *Langmuir* **2005**, *21*, 5529-5536.
- (131) Munro, J. C.; Frank, C. W. *Langmuir* **2004**, *20*, 3339-3349.
- (132) Van der Heyden, A.; Wilczewski, M.; Labbe, P.; Auzely, R. *Chemical Communications* **2006**, 3220-3222.
- (133) Reimhult, E.; Hook, F.; Kasemo, B. *Physical Review E: Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* **2002**, *66*, 051905/051901-051905/051904.
- (134) Seantier, B.; Breffa, C.; Felix, O.; Decher, G. *Nano Letters* **2004**, *4*, 5-10.
- (135) Keller, C. A.; Glasmaster, K.; Zhdanov, V. P.; Kasemo, B. *Physical Review Letters* **2000**, *84*, 5443-5446.
- (136) Voinova, M. V.; Rodahl, M.; Jonson, M.; Kasemo, B. *Physica Scripta* **1999**, *59*, 391-396.
- (137) Rodahl, M.; Hook, F.; Fredriksson, C.; Keller, C. A.; Krozer, A.; Brzezinski, P.; Voinova, M.; Kasemo, B. *Faraday Discussions* **1997**, *107*, 229-246.
- (138) Richter, R. P.; Brisson, A. R. *Biophysical Journal* **2005**, *88*, 3422-3433.
- (139) Jule, E.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. *Langmuir* **2002**, *18*, 10334-10339.
- (140) Duverger, E.; Frison, N.; Roche, A.-C.; Monsigny, M. *Biochimie* **2003**, *85*, 167-179.
- (141) Matsumura, K.; Higashida, K.; Ishida, H.; Hata, Y.; Yamamoto, K.; Shigeta, M.; Mizuno-Horikawa, Y.; Wang, X.; Miyoshi, E.; Gu, J.; Taniguchi, N. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 15700-15708.
- (142) Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Mann, D. A.; Owen, R. M.; Kiessling, L. L. *Analytical Biochemistry* **2002**, *305*, 149-155.
- (143) Cairo, C. W.; Gestwicki, J. E.; Kanai, M.; Kiessling, L. L. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 1615-1619.
- (144) Ostuni, E.; Yan, L.; Whitesides, G. M. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces* **1999**, *15*, 3-30.
- (145) Quinn, J. G.; O'Neill, S.; Doyle, A.; McAtamney, C.; Diamond, D.; MacCraith, B. D.; O'Kennedy, R. *Analytical Biochemistry* **2000**, *281*, 135-143.
- (146) Quinn, J. G.; O'Kennedy, R.; Smyth, M.; Moulds, J.; Frame, T. *Journal of Immunological Methods* **1997**, *206*, 87-96.
- (147) Raether, H. *Physics of Thin Films* **1977**, *9*, 145-261.
- (148) Welford, K. *Optical and Quantum Electronics* **1991**, *23*, 1-27.
- (149) Reimhult, E.; Larsson, C.; Kasemo, B.; Hook, F. *Analytical chemistry* **2004**, *76*, 7211-7220.

- (150) Hook, F.; Kasemo, B.; Nylander, T.; Fant, C.; Sott, K.; Elwing, H. *Analytical chemistry* **2001**, *73*, 5796-5804.
- (151) Loefaas, S.; Malmqvist, M.; Roennberg, I.; Stenberg, E.; Liedberg, B.; Lundstroem, I. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **1991**, *B5*, 79-84.

CHAPITRE II

Chapitre II. Influence de la présentation multiple de sucre offerte par les RAFT sur l'interaction sucre-lectine

I. Introduction

La multivalence est devenue un sujet central en biochimie¹ depuis qu'il est apparu clairement qu'elle gouverne de nombreuses interactions entre des protéines et des petites molécules, entre des protéines ou des anticorps et des membranes cellulaires, entre des virus et des cellules, etc². Parmi elles, les interactions sucre-protéine sont particulièrement étudiées, parce qu'elles jouent un rôle essentiel dans les événements de reconnaissance membranaire, avec par exemple, la liaison du virus influenza aux membranes cellulaires³⁻⁹, ainsi que dans la reconnaissance effectuée par « les protéines se liant au sucre » : les lectines¹⁰⁻¹⁹, pour lesquelles la concanavoline A (qui sera nommée dans l'ensemble de ce chapitre, Con A) sert la plupart du temps de système modèle²⁰⁻²⁴.

Dans ce chapitre, il sera discuté de l'effet de la présentation multivalente de sucre mannose sur l'interaction avec la lectine concanavoline A. La présentation multivalente des sucres sera assurée par l'utilisation de la molécule spécifique synthétique RAFT qui permet l'exposition d'une ou de quatre têtes sucres à sa surface.

Deux approches ont alors été utilisées : soit l'immobilisation des sucres sur la surface, soit l'immobilisation de la lectine afin de garantir une meilleure compréhension des effets statistique/proximité des sucres sur l'affinité de l'interaction sucre-lectine. Les études ont été effectuées en utilisant deux techniques en temps réel complémentaires : la QCM-D et la SPR. Ces techniques nous ont ainsi permis de caractériser la fonctionnalisation de nos surfaces et de suivre les cinétiques d'interaction de la lectine ou des architectures oligosaccharidiques.

Nous allons, au préalable, introduire des généralités concernant les interactions sucre-lectine en définissant plus particulièrement les acteurs de l'interaction et leur implication dans les phénomènes de reconnaissance.

I.1. Généralités

I.1.1 Les sucres

Les hydrates de carbone ou sucres constituent l'une des classes de molécules les plus abondantes, les plus largement réparties et les plus variées fonctionnellement. Ils remplissent des fonctions diverses et variées. Associés aux protéines et aux lipides au niveau de la surface cellulaire, ils participent aux fonctions physiologiques et pathologiques²⁵. Les sucres les plus étudiés pour leur interaction avec des lectines sont le mannose, le galactose, le glucose, le lactose ou encore le fucose (Figure 1)

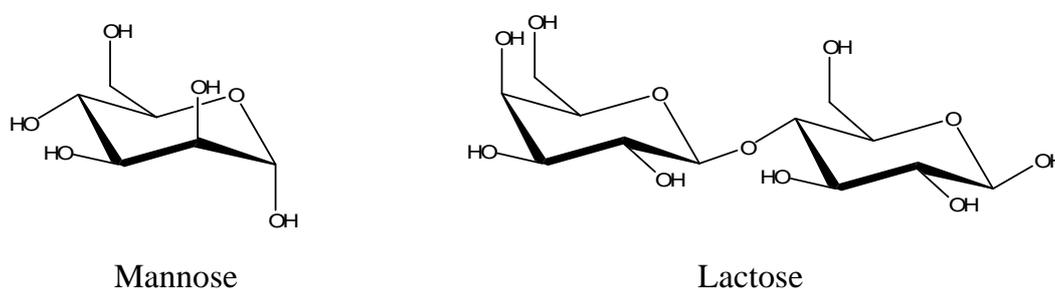


Figure 1 : Structure chimique semi-développée des sucres mannose et lactose.

I.1.2 Les lectines

Les lectines, définies comme des protéines se liant aux sucres, existent dans la plupart des organismes vivants, allant des virus et bactéries aux plantes et animaux. Elles sont impliquées dans de nombreux procédés biologiques d'espèces diverses²⁶, tels que l'élimination des glycoprotéines du système circulatoire^{27, 28}, l'adhésion d'agents infectieux aux cellules hôtes²⁹⁻³¹, les interactions cellulaires dans le système immunitaire, ainsi que dans la malignité et les métastases^{32, 33}.

Chaque molécule de lectine contient typiquement au moins deux sites de liaison sucre, *i.e.* elles sont di- ou polyvalentes. L'affinité des lectines pour les monosaccharides est faible, avec des constantes d'association à l'échelle du millimolaire. Pourtant l'interaction sucre-lectine s'avère être d'une très haute spécificité. En effet, les lectines spécifiques du galactose (par exemple la lectine PNA) ne réagiront ni avec le glucose ni avec le mannose, comme celles spécifiques du mannose (la Con A) ne réagiront pas au galactose. Ainsi, les lectines végétales, sans tenir compte de leur spécificité, se lient aux ligands à travers les chaînes latérales d'une constellation de trois résidus de site combinés invariants, un acide aspartique, une asparagine,

et un acide aminé aromatique^{34, 35} ou une leucine³⁶. L'acide aminé aromatique joue un rôle clef dans la liaison avec le ligand ; l'acide aspartique et l'asparagine participent quant à eux à la coordination de l'ion calcium présent dans tous les membres de cette famille, ce qui montre la nécessité de cet ion métallique pour la liaison avec l'oligosaccharide. La distinction du sucre se fait alors par son orientation différente dans les sites de combinaison des lectines. Les lectines interagissent avec les sucres de façon non covalente et leur liaison est habituellement réversible et de haute spécificité^{37, 38}.

La première lectine pure, la concanavaline A (issue de la cacahouète) a été isolée en 1919 par James Sumner³⁹, qui a également montré en 1936 sa spécificité vis-à-vis du mannose et du glucose⁴⁰.

L'abondance relative de cette lectine dans la cacahouète, sa facilité de fabrication, ainsi que le grand nombre de saccharides avec lesquels elle peut interagir en a fait la lectine la plus couramment utilisée comme modèle. Cette lectine présente la possibilité de pouvoir se lier de façon multiple⁴¹ à des motifs mannose. A pH < 5, la lectine se présente sous la forme d'un dimère. A pH > 7, donc au pH physiologique auquel nous nous sommes placés pour nos études, la Con A existe sous forme d'un tétramère avec quatre sous unités identiques, chacune présentant un site de reconnaissance sucre (Figure 2).

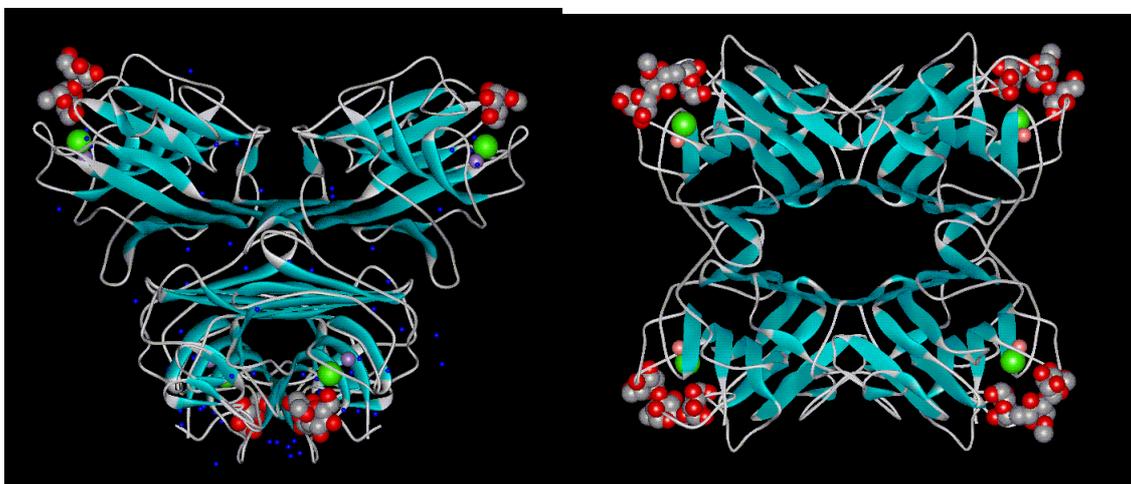


Figure 2 : Schéma représentant la modélisation de la lectine Con A (bleu) complexée avec le sucre mannose (sphères rouge et grise). Deux vues différentes sont proposées.

Sa spécificité pour les unités noyau ayant une branche trimannoside, localisées dans les liens N-glycosidique des glycoprotéines souvent associées aux surfaces cellulaires, a fait de la Con A un outil essentiel dans les études histochimiques⁴². Cette lectine a également été utilisée dans une variété d'applications, telles que les études de multivalence, les analyses de liaison

et les techniques d'affinité⁴³⁻⁴⁸. Elle a aussi fait l'objet de nombreuses études de caractérisation afin d'étudier son affinité avec différents oligosaccharides par SPR^{45, 49}, par AFM^{50, 51}, par ITC²⁴ (Isothermal Titration Microcalorimetry) ainsi que récemment par microgravimétrie (QCM)⁵².

La partie centrale de ce chapitre a été de quantifier l'amélioration de la force de la liaison entre la lectine Con A et le sucre mannose présenté de manière multiple via la molécule RAFT.

I.2. Les interactions sucre – lectine

I.2.1 L'intérêt biologique

Bien qu'une large gamme d'événements importants en biologie soit contrôlée par des interactions sucre-protéine, plusieurs états de maladie impliquent un motif de reconnaissance sucre. Des événements précoces dans les cycles infectieux de certaines bactéries, de virus, de mycoplasmes (bactéries provoquant des infections pulmonaires ou génitales), et de parasites nécessitent une reconnaissance, via l'intermédiaire d'oligosaccharide, des hôtes par le pathogène, de la même manière que fonctionnent certains processus métastatiques. La capacité de contrôler ces événements avec de petites molécules sélectives et inhibitrices offre un énorme potentiel pour les études biologiques. D'un autre côté, comme on l'a vu précédemment, beaucoup de ligands saccharidiques monovalents se lient à leur récepteur protéinique de façon relativement faible de l'ordre de 10^{-3} - 10^{-4} M⁻¹. Indubitablement, le contrôle *in vivo* effectif de ces événements dépendant de l'interaction sucre-protéine requiert une affinité hautement plus forte. Contre cette faiblesse de l'interaction, le développement de petits ligands présentant de multiples domaines de reconnaissance sucre pour les lectines est apparu comme un moyen simple d'augmenter l'affinité de liaison. En effet, si la nature a circonvenu les limitations de la faiblesse des liaisons par la multivalence, il semble raisonnable de penser que les ligands multivalents synthétiques devraient se lier avec une meilleure affinité que leur homologue monovalent. Cet effet mis en avant en 1995 par Lee et *al.*, est depuis lors connu sous le nom très général de « glycoside cluster effect »⁵³.

Dans ce contexte, quelques petits ligands multivalents, présentant des entités sucre très proches, c'est-à-dire qui ne peuvent pas se lier de façon multiple à plusieurs sites d'une même lectine, ont aussi démontré une efficacité meilleure que leur homologue monovalent^{17, 54, 55}. Cette amélioration peut être attribuée aussi bien à un effet de concentration locale en sucre,

également défini comme un effet de proximité/statistique^{56, 57} qu'à un effet de « cluster » de la lectine par le ligand multivalent, ce dernier effet ayant été rarement démontré⁵⁵. Ces différentes possibilités, apparentées au « glycoside cluster effect », sont présentées dans la Figure 3. Dans le cadre de ces études nous avons négligé la présence d'un éventuel site secondaire de reconnaissance des lectines.

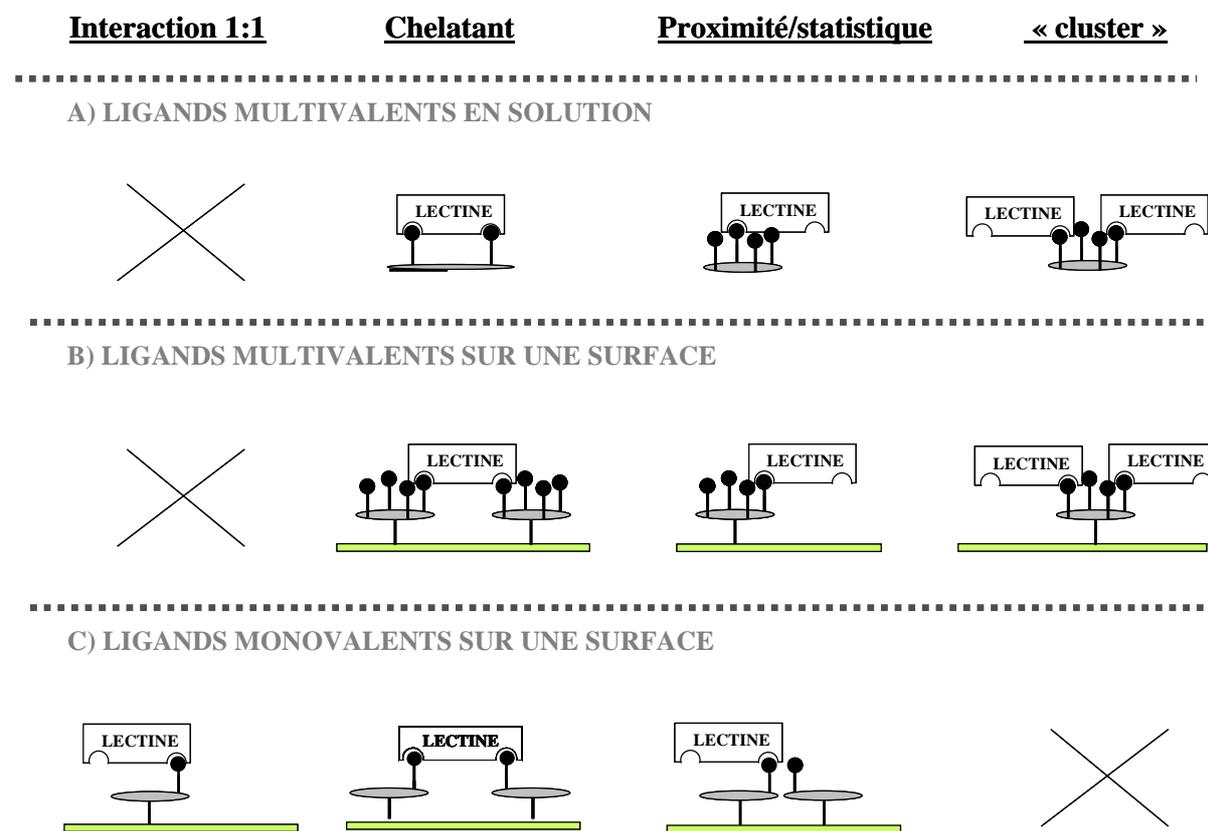


Figure 3 : Représentation schématique des différents mécanismes d'interaction dont les trois principaux responsables du « glycoside cluster effect » (effets chelatant, de proximité/statistique et « cluster ») dans le cas d'une interaction entre des lectines et A) des ligands multivalents en solution, B) des ligands multivalents immobilisés sur une surface et C) des ligands monovalents immobilisés sur une surface.

Pour les études en solution (Figure 3 A)), l'amélioration de l'affinité de l'interaction entre un ligand multivalent et une lectine (bivalente) peut être due à trois mécanismes apparentés au « glycoside cluster effect » : c'est à dire soit un effet de chélation entre la lectine et plusieurs motifs sucre du même ligand, soit une effet de proximité des sucres qui facilite la vitesse de la reconnaissance ou encore par un effet de « cluster » du ligand multivalent sur la lectine. Ce dernier phénomène a été rarement démontré, car, en effet la plupart du temps il conduit à la précipitation des complexes formés. Pour les ligands monovalents, le système devient beaucoup plus simple, l'interaction devient monovalente et ne présente plus de « glycoside

cluster effect ». Concernant les études aux surfaces, y compris pour les ligands monovalents on retrouve les effets chelatatant (Figure 3 C)). En effet, sur une surface, l'immobilisation des ligands à proximité les uns des autres conduit à la formation d'une surface multivalente même lorsque le ligand est monovalent. Une dilution de la surface en ligand permet souvent de faire la distinction entre ces différents effets.

C'est dans ce contexte, que nous avons utilisé une molécule développée et synthétisée dans notre équipe depuis plusieurs années, appelée RAFT, pour *Regioselectively Adressable Functionalized Template*. Cette molécule présente, en effet, grâce aux chimistes organiciens de notre équipe, la possibilité d'immobiliser à proximité et de façon multivalente (de 1 à 16) des ligands à motifs biologiques (sucre, peptide, ...).

I.2.2 La molécule RAFT

I.2.2.1. Son architecture et ses aptitudes

Durant ces dernières années, notre équipe a développé un nouvel outil moléculaire qui combine des propriétés de reconnaissance et de possible effecteur pour des applications biologiques diverses telles que le rôle de vecteurs pour le ciblage de néo-vaisseaux⁵⁸ (voir chapitre III), d'imitateurs de surface cellulaire⁵⁹, de vaccins synthétiques anti-tumoraux⁶⁰, ou de marqueurs de tumeurs⁶¹. Notre approche utilise une plate-forme cyclodécapeptidique basée sur un modèle TASP (Template Assembled Synthetic Proteins) qui a déjà été précédemment décrit comme un nouveau modèle de conception de protéine⁶². Ces plate-formes topologiques nommée « RAFT », exhibent deux « faces » réactives différentes, spatialement séparées et indépendamment fonctionnalisables : le domaine de détection et le domaine de reconnaissance (Figure 4).

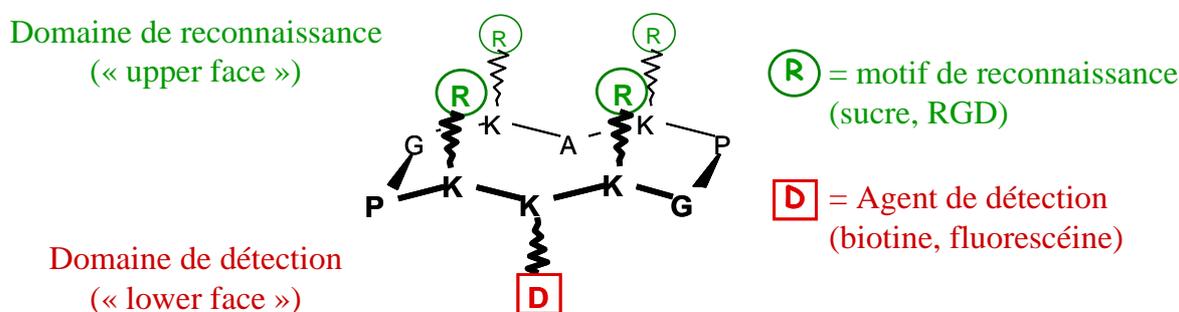


Figure 4 : Représentation schématique de la molécule RAFT

Ces caractéristiques structurales permettent alors un assemblage régiosélectif et séquentiel de ligands de base biomoléculaire (domaine de détection) et d'unités biologiquement fonctionnelles (domaine de reconnaissance)^{63, 64}.

Nos collègues ont démontré récemment que la proximité de ligands oligosaccharide présentés à la surface des molécules RAFT garantit une reconnaissance spécifique et une amélioration significative de l'affinité de la liaison avec la lectine via l'utilisation d'interactions multivalentes en solution⁵⁹ et sur des supports solides^{65, 66}. En solution, notamment, une étude préliminaire en anisotropie de fluorescence⁵⁹ a montré que la molécule RAFT, exhibant sur sa face de reconnaissance 4 sucres mannose (RAFT-(Man)₄, cf Figure 4), présente une meilleure reconnaissance pour la lectine Con A que son homologue monovalent (RAFT-(Man)₁). Il est cependant important de noter à ce stade, que la distance entre deux sucres mannose d'une même molécule RAFT, ~ 25 Å (estimée en modélisation moléculaire), est plus faible que la distance entre deux sites de reconnaissance d'une même lectine Con A, ~ 65 Å⁶⁷. Il est donc physiquement impossible qu'une même molécule RAFT se lie de façon multivalente à une même lectine (effet chelatant, Figure 3 A)). Il semble alors que seuls les deux autres effets (« cluster » ou proximité/statistique, Figure 3) puissent être à l'origine de cette amélioration de l'affinité.

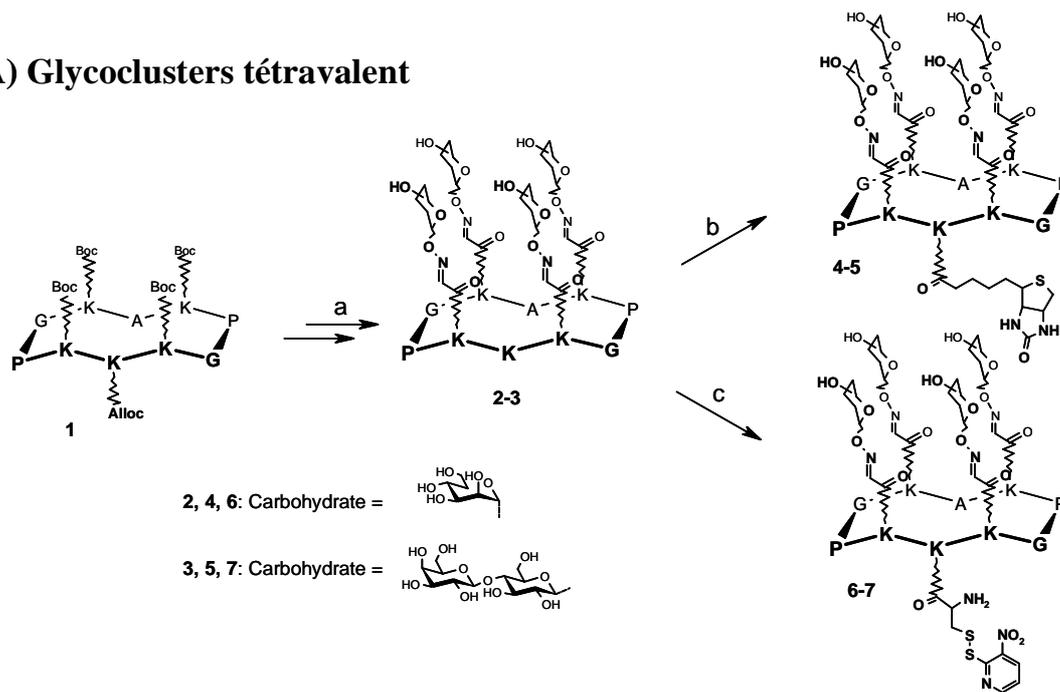
Pour les études sur support solide, des tests ELISA ont également confirmé cette amélioration de l'affinité de la Con A pour les surfaces fonctionnalisées par la molécule RAFT-(Man)₄^{65, 66} par rapport à son homologue monovalent, la molécule RAFT-(Man)₁. Cependant les études aux interfaces, compte tenu de la faible taille des ligands sucre par rapport à la lectine et de la proximité des ligands entre eux, font que l'on travaillera forcément sur des surfaces dites multivalentes, même dans le cas de ligands monovalents. Cette amélioration de l'affinité semble montrer que même si la présentation multivalente de ligands sucre est importante, le contrôle de la densité locale est également primordial.

I.2.2.2. Sa synthèse

Dans le but de mieux comprendre les procédés de reconnaissance entre des ligands multivalents immobilisés et une lectine modèle, la Con A, nous avons conçu et synthétisé, au sein de notre équipe, des molécules RAFT exposant à la fois des « clusters » de sucres et des éléments d'ancrage pour permettre l'immobilisation de la molécule sur des surfaces d'or ou de streptavidine.

Des molécules RAFT portant 4 sucres mannose ou 4 sucres lactose (respectivement RAFT-(Man)₄ ou RAFT-(Lac)₄) ont été synthétisées grâce à une stratégie de lien oxime chimiosélective et convergente (Figure 5). Afin d'évaluer l'effet de la présentation multivalente sur l'impact de la force de l'interaction, les glycopeptides monovalents correspondant ont également été synthétisés, notés respectivement RAFT-(Man)₁ et RAFT-(Lac)₁. Ces derniers nous serviront alors de contrôle.

A) Glycoclusters tétravalent



B) Glycoclusters monovalent

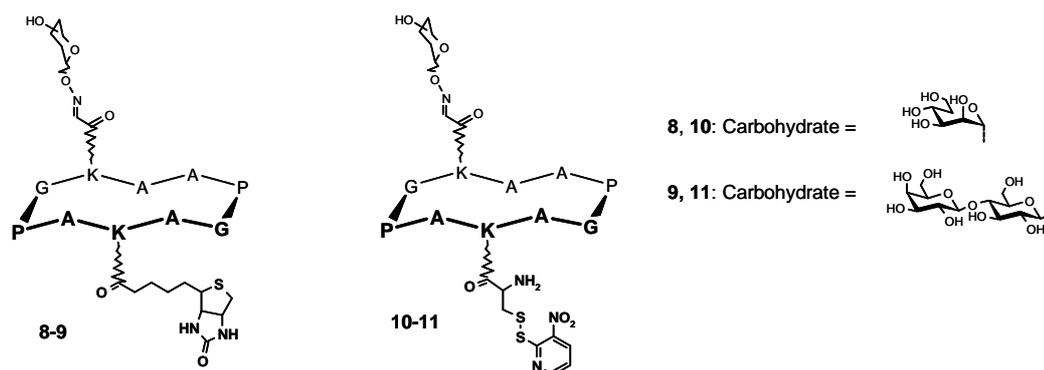


Figure 5: Synthèses de glycoclusters tétravalents (A) et monovalents (B). *Réactifs et conditions*: a) Voir référence,⁶⁶ b) biotine-OSu, DIEA, DMF; c) BocCys(Npys)-OSu, DIEA, DMF. Afin de faciliter la lecture du manuscrit, les molécules 2, 4, 6 seront appelées RAFT-(Man)₄, les molécules 8, 10 seront nommées RAFT-(Man)₁. De la même manière, les molécules 3, 5, 7 seront appelées RAFT-(Lac)₄ et les molécules 9, 11 seront nommées RAFT-(Lac)₁.

L'ensemble des étapes de la synthèse de la molécule RAFT (molécule **1**) ne sera pas détaillé dans ce manuscrit mais est disponible dans la littérature⁶⁸. Concernant la fonctionnalisation de la plate-forme RAFT, nous allons rapidement évoquer les étapes principales de la synthèse qui a été effectuée par le Dr Olivier Renaudet.

Un décapeptide linéaire est, au préalable, synthétisé sur une phase solide selon la stratégie standard Fmoc/*t*Bu qui utilise un synthétiseur de peptide parallèle ; ensuite ce dernier est cyclisé en solution pour donner le cyclodecapeptide **1** protégé orthogonalement. Après avoir générer des fonctions aldéhydes à partir de fonction sérine sur la face supérieure de la plate-forme, le mannose et le lactose aminoxylatés⁶⁹ sont alors introduits via un lien oxime pour donner les glycoclusters **2** et **3**. Pour cette étude, le domaine de reconnaissance se composera d'une ou de quatre têtes sucres mannose ou lactose (Figure 5). Les sucres lactose, non reconnaissants de la lectine Con A, serviront de contrôle négatif afin de vérifier la spécificité de l'interaction entre la Con A et les RAFT présentant 1 ou 4 mannoses.

La seconde face, le domaine de détection, sera fonctionnalisée selon le besoin. Dans notre cas afin de permettre l'ancrage de la molécule RAFT sur une surface, on greffera une entité qui sera soit une biotine soit un groupement thiol (CysNpys). La biotine est introduite sur les molécules **2** et **3** comme un ester actif sur la chaîne latérale de lysine qui pointe sur la face inférieure opposée. Cette réaction se déroule dans le DMF sous pH basique et permet l'obtention des composés **4** et **5**, après une phase de purification HPLC, avec un rendement de l'ordre de 70 %. Concernant le groupement thiol, les composés **2** et **3** sont fonctionnalisés avec un résidu cystéine portant le groupe actif *S*-3-nitro-2-pyridinesulfenyle (Npys) sur la chaîne latérale. BocCys(Npys) est couplé à la lysine libre comme un ester succinique dans le DMF. Le groupe Boc est ensuite éliminé par traitement avec une solution de TFA et par une purification RP-HPLC et l'on obtient alors les molécules **6** et **7** qui peuvent être facilement immobilisées sur une surface d'or.

Pour une facilité de lecture du manuscrit, les molécules 8,10 et 2, 4, 6 seront respectivement appelées RAFT-(Man)₁, RAFT-(Man)₄, et les molécules 9, 11 et 3, 5, 7 seront nommées RAFT-(Lac)₁ et RAFT-(Lac)₄. Lorsque nous parlerons en général des RAFT présentant 1 et 4 sucres mannoses ou lactoses, ils seront nommés RAFT-Man ou RAFT-Lac. Le domaine de détection sera signalé dans chaque paragraphe pour éviter d'alourdir la nomenclature de la molécule.

II. L'interaction lectine Con A – RAFT-Man

Dans cette première partie, nous avons voulu mettre en évidence l'avantage de la présentation multivalente de sucre par la molécule RAFT sur l'affinité de l'interaction avec la lectine Con A en essayant de mettre en avant le ou les effets responsables de cette amélioration de la force de liaison. Les études ont été effectuées via l'utilisation de deux techniques de détection aux surfaces, la QCM-D et la SPR. Un des deux partenaires doit alors être immobilisé. La première approche entreprise, a été l'immobilisation des glycopeptides RAFT sur la surface.

II.1. Etude avec le RAFT immobilisé

L'immobilisation du RAFT sur une surface a été réalisée par deux voies de greffage du RAFT : la première via un pont biotine-streptavidine (SA) et la seconde via un couplage covalent de groupements thiol sur une surface d'or.

La situation, cependant, devient d'autant plus complexe lorsque les ligands sucre sont immobilisés sur une surface. En effet, la surface fonctionnalisée par les ligands sucre devient multivalente. Il sera donc difficile de différencier l'effet de la présentation multivalente locale des sucres (dans le cas d'un ligand multivalent) de l'effet chelatant induit par la proximité des ligands à la surface (Figure 3). Afin de pouvoir mettre en avant l'effet de proximité/statistique qui nous intéresse avec les ligands multivalents, les surfaces ont donc été fonctionnalisées avec des densités variables en ligand RAFT.

II.1.1 Etude par QCM-D

L'ensemble des expériences présentées dans cette partie a été réalisé à 24°C. Le premier mode d'immobilisation des RAFT a été l'utilisation d'un pont biotine-streptavidine via l'intermédiaire d'un cristal 2D de streptavidine élaboré à la surface d'une bicouche lipidique supportée.

II.1.1.1. Immobilisation de RAFT biotinylés à la surface d'un cristal 2D de streptavidine

Lors de nos premières études, nous avons décidé d'utiliser, comme plate-forme d'ancrage des molécules RAFT biotinylés, un cristal 2D de streptavidine élaboré à la surface d'une bicouche lipidique supportée (notée BLS). Ce choix a été motivé par plusieurs raisons :

- L'élaboration d'une telle plateforme, décrite en détail dans la littérature, est parfaitement reproductible⁷⁰⁻⁷². Les caractéristiques géométriques du cristal 2D de streptavidine sont définies, ce qui permet le contrôle de l'orientation et de la densité surfacique lors de la fixation des RAFT biotinylés.

- La QCM-D constitue une technique particulièrement bien adaptée pour caractériser, étape par étape, la construction de ce type d'assemblage.

- Les BLS peuvent être élaborées sur des surfaces de mica. La fonctionnalisation de ce substrat, atomiquement plan, par les ligands RAFT est particulièrement intéressante en vue d'études futures par microscopie de champs proche (AFM).

Les BLS sont obtenues par adsorption, puis fusion de vésicules unilamellaires de petites tailles (SUV) sur des surfaces hydrophiles (silice ou mica). L'utilisation de BLS dopées par des phospholipides biotinylés permet alors la formation d'un cristal bidimensionnel de streptavidine, à la surface duquel les RAFT biotinylés peuvent être immobilisés grâce à l'interaction forte et difficilement réversible entre les groupes biotine et la streptavidine.

Toutes les études de QCM-D effectuées dans cette partie ont été faites en mode d'échange (mode « batch »).

II.1.1.1.1. Formation des vésicules de petite taille (SUV)

- Mise au point expérimentale

Les premières vésicules formées ont été des SUV se composant de 100% de 1 – palmitoyl – 2 – oleoyl – sn – glycerol – 3 – phosphatidylcholine (POPC) afin de valider le protocole de formation des vésicules. Nous avons choisi d'utiliser le protocole de B. J. Litman⁷³ qui consiste en une sonication suivie d'une ultracentrifugation.

Les lipides sont initialement solubilisés dans une solution de chloroforme à 10 mg/ml. 500 µL de cette solution sont prélevés et déposés dans un cône où le chloroforme est évaporé sous flux d'azote pendant une heure minimum. Les phospholipides sont ensuite redispersés dans

une solution tampon de TRIS (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7,4) dégazé afin de former une solution de concentration 2 mg/mL en phospholipides.

Cette solution est ensuite soniquée pendant une heure avec des cycles de 5 secondes de sonication (83 Watts) et 5 secondes de refroidissement à 0°C. La solution opaque blanchâtre initiale devient au fur et à mesure de plus en plus transparente. A cette étape, on a formé de petites vésicules de taille hétérodispersée. Afin d'homogénéiser la taille des vésicules notamment via l'élimination des vésicules multilamellaires et de celles de grande taille, la solution est ensuite ultracentrifugée pendant 3 heures à 47000 g et à 4°C. Le surnageant est alors récupéré. On obtient alors des SUV de taille monodispersée qui sont ensuite aliquotées dans des tubes Eppendorf et stockées au réfrigérateur. La dispersion est alors utilisable un mois. La concentration de la solution de SUV récupérée sera considérée égale à 2 mg/mL.

Ces SUV ont été caractérisées par diffusion de la lumière et par cryoTEM afin de déterminer la taille, la polydispersité et de vérifier l'absence de vésicules multilamellaires (Figure 6). Pour la diffusion de la lumière, on a utilisé un zétasizer nano série (Malvern instrument) qui nous a permis de déterminer par la méthode des cumulants un diamètre hydrodynamique moyen des SUV de 29-34 nm avec un indice de polydispersité de 0,13 environ. Cet indice de polydispersité inférieur à 0,25 tendrait à confirmer que la solution est majoritairement monodispersée.

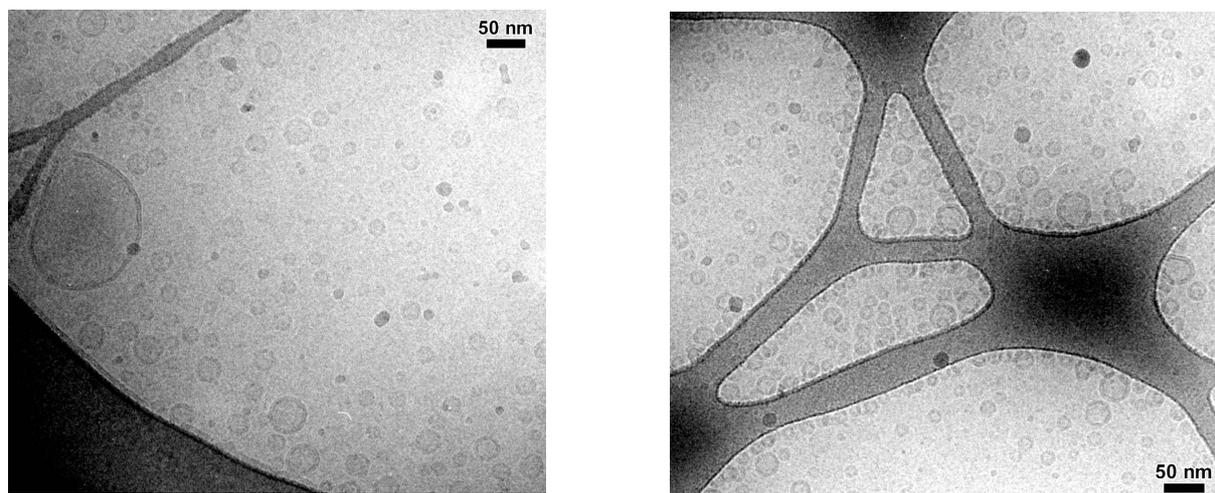


Figure 6: Image en CryoTEM de SUV composées à 100 % de POPC dans le tampon TRIS à une concentration de 2 mg/ml.

L'étude par CryoTEM (Figure 6) montre une grande proportion de vésicules unilamellaires d'un diamètre compris entre 30 et 40 nm, mais on trouve également en faible quantité des vésicules de grande taille (150 à 400 nm). Malgré la présence d'une faible proportion de

vésicules de grande taille, les SUV présentent une taille assez monodisperse. Pour plus de précaution, nous avons rajouté une heure supplémentaire d'ultracentrifugation, passant ainsi de 3 à 4 heures.

- Formation des SUV biotinylées

Une fois le protocole de formation des SUV mis au point, nous sommes passés à la formation des SUV mixtes composées de 95% de POPC et de 5% de 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(cap biotinylés) (noté DPPE). Nous avons choisi cette quantité de phospholipides biotinylés car il s'avère que c'est la proportion idéale pour permettre par la suite une parfaite immobilisation de la streptavidine selon une cristallisation 2D⁷⁰. Le protocole de formation des SUV reste le même que cité précédemment (2 mL de SUV avec une concentration en lipide de 2 mg/mL). Les solutions des deux phospholipides dilués dans le chloroforme sont prélevées indépendamment puis mélangées avant que la solution de chloroforme ne soit évaporée. Dans ce cas, les lipides sont redispersés dans une solution de tampon HEPES 0,1 M ; NaCl 0,1 M ; 1 mM CaCl₂ et 1 mM MnCl₂ ; pH = 7,2 (noté par la suite WB HBS) toujours dégazé. Ce tampon sera le tampon de travail pour les études Con A/sucre car la présence des ions calcium et manganèse est nécessaire pour cette interaction. Les vésicules formées ont ensuite été caractérisées par diffusion de la lumière, via l'utilisation d'un zétasizer nano série. Les données obtenues confirment la formation de vésicules d'une taille moyenne de 35 nm pour 97.5% des SUV. Le coefficient de polydispersité obtenu 0.205, inférieur à 0.25, confirme la monodispersité de la dispersion de SUV. Les SUV stockées au réfrigérateur sont utilisables un mois environ. L'évolution des vésicules au cours du temps a été testée par diffusion de la lumière. Au bout de 2 mois, la dispersion présente un coefficient de polydispersité de 0.388 évoquant la présence de deux populations de vésicules de taille homogène, une à 31 nm (95.9 %) et l'autre à 92 nm (3.4%). Après une période de 10 mois, les vésicules fusionnent de plus en plus entre elles et l'étude en diffusion de la lumière montre que la seconde population autour de 100 nm est de plus en plus élevée (>10%).

II.1.1.1.2. Formation de la BLS

La formation de bicouche lipidique supportée sur silice a été largement étudiée par les équipes de A. Brisson et de B. Kasemo en QCM-D. La formation des BLS s'effectue par fusion de

petites vésicules unilamellaires sur une surface hydrophile, qui dans notre cas est un cristal de quartz recouvert d'or et d'une fine couche de silice (40 nm).

Pour l'ensemble des études présentées dans cette section « II.1.1 Etude par QCM-D », les surfaces ont été au préalable nettoyées et activées selon un protocole identique qui consiste, dans un premier temps, à une exposition de 10 min à l'UV-Ozone, puis dans un second temps à l'immersion d'un cristal de quartz recouvert de silice pendant 30 min dans une solution de SDS à 2 % (poids/volume). Les surfaces sont ensuite rincées abondamment à l'eau et séchées sous flux d'azote. Une dernière exposition de 10 min à l'UV-Ozone est finalement effectuée. Une fois nettoyé, la surface de silice est ensuite montée dans la chambre de mesure de la QCM-D. Les surfaces de silice une fois fonctionnalisées et utilisées pour une étude pourront être, selon ce même cycle de nettoyage mais effectué deux fois, régénérées et réutilisées un maximum de 5 fois.

La surface, une fois montée dans la chambre de mesure, est testée à sec puis dans le milieu d'étude (WB HBS) afin de vérifier les bonnes réponses de vibration du quartz à la fréquence de résonance et à ses 3 harmoniques.

L'étude commence dans le WB HBS, en effectuant une ou plusieurs injections de ce dernier sur la surface jusqu'à la stabilisation des signaux f_n/n et D_n . Les SUV sont ensuite injectées à une concentration de 0.2 mg/mL dans le WB HBS.

La BLS se forme alors en plusieurs étapes^{74, 75} (Figure 7):

- La première étape est l'adhésion des vésicules intactes à la surface jusqu'à une concentration critique. Cette étape se traduit sur le graphe par une forte augmentation de la dissipation d'énergie et par une forte diminution de la fréquence de résonance.

- La seconde étape correspond à la fusion des vésicules entre elles et à leur étalement sur la surface. Cette dernière étape s'accompagne d'une libération de l'eau prisonnière entre et à l'intérieur des vésicules, ce qui se reconnaît de façon caractéristique par une augmentation de la fréquence et par une forte diminution de la dissipation d'énergie.

La bicouche lipidique supportée obtenue est stable même après plusieurs rinçages avec le tampon.

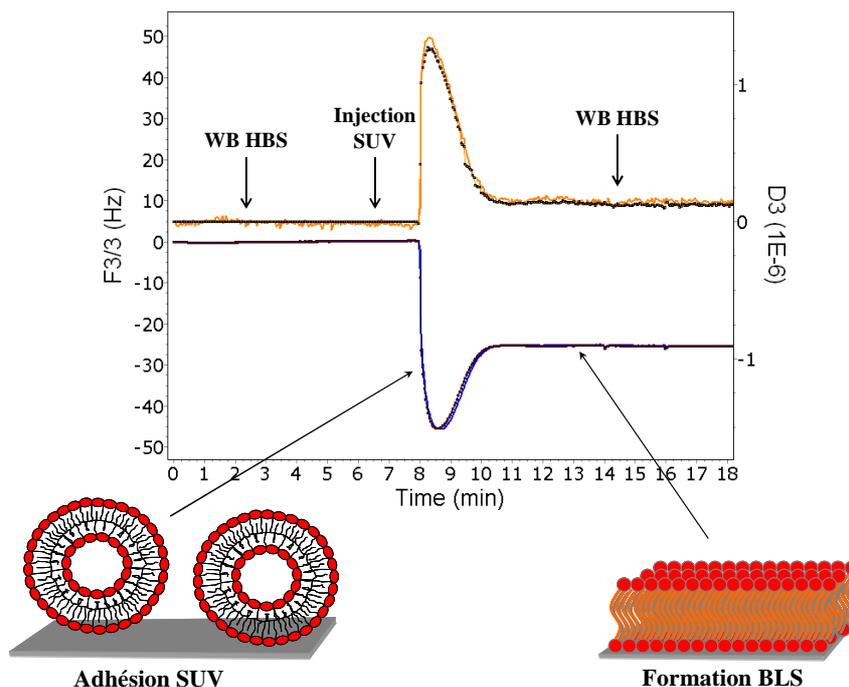


Figure 7 : Formation d'une BLS sur une surface de silice à partir de SUV biotinylées, suivie par QCM-D. En orange les variations de dissipation d'énergie en fonction du temps et en bleu celles de la fréquence. En noir la modélisation des données obtenue par le modèle de Voïnova (cf chapitre I).

Les paramètres de formation d'une bicouche lipidique^{76, 77}, correspondent à une variation de fréquence ($\Delta f_n/n$) de 26 Hz, une variation de dissipation (ΔD_n) de 0,2 - 0,3.10⁻⁶, et à une variation de masse selon l'équation de Sauerbrey (Δm_{sauer}) de 470 ng/cm². Le Tableau 1 résume l'ensemble des valeurs, Δf_3 , D_3 et Δm_{sauer} obtenues pour la formation de plusieurs BLS. Ces résultats confirment la reproductibilité aussi bien de la formation des SUV que l'obtention de bicouches lipidiques supportées rigides et stables après rinçage.

Expériences	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	Moyenne
Δf_3 (Hz)	-26,4	-25,8	-26,6	-26	-27	-26,3	-26,6	-27,7	-26,55
ΔD_3 (10-6)	0,54	0,19	0,56	0,21	0,61	0,2	0,39	0,47	0,39625
Δm_{sauer} (ng/cm ²)	464,8	458,8	475,6	462,2	478,5	467,4	471,9	487,7	470,8625

Tableau 1 : Résumé de l'ensemble des valeurs de la masse surfacique, de la fréquence et de la dissipation d'énergie de la 3^{ème} harmonique obtenues pour la formation d'une BLS.

Les BLS s'avèrent donc être une plate-forme, parfaitement contrôlée et très aisément reproductible. Dans notre cas, la fonctionnalisation des BLS par des biotines va nous permettre d'utiliser le pont biotine-streptavidine pour immobiliser les molécules RAFT biotinylées.

II.1.1.1.3. Formation de la surface 2D de streptavidine

La streptavidine est connue depuis de nombreuses années pour sa réorganisation et sa capacité de cristallisation 2D⁷⁷⁻⁸⁶. La streptavidine est une protéine tétramérique de poids moléculaire 60 kDa (4×15 KDa) qui reconnaît de façon très spécifique la biotine ($K_A = 10^{13} - 10^{15} M^{-1}$). Sur une BLS biotinylée, son immobilisation selon une cristallisation 2D a été mise en évidence par l'équipe de A. Brisson^{71, 87}. On forme alors une seconde couche parfaitement contrôlée de streptavidine.

La formation de cette seconde couche est réalisée par une injection de la solution de streptavidine (10 µg/mL dans WB HBS) sur la BLS biotinylée. La solution est laissée ensuite en contact une heure pour permettre la cristallisation 2D de la protéine à la surface. Les formes des courbes représentant Δf et ΔD sont très caractéristiques : la fréquence diminue brutalement au début de l'association puis dérive très doucement pendant une quarantaine de minutes. La dissipation, elle, augmente très rapidement puis montre une légère diminution et une stabilisation rapide au bout d'une dizaine de minutes (Figure 8). Une fois les valeurs Δf et ΔD stables, la surface est à nouveau rincée avec le WB HBS ce qui n'entraîne aucun changement sur les deux signaux.

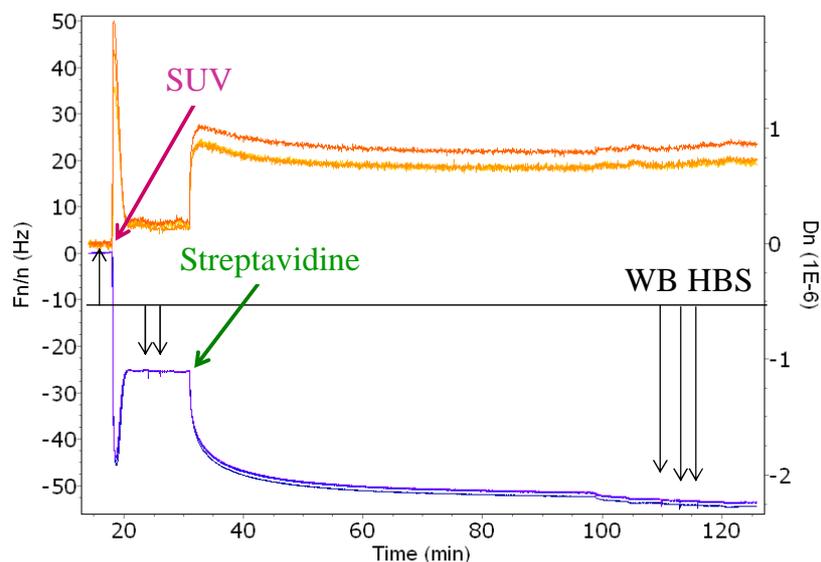


Figure 8: Formation d'une BLS biotinylée à partir de SUV (5% biotine) et d'une monocouche de streptavidine (10 µg/mL dans WB HBS) suivie par QCM-D. Le graphe montre les variations de dissipation d'énergie (courbes hautes) et de fréquence (courbes basses) en fonction du temps.

Cette étape de l'assemblage, très importante, permet de mettre en avant l'importance de la mesure de la dissipation d'énergie en QCM-D. En effet, cette cristallisation s'accompagne

d'une faible diminution de fréquence qui correspondrait pour l'équation de Sauerbrey à une légère augmentation de masse. Cependant lorsque l'on se sert du modèle viscoélastique de Voïvona, la diminution de la fréquence ne correspond à aucune variation de masse ; elle n'est que la conséquence du réarrangement de la streptavidine sur la surface⁸⁸ (Figure 9).

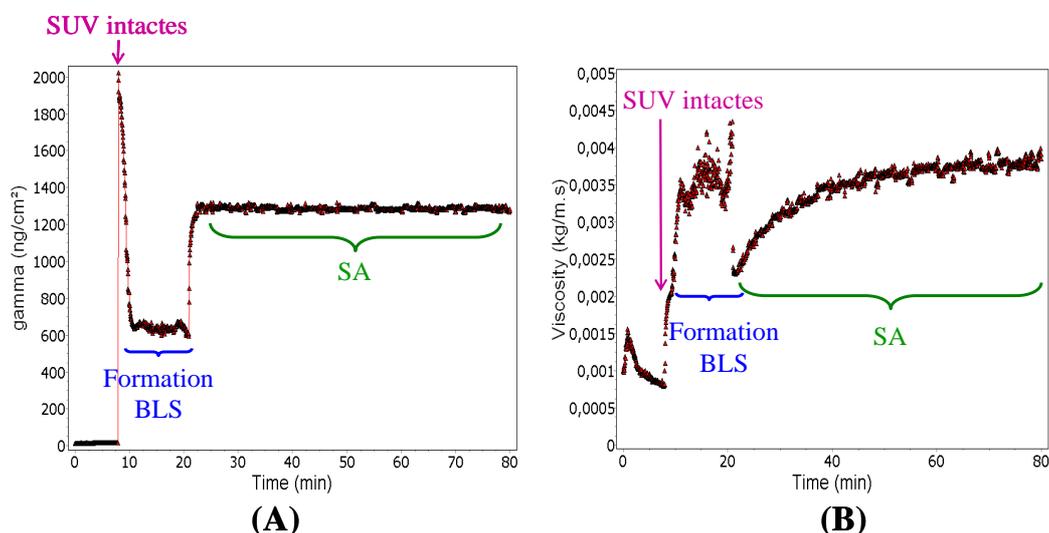


Figure 9 : Variation en fonction du temps (A) de la masse surfacique et (B) de la viscosité du film formé. Le modèle de Voïnova a été utilisé pour calculer ces paramètres à partir des données expérimentales de la Figure 8.

La comparaison sur l'ensemble des études (Tableau 2) permet de confirmer la formation d'une monocouche de streptavidine rigide³⁸. En effet, on retrouve les valeurs caractéristiques de la littérature, c'est-à-dire une variation de fréquence d'environ 30 Hz et une dissipation d'environ $0,6 \cdot 10^{-6}$, correspondant à un Δm de 520 ng/cm^2 (modèle de Voïnova).

Expériences	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	Moyenne
Δf_3 (Hz)	-33,5	-31,2	-27,5	-28,9	-27	-26,1	-28,6	-34,2	-29,625
ΔD_3 (10^{-6})	0,16	0,55	0,87	0,8	0,6	0,52	0,88	0,7	0,635
Δm (ng/cm^2)	589,4	555,4	480,1	504	463,4	456,8	511	595,2	519,4125

Tableau 2: Valeurs de la masse surfacique, de la fréquence et de la dissipation d'énergie pour la formation d'une monocouche de streptavidine sur une BLS 5% biotinylée.

Les résultats obtenus confirment la formation d'une monocouche de streptavidine à la surface. Cependant, le dépôt de la streptavidine (sur des BLS biotinylées) en monocouche se fait selon un arrangement cristallin C222 à $\text{pH} > 7$ ⁸⁹. La streptavidine présente quatre sites de reconnaissance spécifique à la biotine dont deux sites servent à son immobilisation sur la bicouche lipidique biotinylée. Les deux autres restent disponibles et permettent l'assemblage ultérieur des molécules RAFT biotinylées. Dans une première approximation, la streptavidine

dans sa forme de cristaux 2D peut être vue comme des carrés proches formant un arrangement C222-2D avec des paramètres de maille $a = b = 58 \text{ \AA}$ (Figure 10).

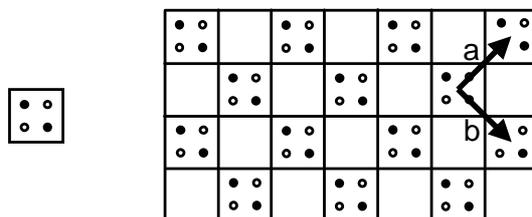


Figure 10 : Dessin schématique représentant l'arrangement 2D cristallin C222 de la streptavidine tétramérique sur une BLS 5% biotinylée. L'adhésion de la streptavidine sur la BLS biotinylée se fait par deux des quatre sites de reconnaissance de la biotine (●) et les deux autres se retrouvent face à la solution aqueuse (○).

La distance centre à centre entre deux sites adjacents de liaison biotine de la streptavidine est d'environ 25 \AA . Comme le montre la Figure 10, une grande quantité d'espace vacant entre les molécules de streptavidine est à l'origine d'une couche très hydratée. Une simple comparaison de la masse surfacique pour la formation d'une monocouche de streptavidine obtenue par QCM-D et par SPR⁷⁰ donne un pourcentage de l'eau acoustiquement couplée par rapport à la protéine de 55 :45, avec une densité effective d'environ $1,15 \text{ g.cm}^{-3}$ et une épaisseur de $4,7 \text{ nm}$ ^{70,78}.

Ainsi, cet arrangement de la streptavidine apparaît comme une plate forme particulièrement bien définie pour une distribution spatiale contrôlée de ligands biotinylés sur la surface.

II.1.1.1.4. Immobilisation des molécules RAFT biotinylées

L'immobilisation des molécules de RAFT sur la surface de streptavidine se fait grâce à la présence d'une biotine sur la face de détection du RAFT. Malgré le faible poids moléculaire de nos molécules (de 1339 à 2209 Da), la technique QCM-D permet de détecter l'adhésion instantanée des RAFT sur la surface. Elle se caractérise par une très rapide diminution de la fréquence sans variation de la dissipation (Figure 11).

La fixation des RAFT se fait par une seule injection de concentration $4 \text{ }\mu\text{M}$ dans WB HBS. Cette concentration suffit à saturer la surface en RAFT. Des essais à une plus forte concentration ($8 \text{ }\mu\text{M}$) et plusieurs injections successives n'ont, en effet, donné aucun changement. La stabilité de la réponse obtenue en QCM-D suggère que la couche de RAFT est fortement liée à la surface de streptavidine.

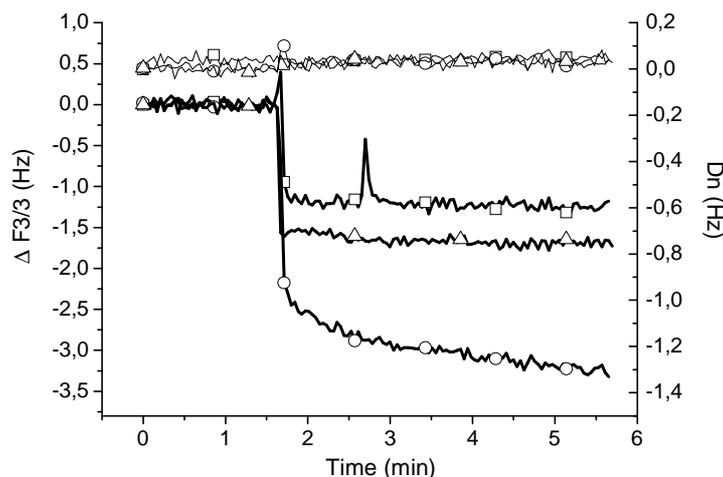


Figure 11 : Réponse en QCM-D montrant la variation de la fréquence (courbes basses) et de la dissipation (courbes hautes) de la troisième harmonique pour la fixation des RAFT-(Man)₁ (□), RAFT-(Man)₄ (○) et RAFT-(Lac)₁ (Δ).

Discussion : état de surface

Afin de vérifier l'état de la surface reconnaissante, nous avons comparé la quantité, déterminée expérimentalement, de RAFT immobilisés par rapport à la quantité théorique attendue. En prenant en compte la cristallisation 2D selon une géométrie C222 de la streptavidine, on va immobiliser, à saturation des sites de reconnaissance de la biotine d'une streptavidine, deux molécules de RAFT par molécule de streptavidine. Le calcul du recouvrement surfacique de la streptavidine donne une quantité de $4,93 \times 10^{-12}$ mol. cm⁻². En considérant la proportion de 2:1 entre le RAFT et la streptavidine, on peut déduire la quantité théorique maximale de RAFT immobilisée attendue de $9,86 \times 10^{-12}$ mol. cm⁻².

Dans le Tableau 3, les variations de masses expérimentales des RAFT biotine obtenues par modélisation (Voinova) sont comparées aux valeurs théoriques obtenues en considérant la variation maximale théorique de RAFT biotine sur la base de l'équation de Sauerbrey. Les différences observées entre le Δm théorique et expérimental peuvent être attribuées au fait que la variation de masse mesurée en QCM-D inclut la quantité d'eau couplée hydrodynamiquement aux molécules RAFT immobilisées. La comparaison montre que les RAFT forment une couche très hydratée contenant de 50 à 65 % d'eau. Cette quantité d'eau présente dans les couches de RAFT varie en fonction de la longueur et structure des bras sucre greffés sur les RAFT qui doit permettre le couplage acoustique de plus ou moins d'eau. En effet, le lactose est un disaccharide alors que le mannose n'est qu'un monosaccharide. Cette différence de longueur de bras peut alors en être une des causes.

	Poids moléculaire (g mol ⁻¹)	Δf QCM-D (Hz)	Δm^a expérimentale (ng cm ⁻²)	Δm théorique (ng cm ⁻²) ^b
RAFT-(Man) ₁	1339	1,4 ± 0.4	24,8	13,2 (53 %) ^c
RAFT-(Lac) ₁	1501	2,3 ± 0.3	40,7	14,8 (36 %)
RAFT-(Man) ₄	2209	3,5 ± 0.5	62	21,8 (35 %)

^a calculés en utilisant Δf mesurée et l'équation de Sauerbrey

^b calculés en utilisant l'équation de Sauerbrey pour un recouvrement surfacique théorique de $\sim 9,86 \times 10^{-12}$ mol cm⁻²

^c la valeur entre parenthèse est le rapport entre la variation de masse théorique et expérimentale.

Tableau 3: Variation de masse expérimentale et théorique correspondant à l'immobilisation des molécules RAFT sur un cristal 2D de streptavidine formé sur une BLS biotinylée.

II.1.1.1.5. Etude cinétique de l'interaction de la Con A

Après la formation d'une surface fonctionnalisée par des RAFT-Man, l'étude de l'adhésion de la Con A a été réalisée. Toutefois, avant de commencer cette étude, nous nous sommes assurés de l'absence d'adsorption non spécifique.

- L'élimination de l'interaction non spécifique

Il est connu que la présence d'une monocouche de protéine, comme celle que l'on a formée avec la streptavidine, favorise l'interaction non spécifique d'autres protéines sur sa surface (interaction hydrophobe protéine-protéine). Afin de remédier à cela, une étape intermédiaire d'injection d'une autre protéine, la BSA (Bovine Serum Albumin) sur la surface fonctionnalisée en RAFT, juste avant l'étape d'association de la lectine Con A, permet d'éviter une adhésion non spécifique de la lectine Con A. Cette étape est apparue fort efficace car la faible fixation de la Con A observée sur une surface recouverte de RAFT-(Lac)₁ (le lactose ne reconnaissant pas la lectine) disparaît grâce au blocage des sites non spécifiques par la BSA (Figure 12). Ce nombre de sites non spécifiques reste, néanmoins, relativement faible. En effet, l'adhésion de la BSA sur la surface n'induit qu'une faible variation de la fréquence de résonance et de la dissipation (respectivement 3.3 Hz et 0.35×10^{-6} pour 10 mesures moyennées). L'ensemble des résultats obtenus par la suite présente une étape supplémentaire d'immobilisation de la BSA. La fixation de la lectine Con A observée correspond, alors, seulement à de la reconnaissance spécifique.

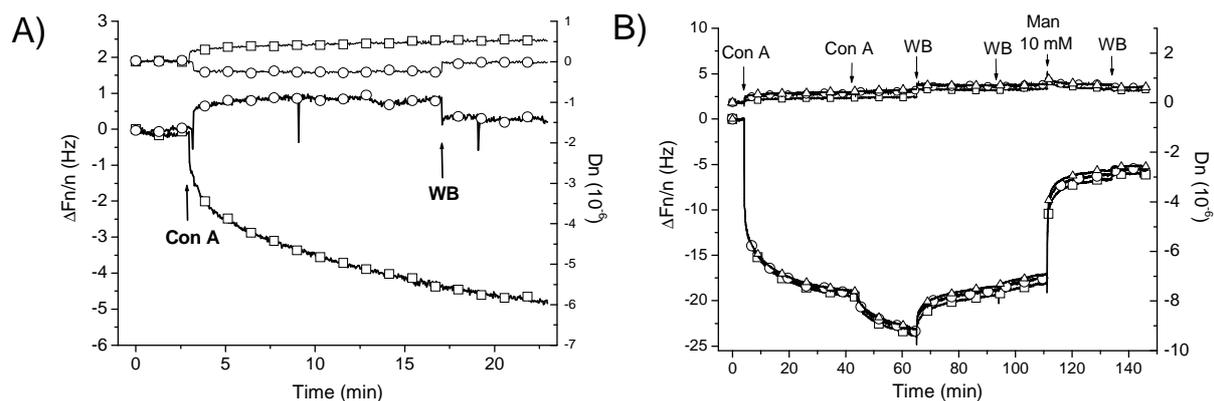


Figure 12 : Réponse typique de QCM-D A) fréquence normalisée $\Delta f_n/n$ (courbes basses) et dissipation D_n (courbes hautes) pour la troisième harmonique ($n = 3$) correspondant à l'interaction de la Con A ($63 \mu\text{M}$) sur la surface de RAFT-(Lac)₁/streptavidine/BLS biotylée avec (\circ) et sans (\square) une étape préalable d'adsorption de la BSA.

B) fréquence normalisée $\Delta f_n/n$ (courbes basses) et dissipation D_n (courbes hautes) pour les trois harmoniques $n = 3$ (\square), $n = 5$ (\circ) et $n = 7$ (Δ) correspondant à l'interaction de la Con A ($63 \mu\text{M}$) sur une surface saturée en RAFT-(Man)₁ suivie par une étape de régénération au mannose (10 mM). La surface est rincée avec le WB HBS après chaque étape.

- L'étude cinétique de la lectine Con A

L'adhésion de la lectine Con A a ensuite été étudiée sur des surfaces saturées en RAFT-(Man)₁ et en RAFT-(Man)₄ pour des concentrations croissantes en lectine Con A : 0,063 ; 0,1255 ; 0,63 et 1,255 μM . Deux injections successives de 0,5 mL ont été effectuées systématiquement pour chaque concentration afin d'empêcher les phénomènes de déplétion. Après l'adsorption de la lectine, l'injection de la solution de mannose libre concentré en solution jusqu'à 100 mM, une solution d'HCl (pH = 2) ou de NaOH (pH = 12), ou encore une solution d'EDTA 0,5 M à pH = 8,5 n'a pas permis la régénération de la surface. De plus, la présence de la BLS empêche l'utilisation de SDS comme solution de régénération. Ainsi, l'étude cinétique de l'adhésion de la lectine Con A pour l'ensemble des concentrations sur une même surface d'étude n'est pas envisageable. Il a donc fallu refaire systématiquement une nouvelle fonctionnalisation de surface pour l'étude d'une seule cinétique d'adhésion à une concentration de la lectine Con A. La Figure 13 présente une expérience complète qui permet de mettre en évidence l'ensemble des étapes successives d'immobilisation de chacun des composés.

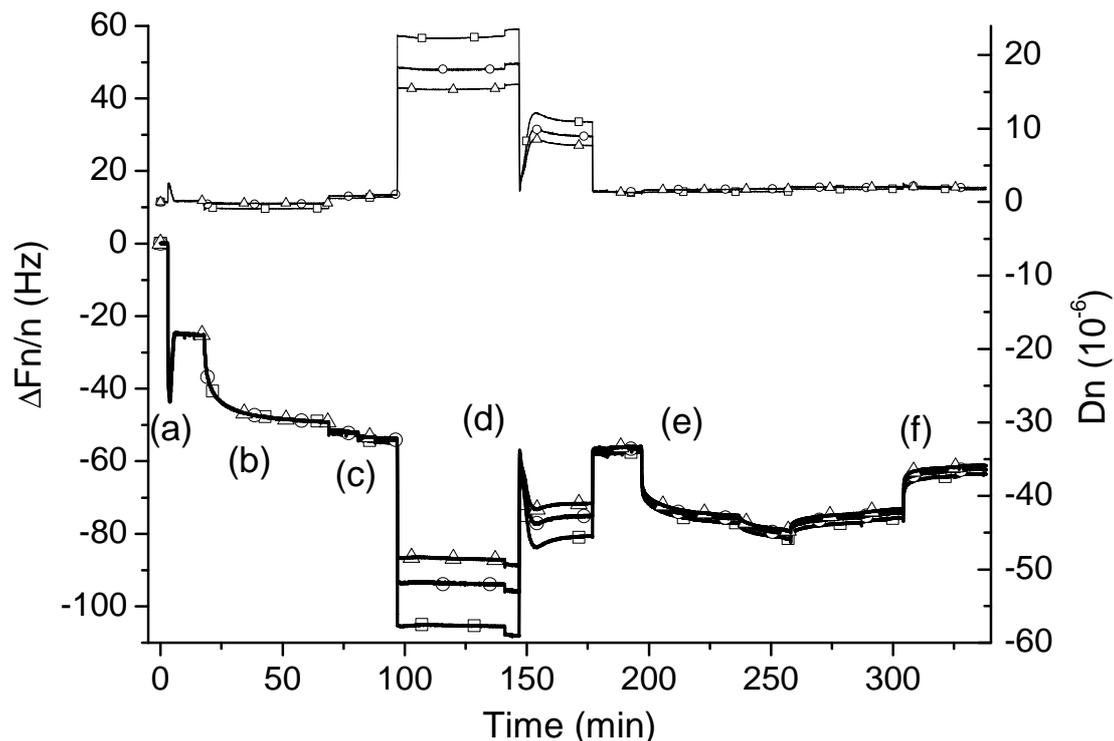


Figure 13 : Réponse typique de QCM-D, fréquence normalisée $\Delta f_n/n$ (courbes basses) et dissipation D_n (courbes hautes) pour les trois harmoniques $n = 3$ (\square), $n = 5$ (\circ) et $n = 7$ (Δ) représentant une étude complète : (a) formation de la BLS, (b) immobilisation de la SA, (c) adhésion du RAFT-(Man)₄, (d) étape d'injection de la BSA, (e) adhésion de la lectine Con A et (f) étape de régénération au mannose (25 mM).

L'association de la Con A sur la surface se traduit par une rapide diminution de la fréquence suivie d'une lente dérive de la fréquence qui finit par se stabiliser au bout de 60 minutes. La variation de la dissipation reste faible ($< 2 \cdot 10^{-6}$), et les réponses de $\Delta f_n/n$ et D_n sont indépendantes du numéro de l'harmonique. En première approximation, on peut donc considérer que l'assemblage formé se comporte comme un film mince rigide⁹⁰⁻⁹². Le rinçage de la surface avec le WB HBS ne dissocie qu'une petite partie de la Con A qui a adhéré sur les surfaces de RAFT-Man, traduisant, ainsi, une force de liaison élevée entre ces deux derniers. Une seconde observation est que la quantité de lectine immobilisée sur la surface de RAFT-(Man)₄ est plus importante que celle qui a adhéré sur la surface de RAFT-(Man)₁ et ce quelque soit la concentration en lectine Con A injectée (Tableau 4).

[Con A] (μM)	Surface RAFT-(Man) ₁ Γ_{sauer} (ng/cm^2)	Surface RAFT-(Man) ₄ Γ_{sauer} (ng/cm^2)
0.063	/	358
0.1255	176	476
0.63	409	932
1.255	420	881

Tableau 4 : Masses surfaciques (déterminées par l'équation de Sauerbrey) de la lectine Con A en fonction de sa concentration pour la surface saturée en RAFT-(Man)₁ et en RAFT-(Man)₄

Une même lectine ne peut pas se lier simultanément sur deux sucres d'un même RAFT. En revanche, la distance entre les différentes molécules de RAFT-Man immobilisées sur la surface (Figure 14) est suffisamment faible pour permettre une liaison multivalente de la lectine sur les surfaces de RAFT-(Man)₁ ou RAFT-(Man)₄. On peut estimer, à partir des données cristallographiques, que la formation d'une monocouche de Con A correspond à une concentration surfacique de $3,93 \times 10^{-12} \text{ mol.cm}^{-2}$ (voir détail de calcul page -78-). Si l'on considère qu'au maximum, une monocouche de Con A interagit de manière bivalente avec la surface de RAFT-Man, cela signifie que $\sim 7,9 \times 10^{-12} \text{ mol.cm}^{-2}$ de résidus mannose doivent être présents. La comparaison avec la valeur théorique de RAFT-Man biotine immobilisé ($9,86 \times 10^{-12} \text{ mol.cm}^{-2}$) montre bien que dans les deux cas, suffisamment de sucre sont présents à la surface pour que la Con A se lie de façon multivalente.

A la vue de cette multivalence, la modélisation de ces résultats par un modèle simple de Langmuir apparaît donc inexploitable. De plus, il ne faut pas oublier que la masse surfacique mesurée en QCM-D représente à la fois la quantité « sèche » de lectine adsorbée ainsi que l'eau couplée à la surface. Cette seconde contribution est dépendante de la densité d'implantation des molécules de Con A qui varie avec la concentration en lectine Con A et le type de surface. Pour résumer, la valeur de Γ_{sauer} mesurée (Tableau 4) n'est pas linéairement liée au nombre de molécules de protéine à la surface. Même si une différence nette est observée entre les deux surfaces de RAFT-Man au niveau de la quantité « totale » de lectine immobilisée, cette différence due à une meilleure reconnaissance de la surface en RAFT-(Man)₄ par rapport à celle en RAFT-(Man)₁ n'est pas quantifiable.

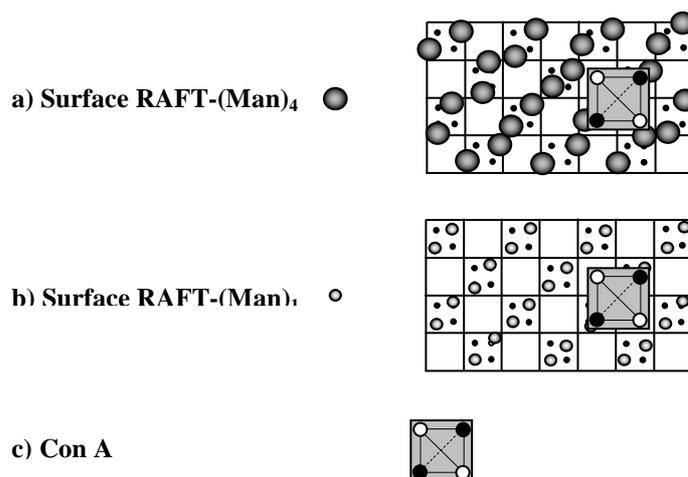


Figure 14 : Dessin schématique représentant a) une surface saturée en RAFT-(Man)₄, b) une surface saturée en RAFT-(Man)₁ et c) une lectine Con A. Sur ce schéma, la lectine est assimilée à un cube de 65 Å d'arête et elle est présentée selon une projection mettant en avant la possibilité d'une interaction bivalente avec la surface.

De plus, le but de l'étude étant de mettre en avant l'amélioration de la reconnaissance par la présentation multivalente de sucre, il aurait été souhaitable d'effectuer des dilutions de RAFT à la surface afin de pouvoir distinguer l'effet de proximité/statistique de la présentation multivalente des sucres sur le RAFT par rapport aux autres effets (cf Figure 3). Cependant, compte tenu des problèmes à la fois de régénération de surface et de l'interprétation des résultats, nous avons opter pour une simplification de notre étude en immobilisant directement les molécules RAFT sur une surface d'or via un couplage covalent thiol – or.

II.1.1.2. Immobilisation de RAFT thiol sur une surface d'or

Pour cette étude, nous avons toujours les mêmes molécules à notre disposition RAFT à 1 et 4 mannoses et à 1 et 4 lactoses, mais cette fois ces molécules présentent sur leur face de détection un groupement CysNPys, afin d'immobiliser la molécule sur une surface d'or (cf Figure 5 page - 62 -).

Les cristaux de quartz recouvert d'or sont systématiquement nettoyés selon le même protocole avant utilisation afin de garantir une bonne fonctionnalisation de la surface. Dans un premier temps, le quartz est rincé à l'eau puis séché sous flux d'azote. Dans un second temps, il est exposé pendant 10 min à une irradiation UV-Ozone afin d'oxyder toute la matière organique déposée sur la surface d'or. Ensuite, le quartz est plongé pendant 15 min dans une solution d'éthanol absolu sous agitation afin d'éliminer toutes les impuretés et de réduire les

oxydes d'or. La surface est finalement rincée à l'éthanol, séchée sous flux d'azote puis plongée dans la solution fraîche de molécules de RAFT à 0.1 mM dans de l'eau ultra pure (milliQ). La solution est laissée en contact toute la nuit et le lendemain la surface est rincée à l'eau milliQ.

Afin de vérifier la bonne fonctionnalisation de la surface par la molécule RAFT, l'ensemble des surfaces est caractérisé par ellipsométrie par deux mesures, avant et après fonctionnalisation. La première mesure, réalisée avant la fonctionnalisation, permet d'obtenir les paramètres de chaque surface d'or, n_s et k_s , qui sont respectivement l'indice de réfraction et le coefficient d'extinction molaire, en analysant, les propriétés ellipsométriques du substrat d'or nu (Ψ et Δ) selon un modèle à deux phases (substrat/air ambiant). La seconde mesure, faite après modification de la surface, permet d'accéder à l'épaisseur, d , de la couche de RAFT formée. Les paramètres ellipsométriques Ψ et Δ sont analysés selon un modèle dit à trois phases (substrat/couche de RAFT/air ambiant) dans lequel les paramètres de la surface d'or précédemment déterminés (n_s et k_s) sont utilisés. On considère également de manière classique que la couche de RAFT immobilisée possède un indice de réfraction de 1,45. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 5. L'ensemble des épaisseurs obtenu est, en accord avec la taille des molécules RAFT déterminée par modélisation moléculaire, d'environ 2 nm.

	Substrat modifié par le RAFT-Man									
	100%		33%		20%		10%		5%	
	(Man) ₁	(Man) ₄	(Man) ₁	(Man) ₄	(Man) ₁	(Man) ₄	(Man) ₁	(Man) ₄	(Man) ₁	(Man) ₄
$n_s (\pm 0,011)$	0,196	0,188	0,216	0,196	0,201	0,206	0,2	0,189	0,213	0,185
$k_s (\pm 0,011)$	3,603	3,548	3,509	3,568	3,611	3,625	3,625	3,599	3,581	3,583
$d (\pm 0,16 \text{ nm})$	1,84	1,96	1,87	1,91	2,26	2,71	2,87	1,97	1,92	2,16

Tableau 5 : Paramètres optiques (n_s et k_s) et mesure de l'épaisseur (d) de la couche de RAFT-Man, obtenus aux différentes densités de surface en RAFT-Man pour l'ensemble des cristaux de quartz recouvert d'or. L'indice de réfraction de la couche de RAFT est considéré égal à 1,45.

Afin de vérifier le temps nécessaire à la formation d'une monocouche de RAFT-Man sur une surface d'or, une étude en QCM-D a été réalisée. On a ainsi suivi, en direct, l'association de la molécule RAFT-(Man)₁ (0.1 mM en solution aqueuse) sur la surface d'or. L'étude s'effectue en mode batch. Les mesures commencent dans l'eau, puis la molécule RAFT est injectée. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 15.

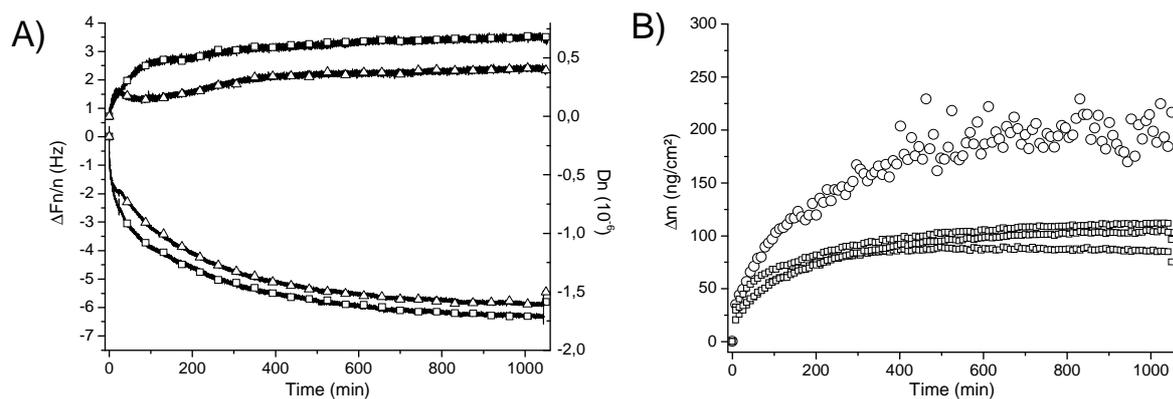


Figure 15: A) Etude par QCM-D du greffage du RAFT-(Man)₁ (0.1 mM dans H₂O) sur une surface d'or. Les courbes basses montrent les variations de fréquence ($\Delta f_n/n$) et les hautes celles de la dissipation (D_n) pour la 3^{ème} (\square) et la 7^{ème} (Δ) harmoniques en fonction du temps. B) Variation de la masse surfacique en fonction du temps obtenue en utilisant l'équation de Sauerbrey (\square) et le modèle de Voïnova (\circ) pour les trois harmoniques ($n = 3, 5$ et 7).

On peut observer une lente variation des fréquences et des dissipations d'énergie dans le temps, ce qui correspond à une lente association de la molécule RAFT-(Man)₁ sur la surface d'or. Ce processus, très lent, nécessite un minimum de 15 heures. La dilution des molécules RAFT-Man à la surface est effectuée par mélange des solutions de RAFT-Man avec une solution de RAFT-(Lac)₁. Six différentes densités de surfaces en RAFT-Man ont été testées : 100%, 33%, 20%, 10%, 5% et 2% molaire.

II.1.1.2.1. L'interaction de la lectine Con A avec les surfaces RAFT-Man : résultats expérimentaux

L'étude cinétique de l'adhésion de la lectine Con A s'effectue à une température de 24 °C sous un flux continu de 100 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Les solutions de protéine sont préparées juste avant leur injection sur la surface à partir de la même solution mère de lectine Con A conservée dans un bain de glace. Les solutions sont mises en température dans un bain thermostaté à 24 °C avant injection. Le tampon d'étude utilisé est le même que précédemment (WB HBS), dans lequel 0,005% de surfactant P20 a été ajouté. Ainsi, grâce à cet ajout de tensioactif aucune adhésion non spécifique de la lectine PNA (Peanut Agglutinin) n'est observée sur une surface saturée en RAFT-Man. Le tampon sera nommé WB HBS 2.

Six concentrations de la lectine Con A ont été étudiées sur l'ensemble des surfaces : 0,049; 0,098; 0,49; 0,98; 4,9 et 9,8 μM . Nous avons effectué des cycles d'association – dissociation de 9 min de la lectine suivis de deux étapes de régénération qui permettent de retrouver l'état initial de surface après chaque injection de lectine (Figure 16).

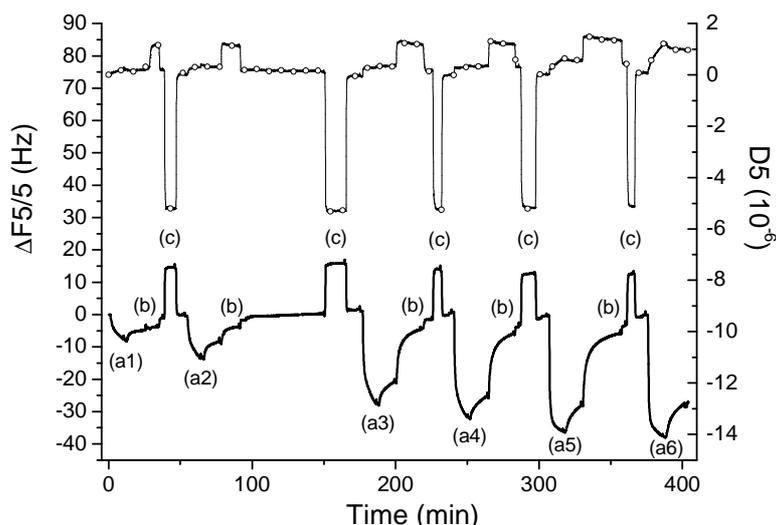


Figure 16 : Réponse typique en QCM-D enregistrée durant l'adsorption de la Con A sur une surface à 100 % en RAFT-(Man)₄. Pour plus de clarté, seules les variations de fréquence normalisées $\Delta f_n/n$ (courbe basse) et de dissipation D_n (courbe haute) pour la troisième harmonique ($n = 3$) sont présentées. (a) Adsorption de la lectine (a1) 0,049 μM ; (a2) 0,098 μM ; (a3) 0,49 μM ; (a4) 0,98 μM ; (a5) 4,9 μM et (a6) 9,8 μM . L'injection du TP (0,1 M HEPES ; 0,1 M NaCl ; 1 mM Ca^{2+} ; 1 mM Mn^{2+} ; 0,005 % P20 ; pH = 7,2) conduit à une dissociation partielle de la Con A. La régénération de la surface est effectuée par l'injection successive de solutions (b) de mannose à 25 mM et (c) de SDS à 0.05 %.

La première étape de régénération consiste en l'injection d'une solution de 25 mM en mannose libre, la seconde étape en l'injection d'une solution à 0,05 % en sodium dodecyl sulfate (SDS). En effet, les injections de mannose concentré, même à une concentration de 50 mM, ne suffisent pas à régénérer totalement la surface.

L'interaction de la Con A avec les surfaces présentant différentes densités de surface en RAFT-Man est comparée par superposition des parties de courbes correspondant à chaque cycle d'adsorption-désorption pour des concentrations croissantes en Con A sur la même monocouche auto-assemblée (SAM) (Figure 17).

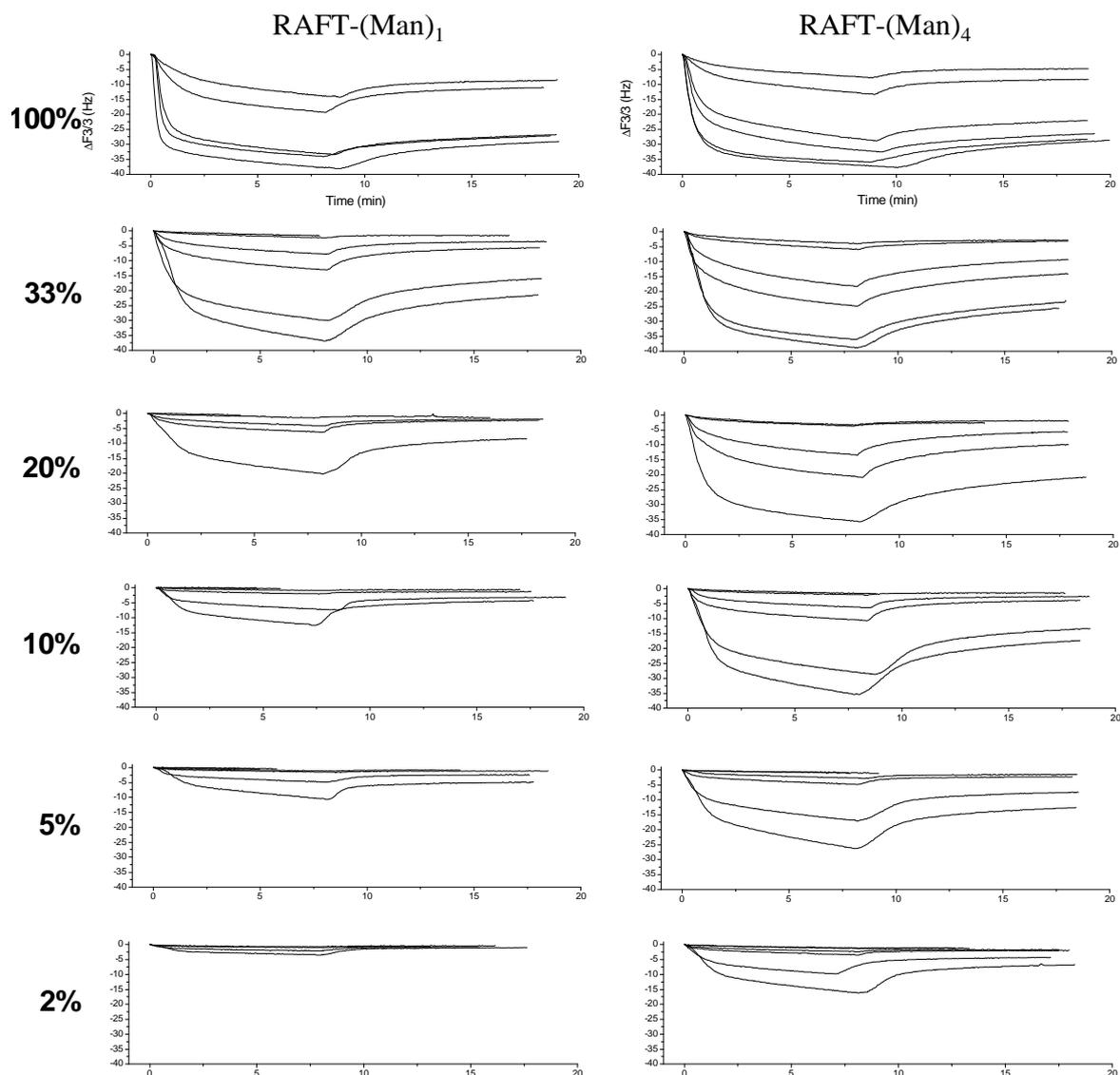


Figure 17 : Réponses en QCM-D obtenues pour les cycles d'association-dissociation de la lectine Con A (de 0,049 à 9,8 μ M) sur six différentes densités de surface en RAFT-(Man)₁ (courbes de gauche) et en RAFT-(Man)₄ (courbes de droite). Seul les $\Delta f_n/n$ pour la troisième harmonique sont présentés pour une question de clarté.

Une première analyse visuelle des courbes montre qu'à forts recouvrements de surface en RAFT-Man, on obtient des réponses similaires au niveau de l'association et de la dissociation de la lectine. Dans ces conditions, il apparaît clair que la densité surfacique de mannose est suffisante pour assurer la formation d'une monocouche dense de Con A, et ce quel que soit le RAFT-Man utilisé. Ce n'est qu'à partir d'une dilution de 20% en RAFT-Man, que la présentation locale des sucres exhibée par les RAFT-(Man)₁ et RAFT-(Man)₄ influence les quantités de Con A immobilisées.

II.1.1.2.2. Discussion

Compte tenu que le facteur de dissipation reste faible (inférieure à 10^{-6}) lors de l'adsorption des protéines, nous avons considéré en première approximation que la couche de lectine Con A formée présente un comportement rigide. Dans ces conditions, les variations de fréquence normalisées $\Delta f_n/n$ sont linéairement liées aux variations de masse selon l'application de l'équation de Sauerbrey. Afin de comparer le comportement des différentes surfaces, les variations de masse à l'équilibre ($\Gamma_{\text{éq}}$) correspondant à un temps d'association de 9 min de la Con A, ont été tracées en fonction de la concentration en Con A (Figure 18).

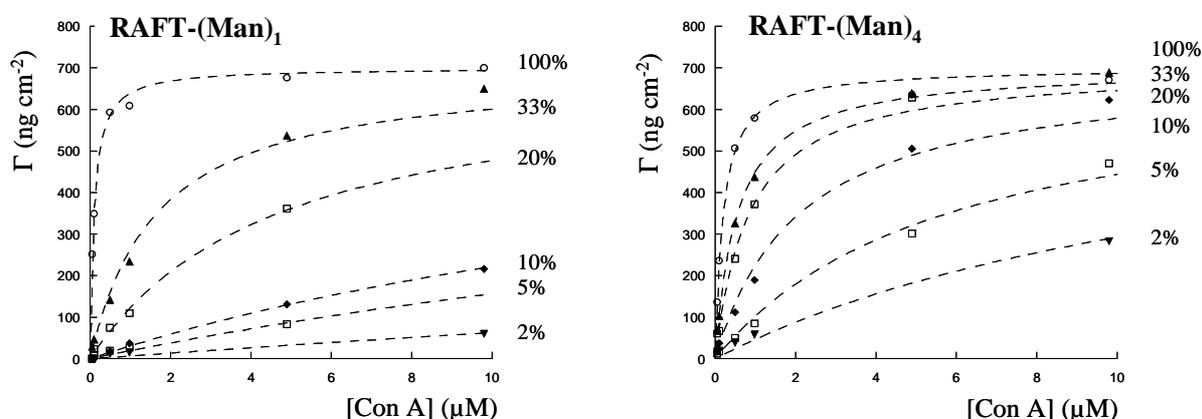


Figure 18 : Variation de $\Gamma_{\text{éq}}$ en fonction de la concentration en lectine Con A sur les différentes densités surfaciques en RAFT-(Man)₁ (courbes de gauche) et en RAFT-(Man)₄ (courbes de droite). Les points ont été reliés entre eux pour une meilleure visualisation des résultats.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que la couche de lectine formée sur les surfaces denses en sucre (100 et 33%) correspond à la formation d'une monocouche compacte de lectine sur la surface. La structure cristallographique de la lectine Con A complexée avec le methyl- α -D-mannopyranoside a été précédemment établie^{93, 94}. Le volume du cristal par unité de poids moléculaire est de $2,73 \text{ \AA}^3/\text{dalton}$ (dont 55% de solvant). Le volume occupé par une Con A hydratée est alors d'environ $2,8 \times 10^{-19} \text{ cm}^3$, et en première approximation, on peut assimiler la Con A à un cube de 65 \AA de côté. En supposant que l'on forme une monocouche compacte de Con A sur la surface de RAFT-Man, un recouvrement surfacique maximal d'environ $3,93 \times 10^{-12} \text{ mol.cm}^{-2}$ est obtenu. Ainsi, la variation de masse théorique attendue pour la formation d'une monocouche dense hydratée de Con A peut être estimée. En supposant une densité similaire à celle du cristal ($1,165 \text{ g.cm}^{-3}$), on trouve une masse d'environ 770 ng.cm^{-2} . Malgré les diverses approximations, toutefois raisonnables, de ces

calculs théoriques, on peut comparer à titre indicatif ces valeurs à celles obtenues expérimentalement.

Pour les surfaces à forte densité en sucre (33 et 100 %) que ce soit avec le RAFT-(Man)₁ ou RAFT-(Man)₄, une variation de masse maximale (Γ_{\max}) de 710 ng.cm⁻² est obtenue, en bon accord avec la masse théorique de 770 ng.cm⁻² précédemment estimée. Ce résultat confirme qu'il y a suffisamment de sites sucre disponibles à la surface, pour permettre une saturation de la surface par une monocouche de Con A adsorbée.

Les différences entre les deux surfaces sont ensuite mises en valeur pour les plus fortes dilutions en RAFT-Man dans les SAMs. En effet pour des dilutions équivalentes en RAFT-Man, la quantité de protéine qui adhère sur les SAMs de RAFT-(Man)₄ est largement supérieure à celle observée sur les RAFT-(Man)₁. En augmentant la dilution des RAFT-Man dans les SAMs, les distances entre les ligands mannose sur la surface augmentent. A partir d'une certaine dilution, on devrait ainsi supprimer l'effet chélatant de la lectine (Figure 3 page - 59 -) sur plusieurs molécules RAFT-Man, et mettre en avant l'effet de la concentration locale en sucre. Cependant, ce seul effet ne peut pas être responsable de la plus grande quantité de lectine adsorbée sur les RAFT-(Man)₄ (deux fois plus pour une surface à 10 % de RAFT-(Man)₄) par rapport aux SAMs à RAFT-(Man)₁. La seule explication possible à ce phénomène serait que, malgré la faible distance entre deux sucres d'une même molécule RAFT (~ 2,5 nm), la molécule RAFT-(Man)₄ permet l'immobilisation d'approximativement 2 à 3 lectines différentes.

Maintenant, une analyse plus quantitative s'avère délicate à réaliser à partir des données de QCM-D. Tout d'abord parce que, comme pour l'étude précédente, la variation de masse obtenue inclue, en plus de la masse de lectine « sèche », une contribution due à l'eau acoustiquement liée. Ainsi, les informations cinétiques et thermodynamiques ne peuvent pas être extraites de ces données car seule la masse de lectine sèche est significative pour ce type de traitement. De plus, les courbes d'association de la Con A obtenues présentent une portion de courbe linéaire (premières minutes) qui est caractéristique de la présence de limitations par le transport de masse. Bien que les expériences soient effectuées sous des conditions de flux continu, à la fois le grand volume de la chambre de mesure (~ 80 μ L), ainsi que le faible flux (100 μ L/min) ne permettent pas d'éviter ces limitations. C'est pour ces raisons que nous avons décidé de compléter ces résultats par des études complémentaires en résonance plasmonique de surface (SPR).

II.1.2 Etude de l'interaction Con A/ RAFT-Man par SPR

La majeure partie des manipulations effectuées dans cette partie a été réalisée à 25 °C et sous flux continu. Nous rappelons, qu'en SPR (BIAcore®), l'enregistrement de la variation de l'angle de résonance permet de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées sur le biocapteur. Le signal de résonance est exprimé en unités de résonance (RU). Sous certaines conditions, cette unité de résonance peut être convertie en masse surfacique. L'enregistrement de ce signal s'appelle un sensorgramme.

Tout comme pour l'étude en QCM-D, nous avons utilisé les mêmes molécules RAFT-Man soit biotinylées soit présentant un groupement thiol. Ainsi, deux modes de fonctionnalisation de la surface par les RAFT, couplage streptavidine-biotine et couplage or-thiol ont été entrepris.

II.1.2.1. Greffage des RAFT-Man sur des sensor chip d'or

Des essais de couplage covalent des RAFT via la formation d'une liaison or - thiol ont tout d'abord été entrepris. Il faut rappeler ici que les quatre microcanaux d'étude disponibles en BIAcore® ne sont pas directement présents sur la surface mais c'est le contact avec la cellule microfluidique qui forme les 4 canaux par un système de gonflement – dégonflement. Cette technique nécessitant la présence d'une piste de référence, il est impossible de fonctionnaliser les quatre canaux par des molécules différentes en dehors de la chambre de mesure. Comme le montre la caractérisation de la formation sur or d'une monocouche dense en RAFT effectuée en QCM-D (Figure 15), il faudrait laisser la solution de RAFT thiol en contact avec la surface d'or pendant quinze heures. Cependant, les appareils BIAcore® ne permettent pas de travailler autrement qu'en flux continu. Même en travaillant au plus faible flux, l'immobilisation de la molécule nécessiterait une trop grande quantité de produit (~ 30 mL). Nous avons néanmoins essayé une fonctionnalisation de la surface en laissant en contact pendant une heure les solutions (1 mM) en RAFT-Man et RAFT-Lac avec respectivement les pistes de mesure et de référence. L'étude cinétique de l'adhésion de la lectine Con A a ensuite été effectuée. Mais la présence d'une forte adhésion non spécifique sur la surface de référence (RAFT-Lac) a empêché toute continuation des études.

II.1.2.2. Couplage affine des RAFT via des ponts biotine - streptavidine sur une sensor chip C1

Suite aux difficultés rencontrées pour immobiliser les RAFT-Man sur une surface d'or, nous sommes alors revenus à l'utilisation d'un pont biotine-streptavidine. La présence de la BLS, utilisée en QCM-D, rendant difficile la régénération de surface, nous avons directement immobilisée la streptavidine sur la surface d'étude par le biais d'un couplage covalent.

II.1.2.2.1. Fonctionnalisation de la surface d'étude

Dans le cadre des études en BIAcore[®], il existe une gamme de surfaces ou sensor chips (appelées CM3, CM4, CM5 et C1) qui sont déjà pré-fonctionnalisées et qui permettent de façon relativement accessible l'immobilisation covalente directe de protéines sur la surface. Pour cette étude, nous avons utilisé une surface appelée sensor chip C1 qui permet l'immobilisation covalente de la streptavidine. Cette sensor chip se compose d'une fine couche d'or fonctionnalisée par une monocouche de groupes carboxyméthyle. Cette surface d'étude a été préférée à une sensor CM5 (chaînes de Dextran carboxyméthylées, cf chapitre I) afin de mieux contrôler la fonctionnalisation de la surface. Dans l'ensemble de ces études, nous avons utilisé le même tampon que pour les études précédentes, le WB HBS, dans lequel a été rajouté 0.05% de surfactant P20. Ce tampon, légèrement différent des deux autres tampons, sera noté WB HBS 3.

- Immobilisation de la streptavidine

L'immobilisation de la protéine streptavidine s'effectue par la méthode du couplage amine développée par pharmacia (BIAcore[®]) (Figure 19). Cette fonctionnalisation s'effectue en trois étapes consécutives sous un flux continu de 5 μ L/min.

- La première consiste en l'activation des groupes carboxyméthyle par un mélange de stoechiométrie 1:1 de N-hydroxysuccinimide (NHS) / N-ethyl-N'-(3-diethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) (50 mM NHS, 200 mM EDC). Cette étape consiste en une injection de 7 min.

- La seconde étape conduit à l'immobilisation de la streptavidine par injection d'une solution à 100 μ g/mL de streptavidine diluée dans un tampon d'acétate de sodium à 10 mM à pH = 4,5 ; pH facilitant l'adhésion de la protéine sur les surfaces par des attractions électrostatiques. En effet, le pH de la solution de couplage de la protéine est inférieur au point

isoélectrique de la streptavidine, ce qui confère à la protéine une charge nette positive. La surface étant chargée négativement (groupements carboxylates), les forces électrostatiques vont alors faciliter l'interaction de la protéine avec la surface.

- La dernière étape sert à la neutralisation de la surface par l'injection d'une solution d'éthanolamine 1 M à pH = 8,5 qui permet de masquer les sites ester succinimide qui n'ont pas réagi avec la streptavidine.

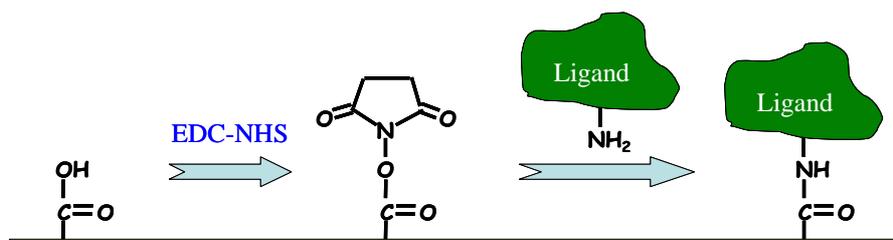


Figure 19: Schéma représentant les deux premières étapes du couplage amine d'un ligand, ici la streptavidine, sur une sensor chip C1.

Afin de garantir un état de surface équivalent pour l'ensemble de notre étude, nous avons immobilisé une quantité équivalente de streptavidine de 370 ± 10 RU sur toutes les pistes. Cette quantité ne correspond pas à la formation d'une monocouche compacte de streptavidine. La variation en RU (ΔRU) peut être convertie en masse (Δm_{SPR}) selon la relation suivante^{70, 95} :

$$\Delta m_{SPR} = d \frac{n_{biomolécule}^{eff} - n_{buffer}}{dn/dc} = C_{SPR} \Delta RU \quad (II-1)$$

avec $C_{SPR} \sim 0,066 \text{ ng.cm}^{-2}$ pour l'adsorption de protéine sur une surface plane d'or, avec dn/dc (rapport indice de réfraction sur la concentration) $\sim 0,18 \text{ mL/g}$ pour une protéine⁹⁶. $n_{biomolécule}^{eff}$ et n_{buffer} correspondent respectivement à l'indice de réfraction de la biomolécule et du tampon d'étude.

La quantité de streptavidine immobilisée est estimée d'après la relation (II-1) à $\sim 24,5 \text{ ng.cm}^{-2}$ ce qui correspond environ à $2,458 \times 10^{11} \text{ molécules.cm}^{-2}$ soit 10 % d'une monocouche (la formation d'une monocouche de streptavidine a été estimée en SPR, par Höök *et al.*⁷⁰, à 200 ng.cm^{-2}). Ce type d'immobilisation par couplage amine ne permet pas l'obtention d'un arrangement cristallin 2D d'une monocouche de streptavidine. Il est donc important de noter que les recouvrements surfaciques de RAFT-Man exprimés en pourcentage ne seront pas

équivalents entre les expériences de SPR qui suivent et celles effectuées précédemment en QCM-D. Ce faible taux d'immobilisation de streptavidine et donc de RAFT pour les études SPR a été choisi afin de minimiser les limitations de transport de matière durant les expériences cinétiques mais également afin de voir plus rapidement les effets de la dilution des surfaces en RAFT-Man sur l'adhésion de la lectine.

- Immobilisation des RAFT

L'immobilisation des RAFT-Man biotine se fait par une simple injection de 3 min d'une solution à 5 μM de RAFT dans le WB HBS 3 qui suffit à saturer les sites de liaison de la streptavidine. Nous avons ainsi réalisé des surfaces exhibant des densités variables en RAFT-(Man)₁ et en RAFT-(Man)₄ en adsorbant des mélanges de RAFT-Man / RAFT-(Lac)₄ obtenus par dilution des solutions de RAFT-Man avec des solutions de RAFT-(Lac)₄ aux taux molaires désirés (100 %, 25 %, 10 % et 5 %). La surface de référence, quant à elle, a été fonctionnalisée par une solution à 100 % de RAFT-(Lac)₄. Le Tableau 6 présente les quantités de RAFT immobilisés (exprimées en RU) sur les surfaces de streptavidine.

Taux molaire en RAFT-man	Quantité (RU)	Masse molaire (g.mol ⁻¹)
100% RAFT-4man	33,9	2209
100% RAFT-1man	3,7	1339
100% RAFT-4lac	31,6	2825
100% RAFT-1lac	6,1	1501
25% RAFT-4man (75% RAFT-4lac)	32,0	
25% RAFT-1man (75% RAFT-4lac)	14,3	
10% RAFT-4man (90% RAFT-4lac)	26,7	
10% RAFT-1man (90% RAFT-4lac)	14,9	
5% RAFT-4man (95% RAFT-4lac)	26,1	

Tableau 6: Quantité de RAFT en RU immobilisé sur la sensor chip C1-streptavidine pour des densités différentes en RAFT-Man et en RAFT-Lac.

On constate que les signaux SPR résultant de la fixation des RAFT biotinylés présentent des variations importantes d'intensité en fonction de la structure moléculaire des RAFT. En particulier les RAFT ne comportant qu'un seul motif sucre induisent une réponse 5 à 8 fois plus faible que celles obtenues avec les RAFT comportant 4 motifs sucres. Les variations de masse molaire (Tableau 6) ne permettent pas à elles seules d'expliquer ces écarts significatifs (chapitre I, équation I-24, page -42-). Une explication possible consisterait en des valeurs de

C_{SPR} (équation (II-1) page -87-) différentes selon que le RAFT soit fonctionnalisé par un seul ou quatre motifs sucre. Nous n'avons malheureusement pas eu le temps de vérifier cette hypothèse, en mesurant notamment l'incrément d'indice de réfraction, dn/dc , pour chacun des RAFT étudiés. Etant donné la force de l'interaction biotine-streptavidine, nous avons considéré pour la suite du travail, que l'ensemble des sites des streptavidine disponibles était complexé par un RAFT biotinylé. La diminution des réponses en RU obtenues en fonction de l'augmentation du pourcentage en RAFT-(Man)₁ confirme d'ailleurs notre hypothèse.

II.1.2.2.2. L'adhésion non spécifique

Dans l'ensemble des manipulations effectuées en SPR, le moyen d'éviter l'adhésion non spécifique s'effectue par l'ajout d'une quantité de surfactant, P20 ou tween 10, à 0.05% dans le tampon de « course » et dans l'ensemble des solutions injectées sur la surface. Dans ces conditions, l'utilisation de la BSA ne s'avère plus nécessaire.

Il est alors important de vérifier le bon fonctionnement de la piste de référence et des trois pistes de mesure. Nous avons tout d'abord vérifié que l'on n'avait pas d'interaction de la lectine Con A avec le RAFT-(Lac)₄ puis qu'une autre lectine similaire à la Con A, la PNA (protéine tétramérique de 110 kDa avec 4 sites de reconnaissance au galactose) n'adhérait pas sur les surfaces fonctionnalisées par le RAFT-(Man)₄ et RAFT-(Man)₁. Les résultats n'ont fait état d'aucune adhésion non spécifique des lectines sur les surfaces. Il était très important de s'en assurer pour être sûr que l'adhésion observée n'est due qu'à de l'adhésion spécifique. L'absence d'adhésion de la lectine Con A sur les molécules RAFT-Lac est primordiale car nous allons nous servir de ces dernières pour diluer les surfaces en RAFT-Man. Ces vérifications effectuées, nous avons pu réaliser les études cinétiques de liaison de la Con A pour des concentrations croissantes en analyte sur l'ensemble des surfaces fonctionnalisées par différentes densités de recouvrement en RAFT-(Man)₁ et en RAFT-(Man)₄.

II.1.2.2.3. Etude cinétique de l'adhésion de la Con A : résultats expérimentaux

L'étude cinétique a été effectuée systématiquement selon le protocole suivant (cf partie expérimentale) :

- flux 25 μ L/min
- temps d'association-dissociation 120 s / 120 s
- régénération au mannose 25 mM pendant 10 min

- une concentration doublée et deux concentrations nulles

La gamme de concentration de la lectine a été de 24,5 nM à 9800 nM pour les plus fortes densités en RAFT (100 % et 25 %). Pour les plus faibles (10 et 5 %), la gamme de concentration a été étendue jusqu'à 78400 nM du fait des faibles K_D enregistrés. Les courbes cinétiques sont présentées ci après (Figure 20).

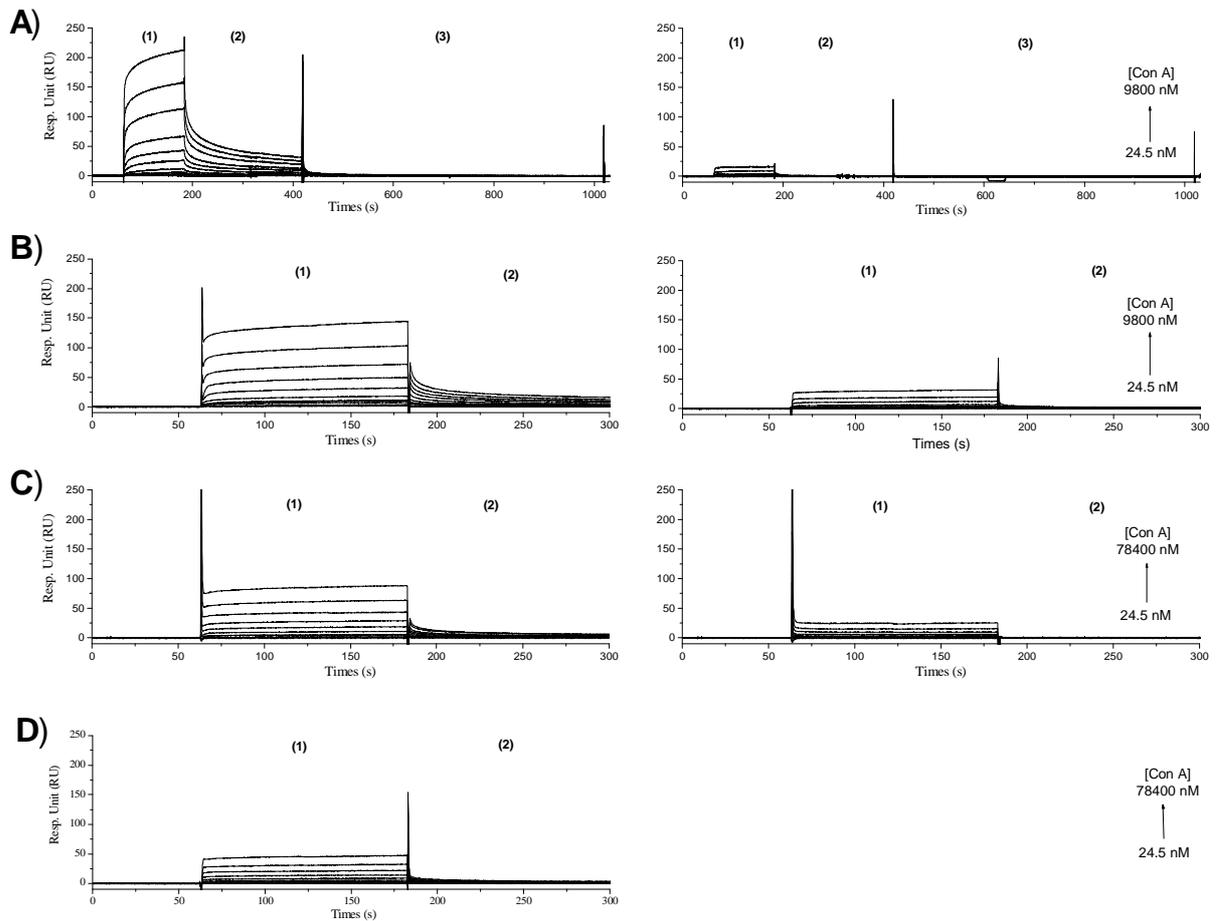


Figure 20 : Courbes cinétiques représentant les cycles d'adsorption et de désorption de la lectine Con A pour des densités en RAFT-Man A) 100 %, B) 25 %, C) 10 % et D) 5 %. (1) étape d'association, (2) étape de dissociation et (3) régénération (25 mM Mannose) de la lectine à différentes concentrations.

Lors de cette étude, l'utilisation d'une solution de mannose concentrée à 25 mM suffit à permettre la régénération totale de la surface. L'absence de limitation par le transport de matière et le flux rapide peuvent être responsables de cette facilité de régénération. En effet, une étude cinétique d'association – dissociation a été effectuée à trois différents flux (5, 15 et 75 $\mu\text{L}/\text{min}$) et la Figure 21 montre une parfaite superposition des courbes entre elles et atteste l'absence de limitation par le transport de matière.

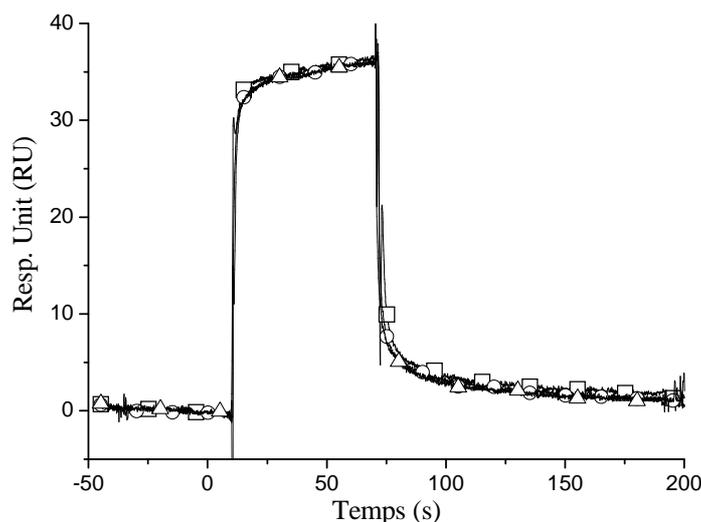


Figure 21 : Courbe d'association-dissociation de la lectine Con A à 9800 nM sur une surface fonctionnalisée par 25 % de RAFT-(Man)₁ pour trois flux différents : 5 (□), 15 (○) et 75 (Δ) μL/min.

D'un point de vue global, on observe que la réponse en RU correspondant à la quantité de Con A adsorbée sur la surface, est plus grande pour la surface présentant le RAFT-(Man)₄ par rapport à celle présentant le RAFT-(Man)₁. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment par QCM-D. Cependant, lorsque l'on regarde les courbes obtenues pour les surfaces dites « à saturation », *i.e.* à 100 % de recouvrement en RAFT-Man, on constate que l'on a une différence bien plus prononcée entre les surfaces RAFT-(Man)₄ et RAFT-(Man)₁ par rapport aux résultats précédents obtenus en QCM-D. Cela peut être attribué à la façon différente de préparer la surface (voir section II.1.2.2.1 Fonctionnalisation de la surface d'étude) aussi bien qu'à une optimisation des conditions du transport de matière grâce à la technologie BIAcore[®]. En plus de la dilution des RAFT induite par la distance entre les sites de liaison de la streptavidine, l'utilisation du couplage amine conduit à une fonctionnalisation de surface beaucoup moins structurée. Ainsi, on observe une variation de masse maximale de Con A respectivement d'environ 270 RU et 75 RU pour une surface saturée en RAFT-(Man)₄ et en RAFT-(Man)₁, ce qui correspond à 18 et 5 ng.cm⁻² de protéine. En comparant ces résultats à ceux obtenus pour les expériences en QCM-D où une monocouche de Con A hydratée^{93, 94} correspondait à 770 ng.cm⁻² soit 346 ng.cm⁻² de lectine Con A sèche (55 % de solvant), on constate que l'on travaille à des densités de surface beaucoup plus faibles en sucre. C'est cette forte dilution qui est à l'origine des grandes différences observées entre les surfaces RAFT-(Man)₄ et RAFT-(Man)₁.

II.1.2.2.4. Discussion

L'analyse quantitative des sensorgrammes présentés à la Figure 20 nécessite le choix d'un modèle cinétique pertinent pour décrire l'interaction de la lectine Con A avec les ligands RAFT-Man immobilisés sur la surface de la sensor chip. Dans ce but, nous avons tout d'abord analysé les quantités de lectine fixée (exprimée en RU) à la fin de l'étape d'association, en considérant qu'un état proche de l'état d'équilibre était obtenu. Si cette hypothèse est bien vérifiée (état d'équilibre atteint) à faible densité de surface, la situation est différente pour les fortes densités de 100 % et 25 % (Figure 20) où l'on observe que l'obtention d'une réponse stable nécessiterait des temps d'association supérieur à 2 minutes. Cette analyse permet cependant, malgré cette approximation, d'obtenir des informations intéressantes pour la compréhension du processus d'interaction.

Une première analyse consiste à réaliser les tracés de Scatchard, c'est-à-dire le tracé de $R_{\text{éq}}/[\text{Con A}]$ en fonction de $R_{\text{éq}}$ (Figure 22). Comme décrit dans la partie bibliographique (cf Chapitre I), cette représentation est un moyen graphique de mettre en évidence une interaction simple de type 1:1 (obtention d'une droite) ou l'existence d'un mécanisme plus complexe (absence d'un tracé linéaire).

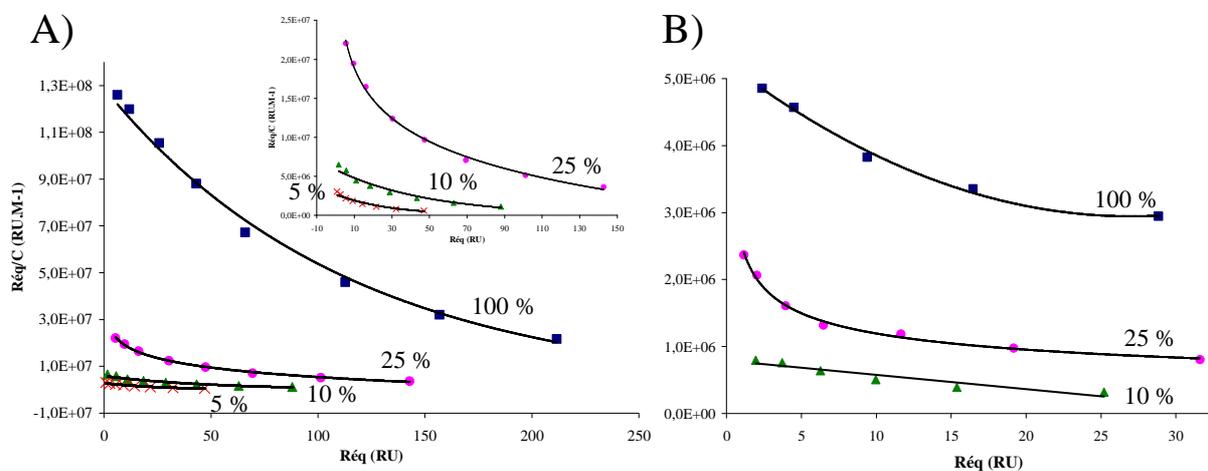


Figure 22 : Représentation de Scatchard de l'interaction de la Con A avec des surfaces fonctionnalisées A) par le RAFT-(Man)₄ et B) par le RAFT-(Man)₁ à des densités surfaciques croissantes (les pourcentages en RAFT-Man sont indiqués à proximité des courbes).

La Figure 22 démontre qu'un tracé linéaire n'est jamais obtenu sauf à 10 % de densité surfacique de RAFT-(Man)₁ où la faible courbure pourrait être négligée. Dans cette hypothèse, l'isotherme d'adsorption de la lectine Con A sur la surface à 10 % de RAFT-(Man)₁ peut être analysée selon un modèle 1:1 de Langmuir. On obtient alors une constante

de dissociation K_D de 97 μM pour l'interaction monovalente RAFT-(Man)₁ / Con A. Cette faible valeur de l'affinité est en accord avec les valeurs rapportées dans la littérature ($K_D = 200 \pm 50 \mu\text{M}$), ce qui semble indiquer que la surface à 10 % de sucres mannose est suffisamment diluée pour interagir avec la Con A via des interactions monovalentes.

Lorsque la densité surfacique des RAFT-Man augmente, la distance entre les sucres mannose diminue, favorisant ainsi la possibilité d'une interaction multivalente de la Con A avec plusieurs motifs mannose de la surface, au détriment d'une interaction purement monovalente. Dans cette hypothèse, des tracés de Scatchard non linéaires devraient être obtenus, ce qui est observé expérimentalement (Figure 22). Il semble alors que pour les surfaces fonctionnalisées en RAFT-(Man)₁, l'apparition d'un tracé linéaire à une densité surfacique de 10 %, rend compte de la disparition de l'effet de chélation de la lectine sur la surface au profit d'une simple interaction de type 1:1. Par contre, en ce qui concerne les surfaces fonctionnalisées en RAFT-(Man)₄, les graphes de Scatchard sont non linéaires même aux faibles dilutions (10 et 5 %), où l'effet de chélation de la lectine est supposé disparaître. Ce résultat met en évidence la présence d'un mécanisme d'interaction plus complexe entre le RAFT-(Man)₄ et la lectine Con A à ces faibles dilutions qui pourrait s'expliquer par l'effet « cluster » des molécules RAFT multivalentes sur plusieurs lectines.

Afin de quantifier ce processus d'interaction multivalente, nous avons appliqué le modèle multivalent de Scatchard (cf Chapitre I) aux réponses enregistrées à la fin de l'étape d'association ($R_{\text{éq}}$). Ce modèle développé par Winzor *et al.*⁹⁷ permet la détermination d'une constante de dissociation intrinsèque, K_{DX} , ainsi que d'une concentration effective des sites de liaison sur la surface, C_X^* , pour des interactions multivalentes. Pour cela, les auteurs ont utilisé une formulation multivalente de l'équation de Scatchard (cf chapitre I), qui leur permet d'obtenir l'équation de liaison hyperbolique rectangulaire suivante :

$$fC_A^{*(f-1)/f} \times (C_A^{*1/f} - C_A^{1/f}) = \frac{fC_A^{*(f-1)/f} K_{AX} C_X^* C_A^{1/f}}{1 + fC_A^{*(f-1)/f} K_{AX} C_A^{1/f}} \quad (\text{II-2})$$

où C_A est la concentration totale en analyte (Con A) injecté, C_A^* la concentration totale en analyte dans le canal d'étude, *i.e.* incluant la lectine immobilisée sur les sucres de la surface, f le nombre de site de liaison de l'analyte (la Con A), K_{AX} la constante d'association intrinsèque et C_X^* la concentration effective des sites d'affinité présents sur la surface.

Pour notre étude, la lectine Con A en solution est tétravalente. Cependant, du fait de sa géométrie et de la surface en sucre, nous avons considéré qu'il était physiquement impossible que la lectine se lie à plus de 2 sucres différents. Nous avons donc fixé f égal à 2. Après avoir déterminé C_A^* (chapitre I), nous avons calculé puis représenté les grandeurs $2C_A^{*1/2}(C_A^{*1/2} C_A^{1/2})$ ($= Y$) en fonction de $2C_A^{*1/2} C_A^{1/2}$ ($= X$) (Figure 23). L'équation (II-2) peut se mettre sous la forme (II-3) :

$$Y = \frac{K_{AX} C_x^* \times X}{1 + K_{AX} \times X} \quad (\text{II-3})$$

On reconnaît alors une forme d'équation de type hyperbolique qui nous permet par modélisation (Figure 23) de déterminer la constante de dissociation intrinsèque, K_{DX} ($K_{DX} = 1/K_{AX}$), ainsi que la concentration effective des sites d'affinité sucre sur la surface (Tableau 7).

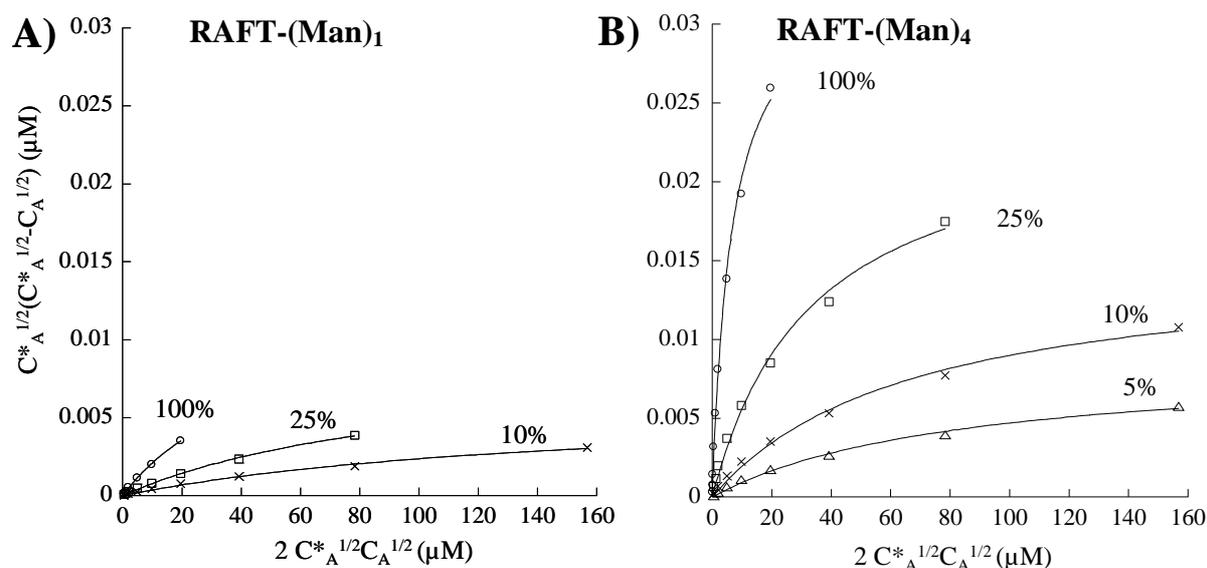


Figure 23 : Représentation hyperbolique de Scatchard pour l'interaction de la lectine Con A à différentes concentrations avec une surface A) de RAFT-(Man)₁ à 100 %, 25 % et 10 % et B) de RAFT-(Man)₄ à 100 %, 25 %, 10 % et 5 %. Les points expérimentaux ont été calculés à partir des expressions de Y et de X (voir texte). Les courbes représentent les simulations calculées à partir de la relation (II-3).

Il est tout d'abord intéressant de constater que le modèle bivalent de Scatchard permet un ajustement paramétrique idéal des données expérimentales comme l'indique les courbes de la Figure 23 ou le coefficient de corrélation (r) très faible présenté dans le Tableau 7.

Ce coefficient de corrélation se définit selon l'équation (II-4) suivante :

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}} \quad (\text{II-4})$$

Il faut rappeler que le modèle bivalent de Scatchard, utilisé ici, est basé sur l'hypothèse que les lectines Con A interagissent de manière bivalente avec les motifs mannoses immobilisés sur la surface. Si une telle hypothèse peut se justifier à des densités surfaciques en RAFT-(Man)₁ élevées, nous avons en revanche démontré précédemment que l'interaction de la Con A avec la surface à 10 % en RAFT-(Man)₁ pouvait également être décrite par un mécanisme de type monovalent. De manière plus réaliste, les deux types d'interactions, monovalente ou bivalente, pourraient coexister à cette faible densité de surface. Cette remarque illustre la difficulté du choix d'un modèle adéquat pour rendre compte des résultats expérimentaux.

RAFT-(Man) ₄	K _{DX} (μM)	C _X * (μM)	r	RAFT-(Man) ₁	K _{DX} (μM)	C _X * (μM)	r
100%	6.6	0.067	0.9972	100%	45	0.023	0.9993
25%	34	0.049	0.9960	25%	105	0.018	0.9987
10%	68	0.030	0.9970	10%	154	0.012	0.9970
5%	84	0.017	0.9966				

Tableau 7 : Constantes de dissociation intrinsèque (K_{DX}) et concentration effective (C_X^{*}) des sites d'affinité pour l'interaction de la lectine Con A avec les molécules RAFT-(Man)₄ et RAFT-(Man)₁ immobilisées à différentes densités surfaciques. Ces valeurs résultent des simulations (Figure 23) sur la base du modèle Scatchard bivalent via la relation (II-3).

Dans le cas du RAFT-(Man)₄, l'effet de proximité/statistique et l'effet « cluster » sont toujours susceptibles de se superposer à l'interaction bivalente de la Con A (effet chelatant) qui, elle seule, est décrite par le modèle de Scatchard bivalent. Il en résulte que les valeurs des paramètres K_{DX} et C_X^{*} (Tableau 7) obtenues par le modèle bivalent de Scatchard correspondent à une réalité physique, uniquement dans le cas des densités surfaciques élevées (25 % et 100 %) en RAFT-(Man)₁. Néanmoins, nous avons considéré que ces valeurs de K_{DX} et C_X^{*} ainsi que leur évolution en fonction de la structure des RAFT-Man et de leur densité surfacique pouvaient permettre de dégager les tendances qualitatives suivantes :

- L'affinité de la Con A pour la surface diminue (K_{DX} augmente) lorsque la densité surfacique en RAFT-Man diminue. En particulier dans le cas du RAFT-(Man)₁ dilué à 10%, on trouve une affinité très faible (K_{DX} = 154 μM) peu compatible avec une interaction

bivalente forte. Dans cette situation un modèle d'interaction 1:1 semble donc mieux adapté pour décrire l'interaction.

- A densité surfacique en mannose identique, mais avec une présentation locale différente (100% RAFT-(Man)₁ et 25% RAFT-(Man)₄) une meilleure affinité de la Con A est observée pour la surface à RAFT-(Man)₄ ($K_{DX} = 33,7 \mu\text{M}$) par rapport au RAFT-(Man)₁ ($K_{DX} = 44,9 \mu\text{M}$). De même, une quantité plus importante de lectine Con A se fixe sur les RAFT-(Man)₄ ($C_X^* = 0,048 \mu\text{M}$) par rapport au RAFT-(Man)₁ ($C_X^* = 0,0231 \mu\text{M}$). Ce résultat suggère que les molécules de RAFT-(Man)₄ peuvent se lier à plusieurs lectines Con A différentes et que cet effet de « cluster » permet d'améliorer l'affinité.

- A densité de surface identique en RAFT-Man, les valeurs de C_X^* montrent que la quantité de Con A fixée sur la surface est systématiquement 2,5 à 3 fois supérieure sur les surfaces à RAFT-(Man)₄ par rapport aux surfaces à RAFT-(Man)₁. Ce phénomène qui est observé même à de faibles densités de surface en RAFT-Man suggère également qu'un RAFT-(Man)₄ peut se lier à plusieurs lectines.

En conclusion, l'utilisation du modèle thermodynamique de Scatchard, bien qu'imparfaitement adapté à l'étude du RAFT-(Man)₄ nous permet d'émettre l'hypothèse que cette molécule peut se lier à plusieurs lectines et que cet effet de « cluster » (Figure 3 page - 59 -) améliore l'affinité de l'interaction avec la lectine

Cet effet de « cluster » de la lectine Con A par la molécule RAFT-(Man)₄ a pu être mis en évidence en étudiant l'interaction de la lectine Con A avec une surface en sucre mannose en présence de RAFT-(Man)₄ en solution.

Afin de confirmer la capacité des molécules RAFT-(Man)₄ à se lier à plusieurs lectines différentes, une expérience de compétition a été effectuée et suivie en SPR.

- Etude par compétition

Pour cette étude similaire à des études d'inhibition, nous avons utilisé une sensor chip C1 sur laquelle 370 RU de streptavidine ont été immobilisées. La piste de référence est fonctionnalisée à 100 % en RAFT-(Lac)₄ et les trois pistes d'étude présentent 100, 25 et 10 % en RAFT-(Man)₁. Des solutions de Con A à 16,33 μM mélangées avec des concentrations croissantes en RAFT-(Man)₁ ou en RAFT-(Man)₄ sont ensuite injectées sur la surface. L'interaction de la lectine Con A avec les surfaces est alors quantifiée par SPR. Les réponses

obtenues à la fin du cycle d'association du mélange Con A – RAFT-Man en fonction de la concentration en RAFT-Man en solution sont représentées sur la Figure 24.

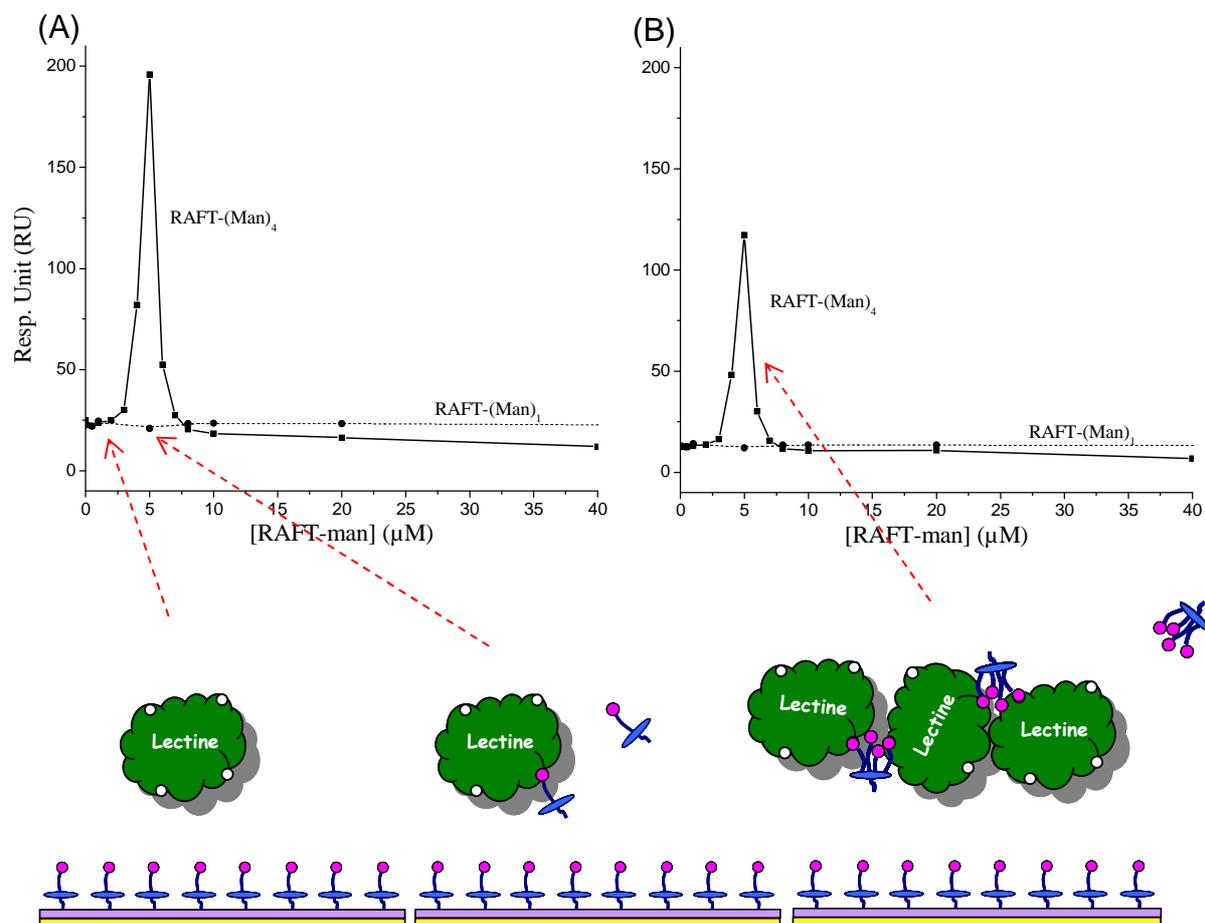


Figure 24 : Etude SPR de l'association de la lectine Con A (16,33 μM) avec une surface à (A) 100 % et (B) 10 % en RAFT-(Man)₁ en présence de concentrations croissantes en RAFT-(Man)₁ et RAFT-(Man)₄ en solution. Les valeurs représentées correspondent aux réponses obtenues à la fin du cycle d'association du mélange Con A/RAFT-Man. En dessous des graphes, une représentation schématique des comportements mis en jeu est présentée.

Aucun changement du signal n'est observé lors de l'injection de la lectine Con A en présence de RAFT-(Man)₁ en solution, et ce quelque soit la concentration. Par contre, une grande augmentation du signal est observée lorsque la Con A est injectée en présence de 3 à 6 μM de RAFT-(Man)₄ en solution avec une réponse maximale observée pour une concentration de 5 μM en RAFT. On observe des réponses similaires pour les trois densités de surface en RAFT-(Man)₁. Il apparaît alors que la molécule RAFT-(Man)₄ en solution au lieu d'inhiber la reconnaissance de la lectine, améliore fortement son interaction pour une certaine gamme de proportion Con A/RAFT-(Man)₄. Ce phénomène peut s'expliquer par la possibilité de la molécule RAFT-(Man)₄ à se lier à deux ou trois lectines pour former des agrégats solubles⁵⁵.

Ces « agrégats » peuvent alors interagir avec les surfaces en RAFT-(Man)₁. Dans cette gamme de concentration, la molécule RAFT-(Man)₄ se comporte alors comme un promoteur de l'interaction Con A/RAFT-(Man)₁ (surface), puisque les agrégats de Con A exhibent un comportement multivalent encore plus important que les lectines seules en solution. Pour des concentrations supérieures en RAFT-(Man)₄, l'inhibition de l'interaction Con A/RAFT-(Man)₁ est observée comme on l'attendait.

Par contre concernant l'action de la molécule RAFT-(Man)₁ sur l'interaction avec la surface, aucun comportement d'inhibiteur n'est remarqué. Il semble alors que l'interaction entre la Con A et le RAFT-(Man)₁ soit trop faible en solution et que la multivalence de la surface soit plus attractive pour la lectine, expliquant alors l'absence de variation du signal observé.

II.2. Conclusion

Les études de l'interaction entre la lectine Con A en solution et les molécules RAFT-Man immobilisées se sont avérées très délicates à analyser. En effet, l'immobilisation des ligands RAFT-Man entraîne la formation d'une surface de sucre multivalente. Même en espaçant les RAFT-Man sur la surface par co-assemblage avec un RAFT-Lac non reconnaissant, il est difficile de s'affranchir des effets chélatant de la lectine multimérique. Pour cette raison, étudier l'impact de la présentation multiple des motifs mannose par les plateformes RAFT est un challenge difficile. Discriminer par cette méthode les influences respectives de l'effet « cluster » et de l'effet de proximité/statistique sur l'augmentation de l'affinité de la Con A pour le RAFT-(Man)₄ apparaît également comme une entreprise encore plus difficile.

Cette étude a cependant permis de confirmer que la présentation multiple des sucres par les plateformes RAFT permet d'accroître l'affinité pour la lectine. Néanmoins, cet effet n'a pas pu être quantifié du fait de la complexité du système étudié et donc de l'impossibilité à modéliser, de manière rigoureuse, l'interaction de la lectine Con A avec le RAFT-(Man)₄ immobilisé.

Dans le cas du ligand monovalent RAFT-(Man)₁, immobilisé, une modélisation de l'interaction avec la lectine Con A est possible, du fait de la moindre complexité du système. Nous avons pu montrer que la constante de dissociation entre le RAFT-(Man)₁ et un site de la lectine Con A est de l'ordre de 100 μ M. A forte densité de RAFT-(Man)₁ immobilisé, l'interaction avec la lectine Con A peut être décrite au moyen du modèle bivalent de Scatchard. L'interaction bivalente de la lectine Con A avec les RAFT-(Man)₁ immobilisés permet d'améliorer l'affinité de l'interaction en abaissant le K_{DX} jusqu'à 45 μ M.

Aucun modèle ne permet de rendre compte rigoureusement de l'interaction de la lectine Con A avec le RAFT-(Man)₄ immobilisé. Le modèle de Scatchard bivalent, a cependant été utilisé pour montrer de manière qualitative que l'affinité et les quantités de Con A fixée sont systématiquement supérieures sur les surfaces RAFT-(Man)₄. Nous avons démontré, par le biais d'expérience d'inhibition, que les RAFT-(Man)₄ peuvent interagir simultanément avec deux ou trois lectines différentes (effet « cluster »). L'amélioration de l'affinité de la Con A pour le RAFT-(Man)₄ est donc une conséquence de deux effets possibles, soit l'effet « cluster » de la lectine (que nous avons démontré), soit l'effet de proximité/statistique du fait de la concentration locale élevée des sucres mannose à la surface de la molécule RAFT.

Afin de pouvoir évaluer l'influence relative de ces deux effets, nous avons entrepris des expériences basées sur l'immobilisation de la lectine, ce qui, comme nous allons le voir, permet de simplifier le système.

II.3. Etude par SPR avec la lectine immobilisée

Afin de mettre en évidence l'effet de la présentation multiple des sucres (effet de proximité/statistique) de la molécule RAFT sur l'interaction sucre-lectine, nous avons décidé d'immobiliser la lectine directement sur la surface. Dans ces conditions, il est évident que l'interaction entre le RAFT-(Man)₁ et la lectine sera de type 1:1. L'effet chelatant, conséquence de l'immobilisation du RAFT-(Man)₁ sur une surface est en effet supprimé. Une situation identique (absence d'effet chelatant) sera obtenue pour l'étude du RAFT-(Man)₄. Dans le cas du RAFT-(Man)₄, il conviendra cependant de travailler avec une surface suffisamment diluée en Con A de manière à ce qu'une molécule de RAFT-(Man)₄ ne puisse pas interagir selon le processus de « cluster » avec plusieurs lectines Con A immobilisées. Comme le montre le schéma de la Figure 25, l'immobilisation de la lectine permet de simplifier le système.

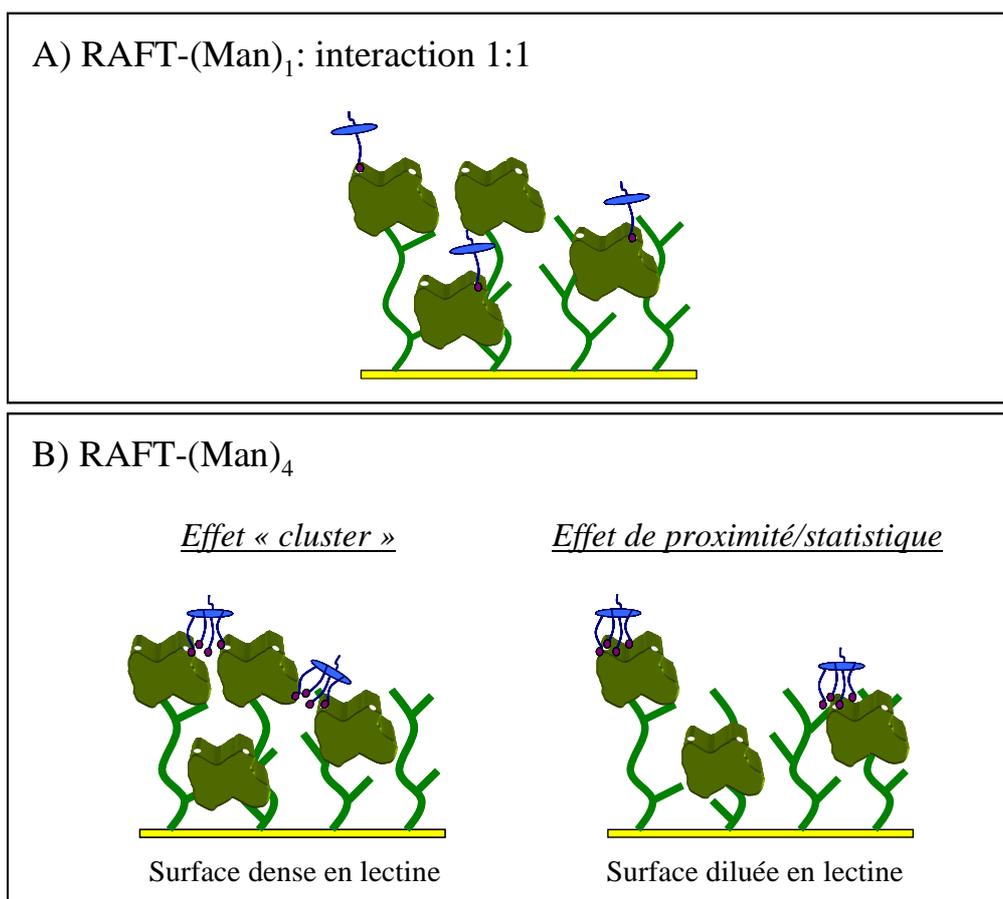


Figure 25 : Représentation schématique des différents processus possibles de liaison entre la lectine Con A immobilisée et les molécules en solution A) le RAFT-(Man)₁ et B) le RAFT-(Man)₄.

Une nouvelle molécule, appelée MAP, pour Multiple Antigenic Peptide (dendrimère utilisé pour présenter plusieurs copies d'un antigène immunogène), a été également testée lors de ces études. Cette dernière molécule permet une présentation multiple de 4 sucres sur sa surface, mais par l'intermédiaire d'une architecture différente de celle de la molécule RAFT. Les 4 sucres sont alors exhibés sur la molécule avec une plus grande proximité, leur conférant alors une moins grande liberté de mouvement (Figure 26). Cette molécule a été synthétisée par le Dr O. Renaudet et sera notée MAP-(Man)₄ par la suite.

Nous avons donc voulu tester si cette différence de structure permettait également l'amélioration de l'affinité avec la lectine Con A. L'ensemble des molécules RAFT et MAP, utilisées dans ces études, présente un groupement amine sur leur face de détection.

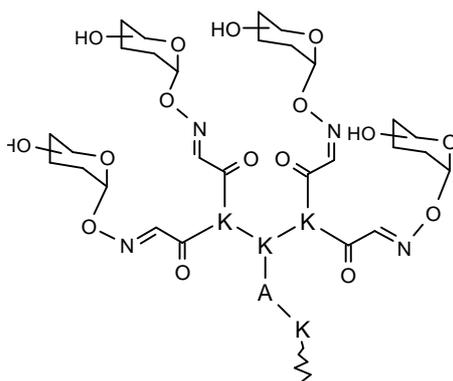


Figure 26 : Schéma de la molécule MAP-(Man)₄

L'immobilisation de la lectine Con A se fait de la même façon que celle de la streptavidine en utilisant la méthode du couplage amine. Seule la surface d'immobilisation varie. En effet, on utilise cette fois-ci une chips CM5. Il s'agit d'un support de verre recouvert d'une fine couche d'or et d'un hydrogel réticulé de dextran carboxyméthylé d'une épaisseur d'environ 100 nm. Par rapport aux études précédentes, nous avons utilisé une sensor chip CM5 parce que la sensor chip C1 ne permet pas l'immobilisation d'une quantité suffisante de lectine afin de permettre la détection des molécules RAFT et MAP de faible poids moléculaire.

Afin de garantir un état de surface identique, on immobilise, toujours par couplage amine, sur la piste d'étude la lectine Con A et sur celle de référence une quantité similaire en lectine PNA. Deux densités surfaciques différentes en Con A ont été effectuées. Une dilution suffisante de la Con A immobilisée devrait, en effet, permettre de s'affranchir de l'effet de « cluster » et d'étudier uniquement l'influence de la présentation multiple des motifs mannose par le RAFT-(Man)₄ (effet de proximité/statistique) (cf Figure 25).

II.3.1 Haute densité en lectine Con A

Pour une première étude nous avons décidé d'immobiliser les lectines à une haute densité de surface pour faciliter la détection des molécules RAFT et obtenir des courbes cinétiques exploitables. L'évolution des interactions Con A/RAFT-Man a ensuite été comparée à une surface plus diluée en Con A. Les solutions de lectines PNA (0.2 mg/mL) et Con A (0.1 mg/mL) sont laissées en contact avec la piste pendant 10 min à 10 μ L/min, après activation des sites carboxyméthyle par le mélange EDC-NHS. Respectivement, 6433 RU et 9669 RU de lectines sont immobilisées. Il faut noter que comme les lectines sont diluées dans un tampon acétate 10 mM, pH = 4.5, la lectine Con A ne se présente alors plus sous sa forme

tétramère mais sous la forme d'un dimère (pH de solubilisation de la lectine inférieure au point isoélectrique de la lectine).

II.3.1.1. Résultats expérimentaux

Nous avons tout d'abord vérifié l'absence d'adhésion non spécifique des molécules RAFT-(Lac)₄ et RAFT-(Man)₄ sur la piste d'étude et la piste de référence, respectivement. Une très faible adhésion non spécifique, inférieure à 10 RU pour une concentration maximale de 200 μ M en RAFT-(Lac)₄, est observée sur la piste d'étude. Aucune adhésion, par contre, n'est mise en évidence sur la piste de référence par la molécule RAFT-(Man)₄, même à très forte concentration.

Cela étant, il faut ensuite mettre au point la régénération de la surface afin de pouvoir effectuer l'étude cinétique d'adhésion des molécules RAFT-Man sur la surface de lectine. L'utilisation de mannose concentré à 50 mM permet la régénération totale et sans dégradation de la surface de lectine.

Finalement, il faut vérifier que les cinétiques d'association et de dissociation ne sont pas limitées par le transport de matière. Nous avons donc, comme pour les études précédentes d'adhésion de la lectine, fait varier le flux d'étude (5, 15 et 75 μ L/min) pour un cycle d'association-dissociation des trois molécules RAFT-(Man)₄, RAFT-(Man)₁ et MAP-(Man)₄ à une concentration de 10, 100 et 10 μ M respectivement. La Figure 27 montre les courbes obtenues.

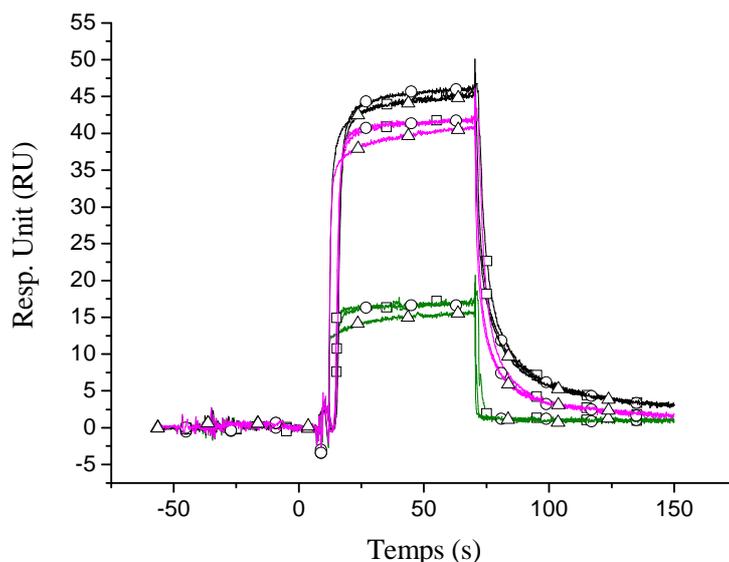


Figure 27 : Vérification de l'absence de limitation par du transport de matière de l'adhésion des analytes RAFT-(Man)₄ à 10 μ M (noir), RAFT-(Man)₁ à 100 μ M (vert) et MAP-(Man)₄ à 10 μ M (rose) sur la lectine immobilisée. Chaque association de molécules a été testée à 3 différents flux : 5 (\square), 15 (\circ), et 75 (Δ) μ L/min et à une température de 25°C.

Malgré un léger décalage de l'ensemble des courbes à 75 $\mu\text{L}/\text{min}$, l'ensemble des trois courbes pour chacune des trois molécules se superpose nettement, traduisant alors l'absence de limitation par le transport de matière. Une fois ces mises au point effectuées, nous avons pu entreprendre l'étude de l'interaction entre les molécules RAFT-(Man)₁, RAFT-(Man)₄ et MAP-(Man)₄ et la Con A immobilisée.

L'ensemble des sensorgrammes présenté dans cette partie, a été réalisé dans les conditions expérimentales suivantes (cf partie expérimentale) :

- T = 25°C
- flux de 40 $\mu\text{L}/\text{min}$
- 60 s de temps d'association et de dissociation de l'analyte
- régénération par injection d'une solution de mannose 50 mM pendant 120 s
- une concentration doublée et 2 concentrations nulles insérées dans la série

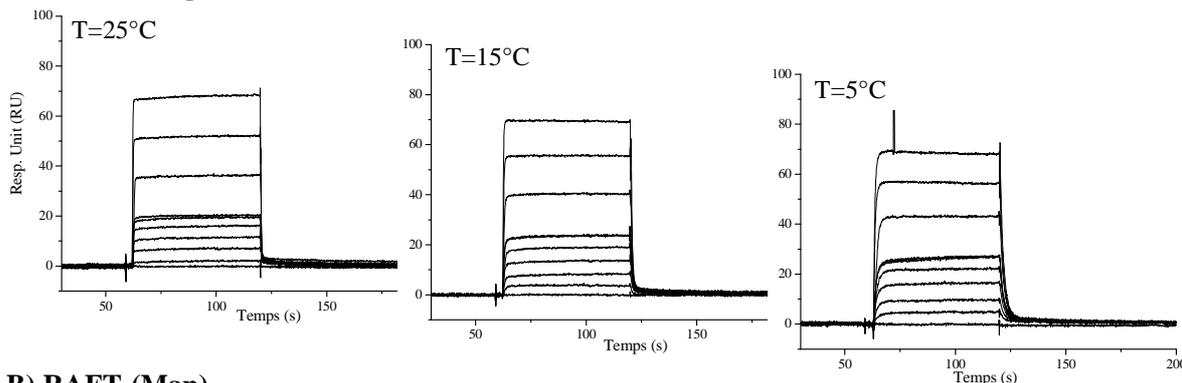
Les premières expériences d'adhésion de la molécule RAFT-(Man)₁, pour une gamme de concentration allant de 10 μM à 1000 μM , ont montré des processus d'association et de dissociation très rapides, incompatibles avec l'obtention d'informations cinétiques. Seule l'analyse du signal à l'équilibre (R_{eq}) peut être exploitée, ce qui permet de déterminer l'affinité de l'interaction par l'utilisation d'une isotherme de Langmuir.

Afin d'évaluer les paramètres cinétiques, il faut trouver un moyen de ralentir les processus d'association et de dissociation de la molécule. Une possibilité est de diminuer la température d'étude de l'interaction. Les sensorgrammes ont donc également été réalisés dans les mêmes conditions à 5 °C et 15 °C.

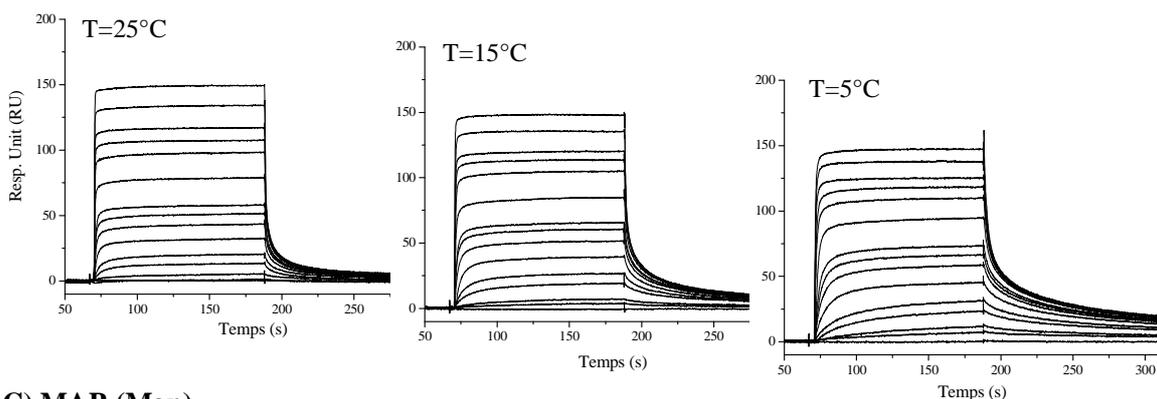
Des conditions expérimentales identiques ont été utilisées pour l'étude du RAFT-(Man)₄ et du MAP-(Man)₄. Cependant, du fait des quantités de produits disponibles, des gammes de concentrations moins larges ont été utilisées : de 50 nM à 400 μM pour le RAFT-(Man)₄ et de 500 nM à 200 μM pour le MAP-(Man)₄. Ces gammes de concentration moins élevées ne constituent pas *a priori* un handicap car des affinités plus élevées de ces molécules multivalentes vis-à-vis de la lectine Con A sont attendues.

La Figure 28 présente les sensorgrammes obtenus aux différentes températures pour les trois molécules étudiées.

A) RAFT-(Man)₁



B) RAFT-(Man)₄



C) MAP-(Man)₄

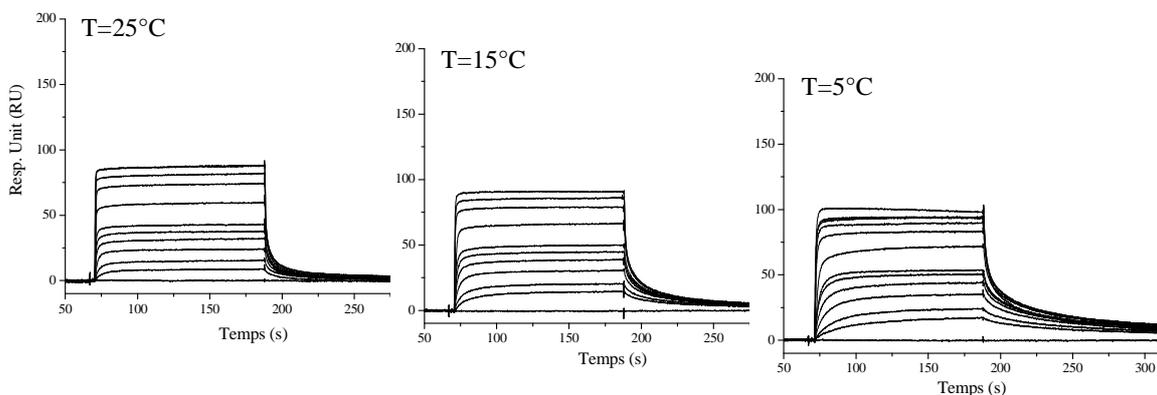


Figure 28 : Sensorgrammes enregistrés à 25°C, 15°C et 5°C lors de l'interaction des molécules A) RAFT-(Man)₁, B) RAFT-(Man)₄ et C) MAP-(Man)₄ avec la lectine Con A immobilisée à haute densité surfacique (9669 RU). La piste de référence est obtenue par immobilisation de 6433 RU de lectine PNA. Le flux est de 40 μ L/min. Les gammes de concentrations utilisées sont : 10 μ M – 1000 μ M pour le RAFT-(Man)₁; 50 nM – 400 μ M pour le RAFT-(Man)₄ et 500 nM – 200 μ M pour le MAP-(Man)₄.

II.3.1.2. Discussion

Une première analyse purement visuelle des sensorgrammes obtenus, démontre que diminuer la température de 25°C à 5°C permet de ralentir efficacement les processus d'association et de dissociation pour chacune des molécules étudiées. Dans le cas du RAFT-(Man)₁, seule l'expérience réalisée à 5°C (Figure 28A)) permettra d'obtenir des informations cinétiques. Les

molécules RAFT-(Man)₄ et MAP-(Man)₄ (Figure 28B) et C)) présentent des comportements similaires avec une vitesse d'association relativement rapide et une vitesse de dissociation beaucoup plus lente par rapport au RAFT-(Man)₁. Il semble alors que la présence des 4 sucres permet de former un complexe beaucoup plus stable par rapport au complexe RAFT-(Man)₁ / Con A qui se dissocie immédiatement lors du rinçage. Il convient également de remarquer, qu'à l'opposé du RAFT-(Man)₁, l'ensemble des sensorgrammes obtenus avec les molécules multivalentes présentent des informations cinétiques exploitables, même pour la température la plus élevée de 25°C.

Afin de quantifier les forces d'interaction entre la lectine Con A immobilisée et les différentes molécules oligosaccharidiques, il convient tout d'abord d'identifier le modèle d'interaction qui permet de rendre compte des résultats expérimentaux

Les sensorgrammes de la Figure 28 démontrent que pour chaque concentration d'analyte utilisé, un équilibre est obtenu à la fin de l'étape d'association. Nous avons donc pu réaliser les tracés de Scatchard ($R_{\text{eq}}/[\text{analyte}]$ en fonction de $[\text{analyte}]$) pour chacune des molécules étudiées (Figure 29).

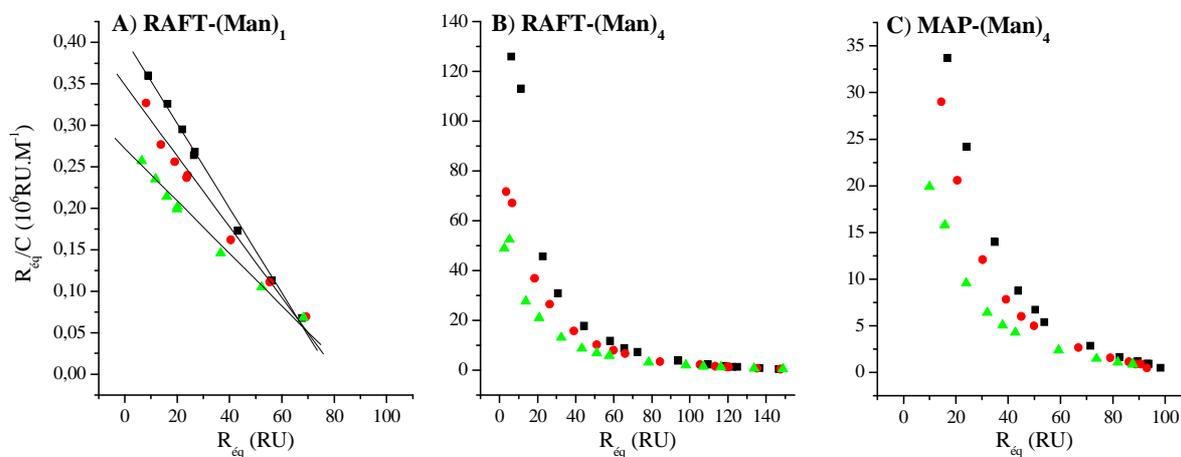


Figure 29 : Représentation de Scatchard pour l'interaction de la lectine Con A immobilisée à forte densité surfacique (9669 RU) avec les molécules A) RAFT-(Man)₁, B) RAFT-(Man)₄ et C) MAP-(Man)₄. Les données ont été analysées pour trois températures 5°C (■), 15°C (●) et à 25°C (▲).

L'obtention d'un tracé de Scatchard linéaire dans le cas du RAFT-(Man)₁ indique que l'interaction de cette molécule avec la lectine Con A immobilisée peut être décrite par un modèle d'interaction de type 1:1 (modèle de Langmuir). Le tracé de l'isotherme d'adsorption et sa modélisation par une isotherme de Langmuir permet alors d'obtenir pour chaque température la constante de dissociation (K_D) et R_{max} . Ces données sont rassemblées dans le Tableau 8.

Température (°C)	K_D (μM)	R_{max} (RU)	Chi ²
5	203,9	80,4	0,549
15	270,6	86,9	0,643
25	368	92,5	0,466

Tableau 8 : Constantes de dissociation (K_D) et réponses maximales de molécules RAFT-(Man)₁ (R_{max}) fixée lors de l'interaction avec la lectine Con A immobilisée à forte densité surfacique. Les réponses à l'équilibre de la Figure 28A) ont été analysées au moyen d'une isotherme de Langmuir.

Les faibles valeurs de chi² obtenues entre les données expérimentales et les valeurs simulées attestent d'une analyse de bonne qualité. Les valeurs élevées des K_D déterminés sont en accord avec une faible affinité du RAFT-(Man)₁ pour la lectine Con A. Ce résultat est caractéristique des interactions monovalentes sucre - lectine et parfaitement en accord avec les résultats de la littérature. Il est intéressant de constater que la valeur obtenue à 25°C ($K_D = 368 \mu\text{M}$) est du même ordre de grandeur que celle mesurée lorsque le RAFT-(Man)₁ est immobilisé à faible densité sur la surface ($K_D = 97$ ou $154 \mu\text{M}$, cf pages - 92 - et - 95 -). La valeur de K_D , légèrement supérieure obtenue ici pourrait être attribuée à la méthode de mesure différente. Plus certainement, elle pourrait indiquer que les RAFT-(Man)₁ immobilisés n'étaient pas suffisamment dilués sur la surface. Dans ce cas la possibilité d'une interaction bivalente de la lectine avec la surface (effet chelatant) pourrait être en mesure d'abaisser la constante K_D jusqu'à $97 \mu\text{M}$.

La légère augmentation de R_{max} avec la température (Tableau 8) pourrait être une conséquence d'une variation des propriétés optiques du système avec la température.

Pour la température de 5°C, nous avons également réalisé une analyse cinétique du sensorgramme enregistré (Figure 28A)). L'application du modèle cinétique 1:1 de Langmuir donne une simulation des données expérimentales de bonne qualité (Figure 30) avec une faible valeur de chi² et des résidus de qualité acceptable. Les constantes de vitesses d'association et de dissociation sont respectivement $k_a = 2092 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $k_d = 0,389 \text{ s}^{-1}$. On en déduit une constante d'équilibre de dissociation, $K_D = k_d/k_a = 185,8 \mu\text{M}$. Cette valeur, très proche de celle déterminée via l'isotherme d'adsorption ($K_D = 203,9 \mu\text{M}$, Tableau 8) confirme la validité d'un modèle d'interaction 1:1 entre la lectine Con A immobilisée et le RAFT-(Man)₁. Ceci est également corroboré par des valeurs similaires des R_{max} obtenus par l'analyse thermodynamique ($R_{\text{max}} = 80,4 \text{ RU}$, Tableau 8) et par l'analyse cinétique ($R_{\text{max}} = 83,9 \text{ RU}$).

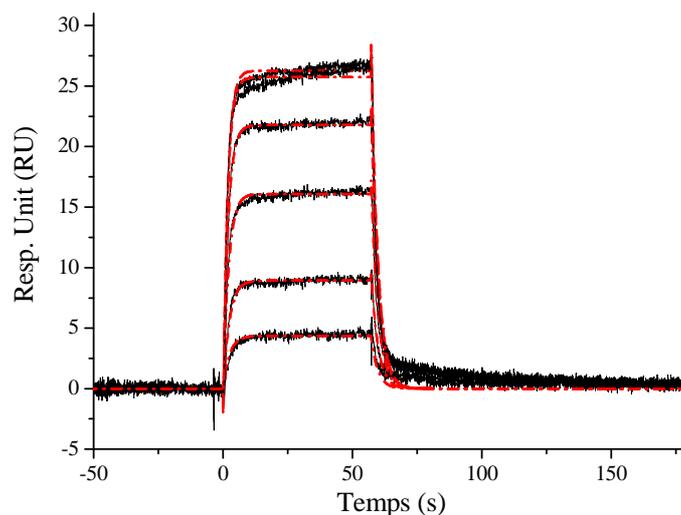


Figure 30 : Courbes cinétiques d'association et dissociation de la molécule RAFT-(Man)₁ avec la lectine Con A (en noir) et leur modélisation (en rouge pointillés) par le modèle 1 :1 du logiciel BIAcore® T100 évaluation. L'étude cinétique a été faite à 5°C.

Dans le cas des molécules RAFT-(Man)₄ et MAP-(Man)₄, la non linéarité des tracés de Scatchard (Figure 29) démontre qu'un modèle d'interaction monovalent 1:1 ne peut rendre compte de l'interaction. Pour interpréter ce résultat, nous avons fait l'hypothèse que, pour un taux de greffage de 9669 RU, les molécules de Con A immobilisées étaient suffisamment proches les unes de autres pour que les molécules RAFT-(Man)₄ et MAP-(Man)₄ puissent interagir avec deux lectines différentes selon l'effet « cluster » décrit à la Figure 25B).

Dans cette hypothèse, nous avons tout d'abord analysé les quantités de molécules multimériques fixées à l'équilibre ($R_{\text{éq}}$) en appliquant le modèle de Scatchard bivalent selon l'équation de liaison hyperbolique rectangulaire (équation II-3). Les résultats de cette analyse sont présentés dans le Tableau 9.

RAFT-(Man) ₄				MAP-(Man) ₄			
Température	K_{DX} (μM)	C_{X}^* (μM)	r	Température	K_{DX} (μM)	C_{X}^* (μM)	r
5 °C	13,9	1,7201	0,9809	5 °C	11,6	1,5713	0,9791
15 °C	18,8	1,728	0,9827	15 °C	14,1	1,5287	0,9841
25 °C	28,1	1,772	0,9838	25 °C	21,6	1,5453	0,9982

Tableau 9 : Constantes de dissociation intrinsèque (K_{DX}) et concentration effective (C_{X}^*) des sites d'affinité pour l'interaction du RAFT-(Man)₄ et MAP-(Man)₄ avec la lectine Con A immobilisée à forte densité (9669 RU). Ces valeurs résultent de l'analyse des réponses à l'équilibre des sensorgrammes de la Figure 28 au moyen du modèle de Scatchard bivalent selon l'équation de liaison hyperbolique rectangulaire (équation II-3).

Les concentrations effectives (C_{X}^*) des sites d'affinité de la lectine immobilisée semblent légèrement supérieures pour le RAFT-(Man)₄. Ceci pourrait être une conséquence des

structures différentes du RAFT et du MAP. Il pourrait également s'agir d'une conséquence des gammes de concentrations différentes utilisées pour étudier l'interaction de ces deux molécules avec la lectine Con A.

Comme le montrent les simulations de la Figure 31 et les valeurs élevées des coefficients de corrélation, le modèle bivalent de Scatchard permet de rendre compte des résultats expérimentaux.

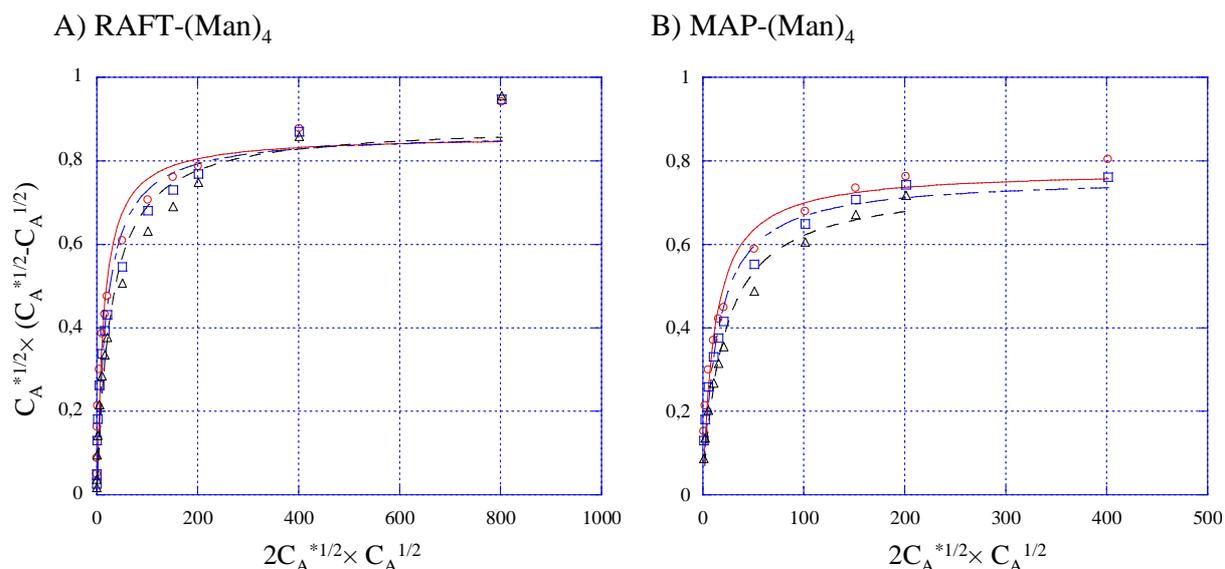


Figure 31: Représentation hyperbolique de Scatchard selon un modèle d'interaction bivalente entre A) le RAFT-(Man)₄ et B) le MAP-(Man)₄ avec la lectine Con A immobilisée à forte densité surfacique (9669 RU) pour les trois températures : 5 °C (○), 15°C (Δ) et 25 °C (□). Ces tracés ont été effectués à partir des réponses à l'équilibre des sensorgrammes de la Figure 28. Les points représentent les valeurs expérimentales et les courbes sont obtenues par ajustement paramétrique au moyen de l'équation de la liaison hyperbolique (équation II-3).

Les valeurs de K_{DX} restent comprises entre 10 et 30 μM et sont donc dans un ordre de grandeur plus faibles que celles enregistrées avec le RAFT-(Man)₁ ($K_D \sim 200 \mu\text{M}$). Ce résultat est donc parfaitement en accord avec notre hypothèse que le RAFT-(Man)₄ et le MAP-(Man)₄ peuvent interagir simultanément avec plusieurs lectines immobilisées (effet « cluster »), ce qui renforce la force de l'interaction. Les valeurs similaires de K_{DX} observées pour le RAFT-(Man)₄ et le MAP-(Man)₄ suggèrent que la différence de structure entre ces deux composés n'influence que faiblement leur affinité vis-à-vis de la lectine Con A pour ce type d'interaction bivalente. Une analyse cinétique de l'interaction des molécules RAFT-(Man)₄ et le MAP-(Man)₄ est également possible tout comme le RAFT-(Man)₁. Seuls les sensorgrammes obtenus à 5°C (Figure 28) ont fait l'objet d'une telle étude. La Figure 32 compare les sensorgrammes expérimentaux avec les sensorgrammes simulés au moyen d'un

modèle d'analyte monovalent (Figure 32A)) et au moyen d'un modèle d'analyte bivalent (Figure 32B)).

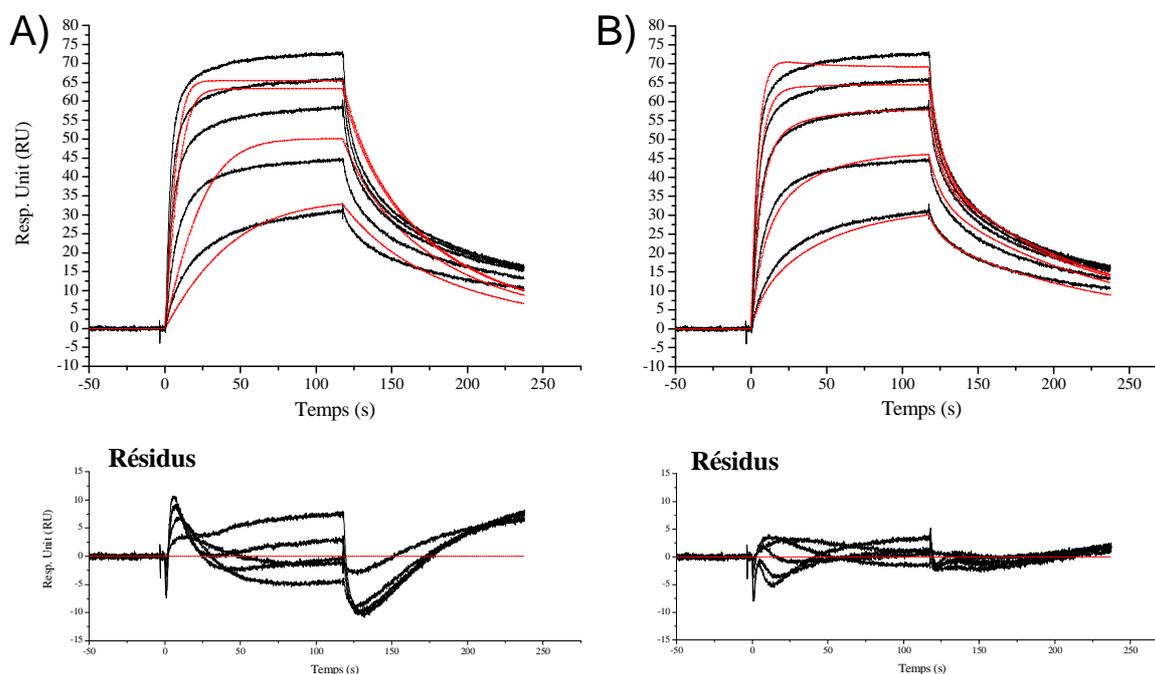


Figure 32 : Analyse cinétique de l'interaction du RAFT-(Man)₄ avec la lectine Con A immobilisée à forte densité surfacique (9669 RU) au moyen d'un modèle A) de Langmuir et B) de l'analyte bivalent. Les courbes noire et rouge correspondent respectivement aux sensorgrammes expérimentaux et simulés. Les résidus (différence entre le modèle et la courbe expérimentale) sont également présentés.

Comme attendu, le modèle de Langmuir ne permet pas de rendre compte des sensorgrammes expérimentaux (Figure 32A)). En revanche des simulations de meilleure qualité (résidus et χ^2 plus faibles) sont obtenues avec le modèle d'analyte bivalent (Figure 32B)). Les résultats de cette modélisation cinétique sont présentés dans le

Tableau 10.

Analytes	ka1 (M ⁻¹ .s ⁻¹)	kd1 (s ⁻¹)	kd1/ka1 (μM)	ka2 (RU ⁻¹ .s ⁻¹)	kd2 (s ⁻¹)	Rmax (RU)	chi ²
RAFT-(Man) ₄	6726	0,1123	16,70	0,00038	0,00579	132,5	1,99
MAP-(Man) ₄	7404	0,09322	12,59	0,00067	0,0079	117,80	1,5
RAFT-(Man) ₁	2092	0,389	185,80				

Tableau 10 : Résumé des paramètres cinétiques et thermodynamiques obtenus par la modélisation cinétique (modèle d'analyte bivalent) des courbes d'association-dissociation des molécules RAFT-(Man)₄ et MAP-(Man)₄ avec la lectine Con A immobilisée à forte densité surfacique (9669 RU), pour une température de 5°C. Les valeurs des paramètres obtenus avec le RAFT-(Man)₁ (modèle cinétique de Langmuir) sont également présentés pour comparaison.

Le modèle cinétique d'analyte bivalent semble donc être un modèle bien adapté, en accord avec l'analyse thermodynamique effectuée au moyen du modèle de Scatchard bivalent. On constate que les deux molécules RAFT-(Man)₄ et le MAP-(Man)₄ présentent des constantes cinétiques analogues, confirmant que les différences structurales entre ces deux composés ne sont pas suffisantes pour influencer notablement l'interaction avec la Con A immobilisée sur cette surface.

La comparaison des constantes cinétiques k_{a1} et k_{d1} de la première étape du mécanisme d'analyte bivalent avec les constantes cinétiques obtenues pour l'interaction du RAFT-(Man)₁ (mécanisme 1:1) s'avère particulièrement intéressante. On observe en effet que la constante de vitesse k_{a1} est environ 3,5 fois plus élevée que la valeur k_a observée pour le RAFT-(Man)₁. Cette augmentation de la vitesse d'association peut, sans ambiguïté, être attribuée à un effet de concentration locale en mannose plus élevé dans le cas des ligands exhibant 4 mannoses (effet de proximité/statistique). A l'inverse, on observe des constantes de vitesse de dissociation k_{d1} environ 4 fois plus faible que celles observées avec le RAFT-(Man)₁. Cette diminution du k_d pourrait s'expliquer également par l'effet de proximité/statistique qui pourrait favoriser un processus local de re-liaison. Ces deux effets cinétiques se combinent pour aboutir à l'obtention d'une constante d'équilibre de dissociation K_{D1} inférieure par plus d'un ordre de grandeur à celle obtenue (K_D) pour le RAFT-(Man)₁.

Il apparaît donc clair que les deux effets apportés par les molécules RAFT (ou MAP) multivalentes, l'effet cluster et l'effet de densité locale en sucre, joue un rôle important dans l'amélioration de l'affinité de la lectine Con A. Afin de mettre en évidence uniquement le second effet de densité locale en sucre, nous avons réalisé d'autres expériences à une plus faible densité surfacique en lectine Con A immobilisée.

II.3.2 Faible densité en lectine Con A

Lors de nos premières études, nous avons immobilisé 9669 RU de lectine Con A sur la surface de dextran. A ce taux d'immobilisation, les lectines présentent une proximité telle que les molécules RAFT-(Man)₄ et le MAP-(Man)₄ peuvent se lier de façon multivalente à plusieurs lectines de la surface. Pour cette seconde étude, nous avons donc voulu nous placer à une densité de recouvrement en lectine faible de telle sorte que la distance entre deux lectines rende impossible ces interactions multiples des molécules RAFT-(Man)₄ et le MAP-(Man)₄. Nous avons alors décidé d'immobiliser une quantité de lectine environ trois fois inférieure au taux précédent. En effet, il faut diminuer la densité de lectine pour espacer au

maximum les lectines tout en gardant une quantité suffisante pour permettre la détection des petites molécules RAFT-Man et MAP-Man. 3193 RU et 2832 RU, respectivement, de lectines Con A et PNA ont donc été immobilisée sur une sensor chip CM5 par couplage amine sur les pistes d'étude et de référence.

II.3.2.1. Résultats expérimentaux

Les mêmes études cinétiques que précédemment ont été effectuées sur les trois molécules RAFT-(Man)₁, RAFT-(Man)₄ et le MAP-(Man)₄, mais cette fois sur deux températures (5 et 25°C). Les cycles d'association-dissociation des analytes sont de 120 s chacun, avec une régénération de 120 s par injection d'une solution de mannose 50 mM. L'ensemble de l'étude a été réalisé à un flux constant de 40 µL/min. Afin de vérifier la conservation du même état de surface tout au long de l'expérience une concentration a systématiquement été doublée, et deux concentrations nulles (tampon) ont été effectués. Les concentrations utilisées sont les mêmes que précédemment pour les RAFT-(Man)₄ et RAFT-(Man)₁, par contre pour la molécule MAP-(Man)₄, par manque de produits nous n'avons pu monter qu'à 100 µM. Les sensorgrammes obtenus à 5 et 25°C sont représentés à la Figure 33.

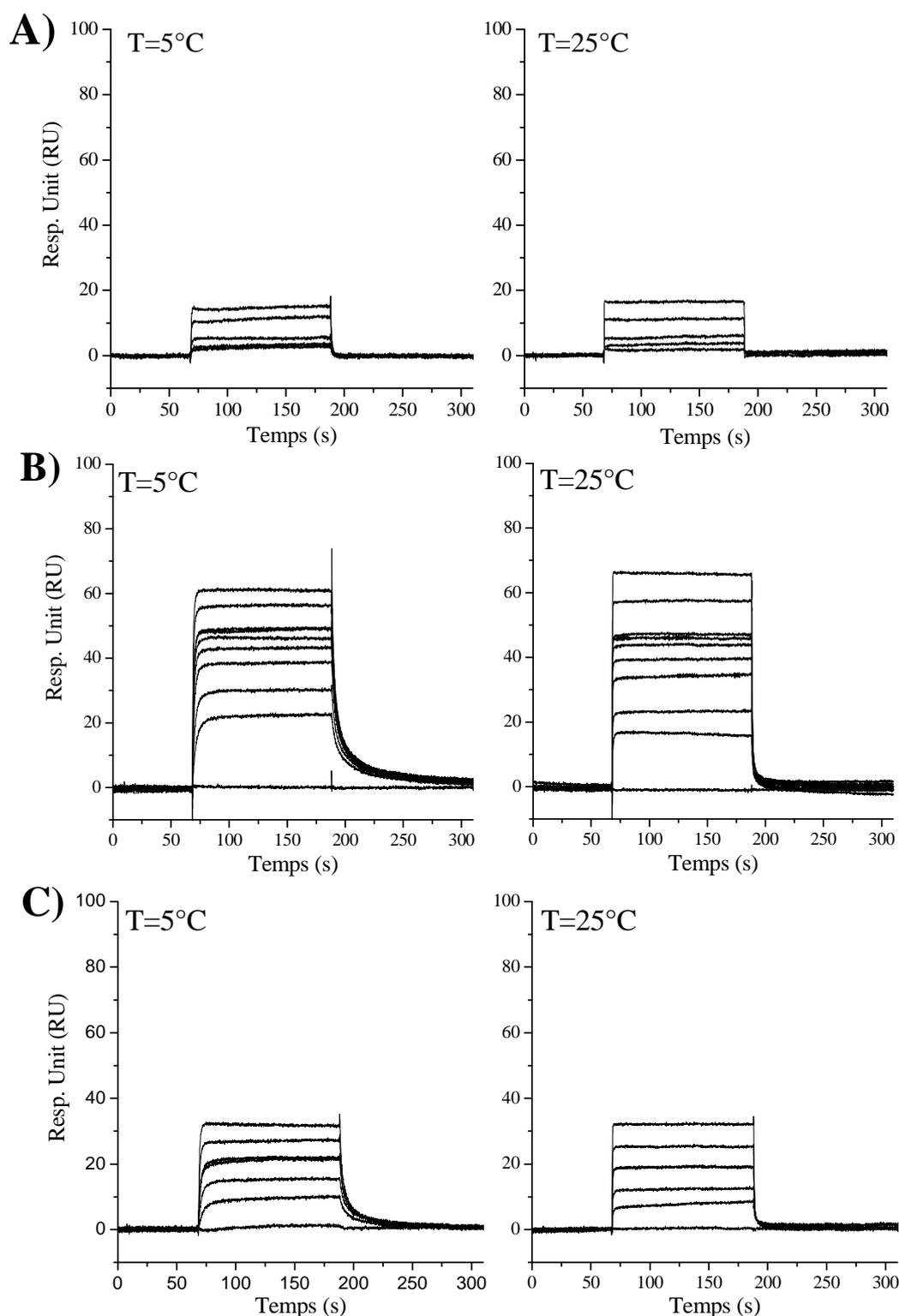


Figure 33 : Sensorgrammes enregistrés à 5°C et 25°C lors de l'interaction des molécules A) RAFT-(Man)₁, B) RAFT-(Man)₄ et C) MAP-(Man)₄ avec la lectine Con A immobilisée à faible densité surfacique (3193 RU). La piste de référence est obtenue par immobilisation de 2832 RU de lectine PNA. Le flux est de 40 μ L/min. Les gammes de concentrations utilisées sont : 10 μ M – 1000 μ M pour le RAFT-(Man)₁ ; 50 nM-400 μ M pour le RAFT-(Man)₄ et 500 nM – 100 μ M pour le MAP-(Man)₄.

II.3.2.2. Discussion

Les sensorgrammes obtenus à 25°C présentent des étapes d'association et de dissociation très rapides qui empêchent toute analyse cinétique. L'abaissement de la température à 5°C ralentit suffisamment les processus d'interaction pour qu'une analyse cinétique soit possible dans le cas du RAFT-(Man)₄ et le MAP-(Man)₄. Dans tous les cas, un état d'équilibre est obtenu à la fin de l'étape d'association, ce qui permettra une analyse thermodynamique de l'interaction.

Afin de vérifier la présence ou l'absence d'interactions multivalentes entre les ligands mannose et la lectine Con A immobilisée, les représentations de Scatchard ont été tracées et sont représentés à la Figure 34.

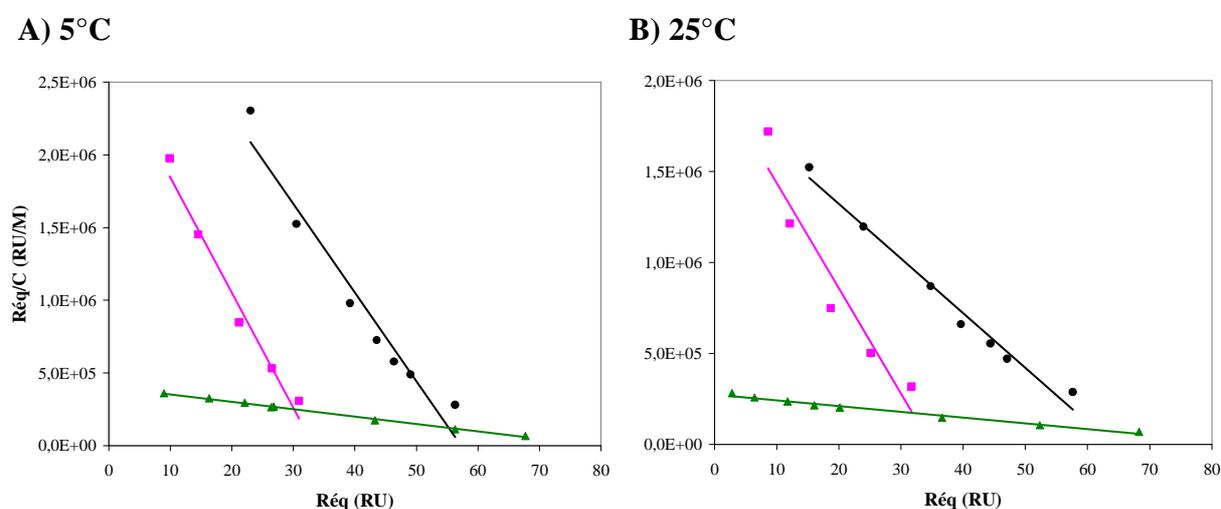


Figure 34 : Représentation de Scatchard pour l'interaction de la lectine Con A immobilisée à faible densité surfacique (3193 RU) avec les molécules RAFT-(Man)₁ (▲), MAP-(Man)₄ (■) et RAFT-(Man)₄ (●) à A) 5°C et B) 25°C.

L'obtention d'une légère courbure sur l'ensemble des tracés de Scatchard linéaires correspondant à l'interaction des molécules RAFT-(Man)₄ et MAP-(Man)₄ avec la lectine Con A semble indiquer la présence persistante d'une interaction plus complexe que la simple interaction 1:1 attendue. Cela peut s'expliquer par une proximité encore trop importante des lectines immobilisées à la surface. Une seconde explication pourrait être simplement l'effet de proximité/statistique due à la présentation des sucres sur les molécules RAFT-(Man)₄ et MAP-(Man)₄, qui fait que l'on aura forcément une interaction plus complexe que le modèle d'interaction 1:1. Des expériences complémentaires à plus faible densité de Con A serait donc nécessaire pour permettre d'élucider l'origine de la faible courbure sur les tracés de Scatchard.

Compte tenu de la quantité faible de la lectine sur la surface et de la faiblesse de la courbure des tracés de Scatchard, nous avons décidé de négliger ces interactions multivalentes et de traiter les données expérimentales à l'aide de modèles d'interaction de type 1:1.

Le tracé des isothermes d'adsorption et leur modélisation au moyen d'une isotherme 1:1 de Langmuir donne accès aux paramètres thermodynamiques de l'interaction entre les molécules RAFT-(Man)₄, RAFT-(Man)₁ et MAP-(Man)₄ et la lectine Con A immobilisée (Tableau 11).

Analyte	Temp (°C)	K _D (μM)	R _{max} (RU)	chi ²
RAFT-(Man) ₁	5	325,7	24,4	0,292
RAFT-(Man) ₄	5	21,6	61,6	5,43
MAP-(Man) ₄	5	14,4	34,4	0,677
RAFT-(Man) ₁	25	366,7	29,4	0,664
RAFT-(Man) ₄	25	44,7	70,7	4,15
MAP-(Man) ₄	25	23,1	37,8	1,79

Tableau 11 : Constante de dissociation (K_D) et quantité maximale de molécule RAFT-Man et MAP-(Man)₄ (R_{max}) fixée lors de l'interaction avec la lectine Con A immobilisée à faible densité surfacique (3193 RU). Les réponses à l'équilibre des sensorgrammes (Figure 33) ont été analysées au moyen d'une isotherme de Langmuir.

Dans le cas des expériences réalisées à 5°C avec le RAFT-(Man)₄ et le MAP-(Man)₄, une analyse cinétique des sensorgrammes est également possible, selon un modèle de Langmuir (Tableau 12). En revanche, la qualité médiocre des sensorgrammes obtenus avec le RAFT-(Man)₁ à faible densité surfacique de lectine Con A ne permet pas cette analyse cinétique.

Une simulation satisfaisante (chi² < 5) des sensorgrammes expérimentaux est obtenue pour les deux molécules.

Analyte	Temp (°C)	k _a (M ⁻¹ /s)	k _d (s ⁻¹)	K _D (μM)	R _{max} (RU)	chi ²
MAP-4man	5	9209	0,1101	12,0	32	0.898
RAFT-4man	5	6595	0,08248	12,5	51,2	4.19

Tableau 12 : Résumé des paramètres cinétiques obtenus par la modélisation cinétique (modèle de Langmuir) des courbes d'association-dissociation des molécules RAFT-(Man)₄ et MAP-(Man)₄ avec la lectine Con A immobilisée à faible densité surfacique (3193 RU), pour une température de 5°C.

La qualité de cette analyse cinétique est également validée par le fait que k_d / k_a = 12,5 μM et 12 μM, respectivement pour les molécules RAFT-(Man)₄ et MAP-(Man)₄, est très proche des

valeurs des constantes de dissociation, $K_D = 21,6 \mu\text{M}$ et $14,4 \mu\text{M}$ issues de l'analyse thermodynamique.

Afin de faciliter la discussion nous avons rassemblé dans le tableau 13, les informations cinétiques et thermodynamique obtenues à 5°C pour l'interaction des molécules RAFT-Man et MAP-Man avec la lectine Con A immobilisée à forte et à faible densité surfacique.

	Con A (RU)	Nature de l'interaction	$k_a^{(a)}$ ($\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	$k_d^{(a)}$ (s^{-1})	k_d/k_a (μM)	$K_D^{(b)}$ (μM)
RAFT-(Man) ₁	9669	1:1	2092	0,389	185,8	203,9
	3193	1:1	/ ^(c)	/ ^(c)	/ ^(c)	325,7
RAFT-(Man) ₄	9669	bivalente	6726	0,112	16,7	/
	3193	1:1	6595	0,0824	12,5	21,6
MAP-(Man) ₄	9669	bivalente	7404	0,093	12,6	/
	3193	1:1	9209	0,11	12,0	14,4

^(a) dans le cas d'une interaction bivalente k_a et k_d correspondent à la 1^{ère} étape du mécanisme (k_{a1} et k_{d1})

^(b) K_D est obtenu par l'analyse de l'isotherme d'adsorption selon un modèle de Langmuir

^(c) la qualité des sensorgrammes ne permet pas une analyse cinétique

Tableau 13 : récapitulatif des constantes cinétiques et thermodynamiques à 5°C relatives à l'interaction des molécules RAFT-Man et MAP-Man avec la lectine Con A immobilisée.

En effet, pour cette température de 5°C , nous avons réussi à mesurer l'ensemble des constantes cinétiques et thermodynamiques. Du fait de la cohérence des valeurs k_d/k_a et K_D , nous pouvons estimer les affinités des molécules RAFT-Man et MAP-Man en calculant la valeur moyenne de ces deux grandeurs. Ainsi la constante de dissociation est de $240 \mu\text{M}$ pour le RAFT-(Man)₁, de $17 \mu\text{M}$ pour le RAFT-(Man)₄ et de $12,3 \mu\text{M}$ pour le MAP-(Man)₄. La présentation multiple offerte par la plateforme RAFT et MAP améliore l'affinité d'un facteur 14 et 19 respectivement, soit d'un facteur 3,5 et 4,75 si l'on raisonne à concentration constante en motif mannose ($3,5 = 14/4$ et $4,75 = 19/4$). Cette amélioration par un facteur minimal de 3,5 est la conséquence de la concentration locale élevée (effet de proximité/statistique) offerte par le RAFT-(Man)₄ et le MAP-(Man)₄. C'est cet effet, conjugué à la possibilité de se lier à plusieurs lectines différentes (effet « cluster ») qui rend plus forte l'interaction des ligands RAFT (ou MAP) multivalent avec les lectines.

II.4. Conclusion

L'immobilisation de la lectine Con A permet une simplification nette du problème de la multivalence de la surface et permet de distinguer l'ensemble des processus rendant compte d'un « glycoside cluster effect ». Ces études ont donc permis de mettre en évidence la présence d'un effet de proximité/statistique due à la présentation multivalente des RAFT. Cet effet combiné à un effet de « cluster » des molécules RAFT est responsable de l'amélioration de la reconnaissance de la lectine par les molécules RAFT-(Man)₄ par rapport à la molécule homologue RAFT-(Man)₁ monovalente. Les résultats similaires obtenus par l'étude de l'adhésion de la molécule MAP montre que la structure de la plate forme de la molécule RAFT n'influence pas les processus de reconnaissance et que seule la proximité des sucres en est responsable.

La concordance des analyses cinétiques et thermodynamiques, ainsi que le mode d'immobilisation des lectines (qui induit une répulsion des molécules Con A rendue « positive ») devraient assurer que cette amélioration de l'affinité est due, exclusivement, à la présentation multivalente des sucres sur la molécule RAFT ou la molécule MAP. Cependant, les tracés de Scatchard mettent en avant la présence d'une légère courbure traduisant alors la présence d'une interaction plus complexe. Afin de confirmer ces résultats obtenus, une dilution supplémentaire de la densité en Con A sur la surface pourrait être envisagée. Cependant, une dilution supplémentaire de la surface ne garantirait pas pour autant que les lectines s'immobilisent, toutes, éloignées les unes de autres. De plus la détection des molécules deviendrait de plus en plus difficile rendant l'analyse des données très complexe et peu fiable. Cette présence de la légère courbure n'est peut être que, tout simplement, l'expression de la présence de l'effet de proximité/statistique des molécules RAFT-(Man)₄ et MAP-(Man)₄.

III. Conclusion du chapitre

Le but des études présentées dans ce chapitre était de démontrer les avantages de la présentation multiple des mannoses offert par la molécule RAFT sur l'amélioration de la force de l'interaction avec la lectine Con A. Pour ce faire, deux techniques de caractérisation aux interfaces différentes ont été utilisées. Cependant l'étude des interactions entre partenaires

biologiques multivalents, RAFT et lectines, à l'interface solide-liquide s'est avérée être d'une grande complexité.

La première approche entreprise qui consiste à immobiliser les molécules sucre sur une surface rend le système d'étude hautement délicat. En effet, la petite taille des molécules RAFT-Man par rapport aux lectines multimériques va permettre de créer des surfaces d'interaction multivalente en plus de la présentation multiple des sucres sur la molécule RAFT-(Man)₄. Afin de simplifier le système d'étude, les surfaces ont été diluées en sucre mannose. Cette manière de procéder nous a alors permis de démontrer que les molécules RAFT-(Man)₄ présentent une meilleure affinité avec la lectine Con A par rapport à leur homologue monovalent via deux effets : l'effet « cluster » et l'effet de proximité/statistique ou de densité locale en sucre. Finalement une étude de compétition a permis de confirmer l'effet « cluster » de la molécule RAFT-(Man)₄ qui va jouer alors un rôle d'effecteur sur la reconnaissance de la lectine Con A avec des surfaces à différentes densités en sucre mannose.

La seconde approche, qui consiste à immobiliser la lectine sur la surface, a ensuite été entreprise afin de distinguer l'importance de ces deux effets sur l'amélioration de la force d'interaction. Nous avons ainsi pu démontrer la présence d'un effet de proximité/statistique dû à la présentation multiple des sucres à la surface de la molécule RAFT ou MAP, qui permet une amélioration de la force de l'interaction d'un facteur 14 et 19 respectivement, soit d'un facteur 3,5 et 4,75 si l'on raisonne à concentration constante en motif mannose.

Pour la suite des études, une voie de synthèse intéressante pourrait être de combiner la présence de bras court et de bras long biologiquement actif sur la molécule RAFT. Cela pourrait permettre d'améliorer encore plus l'affinité de l'interaction en alliant les effets de proximité/statistique du RAFT avec la possibilité de « chelater » plusieurs sites d'une même lectine.

Références chapitre II :

- (1) Mammen, M.; Chio, S.-K.; Whitesides, G. M. *Angewandte Chemie, International Edition* **1998**, *37*, 2755-2794.
- (2) Varki, A. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.
- (3) Matrosovich, M. N.; Mochalova, L. V.; Marinina, V. P.; Byramova, N. E.; Bovin, N. V. *FEBS Letters* **1990**, *272*, 209-212.
- (4) Spaltenstein, A.; Whitesides, G. M. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 686-687.
- (5) Lees, W. J.; Spaltenstein, A.; Kingery-Wood, J. E.; Whitesides, G. M. *Journal of Medicinal Chemistry* **1994**, *37*, 3419-3433.
- (6) Sigal, G. B.; Mammen, M.; Dahmann, G.; Whitesides, G. M. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 3789-3800.
- (7) Choi, S.-K.; Mammen, M.; Whitesides, G. M. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 4103-4111.
- (8) Glick, G. D.; Toogood, P. L.; Wiley, D. C.; Skehel, J. J.; Knowles, J. R. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266*, 23660-23669.
- (9) Sabesan, S.; Duus, J. O.; Neira, S.; Domaille, P.; Kelm, S.; Paulson, J. C.; Bock, K. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 8363-8375.
- (10) Lee, R. T.; Lin, P.; Lee, Y. C. *Biochemistry* **1984**, *23*, 4255-4261.
- (11) DeFrees, S. A.; Kosch, W.; Way, W.; Paulson, J. C.; Sabesan, S.; Halcomb, R. L.; Huang, D.-H.; Ichikawa, Y.; Wong, C.-H. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 66-79.
- (12) Roy, R. *Curr Opin Struct Biol FIELD Full Journal Title:Current opinion in structural biology* **1996**, *6*, 692-702.
- (13) MacKenzie, C. R.; Hiram, T.; Deng, S.-j.; Bundle, D. R.; Narang, S. A.; Young, N. M. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 1527-1533.
- (14) Gestwicki, J. E.; Strong, L. E.; Kiessling, L. L. *Chemistry & Biology* **2000**, *7*, 583-591.
- (15) Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, *4*, 696-703.
- (16) Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. *Science* **2001**, *291*, 2357-2364.
- (17) Lundquist, J. J.; Toone, E. J. *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 555-578.
- (18) Vrasidas, I.; Andre, S.; Valentini, P.; Bock, C.; Lensch, M.; Kaltner, H.; Liskamp, R. M. J.; Gabius, H.-J.; Pieters, R. J. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, *1*, 803-810.
- (19) Kalovidouris, S. A.; Blixt, O.; Nelson, A.; Vidal, S.; Turnbull, W. B.; Paulson, J. C.; Stoddart, J. F. *Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 8485-8493.
- (20) Kanai, M.; Mortell, K. H.; Kiessling, L. L. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 9931-9932.
- (21) Cairo, C. W.; Gestwicki, J. E.; Kanai, M.; Kiessling, L. L. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 1615-1619.
- (22) Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 14922-14933.
- (23) Akai, S.; Kajihara, Y.; Nagashima, Y.; Kamei, M.; Arai, J.; Bito, M.; Sato, K.-I. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **2001**, *20*, 121-143.
- (24) Dam, T. K.; Roy, R.; Das, S. K.; Oscarson, S.; Brewer, C. F. *The Journal of biological chemistry* **2000**, *275*, 14223-14230.
- (25) Gabius, H.-J.; Siebert, H.-C.; Andre, S.; Jimenez-Barbero, J.; Ruediger, H. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 740-764.

- (26) Sharon, N.; Lis, H. *Science* **1989**, *246*, 227-234.
- (27) Ashwell, G.; Harford, J. *Annual Review of Biochemistry* **1982**, *51*, 531-554.
- (28) Ashwell, G.; Morell, A. G. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **1974**, *41*, 99-128.
- (29) Paulson, J. C. *Receptors* **1985**, *2*, 131-219.
- (30) Wiley, D. C.; Skehel, J. J. *Annual Review of Biochemistry* **1987**, *56*, 365-394.
- (31) Sharon, N. *FEBS Letters* **1987**, *217*, 145-157.
- (32) Gabius, H. J. *Angewandte Chemie* **1988**, *100*, 1321-1330.
- (33) Monsigny, M.; Roche, A. C.; Kieda, C.; Midoux, P.; Obrenovitch, A. *Biochimie* **1988**, *70*, 1633-1649.
- (34) Adar, R.; Sharon, N. *European Journal of Biochemistry* **1996**, *239*, 668-674.
- (35) Sharon, N. *Trends in biochemical sciences* **1993**, *18*, 221-226.
- (36) Imberty, A.; Casset, F.; Gegg, C. V.; Etzler, M. E.; Perez, S. *Glycoconjugate Journal* **1994**, *11*, 400-413.
- (37) Liener, I. E.; Sharon, N.; Goldstein, I. J.; Editors *The Lectins. Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*, 1986.
- (38) Sharon, N.; Lis, H. *Lectins*, 1989.
- (39) Sumner, J. B. *Journal of Biological Chemistry* **1919**, *37*, 137-141.
- (40) Sumner, J. B.; Howell, S. F. *Journal of Bacteriology* **1936**, *32*, 227-237.
- (41) Lis, H.; Sharon, N. *Chemical Reviews* **1998**, *98*, 637-674.
- (42) Nakayama, J.; Katsuyama, T.; Fukuda, M. *Acta Histochemica et Cytochemica* **2000**, *33*, 153-157.
- (43) Endo, T. *Journal of chromatography. A* **1996**, *720*, 251-261.
- (44) Gabius, S.; Hellmann, K. P.; Hellmann, T.; Brinck, U.; Gabius, H. J. *Analytical Biochemistry* **1989**, *182*, 447-451.
- (45) Mann, D. A.; Kanai, M.; Maly, D. J.; Kiessling, L. L. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 10575-10582.
- (46) Mislovicova, D.; Stratilova, E.; Kolarova, N. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **1997**, *20*, 1367-1379.
- (47) Page, D.; Roy, R. *Bioconjugate Chemistry* **1997**, *8*, 714-723.
- (48) Saleemuddin, M. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **1999**, *64*, 203-226.
- (49) Goto, S.; Masuda, K.; Miura, M.; Kanazawa, K.; Sasaki, M.; Masui, M.; Shiramizu, M.; Terada, H.; Chuman, H. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2002**, *50*, 445-449.
- (50) Bondurant, B.; Last, J. A.; Waggoner, T. A.; Slade, A.; Sasaki, D. Y. *Langmuir* **2003**, *19*, 1829-1837.
- (51) Touhami, A.; Hoffmann, B.; Vasella, A.; Denis, F. A.; Dufrene, Y. F. *Langmuir* **2003**, *19*, 1745-1751.
- (52) Pei, Z.; Anderson, H.; Aastrup, T.; Ramstroem, O. *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, *21*, 60-66.
- (53) Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Accounts of Chemical Research* **1995**, *28*, 321-327.
- (54) Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. *Angewandte Chemie, International Edition* **2006**, *45*, 2348-2368.
- (55) Burke, S. D.; Zhao, Q.; Schuster, M. C.; Kiessling, L. L. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 4518-4519.
- (56) Mangold, S. L.; Cloninger, M. J. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, *4*, 2458-2465.
- (57) Wolfenden, M. L.; Cloninger, M. J. *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17*, 958-966.
- (58) Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Garanger, E.; Favrot, M.-C.; Dumy, P. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 5730-5739.

- (59) Renaudet, O.; Dumy, P. *Organic Letters* **2003**, *5*, 243-246.
- (60) Grigalevicius, S.; Chierici, S.; Renaudet, O.; Lo-Man, R.; Deriaud, E.; Leclerc, C.; Dumy, P. *Bioconjugate Chemistry* **2005**, *16*, 1149-1159.
- (61) Razkin, J.; Josserand, V.; Boturyn, D.; Jin, Z.-h.; Dumy, P.; Favrot, M.; Coll, J.-L.; Texier, I. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1069-1072.
- (62) Mutter, M.; Dumy, P.; Garrouste, P.; Lehmann, C.; Mathieu, M.; Peggion, C.; Peluso, S.; Razaname, A.; Tuchscherer, G. *Angewandte Chemie, International Edition* **1996**, *35*, 1482-1485.
- (63) Renaudet, O.; Dumy, P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15*, 3619-3622.
- (64) Garanger, E.; Boturyn, D.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. *Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71*, 2402-2410.
- (65) Renaudet, O.; Dumy, P. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, *4*, 2628-2636.
- (66) Singh, Y.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. *Organic Letters* **2005**, *7*, 1359-1362.
- (67) Bakowsky, U.; Rettig, W.; Bendas, G.; Vogel, J.; Bakowsky, H.; Harnagea, C.; Rothe, U. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2000**, *2*, 4609-4614.
- (68) Dubois, M.-P.; Gondran, C.; Renaudet, O.; Dumy, P.; Driguez, H.; Fort, S.; Cosnier, S. *Chemical Communications* **2005**, 4318-4320.
- (69) Renaudet, O.; Dumy, P. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 7575-7578.
- (70) Larsson, C.; Rodahl, M.; Hook, F. *Analytical chemistry* **2003**, *75*, 5080-5087.
- (71) Reviakine, I.; Brisson, A. *Langmuir* **2001**, *17*, 8293-8299.
- (72) Scheuring, S.; Muller, D. J.; Ringler, P.; Heymann, J. B.; Engel, A. *Journal of Microscopy (Oxford)* **1999**, *193*, 28-35.
- (73) Barenholz, Y.; Gibbes, D.; Litman, B. J.; Goll, J.; Thompson, T. E.; Carlson, R. D. *Biochemistry* **1977**, *16*, 2806-2810.
- (74) Richter, R. P.; Brisson, A. *Langmuir* **2004**, *20*, 4609-4613.
- (75) Keller, C. A.; Kasemo, B. *Biophysical Journal* **1998**, *75*, 1397-1402.
- (76) Richter, R. P.; Maury, N.; Brisson, A. R. *Langmuir* **2005**, *21*, 299-304.
- (77) Blankenburg, R.; Meller, P.; Ringsdorf, H.; Salesse, C. *Biochemistry* **1989**, *28*, 8214-8221.
- (78) Darst, S. A.; Ahlers, M.; Meller, P. H.; Kubalek, E. W.; Blankenburg, R.; Ribi, H. O.; Ringsdorf, H.; Kornberg, R. D. *Biophysical Journal* **1991**, *59*, 387-396.
- (79) Avila-Sakar, A. J.; Chiu, W. *Biophysical Journal* **1996**, *70*, 57-68.
- (80) Hemming, S. A.; Bochkarev, A.; Darst, S. A.; Kornberg, R. D.; Ala, P.; Yang, D. S. C.; Edwards, A. M. *Journal of Molecular Biology* **1995**, *246*, 308-316.
- (81) Frey, W.; Schief, W. R., Jr.; Vogel, V. *Langmuir* **1996**, *12*, 1312-1320.
- (82) Wang, S.-W.; Poglitsch, C. L.; Yacilla, M. T.; Robertson, C. R.; Gast, A. P. *Langmuir* **1997**, *13*, 5794-5798.
- (83) Edwards, T. C.; Koppenol, S.; Frey, W.; Schief, W. R., Jr.; Vogel, V.; Stenkamp, R. E.; Stayton, P. S. *Langmuir* **1998**, *14*, 4683-4687.
- (84) Ku, A. C.; Darst, S. A.; Robertson, C. R.; Gast, A. P.; Kornberg, R. D. *Journal of Physical Chemistry* **1993**, *97*, 3013-3016.
- (85) Wang, S.-W.; Robertson, C. R.; Gast, A. P. *Langmuir* **1999**, *15*, 1541-1548.
- (86) Yacilla, M. T.; Robertson, C. R.; Gast, A. P. *Langmuir* **1998**, *14*, 497-503.
- (87) Richter, R. P.; Brisson, A. *Langmuir* **2003**, *19*, 1632-1640.
- (88) Su, X.; Wu, Y.-J.; Knoll, W. *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, *21*, 719-726.
- (89) Zhdanov, V. P.; Hook, F.; Kasemo, B. *Proteins* **2001**, *43*, 489-498.
- (90) Devillers, C. H.; Boturyn, D.; Bucher, C.; Dumy, P.; Labbe, P.; Moutet, J.-C.; Royal, G.; Saint-Aman, E. *Langmuir* **2006**, *22*, 8134-8143.

- (91) Hook, F.; Kasemo, B.; Nylander, T.; Fant, C.; Sott, K.; Elwing, H. *Analytical chemistry* **2001**, *73*, 5796-5804.
- (92) Vogt, B. D.; Lin, E. K.; Wu, W.-L.; White, C. C. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108*, 12685-12690.
- (93) Derewenda, Z.; Yariv, J.; Helliwell, J. R.; Kalb, A. J.; Dodson, E. J.; Papiz, M. Z.; Wan, T.; Campbell, J. *EMBO Journal* **1989**, *8*, 2189-2193.
- (94) Naismith, J. H.; Emmerich, C.; Habash, J.; Harrop, S. J.; Helliwell, J. R.; Hunter, W. N.; Raftery, J.; Kalb, A. J.; Yariv, J. *Acta Crystallographica, Section D: Biological Crystallography* **1994**, *D50*, 847-858.
- (95) Loefaas, S.; Malmqvist, M.; Roennberg, I.; Stenberg, E.; Liedberg, B.; Lundstroem, I. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **1991**, *B5*, 79-84.
- (96) Stenberg, E.; Persson, B.; Roos, H.; Urbaniczky, C. *Journal of Colloid and Interface Science* **1991**, *143*, 513-526.
- (97) Harris, S. J.; Jackson, C. M.; Winzor, D. J. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1995**, *316*, 20-23.

CHAPITRE III

Chapitre III. Les interactions ligand peptidique - récepteur cellulaire

I. Introduction

Les architectures supramoléculaires et les matériaux moléculaires de taille nanométrique présentent un intérêt majeur dans le développement des nanosciences et des nanotechnologies, avec de nombreuses applications potentielles, et en particulier dans le domaine médical. Ce domaine en plein essor s'appuie sur la grande capacité d'ingénierie moléculaire des chimistes à concevoir et élaborer des structures moléculaires fonctionnelles pour relever les nouveaux challenges technologiques basés sur l'étude et l'utilisation des propriétés de la matière à l'échelle nanométrique. Une stratégie prometteuse consiste alors à combiner les propriétés structurales et dynamiques de ces matériaux moléculaires associées à celles des molécules biologiques afin d'assurer une fonction spécifique dans un dispositif nanotechnologique.

Dans le cadre de ce manuscrit, nous nous sommes servis de l'architecture moléculaire offerte par le RAFT (cf chapitre II) afin de permettre la présentation multiple d'un ligand peptidique biomoléculaire, le cyclopentapeptide RGDfK. Cette séquence -RGD- est reconnue de façon spécifique par une protéine transmembranaire surexprimée à la surface de cellules cancéreuses, les intégrines $\alpha\beta_3$, impliquées notamment dans l'angiogenèse tumorale, l'invasion tumorale et les métastases¹⁻³.

1.1. L'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse est un processus bien connu qui requiert la migration et l'adhésion des cellules endothéliales sur la matrice extracellulaire par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Actuellement, le ciblage de la néo-angiogenèse tumorale est une voie de recherche privilégiée pour le diagnostic et pour le traitement des tumeurs solides. Les cellules endothéliales des néovaisseaux tumoraux surexpriment certains marqueurs spécifiques tels que l'intégrine $\alpha\beta_3$. Dans l'angiogenèse, les cellules en besoin de sang, sécrètent des ligands qui stimulent les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et permettent la formation de nouveaux vaisseaux. L'interaction qui a donc lieu entre les ligands naturels de l'angiogenèse et les récepteurs des cellules endothéliales est hautement affine avec un K_D de l'ordre de 1 nM⁴.

L'inhibition de cette interaction conduit à l'apoptose (mort cellulaire) des cellules vasculaires angiogéniques proliférantes. Ainsi, les deux principaux axes d'étude actuels sont de trouver un puissant ligand qui pourrait soit être en compétition avec les ligands naturels et ainsi lutter contre la prolifération des cellules cancéreuses (axe thérapeutique), soit permettre, via l'utilisation de sonde, la détection et le ciblage de cancer précoce ou non (axe imagerie). Une solution prometteuse est de créer des molécules telles que des polypeptides ou des oligosaccharides avec des tailles d'environ 5-10 kDa, comme la molécule RAFT. Ces molécules apparaissent alors suffisamment grandes pour tolérer une sonde fluorescente, et suffisamment petites pour être rapidement excrétées et pour pouvoir passer à travers les orifices des cellules.

1.2. Les intégrines

1.2.1 Structure

Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion cellulaire hétérodimériques qui facilitent la communication entre une cellule et son environnement ⁵. Elles consistent en deux sous-unités polypeptidiques transmembranaires, α et β , associées de façon non-covalente (Figure 1). La famille des intégrines chez les mammifères comporte 18 membres de la chaîne α et 8 de la chaîne β , qui peuvent s'assembler pour former 24 récepteurs hétérodimériques. La corrélation de ces deux sous - unités α et β dicte la spécificité de liaison de l'intégrine et sa fonction biochimique finale. La sous-unité α contient 1100 résidus. Elle est caractérisée par la présence dans le domaine extracellulaire, à proximité de l'extrémité N-terminale, de 3 à 4 régions contenant entre 12 et 15 résidus, capables de s'associer à des cations divalents Ca^{2+} et Mg^{2+} ⁶. Celle-ci est également ramifiée au voisinage de la partie transmembranaire par l'établissement d'un pont disulfure. La sous-unité β , plus petite, contient typiquement environ 800 résidus. Elle présente, à proximité du domaine transmembranaire, 4 domaines d'environ 40 résidus hautement conservés et riches en cystéine. La partie N-terminale, exposée vers le milieu extracellulaire, est repliée et forme une large boucle. Ces deux chaînes α et β contiennent de courtes parties transmembranaires (environ 20-30 résidus) constitués essentiellement de résidus hydrophobes permettant ainsi leur ancrage à l'intérieur des membranes biologiques ou dans des bicouches lipidiques artificielles. Les régions intracellulaires, contenant au plus 20 à 50 résidus, contiennent les extrémités C-terminales des deux chaînes.

Les voies de signalisation faisant intervenir les intégrines sont impliquées dans la régulation des grandes fonctions cellulaires, notamment la régulation du cycle cellulaire et la migration des cellules.

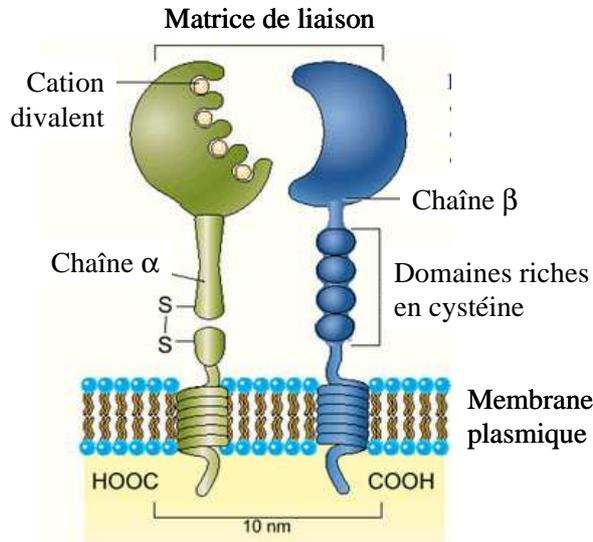


Figure 1: Représentation schématique d'une intégrine (adapté du schéma du Dr Bukowski, CancerPublications.com)

I.2.2 Le rôle des cations dans les relations propriété / fonction des intégrines

Bien que le mécanisme de liaison des intégrines avec les ligands ne soit pas encore clairement établi, il est connu que cette liaison est dépendante de la présence ou non de cations bivalents tels que Ca^{2+} et Mg^{2+} . Chaque intégrine hétérodimérique présente 3 à 5 sites de liaison aux cations divalents. Ces sites de liaison sont relativement de faible affinité (du μM^{-1} au mM^{-1}), cependant ils exercent, en fonction de leur occupation, de profonds effets sur la liaison de l'intégrine avec son ligand. En effet, l'action collective de liaison des ions divalents sur l'intégrine en plus du ligand, peut soit favoriser la liaison de ce dernier (cations = promoteurs), soit l'inhiber (cations = antagonistes), soit encore changer la spécificité de la liaison du ligand (cations = sélecteurs). Les différents rôles de chaque cation sur la liaison des ligands avec les intégrines n'ont pas encore été tous bien établis. En effet, il semble que leur implication soit dépendante de leur concentration en solution, ainsi que de leur proportion relative⁷.

La plupart du temps, Ca^{2+} est connu pour inhiber les interactions, tandis que les cations Mg^{2+} et Mn^{2+} stimulent la liaison de l'intégrine avec son ligand. C'est le cas notamment pour

l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ avec le fibrinogène ⁸ et dans l'interaction de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ avec l'ostéopontine ⁹ ou le fibrinogène ⁹. Dans d'autre cas, la présence de Ca^{2+} favorise la liaison, par exemple entre l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ et le fibrinogène ¹⁰.

Chaque cas apparaît être un cas particulier pour lequel il faut trouver les conditions idéales permettant l'obtention de la meilleure affinité entre l'intégrine et le ligand.

I.2.3 L'intégrine $\alpha v\beta 3$ - Fonction

Les intégrines $\alpha v\beta 3$ sont à l'origine de l'attachement des cellules à leur environnement et en particulier au réseau de protéines de la matrice extracellulaire (vitronectine, fibronectine, collagène, laminine...). Elles se lient aux ligands extracellulaires via les domaines N-terminaux de leurs sous-unités α et β . Elles sont d'importants médiateurs de la communication cellulaire et participent à la transmission de signaux mécaniques et chimiques de façon bidirectionnelle dans la membrane cellulaire. En réponse à l'activation cellulaire, une signalisation intracellulaire dite « inside-out », contrôle le niveau d'affinité de la liaison des ligands sur l'intégrine. En effet, les cellules régulent la fonction de leurs intégrines par un contrôle spatio-temporel (changement rapide et réversible de la conformation des intégrines) de leur affinité envers les ligands et permettent ainsi le passage de l'état d'une cellule non-adhérente à un état d'adhérence. Une fois activée, l'intégrine interagissant avec son ligand intègre des signaux extracellulaires et les transmet à l'intérieur de la cellule, c'est la signalisation « outside-in », responsable des processus d'agrégation, d'adhérence, et de migration.

Cette intégrine $\alpha v\beta 3$ est apparue comme une cible très attrayante pour le développement d'agents anti-cancéreux. Ce n'est, alors, que depuis ces dernières années que les chercheurs ont commencé, notamment dont notre équipe ¹¹, à s'intéresser à la synthèse de molécules permettant l'expression d'un ou de plusieurs motifs -RGD- dans un but thérapeutique ¹²⁻¹⁴.

I.3. Le motif RGD comme marqueur de l'intégrine $\alpha v\beta 3$

Au début des années 1990, il a été mis en évidence la spécificité des peptides possédant la séquence tripeptidique -RGD- (-Arg-Gly-Asp-) comme ligand de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ ^{15, 16}. Ce motif commun est présent sur la plupart des protéines de la matrice extracellulaire comme la

vitronectine, la fibronectine, l'ostéopontine, la thrombospondine, ainsi que sur le fibrinogène (protéine sanguine soluble). De nombreuses intégrines (environ la moitié des hétérodimères) reconnaissent et interagissent avec leurs substrats protéiques via la séquence -RGD-. C'est particulièrement le cas des intégrines $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, récepteur plaquettaire du fibrinogène, $\alpha\text{5}\beta\text{1}$, récepteur endothélial de la fibronectine, ainsi que $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, récepteur endothélial de la vitronectine. L'ensemble de ces substrats ont en commun le motif -RGD- mais présentent des affinités distinctes pour les différentes intégrines. Bien que la spécificité d'une intégrine à un substrat soit attribuée à la conformation du motif -RGD- dans la protéine, ainsi qu'à celle des résidus adjacents, le mécanisme d'action des molécules ciblant l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ reste non élucidé.

L'approche que nous avons employée consiste à utiliser la molécule RAFT comme plateforme permettant d'un côté de rendre accessible à la surface cellulaire les ligands -RGD- et de l'autre côté de greffer soit un ligand permettant l'immobilisation du RAFT sur une surface pour l'étude des interactions aux interfaces soit une sonde fluorescente pour la détection de tumeur¹⁷⁻¹⁹ (cette dernière partie a fait l'objet d'autres travaux).

I.4. L'interaction RGD-intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ à l'interface solide - liquide

Depuis le début du XXI^{ème} siècle, l'étude du mode de fonctionnement de reconnaissance des intégrines, ainsi que l'étude de son interaction avec les ligands -RGD- a fait l'objet de nombreuses recherches. Grâce au développement des techniques d'étude aux interfaces, de nombreux physico-chimistes se sont donc intéressés à mieux comprendre cette interaction grâce à l'immobilisation de l'un des deux partenaires :

- L'immobilisation des molécules présentant les motifs -RGD- apparaît être la solution la plus facile d'accès. Différents moyens existent ensuite pour vérifier l'interaction de l'intégrine avec les ligands -RGD- : soit en se servant de la reconnaissance par les cellules surexprimant l'intégrine^{12, 13, 16, 20, 21}, soit par l'utilisation directe des intégrines extraites des cellules et purifiées. Les intégrines sont utilisées ensuite tout simplement diluées dans une solution adaptée²²⁻²⁴.

- La seconde façon d'étudier l'interaction est d'immobiliser l'intégrine sur la surface. Deux procédés ont alors été mis au point : soit en immobilisant l'intégrine par couplage covalent amine (cf chapitre II)^{7, 25-31} soit en insérant les intégrines dans une bicouche

lipidique (modèle de membrane)^{14, 32-35} ce qui leur permet de conserver leur environnement naturel.

Concernant spécifiquement l'interaction de l'intégrine $\alpha\beta3$ avec le ligand peptidique -RGD-, un certain nombre de caractérisations ont déjà été effectuées. Dans la littérature, on retrouve, par exemple, des études de tests ELISA^{12, 21, 25, 26}, de résonance plasmonique de surface (SPR)^{7, 22, 23, 27, 28}, de cytométrie en flux (fluorescence)^{12, 13}, de spectroscopie de fluorescence plasmonique^{14, 32} ou encore en microscopie de fluorescence¹⁷⁻¹⁹. L'ensemble de ces études a ainsi permis de mettre en avant la spécificité des ligands -RGD- à l'intégrine, l'inhibition de la reconnaissance des protéines de la matrice extracellulaire (ECM) par le ligand -RGD- ou encore l'amélioration de la reconnaissance par l'utilisation de ligands peptidiques multimériques.

Dans notre équipe, des études *in vivo* en microscopie de fluorescence ont été effectuées¹⁷⁻¹⁹ par nos collègues O. Renaudet et P. Dumy. Ces études ont permis de mettre en évidence l'efficacité de la présentation multivalente des motifs -RGD- grâce à la molécule RAFT sur la détection et le ciblage de cellules cancéreuses. Cependant, aucune donnée quantitative concernant la force de la liaison n'a été pour le moment déterminée. En effet, la petite taille de ces ligands peptidiques les rend difficilement détectables.

Dans ce chapitre, nous avons essayé de mettre en évidence l'augmentation de la spécificité et de l'affinité de la liaison -RGD- / intégrine grâce à la présentation multiple des sites de reconnaissance -RGD- à la surface d'une molécule RAFT, que l'on nommera RAFT-(RGD)₄. Deux approches ont été envisagées :

La première consiste en l'étude de l'interaction des RAFT-(RGD)₄ avec des cellules surexprimant l'intégrine $\alpha\beta3$ réalisée en suivant par microgravimétrie l'adhésion de ces cellules sur des surfaces de RAFT.

La seconde approche utilisée a été l'étude par résonance plasmonique de surface (BIAcore®) de l'interaction entre l'intégrine $\alpha\beta3$ immobilisée et la molécule RAFT-(RGD)₄.

II. Etude en microgravimétrie : immobilisation de la molécule RAFT

Cette étude initiale a pour but, dans un premier temps de vérifier la spécificité de l'interaction de cellules cancéreuses surexprimant l'intégrine $\alpha\beta3$ sur une surface fonctionnalisée par des ligands peptidiques -RGD-. Afin de pouvoir, dans un second temps, essayer de mettre en

évidence que la présentation multivalente de ligand peptidique -RGD- par la molécule RAFT permet une amplification de l'adhésion cellulaire par rapport à l'utilisation d'un monomère -RGD-.

II.1. Etat de l'art : adhésion cellulaire suivie par QCM-D

La technique QCM-D a déjà été utilisée pour caractériser les cellules vivantes dans leur processus d'adhésion sur une surface³⁶⁻⁴⁵. Toutefois, une analyse quantitative de cette adhésion cellulaire apparaît plus délicate. En effet, dans le cas de l'adsorption d'une monocouche de cellules, l'équation de Sauerbrey (qui relate la proportionnalité de la masse déposée avec la variation de fréquence) n'est pas valide du fait de la trop grande viscosité des cellules adsorbées à la surface. De plus, l'analyse avec le modèle de Voïnova n'est également pas applicable. En effet, la longueur d'onde ($\sim 0.25 \mu\text{M}$) pour l'onde d'ondulation dans l'eau à 5 MHz est considérablement plus petite que le diamètre typique d'une cellule ($10 \mu\text{m}$)⁴⁶. C'est pourquoi, l'on ne détectera, par les variations de fréquence, qu'une fraction de la masse des cellules qui adhèrent à la surface ; c'est-à-dire que chaque cellule qui adhère, ne pourra être regardée que comme l'ajout d'une masse effective, qui est beaucoup moins importante que la masse réelle de la cellule. L'augmentation mesurée de la dissipation d'énergie résulte essentiellement de la détection d'une petite région de la cellule, proche de la surface de l'électrode³⁶.

La sensibilité latérale de la QCM-D pour les changements à la fois de la fréquence de résonance, Δf , et du facteur de dissipation, ΔD , est proportionnelle à l'amplitude de l'oscillation⁴⁷. La sensibilité varie selon les fonctions gaussiennes de même largeur, centrées sur le milieu de l'électrode active. A partir de tout cela, le seul moyen qui reste à disposition pour essayer de caractériser l'adhésion cellulaire est d'utiliser le rapport entre ΔD et Δf qui eux sont indépendants de la position de l'adhésion des cellules sur l'électrode. Dynamiquement, $\Delta D/\Delta f$ sera tributaire de la masse déposée effective, de ses propriétés viscoélastiques, de la structure interne et des formes des cellules individuelles, ainsi que, de l'évolution de ces caractéristiques dans le temps durant les interactions avec la surface³⁶.

II.2. Préparation des surfaces d'étude

Deux molécules RAFT thiol, *i.e.* présentant un groupement thiol sur leur face de détection, ont été utilisées : l'une présentant 4 motifs RGD et l'autre exposant 4 motifs RAD (Figure 2). Le motif RAD est également une séquence d'acides aminés (Arginine-Alanine-Aspartate) mais cette dernière est non spécifique de la détection des intégrines $\alpha v\beta 3$ étudiées. Ces deux molécules ont été immobilisées sur un cristal de quartz recouvert d'or.

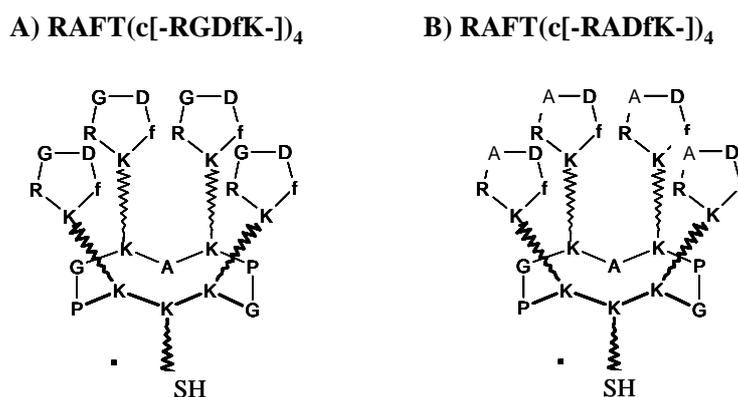


Figure 2 : Schémas des molécules A) RAFT(c-[RGDfK])₄ et B) RAFT(c-[RADfK])₄

Les conditions de fonctionnalisation des surfaces d'or par les molécules RAFT-(RGD)₄ et RAFT-(RAD)₄ ont été basées sur celle d'une étude effectuée en collaboration avec le Pr J.C. Moutet et Dr C. Bucher (équipe Chimie Inorganique Redox, DCM). Ces études utilisant des RAFT thiol présentant non pas 4 RAD ou RGD mais quatre groupements ferrocène, appelé RAFT-(Fc)₄ (Figure 3), ont été suivies en QCM-D et en électrochimie (thèse de Charles Devillers, soutenue en 2006). Les résultats de cette étude sont décrits ci-après.

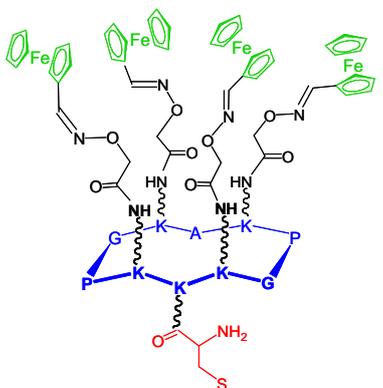


Figure 3 : Schéma de la molécule RAFT-(Fc)₄

II.2.1 Nettoyage et activation du cristal de quartz recouvert d'or

Les surfaces d'or sont nettoyées et activées avant chaque greffage selon le protocole de nettoyage suivant :

- rinçage à l'eau du quartz et séchage de ce dernier sous azote.
- exposition de 10 min à l'UV-Ozone
- immersion pendant 15 min dans une solution d'éthanol absolu sous agitation puis séchage du quartz toujours sous flux d'azote.

La surface fraîchement activée est alors immédiatement mise en contact avec les solutions de RAFT.

II.2.2 Optimisation des conditions d'immobilisation

L'optimisation des conditions d'immobilisation des molécules RAFT thiol sur une surface d'or a été réalisée par une étude précédente via le RAFT-(Fc)₄. La Figure 4 montre les courbes expérimentales obtenues par QCM-D correspondant à l'adhésion de la molécule RAFT-(Fc)₄ sur le cristal de quartz recouvert d'or. L'étude a été faite à 20,7 °C en mode statique.

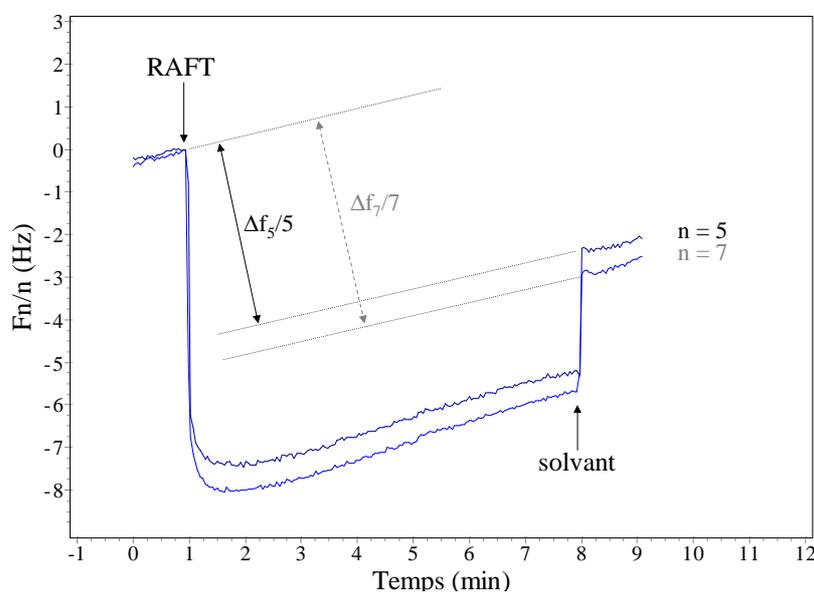


Figure 4 : Suivi du greffage du RAFT-(Fc)₄ (1 mM dans le solvant 50/50 H₂O-CH₃CN) sur un cristal de quartz recouvert d'or par QCM-D. Les courbes représentent la variation des fréquences en fonction du temps pour les deux harmoniques n = 5 et 7. Les fréquences sont normalisées par rapport au numéro de l'harmonique. L'étude a été effectuée à 20,7 °C.

La caractérisation a été effectuée en milieu 50/50 H₂O – CH₃CN (v/v) afin de solubiliser la molécule RAFT-(Fc)₄ (Figure 4). Ce milieu n'étant pas très adapté à certains constituants de la chambre de mesure, on peut observer une dérive linéaire et continue de Δf_n et ΔD_n sur l'ensemble de l'expérience. Cette dérive peut être associée à une modification progressive par l'acétonitrile des propriétés mécaniques du joint torique utilisé pour maintenir le quartz dans la chambre de mesure. En tenant compte de cette déviation linéaire, l'étude et l'analyse de l'adhésion de la molécule RAFT thiol sur or ont pu, néanmoins, être effectuées en utilisant les harmoniques 5 et 7 (la troisième harmonique étant trop sensible aux problèmes mécaniques liés au quartz).

Le graphique montre que l'adhésion des molécules RAFT-(Fc)₄ (1 mM dans le mélange H₂O-CH₃CN) sur l'or est très rapide (<1 min) et semble stable après rinçage.

L'adhésion finale des RAFT correspond à une valeur de 5,3 et 5,9 Hz respectivement pour l'harmonique 5 et 7. La très faible variation de la dissipation d'énergie, inférieure à 10⁻⁶ indique que la couche auto-assemblée de RAFT-(Fc)₄ se comporte comme un film fin et rigide, ce qui a permis d'appliquer l'équation de Sauerbrey afin de déterminer la masse surfacique et, ainsi, de vérifier qu'une monocouche dense a bien été formée. On trouve alors une variation $\Delta m = 99 \text{ ng/cm}^2$, ce qui équivaut à une couverture de surface de $4,33 \cdot 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$ (RAFT-(Fc)₄ = 2287,4 g/mol) et une surface moléculaire de 384 Å², en supposant que la différence de masse mesurée n'est due qu'à l'adhésion de RAFT à la surface. Cette valeur, comparée à l'aire théorique estimée par des mesures en modélisation moléculaire de 225 Å², tendait à confirmer le bon accord avec la formation d'une monocouche dense de RAFT-(Fc)₄ sur la surface du quartz recouvert d'or.

Cette étude apparaît, cependant, en désaccord avec les résultats de l'adhésion du RAFT-(Man)₄ CysNPys effectuée dans le chapitre précédent (chapitre II) qui indique que la formation d'une monocouche nécessite 15h de contact de la solution à 0,1 mM avec la surface d'or. Les différences observées peuvent s'expliquer par des conditions expérimentales distinctes entre les deux types d'expérience (concentration, solvant, groupement thiol). Pour des problèmes expérimentaux (évaporation de la solution, faible quantité en produit), il nous est apparu non envisageable de laisser la solution en présence de la surface d'or plus d'une heure. Suite à cette première étude de l'adhésion du RAFT-(Fc)₄, le temps de contact entre les solutions des RAFT-(RGD)₄ et RAFT-(RAD)₄ étudiés et la surface d'or a été fixée à 15 min.

II.2.3 Immobilisation RAFT-(RGD)₄ et RAFT-(RAD)₄

Les deux molécules RAFT thiol utilisées (RAFT-(RGD)₄ et RAFT-(RAD)₄), non totalement solubles en solution aqueuse, ont été diluées dans un mélange eau – acétonitrile (80-20) à 1 mM. Les surfaces sont laissées au contact de la solution pendant 15 min, et sont ensuite rincées par un mélange eau – acétonitrile (80-20) puis séchées sous flux d'azote. Les cristaux de quartz modifiés sont ensuite montés dans la chambre de mesure de la QCM-D. Deux études ellipsométriques sont systématiquement réalisées sur la surface : la première, sur la surface d'or vierge venant juste d'être nettoyée et la seconde, sur la même surface après le greffage des molécules RAFT. La Figure 5 montre les différences observées entre les deux états de surface au niveau des deux angles ellipsométriques Ψ et Δ .

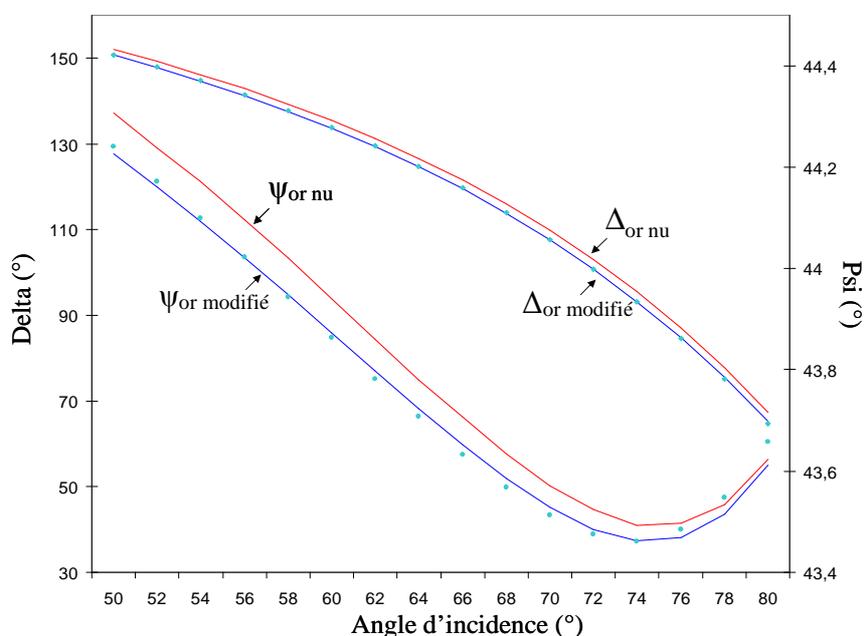


Figure 5 : Valeurs expérimentales de Ψ et de Δ (ligne continue) et du meilleur fit (points) mesurés sur un substrat d'or nu (rouge) et un substrat modifié par la molécule RAFT-(RGD)₄ (bleu).

Les angles ellipsométriques du substrat d'or nu (Ψ et Δ) sont analysées en utilisant un modèle à deux phases (substrat/air ambiant), ce qui permet d'obtenir les propriétés optiques de la couche d'or par l'intermédiaire de deux valeurs n_s et k_s , qui sont respectivement l'indice de réfraction et le coefficient d'extinction molaire de la surface (s) (cf Chapitre I). Ces deux valeurs sont spécifiques de la surface étudiée et varient d'une surface à l'autre. Ces valeurs sont, ensuite, utilisées pour analyser les données du substrat modifié par le composé RAFT, sur la base d'un modèle dit à trois phases (substrat/couche de RAFT/air ambiant). En utilisant

la valeur fixe de $n_{\text{RAFT}} = 1.45$, valeur correspondant à l'indice de réfraction d'une couche organique, on détermine les caractéristiques optiques de la couche de RAFT : k_{RAFT} et l'épaisseur d_{RAFT} . L'analyse des résultats donne une épaisseur respective pour le greffage des RAFT-(RGD)₄ et RAFT-(RAD)₄ de $1,94 \pm 0,16$ nm et $2,21 \pm 0,16$ nm. Ces valeurs, en accord avec la taille des molécules RAFT, semblent corroborer l'hypothèse de la formation d'une monocouche de RAFT sur les surfaces d'or. Il nous est, cependant, impossible d'affirmer que la couche formée correspond à celle d'une monocouche dense et compacte des molécules RAFT à la surface.

II.3. L'adhésion des cellules

Deux types de cellules ont été utilisés à une concentration de 1 million de cellules par millilitre.

- les cellules 3LL (Lewis lung carcinoma). Il s'agit d'un type de cellule de cancer du poumon chez la souris. Elles seront appelées cellules négatives (-) car elles présentent très peu d'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ à leur surface.

- les cellules HEK β3 , pour Human Embryonic Kidney. Ces cellules surexpriment l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ à leur surface. Ces dernières seront donc appelées inversement les cellules positives (+).

Les cellules 3LL et HEK β3 ont été cultivées et fournies par l'équipe du Pr Jean-Luc Coll de l'institut Albert Bonniot de Grenoble.

La QCM-D a été utilisée en mode flux continu avec un débit constant de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ à 30 °C. L'ensemble des solutions est maintenu dans la glace et mis, seulement avant leur utilisation, dans un bain thermostaté à 30° et sous agitation afin d'éviter la sédimentation des cellules.

II.3.1 Résultats expérimentaux

II.3.1.1. Surface RAFT-(RGD)₄

La Figure 6 montre les étapes successives nécessaires au suivi de l'adhésion cellulaire en QCM-D. La première étape de l'étude consiste à injecter sur la surface une solution de tampon PBS, pH = 7,4 (0,01 M Na_2HPO_4 ; 0,137 M NaCl et 0,0027 M KCl), qui sert de ligne de base. Ce tampon était utilisé, à la base, pour d'autres types d'études et avait deux utilités :

la première était de limiter la quantité de milieu cellulaire consommée (fort coût) et la seconde de rincer et neutraliser l'appareil.

Une fois les signaux de fréquence de résonance et de dissipation stables, on injecte une solution de milieu cellulaire sans sérum, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Il s'agit du milieu cellulaire dans lequel sont diluées les cellules et qui permet d'apporter à ces dernières les nutriments essentiels à leur survie. L'addition du milieu cellulaire DMEM induit une variation aussi bien de Δf (8 Hz) que de la dissipation qui passe à $1,7 \cdot 10^{-6}$ (Figure 6). Ces variations rapides peuvent être en grande partie attribuées à une plus grande viscosité de la solution du milieu cellulaire injectée par rapport à la solution précédente. Il se peut que l'on ait, en plus de cet effet tampon, une légère association de produits présents dans le milieu cellulaire. En effet, ce dernier contient une quantité importante de sels inorganiques, d'acides aminés et de vitamines qui peuvent faiblement se lier sur la surface de façon non spécifique. Quoiqu'il en soit ces variations ne correspondent pas à l'association d'une quantité importante de matériaux sur la surface d'étude et sont considérées comme négligeables.

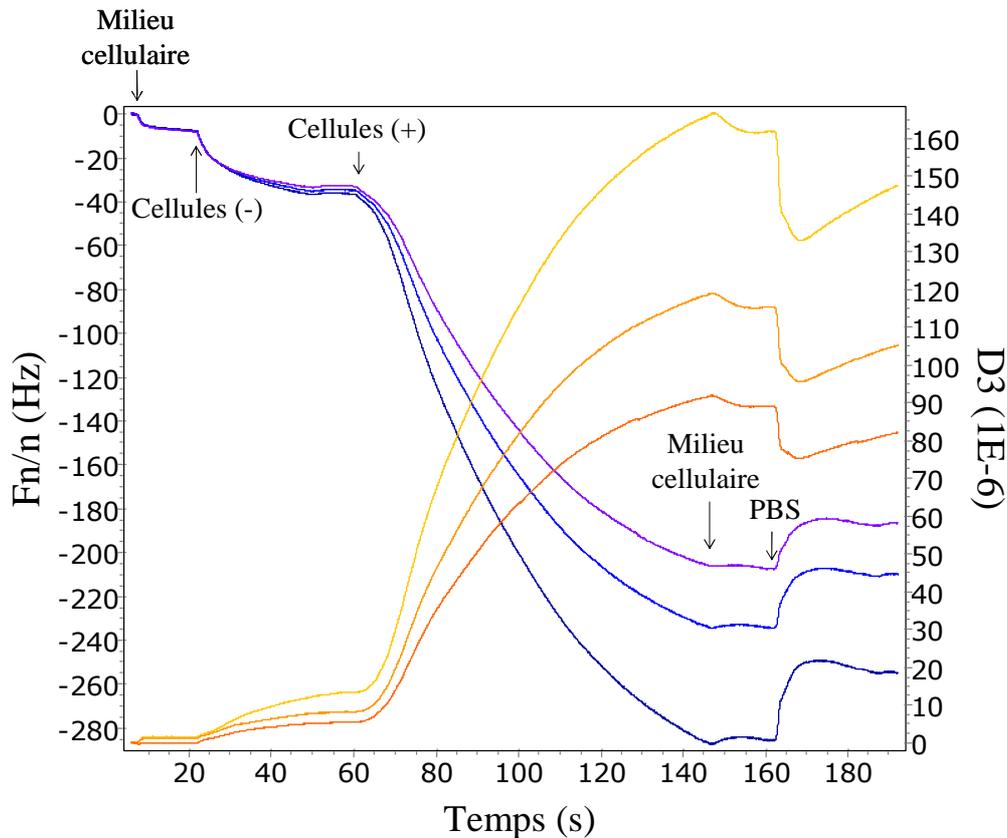


Figure 6: Courbes expérimentales obtenues en QCM-D correspondant à l'adhésion cellulaire, sur une surface d'or fonctionnalisée par 15 min de greffage du RAFT-(RGD)₄ à 0,1 mM, de cellules négatives 3LL et de cellules positives HEK β 3.

Une fois la stabilisation des signaux atteinte, la première catégorie de cellules est injectée sur la monocouche de RAFT-(RGD)₄. On commence par les cellules 3LL négatives. L'injection des cellules se traduit par une faible et progressive diminution des fréquences de résonance, qui s'accompagne d'une augmentation également lente des dissipations d'énergie pour les trois harmoniques. Au bout, d'une vingtaine de minutes l'ensemble des signaux se stabilise aux valeurs $\Delta f_n \sim -24-26$ Hz et D_n compris entre 7 et $11,7 \cdot 10^{-6}$. En première observation, la faible diminution de la fréquence associée à une augmentation de la dissipation, ainsi que la dépendance des signaux en fonction de l'harmonique, traduisent une faible association de matière très visqueuse sur la surface. Il semble alors que l'on ait une très faible association non spécifique des cellules 3LL sur la surface de RAFT-(RGD)₄. Le rinçage au milieu cellulaire n'induit, ensuite, aucun changement.

Les cellules positives HEK $\beta 3$ sont ensuite injectées. Une forte diminution de la fréquence et une forte augmentation de la dissipation sont observées. Dans ce cas là, l'adhésion des cellules est beaucoup plus importante. Les cellules sont laissées en contact 1h30 sans atteindre une stabilisation du signal. Par la suite, le rinçage au milieu cellulaire ne s'accompagne d'aucun décrochement et permet la stabilisation des réponses.

La dernière étape consiste au retour dans le milieu initial d'étude : le tampon PBS. Seul un faible décrochement des fréquences de résonance et des dissipations est observé. Les cellules positives ne semblent pas se décrocher de la surface. Cette surface d'étude est ensuite extraite de la chambre de mesure et plongée directement dans une solution d'éthanol absolue pendant 15 min afin de figer les cellules sur la surface. Les surfaces sont ensuite observées en ellipsométrie grâce à une caméra CCD (Figure 7). L'efficacité du processus d'adhésion cellulaire sur la monocouche auto assemblée de RAFT-(RGD)₄ est clairement révélée par la vue au microscope de la surface du quartz recouvert d'or après l'expérience en QCM-D. De nombreuses cellules sont présentes sur la surface de RAFT-(RGD)₄.

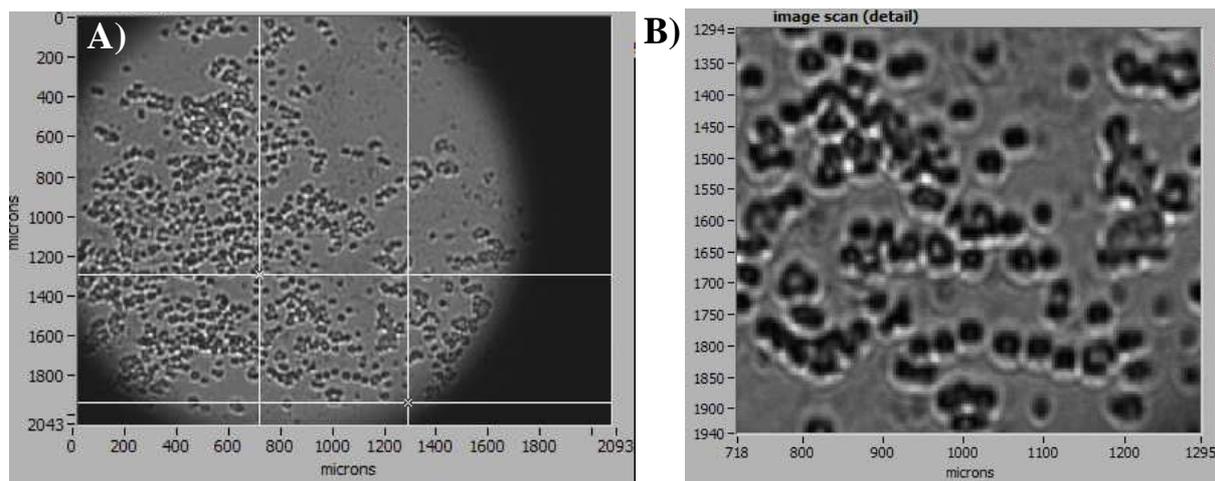


Figure 7 : A) Photo prise en ellipsométrie de la surface d'or fonctionnalisée par le RAFT-(RGD)₄ après l'étude de l'adhésion des cellules en QCM-D. B) Zoom de la partie encadrée de la photo A).

Dans le cadre d'une première analyse, il semble que l'on ait la présence d'une faible association non spécifique des cellules négatives sur la monocouche de RAFT-(RGD)₄. Cela est facilement compréhensible du fait de la présence sur les cellules d'une faible quantité des récepteurs cellulaires : les intégrines $\alpha\beta3$. Cette adhésion des cellules n'est néanmoins pas comparable avec celle des cellules positives surexprimant l'intégrine $\alpha\beta3$. Concernant les cellules positives, les variations de fréquence et de dissipation observées ($-250 \text{ Hz} < \Delta f_n/n < -174 \text{ Hz}$ et $84.10^{-6} < D_n < 148.10^{-6}$) correspondent bien à l'adhésion d'une quantité importante de cellules (fort $\Delta f_n/n$) sur la surface. La valeur élevée du D_n , ainsi que la non superposition des $\Delta f_n/n$ et D_n pour les 3 harmoniques indiquent que le film formé est très visqueux.

II.3.1.2. Surface RAFT-(RAD)₄

Le cristal de quartz recouvert d'or est fonctionnalisé (décrit précédemment) par les molécules RAFT-(RAD)₄. La surface est, ensuite, montée dans la chambre de mesure à sec. L'expérience consiste, comme précédemment, en l'injection sur la surface de la solution de PBS, suivie par celle du milieu cellulaire sans sérum, et enfin de l'injection des cellules négatives puis positives. La Figure 8 montre les résultats obtenus.

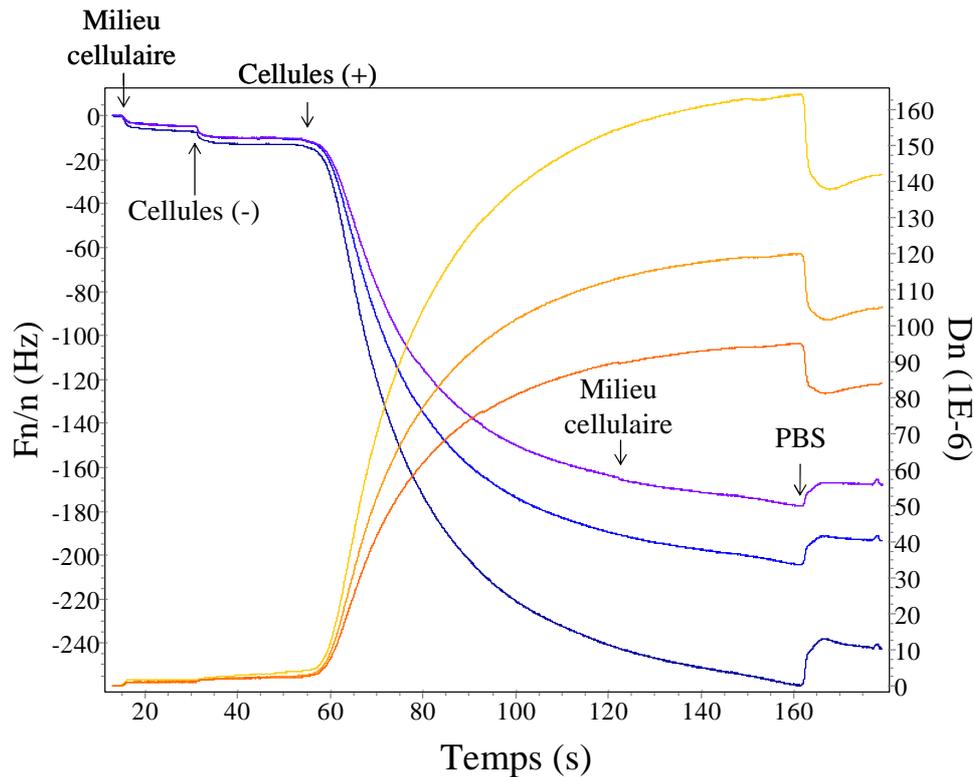


Figure 8: Courbes expérimentales obtenues en QCM-D correspondant à l'adhésion cellulaire de cellules négatives 3LL et de cellules positives HEK $\beta 3$ sur une surface d'or de RAFT-(RAD)₄ à 0,1 mM.

On observe, comme pour l'étude précédente, une variation faible de Δf_n et ΔD_n due à l'injection du milieu cellulaire puis à l'adhésion faible des cellules négatives ILL ($\Delta f_n/n \sim 6$ Hz et $\Delta D_n \sim 2,36 \cdot 10^{-6}$). De même, l'injection des cellules HEK $\beta 3$ s'accompagne d'une diminution élevée du $\Delta f_n/n$ d'environ 200 Hz qui s'accompagne d'une augmentation conséquente du facteur de dissipation ($\Delta D_n \sim 117 \cdot 10^{-6}$). Ces valeurs sont également en accord avec l'adhésion des cellules positives sur la surface de RAFT-(RAD)₄. Cette surface n'a pas été observée en ellipsométrie à la fin de l'expérience.

II.3.2 Discussion

Nous avons obtenu un comportement très similaire de l'adhésion des deux types de cellules, que ce soit sur la surface fonctionnalisée par les motifs -RGD- ou -RAD-. Il semble alors difficile d'affirmer, que les fortes variations de fréquence et de dissipation observées sur la surface de RAFT-(RGD)₄, ne soit dues qu'à de la reconnaissance spécifique des intégrines

$\alpha v\beta 3$ sur les récepteurs -RGD-. L'adhésion de ces mêmes cellules sur la surface de RAFT-(RAD)₄ peut être alors attribuée soit :

- 1) à l'hydrophobicité de la couche d'or inférieure trop proche
- 2) soit à l'absence d'une monocouche compacte de RAFT,
- 3) ou à la sédimentation des cellules sur la surface.

Comme mentionné au paragraphe « II.1 Etat de l'art : adhésion cellulaire suivis par QCM-D », le facteur $\Delta D/\Delta f$ peut être un moyen de caractériser l'adhésion cellulaire sur la surface. Il permet dans notre cas de soulever des interrogations dans l'adhésion des cellules.

La Figure 9 présente le graphe $\Delta D/\Delta f$ pour l'adhésion des cellules positives HEK $\beta 3$ sur la surface.

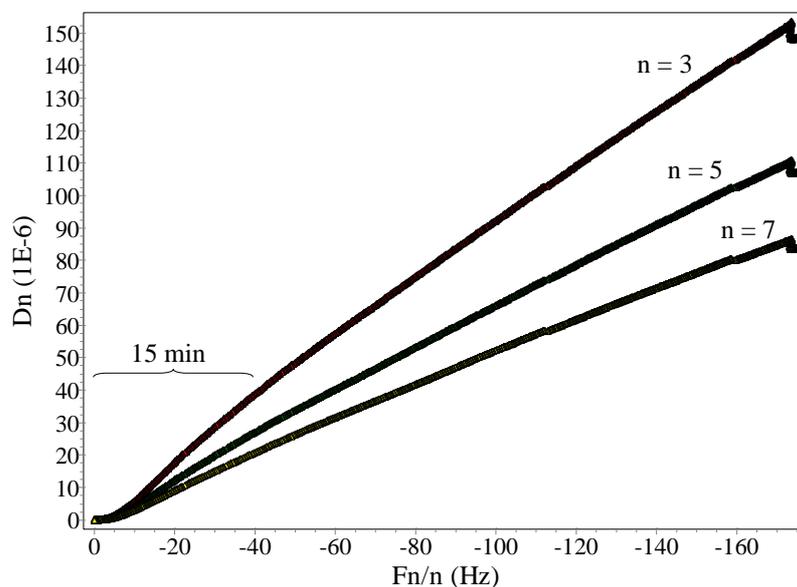


Figure 9 : Graphe représentant les variations de la dissipation d'énergie en fonction de celle de la fréquence correspondant à l'adhésion des cellules HEK $\beta 3$ (+) sur la monocouche de RAFT-(RGD)₄.

En fonction des fluctuations de la droite obtenue par le tracé de $\Delta D/\Delta f$, on peut mettre en évidence pour notre étude deux régimes. Une première étape lente de 15 min puis une seconde beaucoup plus longue. D'autres études d'adhésion cellulaire effectuées en QCM-D décrivent le processus de reconnaissance cellulaire en trois étapes^{40, 48} selon les différentes variations de la pente de la droite $\Delta D/\Delta f$ (Figure 10).

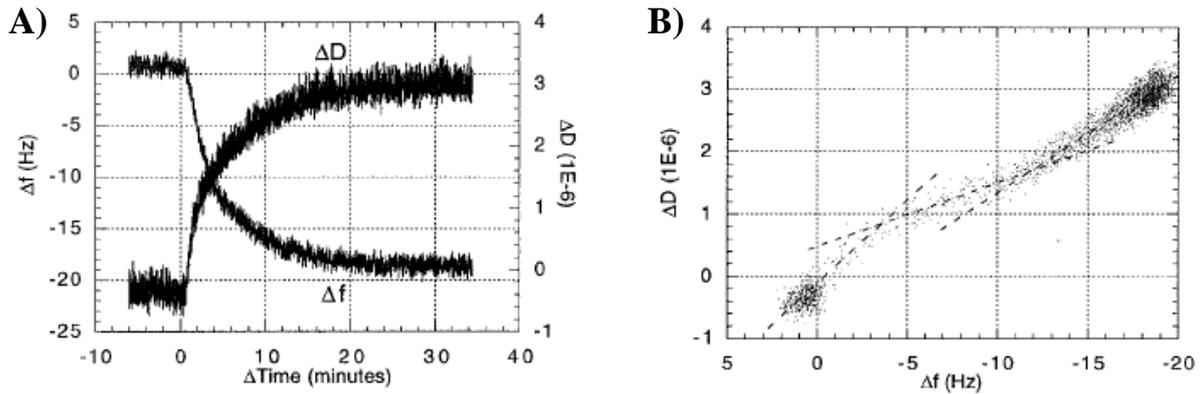


Figure 10 : Figures issues de ³⁶ montrant A) les variations de fréquence et de dissipation enregistrées lors de l'adhésion de cellules sur des récepteurs surfaciques et B) le graphe $\Delta D/\Delta f$ correspondant et permettant la distinction des étapes d'adhésion cellulaire.

La première consiste au contact des cellules sur la surface qui vont ensuite « rouler » sur la surface jusqu'à trouver un point d'attache et cela, peut-être, grâce au regroupement des intégrines sur la surface de la cellule. La seconde étape se caractérise par l'étalement des cellules. Et enfin, la troisième étape correspondrait à la prolifération des cellules sur la surface qui se traduit par une stabilisation de la fréquence et de la valeur de la dissipation d'énergie. Un des buts actuel est d'ailleurs d'essayer de relier les variations de f et de D aux différents comportements d'adhésion des cellules sur une surface spécifique.

Dans notre cas, au bout d'1h30 d'association des cellules, on observe toujours une augmentation aussi bien de Δf que de D , qui semblerait indiquer que les cellules ne prolifèrent pas sur la surface. Il semble que l'on ait encore soit de l'association des cellules, soit des changements de comportement des cellules sur la surface, ou soit la sédimentation des cellules sur la surface (dû au mode d'injection des cellules par QCM-D). Le processus d'adhésion cellulaire étant très long (environ 3 à 4 heures)⁴⁸, dans notre cas, il se peut que les cellules n'aient pas été laissées assez de temps en contact avec la surface. Le dernier régime, c'est-à-dire la prolifération des cellules n'a donc pas pu être atteint. Une autre hypothèse est que cette dernière étape n'est pas observée d'une part parce que l'adhésion des cellules ici enregistrée ne correspond peut être pas à de l'adhésion spécifique des cellules sur les motifs -RGD-. D'autre part, l'absence de sérum, donc de facteur de croissance, dans le milieu cellulaire ne favorise pas la prolifération des cellules.

II.4. Conclusion et perspectives

A la vue de ces résultats expérimentaux, aucune conclusion ne peut être établie concernant la mise en évidence de la spécificité de la liaison ligand RGD / intégrine $\alpha v \beta 3$. Toute tentative pour mettre en évidence l'amélioration de la reconnaissance grâce à la présentation multivalente des RGD semble compromise en gardant ces conditions expérimentales.

Une des perspectives en cours de développement dans notre équipe est l'utilisation de SAMs mixtes PEG/RAFT-RGD. Le polyéthylène glycol est, en effet, une des rares molécules connues qui limite fortement l'adhésion non spécifique des cellules sur une surface. Les premières études s'avèrent concluantes et font l'objet d'une autre thèse (thèse de Ludivine Sandrin sous la responsabilité de L. Guérente et D. Boturyn).

Une seconde façon de pouvoir mettre en avant l'amélioration de la spécificité de la liaison entre l'intégrine et le RAFT-(RGD)₄ est de déterminer la constante d'affinité entre ces deux partenaires et de la comparer à celle déjà déterminée entre l'intégrine et le monomère cyclo-RGDfK-. Dans ce cas, la SPR s'avère être la technique d'étude par excellence qui permet l'accès à ce type de données.

III. Interaction RAFT-(RGD)₄ / intégrine $\alpha v \beta 3$ – Etude par SPR

Afin d'obtenir une estimation de la constante d'association entre le récepteur membranaire, l'intégrine $\alpha v \beta 3$ (Figure 1) et les RAFT-(RGD)₄ ou le monomère cyclo-RGDfK-, des études en résonance plasmonique de surface ont été entreprises. Cela nécessite alors l'immobilisation sur la surface de l'un des deux partenaires de l'étude : le RAFT ou l'intégrine. Bien que l'immobilisation des molécules RAFT semble être la solution la plus facile d'accès, le fort coût des intégrines empêche, malheureusement, l'étude cinétique des intégrines en tant qu'analyte en solution.

Comme mentionnés dans l'introduction, il existe deux procédés permettant l'immobilisation des intégrines sur une surface. Le premier consiste à greffer de façon covalente l'intégrine par couplage amine sur une surface présentant des groupements carboxyles. Le second repose sur l'insertion des intégrines dans des vésicules de grande taille puis à leur fusion sur une surface en une bicouche lipidique suspendue. Cependant, pour des études en BIAcore[®], le faible poids des molécules RAFT-(RGD)₄ et du monomère cyclo-RGDfK- nécessite l'immobilisation d'une quantité suffisante d'intégrines sur la surface empêchant l'emploi de

cette seconde façon de procéder. L'immobilisation directe de l'intégrine, même si cette dernière ne se présente pas dans son environnement naturel, apparaît être la seule solution satisfaisante ; d'autant plus que des études précédentes ont montrées que les intégrines, une fois immobilisées par cette méthode, gardent leur activité^{7, 27-30}.

III.1. Fonctionnalisation de la surface

Différents tampons de course ont été utilisés, on les notera:

- **RB1**: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% P20, 1 mM MnCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, pH=7,4
- **RB2**: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% P20, 0,1 mM MnCl₂, 0,1 mM MgCl₂, pH=7,4
- **RB3**: PBS (0.01 M Na₂HPO₄, 0.137 M NaCl et 0.0027 M KCl), 1 mM MgCl₂, 0,005% P20, pH = 7.4
- **RB4**: 50 mM TRIS, 15 mM NaCl, 1mM MnCl₂, 2 mM MgCl₂, 0,005% P20, pH = 7.4

Le nom du tampon de course sera nommé à chaque étude.

L'immobilisation des intégrines se fait sur une chips CM5 selon la méthode classique de couplage amine développée par pharmacia (BIAcore, cf chapitre II). Elle a été effectuée à 10 µL/min. La température d'étude est de 25 °C et les produits sont stockés dans le compartiment à échantillons à 10 °C.

III.1.1 Les intégrines utilisées

Les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha5\beta1$ ont été étudiées. Ces deux intégrines présentent un site de reconnaissance au motif -RGD-. Compte tenu du fait qu'il n'existe pas d'intégrine commerciale qui ne reconnaisse pas le motif -RGD-, l'intégrine $\alpha5\beta1$ a été utilisée, par comparaison avec l'intégrine $\alpha\beta3$ pour vérifier la viabilité des intégrines immobilisées de manière non naturelle (voir ci après).

III.1.2 Les pistes de référence

La piste de référence doit, dans le meilleur des cas, présenter un état de recouvrement identique par rapport aux surfaces d'études. Cependant comme on l'a vu précédemment, il

n'existe pas d'intégrine commerciale qui ne présente pas de reconnaissance pour le motif -RGD-.

Pour nos études, deux types de surface de référence ont été effectués :

- une « blank immobilisation ». Deux tests de viabilité de l'intégrine $\alpha v \beta 3$ ont été réalisés avec des protéines de la matrice extra cellulaire. Pour ces études, afin d'éviter toute reconnaissance non spécifique, la piste de référence a été désactivée en effectuant un couplage amine de l'éthanolamine, ce que l'on appelle une « blank immobilisation » (pratique courante utilisée en SPR lorsque les intégrines sont immobilisées). Cela consiste à activer la surface par le mélange EDC-NHS (0,2 M – 0,05 M) puis à la désactiver directement par le couplage covalent de l'éthanolamine (1M, pH=8,5) sur les groupements carboxylates.

- pour l'étude cinétique d'adhésion des molécules RAFT, la piste de référence a été fonctionnalisée par la lectine Con A. L'absence d'adhésion non spécifique des molécules sur cette dernière a été vérifiée. En effet, la détection de petites molécules nécessite de travailler sur des pistes (référence et étude) présentant un état de surface similaire, afin de limiter au maximum la détection des effets tampons relatifs à cette différence d'état de recouvrement entre les deux pistes.

L'immobilisation de la lectine s'est faite par couplage amine exactement de la même façon que dans le chapitre II. L'adhésion finale correspond à un recouvrement de 13950 RU de lectine Con A à la surface (cf chapitre II).

III.1.3 Les pistes d'étude

L'immobilisation des deux intégrines $\alpha v \beta 3$ et $\alpha 5 \beta 1$ se fait par couplage amine. La piste est activée par un mélange 0,2 M EDC – 0,05 M NHS pendant 7 min. Les intégrines sont ensuite injectées, chacune sur une piste, à une concentration de 0,1 mg/mL diluées dans le TP acétate 10 mM pH = 4,0 avec 1 mM en Mn^{2+} , $2Cl^{-}$ et 28 mM en octyl- β -D-glucopyranoside (due à la dilution du tensioactif présent dans la solution commerciale de l'intégrine)²⁹. Les intégrines sont laissées en contact avec la surface des temps variables (inférieurs à 3 min) afin d'obtenir des surfaces présentant entre 5000 et 10 000 RU d'intégrines (de 5 à 10 ng/mm²). Le tableau ci après résume les quantités d'intégrines immobilisées.

Expériences	Quantité immobilisée (RU)			
	(1)	(2)	(3)	(4)*
Intégrine $\alpha v \beta 3$	10088	5242	9222	6751
Intégrine $\alpha 5 \beta 1$	12689	4864	10651	/

* dans ce cas une piste présentant la lectine Con A sert de piste de référence et a été immobilisé à 13957 RU

Tableau 1 : Quantité d'intégrines $\alpha v \beta 3$ et $\alpha 5 \beta 1$ immobilisées sur les différentes pistes d'étude en fonction des expériences réalisées.

Une solution d'éthanolamine (1M, pH = 8,5) est ensuite mise en contact avec la surface afin de bloquer les sites activés par la 1^{ère} étape mais qui n'ont pas réagi lors de l'ajout de l'intégrine.

Enfin, deux courtes injections d'une minute de 20 mM EDTA, 1M NaCl dans le TP de course sont effectuées afin d'éliminer les intégrines qui ne sont pas associées de façon covalente.

III.2. Tests de viabilité

Une fois les intégrines immobilisées, il est important de vérifier que ce mode d'immobilisation, peu conventionnel, de l'intégrine ne détériore pas leur conformation et leur activité. En effet, la chaîne α de ces dernières présente un pont disulfure qui peut être facilement coupé (Figure 1 page - 127 -) et la reconnaissance du motif RGD nécessite la proximité des deux sous-unités α et β . Cette bonne conformation de l'intégrine $\alpha v \beta 3$ peut être vérifiée rapidement grâce à l'utilisation de l'anticorps spécifique de l'intégrine : appelé LM609.

III.2.1 Test de conformation de l'intégrine : adhésion de l'anticorps LM609

Les anticorps sont des glycoprotéines qui se présentent sous la forme d'un Y. Ils ont la capacité de reconnaître et de se fixer de manière spécifique sur un antigène. Cette spécificité est conférée par la présence de domaines extrêmement variables aux extrémités des anticorps. L'intégrine $\alpha v \beta 3$ a été démontrée comme étant l'antigène spécifique de l'anticorps monoclonal LM609. La liaison qui se forme ensuite entre l'anticorps et l'antigène est hautement affine et difficilement réversible. L'anticorps, spécifique à l'intégrine $\alpha v \beta 3$, ne présentera donc aucune reconnaissance envers la seconde intégrine $\alpha 5 \beta 1$.

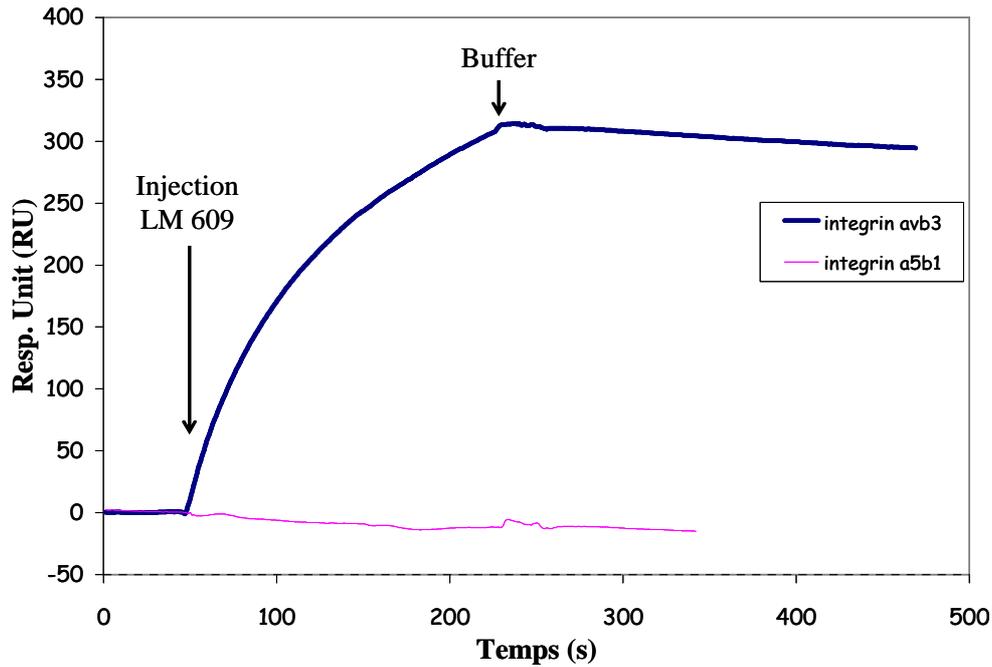


Figure 11 : Etude en SPR correspondant à l'association spécifique de l'anticorps LM 609 sur la surface fonctionnalisée par les intégrines $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ (ligne épaisse) par opposition à l'absence de reconnaissance de ce dernier sur la surface présentant les intégrines $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ (ligne fine).

Nous avons testé la reconnaissance de l'anticorps à une concentration de 62,5 nM sur les surfaces d'études de l'expérience n°3 présentant soit l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ soit l'intégrine $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ (Figure 11). Nous avons utilisé le tampon d'étude RB4 car sa composition est couramment utilisée dans des études d'interaction similaire anticorps LM609 / intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ ^{14, 32}. Les résultats obtenus montrent la spécificité de la reconnaissance de l'anticorps uniquement sur la piste fonctionnalisée par l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ confirmant ainsi que ce mode d'immobilisation conserve, au moins pour une partie des protéines, la bonne orientation et conformation des intégrines en deux sous-unités côte à côte.

III.2.2 Test de l'activité : adhésion de la vitronectine

L'activité des intégrines sur la surface a ensuite été vérifiée en étudiant la cinétique d'adhésion de la vitronectine (VN), une glycoprotéine de la matrice extracellulaire, qui présente une affinité spécifique connue avec les deux intégrines. La vitronectine présente un poids moléculaire de 75 kDa et est constituée de 459 résidus d'acides aminés.

L'étude présentée a été faite sur les pistes de l'expérience n°2 avec RB1 comme tampon d'étude. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant les autres tampons d'étude. On a

fait varier les concentrations en VN de 20 nM à 500 nM, avec un temps d'association et de dissociation de 5 min. Après chaque cycle d'association-dissociation, la surface est régénérée par deux injections de 2 min d'une solution à 100 mM en EDTA, pH = 8,5. La Figure 12 montre les courbes cinétiques d'association et de dissociation entre la VN et l'intégrine $\alpha v\beta 3$ obtenues par SPR. L'analyse cinétique effectuée à l'aide du logiciel BIAcore T100 evaluation, en utilisant un modèle d'interaction 1 :1, a permis de déterminer une affinité de l'ordre de 80 nM qui est en accord avec les valeurs données dans la littérature ($K_D = 100$ nM)

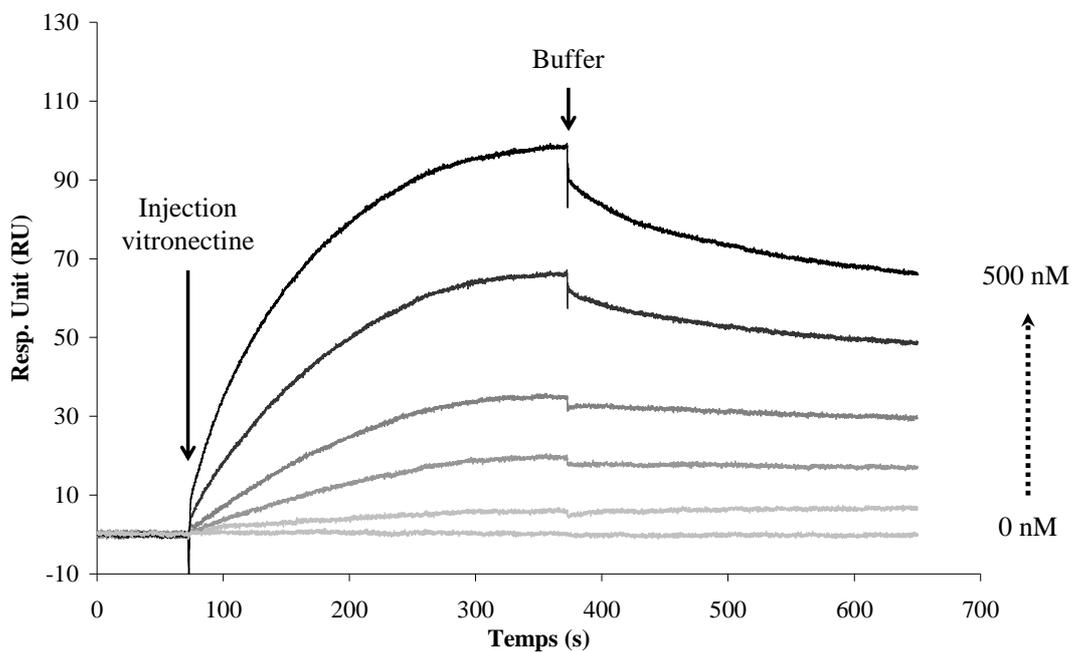


Figure 12 : Sensorgrammes enregistrés lors de l'étude cinétique, effectuée en SPR, de l'adhésion de la protéine ECM, la vitronectine, sur la surface fonctionnalisée par l'intégrine $\alpha v\beta 3$.

Cette seconde analyse nous a donc permis de confirmer que l'immobilisation de l'intégrine par couplage covalent conserve l'activité d'une partie des intégrines immobilisées. On peut déterminer la quantité d'intégrines immobilisées qui reste active grâce à la quantité maximale de VN qui adhère. On trouve, en effet, $R_{max} = 113,5$ RU, c'est-à-dire une masse surfacique de 0,1135 ng/mm² soit $1,51 \cdot 10^{-11}$ mol.cm⁻² (1 RU = 1000 pg.mm⁻²). Comme il s'agit d'une interaction de type 1:1 entre la VN et l'intégrine $\alpha v\beta 3$, on aura également $1,51 \cdot 10^{-11}$ mol.cm⁻² d'intégrines à la surface qui sont orientées dans le bon sens, hétérodimériques et actives (Chapitre I). Cette quantité d'intégrine active correspondrait ainsi à une valeur de 356,6 RU,

sachant que la masse molaire de la vitronectine est de 75 000 Da et celle de l'intégrine 237 000 Da. Initialement, on avait immobilisé sur cette surface d'étude 5242 RU d'intégrine. Il semble alors que l'on ait qu'une très faible partie des intégrines « actives » à la surface et à la vue de ce résultat il risque d'être très difficile de pouvoir détecter et donc observer l'adhésion des molécules RAFT et du monomère cyclo-RGDfK- sur la surface d'intégrine. Toutefois, compte tenu des spécificités de l'appareil utilisé, BIAcore® T100, une étude a été entreprise.

III.3. Etude cinétique de l'interaction intégrine $\alpha\beta3$ /ligand peptidique -RGD-

III.3.1 Présence d'effet tampon

Les premières études en cinétique, effectuées sur les pistes des expériences n° 1, 2 et 3, qui utilisaient une « blank immobilisation » comme référence, ont mis en évidence des problèmes d'effet tampon. En effet, on obtenait une constante d'affinité entre l'intégrine et le RAFT-(RGD)₄ ou le cyclo-RGDfK- de l'ordre de 0,1 mM (relatif à une interaction très faible) et un R_{max} supérieur à 100 RU (Figure 13). Les intégrines immobilisées sur les pistes d'étude utilisées lors de chacune des expériences ont été testées au préalable par l'injection de vitronectine.

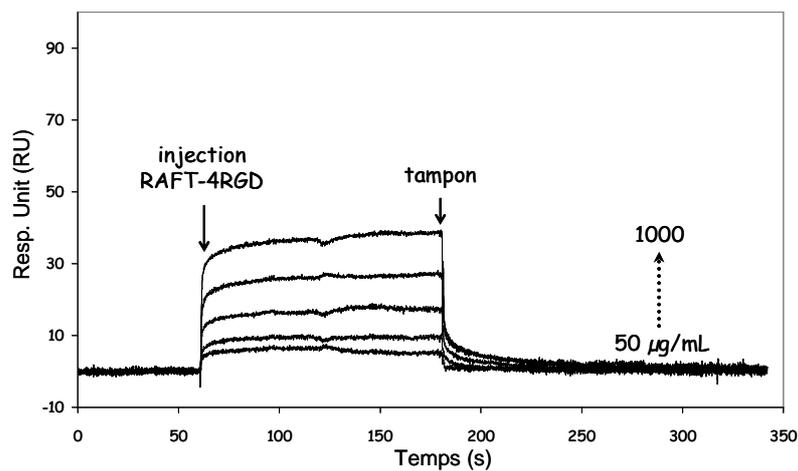


Figure 13 : Exemple des courbes d'association/dissociation représentant l'étude cinétique du RAFT-(RGD)₄ sur la surface d'intégrines $\alpha\beta3$ par SPR.

Des calculs théoriques, en utilisant le même facteur de conversion RU/masse surfacique que pour les protéines (dn/dc des molécules RAFT n'est pas connu), permettent d'obtenir des

valeurs approximatives de la quantité maximale de molécules attendue. Ces calculs montrent que pour le RAFT-(RGD)₄ (masse molaire du RAFT-(RGD)₄ = 4278 Da) et le cyclo-RGDfK- (masse molaire du c-RGDfK- = 831,7 Da), une quantité maximale respective d'environ 6 RU et 2 RU est estimée. Les « quantités » mesurées sont donc trop élevées pour correspondre à l'adhésion des molécules RAFT-(RGD)₄.

De même, des tests de compétition entre les RAFT-(RGD)₄ et la vitronectine ont été réalisés, afin d'essayer de mettre en évidence la force de l'affinité entre le RAFT-(RGD)₄ et les intégrines. La Figure 14 montre l'adhésion de la VN à différentes concentrations lorsqu'on la mélange avec 117 μM de RAFT-(RGD)₄. Les courbes plus fines correspondent à l'adhésion de la VN à 35 (rouge), 75 (vert) et 150 nM (bleu) seule et les courbes plus épaisses à l'association et dissociation de la VN aux mêmes concentrations mélangées avec 117 μM de RAFT-(RGD)₄. Les résultats montrent qu'aucun changement n'est observé dans l'association et la dissociation de la VN par la présence de la molécule RAFT-(RGD)₄. Cette étude semble confirmer que le seul effet apporté par la solution de RAFT est un effet tampon, car on retrouve à chaque fois le même saut qui correspond bien à l'injection de la solution RAFT-(RGD)₄ à 117 μM seule (courbe noire).

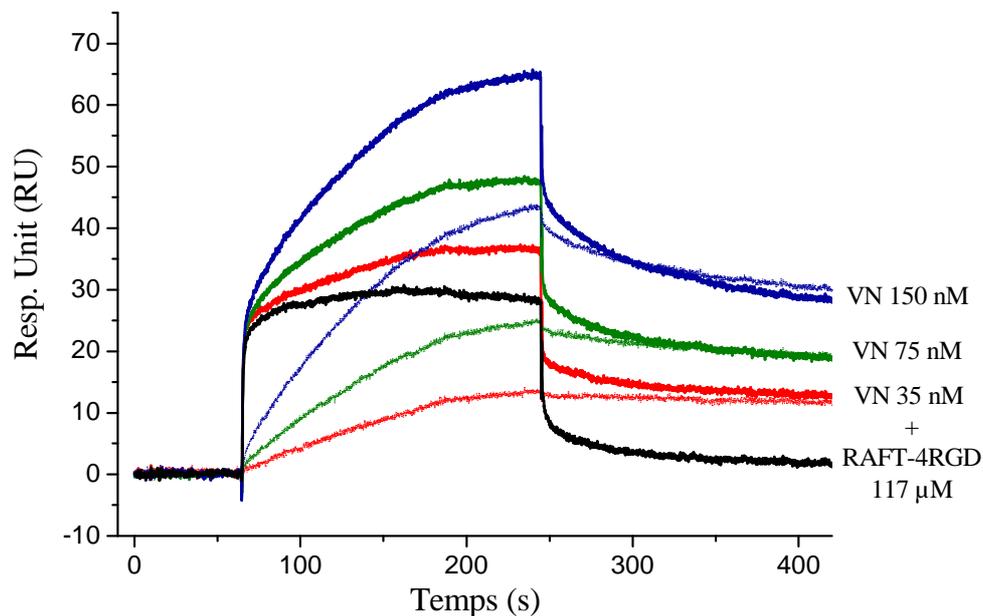


Figure 14 : Courbes d'association – dissociation de la VN seule (courbes fines) et d'un mélange (courbes épaisses) de VN et de RAFT-(RGD)₄ (117μM) pour trois concentrations en VN : 35 nM (rouge), 75 nM (vert) et 150 nM (bleu). La courbe noire correspond à l'association et la dissociation du RAFT-(RGD)₄ seul à 117 μM.

III.3.2 La piste de référence

En SPR, la présence d'effet tampon peut avoir deux origines, soit un état de surface différent entre la piste de référence et la piste d'étude, soit une différence entre le tampon de course et le tampon où est dilué l'analyte. Dans notre cas, le tampon de course est le même que le tampon d'étude, par contre les états de surface sont totalement différents vu que la piste de référence ne présente rien à sa surface. L'idéal aurait été d'immobiliser exactement le même type de molécule ou protéine sur les deux pistes. Comme il n'existe aucune intégrine commerciale qui ne présente pas de site de reconnaissance au motif -RGD-, on a alors décidé d'immobiliser la lectine Con A sur la piste de référence. Compte tenu que la lectine Con A présente un poids moléculaire plus faible que celui de l'intégrine, nous avons donc immobilisée deux fois plus de lectine Con A que d'intégrines (Tableau 1), afin d'établir un recouvrement en protéines identique sur les deux pistes. Une quantité SPR de 6 751 RU d'intégrine $\alpha\beta3$ et de 13 957 RU de lectine Con A a donc été immobilisée. L'étude cinétique de la molécule RAFT-(RGD)₄ a ensuite été effectuée. La Figure 15 montre que l'on a réussi à éliminer une grande partie des effets tampon mais l'on n'observe toujours pas de cinétique d'association – dissociation de la molécule sur la surface d'intégrine.

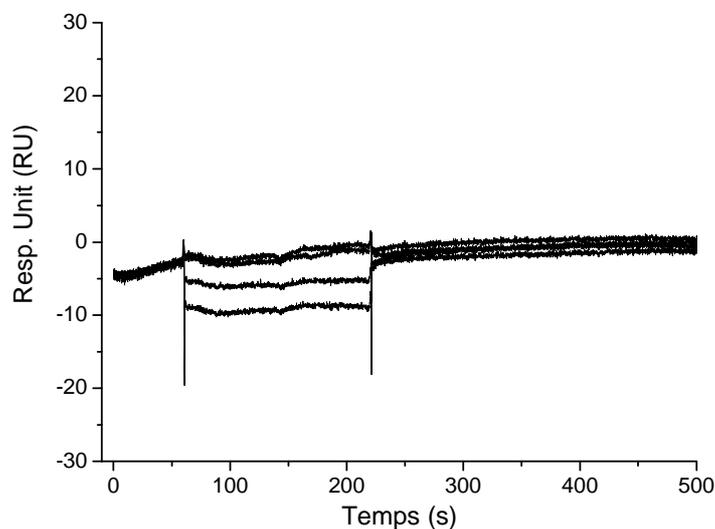


Figure 15 : Courbes cinétiques d'association et dissociation du RAFT-(RGD)₄ pour des concentrations variant de 100 à 500 µg/mL.

III.3.3 Tentative d'alourdissement de la molécule RAFT-(RGD)₄

Une tentative d'alourdissement de la molécule de RAFT a été réalisée afin de permettre une détection plus facile. Compte tenu que nous avons à notre disposition la molécule RAFT-(RGD)₄ avec un groupement biotine sur sa face de détection (synthèse réalisée par Ludivine Sandrin), nous avons mélangé la molécule RAFT biotinylée avec la streptavidine afin d'obtenir un complexe RAFT/streptavidine (Figure 16).

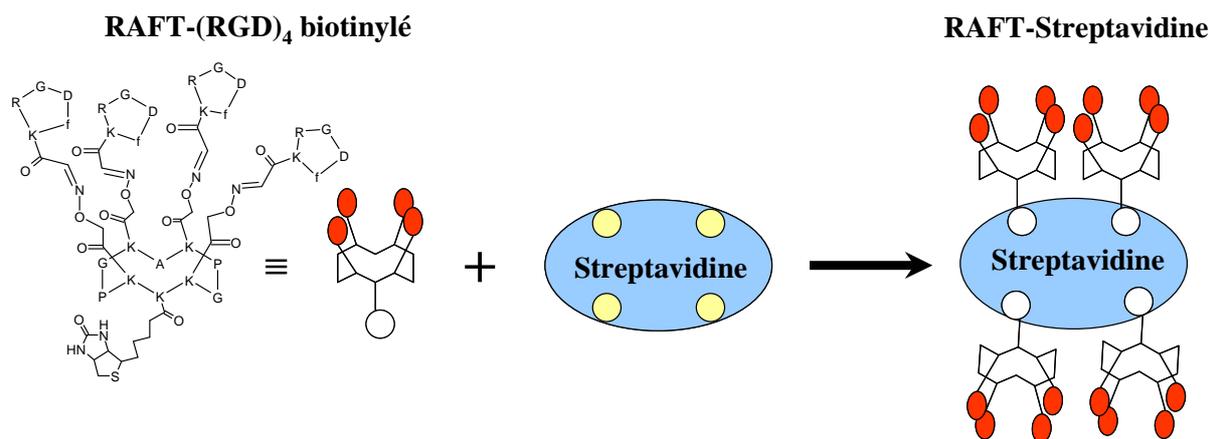


Figure 16 : Structure de la molécule RAFT-(RGD)₄ biotinylée et schéma réactionnel montrant le mélange de la molécule RAFT-(RGD)₄ avec la streptavidine

Les sensorgrammes obtenus ne présentent pas de courbes cinétiques d'association-dissociation exploitables. La faible solubilité des molécules biotine RAFT-(RGD)₄ dans notre tampon d'étude pourrait expliquer l'absence de formation des complexes RAFT-streptavidine. Nos études se sont arrêtées à ce niveau.

IV. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons essayé de mettre en évidence d'une part la spécificité de liaison de cellules cancéreuses sur une surface de RAFT-(RGD)₄ et d'autre part de quantifier cette spécificité en montrant l'avantage d'utiliser la multivalence pour améliorer la détection des cellules cancéreuses par la molécule RAFT-(RGD)₄. Bien que les objectifs fixés n'aient pu être atteints, les résultats obtenus ont permis de poser la base des études actuelles qui sont en cours de réalisation au laboratoire (thèse de Ludivine Sandrin).

Dans la première partie de ce chapitre, l'immobilisation des molécules RAFT seules sur une surface d'or s'est avérée être non adaptée pour les études d'adhésion cellulaire. Il semble, en effet, que la monocouche formée ne soit pas assez épaisse ou dense pour empêcher l'adhésion non spécifique des cellules sur la surface. Le mode d'immobilisation des ligands RAFT-RGD a donc été repensé et les études en cours, utilisant des SAMs mixte PEG/RAFT-RGD, sont en bonne voie pour atteindre ce premier objectif.

Ensuite, dans la seconde partie de ce chapitre, le couplage amine, choisi comme mode d'immobilisation de l'intégrine pour les études SPR, a montré son efficacité au niveau de l'activité et de l'adéquation conformation de l'intégrine sur la surface. Toutefois, le trop faible poids des molécules RAFT-(RGD)₄ ou du monomère cyclo-RGDfK- empêche toute détection des molécules même avec un des appareils le plus sensible de sa génération (BIAcore® T100). Le second mode d'immobilisation de l'intégrine dans une bicouche lipidique suspendue ne permettra pas une meilleure détection des architectures -RGD-. En effet, ce mode d'immobilisation permet d'exposer seulement une faible quantité d'intégrine dans la bicouche lipidique, d'autant plus que la moitié de ces dernières se retrouveront statistiquement avec leur matrice de liaison orientée vers la solution, et l'autre moitié vers le support ne permettant pas l'adhésion du ligand. Afin de mener à terme cette étude, il est nécessaire d'alourdir la molécule RAFT. La tentative avec le complexe RAFT-(RGD)₄ biotine/streptavidine n'ayant pas fonctionné, une autre approche envisageable est d'insérer les molécules RAFT dans des vésicules de petites tailles (Figure 17 A)). Cela nous permettrait d'avoir des objets de poids moléculaire convenable ce qui rendrait alors possible des études aussi bien en QCM-D qu'en SPR.

Cette insertion des molécules RAFT dans des vésicules pourrait également s'avérer utile dans le cadre de l'étude d'adhésion cellulaire par QCM-D (Figure 17 B)). On pourrait, en effet, se servir de ces dernières pour former une bicouche lipidique fonctionnalisée par les molécules RAFT sur une surface. Les bicouches lipidiques supportées sont bien connues pour leur état de surface inerte, empêchant ainsi l'adhésion non spécifique des cellules sur la surface. Elles pourraient donc être un bon substitut à l'utilisation des SAMs de PEG.

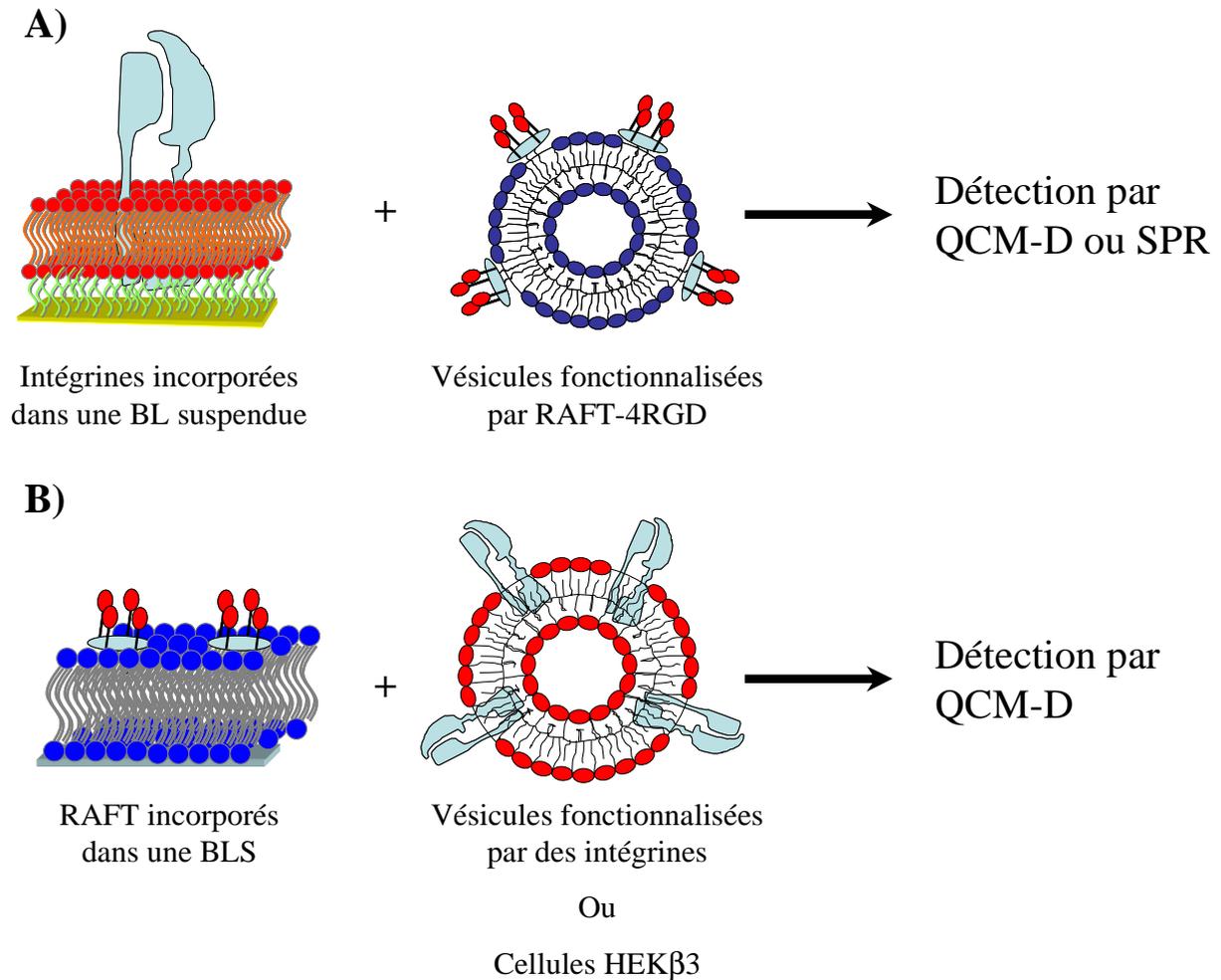


Figure 17 : Présentations des deux différentes voies d'étude en perspective : A) par détection en SPR ou QCM-D de l'adhésion de vésicules fonctionnalisées par des RAFT-(RGD)₄ sur une bicouche lipidique suspendue présentant des intégrines et B) par détection QCM-D de l'adhésion de cellules cancéreuses ou de vésicules fonctionnalisées par des intégrines sur une BLS présentant des RAFT-(RGD)₄.

Références chapitre III :

- (1) Eliceiri, B. P.; Cheresh, D. A. *Current Opinion in Cell Biology* **2001**, *13*, 563-568.
- (2) Felding-Habermann, B. *Clinical & Experimental Metastasis* **2003**, *20*, 203-213.
- (3) Arndt, T.; Arndt, U.; Reuning, U.; Kessler, H. *Cancer Therapy* **2005**, 93-141.
- (4) Tweedle, M. F. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2006**, *1*, 2-9.
- (5) Hynes, R. O. *Cell* **2002**, *110*, 673-687.
- (6) Haubner, R.; Finsinger, D.; Kessler, H. *Angewandte Chemie, International Edition in English* **1997**, *36*, 1374-1389.
- (7) Hu, D. D.; Barbas, C. F., III; Smith, J. W. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 21745-21751.
- (8) Gailit, J.; Ruoslahti, E. *Journal of Biological Chemistry* **1988**, *263*, 12927-12932.
- (9) Hu, D. D.; Hoyer, J. R.; Smith, J. W. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 9917-9925.
- (10) Smith, J. W.; Piotrowicz, R. S.; Mathis, D. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 960-967.
- (11) Garanger, E.; Boturyn, D.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. *Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71*, 2402-2410.
- (12) Owen, R. M.; Carlson, C. B.; Xu, J.; Mowery, P.; Fasella, E.; Kiessling, L. L. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 68-82.
- (13) Carlson, C. B.; Mowery, P.; Owen, R. M.; Dykhuizen, E. C.; Kiessling, L. L. *Chemical Biology* **2007**, *2*, 119-127.
- (14) Loessner, D.; Kessler, H.; Thumshirn, G.; Dahmen, C.; Wiltschi, B.; Tanaka, M.; Knoll, W.; Sinner, E.-K.; Reuning, U. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 4524-4533.
- (15) D'Souza, S. E.; Ginsberg, M. H.; Plow, E. F. *Trends in Biochemical Sciences* **1991**, *16*, 246-250.
- (16) Garanger, E.; Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Favrot, M.-C.; Dumy, P. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, *4*, 1958-1965.
- (17) Jin, Z.-H.; Josserand, V.; Razkin, J.; Garanger, E.; Boturyn, D.; Favrot, M.-C.; Dumy, P.; Coll, J.-L. *Molecular Imaging* **2006**, *5*, 188-197.
- (18) Jin, Z.-H.; Razkin, J.; Josserand, V.; Boturyn, D.; Grichine, A.; Texier, I.; Favrot, M.-C.; Dumy, P.; Coll, J.-L. *Molecular Imaging* **2007**, *6*, 43-55.
- (19) Razkin, J.; Josserand, V.; Boturyn, D.; Jin, Z.-h.; Dumy, P.; Favrot, M.; Coll, J.-L.; Texier, I. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1069-1072.
- (20) Maheshwari, G.; Brown, G.; Lauffenburger, D. A.; Wells, A.; Griffith, L. G. *Journal of Cell Science* **2000**, *113*, 1677-1686.
- (21) Auernheimer, J.; Zukowski, D.; Dahmen, C.; Kantlehner, M.; Enderle, A.; Goodman Simon, L.; Kessler, H. *Chembiochem* **2005**, *6*, 2034-2040.
- (22) Lechner, A. M.; Assfalg-Machleidt, I.; Zahler, S.; Stoeckelhuber, M.; Machleidt, W.; Jochum, M.; Naegler, D. K. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 39588-39597.
- (23) Vella, F.; Thielens, N. M.; Bersch, B.; Arlaud, G. J.; Frchet, P. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 19834-19843.
- (24) Hu, B.; Finsinger, D.; Peter, K.; Guttenberg, Z.; Baermann, M.; Kessler, H.; Escherich, A.; Moroder, L.; Boehm, J.; Baumeister, W.; Sui, S.-f.; Sackmann, E. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12284-12294.
- (25) Goodman, S. L.; Hoelzemann, G.; Sulyok, G. A. G.; Kessler, H. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 1045-1051.
- (26) Dechantsreiter, M. A.; Planker, E.; Matha, B.; Lohof, E.; Holzemann, G.; Jonczyk, A.; Goodman, S. L.; Kessler, H. *Journal of medicinal chemistry* **1999**, *42*, 3033-3040.

- (27) Pesho, M. M.; Bledzka, K.; Michalec, L.; Cierniewski, C. S.; Plow, E. F. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 23034-23041.
- (28) Smith, J. W.; Hut, D.; Satterthwait, A.; Pinz-Sweeney, S.; Barbas, C. F. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 32788-32795.
- (29) Wu, P.-L.; Lee, S.-C.; Chuang, C.-C.; Mori, S.; Akakura, N.; Wu, W.-g.; Takada, Y. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 7937-7945.
- (30) Sriramarao, P.; Steffner, P.; Gehlsen, K. R. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268*, 22036-22041.
- (31) Marchi-Artzner, V.; Lorz, B.; Gosse, C.; Jullien, L.; Merkel, R.; Kessler, H.; Sackmann, E. *Langmuir* **2003**, *19*, 835-841.
- (32) Sinner, E.-K.; Reuning, U.; Kok, F. N.; Sacca, B.; Moroder, L.; Knoll, W.; Oesterhelt, D. *Analytical Biochemistry* **2004**, *333*, 216-224.
- (33) Erb, E.-M.; Tangemann, K.; Bohrmann, B.; Mueller, B.; Engel, J. *Biochemistry* **1997**, *36*, 7395-7402.
- (34) Goennenwein, S.; Tanaka, M.; Hu, B.; Moroder, L.; Sackmann, E. *Biophysical Journal* **2003**, *85*, 646-655.
- (35) Hussain, M. A.; Agnihotri, A.; Siedlecki, C. A. *Langmuir* **2005**, *21*, 6979-6986.
- (36) Fredriksson, C.; Kihlman, S.; Rodahl, M.; Kasemo, B. *Langmuir* **1998**, *14*, 248-251.
- (37) Fredriksson, C.; Kihlman, S.; Kasemo, B.; Steel, D. M. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1998**, *9*, 785-788.
- (38) Gryte, D. M.; Ward, M. D.; Hu, W. S. *Biotechnology Progress* **1993**, *9*, 105-108.
- (39) Knerr, R.; Weiser, B.; Drotleff, S.; Steinem, C.; Goepferich, A. *Macromolecular Bioscience* **2006**, *6*, 827-838.
- (40) Lord, M. S.; Modin, C.; Foss, M.; Duch, M.; Simmons, A.; Pedersen, F. S.; Milthorpe, B. K.; Besenbacher, F. *Biomaterials* **2006**, *27*, 4529-4537.
- (41) Marx, K. A.; Zhou, T.; Warren, M.; Braunhut, S. J. *Biotechnology Progress* **2003**, *19*, 987-999.
- (42) Marxer, C. G.; Coen, M. C.; Bissig, H.; Greber, U. F.; Schlapbach, L. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *377*, 570-577.
- (43) Modin, C.; Stranne, A.-L.; Foss, M.; Duch, M.; Justesen, J.; Chevallier, J.; Andersen, L. K.; Hemmersam, A. G.; Pedersen, F. S.; Besenbacher, F. *Biomaterials* **2006**, *27*, 1346-1354.
- (44) Wegener, J.; Janshoff, A.; Galla, H. J. *European Biophysics Journal* **1998**, *28*, 26-37.
- (45) Zhou, T.; Marx, K. A.; Warren, M.; Schulze, H.; Braunhut, S. J. *Biotechnology Progress* **2000**, *16*, 268-277.
- (46) Voinova, M. V.; Rodahl, M.; Jonson, M.; Kasemo, B. *Physica Scripta* **1999**, *59*, 391-396.
- (47) Rodahl, M.; Kasemo, B. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **1996**, *B37*, 111-116.
- (48) Li, J.; Thielemann, C.; Reuning, U.; Johannsmann, D. *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, *20*, 1333-1340.

CHAPITRE IV

Chapitre IV. Films multicouches basés sur des interactions hôte-invité

I. Introduction : la multivalence en milieu supramoléculaire

Lors des chapitres précédents, nous avons vu que les interactions multivalentes étaient impliquées dans une grande variété de procédés biologiques. La possibilité, apportée par les liaisons multivalentes, de fournir des propriétés qualitativement et quantitativement différentes de celles de leur homologue monovalent, font des événements de liaison multivalents un phénomène très attractif dans un vaste champ de domaines de la chimie et de la biologie. Ainsi ces dernières années, la chimie supramoléculaire^{1, 2}, notamment, s'est particulièrement intéressée à tirer profit des interactions multivalentes. En effet, la multivalence offre une voie d'auto-assemblage efficace, directionnelle et sélective, qui confère un comportement thermodynamique et cinétique unique aux complexes supramoléculaires. Contrairement à la plupart des interactions multivalentes en biochimie, les interactions multivalentes supramoléculaires sont idéales pour obtenir une compréhension fondamentale et quantitative de la multivalence car le nombre d'interactions est simplifié.

Bien que le concept de multivalence soit utilisé en chimie supramoléculaire depuis de nombreuses années, ce n'est que récemment que les chimistes se sont intéressés aux avantages qu'ils pourraient extraire des interactions multivalentes pour des applications en machinerie moléculaire³ ou en nanofabrication⁴⁻⁶ notamment. En effet, la multivalence constitue un procédé d'auto assemblage qui combine toutes les caractéristiques attractives de ce dernier, *i.e.* la réversibilité, l'auto-tri, l'auto correction, ainsi que la possibilité d'atteindre une stabilité d'auto-assemblage thermodynamique et/ou cinétique aux concentrations nano ou même picomolaires¹.

I.1. Interaction hôte-invité : études en solution

Dans la littérature, on trouve de nombreux motifs multivalents supramoléculaires qui ont été largement employés afin de mettre en avant l'intérêt de la multivalence pour des études d'interaction en solution. Notamment, J. Rao et G. M. Whitesides ont intensivement étudié l'interaction multivalente entre la vancomycine multivalente et les motifs multivalents D-alanine-D-alanine (DADA) ou D-alanine-lactate (DALac)⁷⁻¹¹. La vancomycine est un membre

important du groupe des antibiotiques glycopeptide qui sont actifs contre la bactérie gram-positive. L'utilisation des interactions multiples via des dimères de vancomycine permet d'obtenir des propriétés différentes de reconnaissance envers les bactéries. En effet, certaines bactéries sont devenues résistantes à la vancomycine monomérique par le remplacement des séquences DADA carboxyles terminales sur la paroi des cellules - un des principaux points d'accroche de la vancomycine - par le motif DALac. Les auteurs ont ainsi montré l'importante amélioration de l'affinité entre les partenaires multivalents par rapport à leurs homologues monovalents envers les motifs DADA et DALac.

Un autre motif intensivement utilisé est la molécule β -cyclodextrine (notée β -CD), qui est probablement un des plus anciens motifs et des plus consciencieusement utilisés pour l'étude de systèmes multivalents. La β -CD (Figure 1) est une molécule qui offre une cavité hôte hydrophobe sélective et affine aux substrats hydrophobes. L'utilisation de multimères de β -CD a permis d'accroître considérablement cette sélectivité et cette affinité ¹².

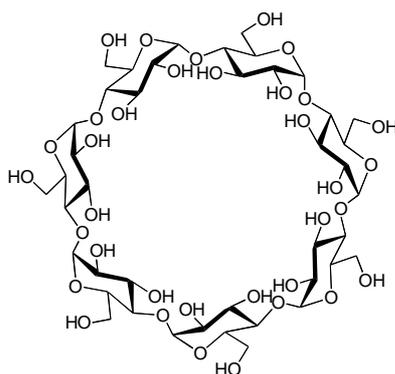


Figure 1 : Structure de la β -cyclodextrine.

Des effets similaires ont été observés concernant l'étude entre des dimères de β -CD, présentant une propriété de chélation de métal, et des molécules invitées chargées ¹³ ou contenant un métal ¹⁴. Les pseudorotaxanes ¹⁵⁻¹⁷, la famille des oligomères linéaires, les porphyrines de Zinc ¹⁸, pour ne citer qu'eux sont encore d'autres types de motifs multivalents supramoléculaires qui ont intensivement servis de modèle aux études de la multivalence en solution.

I.2. Interaction hôte-invité : études aux interfaces

Bien qu'une quantité importante d'étude de la multivalence en chimie supramoléculaire ait été faite en solution, des études de ces interactions multivalentes à l'interface solide – liquide commencent de plus en plus à se développer. Notamment des chimistes, comme J. Hüsken, ont commencé à voir un certain nombre d'avantages aux études mécanistiques des interactions multivalentes aux surfaces par rapport aux systèmes modèles en solution. En effet, les substrats métalliques, tel que l'or, permettent par exemple des études en résonance plasmonique de surface ou encore en spectroscopie de résonance plasmonique de surface, donnant alors accès à la caractérisation du comportement cinétique de l'interaction multivalente. Un autre avantage intéressant de travailler sur une surface est que la structure, la densité ainsi que l'environnement des fonctions immobilisées en monocouches sont connues. De ce fait, ces dernières caractéristiques peuvent être facilement contrôlables et modifiables, permettant, alors, des études systématiques concernant la multivalence, la concentration effective et l'influence des fonctions compétitives sur la vitesse de dissociation des complexes multivalents. Dans la littérature pour ce type d'études, une foule d'exemples importants sont recensés dans le domaine de la biochimie. Par contre, il existe très peu d'études effectuées sur les interactions multivalentes supramoléculaires aux interfaces. Seuls deux des motifs cités précédemment, la vancomycine^{8, 19} et la β -cyclodextrine (développé ci après)^{20, 21}, ont fait l'objet de quelques recherches. Dans les deux cas, les résultats ont montré que l'immobilisation des entités sur une surface permet d'améliorer fortement l'affinité de l'interaction multivalente par rapport aux études similaires effectuées en solution. Il semble alors qu'une augmentation relative de la concentration effective des entités fonctionnelles à la surface en soit responsable (cf Chapitre I); et que cet accroissement de l'affinité soit essentiellement dû à la diminution de la vitesse de dissociation du complexe formé.

Pour notre étude, nous avons exploité les interactions hôte-invité multivalentes aux surfaces en utilisant des polymères de chitosane fonctionnalisés par des motifs β -CD ou d'adamantane dans le but de former un auto-assemblage multicouche supramoléculaire.

II. Les films multicouches auto-assemblés de biopolymères

II.1. Introduction

Les hydrogels présentant des modifications de leur comportement (gonflement – dégonflement) en réponse à de faibles variations de la température de l'environnement, du pH, de la force ionique ou à des molécules spécifiques, parmi d'autres stimuli, ont attirés une attention considérable ces dernières années. En effet, ce type de matériaux présente de nombreuses applications potentielles dans les domaines de la biochimie et du biomédical. Très récemment, il y a eu un intérêt dans le développement de gels actifs aux stimuli présentant une dimension confinée tels que les films (de substrat) supportés. En réduisant les transitions de volume de phase de ces systèmes à de plus faibles dimensions, il est possible de créer des surfaces actives aux stimuli, sur lesquelles des interactions avec des molécules biologiques ou des tissus pourraient être modulées. Il existe de nombreuses méthodes qui permettent d'élaborer des films minces structurés et fonctionnels, et parmi elles, l'auto-assemblage électrostatique couche par couche (LbL). Cette méthode développée par R. Iler en 1966²² s'est imposée comme une technique efficace, versatile et très simple de formation de films multicouche. Ce processus, basé sur l'adsorption alternée de particules de charges opposées, a été adapté par G. Decher aux polyélectrolytes²³. Elle a également été étendue avec succès à d'autres forces attractives telles que les liaisons hydrogène^{24, 25}, les interactions de type transfert de charge^{26, 27}, la reconnaissance de molécules spécifiques²⁸⁻³¹ (interaction sucre-lectine ou biotine-avidine) ou les interactions hôte-invité³².

Dans le cadre de nos travaux³³, nous nous sommes intéressés à la possibilité d'assemblage entre deux polymères de chitosane, l'un présentant des cavités β -cyclodextrine (noté chit-CD) et l'autre des fonctions adamantane (chit-AD), en mettant à profit des interactions hôte-invité comme technique d'auto-assemblage couche par couche. Nous nous sommes ainsi servis de l'hydrophobie des entités adamantane qui vont complexer, en milieu aqueux, les cavités CDs hydrophobes. Compte tenu de son comportement de gel³⁴ en milieu liquide, ainsi que de ses possibilités de réponse aux stimuli (gonflement-dégonflement en fonction de la force ionique du milieu), cet assemblage aux interfaces semblait prometteur.

II.2. Etat de l'art

II.2.1 Les interactions hôte-invité de la β -cyclodextrine aux interfaces

La cavité de la cyclodextrine est connue pour l'encapsulation de molécules hydrophobes qui permet de protéger ces dernières contre l'oxydation et d'augmenter leur solubilité en milieu aqueux. Elle est donc couramment utilisée - comme on l'a vue précédemment en solution principalement, et de plus en plus pour des analyses en surface - pour des études d'interactions hôtes et invités. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'analyse des interactions multivalentes effectuées à l'interface solide-liquide mettant en jeu des interactions hôte-invité. On ne trouve, alors, que peu d'exemples dans la littérature. Ravoo *et al.* ont étudié l'interaction multivalente entre des vésicules de cyclodextrines et des polymères de poly(acide isobutylmaléique) modifiés par des groupes adamantyle ou tert-butylphényle²⁰. Huskens *et al.* ont également intensivement étudié les interactions multivalentes entre des SAMs de β -cyclodextrine (CD SAMs) et des molécules modifiées par de multiples fonctions invités hydrophobes³⁵, ferrocène, adamantane.... Récemment, ils ont réalisé des assemblages multicouches de dendrimères d'adamantane (AD) et de nanoparticules d'or fonctionnalisées par des cyclodextrines³⁶. Des assemblages multicouches avec des molécules individuelles ont également été élaborés et étudiés par microbalance à cristal de quartz (QCM) avec des dimères de cyclodextrine et des poly(allylamines) modifiées par des ferrocènes³².

II.2.2 Les films multicouches « hôte - invité » de polymère

Concernant les films multicouches hôte-invité de polymères, dans la littérature, peu de publications des auteurs cités précédemment s'intéressent à l'adsorption de polymère d'adamantane sur une surface modifiée par des β -cyclodextrines. Ils observent que la couche de polymère adsorbée via les interactions hôte - invité l'est de manière irréversible. Les auteurs suggèrent que la liaison est donc forte et que tous ou presque les sites "invité" AD du polymère sont engagés dans une interaction multivalente avec la surface de β -CD. Cette hypothèse a été vérifiée par la non adsorption de β -CD libre en solution et de nanoparticules fonctionnalisées par des β -CD sur la couche de polymère AD adsorbée³⁷.

Bien que quelques exemples de films multicouches basés sur des complexes d'inclusion et élaborés à partir de molécules seules ou de nanoparticules fonctionnalisées (décrit ci-dessus)

sont relatés dans la littérature ^{32, 36, 38}, ce travail représente à notre connaissance le premier exemple d'un assemblage de films multicouches actifs aux stimuli fondé sur des interactions hôte et invité entre des polymères uniquement.

II.3. Les molécules d'étude

Deux types de molécules ont été utilisées lors de ces études : des polymères de chitosanes modifiés par des entités soit CD soit AD. Des molécules d'adamantane thiol et d'éthane thiol ont permis la fonctionnalisation de la surface d'or, point d'ancrage de notre assemblage.

II.3.1 Les polymères de chitosane

II.3.1.1. Origine

La chitine, poly(β -(1 \rightarrow 4)-N-acetyl-D-glucosamine), est un polysaccharide naturel d'une importance majeure dans les organismes vivants. Elle a été le premier polysaccharide identifié en 1884 (Figure 2). Ce biopolymère est synthétisé par un nombre conséquent d'organismes vivants, ce qui en fait le polymère le plus abondant après la cellulose.

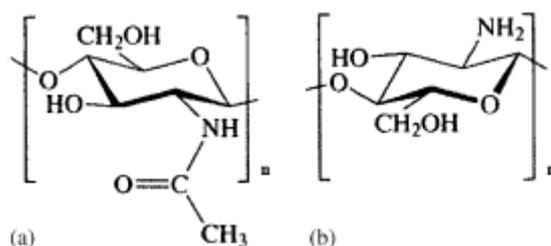


Figure 2 : Structure chimique des unités répétées de (a) la chitine poly(N-acétyl-β-D-glucosamine) et (b) du chitosane poly(D-glucosamine).

Quand le degré de désacétylation de la chitine atteint 50% (dépendant de l'origine du polymère), elle devient soluble en milieu aqueux acide et on l'appelle alors le chitosane. La solubilisation a lieu par protonation de la fonction $-NH_2$ sur la position C-2 de l'unité répétée D-glucosamine, par laquelle le polysaccharide est converti en un polyélectrolyte en milieu acide. Le chitosane est le seul polymère cationique pseudonaturel. Il trouve de nombreuses applications qui découlent de ses caractéristiques uniques : flocculant pour le recouvrement des

protéines, dépollution, etc... Grâce à sa solubilité en milieu aqueux, le chitosane est largement utilisé pour différentes applications en tant que solution, gel, film ou fibre.

II.3.1.2. Les polymères de chitosane modifié utilisés : chit-CD et chit-AD

Pour notre étude, les polymères de chitosane ont été fonctionnalisés par des motifs adamantane et β -cyclodextrine par le Pr Rachel Auzély (CERMAV, Grenoble). Les chitosanes utilisées pour la synthèse, sont des molécules commerciales de Pronova (Norway). Ils présentent un poids moléculaire de 195 000 g/mol avec un degré d’N-acétylation de 0,12. Ils sont purifiés par solubilisation dans une solution aqueuse d’acide acétique puis par une re-précipitation dans une solution d’hydroxyde de sodium jusqu’à pH neutre. Le polysaccharide est finalement lavé avec de l’eau distillée puis de l’éthanol et est séché. La β -cyclodextrine a été aimablement fournie par le groupe Roquette Frères (Lestrem, France). La synthèse complète des chitosanes greffés par des motifs cyclodextrine (degré moyen de substitution (DS) = 0,07 ; vérifié par spectroscopie RMN) et adamantane (DS = 0,05) et a été décrite précédemment^{39, 40}. La Figure 3 montre les structures et les représentations schématiques, utilisées dans cette étude, des deux polymères de chitosane modifiés obtenus.

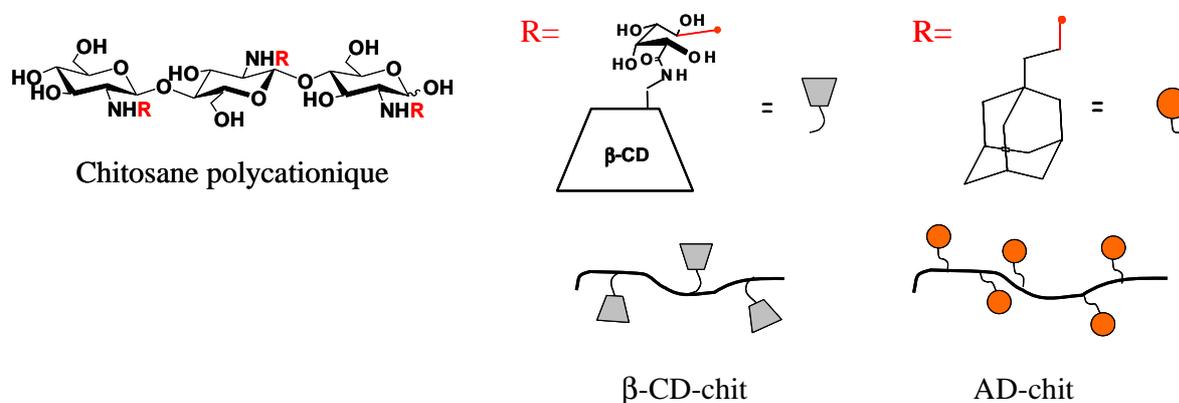


Figure 3 : Structures et représentations schématiques des deux polymères de chitosane modifiés, chit-CD et chit-AD.

II.3.1.3. Leurs propriétés en milieu aqueux

Des études du comportement rhéologique des solutions polymériques ont été précédemment effectuées au CERMAV par R. Auzély via l’utilisation d’un rhéomètre AR 1000⁴¹. Ces études ont montré que le mélange des deux polymères de chitosane, chit-CD et chit-AD,

conduit à une grande augmentation de la viscosité causée par la complexation spécifique par inclusion des entités CD et AD⁴⁰. La stabilité de ces points réversibles de réticulation est liée à la constante de stabilité du complexe CD-AD formé. L'auto-assemblage de ces polymères modifiés est spécifique (Figure 4).

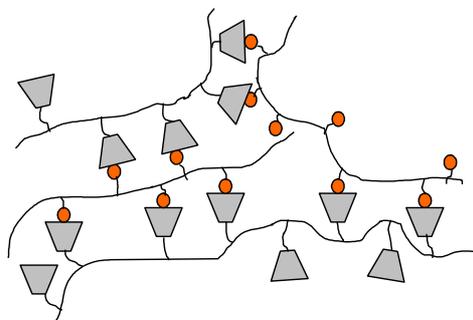


Figure 4 : Représentation schématique de la réticulation des deux polymères de chitosane en milieu aqueux.

Les premiers résultats ont indiqué un comportement viscoélastique qui se caractérise par une grande augmentation du module élastique sur une large gamme de fréquence. Ce système de comportement de gel est réversible et le retour à une solution visqueuse s'effectue en présence d'un excès des molécules CD ou AD libres.

II.3.2 Synthèse de l'adamantane acetamidoethanethiol (AD-SH)

La synthèse a été effectuée par le Pr Rachel Auzély du CERMAV (Grenoble). Elle est relatée ici à titre d'information.

A une solution d'acide acétique d'adamantane (0,5 g ; 2,57 mmol) dans du DMF sec (15 mL), de l'hydroxybenzotriazole (0,35 g ; 2,57 mmol), du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (0,64 g ; 3,35 mmol) dissout dans du DMF (5mL) avec la présence de N-éthyl-diisopropylamine (1,05 mL ; 6,18 mmol) et du chlorhydrate de cystéamine sont successivement ajoutés sous azote. Après 14 h d'agitation sous azote et à température ambiante, le solvant est évaporé sous vide. L'huile résiduelle est ensuite dissoute dans du diéthyléther (200 mL) et la phase organique résultante est lavée avec H₂O (2×30 mL et 1×20 mL) et séchée (Na₂SO₄). Le solvant est alors évaporé sous vide et on obtient une poudre blanche de AD-SH (0,38 g ; 1,50 mmol). L'étude du spectre obtenu lors d'une étude de RMN C13 confirme la bonne composition et structure de la molécule AD-SH (Figure 5).

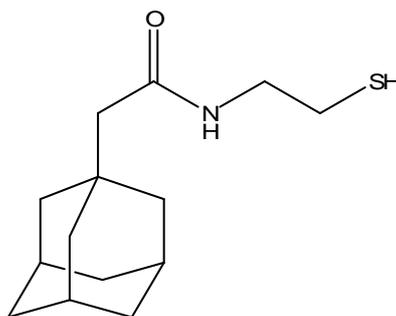


Figure 5 : Structure chimique de la molécule d'adamantane acetamidoéthanethiol notée AD-SH.

III. L'auto assemblage couche par couche : étude en QCM-D

L'ensemble des études effectuées dans cette partie a été réalisé en mode statique (mode « batch ») à 24°C. Le tampon d'étude est le solvant usuel du chitosane : 0,3 M CH₃COOH / 0,03 M CH₃COONa, il sera noté solvant A. Ce solvant se trouve être le plus approprié à l'éluion du chitosane, empêchant les phénomènes d'agrégation^{39, 40, 42}. Du sel est ajouté afin d'écranter les répulsions électrostatiques entre les longues chaînes de chitosane chargées positivement. Un temps minimum de 12h, à température ambiante, est nécessaire afin de permettre une dilution correcte des polysaccharides greffés par les entités CD et AD.

La première étape de l'assemblage est la fonctionnalisation de la surface d'or par une première couche de groupements adamantyle. Cette première couche se fait par un couplage covalent thiol-or, des espèces adamantane acetamidoethanethiol (AD-SH) sur un cristal de quartz recouvert d'une couche d'or. Une fois le cristal de quartz recouvert d'or fonctionnalisé, l'auto-assemblage des polymères de chitosane est suivi couche par couche par une étude en QCM-D. L'impact de la composition de cette surface d'ancrage sur l'assemblage a été étudié en utilisant différents taux de greffage.

III.1. La fonctionnalisation de la surface, base de l'assemblage

La surface d'or, avant fonctionnalisation, est nettoyée et activée selon le protocole de nettoyage suivant⁴³ : après une exposition de 10 min à l'UV-Ozone, le cristal de quartz recouvert d'une couche d'or est immergé dans une solution 1:1:6 (v/v/v) de NH₃ (25%), d'H₂O₂ (30%) et d'eau milliQ et le tout est chauffé à 70°C pendant 10 min. La surface est, ensuite, rincée à l'eau milliQ et séchée sous azote, puis plongée dans la solution de greffage.

Les cristaux de quartz recouverts d'une couche d'or ont été fonctionnalisés à trois densités différentes en entités adamantane. Les SAMs sont donc préparées en diluant les molécules AD-SH avec du mercapto éthanol (Et-SH) aux ratios molaires désirés 5, 25 et 50 % en entités adamantane. Les cristaux de quartz sont plongés dans une solution éthanolique avec le mélange de thiol souhaité pour 18 heures à température ambiante. Les solutions de thiols sont préparées avec des solutions mères de 1 mM en Et-SH et en AD-SH. Bien que la fraction molaire d'AD-SH adsorbée sur la surface soit différente de celle en solution, la fraction molaire surfacique est supposée augmenter avec celle volumique et ce sur toute la gamme de concentration⁴⁴. Ainsi, pour simplifier la lecture du chapitre, les densités en SAM adamantane mentionnée sont les concentrations en AD-SH dans les solutions de greffage. Le quartz est, finalement, rincé à l'éthanol absolu, séché sous flux d'azote et monté dans la chambre de mesure de la QCM-D.

III.2. Résultats expérimentaux

III.2.1 La formation de l'assemblage

Les études en QCM-D commencent par l'injection, sur les SAMs d'adamantane, du solvant A (tampon de « course ») jusqu'à la stabilisation du signal. Cela prend en général une dizaine de minute. Il semble, en effet que la mise en contact de la surface avec la solution aqueuse du solvant induit une légère modification de la surface (hydratation de la couche). Ensuite, la formation de l'assemblage s'effectue par l'injection de manière alternative des solutions de polymères de chit-CD, de chit-AD, de chit-CD, etc... jusqu'à ce que l'un des deux polymères n'adhèrent plus sur la surface. Plusieurs injections des solutions de polymères sont effectuées afin de surmonter les phénomènes de déplétion. Les polymères sont injectés à des concentrations croissantes (de 0.05 à 1 g/L) afin de s'assurer de la saturation de la surface initiale et de chacune des couches successives. Après chaque injection de polymères, la surface est systématiquement rincée avec le solvant A, afin de vérifier la stabilité de la couche formée et d'estimer la masse adsorbée.

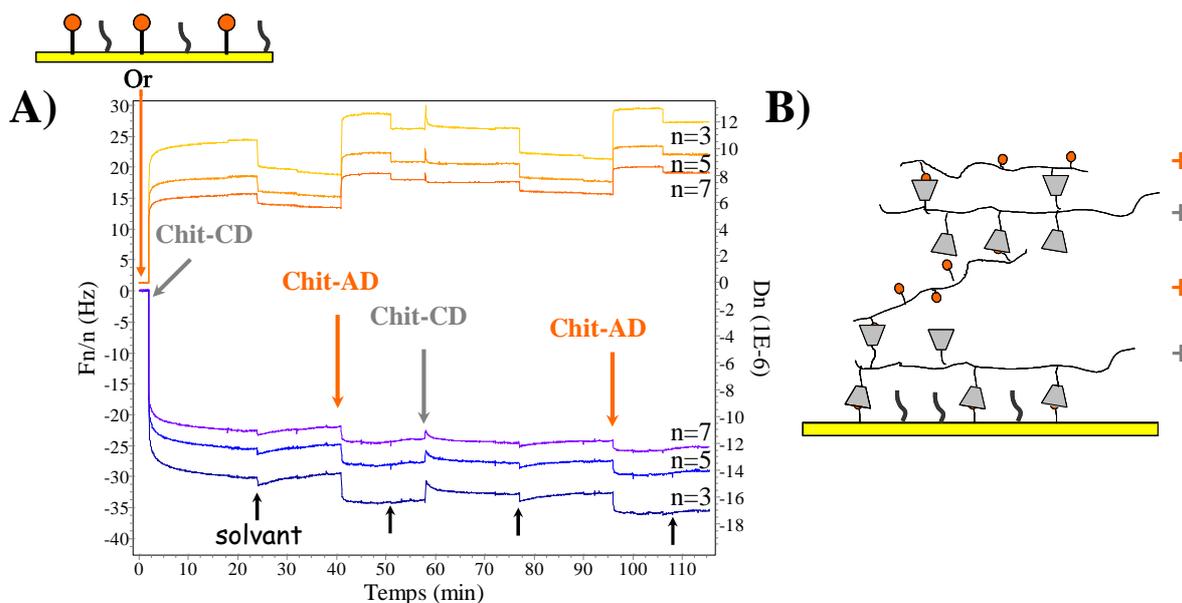


Figure 6 : A) Réponse typique en QCM-D, variation des fréquences normalisées $\Delta f_n/n$ (bleu-violet) et des dissipations D_n (orange) pour les trois harmoniques ($n=3, 5$ et 7) enregistrée durant la construction multicouche chit-CD/chit-AD sur une SAM fonctionnalisée par un mélange 50-50 en adamantane thiol et en mercapto éthanol. B) Schéma représentant la formation de l'auto-assemblage multicouche des polymères chit-CD et chit-AD correspondant à la figure A).

On suit ainsi en QCM-D, grâce à la variation de la fréquence et de la dissipation d'énergie, pour la fréquence de résonance du quartz et ses trois harmoniques ($n=3, 5$ et 7), la formation de l'assemblage couche par couche. La Figure 6 montre un exemple des graphes que l'on obtient. L'adsorption de la première couche de chit-CD conduit pour les trois différentes densités en surface en AD-SH à une grande diminution de $\Delta f_n/n$ et une forte augmentation de D_n . Ces grandes variations de signal, ainsi que l'absence de superposition des réponses de $\Delta f_n/n$ et D_n pour les trois harmoniques indiquent la formation de couches visqueuses sur les trois surfaces. Les variations de masse, $\Delta\Gamma$, pour chaque adsorption et pour chaque densité en surface ont été obtenues en utilisant le modèle viscoélastique de Voinova⁴⁵.

Le Tableau 1 présente l'ensemble des données – la variation de la masse ($\Delta\Gamma$), la valeur de la viscosité de la couche adsorbée (η) et la valeur du module d'élasticité de la couche formée (μ) – obtenues en modélisant les données expérimentales correspondant à l'adsorption des trois premières couches de polymères de chitosane modifiés sur les trois SAMs de densités différentes en adamantane.

		Ratio molaire d'AdSH dans la solution de greffage								
		50 %			25 %			5 %		
Couche	Polymère	η (kg.ms ⁻¹)	μ (Pa)	$\Delta\Gamma$ (ng.cm ⁻²)	η (kg.ms ⁻¹)	μ (Pa)	$\Delta\Gamma$ (ng.cm ⁻²)	η (kg.ms ⁻¹)	μ (Pa)	$\Delta\Gamma$ (ng.cm ⁻²)
1	Chit-CD	1.38×10 ⁻³	5.73×10 ⁻³	1368	1.34×10 ⁻³	5.59×10 ⁻³	907	1.34×10 ⁻³	5.59×10 ⁻³	951
2	Chit-AD	1.30×10 ⁻³	4.98×10 ⁻³	530	1.31×10 ⁻³	5.06×10 ⁻³	657	1.31×10 ⁻³	5.06×10 ⁻³	946
3	Chit-CD	1.36×10 ⁻³	5.35×10 ⁻³	-288	1.25×10 ⁻³	4.44×10 ⁻³	437	1.25×10 ⁻³	4.44×10 ⁻³	85

Tableau 1 : Résumé des différentes valeurs obtenues en modélisation les données expérimentales (modèle de Voinova) correspondant à l'adsorption de trois couches de polymères de chitosane modifiés sur les trois SAMs présentant 5, 25 et 50% d'entités adamantane.

Les valeurs de masse obtenues sur les trois SAMs contenant les entités AD, après l'adsorption du chit-CD et le rinçage de la surface avec le solvant, indiquent la formation d'une couche de chit-CD. De plus, les valeurs de la viscosité de la couche de chit-CD obtenues sont bien en accord avec la formation d'une couche d'hydrogel (Tableau 1) que l'on trouve dans la littérature ⁴⁶. La couche de chit-CD formée sur les trois SAMs s'avère de plus être bien stable après plusieurs rinçages au solvant.

III.2.2 Validation de l'interaction hôte-invité comme base de l'assemblage

Avant de continuer la discussion sur les résultats obtenus, nous avons, au préalable, vérifié que l'adhésion des polymères de chitosane observée est bien due à la formation de complexe d'inclusion entre les entités adamantane et β -cyclodextrine. Deux tests ont alors été effectués, afin de vérifier la spécificité de l'adsorption des polymères chit-CD sur la SAM d'adamantane.

- L'adhésion non spécifique

Pour cela nous avons fonctionnalisé la surface d'étude d'or par une monocouche dense et compacte de mercapto éthanol, c'est-à-dire selon notre nomenclature à 0 % en adamantane. On forme alors une surface hydrophile. Une adhésion non spécifique des polymères de chitosane CD non négligeable de 460 ng.cm⁻² sur la surface a été observée.

- Compétition sur la première couche

Dans un second temps, des expériences de compétition avec une solution à 5 mM en β -cyclodextrine libre ont été menées sur les différentes couches de chit-CD formées sur les trois

SAMs d'adamantane 5, 25 et 50%. Les couches de chit-CD ont été formées par adsorption d'une solution de polymère de 1 g/L ou 2 g/L (surface à 50 % en ADSH) sur les différentes SAMs. L'injection, ensuite, d'une solution de β -cyclodextrine libre concentrée sur les trois surfaces, crée une compétition entre les CD libres en solution et les entités CD greffées sur le polymère adsorbé sur les surfaces. Sur les trois surfaces, seule une désorption partielle de la couche de chit-CD est observée. Une dernière étape de rinçage avec le solvant est effectuée. Les masses restantes de chit-CD sur les différentes SAMs en fonction des taux d'adamantane des SAMs sont représentées sur la Figure 7.

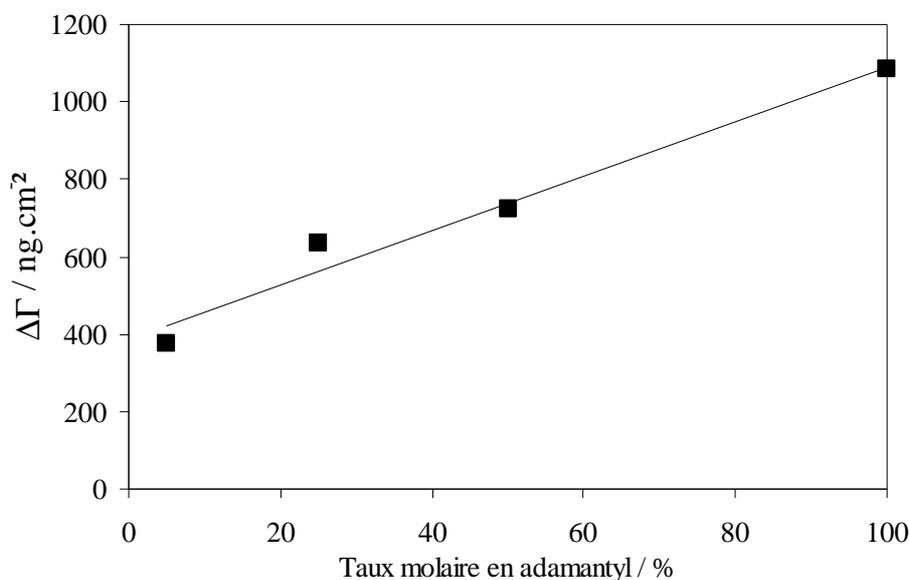


Figure 7 : Masses de chit-CD restantes après l'injection d'une solution de 5 mM en β -CD libre et le rinçage par le solvant, sur des couches de chit-CD formées par l'adsorption de 1 g/L ou 2 g/L (50 %) de solution de polymère sur quatre différentes SAMs (5, 25, 50 et 100 %)

La Figure 7 montre que l'injection d'une forte concentration en β -CD libre n'agit que faiblement comme compétiteur sur les différentes surfaces AD/chit-CD. Cette absence de dissociation des polymères de chit-CD traduit la spécificité de l'interaction entre les entités adamantane invités et les cavités cyclodextrines hôtes.

III.3. Discussion

III.3.1 Assemblage basé sur des interactions hôte-invité

Les résultats obtenus grâce aux deux derniers tests, suggèrent que deux phénomènes ont lieu durant le processus d'adsorption des polymères de chit-CD. Le premier est la présence incontestable d'une adsorption non spécifique des polymères de chitosane sur la surface. Le second phénomène, en plus de cette adsorption non spécifique, met en évidence que la partie des polymères adsorbés est fortement ancrée sur la surface recouverte d'entités adamantane via des interactions multivalentes spécifiques hôte-invité. En effet, la présentation multiple des sites hôtes offerts par le polymère induit vraisemblablement une plus haute affinité à la surface par comparaison aux molécules homologues monovalentes de β -CD^{12, 47, 48}. Cela semble expliquer la masse restante sur la surface après rinçage avec la solution de β -CD- qui est supérieure à celle de l'interaction non spécifique. De plus, l'augmentation de cette masse avec le taux molaire en entités adamantane de la SAM et spécialement pour les SAMs présentant de forte concentration en AD-SH est en accord avec la présence d'interactions multivalentes hôte-invité.

Ces résultats confirment ainsi que l'assemblage est principalement basé sur des interactions entre des sites d'inclusion de la cyclodextrine des polymères chit-CD et des entités adamantane invité immobilisées sur la surface.

III.3.2 Formation de l'assemblage

Lorsque l'on compare les masses surfaciques des polymères de chit-CD adsorbés sur les trois différentes SAMs (Tableau 1), on obtient des résultats similaires. Il semble alors, de prime abord, que le taux initial d'entités adamantane greffées sur la surface n'a aucune incidence sur la formation de la première couche de l'assemblage. Cette observation peut s'expliquer par le fait qu'il y ait suffisamment, dans tous les cas, de sites d'ancrage hydrophobes adamantane offerts par la surface pour former la première couche via des interactions hôte-invité³⁷.

Comme mentionné précédemment, la difficulté dans l'élaboration de l'assemblage multicouche basé sur des interactions hôte-invité est liée à la disponibilité des entités hôtes ou invités, couplée au problème de répulsion de charges entre les polymères. Nos résultats montrent que sur la première couche de chit-CD, une seconde couche de chit-AD peut être adsorbée, passant ainsi outre la répulsion électrostatique entre les polymères de chitosane

chargés positivement (Tableau 1). Ces résultats confirment que l'assemblage supramoléculaire est basé sur des interactions hôtes – invités entre les polymères de chit-CD et de chit-AD.

Contrairement aux résultats obtenus pour la première couche, les masses des secondes couches adsorbées de chit-AD sont fonction de la fraction molaire initiale en adamantane de la SAM. Plus il y a d'entités adamantane sur la surface, moins il y a de polymères chit-AD qui adhèrent sur la première couche de chit-CD (Tableau 1). Puisque la couche de chit-AD est séparée de la SAM par la couche de chit-CD, ce résultat conduit à la conclusion que les premières couches ancrées sur les trois différentes SAMs ne sont pas identiques et présenteraient des organisations distinctes. Les différences de masse obtenues pour les secondes couches adsorbées peuvent être expliquées par la disponibilité variable des sites hôtes offerts par la première couche de polymère chit-CD (Figure 8).

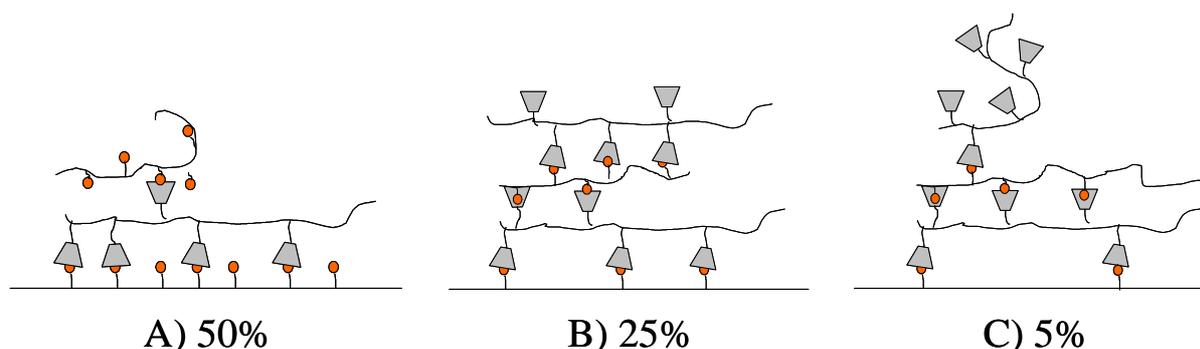


Figure 8 : Schéma représentant l'influence des densités en adamantane des trois différentes SAMs sur la croissance de l'auto-assemblage : A) haut, B) moyen et C) faible taux molaire exhibés par la SAM.

Les polymères de chit-CD semblent adapter leur conformation à la densité en adamantane présente sur la SAM ; une faible proportion de sites hôte du polymère chit-CD est engagée sur une surface diluée en adamantane, signifiant qu'une large proportion de sites est alors encore disponible pour d'autre complexation, *i.e.* pour l'ancrage des entités adamantane de la seconde couche. (Figure 8(C)). Par comparaison, sur une surface à haute densité en AD-SH, le contraire est observé. Ainsi, la majorité des sites d'inclusion CD de la première couche de polymère hôte sont engagés dans la complexation de la surface, laissant alors seulement une quantité relativement faible de sites libres pour la complexation de la seconde couche de polymère chit-AD (Figure 8(A)).

L'adhésion du polymère de chit-CD, qui forme la troisième couche, corrobore notre hypothèse sur le rôle majeur joué par la proportion des sites hôte ou invité disponibles pour

l'élaboration de la multicouche. Sur les deux couches (chit-CD/chit-AD) formées sur une surface fonctionnalisée à 50%, le polymère de chit-CD agit comme un compétiteur. Au lieu de former une troisième couche, le polymère de chit-CD conduit à la désorption partielle ($\sim 288 \text{ ng.cm}^{-2}$) de la seconde couche de chit-AD (Tableau 1). Cette observation peut être attribuée à la faible quantité de complexes d'inclusion engagés dans l'adhésion entre la première et la seconde couche de polymères (cf Figure 8).

De plus, la même déposition alternative est réalisée sur une surface fonctionnalisée à 5% et elle conduit cette fois, non pas à la désorption de la seconde couche comme précédemment, mais à la faible adsorption de la troisième couche, confirmant la stabilité de la liaison des deux couches de polymères précédentes. En effet, sur une SAM greffée à 5% en adamantane, le chit-CD qui constitue la première couche n'est pas immobilisée sur la surface par une grande quantité de complexes d'inclusion. La plupart des cavités cyclodextrine va alors être engagée dans la complexation de la seconde couche de chit-AD. Cette seconde couche ne présente alors plus suffisamment d'entité adamantane libre pour une complexation supplémentaire et donc pour la formation d'une troisième couche de chit-CD.

L'ensemble de ces résultats indique qu'il existerait un taux molaire optimum d'entité adamantane à greffer sur la surface, taux qui permettrait la meilleure élaboration de l'assemblage multicouche. Cette étude semble montrer que la valeur optimale est proche de 25%. En effet, pour cette surface, la complexation des sites entre chaque couche est bien distribuée, permettant la meilleure adsorption et formation d'une troisième couche (Tableau 1).

III.4. La variation de la force ionique

Suite à ces études et aux comportements des polymères, chargés positivement, observés en solution (gonflement/dégonflement des gels), nous avons testé l'effet de l'augmentation de la force ionique sur les assemblages trois couches construits sur les surfaces à 5% et 25% en adamantane (Figure 9).

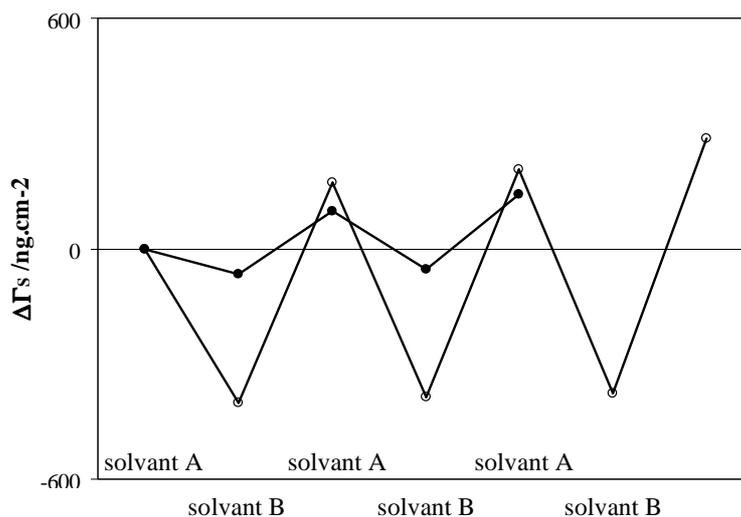


Figure 9 : Variation de la masse $\Delta\Gamma_s$ des assemblages trois couches construit sur les SAMs de densité 5% (○) et 25% (●) en adamantane lorsque l'on expose des solvants de différentes forces ioniques.

Nous avons alors injecté alternativement sur les deux films multicouches le solvant A et un solvant B, composé de 0,3 M AcOH et de 0,1 M AcOONa, qui présente une force ionique plus forte. Comme représenté sur le Tableau 2 et sur la Figure 9, on observe une diminution du $\Delta\Gamma_s$ lorsque l'on passe du solvant A au solvant B. Ces variations de masse du film indique clairement la capacité de gonflement/dégonflement des multicouches (Tableau 2 et Tableau 3).

	$\Delta\Gamma_s$ (ng.cm ⁻²)	
	Surface à 25% en adamantane	Surface à 5% en adamantane
Solvant A	0	0
Solvant B	-403	-67
Solvant A	173	98
Solvant B	-385	-53
Solvant A	208	141
Solvant B	-584	
Solvant A	662	

Tableau 2 : Variation de masse $\Delta\Gamma_s$ des assemblage trois couches construits sur les SAM fonctionnalisées à 5 et 25% en adamantane, selon l'exposition aux solvants A et B de différentes forces ioniques. $\Delta\Gamma_s$ est la différence de masse entre l'assemblage pour chaque exposition aux solvants et l'assemblage initial dans le solvant A.

Comme le montre les résultats du Tableau 2, cette capacité apparaît être conditionnée par le taux molaire surfacique en entités adamantane présentes sur la SAM. En effet, la comparaison des deux densités surfaciques montrent une capacité de gonflement-dégonflement beaucoup plus importante pour la surface à 25% en entités adamantane qui, comme nous venons de le voir, permet la formation d'un meilleur assemblage multicouche. Il semble alors que la seule différence entre les deux surfaces, qui pourrait être responsable de cette différence de comportement, soit le nombre de paires de complexation hôte-invité des différentes couches de l'assemblage (Figure 8).

	η (kg.ms ⁻¹)	μ (Pa)	$\Delta\Gamma$ (ng.cm ⁻²)
Solvant A	1.42×10^{-3}	6.72×10^{-3}	/
Solvant B	1.846×10^{-3}	1.31×10^{-3}	-403
Solvant A	1.42×10^{-3}	6.89×10^{-3}	576
Solvant B	1.847×10^{-3}	1.26×10^{-3}	-557
Solvant A	1.42×10^{-3}	6.90×10^{-3}	592
Solvant B	1.852×10^{-3}	1.25×10^{-3}	-584
Solvant A	1.43×10^{-3}	6.84×10^{-3}	662

Tableau 3 : Variation des paramètres caractéristiques de la multicouche, formée sur une SAM à 5% en adamantane, en fonction de la force ionique du solvant ($\Delta\Gamma$ la variation de masse surfacique, μ le module élastique, η la viscosité de la couche adsorbée et Γ la masse de l'assemblage complet (3 couches))

La diminution de la masse observée dans le solvant salin B suggère la compression des films, qui se produit par la libération de l'eau emprisonnée dans la multicouche ⁴⁹. De plus, la viscosité de la multicouche est plus élevée dans le solvant salin B, $\sim 1.8 \times 10^{-3}$ kg.m⁻¹.s⁻¹, que dans le solvant A où elle est environ égale à 1.4×10^{-3} kg.m⁻¹.s⁻¹ (Tableau 3). Ce résultat est en accord avec le dégonflement d'un film hydraté ⁴⁶. Les solvants présentant des forces ioniques plus hautes, contribuent certainement à diminuer l'effet répulsif électrostatique entre les couches, en écrantant les charges positives des polymères. Par ailleurs, l'augmentation de la force ionique comme nous l'avons fait, conduit également à une augmentation de pH. Ainsi, la fraction molaire de la forme cationique des groupements amine des polymères chit-CD et chit-AD a diminuée, diminuant également les répulsions électrostatiques entre les polymères. Les deux effets, augmentation de la force ionique et augmentation du pH, vont donc dans le même sens. Toutefois, compte tenu des conditions de solubilité restreintes du polymère chit-

AD, il ne nous a pas été possible de dissocier l'impact des deux effets par des expériences où par exemple la force ionique est diminuée tout en conservant le pH constant.

Un autre point à souligner est la bonne réversibilité de la réponse offerte par les assemblages formés sur chacune des deux surfaces (Tableau 2). Ce dernier point montre la stabilité des assemblages multicouches aux stimuli (ou stress) extérieurs. Bien que les répulsions électrostatiques entre les polymères de chitosane polycationique soient compensées par la complexation par inclusion entre les résidus respectifs d'adamantane et de cyclodextrine, elles jouent un rôle crucial dans l'auto-assemblage, et spécialement modulent son épaisseur.

IV. Conclusion du chapitre

Bien que la technique d'auto-assemblage électrostatique couche par couche (LbL) se soit imposée comme une technique versatile pour la formation de film multicouche de polymères, son utilisation se limite aux polyélectrolytes de charges opposées. Ainsi, l'utilisation d'interactions hôte-invité présenterait l'avantage d'étendre la construction de films multicouches à des polymères non chargés, voire présentant des charges électrostatiques identiques (comme c'est le cas dans notre étude). Ces interactions sont toutefois complexes à mettre en œuvre dans les assemblages supramoléculaires, car contrairement aux interactions électrostatiques, elles demandent pour avoir lieu, à ce que les deux sites complémentaires de complexation soient libres et accessibles. De ce fait, aucun exemple de films multicouches basés sur des complexes d'inclusion et faisant intervenir deux polymères n'était jusqu'à présent relatés dans la littérature.

Cette étude a ainsi permis d'établir la faisabilité de la formation d'un auto-assemblage multicouche basé sur des interactions hydrophobes hôte et invité entre deux polymères de chitosane, l'un modifiés par des entités adamantane et l'autre par des cavités β -cyclodextrine. L'assemblage est réalisé par le dépôt successif de chit-CD et de Chit-AD sur une surface présentant des groupements adamantyles. Si la stabilité de l'auto assemblage est conférée par la complexation multivalente qui a lieu à chaque étape de la construction, nos résultats révèlent que la croissance de l'assemblage est principalement gouvernée par la disponibilité des sites de complexation offerts par chacune des couches. La répartition des sites hôte et invité entre chaque couche est ainsi régie par la densité surfacique en groupement adamantyle exhibée par la surface initiale, support de l'assemblage.

Un autre point très intéressant des assemblages multicouches de chitosane présentés dans

ce chapitre est leur capacité de gonflement/dégonflement générée par la présence des charges similaires sur les deux polymères utilisés. En effet, l'assemblage décrit dans cette partie dissocie les deux types d'interactions :

- les interactions hôte-invité comme base de l'assemblage
- les interactions électrostatiques comme moyen de moduler les propriétés de l'assemblage (épaisseur)

Cette étude a donc permis de mettre en avant les possibilités prometteuses des assemblages multicouches basés sur les interactions hôte-invité. D'autres points sont encore à étudier afin de mieux comprendre et développer ces systèmes comme par exemple d'évaluer leur capacité réversible de réponse à d'autres stimuli (pH, température) ou encore de tester leur stabilité en présence de molécules hôte ou invité compétitrices.

Références chapitre IV :

- (1) Mulder, A.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2004**, *2*, 3409-3424.
- (2) Mammen, M.; Chio, S.-K.; Whitesides, G. M. *Angewandte Chemie, International Edition* **1998**, *37*, 2755-2794.
- (3) Badjic, J. D.; Balzani, V.; Credi, A.; Silvi, S.; Stoddart, J. F. *Science (Washington, DC, United States)* **2004**, *303*, 1845-1849.
- (4) Badjic, J. D.; Cantrill, S. J.; Grubbs, R. H.; Guidry, E. N.; Orenes, R.; Stoddart, J. F. *Angewandte Chemie, International Edition* **2004**, *43*, 3273-3278.
- (5) Badjic, J. D.; Balzani, V.; Credi, A.; Lowe, J. N.; Silvi, S.; Stoddart, J. F. *Chemistry--A European Journal* **2004**, *10*, 1926-1935.
- (6) Anderson, S.; Anderson, H. L.; Sanders, J. K. M. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry* **1995**, 2255-2267.
- (7) Rao, J.; Lahiri, J.; Weis, R. M.; Whitesides, G. M. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 2698-2710.
- (8) Rao, J.; Yan, L.; Lahiri, J.; Whitesides, G. M.; Weis, R. M.; Warren, H. S. *Chemistry & Biology* **1999**, *6*, 353-359.
- (9) Rao, J.; Lahiri, J.; Isaacs, L.; Weis, R. M.; Whitesides, G. M. *Science (Washington, D. C.)* **1998**, *280*, 708-711.
- (10) Rao, J.; Whitesides, G. M. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 10286-10290.
- (11) Rao, J.; Colton, I. J.; Whitesides, G. M. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 9336-9340.
- (12) Mulder, A.; Auletta, T.; Sartori, A.; Del Ciotto, S.; Casnati, A.; Ungaro, R.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 6627-6636.
- (13) West, L. C.; Wyness, O.; May, B. L.; Clements, P.; Lincoln, S. F.; Easton, C. J. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, *1*, 887-894.
- (14) Jiang, T.; Lawrence, D. S. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 1857-1858.
- (15) Badjic, J. D.; Cantrill, S. J.; Stoddart, J. F. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 2288-2289.
- (16) Balzani, V.; Clemente-leon, M.; Credi, A.; Lowe, J. N.; Badjic, J. D.; Stoddart, J. F.; Williams, D. J. *Chemistry--A European Journal* **2003**, *9*, 5348-5360.
- (17) Fyfe, M. C. T.; Lowe, J. N.; Stoddart, J. F.; Williams, D. J. *Organic Letters* **2000**, *2*, 1221-1224.
- (18) Anderson, H. L.; Anderson, S.; Sanders, J. K. M. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry* **1995**, 2231-2245.
- (19) Rao, J.; Yan, L.; Xu, B.; Whitesides, G. M. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 2629-2630.
- (20) Ravoo, B. J.; Jacquier, J.-C.; Wenz, G. *Angewandte Chemie, International Edition* **2003**, *42*, 2066-2070.
- (21) Huskens, J.; Deij, M. A.; Reinhoudt, D. N. *Angewandte Chemie, International Edition* **2002**, *41*, 4467-4471.
- (22) Iler, R. K.; Colloid, J. *Interface Sci.* **1966**, *21*, 569-594.
- (23) Decher, G.; Hong, J. D. *Berichte der Bunsen-Gesellschaft* **1991**, *95*, 1430-1434.
- (24) DeLongchamp, D. M.; Hammond, P. T. *Langmuir* **2004**, *20*, 5403-5411.
- (25) Zhang, Y.; Yang, S.; Guan, Y.; Miao, X.; Cao, W.; Xu, J. *Thin Solid Films* **2003**, *437*, 280-284.
- (26) Shimazaki, Y.; Mitsuishi, M.; Ito, S.; Yamamoto, M. *Langmuir* **1997**, *13*, 1385-1387.

- (27) Wang, X.; Naka, K.; Itoh, H.; Uemura, T.; Chujo, Y. *Macromolecules* **2003**, *36*, 533-535.
- (28) Anzai, J.-i.; Hoshi, T.; Nakamura, N. *Langmuir* **2000**, *16*, 6306-6311.
- (29) Anzai, J.-i.; Kobayashi, Y. *Langmuir* **2000**, *16*, 2851-2856.
- (30) Anzai, J.-i.; Kobayashi, Y.; Suzuki, Y.; Takeshita, H.; Chen, Q.; Osa, T.; Hoshi, T.; Du, X.-y. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **1998**, *B52*, 3-9.
- (31) Hoshi, T.; Akase, S.; Anzai, J.-i. *Langmuir* **2002**, *18*, 7024-7028.
- (32) Suzuki, I.; Egawa, Y.; Mizukawa, Y.; Hoshi, T.; Anzai, J.-i. *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)* **2002**, 164-165.
- (33) Van der Heyden, A.; Wilczewski, M.; Labbe, P.; Auzely, R. *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)* **2006**, 3220-3222.
- (34) Lecourt, T.; Sinaye, P.; Chassenieux, C.; Rinaudo, M.; Auzely-Velty, R. *Macromolecules* **2004**, *37*, 4635-4642.
- (35) Huskens, J. *Current Opinion in Chemical Biology* **2006**, *10*, 537-543.
- (36) Crespo-Biel, O.; Dordi, B.; Reinhoudt, D. N.; Huskens, J. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 7594-7600.
- (37) Crespo-Biel, O.; Peter, M.; Bruinink, C. M.; Ravoo, B. J.; Reinhoudt, D. N.; Huskens, J. *Chemistry--A European Journal* **2005**, *11*, 2426-2432.
- (38) Nijhuis, C. A.; Yu, F.; Knoll, W.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *Langmuir* **2005**, *21*, 7866-7876.
- (39) Auzely-Velty, R.; Rinaudo, M. *Macromolecules* **2001**, *34*, 3574-3580.
- (40) Auzely-Velty, R.; Rinaudo, M. *Macromolecules* **2002**, *35*, 7955-7962.
- (41) Auzely, R.; Rinaudo, M. *Macromolecular Bioscience* **2003**, *3*, 562-565.
- (42) Charlot, A.; Auzely-Velty, R.; Rinaudo, M. *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 8248-8254.
- (43) Reimhult, E.; Hooeok, F.; Kasemo, B. *Langmuir* **2003**, *19*, 1681-1691.
- (44) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chemical Reviews (Washington, DC, United States)* **2005**, *105*, 1103-1169.
- (45) Voinova, M. V.; Rodahl, M.; Jonson, M.; Kasemo, B. *Physica Scripta* **1999**, *59*, 391-396.
- (46) Asberg, P.; Bjork, P.; Hook, F.; Inganas, O. *Langmuir FIELD Full Journal Title:Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* **2005**, *21*, 7292-7298.
- (47) Badjic, J. D.; Nelson, A.; Cantrill, S. J.; Turnbull, W. B.; Stoddart, J. F. *Accounts of Chemical Research* **2005**, *38*, 723-732.
- (48) Huskens, J.; Mulder, A.; Auletta, T.; Nijhuis, C. A.; Ludden, M. J. W.; Reinhoudt, D. N. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 6784-6797.
- (49) Hook, F.; Kasemo, B.; Nylander, T.; Fant, C.; Sott, K.; Elwing, H. *Anal Chem FIELD Full Journal Title:Analytical chemistry* **2001**, *73*, 5796-5804.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

L'objectif de ce travail de thèse a été le développement d'outils et de méthodes visant à la compréhension ainsi qu'à la quantification de l'impact de la multivalence sur des processus de reconnaissance aux interfaces. Deux aspects ont été développés. Le premier concerne l'exploitation de ligands synthétiques multivalents dans deux phénomènes d'interactions biomoléculaires : les interactions sucre-lectine et ligand peptidique-récepteurs cellulaires. Le second aspect relève d'une nouvelle voie d'élaboration d'assemblages multicouches de biopolymères basée sur des interactions hôte invité. Pour mener à bien ces études, nous avons mis à profit deux techniques complémentaires de caractérisation aux interfaces, la microgravimétrie et la résonance plasmonique de surface. En effet, ces deux méthodes offrent la possibilité de suivre en temps réel et sans marquage des événements interfaciaux.

Après un chapitre I, qui pose les notions et les modèles d'études des interactions multivalentes aux interfaces, nous nous sommes intéressés dans les chapitres II et III à l'étude d'interactions qui sont améliorées par la présentation multiple de ligands offerte par une plateforme moléculaire appelée RAFT. L'étude de la reconnaissance entre la lectine concanavaleine A et les molécules RAFT présentant un ou quatre sucres a été détaillée dans le chapitre II. La possibilité pour les deux partenaires de l'interaction de s'engager dans des interactions multiples, conduit rapidement à l'obtention de systèmes hautement complexes. En effet, trois types d'interactions peuvent coexister lors de l'interaction entre une molécule RAFT multivalente et la lectine multimérique : la lectine peut interagir avec plusieurs RAFT (effet chélatant), un RAFT peut interagir avec plusieurs lectines (effet cluster), et la concentration locale en sucre offerte par un RAFT multivalent peut conditionner l'interaction avec un site de liaison de la lectine (effet de proximité/statistique). Deux approches ont donc été développées pour simplifier les systèmes et se placer dans des cas limites qui permettent l'étude d'un seul type d'interaction. L'immobilisation des RAFT sur une surface conduit au système le plus complexe, puisque dans ce cas les trois effets peuvent coexister. A forte concentration surfacique, l'effet chélatant prédomine, ce qui se traduit par une affinité élevée de la lectine pour la surface saturée en motif sucre. Une dilution des RAFT sur la surface permet de supprimer l'effet chélatant et de montrer que la lectine présente une meilleure affinité pour les surfaces modifiées par les RAFT multivalents. Des expériences d'interactions compétitives de la lectine avec le RAFT multivalent en solution et les sucres immobilisés ont

démontré qu'une molécule RAFT pouvait se lier à plusieurs lectines simultanément (effet cluster). L'immobilisation de la lectine sur une surface conduit à un système simplifié car seuls les effets de proximité/statistique et de cluster sont physiquement possibles. Une dilution de la lectine immobilisée permet alors de supprimer l'effet cluster et de caractériser l'apport de la concentration locale en sucre offerte par les RAFT multivalents. Nous avons ainsi démontré que les deux effets, effet cluster et effet de proximité, permettent une amélioration conséquente de la force de la liaison RAFT-(Man)₄ / Con A par rapport à l'interaction homologue monovalente. Ainsi, la molécule synthétique multivalente RAFT, grâce sa capacité de former des clusters avec les lectines, pourrait être envisagée comme un activateur du signal de transduction.

La présentation multiple de ligands offerte par la plateforme moléculaire RAFT, peut également être mise à profit dans l'analyse de l'interaction entre les peptides -RGD- et des récepteurs cellulaires. Des études visant à la quantification de cette interaction ont été développées dans le chapitre III. Une première approche globale a concerné l'adhésion de cellules, surexprimant le récepteur cible, sur une surface fonctionnalisée par les molécules RAFT-RGD. Les résultats ont permis de mettre en évidence les difficultés, notamment d'adhésion cellulaire non spécifique, liées à ce type d'étude. Ces premières investigations ont ainsi posés les bases des investigations en cours de réalisation au laboratoire consistant en la réalisation d'une surface de ligands -RGD- bio-inerte. Une autre approche concernant plus spécifiquement l'étude de la force de l'interaction entre les ligands RAFT-RGD et le récepteur cellulaire, l'intégrine $\alpha v \beta 3$, a été entreprise. Le mode d'immobilisation choisi de l'intégrine, couplage amine covalent, s'est avéré efficace en permettant de conserver une partie des intégrines active sur la surface. En revanche, le faible poids moléculaire des molécules RAFT-RGD n'a pas rendu possible la quantification de cette interaction par SPR. L'alternative proposée, serait « d'alourdir » la molécule RAFT en l'insérant dans des vésicules. Cette façon de procéder pourrait également être appliquée aux intégrines afin de les inclure dans un environnement proche de leur milieu naturel. De plus, ces vésicules fonctionnalisées rendraient accessible l'immobilisation d'un des deux partenaires en bicouche lipidique supportée pour constituer une surface bio-inerte.

La dernière application des interactions multivalentes présentée dans ce manuscrit (chapitre IV), concerne la formation d'un assemblage supramoléculaire stimuable. Cette étude a démontré, pour la première fois, la faisabilité de la construction de films multicouches basés sur des interactions multivalentes hôte et invité entre deux biopolymères. L'assemblage a été réalisé par dépôt successifs de deux polymères de chitosane, l'un modifié

par des entités adamantane et l'autre par des cavités β -cyclodextrine sur des surfaces présentant différentes densités en groupements adamantyle. La stabilité de l'assemblage est assurée par des interactions multivalentes cyclodextrine-adamantane. La qualité de l'assemblage, quant à elle, dépend de la disponibilité des sites de complexation offerts par chacune des couches, cette disponibilité dépendant elle-même de la densité en groupements adamantyle de la surface initiale. De plus, les deux biopolymères chargés positivement confèrent à l'assemblage des propriétés réversibles de gonflement/dégonflement en réponse à des variations de force ionique et/ou de pH. Ces films multicouches nouveaux, basés sur des complexes d'inclusion, présentent des capacités prometteuses dans le domaine des nano- et bio-matériaux.

Cette thèse, portant sur l'étude des interactions multivalentes dans les processus de reconnaissance interfaciaux, relève d'un réel travail interdisciplinaire. Pour chacune des applications développées, une analyse approfondie a été menée pour la quantification et la compréhension, au niveau moléculaire, des phénomènes mis en jeu.

ANNEXES

Annexe 1 : Partie expérimentale

I. Microbalance à quartz avec suivi de la dissipation d'énergie : QCM-D

I. 1. Appareillage

Les expériences de microgravimétrie ont été réalisées sur un appareil Q-Sense D300. Les quartz d'or (QSX 301 de Q-Sense) et de silice (QSX 303 de Q-Sense) sont recouverts d'or sur chaque face et, pour les quartz de silice, d'une couche de SiO₂ de 40 nm d'épaisseur. La surface active de ces cristaux de quartz est de 0,2 cm².

Les mesures sous flux continu ont été effectuées au moyen d'une pompe péristaltique à 12 galets, de chez Ismatec, modèle ISM 597.

Le principe de fonctionnement de l'appareil a été développé dans le chapitre I.

La modélisation des données par le modèle de Voinova a été réalisée grâce au logiciel Q-Tools (Q-Sense, Suède).

I. 2. Nettoyage des cristaux de quartz

Les quartz ont été nettoyés, entre autre, par un traitement UV-Ozone au moyen d'un appareil UVO-Cleaner n° 42-220 de chez Jelight Company, Inc.

I. 2. 1. Cristaux de quartz recouvert d'une couche d'or

I. 2. 1. 1. Etudes dans le Chapitre II et III : interactions sucre-lectine et RGD-intégrine

Les surfaces ont été systématiquement nettoyées selon le cycle suivant :

- ✓ Rinçage à l'eau milliQ et séchage sous azote
- ✓ Exposition de 10 min à l'UV-Ozone
- ✓ Immersion pendant 15 min dans une solution d'éthanol absolu sous agitation
- ✓ Rinçage à l'éthanol et séchage à l'azote
- ✓ Immersion dans les solutions de fonctionnalisation 0,1 mM en RAFT-Man/Lac (toute la nuit) ou RAFT-RGD ou RAD (15 min)

Les cristaux de quartz sont finalement rincés à l'eau, séchés à l'azote et montés dans la chambre de mesure.

Les surfaces fonctionnalisées ont ensuite été régénérées 4 fois selon le même protocole mais en rajoutant une étape, avant l'immersion dans l'éthanol, de sonication pendant 1 à 2 minutes du cristal de quartz dans une solution d'éthanol absolu.

I. 2. 1. 2. Etudes dans le Chapitre IV : interaction hôte-invité

Les surfaces ont été systématiquement nettoyées selon le protocole suivant :

- ✓ Rinçage à l'eau milliQ et séchage sous azote
- ✓ Exposition de 10 min à l'UV-Ozone
- ✓ Immersion dans une solution 1:1:6 (v/v/v) de NH₃ (25%), d'H₂O₂ (30%) et d'eau milliQ, le tout chauffé à 70°C pendant 10 min
- ✓ Rinçage à l'eau milliQ et séchage à l'azote
- ✓ Immersion dans les solutions mixtes (1mM dans l'éthanol) AD-SH/Et-SH toute la nuit.

Le cristal de quartz est ensuite rincé à l'éthanol, séché et monté dans la chambre de mesure.

I. 2. 2. Cristaux de quartz recouvert d'une fine couche de silice (Chapitre II)

Les surfaces ont été systématiquement nettoyées selon le protocole suivant :

- ✓ Rinçage à l'eau milliQ puis séchage sous azote
- ✓ Exposition de 10 min à l'UV-Ozone
- ✓ Immersion pendant 30 min dans une solution de SDS à 2% sous agitation
- ✓ Rinçage à l'eau milliQ et séchage à l'azote

Le cristal de quartz est ensuite monté dans la chambre pour subir leur fonctionnalisation in-situ, c'est-à-dire immobilisation d'une BLS, de la couche 2D de streptavidine puis finalement l'adhésion des molécules biotinylées RAFT-Man/Lac.

Les surfaces fonctionnalisées ont ensuite été régénérées au maximum 8 fois selon le même cycle de nettoyage.

II. Résonance plasmonique de surface (BIAcore® T100)

II. 1. Appareillage

Les expériences en résonance plasmonique de surface ont été effectuées sur un appareil T100 de chez BIAcore®. Les mesures ont été réalisées à 25 °C. L'ensemble des produits est stocké pendant les différentes études (immobilisation, étude cinétique, test de transport de matière) dans un compartiment à échantillon thermostaté à 10 °C.

Le principe de fonctionnement de l'appareil a été développé dans le chapitre I.

Les sensor chips utilisées C1, CM5 et Au (SIA Au kit), ainsi que le surfactant P20 proviennent de la société BIAcore®. Le détail de ces surfaces est donné dans les chapitres I et II.

II. 2. Etude cinétique en BIAcore®

L'obtention de sensorgrammes corrects et exploitables avec la technique SPR en BIAcore® s'effectue selon un protocole rigoureux.

II. 2. 1. La piste de référence

Les études en BIAcore® utilisent une piste de référence qui va être soustraite à ou aux pistes d'étude. Cette piste de référence doit présenter un état de surface proche des pistes d'étude et doit être inerte à l'analyte injecté et à la solution de régénération.

II. 2. 2. Conservation et régénération de la surface d'étude

Sur les pistes d'étude, il est essentiel de travailler avec un état de surface fonctionnalisé avec le ligand rigoureusement identique tout au long de l'étude. En effet, il faut s'assurer que pour chacune des concentrations injectées en analyte en solution, la surface soit correctement régénérée et surtout sans dégradation (activité des ligands toujours identique). C'est pourquoi avant toute étude cinétique, il est nécessaire de mettre au point une méthode de régénération totale de la surface. Les conditions de régénération établies, l'étude cinétique peut être réalisée ; elle consiste en un cycle d'adsorption/désorption pour différentes concentrations en analyte. Toutefois, pour s'assurer de la conservation et de la bonne régénération de l'état de surface tout au long de l'étude cinétique, une concentration en analyte a systématiquement été

doublée, une première injection au début de la série de concentration et une à la fin de cette série.

II. 2. 3. Suppression des effets tampon

Pour supprimer les effets tampon dus aux changements de viscosité de la solution injectée en analyte en fonction de sa concentration, deux modifications du signal enregistré sur la piste d'étude sont effectuées :

- le signal de la piste de référence est soustrait à ceux enregistrés aux pistes d'étude
- le signal moyenné enregistré lors de l'injection de solutions de concentration nulle est soustrait.

III. *Ellipsomètre à annulation spectroscopique*

Les expériences en ellipsométrie ont été effectuées sur un appareil EP³-SE de la société Nanofilm Technology GmbH.

Le principe de fonctionnement de l'appareil a été développé dans le chapitre I.

Les mesures ont été réalisées à une longueur d'onde λ de 630,2 nm à température ambiante et à des angles d'incidence variables de 50° à 80°.

Les modélisations optiques ont été obtenues en utilisant le logiciel EP3View de la société Nanofilm Technology GmbH. Un modèle « trois couches », substrat/couche organique/air ambiant a été utilisé pour analyser les données. Les propriétés optiques de chacun des cristaux de quartz recouvert d'or ont été, au préalable, mesurés.

IV. *Les autres méthodes de mesures*

- Les clichés de microscopie à transmission électronique des SUV ont été pris par Jean-Luc Putaux du CERMAV, à Grenoble.

- Les mesures en diffusion de la lumière ont été réalisées sur un appareil Zetasizer Nano series de chez Malvern Instrument au CERMAV, à Grenoble avec le concours de Annabelle Varrot.

V. Réactifs et solvants

V. 1. Réactifs

Produit	fournisseur
Anticorps LM 609	Chemicon
Bovine serum albumin	Sigma Aldrich
DPPE cap-biotinylé	Avanti Polar
Chlorure de calcium	VWR prolabo
Chlorure de manganèse	Acros Organics
Chlorure de potassium	Acros organics
Chlorure de sodium	Roth
Concanavoline A	Sigma Aldrich
EDC	BIAcore [®]
Ethanolamine 1 M	BIAcore [®]
HEPES	Euromedex
Hydroxyde de sodium	Laurylab
Intégrines $\alpha v\beta 3$ et $\alpha 5\beta 1$	Chemicon
Mannose	Sigma Aldrich
NHS	BIAcore [®]
Peanut Agglutinine (PNA)	Sigma Aldrich
POPC	Avanti Polar
Sodium dodecyl sulfate	Panreac
Sodium phosphate dibasique	Acros organics
Streptavidine	Sigma Aldrich
Surfactant P20	BIAcore [®]
TP acétate 10 mM	BIAcore [®]
TRIS	Sigma Aldrich
Vitronectine	Chemicon

V. 2. Solvants

Produit	Fournisseur
Acide chlorhydrique	1CN Biomedicals, Inc
Chloroforme HPLC grade	Aldrich
eau	MilliQ
Ethanol absolu	SDS

Annexe 2 : Publications

Ce travail de thèse a fait l'objet de plusieurs publications :

- 1) Angéline Van Der Heyden, Marie Wilczewski, Pierre Labbé et Rachel Auzély, *Chem. Commun.*, **2006**, 3220-3222.

Multilayer films based on host-guest interactions between biocompatible polymers

- 2) Marie Wilczewski, Angéline Van Der Heyden, Olivier Renaudet, Liliane Coche-Guérente, Pascal Dumy et Pierre Labbé, *Organic and Biomolecular Chemistry* accepté avec révisions majeures.

Promotion of sugar – lectin recognition through multiple sugar presentation offered by Regioselectively Addressable Functionalized Templates (RAFT)

- 3) Marie Wilczewski, Angéline Van Der Heyden, Pascal Dumy, Olivier Renaudet, et Pierre Labbé, en cours de préparation.

New insight in the effects induced by multiple ligand on sugar-lectin recognition : a surface plasmon resonance study

RESUME

Titre : Les interactions multivalentes : leurs rôles dans les processus de reconnaissance biomoléculaire et leur application dans la construction d'assemblage supramoléculaire

Ce travail décrit une étude quantitative de plusieurs systèmes de reconnaissance biomoléculaire impliquant des interactions multivalentes.

Deux chapitres sont axés sur l'utilisation de plateformes supramoléculaires cyclodécapeptidiques appelées RAFT (Regioselectively Addressable Functionalized Template) permettant la présentation multiple de ligand saccharidique ou cyclopeptidique. Une étude cinétique et thermodynamique des interactions entre les ligands RAFT-saccharide et une lectine modèle, la concanavoline A, a permis de démontrer que deux mécanismes moléculaires sont à l'origine de la meilleure affinité des RAFT multivalents par rapport à leurs homologues monovalents : d'une part un effet de « proximité-statistique » dû à la concentration locale élevée en motif sucre et d'autre part la capacité des RAFT multivalents à se lier à plusieurs lectines selon un effet « cluster ». Des études préliminaires ont également concerné l'analyse de l'interaction entre RAFT-RGD et des récepteurs cellulaires.

Dans un dernier chapitre, nous avons démontré, pour la première fois, la formation de films multicouches grâce à des interactions de type hôte-invité entre deux biopolymères de chitosane, l'un fonctionnalisés par des cavités β -cyclodextrine et l'autre par des entités adamantane. Bien que la stabilité de l'assemblage soit assurée par des interactions de complexation multivalentes, la croissance de l'assemblage, quant à elle, dépend de la disponibilité des sites de complexation offerts par chacune des couches. De plus, les deux polymères chargés positivement confèrent à l'assemblage des propriétés de gonflement-dégonflement en réponse à des variations de force ionique et pH.

Mots clés : interaction multivalente, bio-fonctionnalisation de surface, interactions sucre-lectine et ligand RGD-récepteur cellulaire, film multicouche, interaction hôte-invité, SPR, QCM-D.

ABSTRACT

Title: Multivalent interactions: their role in biomolecular recognition processes and their application to the construction of supramolecular assembly

This work deals with a quantitative study of several biomolecular recognition systems involving multivalent interactions.

Two chapters focus on the use of supramolecular cyclodecapeptidic platform called RAFT (Regioselectively Addressable Functionalized Template), which allows the presentation of multiple carbohydrate or cyclopeptidic ligands. Kinetic and thermodynamic studies of the interaction between the ligands RAFT-carbohydrate and a model lectin, concanavalin A, have demonstrated that two molecular mechanisms are responsible for the better affinity of multivalent RAFT molecule compared to their monovalent counterparts: on one hand a "proximity-statistical" effect due to the high local concentration of sugar entities and on the other hand thanks to a "cluster effect" which confers the ability of multivalent RAFT to bind several lectins. Preliminary studies have also involved the analysis of the interaction between RAFT-RGD and integrin cell receptors.

In a last chapter, we have demonstrated, for the first time, polymer multilayer formation based on host-guest interaction between two derivatized chitosans biopolymers, one, with β -cyclodextrin cavities and the other with adamantyl moieties. While stability of the self-assembly is conferred by multivalent complexation occurring at each step of the construction, the assembly growth is mainly governed by the availability of the complexation sites offered by each layer. Moreover, the two positively charged polymers confer to the assembly swelling/deswelling properties in response to changes in ionic strength and pH.

Keywords: multivalent interaction, surface bio-functionalization, carbohydrate-lectin and RGD ligand-cell receptor interactions, multilayer film, host-guest interaction, SPR, QCM-D.